

**COMPOSICIONES DE ÁCIDO GRASO DE LIBERACIÓN CONTROLADA PARA
USARSE EN RECONSTRUCCIÓN CORPORAL Y FORMACIÓN DEL CUERPO**

Campo de la Invención

5 La presente invención está dirigida a composiciones que comprenden lípidos metabólicos fisiológicamente aceptables, y compuestos de liberación controlada (CR, por sus siglas en inglés) de preferencia biodegradables fisiológicamente aceptables, en donde los lípidos están
10 libres de células y los compuestos CR liberan los lípidos metabólicos durante un periodo de tiempo retrasado bajo condiciones fisiológicas. Además, la presente invención se refiere al uso de tal composición para producir una composición cosmética o terapéutica, de preferencia para
15 expansión de tejido graso o reparación de tejido graso. Asimismo, la invención se refiere a un método para el tratamiento terapéutico o cosmético de un mamífero, que comprende la administración de la composición de la invención e inyectar preferiblemente la composición mientras se saca la
20 jeringa de inyección hasta que el área tisular de interés sea tratada.

Antecedentes De La Invención

 El tejido graso almacena energía, proporciona aislamiento y define características estructurales
25 exteriores, por ejemplo, en la cara, senos, glúteos o

cualesquiera otras partes del cuerpo que definen forma de mamíferos. Después de los deseos cosméticos existen también aplicaciones terapéuticas para ingeniería y reconstrucción de tejidos grasos, por ejemplo reconstrucción de seno después de
5 mastectomías, distrofia de lípidos inducida por VIH y reconstrucción facial después de trauma.

Los métodos tradicionales para tratar defectos de tejido graso y para aumento de tejido cosmético emplean un material de relleno que reemplaza o agrega volumen a la parte
10 corporal seleccionada. Los materiales de relleno se clasifican en rellenos autólogos y rellenos no autólogos.

La transferencia de grasa autóloga, es decir, aislamiento quirúrgico de células grasas de una parte y reinyección en otra parte del cuerpo, se han practicado desde
15 finales del siglo 19. La transferencia de células grasas autóloga a la cara tiene la ventaja de su naturaleza permanente y las inyecciones a base de grasa autóloga se traducen en una apariencia más suave y brillante del rostro rejuvenecido. Por otro lado, una principal desventaja es la
20 imprevisibilidad de los resultados debido principalmente a las tasas de supervivencia variables de las células adiposas después de inyección. Por ejemplo, para células grasas inyectadas en áreas de tejido graso (por ejemplo, cara o senos), 30-70% mueren, principalmente debido a la ausencia de
25 nutrientes y oxígeno en el estado pre-angiogénico. Otro

problema es la supervivencia de las células grasas durante el aislamiento. Este aspecto ha sido mejorado por un número de técnicas tales como el uso de agujas aspiradas y tratamiento especializado de las células grasas aisladas. Una desventaja
5 adicional de esta técnica es que requiere intervención quirúrgica y cantidades adecuadas de materiales de células grasas autólogas, que no están disponibles para muchos individuos.

Un curso de acción más moderno en la ingeniería de
10 tejido graso es la inyección de células madre derivadas adiposas (ADSC, por su siglas en inglés) que causan proliferación de nuevos adipocitos. Sin embargo, el proceso implica un procedimiento largo, complicado y costoso que incluye liposucción, aislamiento de ADSC de las células
15 adiposas por ultracentrifugación especializada, opcionalmente con el tratamiento de las ADSCs aisladas con factores de diferenciación, y reinyección de células diferenciadas en el tejido objetivo deseado.

Debido al problema de supervivencia de células de
20 las células grasas varios materiales de relleno no celulares fueron contemplados. El colágeno fue el relleno más ampliamente usado en el mercado hasta la emergencia del ácido hialurónico en 2003. El colágeno induce reacciones inmunogénicas leves debido a su origen bovino y esta
25 tecnología llegó a su fin con la concientización emergente

del riesgo de encefalopatía espongiforme bobina (BSE, por sus siglas en inglés). El ácido hialurónico (HA) ha sido usado como un relleno de tejido graso fuera de prescripción durante años incluso a pesar de que fue aprobado por la FDA mucho más

5 tarde en 2003. Se ha vuelto el relleno más dominante en el mercado. El HA comercial moderno es altamente reticulado con compuestos a base de divinilsulfona para vida media incrementada y de origen recombinante más que animal para reducir inmunidad. La principal desventaja del HA es su

10 expectativa de vida ilimitada después de inyección. La mayoría de los rellenos a base de HA tienen una duración de 3 a 12 meses únicamente. Al igual que con los implantes a base de silicón, el uso de HA para aumento de mama puede interferir con la detección del cáncer a base de mamografía.

15 Otros aspectos potenciales relacionados con HA son una frecuencia más alta y riesgo de desarrollo de granulomas, formación de nódulos y mastalgia, palpabilidad de implante, contracción capsular, infecciones superficiales y desarrollo de abscesos.

20 Se ha sabido también que la administración local y sistémica de estrógenos incrementa el tamaño de los senos de las mujeres por inducción de receptores de estradiol de la generación de tejido adiposo. Se ha sabido que la espironolactona induce desarrollo de mama y feminización

25 debido a sus propiedades anti-andrógeno.

Otro enfoque para la generación de tejido adiposo nuevo es el suministro local a largo plazo de insulina y factor de crecimiento tipo insulina-1 (IGF-1) y factor de crecimiento de fibroblastos básicos (bFGF) por microesferas de PLGA/PEG y esto ha sido probado en un modelo de rata *in vivo* (Yuksel et al., Plastic & Reconstructive surgery, volumen 105(5), abril de 2000, 1712-1720), en donde microesferas que contienen insulina e IGF-1 fueron administradas directamente a la fascia muscular profunda de la pared abdominal de ratas para evaluar su potencial para la generación nueva de tejido adiposo a través de diferenciación adipogénica a partir de fondos celulares no adipocíticos. Las microesferas funcionan como compuestos de liberación controlada (CR) que proporcionan un suministro local a largo plazo de las proteínas que inducen la generación nueva de tejido adiposo en el sitio de administración.

En resumen, las técnicas de la técnica anterior para tratar defectos de tejido graso y para el aumento cosmético de tejido graso requieren ya sea la transferencia autóloga de células grasas o células madre derivadas adiposas (ADSC), la administración local de rellenos no permanentes no celulares o, como alternativa, la administración local de factores de diferenciación y crecimiento de adipocitos.

El objetivo de la presente invención es proporcionar una composición para tratar defectos de tejido

graso y para aumento de tejido graso cosmético que sea técnicamente fácil de producir y administrar, que requiera mínima intervención quirúrgica y que sea segura y económica.

En un primer aspecto el problema debajo de la presente invención es resuelto por la provisión de una composición que comprende (i) lípidos metabólicos y fisiológicamente aceptables, y (ii) compuestos de liberación controlada (CR) de preferencia biodegradables y fisiológicamente aceptables, en donde los lípidos metabólicos están libres de células y los compuestos CR liberan los lípidos metabólicos durante un periodo de tiempo retrasado bajo condiciones fisiológicas.

