

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 956 666**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/137** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 31/426** (2006.01)  
**A61K 31/4439** (2006.01)  
**A61K 47/58** (2007.01)  
**A61K 47/59** (2007.01)  
**A61P 5/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2016 PCT/US2016/058997**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017 WO17075136**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2016 E 16860747 (1)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2023 EP 3368553**

54 Título: **Productos terapéuticos a base de polímeros para el pardeamiento inductivo de grasa**

30 Prioridad:

**27.10.2015 US 201562247192 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**26.12.2023**

73 Titular/es:

**PURDUE RESEARCH FOUNDATION (100.0%)  
101 Foundry Drive Suite 2500  
West Lafayette, IN 47906, US**

72 Inventor/es:

**DENG, MENG;  
JIANG, CHUNHUI;  
KUANG, LIANGJU y  
KUANG, SHIHUAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 956 666 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Productos terapéuticos a base de polímeros para el pardeamiento inductivo de grasa

Esta solicitud reivindica los beneficios bajo el 35 USC 119 (e) solicitud provisional de los Estados Unidos No. 62/247,192, presentada el 27 de octubre de 2015.

## 5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere en general al tratamiento de la obesidad y la diabetes, y en particular a nuevos sistemas basados en polímeros que permiten la generación controlada de tejidos adiposos pardos/beige.

## Antecedentes

10 Esta sección introduce aspectos que pueden ayudar a facilitar una mejor comprensión de la divulgación. En consecuencia, estas declaraciones deben leerse desde esta perspectiva y no deben entenderse como admisiones sobre lo que es o no es estado de la técnica.

15 La epidemia de obesidad ha planteado una gran preocupación para la salud pública en la sociedad moderna debido a su asociación con un espectro de enfermedades metabólicas que incluyen diabetes tipo 2 (T2D), enfermedades cardíacas, hiperglucemia y múltiples cánceres. La obesidad se caracteriza morfológicamente por el almacenamiento excesivo de lípidos en el tejido adiposo blanco (WAT) y se presenta como un trastorno complejo de desequilibrio energético en el que la ingesta supera el gasto. Se han dedicado esfuerzos considerables a explorar los mecanismos patológicos, así como los objetivos terapéuticos celulares y moleculares para combatir la obesidad.

20 Actualmente, existen pocos fármacos disponibles para el tratamiento de la obesidad. En su mayoría, esas terapias se dedican a disminuir la ingesta de energía, ya sea suprimiendo el apetito mediante la estimulación del sistema nervioso central o reduciendo la digestión y absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, esos fármacos sólo producen efectos modestos y suelen ir acompañados de efectos secundarios desagradables y potencialmente dañinos. Por lo tanto, se están explorando exhaustivamente enfoques alternativos para superar la obesidad. Uno de esos enfoques consiste en aumentar el gasto energético. Recientemente, esta estrategia mediante la estimulación de la termogénesis ha surgido como una alternativa atractiva.

25 El tejido adiposo pardo (BAT) es el sitio principal de termogénesis mediante el desacoplamiento de la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP mediante el desacoplamiento de la proteína 1 (Ucp1). Mientras produce calor, BAT consume no solo ácidos grasos libres sino también grandes cantidades de glucosa, lo que aporta beneficios a la salud metabólica. El BAT clásico es abundante en los recién nacidos, pero disminuye con la edad, lo que lleva a cantidades limitadas en los humanos adultos. Esto compromete el valor terapéutico de BAT en la intervención clínica de la  
30 obesidad.

El reciente descubrimiento de BAT inducible (iBAT), también llamado tejido adiposo beige, en los depósitos de WAT reaviva la promesa del tratamiento de la obesidad mediante la estimulación del gasto energético. Los adipocitos beige también poseen una sólida capacidad termogénica.

35 El documento WO2015123576 divulga una nanopartícula que comprende un activador de PPAR gamma para inducir el pardeamiento del tejido adiposo blanco para el tratamiento de la obesidad y la diabetes, en donde la nanopartícula puede estar basada en PLGA y/o fosfaceno. El documento US2014057837 divulga una administración de liberación sostenida mediante encapsulación con polímeros PLGA de un agonista, concretamente un agonista beta adrenérgico, en un método para aumentar el tejido adiposo pardo para el tratamiento de la obesidad. Además, en el documento EP2085120 se ha divulgado el uso de un péptido en combinación con un inhibidor de la gamma secretasa para el  
40 tratamiento de la obesidad. Además el documento US2015010630 divulga composiciones para su uso en el tratamiento de la obesidad, que comprenden una matriz basada en fibroína de seda que comprende agentes inhibidores de macrófagos, en las que los agentes pueden encapsularse y en las que el agente puede ser un inhibidor de la señalización de Notch. También en el documento WO2015120065, se ha divulgado la administración de un inhibidor de la secretasa dentro de una biocápsula para su uso en el tratamiento de la obesidad.

45 Un estudio (PENG PENG BI, et al., "Inhibition of Notch signaling promotes browning of white adipose tissue and ameliorates obesity", NATURE MEDICINE. vol. 20, núm. 8, 1 de agosto de 2014 (2014-08-01), páginas 911-918) ha divulgado además que la inhibición de Notch induce la transcripción de Pparg1a y Prdm16 en adipocitos blancos. Se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la señalización de Notch en ratones obesos mejora la obesidad, reduce la glucosa en sangre y aumenta la expresión de Ucp1 en la grasa blanca. Por lo tanto, la señalización de Notch  
50 puede tener como objetivo terapéutico tratar la obesidad y la diabetes tipo 2. El mismo estudio revela que dichos ratones pueden ser tratados mediante inyección intraperitoneal del inhibidor farmacológico divulgado.

55 Las estrategias actuales para mejorar la biogénesis y la función de los adipocitos beige implican manipulaciones farmacológicas genéticas y sistémicas, que están asociadas con importantes desafíos traslacionales debido a los riesgos de tener consecuencias adversas no deseadas en otras células/tejidos, y la falta de control sobre la ubicación y la extensión temporal de Biogénesis de adipocitos beige. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un sistema

eficaz de administración de fármacos basado en polímeros que induzca la biogénesis de adipocitos beige de una manera espacio-temporal controlada, y métodos para fabricar dichos sistemas.

Las referencias a métodos de tratamiento en el resumen y descripción detallada de la invención en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y fármacos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico)".

#### Resumen

Esta divulgación presenta un agente terapéutico para usar para inducir selectivamente el pardeamiento de los adipocitos en un sujeto. El agente terapéutico comprende al menos un compuesto o composición que induce la formación de adipocitos pardos y/o beige; y un polímero que encapsula al menos un compuesto o composición, en el que el compuesto o composición está encapsulado dentro del polímero mediante interacciones físicas o interacciones químicas y configurado para la proximidad al tejido adiposo blanco (WAT).

En una realización preferida, el agente terapéutico antes mencionado sobrerregula la expresión de la proteína desacopladora 1 (UCP1).

En una realización preferida, el agente terapéutico antes mencionado comprende al menos un compuesto o composición que es un inhibidor de la vía de señalización de Notch.

En alguna realización, el inhibidor de la vía de señalización de Notch sobrerregula la expresión de *Ucp1*, *Ppargc1a*.

En una realización, el inhibidor de la vía de señalización de Notch se selecciona entre inhibidores de  $\gamma$ -secretasa que incluyen dibenzazepina (DBZ) y (éster t-butilico de N-[N-(3,5-difluorofenacetyl)-1-alanyl]-S-fenilglicina) (DAPT).

En una realización preferida, el agente terapéutico antes mencionado comprende el polímero que forma micropartículas o nanopartículas.

En una realización preferida, el agente terapéutico antes mencionado comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en polímeros sintéticos y polímeros naturales.

En una realización preferida, el agente terapéutico antes mencionado comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en polímeros biodegradables y polímeros no degradables.

En una realización preferida, el agente terapéutico antes mencionado comprende un polímero que comprende una clase de vesículas artificiales hechas de copolímeros de bloques anfifílicos sintéticos, en el que las vesículas artificiales comprenden esferas huecas que contienen una solución acuosa en el núcleo rodeada por una membrana bicapa.

En una realización preferida, el agente terapéutico antes mencionado comprende un polímero de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).

En una realización preferida, el agente terapéutico mencionado anteriormente es un conjugado inhibidor de polifosfaceno- $\gamma$ -secretasa biodegradable.

En una realización preferida, el agente terapéutico mencionado anteriormente comprende al menos un compuesto o composición que se selecciona entre activadores  $\beta$ -adrenérgicos (por ejemplo, CL316, 243 y mirabegron), catecolaminas (por ejemplo, norepinefrina), agonistas de PPAR- $\gamma$  (por ejemplo, rosiglitazona y tiazolidinedionas), Capsinoides y compuestos similares a los capsinoides (p. ej., extractos de granos del paraíso), citocinas relacionadas con la inflamación del tejido adiposo (p. ej., IL4), péptidos natriuréticos (p. ej., péptido natriurético auricular (ANP), péptido natriurético de tipo cerebral (BNP) y péptido natriurético de tipo C (CNP)), miembros de la familia FGF (por ejemplo, FGF1, 15/19,21), miembros de la familia BMP (por ejemplo, BMP7, BMP8b), hormonas tiroideas (por ejemplo, hormonas tiroideas T3 y T4) y sus agonistas de los receptores (por ejemplo, agonistas del receptor T3), miocinas (p. ej., Irisina y de tipo meteorina (METRNL), miembros de la familia VEGF (p. ej., VEGF-A), inhibidores de Notch (p. ej., inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa), inhibidores de Janus quinasa (p. ej., tofacitinib), inhibidores de la tirosina quinasa del bazo (p. ej., R406), prostaglandinas y sus análogos sintéticos, agonistas de la ciclooxigenasa-2, ácido retinoico y retinaldehído, activadores de retinaldehído deshidrogenasas, adenosina y sus activadores de receptores, proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), adipocinas (por ejemplo, neuregulina 4, adiponectina), orexina y microARN/ARNip dirigidos a los factores antes mencionados relacionados con las vías de señalización, o la combinación de los mismos.

En una realización preferida, el agente terapéutico mencionado anteriormente comprende además adipocitos, células progenitoras de adipocitos o células madre incrustadas en el polímero.

Esta divulgación proporciona además un método para administrar una cantidad terapéutica de un fármaco para inducir el pardeamiento de los adipocitos en un sujeto. El método comprende encapsular un fármaco en un sistema de matriz polimérica y liberar el fármaco en la proximidad de WAT, en el que el fármaco es un compuesto o composición que induce la formación de adipocitos pardos y/o beige.

Esta divulgación proporciona además un método para tratar la obesidad en un sujeto. El método comprende utilizar el agente terapéutico antes mencionado.

5 En una realización, el método antes mencionado para administrar una cantidad terapéutica de un fármaco comprende además sembrar adipocitos, células progenitoras de adipocitos y células madre en el sistema de matriz polimérica para modificar tejidos adiposos pardos/beige utilizando principios de ingeniería de tejidos basados en estructuras.

En una realización, la encapsulación del fármaco en el sistema de matriz polimérica se desarrolla mediante interacciones físicas seleccionadas entre cualquiera de o una combinación de interacción hidrófoba, interacción hidrófila, enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas intermoleculares.

10 En una realización, la encapsulación del fármaco en el sistema de matriz polimérica se desarrolla a través de un enlace de conjugación entre el fármaco y el polímero a través de al menos un grupo funcional.

15 En una realización, el enlace de conjugación polímero-fármaco está formado por cualquiera de o una combinación de reacción de amina, reacciones de tiol (por ejemplo, reacciones clic de tiol), reacción de carboxilato, reacciones de hidroxilo, reacciones de aldehído y cetona, reacciones de hidrógeno activo, reacciones fotoquímicas y reacciones de cicloadición (por ejemplo, reacción de Diels-Alder, cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC), cicloadición de azida-alquino de Huisgen sin cobre).

20 En una realización, al menos un grupo funcional se selecciona del grupo que comprende cualquiera de o una combinación de aminas, tiol, ácido carboxílico, aldehído, cetona, sitios de hidrógeno activo en el anillo aromático, dieno, isotiocianatos de azida, isocianatos, azidas de acilo. Éster de N - hidroxisuccinimida (NHS), sulfo-NHS, cloruro de sulfonilo, aldehídos, epóxidos, carbonatos, haluro de arilo, imidoésteres, carbodiimidias (por ejemplo, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)), compuesto de alquilfosfato, anhídrido, éster de fluorofenilo, hidroximetilfosfina, grupo guanidino, derivado de yodoacetilo, maleimidias, aziridinas, derivados de acrililo, agentes arilantes, derivado disulfuro, vinilsulfona, feniltioéster, cisplatino, diazoacetato, carbonildiimidazol, oxiranos, carbonato de N,N'-disuccinimidilo (DSC), cloroformiato de N-hidroxisuccinimidilo, halógenos de alquilo, hidracina, maleimida, alquino y cloro unido a fósforo.

25 En una realización, el enlace conjugado comprende cualquiera de o una combinación de isotiourea, isourea, amida, sulfonamida, base cambiante, amina secundaria, carbamato, arilamina, amidina, fosforamido, tioéter, disulfuro, β-tiosulfonilo, éster, carbamato, hidrazona, diazo, cicloadición 2+4, 1,2,3-triazoles, carbohidratos, enlace de ésteres de aminoácidos.

30 En alguna realización, la matriz polimérica son polímeros sintéticos que comprenden uno cualquiera o una combinación de poli(éster alifático) (por ejemplo, poli(lactida) (PLA), poli(ε-caprolactona) (PCL), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(carbonato de trimetileno) (PTMC), polidioxanona (PDS), poli(orto éster), polianhídridos, poli(anhídrido-co-imida), poli(anhídrido-ésteres), poliuretanos (por ejemplo, Degrapols), poli(sebacato de glicerol), poli(etilenimina), poli(ácido acrílico)(PAA), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm), poli(oxazolinias) (por ejemplo, poli(2-metiloxazolina y poli(2-etil-2-oxazolina), fumaratos de oligo(etilenglicol) (OPF), poli(fumarato de propileno), poli(cianoacrilatos de alquilo), amida poliacrílica, poli(aminoácidos) sintéticos (por ejemplo, poli(ácido L-glutámico) (L-PGA) y poli(ácido aspártico)), polifosfacenos y poli(fosfoésteres) y mezclas de los mismos.

40 En algunas realizaciones, el sistema de matriz polimérica comprende polímeros naturales que comprenden cualquiera de o una combinación de fibrina, colágeno, matrigel, elastina, péptidos similares a elastina, albúmina, poli(aminoácidos) naturales (por ejemplo, cianoficina, poli(ε-L-lisina) y poli(ácido x-glutámico)), y polisacáridos (por ejemplo, ácido hialurónico, quitosano, dextrano, sulfato de condroitina, agarosa, alginato y heparina), y mezclas de los mismos.

45 En algunas realizaciones, el sistema de matriz polimérica comprende polímeros no degradables. Estos polímeros no biodegradables comprenden cualquiera de o una combinación de poli(etil etileno) (PEE), poli(butadieno) (PBD), poli(dimetilsiloxano) (PDMS) y poli(estireno) (PS), poli(N-etil-4-vinipiridinio), poli(2,2-(metacrilato de dimetilaminoetilo), poli(etilenimina), poli(alilamina) y poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli(ácido acrílico), poli(sulfonato de estireno), poli(sulfato de vinilo) y poli(metacrilato de 3-sulfopropilo) y amida poliacrílica y mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, el sistema de matriz polimérica comprende cualquiera de o una combinación de arquitecturas lineales, en forma de estrella, hiperramificadas y reticuladas.

50 En algunas realizaciones, el sistema de administración de fármacos basado en polímeros comprende además una o más modificaciones de la superficie que incluyen, entre otras, PEGilación o el uso de ligandos dirigidos a receptores en adipocitos.

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente divulgación se entenderán mejor con referencia a las siguientes figuras, descripciones asociadas y reivindicaciones.

55 Breve descripción de las Figuras

Las Figs. 1A y 1B muestran un sistema de administración de fármacos basado en polímeros que incluye un fármaco encapsulado dentro de un sistema de matriz polimérica a través de (Fig. 1A) interacciones físicas y (Fig. 1B) interacciones químicas.

La Fig. 2A es un gráfico que muestra cómo el inhibidor de Notch DAPT induce el pardeamiento de los adipocitos blancos cultivados y los niveles de ARNm de las dianas de Notch.

La Fig. 2B es un gráfico que muestra cómo el inhibidor de Notch DAPT induce el pardeamiento de adipocitos blancos cultivados y genes relacionados con adipocitos pardos.

La Fig. 2C es una transferencia Western que muestra el nivel de proteínas.

La Fig. 2D es un gráfico que muestra DAPT aumentó la tasa de consumo de O<sub>2</sub> (OCR). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

La Fig. 3A es una imagen de la vista dorsal de los ratones mostrando la inhibición de Notch en ratones obesos deficientes en *Leptina* (*Lep<sup>ob</sup>*) que mejora la obesidad e induce el pardeamiento.

La Fig. 3B es una imagen de WAT subcutáneo y tinción con H&E (derecha, barra de escala de 100 μm).

La Fig. 3C muestra mediciones de glucosa en plasma.

La Fig. 3D es un gráfico que muestra la expresión relativa de genes de adipocitos en WAT subcutáneo.

La Fig. 3E muestra los niveles de proteína UCP1 y Gapdh de WAT subcutáneo. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

La Fig. 4 es una ilustración esquemática de microesferas de PLGA cargadas con DBZ que permiten la liberación sostenida de DBZ para inducir la conversión de adipocitos blancos en adipocitos beige.

La Fig. 5A es una imagen fluorescente de una microesfera cargada con FITC-dextrano. Barra de escala 200 μm.

La Fig. 5B es una imagen de SEM de una población de microesferas de PLGA cargadas con DBZ. Barra de escala de 400 μm.

La Fig. 5C es una imagen de SEM con mayor aumento de una única microesfera de PLGA cargada con DBZ. Barra de escala de 50 μm.

La Fig. 5D es una distribución de tamaño de microesferas de PLGA cargadas con DBZ.

Las Figs. 6A y 6B son perfiles de liberación *in vitro* de FITC-dextrano y DBZ de microesferas de PLGA. La figura 6A muestra liberación *in vitro* de FITC-dextrano de microesferas en PBS a pH 7.4 y 37 °C. La figura 6B muestra la liberación *in vitro* de DBZ de microesferas en PBS a pH 7.4 y 37 °C.

Las Figs. 7A -7F muestran que las microesferas de PLGA cargadas con DBZ inhiben Notch y promueven el pardeamiento *in vitro*. La Fig. 7A es un diagrama del sistema de cocultivo con adipocitos blancos primarios sembrados en el fondo del pozo y microesferas cargadas con DBZ colocadas dentro de un inserto permeable. Los adipocitos maduros se marcaron con BODIPY (rojo). Los núcleos se contratiñeron con DAPI (verde). Expresión de (Fig. 7B) genes diana de Notch, (Fig. 7C) marcadores de pardeamiento y (Fig. 7D) genes de mitocondrias en adipocitos blancos cocultivados con microesferas de PLGA cargadas con DBZ. La Fig. 7E muestra los niveles de proteína de PGC1-α en adipocitos blancos cocultivados con microesferas de PLGA cargadas con DBZ. La Fig. 7F muestra la cuantificación del nivel de proteína para Pgc1-α en relación con Gapdh. DBZ: células en medio acondicionado con DBZ (10 μM); CTRL: células tratadas con control de vehículo DMSO. N = 3. \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01.

La Fig. 8A es una imagen de fluorescencia que muestra los adipocitos blancos tratados con DMSO (Verde, MitoTracker Green; Rojo, Red C12. Barras de escala, 200 μm).

La Fig. 8B es una imagen de fluorescencia que muestra los adipocitos blancos tratados con microesferas PLGA-DBZ (Verde, MitoTracker; Rojo, Red C12. Barras de escala, 200 μm).

La Fig. 8C es una imagen de fluorescencia que muestra los adipocitos blancos tratados con DBZ durante 8 días (Verde, MitoTracker; Rojo, Red C12. Barras de escala, 200 μm).

Las Figs. 9A - 9D muestran la caracterización de la inyección de microesferas cargadas con FITC-dextrano en ratones.

La Fig. 9A muestra la inyección directa de microesferas en el depósito adiposo inguinal de ratones WT. La Fig. 9B muestra microesferas inyectadas (flecha azul) identificadas mediante observación macroscópica de los tejidos adiposos inguinales. La Fig. 9C es una imagen fluorescente que ilustra la distribución de microesferas después de 24 horas de inyección. La Fig. 9D es una imagen representativa que muestra la fluorescencia verde de microesferas cargadas con FITC-dextrano dispersas en adipocitos blancos marcados mediante tinción con Oil Red O. Verde: FITC; Rojo: Oil Red O.

Las Figs. 10A - 10C muestran microesferas de PLGA cargadas con DBZ que inducen el pardeamiento *en vivo*. La Fig. 10A muestra la tinción con H&E que muestra microesferas de PLGA cargadas con DBZ (punta de flecha amarilla) dispersas dentro del depósito de WAT. Barra de escala, 200 μm. La Fig. 10B muestra la tinción con H&E (arriba) y UCP1 (abajo) de WAT inguinal de ratones 14 días después de la inyección de microesferas de PLGA cargadas con DBZ. Barras de escala, 100 μm. La Fig. 10C muestra los niveles de proteína de Pgc1-α y Ucp1 de WAT inguinal de ratones 14 días después de la inyección de microesferas de PLGA cargadas con DBZ.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra la expresión relativa de genes de adipocitos (los valores representan la media de dos réplicas biológicas) después de 14 días de inyección de microesferas cargadas con DBZ.

La Fig. 12 es un diagrama que muestra una realización de la síntesis de sistemas conjugados de inhibidor de PPHOS-y-secretasa.

La Fig. 13 ilustra la captación de adipocitos de nanopartículas de polimersoma PS-*b*-(P4MVP)<sub>2</sub> cargado con FITC-BSA. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Verde: FITC.

Las Figs. 14A-14C muestran una realización de la estructura de polimersoma. La Fig. 14A es una imagen de TEM del polimersoma HPBD41-*b*-(P4MVP<sub>25</sub>)<sub>2</sub>. La Fig. 14B es una imagen de TEM del polimersoma HPBD41-*b*-(P4MVP<sub>25</sub>)<sub>2</sub> cargado con DBZ al 2% (barra de escala: 50 nm). La Fig. 14C es una imagen de TEM del polimersoma HPBD41-*b*-(P4MVP<sub>25</sub>)<sub>2</sub> cargado con DBZ al 5% (barra de escala: 50 nm).

La Fig. 15 muestra una ilustración esquemática de las NP con DBZ que liberan DBZ intracelularmente para promover el pardeamiento después de la inyección local en WAT inguinal.

La Fig. 16 ilustra la Fabricación y caracterización de nanopartículas. (a) Ilustración esquemática de la síntesis de las NP con DBZ mediante el método de nanoprecipitación. La morfología de las NP con DBZ se caracterizó por TEM. Barra de escala, 200 nm. (b) perfiles de liberación *in vitro* de DBZ de las NP con DBZ en condiciones de pH 5.0 y 7.4.

La Fig. 17 ilustra la Interacción celular *in vitro* con nanopartículas. (a) Captación celular de nanopartículas de PLGA cargadas de Nile Red en preadipocitos primarios en 10 (arriba) y 60 (abajo) minutos. Los endo/lisosomas tardíos se tiñeron con LysoTracker Green (LTG) y los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. Barra de escala, 20  $\mu$ m. (b) Imágenes de TEM representativas de nanopartículas en la vesícula endocítica (izquierda) y el endosoma (derecha). Las flechas apuntan a las nanopartículas. Barra de escala, 500 nm.

La Fig. 18 ilustra que las NP con DBZ inducen el pardeamiento *in vitro*. Las células de SVF se aislaron de WAT inguinal y se trataron con NP con DBZ durante la diferenciación adipogénica. (a, b) Análisis cuantitativo por PCR que muestra los niveles de ARNm de los genes diana de Notch (a) y genes marcadores de pardeamiento (b) en adipocitos diferenciados tratados con NP con PLGA y NP con DBZ. (c) Resultados representativos de la transferencia Western que muestran los niveles de expresión de proteínas de Hes1 y Pgc-1 $\alpha$  en adipocitos diferenciados tratados con NP con PLGA y NP con DBZ. (d) Cuantificación de los niveles de proteína de Hes1 y Pgc-1 $\alpha$  normalizados a los controles de  $\beta$ -actina. (e) Análisis cuantitativo por PCR que muestra los niveles de ARNm de *Cox5b* en adipocitos diferenciados tratados con NP con PLGA y NP con DBZ. (f) OCR en condiciones de respiración basal y fuga de protones normalizados a proteína total de adipocitos diferenciados. Los datos se muestran como la media  $\pm$  eem. n = 3 ratones por cada grupo. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01.

La Fig. 19 ilustra que la retención local de las NP con DBZ promueve el pardeamiento de WAT inguinal. (a) Imágenes de fluorescencia *in vivo* a las 24 y 48 h después de la inyección local de nanopartículas de PLGA-cy5.5 en el depósito de WAT inguinal. (b) Imágenes de fluorescencia *ex vivo* de diferentes tejidos a las 72 h después de la inyección. (c) Imagen representativa de TEM que muestra que las nanopartículas estaban localizadas dentro del adipocito. Las flechas apuntan a las nanopartículas. La línea de puntos y las puntas de flecha indican la membrana celular y las vesículas de membrana, respectivamente. Barra de escala, 500 nm. (d, e) Análisis cuantitativo por PCR que muestra los niveles de ARNm de *UCP1* (d) y genes de mitocondrias, *Cox5b* y *Cox7a* (e), de ratones tratados con NP con PLGA y NP con DBZ. Los datos se muestran como la media  $\pm$  eem. n = 7 ratones por cada grupo. \*P < 0.05. (f) Imágenes representativas de la tinción con H&E y UCP1 de WAT inguinal después del tratamiento con NP con PLGA y NP con DBZ. Barra de escala, 50  $\mu$ m.

La Fig. 20 ilustra que las NP con DBZ previenen la obesidad inducida por la dieta. (a) Aumentos relativos del peso corporal de los ratones que recibieron NP con PLGA y NP con DBZ después de la normalización al peso corporal inicial, (b) Ingesta de energía promedio por ratón por día después de la normalización al peso corporal, (c) se cuantificó el peso de WAT inguinal con tratamiento con NP con PLGA y NP con DBZ. Se muestran imágenes representativas. (d) Cuantificación de la concentración de glucosa en sangre y el área bajo la curva durante la prueba de tolerancia a la glucosa realizada en ratones que recibieron NP con PLGA y NP con DBZ. (e) Cuantificación de la concentración de glucosa en sangre y el área sobre la curva durante la prueba de tolerancia a la insulina realizada en ratones tratados con NP con PLGA y NP con DBZ. (f, g, h) Cuantificación de los niveles en suero de glucosa. (f), colesterol (g), e insulina (h) de ratones en ayunas tratados con NP con PLGA y NP con DBZ. Los datos se presentan como la media  $\pm$  eem. n  $\geq$  4 ratones por cada grupo. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, N.S. no significativo.

La Fig. 21 ilustra el Modelado matemático de los perfiles de liberación de DBZ. Los perfiles de liberación *in vitro* de DBZ de las NP con DBZ se ajustan al modelo de Korsmeyer-Peppas a pH 5.0 (a) y 7.4 (b). Los datos se muestran como la media  $\pm$  eem. n = 3 para cada grupo.

La Fig. 22 ilustra La captación celular de nanopartículas *ex-vivo*. (a) Imagen representativa que muestra la localización celular de nanopartículas cargadas de Nile Red en adipocitos maduros. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst. (b) Imagen de TEM representativa que muestra varias nanopartículas dentro del adipocito. Las flechas apuntan a las nanopartículas. La línea de puntos indica la membrana celular. LD, gotita de lípidos. Barra de escala, 2  $\mu$ m.

La Fig. 23 ilustra Parámetros serológicos de ratones en ayunas tratados con NP con PLGA y NP con DBZ. (a, b) Cuantificación de los niveles en suero de triglicéridos. (a) y ácidos grasos libres (b) de ratones en ayunas tratados con NP con PLGA y NP con DBZ. (c) La resistencia a la insulina se calculó como ácidos grasos libres de insulina X. Los datos se presentan como la media  $\pm$  eem. n  $\geq$  4 ratones por cada grupo. \*P < 0.05, N.S. no significativo.

La Fig. 24 ilustra El metabolismo de los ácidos grasos en el hígado de ratones que recibieron NP con PLGA y NP con DBZ. (a) Imágenes representativas de la tinción con Oil Red O de secciones de hígado de ratones que recibieron PLGA y NP con DBZ. Barra de escala, 20  $\mu$ m. (b, c, d) Análisis qPCR que muestra los niveles de ARNm de *Cpt1* (b), *Atgl* y *Hsl* (c), y *Acc1* (d) en los hígados de ratones tratados con NP con PLGA y NP con DBZ. Los datos se presentan como la media  $\pm$  eem. n  $\geq$  4 ratones por cada grupo. \*P < 0.05.

Tabla 1. Parámetros optimizados para la síntesis de 100 mg de nanopartículas.

Tabla 2. Examen de modelo matemático para la liberación de DBZ a partir de nanopartículas a pH 5.0 y 7.4. R<sup>2</sup>-ajustado, criterio de información de Akaike (AIC) y criterio de selección de modelo (MSC) empleado para la selección del modelo (n=3). El mejor modelo posee el valor más alto de R<sup>2</sup>-ajustado, el valor de AIC más bajo y el valor de MSC más grande.

Tabla 3. Cebadores de qPCR utilizados en este estudio.

Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 y 2 son cebadores de qPCR directa e inversa para Hey1.

SEQ ID NO: 3 y 4 son cebadores de qPCR directa e inversa para HeyL.  
 SEQ ID NO: 5 y 6 son cebadores de qPCR directa e inversa para Hes1.  
 SEQ ID NO: 7 y 8 cebadores de qPCR directa e inversa para UCP1.  
 SEQ ID NO: 9 y 10 son cebadores de qPCR directa e inversa para Ppargc1a.  
 SEQ ID NO: 11 y 12 son cebadores de qPCR directa e inversa para Cidea.  
 SEQ ID NO: 13 y 14 son cebadores de qPCR directa e inversa para Dio2.  
 SEQ ID NO: 15 y 16 son cebadores de qPCR directa e inversa para Cox5b.  
 SEQ ID NO: 17 y 18 son cebadores de qPCR directa e inversa para Cox7a.

Descripción detallada

10 Con el fin de promover y comprender los principios de la presente divulgación, ahora se hará referencia a las realizaciones ilustradas en los dibujos, y se utilizará un lenguaje específico para describir las mismas. No obstante, se entenderá que con ello no se pretende limitar el alcance de esta divulgación.

15 En respuesta a la necesidad no satisfecha, en el presente documento se divulgan métodos y sistemas terapéuticos novedosos basados en un diseño de sistemas de administración de fármacos poliméricos para inducir el pardeamiento de los adipocitos para el tratamiento y/o la prevención de la obesidad y sus síntomas metabólicos asociados.

20 La epidemia global de obesidad y sus riesgos asociados de enfermedades crónicas afectan a > 10% de la población mundial. Actualmente, existen pocos fármacos disponibles para el tratamiento de la obesidad. En su mayoría, esas terapias se dedican a disminuir la ingesta de energía, ya sea suprimiendo el apetito mediante la estimulación del sistema nervioso central o reduciendo la digestión y absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, esos fármacos sólo producen efectos modestos y suelen ir acompañados de efectos secundarios desagradables y potencialmente dañinos. Por lo tanto, se justifica el desarrollo de estrategias de tratamiento alternativas eficaces.

25 La obesidad se debe principalmente al excedente de energía sistémica que se almacena en forma de lípidos en los adipocitos blancos, cuya expansión conduce a la obesidad. Los adipocitos pardos que se encuentran de manera prominente en la mayoría de las especies de mamíferos funcionan principalmente para disipar el excedente de energía (lípidos) para generar calor, aumentando así el gasto de energía y contrarrestando la obesidad. Los adipocitos beige relativamente identificados presentes en los tejidos adiposos blancos (WAT) son células inducibles "similares a pardos", que pueden convertirse bidireccionalmente desde y hacia adipocitos blancos bajo el control de la temperatura ambiental o la inervación del nervio simpático. La expresión elevada de la proteína desacopladora 1 (Ucp1), un regulador clave de la termogénesis en adipocitos beige aclimatados al frío, se asocia con una respiración desacoplada y una termogénesis robustas. Notablemente, la actividad de los adipocitos beige se correlaciona con la delgadez en los humanos. Por lo tanto, la transformación de adipocitos blancos en adipocitos beige (pardeamiento) es muy prometedora para desarrollar nuevas terapias que aumenten el gasto energético y reduzcan la adiposidad.

35 Las estrategias actuales para mejorar la biogénesis y la función de los adipocitos beige implican manipulaciones genéticas y farmacológicas. Sin embargo, estos métodos a menudo se asocian con el riesgo de tener consecuencias adversas no deseadas en otras células/tejidos y ofrecen poco control sobre la ubicación y el alcance temporal de la biogénesis de los adipocitos beige. Por ejemplo, la administración del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF-21) se asocia con efectos secundarios sistémicos sobre la pérdida ósea.

40 Los sistemas de administración de fármacos basados en polímeros permiten una liberación de fármacos sostenida y controlada espacio-temporalmente y ofrecen varias ventajas únicas sobre la administración de fármacos convencionales, incluida la liberación continua de fármacos, una disminución de los efectos secundarios sistémicos y un mayor cumplimiento por parte del paciente. Los perfiles de liberación de fármacos se pueden ajustar modulando las características de los polímeros, como la química del material, el peso molecular, la hidrofobicidad/hidrofilicidad, la carga superficial, la degradación y los mecanismos de erosión. Varios ejemplos de productos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) incluyen obleas de GLIADEL, cánulas intraluminales liberadoras de fármacos, parches transdérmicos liberadores de fármacos y esponjas o mallas absorbibles impregnadas con antibióticos. En esta divulgación proporcionamos una plataforma de administración de fármacos basada en polímeros para inducir el pardeamiento del WAT local para el tratamiento de la obesidad y sus síndromes metabólicos relacionados. La plataforma de administración polimérica permite la liberación controlada y sostenida de fármacos eficaces, particularmente de los inhibidores de Notch, para inducir el pardeamiento de los adipocitos después de la administración de composiciones que contienen un polímero a los depósitos de WAT. El fármaco eficaz para este efecto puede ser un compuesto o composición aún por descubrir que induzca el pardeamiento local de los adipocitos con la ayuda de la utilización del polímero. Una categoría no limitante es cualquier compuesto o composición que sea capaz de inducir el pardeamiento de WAT. A continuación se proporcionan ejemplos de compuestos y composiciones en detalle.

55 El fármaco puede ser un agente terapéutico que induce la formación de adipocitos pardos y/o beige, como activadores  $\beta$ -adrenérgicos (por ejemplo, CL316, 243 y mirabegron), catecolaminas (por ejemplo, norepinefrina), agonistas de PPAR- $\gamma$  (por ejemplo, rosiglitazona y tiazolidindionas), capsinoides y compuestos similares a los capsinoides (p. ej., extractos de granos del paraíso), citocinas relacionadas con la inflamación del tejido adiposo (p. ej., IL4), péptidos natriuréticos (p. ej., péptido natriurético auricular (ANP), péptido natriurético de tipo cerebral (BNP) y péptido

5 natriurético de tipo C (CNP)), miembros de la familia FGF (p. ej., FGF1, 15/19,21), miembros de la familia BMP (p. ej., BMP7, BMP8b), hormonas tiroideas (p. ej., hormonas tiroideas T3 y T4) y sus agonistas de los receptores (p. ej., agonistas del receptor T3), miocinas (por ejemplo, irisina y similar a meteorina (METRNL)), miembros de la familia VEGF (por ejemplo, VEGF-A), inhibidores de Notch (por ejemplo, inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa), inhibidores de Janus quinasa (por ejemplo, tofacitinib), inhibidores de la tirosina quinasa del bazo (por ejemplo, R406), prostaglandinas y sus análogos sintéticos, agonistas de la ciclooxigenasa-2, ácido retinoico y retinaldehído, activadores de retinaldehído deshidrogenasas, adenosina y sus activadores de receptores, proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), adipocina (por ejemplo, neuregulina 4, adiponectina), orexina y microARN/ARNip dirigidos a los factores antes mencionados relacionados con las vías de señalización.

10 Se divulga un nuevo papel de la señalización de Notch en la regulación de la homeostasis de los adipocitos blancos y beige. Se ha descubierto que la inhibición de la señalización de Notch mediante la inyección intraperitoneal de dibenzazepina (DBZ), un inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa, induce el pardeamiento de los adipocitos blancos y, en consecuencia, reduce la obesidad y mejora el equilibrio de la glucosa en ratones obesos. Los inhibidores de Notch  
15 útiles en la presente invención como fármacos eficaces son inhibidores de  $\gamma$ -secretasa, por ejemplo dibenzazepina (DBZ) y (éster t-butilico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-1-alanil]-S-fenilglicina). (DAPT).

El fármaco debe incorporarse al polímero en las composiciones de la invención en un porcentaje de carga del 0.1% al 70% en peso. La cinética de liberación del fármaco se puede adaptar manipulando el porcentaje de carga del fármaco, la naturaleza del polímero y el método utilizado para fabricar y cargar el sistema de administración.

20 La divulgación incluye métodos para fabricar un sistema de administración de fármacos basado en polímeros mediante la combinación de un fármaco con un sistema de matriz polimérica. El sistema de administración de fármacos basado en polímeros se puede formular a partir de la encapsulación de fármacos terapéuticos dentro de un sistema de matriz polimérica mediante interacciones físicas (Fig. 1A). Las interacciones físicas incluyen, entre otras, interacción hidrófoba, interacción hidrófila, enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas intermoleculares. El sistema de administración de fármacos basado en polímeros también se puede formular a partir de la encapsulación de fármacos  
25 terapéuticos a través de interacciones químicas (por ejemplo, conjugación polímero-fármaco) dentro de un sistema de matriz polimérica (Fig. 1B). Las reacciones de conjugación terapéutica de polímero incluyen, entre otras, reacción de amina, reacciones de tiol (p. ej., reacciones clic de tiol), reacción de carboxilato, reacciones de hidroxilo, reacciones de aldehído y cetona, reacciones de hidrógeno activo, reacciones fotoquímicas y reacciones de cicloadición (p. ej. Reacción de Diels-Alder, cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC), cicloadición de Huisgen de azida-alquino sin cobre). Los grupos funcionales R1 y R2 pueden incluir, entre otros, aminas, tioles, ácido carboxílico, aldehído, cetona, sitios de hidrógeno activos en el anillo aromático, dieno, isotiocianatos de azida, isocianatos, azidas de acilo. Éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), sulfo-NHS, cloruro de sulfonilo, aldehídos, epóxidos, carbonatos, haluro de arilo, imidoésteres, carbodiimidas (por ejemplo, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)), compuesto de alquifosfato, anhídrido, éster de fluorofenilo, hidroximetilfosfina, grupo guanidino,  
35 derivado de yodoacetilo, maleimidias, aziridinas, derivados de acrililo, agentes arilantes, derivados de disulfuro, vinilsulfona, feniltioéster, cisplatino, diazoacetato, carbonildiimidazol, oxiranos, carbonato de N,N'-disuccinimidilo (DSC), cloroformiato de N-hidroxisuccinimidilo, halógenos de alquilo, hidracina, maleimida, alquino, cloro unido a fósforo. Los enlaces conjugados pueden incluir, entre otros, isotiourea, isourea, amida, sulfonamida, base desplazada, amina secundaria, carbamato, arilamina, amidina, fosforamidato, tioéter, disulfuro,  $\beta$ -tiosulfonilo, éster, carbamato, hidrazona, diazo, cicloadición 2+4; 1,2,3-triazoles, carbohidratos, enlace ésteres de aminoácidos.

El sistema de matriz polimérica puede comprender, consistir en o consistir esencialmente en polímeros sintéticos. Los polímeros sintéticos incluyen, entre otros, poli(éster alifático) (por ejemplo, poli(lactida) (PLA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(carbonato de trimetileno) (PTMC), polidioxanona (PDS), poli(orto éster), polianhídridos, poli(anhídrido-co-imida), poli(ésteres de anhídrido), poliuretanos  
45 (por ejemplo, Degrapols), poli(sebacato de glicerol), poli(etilenimina), poli(ácido acrílico) (PAA), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm), poli(oxazolininas) (por ejemplo, poli(2-metiloxazolina y poli(2-etil-2-oxazolina), fumaratos de oligo(etilenglicol) (OPF), poli(fumarato de propileno), poli(cianoacrilatos de alquilo), amida poliacrílica, poli(aminoácidos sintéticos) (por ejemplo, poli(ácido L-glutámico) (L-PGA) y poli(ácido aspártico)), polifosfacenos, poli(fosfoésteres), lipidoides y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, los polímeros sintéticos pueden ser PLGA con una proporción de 50:50 de ácido láctico a glicólico.

Además, el sistema de matriz polimérica puede incluir polímeros naturales. Los polímeros naturales pueden incluir, entre otros, fibrina, colágeno, matrigel, elastina, péptidos similares a elastina, albúmina, poli(aminoácidos) naturales (por ejemplo, cianoficina, poli( $\epsilon$ -L-lisina) y poli(x-ácido glutámico)), y polisacáridos (por ejemplo, ácido hialurónico, quitosano, dextrano, sulfato de condroitina, agarosa, alginato y heparina), lípidos y mezclas de los mismos.