El término liberación controlada (CR), según se usa en la presente, se refiere a la tecnología de formular compuestos activos para controlar la disponibilidad de compuestos activos, por ejemplo, una liberación sincronizada tal como por ejemplo una liberación sostenida (prolongada), una liberación por pulsos, una liberación retrasada, etc., y combinaciones de las mismas. Las aplicaciones CR típicas son fertilizantes, cosméticos y farmacéuticos. Los compuestos CR para usarse en la presente invención son compuestos formulados junto con los lípidos y opcionalmente otros compuestos fisiológicamente activos que retrasan la liberación de los lípidos y compuestos activos en comparación con la ausencia de los compuestos CR cuando se administran a

un ambiente fisiológico, de preferencia una parte tisular de cuerpo humano tal como la cara, senos, glúteos, etc.

Los compuestos CR y lípidos metabólicos para usarse en la invención deben ser fisiológicamente aceptables, es decir, sustancialmente no tóxicos para el tejido tratado. Se prefiere además que los compuestos CR de la invención sean sustancialmente biodegradables, es decir, sean eliminados y de preferencia metabolizados a partir del sitio de administración con el tiempo.

Los compuestos CR liberan los lípidos metabólicos y opcionalmente otros compuestos activos durante un periodo de tiempo retrasado bajo condiciones fisiológicas. Condiciones fisiológicas, según se menciona en la presente en el contexto de la invención, son las condiciones *in vivo* en el sitio tisular de administración, por ejemplo, condiciones de tejido adiposo.

El perfil de liberación de los compuestos CR para los lípidos metabólicos y opcionalmente otros compuestos activos no está limitado y depende de la formulación de la composición así como del tejido objetivo y el modo y frecuencia de administración. Generalmente, una liberación de ráfaga inicial seguida por una liberación en estado uniforme inician el crecimiento y/o proliferación de adipocitos conservado al mismo tiempo un nivel fisiológicamente aceptable de los lípidos metabólicos y los

compuestos activos opcionales deseados.

En una modalidad preferida los compuestos CR liberan los lípidos metabólicos y opcionalmente otros compuestos activos durante un periodo de tiempo retrasado de
5 7 días a 12 meses, de preferencia 30 a 90 días, más preferiblemente 50 a 70 días, muy preferiblemente durante aproximadamente 60 días.

Los lípidos metabólicos para usarse en la composición de la invención están libres de células,
10 significando que no forman parte de células vivas o muertas y que están esencialmente libres de componentes celulares tales como membranas, núcleos, ácidos nucleicos, etc. Los lípidos metabólicos libres de células tienen la ventaja de que son menos inmunogénicos, farmacológicamente seguros y más
15 accesibles a absorción por células tales como las células en el tejido objetivo.

Lipofilicidad se refiere a la capacidad de un compuesto químico para disolverse en grasas, aceites, lípidos y solventes no polares tales como hexano o tolueno. El
20 término lípidos metabólicos según se usa aquí se define como cualquier compuesto que sea lipófilo y que pueda ser ingerido, almacenado y metabolizado para producir energía celular, por ejemplo, ATP, por células, de preferencia por células en tejidos adiposos, muy preferiblemente por
25 adipocitos.

La composición de la invención puede ser administrada localmente, por ejemplo, por inyección, de preferencia varias inyecciones distribuidas uniformemente, en tejidos para tratar defectos de tejido graso y para aumento
5 cosmético de tejido graso.

Los lípidos metabólicos liberados tienen un número de efectos adecuados en el tejido tratado. A diferencia de las células aisladas, por ejemplo, células grasas y ADSC, los lípidos metabólicos son menos inmunogénicos, no comprometen
10 constituyentes dañinos tales como colágeno derivado de bovino (BSE) y pueden ser ingeridos por células objetivo directamente y rápido. El efecto directo y adecuado de la composición de la invención en las células grasas y otras células en el tejido objetivo es que estas células son
15 “superalimentadas” continuamente, llevando a volumen incrementado.

Para ayudar más al crecimiento de tejido objetivo la composición de la invención puede comprender compuestos activos adicionales, de preferencia compuestos efectores de
20 crecimiento de células grasas los cuales incrementarán las células grasas en tamaño y números, es decir, estimularán el crecimiento de células grasas y adipogénesis, es decir, diferenciación celular de pre-adipositos en adipocitos y crecimiento de volumen de adipocitos. En una modalidad que
25 se prefiere más, la composición de la presente invención

comprende al menos un efector de crecimiento de células grasas, de preferencia un efector de crecimiento de células grasas seleccionado del grupo que consiste en

5 a. insulina, proteínas de unión a factor de crecimiento de insulina 1 a 7 (IGFBP 1-7), factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1) y factor de crecimiento de insulina 2 (IGF-2), de preferencia insulina, factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1) y factor de crecimiento de insulina 2 (IFG-2), muy preferiblemente insulina y factor de
10 crecimiento de insulina 1 (IGF-1), más preferiblemente insulina humana;

b. factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), de preferencia FGF-1, FGF-2, FGF-10 y FGF-21, más preferiblemente FGF-1;

15 c. glucocorticoides, seleccionados preferiblemente del grupo que consiste en cortisol, cortisona, prednisona, predinosolona, triamcinolona, metilprednisolona, dexametasona y betametasona, preferiblemente dexametasona y betametasona;

d. activadores de monofosfato de adenosina cíclico
20 (cAMP), seleccionados preferiblemente del grupo que consiste en aminofilina, pentoxifilina, tiofilina, isobutilmetilxantina (IBMX), foscolina y ácido deshidroabiético (DAA), preferiblemente aminofilina, pentoxifilina y teofilina;

25 e. agonistas del receptor γ -2 activado por

proliferador de peroxisomas (PPAR γ 2), de preferencia compuestos de la clase de tiazolidindionas, muy preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en pioglitazona, troglitazona, rosiglitazona e indometacina, de
5 preferencia troglitazona y rosiglitazona;

f. proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), de preferencia BMP-2, BMP-4, BMP-7 y BMP-9, preferiblemente BMP-2 y BMP-4.

Algunos tejidos objetivo comprenden tejido
10 glandular o se ubican adyacentes al tejido glandular, en particular en los senos femeninos. Se prefiere que el tejido glandular adyacente a o que rodee el tejido objetivo crezca junto con el tejido adiposo de tal manera que el resultado total sea más uniforme, natural y estéticamente placentero.