55 El sistema de matriz polimérica puede incluir polímeros no degradables. Los polímeros no biodegradables incluyen, entre otros, poli(etil etileno) (PEE), poli(butadieno) (PBD), poli(dimetilsiloxano) (PDMS) y poli(estireno) (PS), poli(N-etil-4-vinipiridinio), poli(2,2-(metacrilato de dimetilaminoetilo), poli(etilenimina), poli(alilamina) y poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli(ácido acrílico), poli(sulfonato de estireno), poli(sulfato de vinilo) y poli(metacrilato de 3-sulfopropilo) y amida poliacrílica y mezclas de los mismos.



El sistema de matriz polimérica puede incluir compuestos poliméricos. Por ejemplo, se pueden formular mezclas de polímero-polímero para combinar sinérgicamente las propiedades beneficiosas de los polímeros originales. Se pueden obtener compuestos que combinan una mezcla de polímeros que tienen diferentes velocidades de liberación para lograr un perfil de liberación deseable.

- 5 El sistema de matriz polimérica puede incluir conjugados poliméricos. La conjugación directa del fármaco en la estructura polimérica ayuda a garantizar una alta eficiencia de carga del fármaco y una liberación sostenida del fármaco en el sitio objetivo. La cinética de liberación del fármaco se puede adaptar cambiando la naturaleza y la sensibilidad hidrolítica del enlace polímero-fármaco. Un sistema conjugado de polímero y fármaco de este tipo también se puede utilizar para desarrollar matrices tridimensionales para estudiar las interacciones entre las células y el microambiente extracelular o generar grasa parda diseñada para trasplante.

El sistema de matriz polimérica puede incluir, entre otras, arquitecturas lineales, en forma de estrella, hiperramificadas y entrecruzadas.

El sistema de matriz polimérica puede comprender además una o más modificaciones de superficie que incluyen, entre otras, PEGilación o el uso de ligandos dirigidos a receptores en adipocitos.

- 15 La divulgación también proporciona un método para administrar las composiciones del sistema de administración de polímeros reivindicadas a un sujeto mediante inyección o implantación quirúrgica en el sitio donde se va a lograr el pardeamiento de la grasa. La administración local permite administrar una concentración terapéutica del fármaco a los depósitos de WAT con efectos secundarios sistémicos mínimos. El método también puede incluir la etapa de administrar una cantidad terapéutica del fármaco para inducir el pardeamiento de los adipocitos dentro del sujeto. En otra realización más, se presenta un método para tratar la obesidad en un sujeto. El sistema polimérico puede ser de cualquier tamaño adecuado para su administración al sitio en forma de placas, perlas, gránulos, hidrogeles, micropartículas, nanopartículas o su combinación. Los sistemas de fármacos poliméricos se pueden fabricar mediante varias técnicas bien establecidas que incluyen disolución con disolvente, emulsión de aceite en agua/evaporación de disolvente, secado por aspersión o precipitación usando un sistema disolvente/no disolvente. En las realizaciones preferidas, el sistema polimérico estará en forma de partículas. Por ejemplo, en algunos aspectos, el sistema polimérico comprende micropartículas que están configuradas para su inyección en el WAT de un sujeto. En otros aspectos, el sistema polimérico comprende nanopartículas que están configuradas para su inyección en el WAT de un sujeto.

- 30 Los adipocitos, las células progenitoras de adipocitos y las células madre se pueden combinar con el sistema de matriz polimérica para modificar tejidos adiposos pardos/beige como una nueva terapia para tratar la obesidad y los trastornos relacionados utilizando principios de ingeniería de tejidos basados en estructuras. En una realización, se pueden recolectar células de los sujetos mediante biopsia de tejido adiposo. Luego, las células se pueden sembrar en estructuras poliméricas tridimensionales que imitan las matrices extracelulares naturales. Después del cultivo *in vitro*, las construcciones de célula/estructuras se pueden trasplantar nuevamente a los sujetos. Se pueden aplicar una variedad de factores químicos y biológicos (por ejemplo, agentes de pardeamiento) y estímulos mecánicos (por ejemplo, biorreactor) para facilitar el proceso de generación de tejido antes del trasplante. En una realización, se divulga un sistema de microesferas de PLGA cargadas con inhibidor de Notch biodegradable. Las microesferas poliméricas biodegradables con perfiles predeterminados de degradación y liberación de fármacos son un foco de atención para el desarrollo de sistemas eficaces de administración de fármacos para una variedad de aplicaciones que incluyen el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y el desarrollo de vacunas. Entre una variedad de polímeros que se han empleado para la administración de fármacos, el PLGA, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico, han sido particularmente destacados debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y procesabilidad conveniente. La cinética de liberación de fármacos de las microesferas de PLGA se puede controlar modulando el tamaño de las microesferas, el peso molecular y la composición de PLGA.

- 45 En una realización, se divulga un sistema conjugado inhibidor de polifosfaceno- $\gamma$ -secretasa biodegradable. Los polifosfacenos (PPHOS) que tienen una estructura principal de átomos alternos de fósforo y nitrógeno representan una clase de material única para la administración de fármacos debido a la flexibilidad sintética, la capacidad de ajuste de las propiedades del polímero y la biocompatibilidad. Cada átomo de fósforo porta dos sustituyentes orgánicos, con una variedad de grupos laterales disponibles para la optimización de las propiedades. La liberación de grupos laterales resultantes de la degradación del PPHOS permite el diseño racional de sistemas de administración basados en PPHOS utilizando el concepto de profármaco. Las moléculas de fármacos, como los inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa, se pueden unir directamente como grupos laterales a la cadena polimérica utilizando enlaces hidrolíticamente sensibles como depósitos para la administración del fármaco.

- 55 En otra realización, se divulga un sistema de administración de fármacos basado en nanopartículas que comprende polimerosomas. Los polimerosomas son una clase de vesículas artificiales hechas de copolímeros de bloques anfífilos sintéticos. Los polimerosomas típicos son esferas huecas que contienen una solución acuosa en el núcleo rodeada por una membrana bicapa. La membrana bicapa está compuesta de coronas hidrofílicas hidratadas tanto en el interior como en el exterior de la parte media hidrofóbica de la membrana que separa y protege el núcleo líquido del medio exterior. Los copolímeros de bloques comprenden dos o más bloques de homopolímeros. Cada bloque se polimeriza con un monómero específico o una combinación de monómeros que tienen propiedades físico-químicas

únicas en los polímeros. En esas realizaciones, el bloque hidrófobo incluye, entre otros, poli(etileno) (PEE), poli(butadieno) (PBD), poli(dimetilsiloxano) (PDMS) y poli(estireno) (PS) no biodegradables así como poli(lactida) (PLA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) y poli(carbonato de trimetileno) (PTMC), etc., biodegradables; en esas realizaciones, el bloque hidrófilo incluye, entre otros, poli(N-etil-4-vinipiridinio), poli(2,2-(metacrilato de dimetilaminoetil), poli(etilenimina), poli(alilamina), poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli(ácido acrílico), poli(sulfonato de estireno), poli(sulfato de vinilo), poli(metacrilato de 3-sulfopropilo), polietilenglicol, poli(2-metiloxazolona), poli(2-etil-2-oxazolona) y amida poliacrílica, etc. Los polimerosomas se pueden utilizar para la encapsulación de moléculas terapéuticas mediante interacción física (por ejemplo, interacción hidrófoba, interacción hidrófila, enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas intermoleculares) o mediante interacciones químicas (por ejemplo, conjugación polímero-fármaco) dentro de un polímero. El núcleo acuoso de los polimerosomas se puede utilizar para la encapsulación de moléculas terapéuticas hidrófilas. La membrana puede integrar fármacos hidrófobos dentro de su núcleo hidrófobo.

En otra realización, se divulga un sistema de administración de fármacos basado en nanopartículas biodegradables (NP con DBZ) que comprende PLGA y DBZ aprovechando el descubrimiento del papel desempeñado por la señalización de Notch en la plasticidad de los adipocitos y los beneficios de la liberación de fármacos intracelulares basados en nanopartículas para mejorar la eficacia terapéutica y minimizar los posibles efectos secundarios. Es posible permitir la administración específica de células o tejidos con administración sistémica conjugando la fracción objetivo con nanopartículas. Por ejemplo, se ha informado que la interacción entre un péptido específico CKGGRKDC (SEQ ID NO: 20) y prohibitina, un marcador vascular en el tejido adiposo, facilita el direccionamiento de nanopartículas a la vasculatura en los tejidos adiposos.

En realizaciones alternativas, otros sistemas poliméricos que se pueden utilizar para la administración de fármacos (por ejemplo, agentes de pardeamiento) incluyen, entre otros, nanoportadores, micropartículas, hidrogeles, matrices de fibras, obleas o películas, cápsulas, parches y dispositivos implantables de administración de fármacos.

Aunque en esta divulgación se menciona la aplicación a la obesidad, debe apreciarse que dicha aplicación no pretende limitar las aplicaciones del método y los sistemas descritos en el presente documento. Esta plataforma tecnológica basada en polímeros se puede adaptar fácilmente para tratar un amplio espectro de enfermedades como la enfermedad del hígado graso y la aterosclerosis.

Es importante destacar que hemos demostrado que la administración local de las NP con DBZ previno la obesidad inducida por HFD y mejoró la homeostasis de la glucosa, así como el metabolismo de los ácidos grasos en el hígado, verificando los efectos reguladores directos de la inhibición de Notch en WAT en los perfiles metabólicos sistémicos. Estos beneficios sistémicos obtenidos por la manipulación local están de acuerdo con la publicación anterior de que el trasplante de WAT subcutáneo de ratones entrenados con ejercicio o BAT de ratones normales mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina<sup>25, 26</sup>. Sigue siendo difícil determinar si estos beneficios metabólicos se deben exclusivamente a la elevada absorción de glucosa y ácidos grasos o si involucran adicionalmente otros factores endocrinos secretados por adipocitos beige transformados.

Ejemplo 1: La inhibición de la señalización de Notch promueve el pardeamiento de los adipocitos blancos:

La vía de señalización de Notch es importante para la comunicación entre células y la determinación del destino celular durante el desarrollo y es necesaria para la homeostasis del tejido adulto. El gen diana de Notch Hairy/potenciador de división 1 (Hes1) se une directamente a los promotores del dominio de PR que contiene 16 (*prdm16*), receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (*Ppar $\gamma$* ), y coactivador 1 alfa de *Ppar $\gamma$*  (*Ppargc1a*) para inhibir su transcripción. Esto conduce a una reducción de la biogénesis mitocondrial y niveles reducidos de Ucp1.

La inhibición farmacológica de la señalización de Notch induce el pardeamiento de los adipocitos blancos durante el cultivo *in vitro*. La señalización de Notch se inhibe en adipocitos blancos cultivados con el inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa DAPT (éster t-butílico de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-1-alanil]-S-fenilglicina). DAPT inhibió la señalización de Notch y sobrerreguló la expresión de los genes específicos para la grasa parda Ucp1, Cidea, Prdm16 y Ppargc1a (Figs. 2A-2C). Además, los adipocitos tratados con DAPT mostraron una tasa de consumo de oxígeno (OCR) más alta que los tratados con DMSO, como se espera si se produce un pardeamiento (Fig. 2D).

WAT es el sitio principal de almacenamiento de energía a largo plazo en la mayoría de las especies de vertebrados. En respuesta al exceso de ingesta calórica, el tamaño del WAT se expande mediante hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos. En respuesta a la exposición a temperaturas ambiente frías, el sistema nervioso simpático libera catecolaminas, que se unen a los adrenoreceptores  $\beta$  y activan la lipólisis a través de la vía del cAMP. Los ácidos grasos generados a partir de la lipólisis pueden activar directamente Ucp1 para la producción de calor. Por lo tanto, comprender las vías que funcionan eficazmente para regular la homeostasis de los adipocitos es fundamental para el tratamiento de la obesidad. Recientemente se ha informado que la señalización de Notch desempeña un papel en la regulación de la plasticidad (conversión) de los adipocitos blancos y beige *in vivo*, en consecuencia afectando el metabolismo energético del cuerpo. Ablación específica de adipocitos de *Notch1* o *Rbpj* impulsado por aP2-Cre da como resultado disminuciones en el tamaño de varios depósitos adiposos y aumentos en la abundancia relativa de adipocitos beige en WAT, acompañado de un aumento de la tasa metabólica, una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en animales de experimentación. Estos fenotipos están asociados con niveles elevados de expresión de genes específicos de adipocitos beige en WAT pero no en BAT. Además, los ratones carentes de *Notch1*

o *Rbpj* exhiben un pardeamiento acelerado (aparición de adipocitos beige dentro de WAT) en respuesta a ambientes fríos. Los ratones mutantes *Notch1* específicos del tejido adiposo también son resistentes a la obesidad inducida por HFD. En los esfuerzos iniciales para confirmar el papel de la señalización de Notch en los tejidos adiposos, se demostró que la activación de la señalización de Notch utilizando un ratón con adiponectina-Cre altamente específico para adipocitos inhibe el pardeamiento de WAT e induce el blanqueamiento de BAT, que se manifiesta por la deposición de lípidos y la aparición de adipocitos blancos en el BAT interescapular clásico. La activación de Notch inducida por adiponectina-Cre también hizo que los ratones se volvieran intolerantes a la glucosa y resistentes a la insulina. Estos fenotipos contrastan marcadamente con los observados en ratones con deficiencia de Notch.

Evaluar en qué medida la inhibición de Notch mejora la obesidad *in vivo* en condiciones patológicas, ratones *ob/ob* deficientes en leptina (*Lep<sup>ob</sup>*) fueron tratados con dibenzazepina (DBZ, un inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa). Notablemente, el tratamiento con DBZ atenuó el aumento de peso corporal observado en el grupo de control tratado con vehículo sin afectar la ingesta de energía. Las diferencias de peso corporal se asociaron con un tamaño más pequeño y un menor peso de varios depósitos de WAT en los ratones tratados con DBZ en comparación con los tratados con vehículo (Fig. 3A, B). Los ratones tratados con DBZ también mostraron una mejor tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina en relación con los controles (Fig. 3C). En consonancia con la reducción de la adiposidad, los ratones tratados con DBZ mostraron una tasa de intercambio respiratorio más baja en comparación con los ratones de control, lo que indica que la administración de DBZ inició un cambio metabólico hacia la utilización de la grasa como fuente de energía relevante. A nivel molecular, la administración de DBZ resultó en la inhibición de la expresión de las dianas de Notch *Hes1*, *Hey1* y *HeyL*, así como *Lep*, pero sobreexpresó la expresión de *ucp1* y *Ppargc1a* en WAT (Fig. 3D, E). La administración de DBZ también resultó en la supresión de la expresión de las citocinas inflamatorias codificadas por *Cd68*, *Il6* e *Il1b* que están asociados con la obesidad en humanos. Al finalizar el experimento, las concentraciones de glucosa alimentada en sangre permanecieron bajas en presencia de la inyección de DBZ, lo que sugiere un efecto beneficioso a largo plazo del pardeamiento adiposo sobre el metabolismo de la glucosa.

Sin embargo, los posibles problemas de cumplimiento asociados con los requisitos de múltiples inyecciones periódicas de fármacos, así como las preocupaciones de seguridad y eficacia sobre la distribución generalizada de fármacos en el cuerpo, plantean obstáculos importantes para la traducción clínica de este descubrimiento. Por lo tanto, existe una necesidad crítica de desarrollar nuevos sistemas de administración de fármacos que permitan la administración espacio-temporal selectiva de inhibidores de Notch como DBZ a los tejidos adiposos.

Ejemplo 2: Sistema de administración de DBZ basado en microesferas de PLGA para promover el pardeamiento de WAT para el tratamiento de la obesidad:

En este ejemplo, se divulga un sistema de administración de DBZ basado en microesferas de PLGA para promover el pardeamiento de WAT para el tratamiento de la obesidad (Fig. 4). Se utilizó PLGA con una proporción de lactida a glicólido de 50:50 ya que este polímero específico tiene una tasa de degradación relativamente rápida entre la familia de PLGA, lo que es ventajoso para inducir el pardeamiento. Formulamos las microesferas de PLGA cargadas con DBZ utilizando una técnica de evaporación de emulsión/disolvente y caracterizamos la morfología y los perfiles de liberación de esas microesferas. Además, demostramos que las microesferas de PLGA cargadas con DBZ inhibieron Notch y, en consecuencia, promovieron el pardeamiento tanto *in vitro* como *in vivo*. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se desarrolla un sistema diseñado biológicamente eficaz para administrar agentes terapéuticos para convertir adipocitos blancos en adipocitos beige. Este estudio no sólo contribuye a nuestra comprensión del mecanismo subyacente de la inhibición de Notch en el proceso de pardeamiento, sino que también allana el camino para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para contrarrestar la obesidad y su síndrome metabólico asociado en humanos.

Materiales y métodos:

Materiales:

PLGA (lactida:glicólido 50:50; Pm = 75,000) se obtuvo de Lakeshore Biomaterials. Poli(alcohol vinílico) (PVA; 87-90 % hidrolizado, Pm promedio = 30,000-70,000), dextrano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC-dextrano) (Pm = 70,000) y DBZ se obtuvieron de Sigma. El cloruro de metileno (DCM), el dimetilsulfóxido (DMSO) y el acetonitrilo se adquirieron de Fisher Scientific.

Animales: Todos los ratones utilizados en este estudio eran ratones magros de tipo silvestre mantenidos en forma normal en una instalación limpia. Todos los procedimientos relacionados con el mantenimiento de animales y el uso experimental se llevaron a cabo siguiendo las regulaciones.

Formulación y caracterización de microesferas cargadas con FITC-dextrano.

Se prepararon microesferas de PLGA cargadas con FITC-dextrano mediante una técnica de doble emulsión de agua en aceite en agua (WOW). Brevemente, se disolvieron 0.4 g de PLGA en 4 mL de DCM. En esta fase orgánica (O), se emulsionaron 330  $\mu$ l de solución acuosa (W1) que contenía ~3.7 mg de FITC-dextrano usando un mezclador de vórtice que operaba a 1,000 rpm durante 3 minutos para formar la emulsión W1/O. Esta emulsión primaria se inyectó en 400 mL de una fase acuosa que contenía PVA (W2) al 1 % (p/v). La emulsión W1/O/W2 resultante se agitó a 400 rpm durante la noche con un agitador magnético superior para permitir la evaporación del disolvente y el endurecimiento

de las microesferas. Luego las microesferas se aislaron mediante centrifugación, se lavaron tres veces con agua destilada y se secaron en una estufa de vacío durante 24 horas. Los productos finales se almacenaron en un desecador. Se tomaron imágenes de microesferas de PLGA cargadas con FITC-dextrano mediante microscopía de fluorescencia (EVOS FL).

#### 5 Formulación y caracterización de microesferas cargadas con DBZ.

Se prepararon microesferas de PLGA cargadas con DBZ mediante una técnica de evaporación de emulsión/disolvente de aceite en agua (O/W). La fase oleosa tenía 540 mg de PLGA y 10.8 mg de DBZ disueltos en 2.7 mL de DCM. Esta fase oleosa se inyectó en 400 mL de una fase acuosa que contenía PVA al 1% (p/v), que se agitó a 600 rpm para lograr un sistema de emulsión O/W. La emulsión resultante se agitó durante la noche con un agitador magnético superior para permitir la evaporación completa del disolvente y la solidificación de las gotitas en microesferas. Luego las microesferas se aislaron mediante centrifugación, se lavaron tres veces con agua destilada y se secaron en una estufa de vacío durante 24 horas. Los productos finales se almacenaron en un desecador. La estructura de la superficie de las microesferas se investigó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Nova Nano SEM). El diámetro de las microesferas se midió utilizando el software Image-J y se seleccionaron aleatoriamente alrededor de 130 microesferas para el análisis.

El contenido de DBZ en microesferas se analizó mediante un método de precipitación. Se disolvieron completamente 5 mg de microesferas de PLGA cargadas con DBZ en cloroformo. Una vez disuelta, la solución de cloroformo se añadió gota a gota en 4 mL de metanol en un tubo de centrifuga para disolver DBZ y precipitar PLGA. Se recogió el DBZ del sobrenadante y se concentró bajo una corriente de nitrógeno. Luego, se secó DBZ en una estufa de vacío durante la noche y se disolvió en 10 mL de acetonitrilo con respecto a agua Millipore 2:1. El producto se filtró para análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (HPLC Thermo). Las muestras se analizaron utilizando una fase móvil de acetonitrilo a ácido fosfórico al 0.1 % (50:50) a un caudal de 1 mL/min en una columna de pentafluorofenilpropilo y detección UV a 232 nm. Cada muestra se midió por duplicado. La carga real del fármaco y la eficiencia de encapsulación del fármaco se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$25 \quad \% \text{ Teórico de carga de DBZ} = \frac{\text{DBZ (Total)}}{\text{DBZ (Total)} + \text{PLGA}} \times 100 \%$$

(1-1)

$$\% \text{ Real de carga de DBZ} = \frac{\text{DBZ (Experimental)}}{\text{DBZ (Total)} + \text{PLGA}} \times 100 \%$$

(1-2)

$$\text{Eficiencia de encapsulación} = \frac{\text{Carga real de DBZ}}{\text{Carga teórica de DBZ}} \times 100 \%$$

30 (1-3)

Liberación de FITC-dextrano *in vitro* a partir de microesferas.