15 En una modalidad más preferida la composición de la invención es una formulada específicamente para el crecimiento de tejido objetivo de mama, que comprende además al menos un efector de crecimiento glandular, preferiblemente un efector de crecimiento glandular mamario, muy
20 preferiblemente un factor de crecimiento glandular seleccionado del grupo que consiste en

a. estradiol y derivados de estradiol, de preferencia seleccionados del grupo que consiste en benzoato de estradiol, estradiol hemihidratado, acetato de estradiol,
25 cipionato de estradiol, valerato de estradiol, etinil

estradiol y 17β -estradiol, muy preferiblemente estradiol y cipionato de estradiol, más preferiblemente 17β -estradiol;

b. factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-C, factor de crecimiento por transformación- α (TGF- α), epiregulina (EPR), epigen, betacelulina (BTC), todas las isoformas de neuregulina-1 (NRG1), heregulina (HRG), factor de crecimiento de actividad de inducción de receptor de acetilcolina (ARIA), factor de crecimiento gial (GGF)), neuregulina-2 (NRG2), neuregulina-3 (NRG3), neuregulina-4 (NRG4), factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF) y antirregulina (AR), de preferencia factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento por transformación- α (TGF- α), neuregulina-4 (NRG4), factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF) y anfiregulina (AR), muy preferiblemente factor de crecimiento epidérmico humano (EGF);

c. antiandrógenos, seleccionados preferiblemente del grupo que consiste en bicalutamida, nilutamida, espironolactona y flutamida, muy preferiblemente espironolactona y flutamida.

En una modalidad más preferida los lípidos metabólicos para usarse en la invención comprenden ácidos grasos, de preferencia ácidos grasos seleccionados del grupo

que consiste en ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido undecanoico, ácido dodecanoico, ácido tridecanoico, ácido tetradecanoico, ácido pentadecanoico, ácido octadecanoico, 5 ácido nonadecanoico, ácido eicosanoico, ácido heneicosanoico, ácido tricosanoico, ácido pentacosanoico, ácido hexacosanoico, ácido heptacosanoico, ácido octocosanoico, ácido nonacosanoico, ácido triacontanoico, ácido henatriacontanoico, ácido dotriacontanoico, ácido 10 tritriacontanoico, ácido tetratriacontanoico, ácido pentatriacontanoico, ácido hexatriacontanoico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido elaidico, ácido vaccénico, ácido linoleico y ácido linoelaídico, preferiblemente ácidos grasos seleccionados del grupo que 15 consiste en ácido octadecanoico, ácido dodecanoico, más preferiblemente ácido octadecanoico.

En una modalidad más preferida los compuestos CR de preferencia biodegradables y fisiológicamente aceptables para usarse en la invención se seleccionan del grupo que consiste 20 en ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliláctico (PLA), policaprolactona (PCL), poloxámeros, co-polímeros de polietilenglicol (PEG)-PLGA, combinaciones de PEG y PLGA, combinaciones de PLA y PEG, de preferencia PLA-PEG-PLA, combinaciones de PLGA y poloxámeros, dextrano, alginato y 25 polimetacrilato, preferiblemente combinaciones de PLA, PLGA y

PEG-PLGA, más preferiblemente PLGA y PLA, muy preferiblemente PLGA.

5 A continuación, se describen las modalidades más preferidas pero no limitativas de las composiciones de la invención.

En una modalidad más preferida la presente invención enseña una composición, de preferencia sin efectores de crecimiento de células grasas o efectores de crecimiento glandular, que comprende microesferas biodegradables de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y opcionalmente vitamina C y/o E, que comprende preferiblemente

(i) PLGA con un peso molecular de 21,000 Da y la relación de ácido láctico y ácido glicólico de aproximadamente 1:1,

15 (ii) vitamina C y/o E.

En una modalidad que se prefiere más y adicional, la presente invención enseña una composición con al menos un efector de crecimiento de células grasas, que comprende microesferas biodegradables de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), insulina, FGF-1, rosiglitazona, betametasona y opcionalmente vitamina C y/o E, que comprende de preferencia

(i) PLGA con un peso molecular de 21,000 Da y una relación de ácido láctico y ácido glicólico de aproximadamente 1:1,

(ii) insulina recombinante humana, FGF-1, rosiglitazona, betametasona y vitamina C y/o E.

En una modalidad que se prefiere todavía más y
5 adicional, la presente invención enseña una composición, de preferencia para el tratamiento de senos, con al menos un efector de crecimiento de células grasas y al menos un factor de crecimiento glandular, que comprende microesferas biodegradables ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA),
10 insulina, FGF-1, rosiglitazona, betametasona, EGF-1, espironolactona, estradiol y opcionalmente vitamina C y/o E, que comprende preferiblemente

(i) PLGA con un peso molecular de 21,000 Da y una relación de ácido láctico y ácido glicólico de
15 aproximadamente 1:1,

(ii) insulina recombinante humana, FGF-1, rosiglitazona, betametasona, EGF-1, espironolactona, estradiol y vitamina C y/o E.

En una modalidad más preferida y adicional la
20 presente invención enseña una composición, de preferencia para tratamiento facial, con al menos un efector de crecimiento de células grasas y al menos un factor de crecimiento estrogénico, que comprende microesferas biodegradables ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA),
25 insulina, FGF-1, rosiglitazona, betametasona, estradiol y

opcionalmente vitamina C y/o E, de preferencia que comprende:

(i) PLGA con un peso molecular de 21,000 Da y una relación de ácido láctico y ácido glicólico de aproximadamente 1:1,

5 (ii) insulina recombinante humana, FGF-1, rosiglitazona, betametasona, espironolactona, estradiol y vitamina C y/o E.

Las composiciones de la invención son para usarse en el tratamiento terapéutico o cosmético, y opcionalmente
10 pueden comprender excipientes y diluyentes fisiológicamente aceptables adicionales.

Por lo tanto, en un aspecto más, la presente invención se refiere al uso de una composición de la invención en la producción de una composición cosmética o
15 terapéutica, de preferencia para la expansión de tejido graso o reparación de tejido graso.

En una modalidad preferida la composición de la invención es para usarse en la expansión del tejido graso, preferiblemente expansión de volumen de tejido graso, muy
20 preferiblemente de tejidos de la cara, las glúteos y/o senos.

En una modalidad más preferida la composición de la invención es para usarse en el tratamiento terapéutico o cosmético de una condición seleccionada del grupo que consiste en

25 (i) indicaciones médicas seleccionadas del grupo

que consiste en deformidades corporales, de preferencia cicatrices post-traumáticas, reconstrucción de senos y depresiones de tejidos suaves; deformidades congénitas, de preferencia deformidad de *pectus excavatum*, asimetría de
 5 senos (por ejemplo, síndrome de Polonia), hemisíndromes (por ejemplo, síndrome CLOVE, síndrome de Romberg); deformidades cerca de prótesis, defectos de muslos después de radiación de recontorno, lipodistrofia por VIH, insuficiencia velofaríngea leve; y

10 (ii) indicaciones no médicas seleccionadas del grupo que consiste en aumento de tejido graso cosmético, de preferencia aumento de tejido graso de senos, glúteos, caras, genitales, manos y piernas, y deformidades iatrogénicas, de preferencia irregularidades peri-protésicas, deformidades por
 15 liposucción y deformidades por implantes.