El FITC-dextrano liberado de las microesferas se midió suspendiendo aproximadamente 20 mg de microesferas en 5 mL de tampón PBS a pH 7.4. Las muestras se colocaron en un agitador mantenido a 37 °C y se agitaron a 200 rpm. A intervalos de tiempo predeterminados, las muestras se retiraron del agitador y se centrifugaron a 1000 g durante 2 min. El medio se dividió en alícuotas de 2 mL para el análisis y posteriormente se añadió medio fresco de igual volumen. Los gránulos de microesferas precipitados se resuspendieron en el medio y se colocaron nuevamente en el agitador. La liberación *in vitro* de FITC-dextrano se estudió por triplicado. La concentración de FITC-dextrano en la fase acuosa se determinó fluorimétricamente (Excitación: 485 nm, Emisión: 520 nm, lector de microplacas Synergy H1) utilizando una curva de calibración estándar.

40 Liberación *in vitro* de DBZ a partir de microesferas.

Las microesferas de PLGA cargadas con DBZ se caracterizaron para determinar la liberación del fármaco durante 6 días en PBS a pH 7.4 y 37 °C. La liberación de DBZ se midió usando HPLC. En resumen, se colocaron muestras de 20 mg en tubos de centrifuga individuales y se llenaron con 2.5 mL de PBS. Luego las muestras se colocaron en un agitador mantenido a 37 °C y se agitaron a 200 rpm. En momentos específicos, se retiró 1 mL de medio, se guardó para el análisis y se reemplazó con la misma cantidad de PBS fresco. Los puntos temporales se eligieron de manera que se mantuvieran condiciones perfectas de hundimiento. Cada muestra de sobrenadante se extrajo con 1 mL de cloroformo. Luego se separó la capa orgánica y se dejó evaporar. Luego, el DBZ seco se reconstituyó con 1 mL de una solución de acetonitrilo al 40 % en agua para proporcionar una solución adecuada para el análisis de HPLC (HPLC Thermo).

50 Aislamiento de preadipocitos primarios.

Los preadipocitos primarios se recogieron de los depósitos de WAT subcutáneos de las extremidades y se trituraron en trozos de 2 a 5 mm<sup>2</sup>. Luego, estos trozos se sometieron a digestión con colagenasa de 1.5 mg/mL con agitación a 37 °C durante 1.5-2 horas. La digestión se terminó con medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10%. Después de eso, se eliminaron los adipocitos maduros flotantes y la suspensión celular se filtró a través de una malla de 100 µm, seguido de una breve centrifugación a 450 g durante 5 min. El sedimento se resuspendió y se sembró en placas de cultivo de tejidos.

Cocultivo de preadipocitos primarios con microesferas.

Los preadipocitos primarios se cultivaron en un medio de crecimiento que contenía DMEM, FBS al 20 % y penicilina/estreptomina al 1 % a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio se cambió cada dos días. Tras la confluencia, las células se sometieron a un medio de inducción que contenía DMEM, 10 % de FBS, insulina 2,85 µM, dexametasona 0,3 µM y 3-isobutil-metilxantina 0,63 mM durante 4 días, seguido de un medio de diferenciación que contenía DMEM, insulina 200 nM y triyodotironina 10 nM durante 4 días más. Mientras tanto, se agregaron microesferas de polímero de 5 mg en insertos transwell permeables suspendidos en cada pocillo de placas de 24 pocillos mientras se inducía la diferenciación adipogénica de las células. Otros grupos de tratamiento paralelos incluyeron células en medio acondicionado con DBZ (10 µM) y células en control de vehículo DMSO. Para controlar la diferenciación adipogénica, las gotitas de lípidos y los núcleos de los adipocitos durante el cultivo se contratiñeron con BODIPY (Red C12) y DAPI, respectivamente.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

El ARN total se extrajo del cultivo celular mediante Trizol. Se utilizaron cebadores hexámeros aleatorios para la transcripción inversa para sintetizar ADNc. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se realizó con una máquina Roche Light Cycler 96 (Roche). El ARNr 18S se aplicó como control interno para la normalización. Para el análisis de resultados de qPCR, se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para calcular las veces que cambia.

Extracción de proteínas y análisis de transferencias Western.

La proteína total se extrajo de células o muestras de tejido utilizando tampón RIPA que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0.5 % y dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1 %. Las concentraciones de proteínas se midieron utilizando el reactivo de ensayo de proteínas Pierce BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE. UU.). Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y luego se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore Corp., Billerica, MA). Las membranas se bloquearon en leche al 5 % durante 1 hora y se incubaron con anticuerpos primarios a 4 °C durante la noche. Los anticuerpos PGC1-α (sc-13067) y GAPDH (sc-32233) se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology y ambos se diluyeron 1:1,000. El anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (IgG anti-conejo, 7074S, Cell Signaling) se diluyó 1:5,000. Las señales se detectaron con un sistema de imágenes táctiles ChemiDoc<sup>MC</sup> (Bio-Rad). Los carriles se analizaron para la cuantificación de la densitometría con Bio-Rad Image Lab V5.2.1.

Inyección *in vivo* de microesferas de PLGA.

Primero se anestesiaron los ratones con un cóctel de ketamina-xilazina y luego se inyectaron microesferas de PLGA cargadas con FITC-dextrano o microesferas de PLGA cargadas con DBZ (20 mg/30 g de peso corporal) en el depósito de WAT inguinal en un lado del cuerpo en un 1 mL de solución de Methocel E4M al 0.5 % (peso/vol; Dow Chemical) y Tween-80 al 0.1 % (peso/vol; Sigma) en agua. De manera similar, se inyectaron microesferas de PLGA en el depósito de WAT inguinal contralateral. Los tejidos adiposos se recolectaron después de 24 horas y 14 días después de la inyección para el estudio con microesferas de PLGA cargadas con FITC-dextrano y microesferas de PLGA cargadas con DBZ, respectivamente. La tinción con Oil Red O se realizó para marcar los adipocitos para el estudio con microesferas de PLGA cargadas con FITC-dextrano, mientras que la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y la inmunohistoquímica se realizaron para el estudio con microesferas de PLGA cargadas con DBZ.

Tinción con H&E e inmunohistoquímica.

Los tejidos adiposos se fijaron en formalina al 10% durante 24 horas a temperatura ambiente. Luego, los tejidos se incluyeron en parafina y se cortaron en rodajas de 4 µm de espesor, se desparafinaron y se rehidrataron utilizando xileno, etanol y agua mediante métodos estándar. La inmunohistoquímica se realizó en un Dako Autostainer (Dako). Los portaobjetos se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3 % y suero de caballo normal al 2.5 % (S-2012, Vector), seguido de incubación con anticuerpo primario policlonal de conejo anti-Ucp1 diluido 1:200 en suero de caballo normal al 2.5 % (S-2012, Vector) durante 60 min. Las señales se detectaron con un kit de detección de polímeros anti-IgG de conejo (MP-7401, Vector). El etiquetado se visualizó con 3,3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno (SK-4105, Vector). Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina de Harris (EK Industries) y se recogieron imágenes digitales de todo el portaobjetos con un escáner de portaobjetos Aperio Scan Scope (Aperio).

Análisis estadístico

Los datos cuantitativos se informaron como media  $\pm$  eem. Los valores de p se calcularon mediante una prueba t de Student de dos colas.  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

Resultados:

Formulación y caracterización de microesferas de PLGA.

5 Utilizando PLGA 50:50, se prepararon microesferas de PLGA cargadas con fármaco y se caracterizaron para determinar la distribución del fármaco y las características morfológicas. Primero encapsulamos FITC-dextrano, una sonda fluorescente de uso común, en microesferas de PLGA para evaluar la distribución de FITC-dextrano en microesferas mediante microscopía fluorescente. Se observó que la fluorescencia verde se distribuía uniformemente en todas las microesferas (Fig. 5A). A continuación, formulamos microesferas de PLGA cargadas con DBZ optimizando  
10 los parámetros del proceso, como la concentración de PVA y la velocidad de agitación, para obtener un intervalo estrecho de tamaño de microesferas de 50 a 150  $\mu\text{m}$  (Fig. 5B). La micrografía de SEM con mayor aumento reveló la morfología de la superficie lisa de la microesfera (Fig. 5C). La distribución de tamaño de las microesferas de PLGA cargadas con DBZ se parecía a una distribución gaussiana con más del 50 % en el intervalo de 90-110  $\mu\text{m}$  (Fig. 5D). El porcentaje de carga real de DBZ se caracterizó por ser -1.4 % (p/p), equivalente a -68 % de eficiencia de encapsulación de DBZ.  
15

El sistema de microesferas PLGA permite la liberación de FITC-dextrano y DBZ

Para examinar las capacidades de liberación del fármaco de carga de las microesferas de PLGA, primero colocamos las microesferas de PLGA cargadas con FITC dextrano en el PBS a 37 °C y la liberación se cuantificó fluorométricamente. Las microesferas de PLGA cargadas con FITC-dextrano mostraron un perfil de liberación rápida,  
20 lo que resultó en aproximadamente el 50 % del total de FITC-dextrano liberado después de 24 horas (Fig. 6A). Probablemente esto se debe a la naturaleza hidrófila del FITC-dextrano. Además, caracterizamos el perfil de liberación de DBZ a partir de microesferas de PLGA cargadas con DBZ (Fig. 6B). En general, la tasa de liberación de DBZ de las microesferas de PLGA fue mucho más lenta que la del FITC-dextrano. Aproximadamente, se liberó un 2 % de DBZ de las microesferas de PLGA en las primeras 24 horas. Y la tasa de liberación disminuyó significativamente a partir de  
25 entonces y se liberó alrededor del 3 % de DBZ (~8  $\mu\text{g}$ ) durante 6 días, lo que indica que el DBZ puede liberarse del PLGA de manera sostenida.

Las microesferas de PLGA cargadas con DBZ promueven el pardeamiento en adipocitos

Como intento inicial de probar la bioactividad de DBZ liberada de microesferas de PLGA, cultivamos conjuntamente microesferas de PLGA cargadas con DBZ con adipocitos primarios y examinamos las respuestas celulares (Fig. 7A).  
30 Después de la inducción de la diferenciación adipogénica durante 8 días, observamos gotitas de lípidos clásicas caracterizadas por la inmunofluorescencia BODIPY (Fig. 7A), lo que sugirió que las microesferas no causaron efectos adversos obvios en el cultivo celular. Luego continuamos analizando los niveles de ARNm de los genes termogénicos y diana de Notch. Las microesferas de PLGA cargadas con DBZ inhibieron significativamente a Notch, como lo demuestra la reducción del 40 % del ARNm de los genes diana de Notch. *Hes1* y *HeyL* (Figura 7B). Es importante  
35 destacar que las microesferas de PLGA cargadas con DBZ aumentaron drásticamente los niveles de ARNm de los marcadores de pardeamiento, incluidos *Ucp1*, *Cidea* y *Ppargc1a* (Fig. 7C), así como genes de mitocondrias, incluidos *Cox5b*, *Cox7a*, *Cpt1a* y *Cpt2* (Fig. 7D), lo que sugiere que el DBZ liberado de las microesferas de PLGA puede inhibir la vía de Notch y, en consecuencia, promover el pardeamiento. Además, los resultados de la transferencia Western demostraron que las microesferas de PLGA cargadas con DBZ elevaron significativamente el nivel de proteína de *Pgc1- $\alpha$*  (codificada por *Ppargc1a*) en aproximadamente 3.5 veces (Figs. 7E y 7F), que desempeña funciones clave en la biogénesis mitocondrial y el metabolismo oxidativo. Después de 8 días de cultivo celular, se observó un aumento significativo en la densidad mitocondrial de los adipocitos tratados con DBZ en comparación con el grupo de control  
40 tratado con DMSO (Figs. 8A - 8C). Hubo una superposición de Red C12 con estructuras positivas para MitoTracker, lo que indica la posible mejora coordinada de la absorción de ácidos grasos y las mitocondrias después del tratamiento con DBZ. De importancia potencial, las microesferas cargadas con DBZ también dieron como resultado más mitocondrias y una superposición de Red C12 con MitoTracker en los adipocitos. En conjunto, todos estos datos confirmaron que DBZ permaneció bioactivo para inducir el pardeamiento después de ser liberado de las microesferas de PLGA *in vitro*.  
45

Las microesferas de PLGA cargadas con DBZ estimulan el pardeamiento *in vivo*

50 Para probar más a fondo si las microesferas de PLGA pueden administrar DBZ localmente y promover el pardeamiento *in vivo*, intentamos inyectar microesferas directamente en los depósitos de WAT inguinales del ratón y evaluar el efecto de pardeamiento después de eso (Fig. 9A). Inicialmente, para garantizar que las microesferas pudieran inyectarse con precisión en los depósitos, utilizamos las microesferas cargadas con FITC-dextrano para rastrear la ubicación de las microesferas. Los sitios de inyección de microesferas se identificaron fácilmente con fluorescencia verde mediante  
55 observación macroscópica en los tejidos adiposos inguinales diana (Fig. 9B). Después de 24 horas de inyección, las microesferas cargadas con FITC-dextrano mantuvieron morfologías redondas con fluorescencia expandida, lo que indica la liberación de FITC-dextrano de las microesferas durante este período de tiempo (Fig. 9C, D). Esta observación

también estuvo de acuerdo con nuestros resultados anteriores con respecto al perfil de liberación de FITC-dextrano *in vitro*.

A continuación, inyectamos microesferas de PLGA cargadas con DBZ en los depósitos de WAT inguinales utilizando el mismo procedimiento. Después de 14 días de la inyección, se recogió y procesó el WAT inguinal para su inclusión y corte en parafina. A través de la tinción con H&E, observamos que las microesferas de PLGA cargadas con DBZ se dispersaron dentro del WAT y mantuvieron morfologías redondas en el intervalo de tamaño de 50-150  $\mu\text{m}$ . Es importante destacar que estas microesferas no provocaron ninguna respuesta inflamatoria significativa (Fig. 10A). Es de destacar que las microesferas de PLGA cargadas con DBZ redujeron drásticamente el tamaño de los adipocitos blancos maduros (Figura 10B), un indicador distintivo del efecto de pardeamiento. Los adipocitos beige multiloculares Ucp1+ eran evidentemente abundantes con microesferas de PLGA cargadas con DBZ (Figura 10B). Además, esta característica morfológica del pardeamiento se vio respaldada aún más por la transferencia Western de muestras de tejido que exhibieron mayores niveles de proteína de Pgc1- $\alpha$  y Ucp1 en el grupo de microesferas cargadas con DBZ en comparación con el control (Figura 10C). Además, los ratones inyectados con microesferas cargadas con DBZ manifestaron una mayor expresión de genes mitocondriales (*Cox5b*), así como genes específicos de la grasa parda, tales como *Ppargc1a* y *Cidea* en relación con los controles (Fig. 11). Todos estos datos demostraron que DBZ se liberó exitosamente de las microesferas y retuvo su actividad biológica de inhibición de Notch para promover el pardeamiento *in vivo*.

Cada vez hay más pruebas de que las diferencias metabólicas significativas que distinguen los adipocitos beige de los adipocitos blancos pueden explotarse con éxito para establecer nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento y/o la prevención de la obesidad. Por lo tanto, identificar y abordar los mecanismos subyacentes al pardeamiento es crucial en el desarrollo de terapias efectivas para reducir la adiposidad. La vía de señalización de Notch es importante para la comunicación entre células y la determinación del destino celular durante el desarrollo y es necesaria para la homeostasis del tejido adulto. El gen objetivo de Notch Hairy/potenciador de división 1 (*Hes1*) inhibe las transcripciones del dominio de PR que contiene 16 (*Prdm16*), el coactivador 1 alfa del receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (*Pparc1a*) (*Ppargc1a*) y *Pparc1*, todos críticos en la biogénesis de adipocitos pardos. Esto conduce a una reducción del número de mitocondrias y de la expresión de *Ucp1*. Notablemente, se ha descubierto que la inhibición de la señalización de Notch mediante la inyección intraperitoneal de DBZ induce el pardeamiento de los adipocitos blancos y, en consecuencia, reduce la obesidad y mejora el equilibrio de glucosa en ratones obesos. Esta estrategia puede abrir otra vía novedosa para tratar la obesidad y sus enfermedades metabólicas asociadas. Sin embargo, los posibles problemas de cumplimiento asociados con la necesidad de múltiples inyecciones periódicas de fármacos, en combinación con preocupaciones de seguridad y eficacia sobre la distribución generalizada de fármacos en el cuerpo, reducen el potencial traslacional de este tratamiento. Por ejemplo, se ha propuesto que la inhibición de Notch afecta múltiples procesos biológicos, como la angiogénesis, la formación ósea y la miogénesis. Por lo tanto, sería beneficioso si un sistema portador fuera capaz de administrar DBZ localmente al WAT de manera sostenida para el tratamiento de la obesidad.

Los sistemas de administración controlada de fármacos basados en polímeros ofrecen varias ventajas únicas sobre la administración de fármacos convencionales, incluida la liberación continua del fármaco, la disminución de los efectos secundarios sistémicos y el mayor cumplimiento del paciente. La degradación del polímero es muy deseable en la administración controlada de fármacos porque elimina la necesidad de la extracción quirúrgica de los implantes. Se sabe que el PLGA se degrada por simple hidrólisis de los enlaces éster en ácidos láctico y glicólico, que finalmente se metabolizan en dióxido de carbono y agua. Las microesferas de PLGA se han investigado exhaustivamente como vehículos para administrar una variedad de agentes terapéuticos. La liberación de un agente encapsulado a partir de microesferas de PLGA está controlada tanto por difusión como por degradación del polímero. La cinética de liberación del fármaco se puede adaptar variando la composición del copolímero, el peso molecular y el tamaño de las microesferas. Notablemente, la tasa de degradación del PLGA depende de la composición del copolímero. La pérdida de peso molecular durante la hidrólisis se acelera con un aumento en el contenido de glicólido. Esto se atribuye a una mayor absorción de agua en la matriz polimérica. Por ejemplo, PLGA exhibió un tiempo de degradación del orden de PLGA 50:50 (1-2 meses) < PLGA 75:25 (4-5 meses) < PLGA 85:15 (5-6 meses). Los polímeros con mayor peso molecular dan como resultado tasas de degradación más lentas. Además, el tamaño de las microesferas de PLGA es un factor de control importante en la difusión de fármacos y la degradación de polímeros. Berchane *et al.* demostraron que la tasa de liberación inicial de piroxicam de las microesferas de PLGA disminuyó con un aumento en el tamaño de las microesferas de 13.9 a 81.2  $\mu\text{m}$ , lo que es consistente con la ley de difusión de Fick porque un aumento de las vías de difusión reduciría la tasa de liberación del fármaco. Se ha informado que las microesferas grandes se degradan de manera heterogénea, donde la tasa de degradación en el núcleo es mayor que en la superficie. Por el contrario, las microesferas con un diámetro inferior a 300  $\mu\text{m}$  sufren una degradación homogénea por la que la tasa de degradación del núcleo es equivalente a la de la superficie. Las microesferas pequeñas también se degradan más lentamente que las microesferas grandes como resultado de una menor acumulación de productos de degradación ácidos. Los estudios de liberación *in vitro* demostraron que las microesferas de PLGA cargadas con DBZ fabricadas en el intervalo de tamaño de 50 a 150  $\mu\text{m}$  permitieron la liberación sostenida de DBZ, lo que resultó en ~3 % del fármaco encapsulado liberado durante 6 días. Esta liberación gradual será particularmente beneficiosa para evitar la necesidad de múltiples inyecciones periódicas de DBZ para inducir el pardeamiento.

El cocultivo de preadipocitos primarios con microesferas de PLGA cargadas con DBZ demostró que el DBZ liberado conservaba su bioactividad e inhibía eficazmente la señalización de Notch y la expresión sobrerregulada de genes

específicos de la grasa parda (Fig. 7). Por ejemplo, la expresión de los objetivos posteriores de Notch. *Hes1* y *HeyL* en adipocitos blancos cultivados con DBZ y microesferas cargadas con DBZ se redujeron en más del 40 %, lo que indica la bioactividad del DBZ liberado de los polímeros. Además, las microesferas cargadas con DBZ dieron como resultado una expresión elevada de marcadores de pardeamiento, incluyendo *Ucp1*, *Cidea* y *Ppargc1a*, así como genes de mitocondrias, incluidos *Cox5b*, *Cox7a*, *Cpt1a* y *Cpt2*. Notablemente, los adipocitos pardos y beige contienen más mitocondrias que los adipocitos blancos y poseen la capacidad de quemar lípidos (mediante  $\beta$ -oxidación) para generar calor. *Pgc1- $\alpha$*  (codificado por *Ppargc1a*) también se sabe que induce la expresión de *Ucp1* y otros componentes termogénicos en los adipocitos. Nuestros resultados también están en línea con nuestros hallazgos anteriores con el uso de DBZ en el pardeamiento de los adipocitos blancos. El aumento más pronunciado en los niveles de ARNm de *ucp1* y *Cidea* en los grupos tratados con PLGA-DBZ en comparación con los grupos con DBZ solo se deben presumiblemente a la liberación continua de DBZ de las microesferas, lo que debería haber mejorado la actividad biológica de DBZ y, por lo tanto, resalta una ventaja importante de nuestro sistema de administración de fármacos para el pardeamiento inductivo.