En una modalidad más preferida, la composición de la invención es para usarse en el tratamiento terapéutico o cosmético de una indicación médica para reconstrucción de seno post-mastectomía o para aumento de senos o glúteos.

20 En una modalidad que se prefiere más y adicional, la composición de la invención es para usarse en el tratamiento terapéutico o cosmético de una condición seleccionada del grupo que consiste en (I) indicaciones médicas seleccionadas del grupo que consiste en
 25 reconstrucción facial después de trauma y deformidades, de

preferencia cicatrices de acné, lipodistrofia inducida por VIH, cicatrices; y (II) indicaciones no médicas seleccionadas del grupo que consiste en aumento facial cosmético, de preferencia en cachetes, cejas, frente, glabella, labios, 5 líneas de Marionette, pliegues nasolabiales, nariz, arrugas perioculares y deformidad de párpados hundidos.

Un aspecto más de la presente invención está dirigida a un método para el tratamiento cosmético o terapéutico de un mamífero, de preferencia un humano, muy 10 preferiblemente un tratamiento cosmético o terapéutico de una de las condiciones cosméticas y terapéuticas citadas arriba, que comprende las etapas de

- (i) proporcionar una composición de la invención,
- (ii) administrar opcionalmente anestesia localmente 15 al tejido que será tratado,
- (iii) administración por inyección de la composición y de preferencia inyectar la composición mientras se retira la aguja de inyección,
- (iv) opcionalmente repetir la etapa (iii) hasta que 20 el tejido completo sea tratado.

A continuación se ilustrará más la invención a manera de modalidades específicas, ninguna de las cuales se debe interpretar como limitando el alcance de las reivindicaciones anexas.

La figura 1A es un dibujo esquemático de una vista lateral de una inserción de cánula de punta roma en un seno que muestra que alícuotas pequeñas de composición líquida de acuerdo con la invención son liberadas mientras la aguja es
5 retirada continuamente.

La figura 1B es un dibujo esquemático de una vista superior de un seno en donde la aguja es insertada desde ya sea uno de dos puntos en el margen de la areola o uno de dos puntos en el pliegue inflamamario en direcciones y planos
10 variables para lograr una distribución difusa y uniforme.

La figura 2 muestra una gráfica que ilustra la concentración de triglicéridos absorbidos por células 3T3-L1 (P9) después de incubación junto con un número de diferentes composiciones de compuestos ácido graso-CR de acuerdo con la
15 invención, en donde los compuestos CR controlan la liberación de los ácidos grasos co-formulados. Los asteriscos representan el significado estadístico con referencia al control. El procedimiento detallado fue de acuerdo con el ejemplo 11. El control consistió en microesferas vacías
20 hechas de acuerdo con el ejemplo 5.

La figura 3 muestra una gráfica que ilustra la concentración de triglicéridos en células 3T3-L1 (P9) en donde células 3T3-L1 no diferenciadas fueron tratadas con PLGA-insulina + PLGA-dexametasona y comparadas contra células
25 tratadas con medio de cultivo celular + microesferas de PLGA

vacías (control). Después de los dos días de introducir esto cada uno de los grupos fue tratado con medio que tiene insulina. El procedimiento detallado es según el ejemplo 12. La composición designada microesferas se produjo de acuerdo con los ejemplos 4, 6 y 8. La composición designada control se produjo de acuerdo con el ejemplo 5.

La figura 4 muestra una gráfica que asigna el volumen de almohadillas grasas inguinales a ratones desnudos Balb-c sin tratamiento (naives, control), con portador CMC inyectado (control), con microesferas vacías de acuerdo con el ejemplo 5 inyectadas (vacías, control). *#\$ representa significado estadístico en comparación con control.

La figura 5 muestra una gráfica que asigna el volumen de almohadillas grasas inguinales de ratones desnudos BalB-C sin tratamiento (naives, control), con portador CMC inyectado (control), con microesferas vacías de acuerdo con el ejemplo 5 inyectadas (vacías, control). *#\$ representa significado estadístico en comparación con control.

Las figuras 6A y 6B muestran fotografías de barrido CT de almohadillas de grasa inguinal tratadas con las microesferas de PLGA de acuerdo con el ejemplo 13, 15 días después del tratamiento con microesferas de PLGA sin ácido oleico (Figura 6A).

Ejemplo 1 - Composiciones de la invención

Los intervalos citados para cada constituyente de

las composiciones abajo se refieren a las cantidades y unidades de actividad de cada compuesto en una composición para tratar un área de tejido en un paciente y se entiende que las cantidades y unidades de actividad variarán con el
5 paciente, el tejido objetivo particular, el área y volumen superficial de tejido, la condición que será tratada, el efecto a ser obtenido, etc.

Composición A

(i) 100-200 g de microesferas de PLGA
10 biodegradables con un peso molecular de 21,000 Da y una relación de ácido láctico y ácido glicólico de aproximadamente 1:1;

(ii) 2-20 mg de vitamina C y/o E.

La composición A está particularmente adecuada para
15 el aumento temporal de tejido graso toda vez que carece de efectores de crecimiento de células grasas y después de cierto tiempo el resultado del aumento ha pasado, por ejemplo, semanas a meses, las células superalimentadas y de volumen aumentado es probable que usen o suministren los
20 lípidos metabólicos a otras células. El efecto de la vitamina E es que sirve como un conservador y antioxidante especialmente para los componentes a base de lípidos en la formulación.

Composición B

25 (i) 100-200 g de microesferas de PLGA

biodegradables con un peso molecular de 21,000 Da y una relación de ácido láctico y ácido glicólico de aproximadamente 1:1;

- (ii) 50-100 UI de insulina recombinante humana;
- 5 (iii) 200-400 µg de FGF-1;
- (iv) 2-10 mg de rosiglitazona;
- (v) 1,000-2,000 µg de betametasona y
- (vi) 2-20 mg de vitamina C y/o E.

La composición B es particularmente adecuada para
 10 aumento permanente de tejido adiposo toda vez que incluye factores de crecimiento de células grasas (ii) a (v) que estimula adipogénesis, es decir, la diferenciación celular de pre-adipocitos a adipocitos y la proliferación de adipocitos.

Composición C

- 15 (i) 100-200 g de microesferas de PLGA biodegradables con un peso molecular de 21,000 Da y una relación de ácido láctico y ácido glicólico de aproximadamente 1:1;
- (ii) 50-100 UI de insulina recombinante humana;
- 20 (iii) 200-400 µg de FGF-1;
- (iv) 2-10 mg de rosiglitazona;
- (v) 1,000-2,000 µg de betametasona y
- (vi) 200-400 µg de EGF-1;
- (vii) 50-200 mg de espironolactona;
- 25 (viii) 2-4 mg 17γ-estradiol y

(ix) 2-20 mg de vitamina C y/o E.