Uno de los requisitos más importantes para desarrollar sistemas eficaces de administración de fármacos basados en polímeros es la compatibilidad tisular. Los polímeros de PLGA se consideran un estándar para la administración de fármacos debido a su reconocida biocompatibilidad y aprobación por parte de la Administración de Alimentos y Fármacos para una serie de aplicaciones clínicas. Las microesferas de PLGA cargadas con DBZ fueron bien toleradas después de la inyección *in vivo* en los depósitos de WAT (Fig. 10A). Más importante aún, demostramos que la inyección local de microesferas cargadas con DBZ indujo con éxito el pardeamiento del WAT después de 14 días (Figs. 10B y 10C). El pardeamiento resultante valida aún más que la señalización de Notch desempeña un papel en la regulación de la plasticidad de los adipocitos blancos y beige *in vivo*.

WAT es el sitio principal de almacenamiento de energía a largo plazo. En respuesta al exceso de ingesta calórica, el tamaño del WAT se expande mediante hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos. Nuestro trabajo identificó el potencial de las microesferas poliméricas como plataforma portadora para administrar localmente DBZ a WAT de manera sostenida. Un sistema de administración localizado de este tipo puede eliminar la necesidad de inyecciones repetidas, así como los posibles efectos secundarios que se acompañan de la administración sistémica de DBZ. Una mejor comprensión de la biología de los adipocitos pardos y beige ha llevado a descubrimientos recientes de una variedad de factores que promueven el pardeamiento del WAT, como factores de crecimiento de fibroblastos, proteínas morfogenéticas óseas (BMP), irisina, hormonas tiroideas T3 y T4, péptidos natriuréticos y agonista de la vía  $\beta$ 3- adrenérgica. Sin embargo, al igual que con DBZ, existen importantes preocupaciones sobre la seguridad y la eficacia de la administración sistémica de estos factores de pardeamiento, ya que la exposición incontrolada del tejido puede provocar posibles efectos secundarios no deseados y una cinética impredecible. Por ejemplo, la administración de FGF21 se asocia con efectos secundarios sistémicos sobre la pérdida ósea. Por lo tanto, el desarrollo de terapias eficaces basadas en el color marrón para abordar la epidemia de obesidad cada vez peor requiere la integración de avances en tecnologías de liberación controlada con descubrimientos en la biología de las células grasas beige/marrón.

Se prepararon microesferas de PLGA cargadas con DBZ con un intervalo de tamaño de 50-150  $\mu$ m como un sistema de administración de DBZ utilizando una técnica de evaporación de emulsión/disolvente. Las microesferas de PLGA cargadas con DBZ apoyaron la liberación de DBZ de manera sostenida. La eficacia de las microesferas de PLGA cargadas con DBZ para inducir el pardeamiento se demostró en ambos estudios *in vitro* e *in vivo*. Este estudio demuestra por primera vez la viabilidad de desarrollar un sistema portador diseñado biológicamente para la administración controlada de DBZ para lograr un pardeamiento inductivo utilizando microesferas poliméricas biodegradables. Para facilitar la traducción de nuestra plataforma tecnológica para que tenga un impacto positivo en el tratamiento terapéutico, los esfuerzos futuros se centrarán en la evaluación de este sistema de administración controlada con células y tejidos humanos.

### Ejemplo 3: Sistema PPHOSpro-fármaco para permitir la liberación gradual de inhibidores de la $\gamma$ -secretasa:

Los PPHOS son polímeros de alto peso molecular con una estructura principal de átomos de fósforo y nitrógeno alternos. Cada átomo de fósforo porta dos sustituyentes orgánicos, con una amplia variedad de grupos laterales disponibles para la optimización de las propiedades. El tipo de grupo lateral unido a la estructura principal de PPHOS tiene un efecto profundo en las propiedades fisicoquímicas y biológicas del polímero. Por ejemplo, la sustitución de átomos de cloro del poli(diclorofosfaceno) con grupos hidrolíticamente lábiles tales como ésteres de aminoácidos, imidazolilo, glucosilo, glicerilo y glicolato o éster de lactato sensibiliza al polímero para que se descomponga en períodos de horas, días, meses o años a la temperatura fisiológica dependiendo de la estructura molecular específica del polímero. Por otro lado, los grupos laterales hidrófobos tales como ariloxi, fluoroalcoxi y unidades alcoxi superiores protegen la estructura principal del polímero contra la hidrólisis. Se ha investigado el PPHOS para administrar una variedad de fármacos basados en difusión, erosión o una mezcla de erosión y difusión. Además, las moléculas de fármacos se pueden unir directamente como grupos laterales a la cadena polimérica mediante enlaces hidrolíticamente sensibles como depósitos para la administración de fármacos. Por ejemplo, los conjugados de fármacos de PPHOS-platino (II) biodegradable mostraron una alta actividad antitumoral a través de la liberación controlada de la fracción de platino (II) de la estructura principal de PPHOS en el proceso de degradación. Por lo tanto, los PPHOS constituyen materiales candidatos atractivos para el diseño de sistemas de profármacos basados en polímeros con control eficiente sobre la tasa de degradación y los perfiles de liberación de fármacos.



Las ventajas de los sistemas de profármacos PPHOS incluyen:

La estructura polimérica bien definida, que se puede reproducir con coherencia a medida que los polímeros se sintetizan mediante una ruta de sustitución macromolecular.

5 La flexibilidad de síntesis del PPHOS, que permite el desarrollo de nuevos polímeros con fracciones químicas o biológicas aprovechando la química de los grupos laterales. La sustitución conjunta de inhibidores de  $\gamma$ -secretasa con diferentes grupos laterales en la estructura principal del polímero permite ajustar la degradación del polímero y la liberación del fármaco simplemente variando la proporción de los sustituyentes.

Este sistema polimérico es biocompatible ya que la estructura principal del polímero se degrada en fosfatos de amonio, que el cuerpo puede metabolizar o excretar fácilmente.

10 Un conjugado reproducible basado en PPHOS, que evita las dificultades que podrían surgir al intentar atrapar un fármaco dentro de un polímero; en cambio, el fármaco es el polímero. La conjugación directa de DBZ en la estructura principal del polímero ayuda a garantizar una alta eficiencia de carga del fármaco. La cinética de liberación del fármaco se puede adaptar cambiando la naturaleza y la sensibilidad hidrolítica del enlace polímero-fármaco.

15 Un sistema conjugado de polímero y fármaco de este tipo también se puede utilizar para desarrollar matrices tridimensionales para estudiar las interacciones entre las células y el microambiente extracelular o generar grasa parda diseñada para su implantación.

Síntesis y caracterización de polímeros:

20 El sistema de profármaco basado en PPHOS se puede sintetizar mediante un protocolo de sustitución macromolecular de dos etapas. La polimerización por apertura térmica de anillo de  $(\text{NPCI}_2)_3$ , seguido de reacciones de sustitución nucleofílica del poli(diclorofosfaceno) resultante, da como resultado la producción del profármaco inhibidor de PPHOS- $\gamma$ -secretasa (Fig. 12). Alternativamente, el poli(diclorofosfaceno) se puede sintetizar mediante la polimerización catiónica viva de triclorofosforanimina. Los detalles de la síntesis de este enfoque se han informado en nuestras publicaciones anteriores. Se espera que la unión directa de la sal sódica de un inhibidor de la  $\gamma$ -secretasa (LY411575) a la estructura principal del polímero dé como resultado una eficiencia de carga relativamente alta. El porcentaje de carga y la degradación del polímero se pueden ajustar aún más mediante la sustitución conjunta de la estructura principal del polímero con diferentes grupos laterales. Los espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$  (145 MHz) y de RMN de  $^1\text{H}$  (360 MHz) de los polímeros se obtendrán utilizando un espectrómetro de RMN Bruker de 360 MHz, para confirmar la estructura y las relaciones de grupos laterales. Los pesos moleculares de los polímeros se estimarán a partir de los resultados de la cromatografía de permeación en gel (GPC) utilizando un Hewlett Packard LC serie 1100.

30 Degradación del polímero y liberación del fármaco:

35 La degradación del polímero es muy deseable para desarrollar vehículos de administración de fármacos de liberación controlada/sostenido. El proceso involucrado en la degradación del polímero generalmente incluye varias fases: 1) hidratación con o sin hinchamiento, 2) generación de oligómeros y monómeros por intrusión de agua, 3) degradación progresiva y 4) liberación de oligómeros y monómeros que conducen a una pérdida de masa. En el presente documento se desarrollan polímeros con un tiempo de degradación completo en el intervalo de 12 semanas según los protocolos de intervención actuales para lograr el pardeamiento del WAT en humanos. En resumen, el profármaco PPHOS en forma de discos circulares (10 mm de diámetro y 0.5 mm de espesor) se incubó en PBS (10 mL) a pH 7.4 a 37 °C en un baño de agua con agitación a 250 rpm durante 12 semanas. En momentos específicos, las matrices se retiraron del medio, se secaron hasta peso constante y se determinaron los cambios de peso. El peso molecular de las matrices degradadas también se determina mediante GPC. Las muestras se visualizan mediante SEM. El análisis de los productos de degradación de estos polímeros, incluidos los inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa, se realiza utilizando una combinación de técnicas de RMN, HPLC y espectroscopia infrarroja.

45 Dicho sistema de profármaco polimérico de este tipo se puede utilizar en diferentes formulaciones (por ejemplo, microesferas, nanopartículas, fibras, obleas) para administrar inhibidor de  $\gamma$ -secretasa a los tejidos adiposos para suprimir la señalización de Notch e inducir el pardeamiento del WAT para el tratamiento de la obesidad.

Ejemplo 4: Sistema de administración basado en nanopartículas que comprende polimerosomas:

50 Los sistemas de administración de fármacos en nanopartículas que comprenden polimerosomas proporcionan un medio eficaz para mejorar la eficacia de los fármacos al proporcionar una alta carga útil del fármaco dentro de las células diana. Los copolímeros de bloques sintéticos se han utilizado habitualmente para la preparación de polimerosomas. Se pueden producir polimerosomas con una amplia gama de propiedades (por ejemplo, diferentes espesores de membrana, capacidad de respuesta a estímulos y permeabilidades) utilizando copolímeros en bloque con diferentes pesos moleculares, funcionalidades, estado de carga, composiciones químicas, relación hidrófila/hidrófoba, número de bloques y arquitecturas moleculares.

Formulación y caracterización de polimerosomas cargados con FITC-BSA

El polímero tribloque de poliestireno-b-poli(yoduro de 4-vinil-N-metilpiridina)<sub>2</sub>, PS-b-(P4MVP)<sub>2</sub> se sintetizó de acuerdo con nuestro informe anterior. Las nanopartículas del polimerosoma PS<sub>33</sub>-b-(P4MVP<sub>29</sub>)<sub>2</sub> cargado con FITC-BSA se prepararon mediante diálisis simple. Específicamente, 10 mg del copolímero tribloque PS<sub>33</sub>-b-(P4MVP<sub>29</sub>)<sub>2</sub> y cantidades variables de FITC-BSA se disolvieron en DMSO y se dializaron frente a agua desionizada utilizando tubos de diálisis Spectrum con corte de peso molecular de 10-12 kDa para preparar polimerosomas a concentraciones definidas (~5 mg/mL). Las proteínas libres se eliminaron mediante diálisis (corte de peso molecular 100 kDa) durante 24 horas. La concentración de FITC-BSA en la fase acuosa se determinó fluorométricamente (Excitación: 485 nm, Emisión: 520 nm, lector de microplacas Synergy H1) utilizando una curva de calibración estándar. El porcentaje de carga real de FITC-BSA se caracterizó por ser ~8.6 % (p/p), equivalente a ~86 % de eficiencia de encapsulación de FITC-BSA.

#### 10 Captación celular de nanopartículas de polimerosoma:

Los preadipocitos primarios se cultivaron en medio de crecimiento que contenía DMEM, 20% de FBS y 1% de penicilina/estreptomina a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células se preincubaron con una serie de concentraciones de polimerosoma PS<sub>33</sub>-b-(P4MVP<sub>29</sub>)<sub>2</sub> cargado con FITC-BSA durante 20 min y luego se incubaron con medio de adipocitos. Después de 24 horas, las células se lavaron tres veces con PBS y se fijaron en formaldehído al 4%. Los núcleos se tiñeron con DAPI. La microscopía confocal se realizó en un Nikon A1R (Fig. 13).

#### Formulación y caracterización de polimerosomas cargados con DBZ:

El polímero tribloque de polibutadieno-b-poli(yoduro de 4-vinil-N-metilpiridina)<sub>2</sub> hidrogenado, HPBD-b-(P4MVP)<sub>2</sub> se sintetizó mediante polimerización RAFT. Las nanopartículas del polimerosoma HPBD41-b-(P4MVP<sub>25</sub>)<sub>2</sub> cargado con DBZ se prepararon mediante diálisis simple. Específicamente, 10 mg del copolímero tribloque de HPBD41-b-(P4MVP<sub>25</sub>)<sub>2</sub> y cantidades variables de DBZ se disolvieron en DMSO y se dializaron frente a agua desionizada utilizando tubos de diálisis Spectrum de corte de peso molecular de 10-12 kDa durante 48 horas para preparar polimerosomas a concentraciones definidas. Los polimerosomas HPBD41-b-(P4MVP<sub>25</sub>)<sub>2</sub> cargados con DBZ se liofilizaron para obtener nanopartículas de HPBD41-b-(P4MVP<sub>25</sub>)<sub>2</sub> cargadas con DBZ.

Para probar la eficiencia de carga, 5 mg de nanopartículas de HPBD41-b-(P4MVP<sub>25</sub>)<sub>2</sub> cargadas con DBZ se disolvieron completamente en 0.4 mL de DMSO. La solución se añadió gota a gota en 6 mL de acetato de etilo en un tubo de centrifuga para disolver DBZ y precipitar HPBD41-b-(P4MVP<sub>25</sub>)<sub>2</sub>. Se recogió el DBZ del sobrenadante y se concentró bajo una corriente de nitrógeno. Luego, se secó DBZ en una estufa de vacío durante la noche y se disolvió en 2.4 mL de acetonitrilo con respecto a agua Millipore 2:1. El producto se filtró para análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (HPLC Thermo). Las muestras se analizaron utilizando una fase móvil de acetonitrilo a ácido fosfórico al 0.1 % (50:50) a un caudal de 1 mL/min en una columna de pentafluorofenilpropilo y detección UV a 232 nm. La eficiencia de encapsulación de DBZ se caracterizó por ser de ~30%.

Se realizaron estudios de TEM para caracterizar el tamaño de las nanopartículas de polimerosoma (Fig. 14). En resumen, se colocaron polimerosomas HPBD41-b-(P4MVP<sub>25</sub>)<sub>2</sub> cargados de DBZ (~2 µl) en una rejilla tipo A ultrafina de malla 400 (Ted Pella) y se tomaron imágenes con un TEM Tecnai T20. Se utilizó un voltaje de aceleración de 200 kV y las muestras se tiñeron con acetato de uranilo (UAc) al 2 % para mejorar el contraste.

También se puede desarrollar una estrategia de direccionamiento activo para mejorar la eficiencia de la administración mediante la decoración de las nanopartículas con ligandos específicos que se dirigen a receptores específicos en los adipocitos.

Ejemplo 5: Las nanopartículas de PLGA que liberan inhibidores de Notch inducen el pardeamiento del tejido adiposo blanco local para contrarrestar la obesidad

En este ejemplo, se divulga el desarrollo de un sistema de nanopartículas (NP) de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) que puede permitir la liberación sostenida selectiva de un inhibidor de Notch (dibenzazepina, DBZ) a los depósitos de WAT. Estos NP con DBZ inhiben la señalización de Notch e inducen el pardeamiento después de una rápida internalización celular. Es importante destacar que la inyección local de las NP con DBZ en los depósitos de WAT inguinales en un modelo de ratón obeso inducido por dieta demuestra retención localizada de NP, estimula el pardeamiento, en consecuencia mejora la homeostasis de la glucosa y atenúa el aumento de peso corporal en comparación con el grupo de control. Estos hallazgos ofrecen nuevas vías para desarrollar una posible estrategia terapéutica para el tratamiento clínico de la obesidad y su síndrome metabólico asociado.

#### Materiales y métodos:

##### 50 Materiales:

El poli(D,L-lactida-co-glicólido) 50:50 (PLGA, Resomer 504) se obtuvo de Boehringer Ingelheim (Ingelheim, Alemania). La dibenzazepina (DBZ) se adquirió de Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido). El PLGA con un grupo amino terminal (PLGA-NH<sub>2</sub>) se adquirió de PolySciTech (West Lafayette, IN). La acetona (ACS certificada) y el cloroformo se adquirieron de Fisher Scientific. Todos los demás reactivos y disolventes se adquirieron de Sigma-Aldrich.

##### 55 Animales:

- 5 Todos los procedimientos relacionados con el mantenimiento de animales y el uso experimental se realizaron de acuerdo con el reglamento presentado por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Purdue. Se adquirieron ratones machos con obesidad inducida por muerte (DIO) de 10 semanas de edad con antecedentes C57BL/6 de Taconic y se alojaron en condiciones normales en la Universidad de Purdue. Se utilizó una dieta alta en grasas (Research Diets #D12492, 60% de grasa) para inducir y mantener la obesidad en los ratones. Los ratones con un peso corporal promedio de 36 g a las 14 semanas comenzaron a recibir tratamiento con nanopartículas. Después de 5 semanas, los ratones fueron sacrificados mediante una dosis letal de dióxido de carbono, seguido de una extracción inmediata de sangre de los corazones para la evaluación de los parámetros serológicos y luego una disección rápida de WAT, BAT inguinales e hígados para el análisis molecular y celular.
- 10 Síntesis y caracterización de nanopartículas. Las nanopartículas de PLGA se prepararon mediante un método de nanoprecipitación. En resumen, el PLGA se disolvió en acetona con o sin los compuestos farmacológicos correspondientes, incluidos DBZ o Nile Red (Fluka Analytical). La solución de la mezcla de polímero/fármaco se centrifugó (12.000 rpm, 4 °C, 45 min) y se dispersó en agua agitando durante 15 min. El tamaño y el potencial zeta se determinaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando Malvern Zetasizer. Las nanopartículas se tiñeron con una solución de ácido fosfotúngstico al 1% y se observaron su tamaño y morfología utilizando un microscopio electrónico de transmisión (Philips CM100) que opera a 200 kV. El contenido de DBZ en las nanopartículas se determinó mediante HPLC (Thermo Fisher).
- 15 Liberación de DBZ de las nanopartículas. La liberación de DBZ de las nanopartículas se examinó mediante diálisis, seguido de la caracterización por HPLC. En detalle, se transfirió 1 mL de solución NP con DBZ (1 mg/mL) a una bolsa de diálisis (10 kDa) y se sumergió en 40 mL de PBS (pH 7.4) o tampón acetato (pH 5,0) a 37 °C en un agitador orbital a 100°C. rpm. En momentos específicos, se retiraron 12 mL de solución tampón y se reemplazaron por solución nueva. La muestra se extrajo con cloroformo y luego se reconstituyó con 1 mL de una solución de acetonitrilo al 67 % en agua para análisis por HPLC.
- 20 Síntesis de NP PLGA-Cy5.5. La conjugación de un Cy5.5-éster NHS y PLGA-NH<sub>2</sub> (PM 30,000) se realizó mezclando 1.2 mg de Cy5.5-éster NHS y 33 mg de PLGA-NH<sub>2</sub> en 3 mL de DMSO en un matraz Schlenk al vacío y agitando durante la noche a temperatura ambiente en oscuridad. Después de la reacción, el producto final se purificó usando la técnica disolvente/no disolvente. La mezcla de reacción se vertió en 40 mL de metanol enfriado en un baño de hielo y se centrifugó a 8,000 rpm a 4 °C durante 30 min. El sedimento se disolvió nuevamente en DMSO y se repitió el procedimiento de lavado durante dos ciclos más. El sedimento final se secó usando una estufa de vacío durante 24 horas a temperatura ambiente. Las NP de PLGA-Cy5.5 se prepararon siguiendo el protocolo estándar descrito anteriormente.
- 25 Aislamiento y cultivo de la fracción vascular estromal (SVF) de WAT inguinal. El WAT inguinal se diseccionó específicamente y se picó en trozos pequeños, seguido de la digestión de 1.5 mg/mL de colagenasa en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con agitación suave a 37 °C durante 1.5 a 2 h. La digestión se terminó con suero bovino fetal (FBS) al 10% (vol/vol) en DMEM. Luego, la solución de la mezcla se filtró con un filtro celular de 100 pm (BD Falcon) y se sometió a una breve centrifugación a 450 g durante 5 minutos. Después de eliminar la capa lipídica flotante y el sobrenadante, el sedimento se resuspendió y se mantuvo con DMEM suplementado con FBS al 20 % (vol/vol) y penicilina/estreptomicina al 1 % a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>.
- 30 Captación celular de nanopartículas. Se sembraron células SVF en un portaobjetos con cámara de 8 pocillos (Lab-Tek) a una densidad de 10,000 células por pocillo y se cultivaron durante 24 h. Luego, las células se expusieron a DMEM que contenía 0.1 mg/mL de nanopartículas de PLGA cargadas con Nile Red durante 10 y 60 minutos. Después de lavar dos veces con PBS, las células se incubaron posteriormente con LysoTracker Green 50 nM (Life Technologies) durante 30 min y 1 mg/mL de Hoechst 33342 (Life Technologies) durante 10 min a 37 °C. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia Leica DMI 6000B.
- 35 Diferenciación adipogénica de células SVF con nanopartículas. Las células SVF se cultivaron en placas de cultivo de tejidos hasta la confluencia. Antes de la inducción adipogénica, las células se lavaron con PBS 3 veces y se incubaron con DMEM que contenía nanopartículas con una concentración final de 0.1 mg/mL durante 1 h. Después de retirar la suspensión de nanopartículas, las células se enjuagaron cuidadosamente con PBS y se sometieron al medio de inducción adipogénica que contenía DMEM, FBS al 10 % (vol/vol), insulina 2.85 µM, dexametasona 0.3 µM y 3-isobutilmetilxantina 0.63 mM durante 4 días. El día 5, las células se trataron nuevamente con nanopartículas con el mismo procedimiento descrito anteriormente, seguido del medio de diferenciación adipogénico que contenía DMEM, insulina 200 nM y triiodotironina 10 nM durante 4 días más hasta que los adipocitos maduraron.
- 40 Medición de la tasa de consumo de oxígeno (OCR). Se cultivaron y sembraron células SVF de WAT inguinal de tres ratones diferentes en la microplaca XF24 seahorse (Seahorse Biosciences) a una densidad de 20,000 células por pocillo. Las células fueron inducidas y diferenciadas a adipocitos maduros con el tratamiento de las NP con PLGA y NP con DBZ siguiendo los protocolos descritos anteriormente. Después de 8 días de diferenciación, los adipocitos maduros se lavaron dos veces con PBS y se preincubaron en medio base XF suplementado con glucosa 20 mM, glutamina 2 mM y piruvato 1 mM durante 1-2 h a 37 °C en un ambiente libre de CO<sub>2</sub>. La OCR se midió en el analizador de flujo extracelular XF (Seahorse Biosciences) después de la inyección secuencial de oligomicina (1 mM), FCCP (1
- 45
- 50
- 55

mM) y rotenona/antimicina A (0.5  $\mu$ M). Los valores de OCR presentados se normalizaron con respecto a la masa proteica.

5 Estudios de imágenes *in vivo*. Después de la anestesia con un cóctel de ketamina-xilazina, a los ratones se les inyectaron nanopartículas de PLGA conjugadas con Cy5.5 de 1 mg/mL suspendidas en PBS en el WAT inguinal. Las imágenes se tomaron con el sistema de imágenes IVIS Lumina II (Caliper, EE. UU.) a las 24, 48 y 72 h después de la inyección. Después de la exploración de 72 h, se sacrificó a los ratones y se recogieron múltiples tejidos relacionados, seguido de la toma de imágenes *ex-vivo*. Las imágenes fluorescentes fueron analizadas por el software Living Image.

10 Mediciones de glucosa en sangre. Para GTT, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal 100 mg/mL de D-glucosa (2 g kg<sup>-1</sup> de peso corporal) después de un ayuno de 16 h. Se extrajo sangre de las colas y se midieron los niveles de glucosa con un glucómetro (Accu-Check Active, Roche). Para ITT, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal insulina humana (Santa Cruz) (0.75 U por kg de peso corporal) después de 4 h de ayuno. Se midieron las concentraciones de glucosa en la sangre extraída de las colas. Tanto para GTT como para ITT, los ratones se separaron en uno por jaula con órdenes aleatorias.

15 Medición de parámetros serológicos. Los niveles en suero de ácidos grasos libres, glucosa, colesterol y triglicéridos de ratones DIO en ayunas después del tratamiento con nanopartículas durante 5 semanas se examinaron mediante kits estándar de Randox Laboratories. El nivel de insulina en suero se midió mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ALPCO).

20 Tinción con H&E e inmunohistoquímica. Se fijaron porciones de WAT inguinal en formalina al 10 % durante 24 h a temperatura ambiente, se incluyeron en parafina y se cortaron en portaobjetos de 4  $\mu$ m. Los portaobjetos se desparafinaron y se incubaron con xileno, etanol y agua secuencialmente para la rehidratación de acuerdo con protocolos estándar. Para la tinción con H&E, los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina durante 15 minutos, seguido de tinción con eosina durante 1 minuto. Para la tinción por inmunohistoquímica, los portaobjetos se incubaron en citrato de sodio 0.01 M (pH 6.0) y se calentaron a 96 °C durante 20 minutos para recuperar los antígenos. La inmunohistoquímica de Ucp1 se realizó en un Dako Autostainer (Dako, Carpinteria, CA). Los portaobjetos se tiñeron con el anticuerpo primario Ucp1 (ab10983, Abcam) a una dilución 1:200 durante 1 h. Para la detección de señales, se utilizó el kit de detección de polímeros anti-IgG de conejo (MP-7401, Vector). Luego se utilizó 3,3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno para visualizar el marcaje. Las imágenes se recolectaron a través de un escáner de diapositivas Aperio Scan Scope (Aperio, Vista, CA).

30 Tinción con Oil Red O. Después de la criosección, las muestras de hígado se tiñeron con la solución de trabajo Oil red O que contenía una solución madre de Oil red O al 60 % (vol/vol) (5 g 1-1 en isopropanol) durante 30 min. Después de la tinción, los portaobjetos se lavaron con isopropanol al 60 % y se tomaron imágenes.

35 Extracción de ARN total, síntesis de ADNc y PCR cuantitativa. El ARN total se extrajo de células o tejidos mediante Trizol (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la medición de la concentración de ARN mediante Nanodrop (Thermo Fisher), se transcribieron de forma inversa 5  $\mu$ g de ARN a ADNc con cebadores hexámeros aleatorios mediante la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen). La PCR cuantitativa se realizó en el sistema de PCR Roche Light Cycler 96 (Roche). Las secuencias de los cebadores se enumeraron en la tabla complementaria S. Para el análisis de resultados, se usó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para calcular los cambios relevantes de la expresión génica después de la normalización al ARNr 18S.

40 Extracción de proteínas y transferencia Western. La proteína se extrajo de muestras de células o tejidos con tampón RIPA que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0.5 % y dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1 %. La concentración de proteína se determinó mediante el reactivo de ensayo de proteínas Pierce BCA (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE. UU.). Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y luego se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore Corp., Billerica, MA), seguido del bloqueo con leche al 5 % durante 1 h. Luego las membranas se incubaron con anticuerpos primarios a 4 °C durante la noche. Los anticuerpos Hes1 (SC-166378), Pgc1- $\alpha$  (SC-13067) y  $\beta$ -actina (SC-47778) (Santa Cruz Biotechnology) se diluyeron todos 1:1,000. Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (anti-IgG de conejo, 7074S o anti-IgG de ratón, 7076S, Cell Signaling) se diluyeron 1:5,000. Después de la incubación con anticuerpos secundarios durante 2 h, se utilizó el sustrato de transferencia Western de quimioluminiscencia mejorada (Pierce Biotechnology) para detectar señales con un sistema de imágenes táctiles ChemiDoc<sup>MC</sup> (Bio-Rad).

50 Análisis estadístico. Los datos cuantitativos se representaron como media  $\pm$  eem. Los valores de p se calcularon mediante una prueba t de Student de dos colas. P < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

#### Resultados:

55 Síntesis y caracterización de nanopartículas. Los NP con DBZ se formularon en una relación de masa DBZ/PLGA de 1:19 utilizando un método de nanoprecipitación con condiciones optimizadas (Tabla 1), lo que resultó en una alta eficiencia de encapsulación del 94 %. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostró las estructuras esféricas de las NP con DBZ sintetizados (Fig. 16a). Como se muestra en la Fig. 16b, se determinó que el tamaño de las nanopartículas era  $\sim$  150 nm mediante la dispersión dinámica de la luz (DLS). Se utilizaron NP con PLGA desnudos de tamaño similar como controles. El potencial zeta de superficie para las NP con DBZ en agua fue de  $-20.2 \pm 3.0$  mV.

Para examinar la estabilidad de las nanopartículas resultantes, se incubaron en soluciones salinas tamponadas a diferentes valores de pH y luego se controlaron mediante DLS el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) (Fig. 21). No se encontraron diferencias significativas en el tamaño de partícula y el PDI en diferentes condiciones de pH durante 7 días. Para evaluar las características de liberación de DBZ, investigamos perfiles de liberación *in vitro* de DBZ de las NP con DBZ en condiciones neutras (1 × tampón de PBS, pH 7.4) y ácidas (1 × tampón de PBS, pH 5.0) a 37 ° C. Las NP con DBZ presentaron liberación continua de DBZ con una vida media de 1 día a pH 5.0 y 3 días a pH 7.4, respectivamente (Fig. 16c). Además, la cinética de liberación de DBZ de estas NP con DBZ se analizó mediante modelos matemáticos (Tabla 2). Los datos de liberación se ajustaron bien al modelo de Korsmeyer-Peppas en ambos valores de pH (Fig. 22), lo que indica que DBZ se libera por difusión.

Captación celular de nanopartículas. La captación celular de NP por parte de los preadipocitos primarios se examinó mediante microscopía de barrido láser confocal (Fig. 17a). Las NP se visualizaron encapsulando un tinte fluorescente Nile Red mientras que los endo/lisosomas tardíos se tiñeron con LysoTracker Green (LTG). Las fracciones vasculares estromales (SVF) se aislaron de WAT inguinal y se cultivaron, seguido de la incubación con nanopartículas. En 10 minutos, los endo/lisosomas tardíos se colocalizaron con las NP en preadipocitos, como se evidencia por la aparición de fluorescencia de color naranja a amarillo, lo que indica una endocitosis relativamente rápida de las NP. Cuando el tiempo de incubación se prolongó a 60 minutos, las NP se distribuyeron por todo el citoplasma y alrededor del núcleo, lo que sugiere el escape endolisosomal de las NP. A continuación, el proceso de endocitosis de las NP se visualizó aún más mediante imágenes de TEM (Fig. 17b). Después de 10 minutos de incubación, las NP se identificaron claramente tanto en las vesículas endocíticas como en los endosomas, de acuerdo con los resultados discutidos anteriormente. Para validar aún más la absorción celular de NP a nivel tisular, recuperamos WAT inguinal de ratones y posteriormente las incubamos con NP cargadas de Nile Red. Después de 24 h de incubación, se observó fluorescencia roja en una gran cantidad de adipocitos maduros (Fig. 23a). La absorción celular de nanopartículas se confirmó aún más mediante imágenes de TEM de WAT inguinal (Fig. 23b), lo que demuestra la localización de nanopartículas dentro de los adipocitos. Nuestros datos sugirieron que los adipocitos internalizaron rápidamente las NP a través de la vía endocitótica.

Las NP con DBZ inhiben Notch y promueven los efectos de pardeamiento *in vitro*. Para probar la bioactividad de nuestras NP con DBZ para suprimir la señalización de Notch y estimular el pardeamiento, indujimos la diferenciación adipogénica de células SVF junto con el tratamiento de las NP con DBZ o las NP de PLGA de control. Después de 8 días de diferenciación, examinamos los niveles de ARNm de las dianas Notch y los marcadores de pardeamiento mediante un ensayo de PCR cuantitativo. Los genes diana clásicos de Notch, *Hey1*, *HeyL*, y *Hes1*, disminuyeron significativamente con el tratamiento de las NP con DBZ (Fig. 18a). Mientras tanto, los niveles de ARNm de los marcadores de pardeamiento, incluidos *Ucp1*, *Cidea*, *Pparg1a* y *dio2*, se elevaron dramáticamente (Fig. 18b). Siempre que los efectos de pardeamiento estén intrínsecamente asociados con la biogénesis de las mitocondrias y la capacidad oxidativa, el nivel de ARNm de las subunidades oxidativas 5b del citocromo C (*Cox5b*) aumentó significativamente con el tratamiento de las NP con DBZ (en un 69%, Fig. 18c). Consistentemente, el nivel de proteína de Hes1 disminuyó mientras que el de PGC1 $\alpha$  aumentó notablemente, lo que se cuantificó mediante el análisis de densitometría (Fig. 18d), lo que sugiere la inhibición de Notch y el efecto de pardeamiento por parte de las NP con DBZ. Además, para determinar si estas alteraciones moleculares observadas pueden reflejarse en la respiración celular, se investigó la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de los adipocitos diferenciados en un analizador XF24. Con el tratamiento con NP con DBZ, la OCR en condiciones tanto basales como de fuga de protones aumentó significativamente (Fig. 18e). En conjunto, estos resultados sugirieron que el DBZ liberado de las NP retuvo su bioactividad para inhibir Notch y así inducir el pardeamiento *in vitro*.

La retención local de las NP con DBZ conduce al pardeamiento del WAT inguinal *in vivo*. Para evaluar la capacidad de retención de NP local dentro del WAT, se investigó la biodistribución *in vivo* de las NP de PLGA marcadas con Cy5.5 (Cy5.5-NP) después de la inyección en los depósitos de WAT inguinales utilizando una técnica de imágenes ópticas de infrarrojo cercano no invasiva. El colorante de fluorescencia del infrarrojo cercano Cy5.5-éster NHS se conjugó con PLGA-NH<sub>2</sub> mediante la formación de enlaces amida, seguido de la formulación estándar de nanopartículas. Posteriormente, esas nanopartículas se inyectaron en los depósitos WAT inguinales, que constituyen el tejido graso ampliamente investigado debido a su importante capacidad para reclutar adipocitos beige. Después de 24 h de administración, las Cy5.5-NP presentaron una señal de fluorescencia intensiva alrededor del lugar de la inyección. A medida que aumentó el tiempo, la intensidad de fluorescencia de Cy5.5-NP disminuyó con las señales de fluorescencia retenidas en el depósito de WAT hasta 72 h después de la inyección, lo que indica un fuerte efecto de retención de NP dentro del WAT (Fig. 19a). Después de 72 h de la inyección, los ratones se sacrificaron inmediatamente y se recolectaron tejidos relevantes, incluidos WAT inguinal (iWAT), WAT subcutáneo anterior (asWAT), BAT, músculo, hígado, bazo, riñón y corazón para obtención de imágenes *ex vivo*. Es de destacar que la señal de fluorescencia de Cy5.5-NP se detectó exclusivamente en el WAT inguinal mientras que estaba ausente en los tejidos fuera del objetivo (Fig. 19b), lo que estuvo de acuerdo con los hallazgos sobre la retención local de NP dentro de iWAT. Además, el análisis de TEM de iWAT confirmó aún más la localización de nanopartículas dentro de los adipocitos después de la inyección *in vivo* (Fig. 19c). En conjunto, estos datos respaldaron el potencial de las nanopartículas para lograr la administración intracelular local a los depósitos de WAT inguinales y al mismo tiempo minimizar los efectos fuera del objetivo. A continuación, evaluamos la eficacia de nuestras NP con DBZ para inhibir Notch y, en consecuencia, promover el pardeamiento *in vivo*. Empleamos el modelo de ratón con obesidad inducida por dieta (DIO) e inyectamos NP con DBZ en los depósitos de WAT inguinales una vez por semana durante 5 semanas. Después de eso, se extrajo

el ARN total del WAT inguinal, seguido del análisis cuantitativo por PCR. El nivel de ARNm de *UCP1* se incrementó seis veces en el grupo NP con DBZ en comparación con el grupo de control NP con PLGA (Fig. 19d). Consistentemente, los niveles de ARNm de los genes de las mitocondrias *Cox5b* y *Cox7a* aumentaron drásticamente por la NP con DBZ en comparación con las NP con PLGA (Fig. 19e). Estos cambios moleculares fueron corroborados por la tinción inmunohistoquímica con H&E y UCP1 del WAT inguinal, lo que demuestra gotitas de lípidos multiloculares, contracción de los adipocitos y expresión elevada de UCP1 (Fig. 19f), un indicador distintivo del efecto de pardeamiento resultante del tratamiento con NP con DBZ. Por lo tanto, la administración local de las NP con DBZ podría inhibir eficazmente la señalización de Notch e inducir el pardeamiento del WAT local *in vivo*.

Las NP con DBZ mejoran el metabolismo y previenen la obesidad inducida por la dieta. Además, intentamos evaluar si el pardeamiento inductivo de los depósitos WAT inguinales locales por parte de las NP con DBZ podría regular el metabolismo y reducir la obesidad en ratones obesos. Utilizamos el modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasas (HFD) e inyectamos NP con DBZ en los depósitos de WAT inguinales una vez por semana para determinar los efectos de las NP con DBZ sobre el peso corporal, la morfología del tejido de los adipocitos y el metabolismo de la glucosa. No hubo diferencias en el aumento de peso corporal entre los ratones tratados con Rosi (en solución y en formas de NP no dirigidas) y los ratones obesos no tratados. Notablemente, el tratamiento con NP con DBZ atenuó el aumento de peso corporal observado en el grupo de control tratado con NP con PLGA sin afectar la ingesta de energía (Fig. 20a, b). Después de 5 semanas de tratamiento, se sacrificó a los ratones y se recuperaron muestras de tejido. El WAT inguinal con el tratamiento NP con DBZ parecía de tamaño más pequeño en comparación con sus homólogos con NP con PLGA, lo que se verificó aún más por el menor peso del WAT inguinal de los ratones tratados con NP con DBZ (Fig. 20c). Más sorprendentemente, los efectos de pardeamiento local de las NP con DBZ condujeron a una tolerancia a la glucosa (Fig. 20d) y a la sensibilidad a la insulina (Fig. 20e) significativamente mejoradas. Consistentemente, el análisis de la química plasmática demostró una reducción significativa del 54 % en el nivel de glucosa en los ratones tratados con NP con DBZ que en aquellos con NP con PLGA (Fig. 20f). Además, hubo una disminución del 47 % en el nivel de colesterol en sangre en ratones que recibieron NP con DBZ (Fig. 20g). No se observaron diferencias estadísticas en los niveles de insulina en plasma (Fig. 20h), triglicéridos, ácidos grasos libres y resistencia a la insulina (IR) (Fig. 23) en ratones tratados con NP con DBZ y NP con PLGA. Estos resultados en conjunto proporcionan evidencia alentadora de que la administración local de las NP con DBZ a WAT puede ejercer efectos metabólicos positivos significativos en la prevención de la obesidad en un modelo de ratón DIO.

Además, el contenido de lípidos se redujo en el hígado de los ratones tratados con NP con DBZ que en los ratones tratados con NP con PLGA (Fig. 24a). Esto se confirmó además mediante el análisis de qPCR de genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos hepáticos. El nivel de ARNm de carnitina palmitoiltransferasa I (*Cpt1*) aumentó significativamente con el tratamiento con NP con DBZ (Fig. 24b), lo que indica una oxidación elevada de ácidos grasos. Y los niveles de ARNm de la lipasa de triglicéridos adiposos (*Atgl*) y lipasa sensible a hormonas (*hsl*), los cuales contribuyen a la lipólisis en el hígado, aumentaron profundamente con el tratamiento con NP con DBZ (Fig. 24c). Mientras tanto, la nueva lipogénesis se redujo significativamente en el hígado de ratones que recibieron NP con DBZ, lo que se manifiesta por la disminución del nivel de ARNm de acetil-CoA carboxilasa 1 (*ACC1*) (Fig. 24d), la etapa limitante de la velocidad en la síntesis de ácidos grasos. En conjunto, estos datos sugirieron que el pardeamiento local por NP con DBZ mejoró el metabolismo de los lípidos hepáticos en condiciones de alimentación con HFD.

Estos beneficios sistémicos obtenidos por la manipulación local también están de acuerdo con la publicación anterior de que el trasplante de WAT subcutáneo de ratones entrenados con ejercicio o BAT de ratones normales mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina.

En los últimos años se ha descubierto una gran cantidad de factores de pardeamiento que mejoran el gasto de energía, como los agonistas de la vía  $\beta$ 3-adrenérgica<sup>27, 28</sup>, BMP<sup>29, 30</sup>, FGF<sup>31, 32, 33</sup>, irisina<sup>34</sup>, hormonas tiroideas<sup>35, 36</sup> y péptidos natriuréticos<sup>37</sup>. Sin embargo, estos factores se han enfrentado a importantes desafíos traslacionales debido a la exposición incontrolada del tejido y la cinética impredecible con la administración sistémica. Por ejemplo, aunque FGF21 ha sido un fármaco prometedor para la diabetes tipo 2 debido a su poderosa capacidad para modular el metabolismo de la glucosa y los lípidos, la administración sistémica de FGF21 se asocia con la fragilidad esquelética<sup>38</sup>. Por lo tanto, existe una necesidad crítica de desarrollar una plataforma eficiente de administración de fármacos para avanzar en la traducción clínica. Las nanopartículas poliméricas diseñadas divulgadas en el presente documento podrían aplicarse potencialmente para proporcionar un amplio espectro de estos factores de pardeamiento. Además, también puede ser ventajoso incorporar diferentes factores de pardeamiento simultáneamente para lograr efectos sinérgicos.