La composición C es particularmente adecuada para el aumento de tejido adiposo de senos toda vez que incluye factores de crecimiento de células grasas (ii) a (iv) que
 5 estimulan adipogénesis y, además, los factores de crecimiento glandular (vi) a (viii) que promueven el crecimiento de glándulas mamarias.

Composición D

(i) 100-200 g de microesferas PLGA biodegradables
 10 con un peso molecular de 21,000 Da y una relación de ácido láctico y ácido glicólico de aproximadamente 1:1;

(ii) 1-2 UI de insulina recombinante humana;

(iii) 4-8 µg de FGF-1;

(iv) 40-200 mg de rosiglitazona

15 (v) 20-140 µg de betametasona;

(vi) 0-4 17γ-estradiol (0 mg para hombre, 0-1 mg para mujeres pre-menopáusicas, 2-4 mg para mujeres post-menopáusicas)

(vii) 2-20 mg de vitamina C y/o E.

20 La composición D es particularmente adecuada para el aumento de tejido adiposo facial toda vez que incluye factores de crecimiento de células grasas (ii) a (v) que estimulan adipogénesis y, además, estradiol que interactúa con el receptor de estrógenos en los fibroblastos residentes
 25 en la piel y estimula la formación de colágeno.

Ejemplo 2 - Método de la invención

A continuación se describen dos métodos para practicar la invención.

Método A

- 5 (i) proporcionar una composición de la invención, en particular una de las composiciones A a D,
- (ii) aplicación de anestesia local al área tisular objetivo, en particular cara, senos o glúteos,
- (iii) producir incisiones con un tamaño de 1 mm en
10 el área objetivo a intervalos regulares para planos de distribución cruzados y superpuestos,
- (iv) producir varias inyecciones distribuidas uniformemente con la composición en una jeringa equipada con una aguja de punta de espuma calibre 15-30 o una cánula con
15 puntas en V agudas mientras se retira, produciendo así depósitos verticales a lo largo del canal de inyección,
- (v) repetir la etapa (iv) hasta que el área objetivo completa sea cubierta uniformemente.

Método B

- 20 (i) proporcionar una composición de la invención, en particular una de las composiciones A a D,
- (ii) aplicación de anestesia tópica o regional incluyendo los bloques nerviosos al área tisular objetivo, en particular cara, senos o glúteos,
- 25 (iii) insertar una aguja de punta roma calibre 15-

30 de una jeringa que comprende la composición a una profundidad tisular adecuada en un punto de inyección primario,

(iv) cuando la aguja sea retirada, administrar la
5 composición de una manera lenta y continua hasta que la aguja sea completamente extraída de la piel o, alternativamente, la dirección de la aguja sea cambiada continuamente en una forma radial y se inyecten nuevas líneas sin retirar hasta que toda el área objetivo sea cubierta,

10 (v) inyectar una serie de hilos en un punto secundario perpendicular al punto de inyección primario para proporcionar una mejor cobertura de áreas objetivo más grandes,

(vi) las etapas (ii) a (v) pueden repetirse en
15 varias áreas objetivo, en particular en áreas objetivo faciales.

Ejemplo 3 - Técnica de inyección de la invención

La técnica de inyección preferida para administrar las composiciones de la invención es similar a las técnicas
20 de transferencia de grasa autólogas usadas por los cirujanos y se describe con referencia a las figuras 1A y 1B.

Los principios básicos detrás de la técnica de inyección anterior de las figuras 1A y 1B es distribuir uniformemente la composición de la invención a lo largo del
25 tejido objetivo con el fin de proporcionar varios depósitos

de lípidos metabólicos distribuidos uniformemente controlados en su liberación por los compuestos CR co-formulados para asegurar una difusión uniforme de los lípidos metabólicos y los compuestos efectores opcionales a lo largo del área
 5 objetivo. Las microesferas biodegradables preferidas son de forma y tamaños similares a las células grasas.

Los volúmenes de inyección que se prefieren pueden variar entre 0.1 mL y 500 mL, toda vez que estos dependen del sitio de inyección, elección del paciente y cirujano.
 10 Durante la cesión de inyección se liberan pequeños volúmenes a intervalos regulares para permitir configuración en 3D y para evitar la formación de quistes. Las áreas objetivo de inyección son de preferencia masajeadas para asegurar una distribución uniforme y para evitar la formación de quistes
 15 también.

Ejemplo 4 - Síntesis de microesferas de PLGA-ácidos grasos

1. Ácido poli(láctico-co-glicólico) 50:50 (30,000-60,000) o ácido poli(láctico-co-glicólico) 65:35 (40,000-
 20 75,000) o ácido poli(lacti-co-glicólico) 85:15 (50,000-75,000) se obtuvieron de Sigma Aldrich. Se pesaron 200 mg del polímero en una balanza y se disolvieron en diclorometano grado HPLC. Esta mezcla se agitó a 500 rpm.

2. Una vez que el polímero se había disuelto
 25 completamente, 100 µL del ácido graso de interés se añadieron

a la solución de diclorometano mientras se centrifugaba.

3. 95% mL de una solución de alcohol polivinílico al 4% (PVA) (M_w 89,000-98,000, 99+% hidrolizado) se introdujeron en un vaso de precipitados de 200 mL y se
5 homogeneizaron usando un instrumento ultra turrax digital IKA T25 equipado con un elemento de dispersión S 25 N-10 G.

4. La velocidad de homogeneización se fijó en 6,000 RPM y mientras la solución estaba siendo homogeneizada, la solución de diclorometano con la mezcla se añadió a la
10 solución de PVA por goteo.

5. Esta mezcla se dejó homogeneizar durante 5 minutos.

6. Esta solución homogeneizada se añadió a 300 mL de PVA al 0.5% que estaba siendo agitado a 700 RPM.

15 7. El solvente se dejó evaporar durante 4 horas dando como resultado la formación de microesferas y su endurecimiento.

8. La solución de PVA que contenía las microesferas fue centrifugada a 8,000 RPM y lavada durante 3 veces
20 consecutivas con agua destilada doble.

9. El sobrenadante fue recolectado antes del primer lavado para análisis.

10. Las microesferas que estaban en la pelletilla se resuspendieron en 3 mL de agua destilada doble.

25 11. Estas microesferas resuspendidas se pusieron a

través de liofilización durante 12 horas.

12. Microscopia y/o contador coulter se usaron para determinar el tamaño de las microesferas que estaban entre 10-50 micras.

5 13. El sobrenadante recolectado se usó para obtener la cantidad total de ácido graso que estaba encapsulado. La eficiencia de encapsulamiento fue entre 10-90%.

10 14. El polvo de microesferas se resuspendió en una solución al 2% de carboximetilcelulosa (Pm 90,000, sigma Aldrich) y se remolinó vigorosamente. La solución se remolinó antes de inyectarla en ratones o introducirla en cultivo celular.