En este ejemplo, diseñamos y sintetizamos una plataforma de NP polimérica mediante nanoprecipitación de PLGA biodegradable y biocompatible para la administración intracelular directa de DBZ a los depósitos de WAT. Estas nanopartículas de PLGA cargadas con DBZ (NP con DBZ) se optimizaron en cuanto a tamaño de partícula y propiedades de superficie, y fueron rápidamente internalizadas por los adipocitos durante cultivo de células *in vitro*. Además, demostramos que el DBZ liberado a partir de estos NP con DBZ dio como resultado la inhibición de los genes diana de Notch y la elevación de los genes marcadores de pardeamiento y de las mitocondrias de los adipocitos. Es importante destacar que la inyección local de estas NP con DBZ diseñadas en los depósitos de WAT inguinales en un modelo de ratón obeso inducido por dieta demostró una retención localizada de NP en el depósito sin ninguna acumulación en otros órganos principales, estimuló el pardeamiento de WA y, en consecuencia, mejoró la homeostasis de la glucosa y atenuó el aumento de peso corporal en comparación con el grupo de control. Estos hallazgos no sólo

proporcionan información mecánica sobre la contribución directa del pardeamiento local de WAT inducido por la inhibición de Notch a las mejoras metabólicas sistémicas, sino que también ofrecen nuevas vías para desarrollar una estrategia terapéutica potencial basada en el pardeamiento de los depósitos de WAT para el tratamiento clínico de la obesidad y su síndrome metabólico asociado.

5

Tabla 1

Factores	Valores optimizados
Concentración de PLGA	0.02 g/mL
Volumen de acetona	5 mL
concentración de PVA	0.5 %
Velocidad de agitación	600 rpm
Temperatura	20 °C
Volumen de H <sub>2</sub> O	100 mL

Tabla 2

Modelo		pH 5.0		pH 7.4	
		Promedio	e.e.m.	Promedio	e.e.m.
Orden cero $Q_t = Q_0 + K_0t$	K (%*min-1)	0.013	0.001	0.008	0.002
	Reajustado	0.277	0.099	0.668	0.076
	AIC	170.338	2.213	141.432	12.451
	MSC	0.231	0.131	1.043	0.223
Primer orden En $Q_t = En Q_0 + K_1t$	K (%*min-1)	0.001	0.000	0.000	0.000
	Reajustado	0.859	0.031	0.848	0.076
	AIC	140.113	2.917	118.756	10.070
	MSC	1.910	0.259	2.303	0.877
Modelo de Higuchi $Q_t = K_H(t)^{1/2}$	K (%*min-1/2)	1.517	0.087	0.695	0.193
	Reajustado	0.911	0.031	0.947	0.008
	AIC	67.788	4.281	108.736	10.730
	MSC	2.365	0.322	2.859	0.151
Modelo de Korsmeyer-Peppas $Q_t/Q_\infty = K_k t^n$	K (%*min-n)	3.514	0.584	1.184	0.465
	n	0.380	0.017	0.455	0.039
	Reajustado	0.988	0.003	0.959	0.005
	AIC	44.558	4.696	105.300	10.621
	MSC	4.301	0.296	3.050	0.130

Tabla 3

Gen	Secuencias	SEQ ID NO
Hey1	5'-TGAATC CAG ATG ACC AGC TAC TGT-3'	1
	5'-TAC TTT CAGACT CCG ATC GCT TAC-3'	2
HeyL	5'-CAG ATG CAA GCC CGG AAG AA-3'	3
	5'-ACC AGA GGC ATG GAG CAT CT-3'	4
Hes1	5'-GCA CAG AAA GTC ATC AAA GCC-3'	5
	5'-TTG ATC TGG GTAATG CAG TTG-3'	6
UCP1	5'-AGG CTT CCA GTA CCA TTA GGT-3'	7
	5'-CTG AGT GAG GCA AAG CTG ATT T-3'	8
Ppargc1a	5'-AGC CGT GAC CAC TGA CAA CGA G-3'	9

## ES 2 956 666 T3

Gen	Secuencias	SEQ ID NO
	5'-GCT GCA TGG TTC TGA GTG CTAAG-3'	10
Cidea	5'-TGA CAT TCA TGG GAT TGC AGA C-3'	11
	5'-GGC CAG TTG TGA TGA CTAAGA C-3'	12
Dio2	5'-AAT TAT GCC TCG GAG AAG ACC G-3'	13
	5'-GGC AGT TGC CTA GTG AAA GGT-3	14
Cox5b	5'-TTC AAG GTT ACT TCG CGG AGT-3'	15
	5'-CGG GAC ETIQUETA ATT AGG GTC TTC C-3'	16
Cox7a	5'-GCT CTG GTC CGG TCT TTT AGC-3'	17
	5'-GTA CTG GGA GGT CAT TGT CGG-3'	18



## REIVINDICACIONES

1. Un agente terapéutico para usar en el tratamiento de una enfermedad que se beneficia de inducir selectivamente el pardeamiento de los adipocitos en un sujeto que comprende:
- 5 al menos un compuesto o composición que induce la formación de adipocitos pardos y/o beige, en el que al menos un compuesto o composición es un inhibidor de la vía de señalización de Notch, en el que dicho inhibidor es capaz de sobrerregular la expresión de la proteína de desacoplamiento 1 (*Ucp1*) o *Pparg1a*; un polímero que forma micropartículas o nanopartículas y que encapsula al menos un compuesto o composición; y en el que el agente terapéutico se inyecta en depósitos de tejido adiposo blanco (WAT).
- 10 2. El agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de la vía de señalización de Notch se selecciona entre inhibidores de  $\gamma$ -secretasa que incluyen dibenzazepina (DBZ) y (t-butil éster de N-[N-(3,5-difluorofenacetil)-1-alanil]-S-fenilglicina) (DAPT).
3. El agente terapéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero
- 15 - se selecciona del grupo que consiste en polímeros sintéticos y polímeros naturales, y/o  
 - se selecciona del grupo que consiste en polímeros biodegradables y polímeros no degradables; y/o  
 - comprende una clase de vesículas artificiales hechas de copolímeros de bloques anfífilos sintéticos, en los que dichas vesículas artificiales comprenden esferas huecas que contienen una solución acuosa en el núcleo rodeada por una membrana bicapa, y/o  
 - el polímero es poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA).
4. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
- 20 al menos un compuesto o composición que induce la formación de adipocitos pardos y/o beige, en el que al menos un compuesto o composición es un inhibidor de la vía de señalización de Notch, en el que dicho inhibidor es capaz de sobrerregular la expresión de la proteína de desacoplamiento 1 (*Ucp1*) o *Pparg1a*; y un polímero que forma micropartículas o nanopartículas y encapsula al menos un compuesto o composición para su uso en el tratamiento de la obesidad en un sujeto, en el que el agente terapéutico se inyecta en depósitos de tejido
- 25 adiposo blanco (WAT).
5. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
- al menos un compuesto o composición que induce la formación de adipocitos pardos y/o beige, en el que al menos un compuesto o composición es un inhibidor de la vía de señalización de Notch, en el que dicho inhibidor es capaz de sobrerregular la expresión de la proteína de desacoplamiento 1 (*Ucp1*) o *Pparg1a*; y
- 30 un polímero que forma micropartículas o nanopartículas y que encapsula al menos un compuesto o composición para su uso en el tratamiento de la diabetes en un sujeto, en el que el agente terapéutico se inyecta en depósitos de tejido adiposo blanco (WAT).
6. El agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que la encapsulación del fármaco dentro del sistema de matriz polimérica se desarrolla mediante interacciones físicas seleccionadas entre cualquiera
- 35 de una o una combinación de interacción hidrófoba, interacción hidrófila, enlaces de hidrógeno e interacciones intermoleculares e interacciones electrostáticas intermoleculares, y/o en el que la encapsulación del fármaco dentro del sistema de matriz polimérica se desarrolla a través de un enlace de conjugación entre el fármaco y el polímero a través de al menos un grupo funcional.
7. El agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el enlace de conjugación polímero-fármaco está formado por cualquiera de o una combinación de reacción de amina, reacciones de tiol (por ejemplo, reacciones clic de tiol), reacción de carboxilato, reacciones de hidroxilo, reacciones de aldehído y cetona, reacciones de hidrógeno activo, reacciones fotoquímicas y reacciones de cicloadición (por ejemplo, reacción de Diels-Alder, cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC), cicloadición de Huisgen de azida-alquino sin cobre).
- 40 8. El agente terapéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos un grupo funcional se selecciona del grupo que comprende cualquiera de o una combinación de aminas, tiol, ácido carboxílico, aldehído, cetona, sitios de hidrógeno activo en el anillo aromático, dieno, isotiocianatos de azida, isocianatos, azidas de acilo. Éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), sulfo-NHS, cloruro de sulfonilo, aldehídos, epóxidos, carbonatos, haluro de arilo, imidoésteres, carbodiimidas (por ejemplo, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), compuesto de alquilfosfato, anhídrido, éster de fluorofenilo, hidroximetilfosfina,
- 50 grupo guanidino, derivado de yodoacetilo, maleimidias, aziridinas, derivados de acrililo, agentes arilantes, derivados de disulfuro, vinilsulfona, feniltioéster, cisplatino, diazoacetato, carbonildiimidazol, oxiranos, Carbonato de N,N'-disuccinimidilo (DSC), cloroformiato de N-hidroxilsuccinimidilo, halógenos de alquilo, hidracina, maleimida, alquino y cloro unido a fósforo.
9. El agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el enlace conjugado comprende
- 55 cualquiera de o una combinación de isotiourea, isourea, amida, sulfonamida, base desplazada, amina secundaria,

carbamato, arilamina, amidina, fosforamido, tioéter, disulfuro,  $\beta$ -tiosulfonilo, éster, carbamato, hidrazona, diazo, cicloadición 2 + 4, 1,2,3-triazoles, carbohidratos, enlace ésteres de aminoácidos.

10. El agente terapéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que el sistema de matriz polimérica comprende

- 5 - polímeros sintéticos que comprenden cualquiera de o una combinación de poli(éster alifático) (por ejemplo, poli(lactida) (PLA), poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli(carbonato de trimetileno) (PTMC), polidioxanona (PDS), poli(orto éster), polianhídridos, poli(anhídrido-co-imida), poli(ésteres de anhídrido), poliuretanos (por ejemplo, Degrapols), poli(sebacato de glicerol), poli(etilenimina), poli(ácido acrílico)(PAA), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAm), poli(oxazolinas)
- 10 (por ejemplo, poli(2-metiloxazolina y poli(2-etil-2-oxazolina), fumaratos de oligo(etilenglicol) (OPF), fumarato de polipropileno), poli(cianoacrilatos de alquilo), amida poliacrítica, poli(aminoácidos sintéticos) (por ejemplo, poli(ácido L-glutámico) (L-PGA) y poli(ácido aspártico), polifosfacenos y poli(fosfoésteres) y mezclas de los mismos, y/o
- 15 - polímeros naturales que comprenden cualquiera de o una combinación de fibrina, colágeno, matrigel, elastina, péptidos similares a elastina, albúmina, poli(aminoácidos) naturales (por ejemplo, cianoficina, poli( $\epsilon$ -L-lisina) y poli(ácido  $\gamma$ -glutámico)), y polisacáridos (por ejemplo, ácido hialurónico, quitosano, dextrano, sulfato de condroitina, agarosa, alginato y heparina), y mezclas de los mismos, y/o
- polímeros no degradables.

11. El agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que los polímeros no biodegradables comprenden cualquiera de o una combinación de poli(etileno) (PEE), poli(butadieno) (PBD), poli(dimetilsiloxano)
- 20 (PDMS) y poli(estireno) (PS), poli(N-etil-4-vinipiridinio), poli(2,2-(metacrilato de dimetilaminoetilo), poli(etilenimina), poli(alilamina) y poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli(ácido acrílico), poli(sulfonato de estireno), poli(sulfato de vinilo) y poli(metacrilato de 3-sulfopropilo), y poliamida acrílica y mezclas de los mismos.

12. El agente terapéutico para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en el que el sistema de matriz polimérica comprende cualquiera de o una combinación de arquitecturas lineales, en forma de estrella,
- 25 hiperramificadas y entrecruzadas.

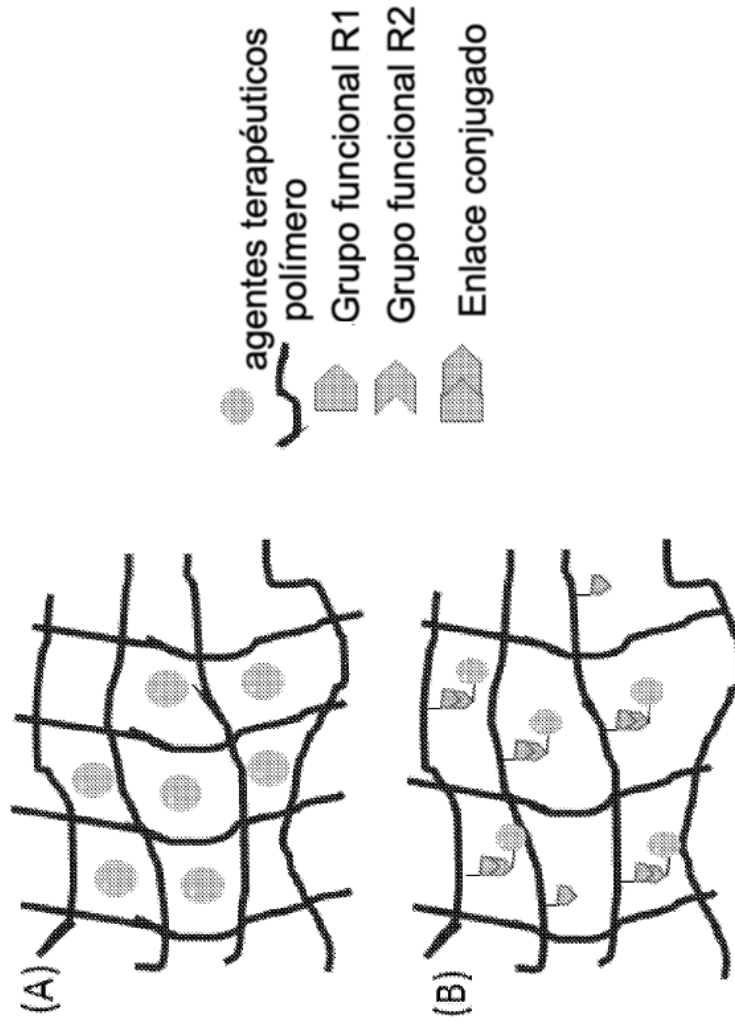


Fig. 1A

Fig. 1B

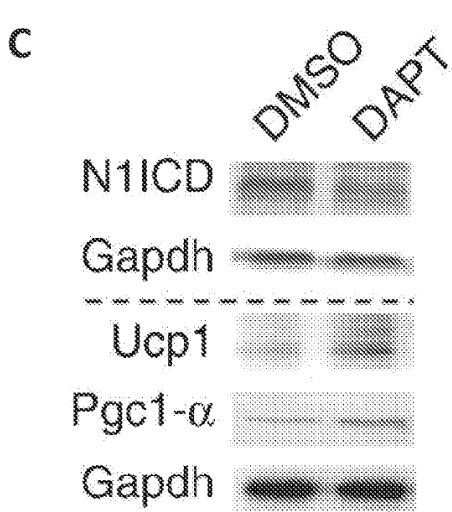
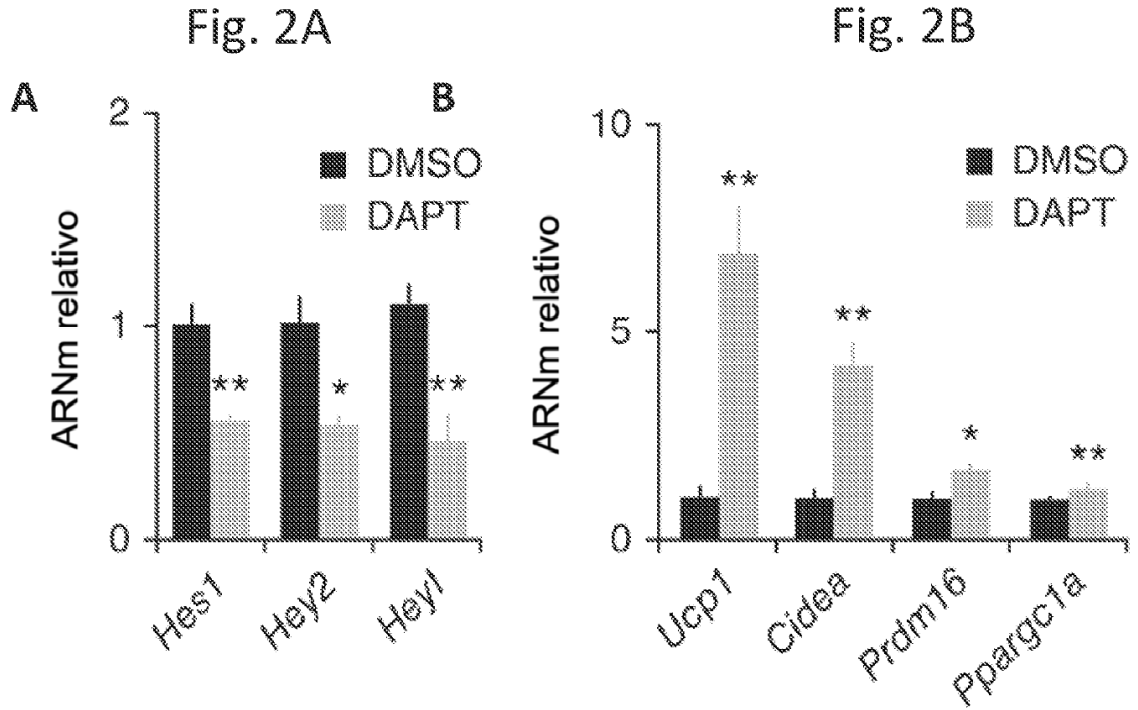


Fig. 2C

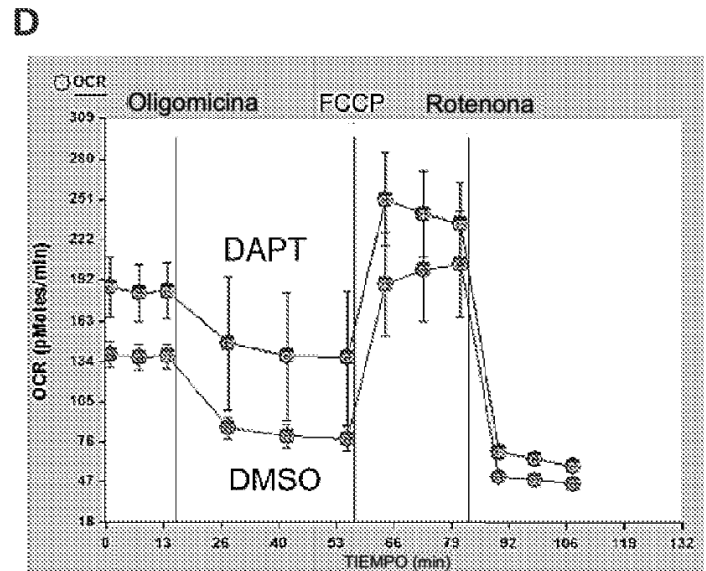


Fig. 2D

Figs. 2A -2D

Fig. 3A

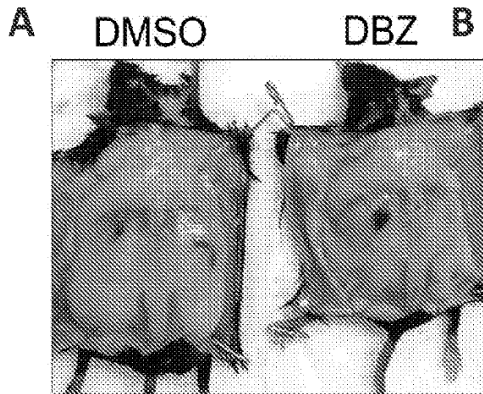


Fig. 3B

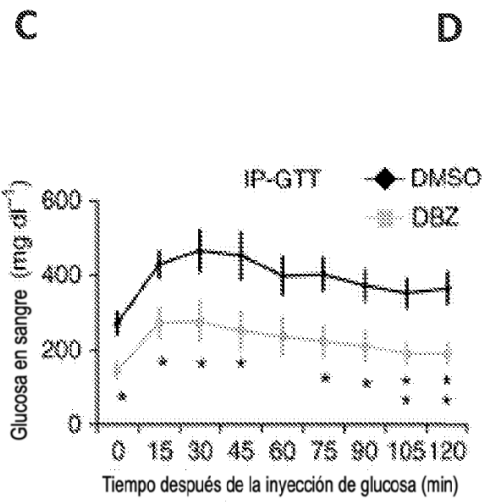
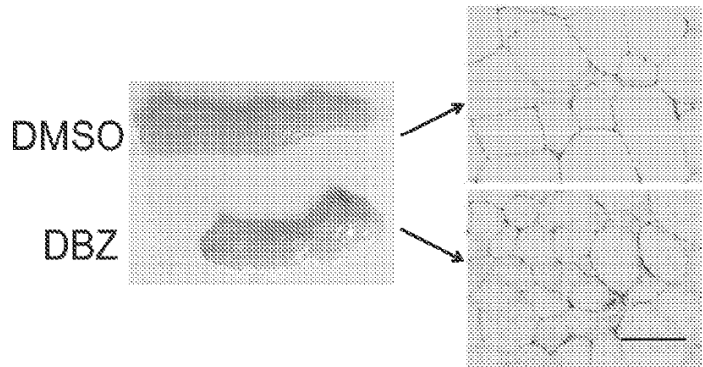