Ejemplo 5 - Síntesis de microesferas de PLGA (vacías)

15 1. Ácido poli(láctico-co-glicólico) 50:50 (30,000-60,000) o ácido poli(láctico-co-glicólico) 65:35 (40,000-75,000) o ácido poli(lacti-co-glicólico) 85:15 (50,000-75,000) se obtuvieron de Sigma Aldrich. Se pesaron 200 mg del polímero en una balanza y se disolvieron en diclorometano
20 grado HPLC. Esta mezcla se agitó a 500 RPM.

2. 95 mL de una solución al 4% de alcohol polivinílico (PVA) (Pm 89,000-98,000, 99+% hidrolizado) se introdujeron en un vaso de precipitado de 200 mL y se homogeneizaron usando un instrumento ultra turrax digital IKA
25 T25 equipado con un elemento de dispersión S 25 N-10 G.

3. La velocidad de homogeneización se fijó en 6,000 RPM y mientras la solución estaba siendo homogeneizada, la solución de diclorometano con la mezcla se añadió a la solución de PVA por goteo.

5 4. Esta mezcla se dejó homogeneizar durante 5 minutos.

5. Esta solución homogeneizada se añadió a 300 mL de PVA al 0.5% que estaba siendo agitado a 700 RPM.

10 6. El solvente se dejó evaporar durante 4 horas dando como resultado la formación de microesferas y su endurecimiento.

7. La solución de PVA que contenía las microesferas fue centrifugada a 8,000 RPM y lavada durante 3 veces consecutivas con agua destilada doble.

15 8. Las microesferas que estaban en la pelletilla se resuspendieron en 3 mL de agua destilada doble.

9. Estas microesferas resuspendidas se pusieron a través de liofilización durante 12 horas.

20 10. Microscopia y/o contador coulter se usaron para determinar el tamaño de las microesferas que estaban entre 10-50 micras.

25 11. El polvo de microesferas se resuspendió en una solución al 2% de carboximetilcelulosa (Pm 90,000, sigma Aldrich) y se remolinó vigorosamente. La solución se remolinó antes de inyectarla en ratones.

Ejemplo 6 - Síntesis de microesferas de PLGA-dexametasona

1. Ácido poli(láctico-co-glicólico) 50:50 (30,000-60,000) o ácido poli(láctico-co-glicólico) 65:35 (40,000-75,000) o ácido poli(lacti-co-glicólico) 85:15 (50,000-75,000) se obtuvieron de Sigma Aldrich. Se pesaron 200 mg del polímero en una balanza y se disolvieron en diclorometano grado HPLC. Esta mezcla se agitó a 500 RPM.
2. Después de que el polímero se había disuelto completamente, se añadieron y se disolvieron completamente 100 mg de dexametasona (Sigma Aldrich).
3. 95 mL de una solución al 4% de alcohol polivinílico (PVA) (Pm 89,000-98,000, 99+% hidrolizado) se introdujeron en un vaso de precipitado de 200 mL y se homogeneizaron usando un instrumento ultra turrax digital IKA T25 equipado con un elemento de dispersión S 25 N-10 G.
4. La velocidad de homogeneización se fijó en 6,000 RPM y mientras la solución estaba siendo homogeneizada, la solución de diclorometano con la mezcla se añadió a la solución de PVA por goteo.
5. Esta mezcla se dejó homogeneizar durante 5 minutos.
6. Esta solución homogeneizada se añadió a 300 mL de PVA al 0.5% que estaba siendo agitado a 700 RPM.
7. El solvente se dejó evaporar durante 4 horas

dando como resultado la formación de microesferas y su endurecimiento.

8. La solución de PVA que contenía las microesferas fue centrifugada a 8,000 RPM y lavada durante 3 veces
5 consecutivas con agua destilada doble.

9. Las microesferas que estaban en la pelotilla se resuspendieron en 3 mL de agua destilada doble.

10. Estas microesferas resuspendidas se pusieron a través de liofilización durante 12 horas.

11. Microscopia y/o contador coulter se usaron para determinar el tamaño de las microesferas que estaban entre
10-50 micras.

12. Una muestra de microesferas se degradó con una solución diluida de álcali, el sobrenadante se analizó usando
15 una placa transparente de UV a 241 nm y se comparó con una curva estándar adecuadamente construida. La eficiencia de encapsulación fue de aproximadamente 2-10%.

13. El polvo de microesferas se resuspendió en una solución al 2% de carboximetilcelulosa (Pm 90,000, sigma
20 Aldrich) y se remolinó vigorosamente. La solución se remolinó antes de inyectarla en ratones.

Ejemplo 7 - Síntesis de microesferas de PLA-ácidos grasos

1. Poli(L-láctido) (PLA) M_n promedio 50:50 fue
25 obtenido de Sigma Aldrich. Se pesaron 200 mg del polímero en

una balanza y se disolvieron en diclorometano grado HPLC. Esta mezcla se agitó a 500 rpm.

2. Una vez que el polímero se había disuelto completamente, 100 μ L del ácido graso de interés se añadieron
5 a la solución de diclorometano mientras se centrifugaba.

3. 95% mL de una solución de alcohol polivinílico al 4% (PVA) (P_m 89,000-98,000, 99+% hidrolizado) se introdujeron en un vaso de precipitados de 200 mL y se homogeneizaron usando un instrumento ultra turrax digital IKA
10 T25 equipado con un elemento de dispersión S 25 N-10 G.

4. La velocidad de homogeneización se fijó en 6,000 RPM y mientras la solución estaba siendo homogeneizada, la solución de diclorometano con la mezcla se añadió a la solución de PVA por goteo para formar la emulsión WOW.

15 5. Esta mezcla se dejó homogeneizar durante 5 minutos.

6. Esta solución homogeneizada se añadió a 300 mL de PVA al 0.5% que estaba siendo agitado a 700 RPM.

20 7. El solvente se dejó evaporar durante 4 horas dando como resultado la formación de microesferas y su endurecimiento.

8. La solución de PVA que contenía las microesferas fue centrifugada a 8,000 RPM y lavada durante 3 veces consecutivas con agua destilada doble.

25 9. El sobrenadante fue recolectado antes del primer

lavado para análisis.

10. Las microesferas que estaban en la pelotilla se resuspendieron en 3 mL de agua destilada doble.

11. Estas microesferas resuspendidas se pusieron a
5 través de liofilización durante 12 horas.

12. Microscopia y/o contador coulter se usaron para determinar el tamaño de las microesferas que estaban entre 10-50 micras.

13. El sobrenadante recolectado se usó para obtener
10 la cantidad total de ácido graso que estaba encapsulado. La eficiencia de encapsulamiento fue entre 10-90% con un promedio de aproximadamente 45%.

14. El polvo de microesferas se resuspendió en una solución al 2% de carboximetilcelulosa (Pm 90,000, sigma
15 Aldrich) y se remolinó vigorosamente. La solución se remolinó antes de inyectarla en ratones o introducirla en cultivo celular.

Ejemplo 8 - Síntesis de microesferas de PLGA que encapsulan insulina

20 1. Ácido poli(láctico-co-glicólico) 50:50 (30,000-60,000) o ácido poli(láctico-co-glicólico) 65:35 (40,000-75,000) o ácido poli(lacti-co-glicólico) 85:15 (50,000-75,000) se obtuvieron de Sigma Aldrich.

2. Se pesaron 200 mg del polímero en una balanza y
25 se disolvieron en diclorometano grado HPLC. Esta mezcla se

agitó a 500 rpm.

3. Insulina humana recombinante (Sigma Aldrich) se disolvió en solución HCl diluida 0.1 M de pH 2.

4. Después de que el polímero se disolvió por completo, la solución se introdujo en un vaso de precipitados usando un instrumento ultra turrax (instrumento digital ultra turrax IKA T25 equipado con un elemento de dispersión S 25 N-10 G). La solución de insulina equivalente a 50 mg fue añadida por goteo para obtener una emulsión de agua en aceite (WO).

5. 95% mL de una solución de alcohol polivinílico al 4% (PVA) (P_m 89,000-98,000, 99+% hidrolizado) se introdujeron en un vaso de precipitados de 200 mL y se homogeneizaron usando un instrumento ultra turrax digital IKA T25 equipado con un elemento de dispersión S 25 N-10 G.

6. La velocidad de homogeneización se fijó en 6,000 RPM y mientras la solución estaba siendo homogeneizada, la solución de diclorometano con la mezcla se añadió a la solución de PVA por goteo.

7. Esta mezcla se dejó homogeneizar durante 5 minutos.

8. Esta solución homogeneizada se añadió a 300 mL de PVA al 0.5% que estaba siendo agitado a 700 RPM.

9. El solvente se dejó evaporar durante 4 horas dando como resultado la formación de microesferas y su

endurecimiento.

10. La solución de PVA que contenía las microesferas fue centrifugada a 8,000 RPM y lavada durante 3 veces consecutivas con agua destilada doble.

5 11. El sobrenadante fue recolectado antes del primer lavado para análisis.

12. Las microesferas que estaban en la pelletilla se resuspendieron en 3 mL de agua destilada doble.

10 13. Estas microesferas resuspendidas se pusieron a través de liofilización durante 12 horas.

14. Microscopia y/o contador coulter se usaron para determinar el tamaño de las microesferas que estaban entre 10-50 micras.

15 15. Una porción de las microesferas fue degradada usando álcali diluido durante la noche y el sobrenadante se usó para cuantificar la cantidad de insulina encapsulada usando un ensayo BCA (Binchoninic acid assay).

20 16. El polvo de microesferas se resuspendió en una solución al 25% de carboximetilcelulosa (Pm 90,000, Sigma Aldrich) y se remolinó vigorosamente. La solución se remolinó antes de inyectar en ratones o introducir en cultivo celular.

Ejemplo 9 - Síntesis de microesferas de PEG-PLGA-ácidos grasos

25 1. Éter metílico de poli(etilenglicol)-bloque-

poli(láctido-co-glicólido), PEG promedio M_n , 5,000, PLGA M_n 55,000 se obtuvo de Sigma Aldrich. Se pesaron 200 mg del polímero en una balanza y se disolvieron en diclorometano grado HPLC. Esta mezcla se agitó a 500 RPM.

5 2. Una vez que el polímero se había disuelto completamente, se añadieron a la solución de diclorometano mientras se centrifugaba, 100 μ l del ácido graso de interés se añadió a la solución de diclorometano mientras se centrifugaba.

10 3. 95% mL de una solución de alcohol polivinílico al 4% (PVA) (P_m 89,000-98,000, 99+% hidrolizado) se introdujeron en un vaso de precipitados de 200 mL y se homogeneizaron usando un instrumento ultra turrax digital IKA T25 equipado con un elemento de dispersión S 25 N-10 G.

15 4. La velocidad de homogeneización se fijó en 6,000 RPM y mientras la solución estaba siendo homogeneizada, la solución de diclorometano con la mezcla se añadió a la solución de PVA por goteo.

20 5. Esta mezcla se dejó homogeneizar durante 5 minutos.

6. Esta solución homogeneizada se añadió a 300 mL de PVA al 0.5% que estaba siendo agitado a 700 RPM.

25 7. El solvente se dejó evaporar durante 4 horas dando como resultado la formación de microesferas y su endurecimiento.

8. La solución de PVA que contenía las microesferas fue centrifugada a 8,000 RPM y lavada durante 3 veces consecutivas con agua destilada doble.

9. El sobrenadante fue recolectado antes del primer lavado para análisis.

10. Las microesferas que estaban en la pelletilla se resuspendieron en 3 mL de agua destilada doble.

11. Estas microesferas resuspendidas se pusieron a través de liofilización durante 12 horas.

12. Microscopia y/o contador coulter se usaron para determinar el tamaño de las microesferas que estaban entre 10-50 micras.

13. El sobrenadante recolectado se usó para obtener la cantidad total de ácido graso que estaba encapsulado. La eficiencia de encapsulamiento fue entre 10-90%.

14. El polvo de microesferas se resuspendió en una solución al 2% de carboximetilcelulosa (Pm 90,000, sigma Aldrich) y se remolinó vigorosamente. La solución se remolinó antes de inyectarla en ratones o introducirla en cultivo celular.

Ejemplo 10 - Síntesis de microesferas de PEG-PLGA-ácidos grasos de PEG

1. Poli(láctido-co-glicólido)-bloque-poli(etilenglicol)-bloque-poli(láctido-co-glicólido), M_n , promedio (1100-1000-1100) se obtuvo de Sigma Aldrich. Se

pesaron 200 mg del polímero en una balanza y se disolvieron en diclorometano grado HPLC. Esta mezcla se agitó a 500 RPM.

2. Una vez que el polímero se había disuelto completamente, se añadieron a la solución de diclorometano
5 mientras se centrifugaba, 100 μ l del ácido graso de interés se añadió a la solución de diclorometano mientras se centrifugaba.

3. 95% mL de una solución de alcohol polivinílico al 4% (PVA) (M_w 89,000-98,000, 99+% hidrolizado) se
10 introdujeron en un vaso de precipitados de 200 mL y se homogeneizaron usando un instrumento ultra turrax digital IKA T25 equipado con un elemento de dispersión S 25 N-10 G.

4. La velocidad de homogeneización se fijó en 6,000 RPM y mientras la solución estaba siendo homogeneizada, la
15 solución de diclorometano con la mezcla se añadió a la solución de PVA por goteo.

5. Esta mezcla se dejó homogeneizar durante 5 minutos.

6. Esta solución homogeneizada se añadió a 300 mL
20 de PVA al 0.5% que estaba siendo agitado a 700 RPM.

7. El solvente se dejó evaporar durante 4 horas dando como resultado la formación de microesferas y su endurecimiento.

8. La solución de PVA que contenía las microesferas
25 fue centrifugada a 8,000 RPM y lavada durante 3 veces

consecutivas con agua destilada doble.

9. El sobrenadante fue recolectado antes del primer lavado para análisis.

10. Las microesferas que estaban en la pelotilla se
5 resuspendieron en 3 mL de agua destilada doble.

11. Estas microesferas resuspendidas se pusieron a través de liofilización durante 12 horas.

12. Microscopia y/o contador coulter se usaron para determinar el tamaño de las microesferas que estaban entre
10 10-50 micras.

13. El sobrenadante recolectado se usó para obtener la cantidad total de ácido graso que estaba encapsulado. La eficiencia de encapsulamiento fue entre 10-90%.

14. El polvo de microesferas se resuspendió en una
15 solución al 2% de carboximetilcelulosa (Pm 90,000, sigma Aldrich) y se remolinó vigorosamente. La solución se remolinó antes de inyectarla en ratones o introducirla en cultivo celular.

Ejemplo 11 - Absorción *in vitro* de diferentes 20 composiciones de compuestos CR/ácido graso

3T3-L1 es una línea celular derivada de células 3T3 (ratón) que se usa comúnmente en la investigación biológica sobre tejido adiposo. Esta línea celular es generalmente aceptada como un modelo de células predecible para
25 investigación de células grasas. Células 3T3-L1 (P9) (ATCC,

Alemania) fueron sembradas a 25,000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Estas células se dejaron lograr confluencia durante 2 días. El medio se cambió de DMEM (10% de suero + estreptomycin (100U) + penicilina (0.1 mg/ml))

5 (todo obtenido de Gibco, Suiza) a DMEM (10% de suero + insulina + dexametasona estreptomycin (100U) + penicilina (0.1 mg/ml)). Después de dos días este medio se cargó a DMEM (10% de suero + insulina estreptomycin (100U) + penicilina (0.1 mg/ml) + x). Los ácidos grasos se añadieron a cada

10 pocillo a una concentración de 20 μ M. En el caso del control, se añadieron microesferas vacías a la misma concentración aproximada de polímero (5 mg/pocillo), ejemplo 5. En todos los casos, el intervalo de tamaño de las microesferas se mantuvo por arriba de 10 micras. El medio se

15 cambió cada tres días con un suplemento fresco de las microesferas respectivas. Las células fueron lisadas usando 1% de Triton X-100 y los niveles de triglicérido se midieron a través de un ensayo. Las estadísticas se llevaron a cabo usando un ANOVA de una vía con una prueba Post de Tukey.

20 Los resultados obtenidos y representados por la figura 2 demuestran que las composiciones de acuerdo con la presente invención, es decir, composiciones que comprenden ácidos grasos metabólicos de diferentes tipos así como compuestos CR de diferentes tipos con los compuestos CR

25 controlando la liberación de los ácidos grasos, llevan a un

incremento significativo de triglicéridos en células modelo adiposas, probando así la absorción controlada e incorporación de ácidos grasos a partir de composiciones CR en triglicéridos celulares. Esta expansión a nivel

5 triglicéridos es independiente de la composición y tipo de compuesto CR, así como del tipo, longitud de cadena de carbono y grado de saturación de ácidos grasos fisiológicamente relevantes.

Ejemplo 12 - Influencia *in vitro* de insulina y

10 **dexametasona controlada en CR en la concentración de triglicéridos**

Células 3T3-L1 (P9) fueron sembradas a 25,000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Estas células fueron dejadas lograr confluencia durante 2 días. El

15 medio se cambió de DMEM (10% de suero) a DMEM (10% de suero + insulina + dexametasona + estreptomicina (100U) + penicilina (0.1 mg/ml). La insulina y dexametasona fueron encapsulados en microesferas de PLGA de composición 50:50 según los ejemplos 4, 6 y 8. Después de 2 días, este medio se cambió

20 por DMEM (10% de suero + insulina + estreptomicina (100U) + penicilina (0.1 mg/ml)) la insulina estuvo en microesferas separadas de acuerdo con los ejemplos 4 y 8. En el caso de control, microesferas vacías fueron añadidas a la misma concentración aproximada de polímero (5 mg/pocillo). En

25 todos los casos el intervalo de tamaño de la microesfera se

mantuvo por arriba de 10 micras. El medio se cambió cada tres días con un suplemento fresco de microesferas de insulina en todos los casos. Las células fueron lisadas usando Triton X-100 el día 8 y los niveles de triglicéridos se midieron a través del ensayo. Las estadísticas se llevaron a cabo usando un ANOVA de una vía con una prueba de Post de Tukey.

Este experimento demostró que nuestras microesferas que contienen dexametasona e insulina por separado inducen diferenciación de células 3T3-L1 y el almacenamiento subsecuente de triglicéridos fue como en el control ya que tiene muy poca diferenciación y de esta manera ningún almacenamiento de triglicéridos. Este experimento demuestra que nuestra combinación de compuestos CR junto con insulina y dexametasona en micropartículas separadas puede inducir diferenciación de células grasas no diferenciadas y su incremento subsecuente en volumen.

Ejemplo 13 - Pruebas con animales in vivo

Las microesferas liofilizadas que se hicieron según el ejemplo 4 (aproximadamente 25 mg de polímero/ratón fueron resuspendidas en 50-200 cP, 2% en solución de H₂O de carboximetilcelulosa de sodio 90 kDa con un grado de polimerización de 400 y grado de sustitución a 0.65-0.9 (denominada CMC de aquí en adelante) durante la noche y se remolinó vigorosamente antes de usar. El polímero ácido

poliláctico-ácido glicólico se usó a una relación 50:50 (30,000-60,000) produciendo microesferas con un diámetro de 10-50 micras. Ratones desnudos Balb-c de 2 meses de edad se usaron para experimentos, cada grupo tenía 5 ratones que
5 fueron obtenidos de Charles rivers labs, Italia. Estos ratones fueron aclimatados a las instalaciones para animales durante un periodo de 30 días para evitar efectos secundarios debidos a estrés.

El volumen de la almohadilla de grasa inguinal
10 izquierda se cuantificó usando barrido CT a 15 y 30 días después de inyección. Se inyectaron 50 mg de composición de microesferas correspondiente en cada almohadilla de grasa inguinal con CMC como portador que correspondió a un volumen total de 100 µl por almohadilla de grasa. Se usó una aguja
15 calibre 22G para la inyección. Los ratones fueron anestesiados usando 3% de isoflurano. La almohadilla de grasa inguinal fue accedida a través de la superficie central. Las microesferas fueron inyectadas mientras la aguja era lentamente extraída para tener así una distribución
20 uniforme del contenido de inyección dentro de la almohadilla de grasa.

Este experimento con animales demuestra claramente que las composiciones compuesto CR/lípido metabólico de acuerdo con la invención da como resultado una absorción
25 controlada y duradera de los lípidos metabólicos para

expandir de manera significativa y homogénea el tejido de células grasas en las inmediaciones de estas composiciones.