Fig. 3C

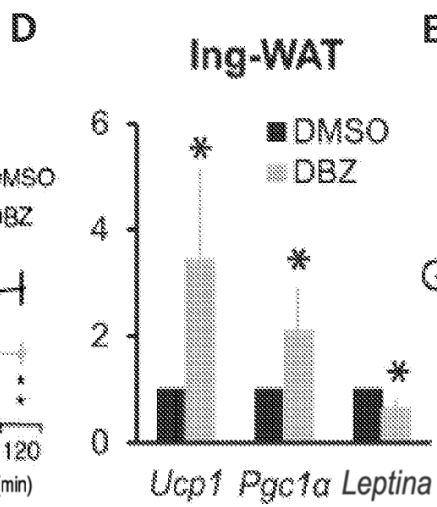


Fig. 3D

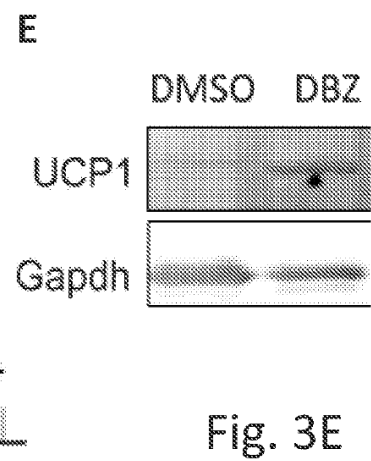


Fig. 3E

Figs. 3A – 3E

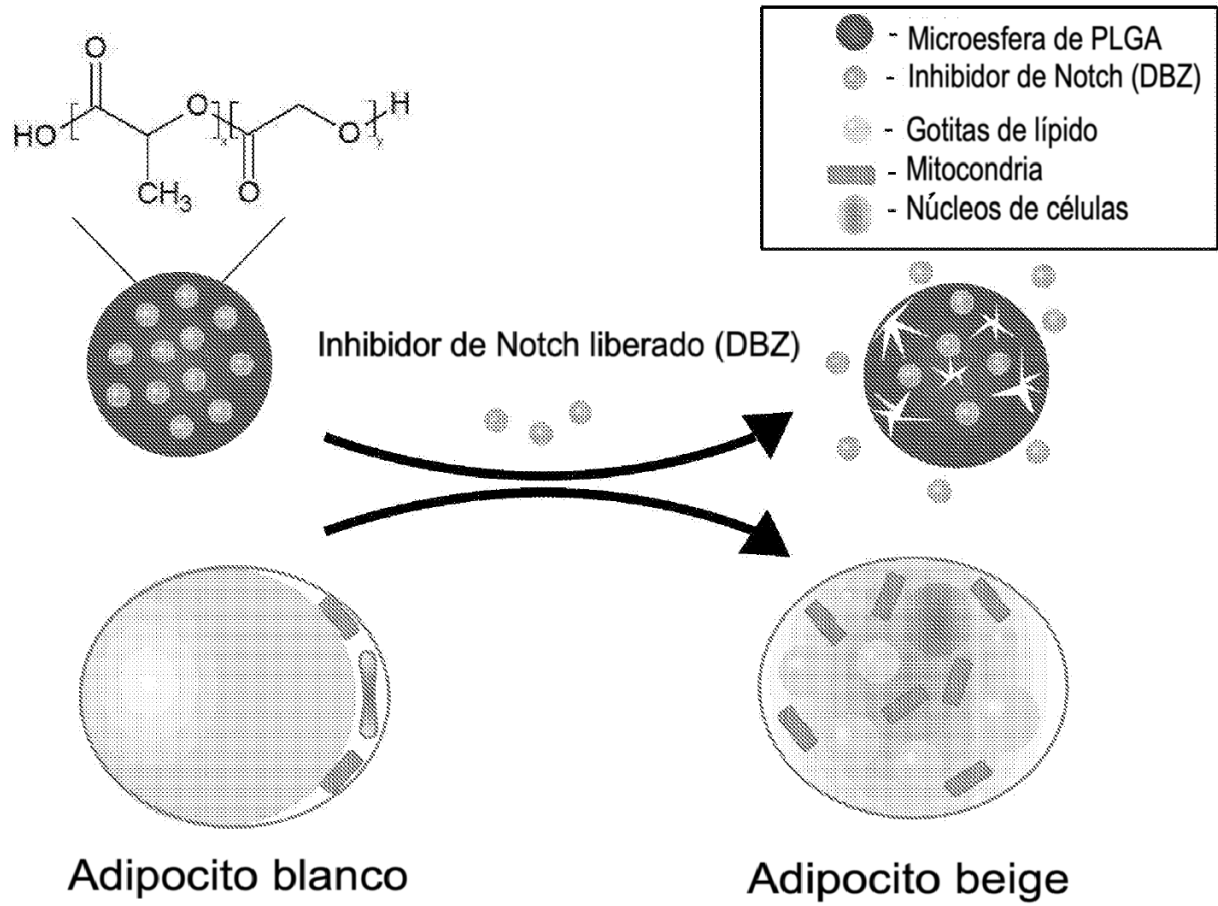


Fig. 4

Fig. 5A

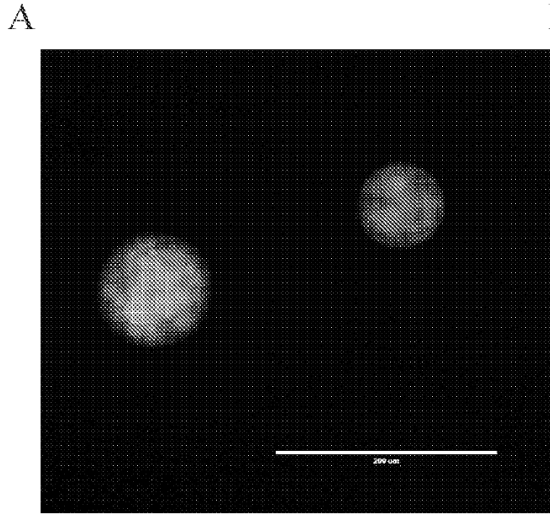
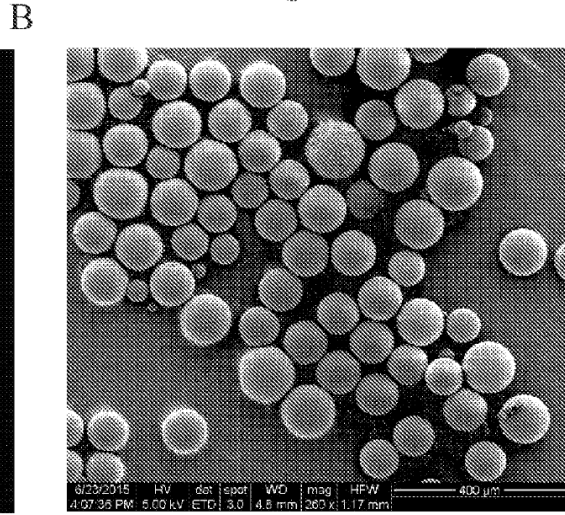


Fig. 5B



C

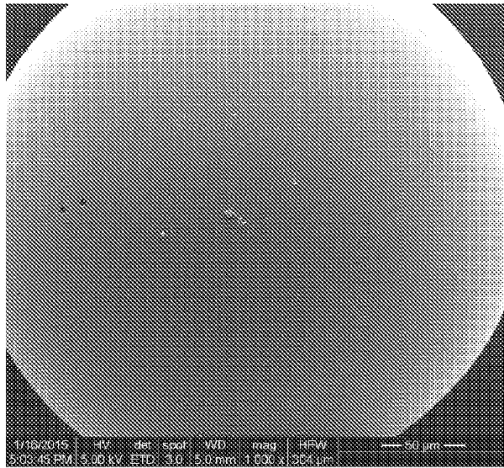


Fig. 5C

D

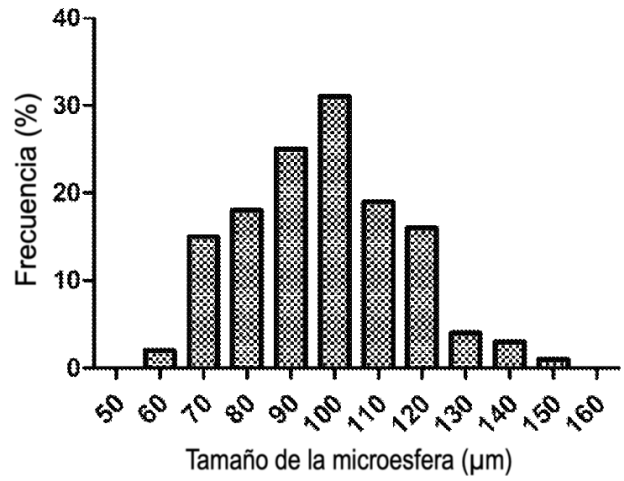


Fig. 5D

Figs. 5A – 5D

A

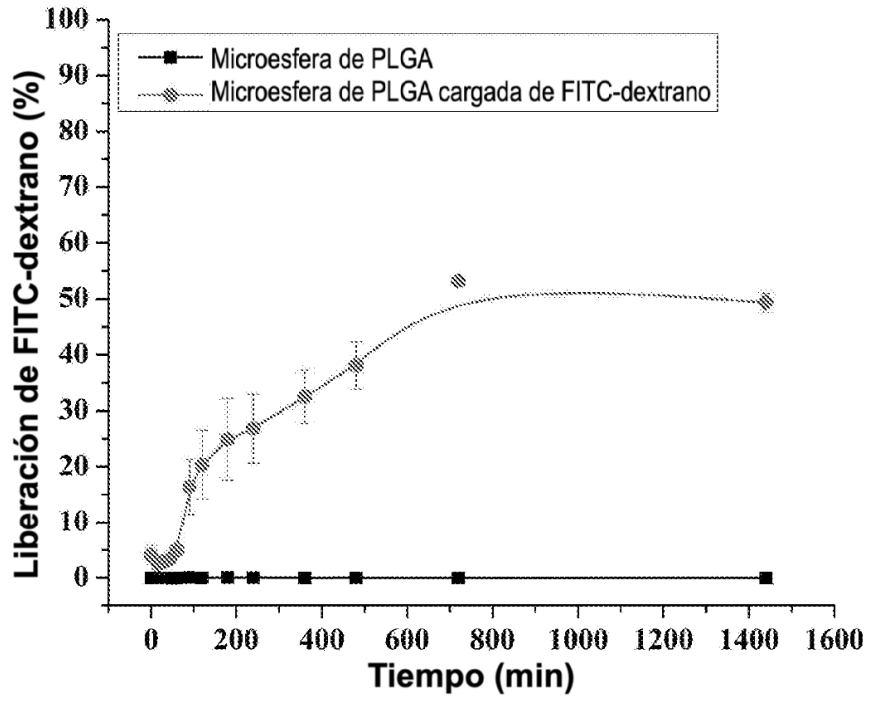


Fig. 6A

B

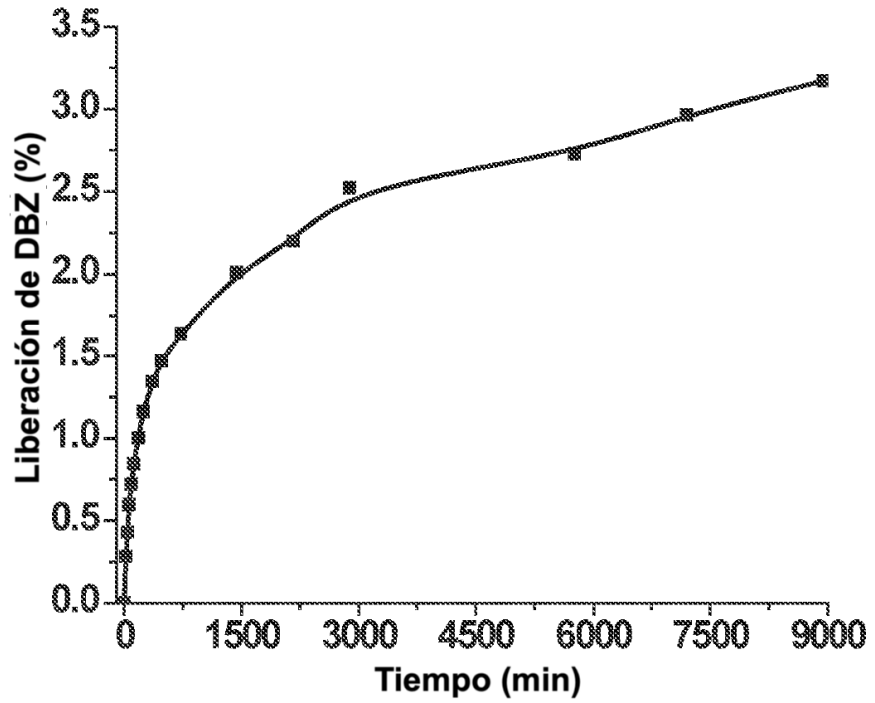
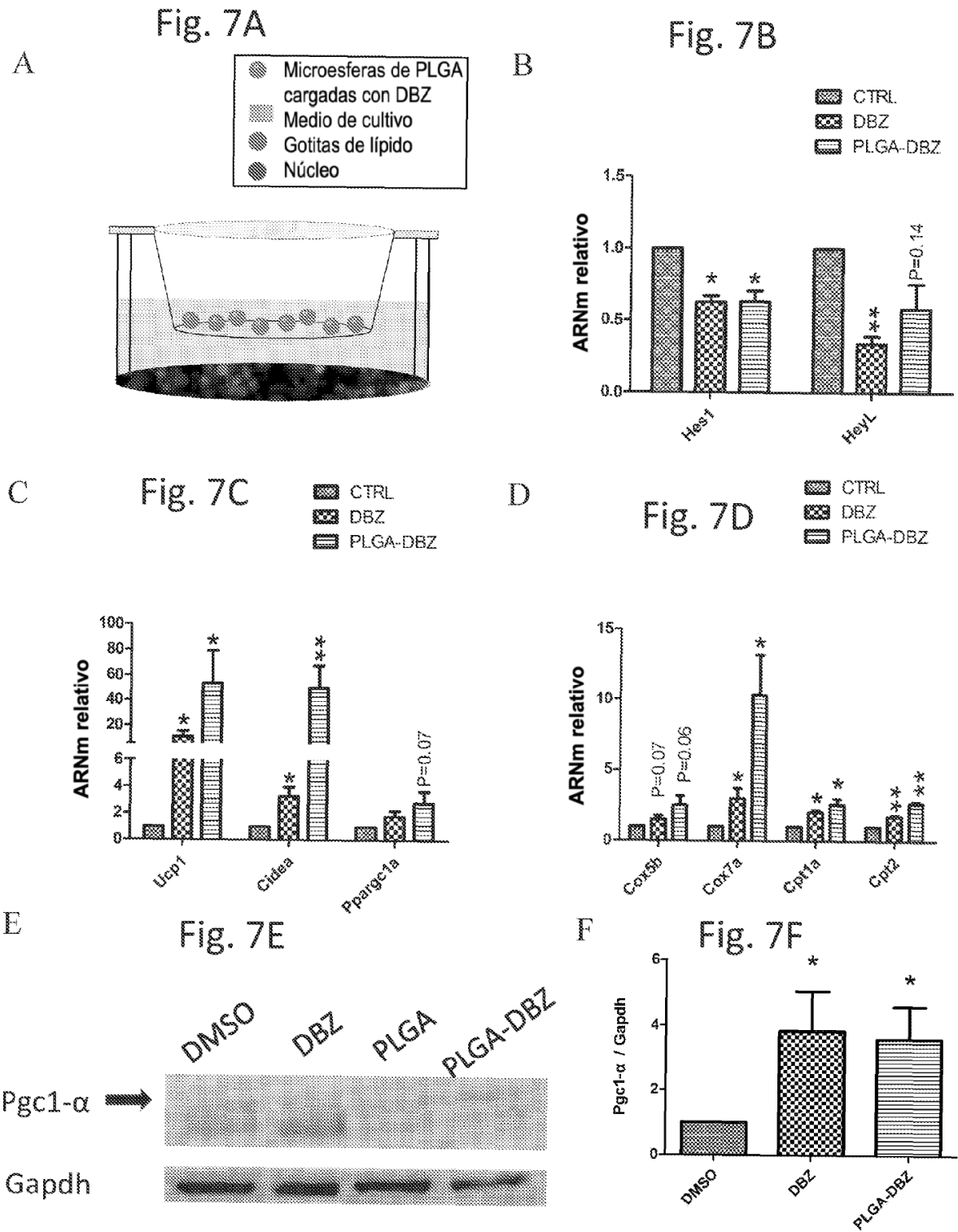


Fig. 6B





Figs. 7A-7F

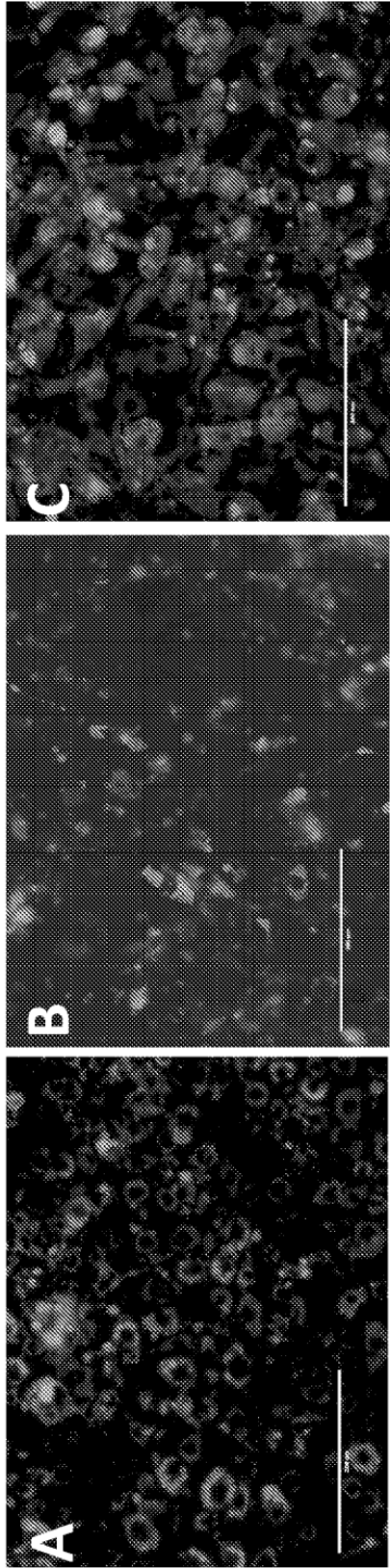


Fig. 8C

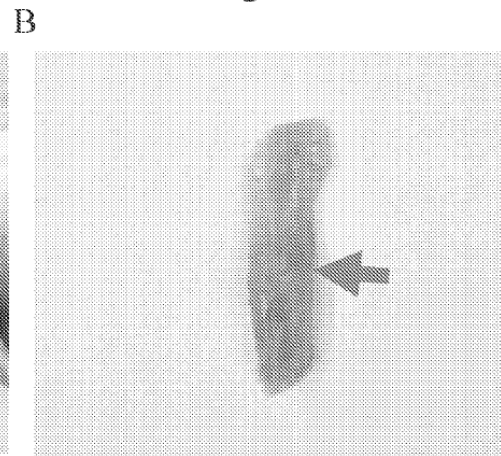
Fig. 8B

Fig. 8A

Fig. 9A



Fig. 9B



C

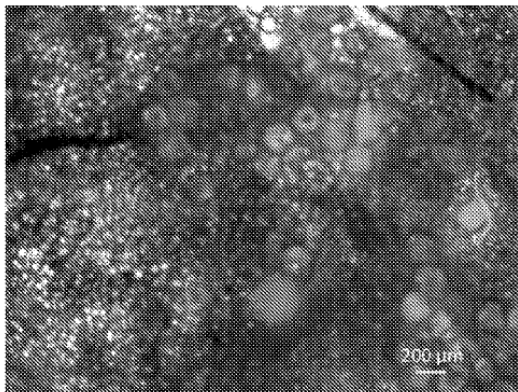


Fig. 9C

D

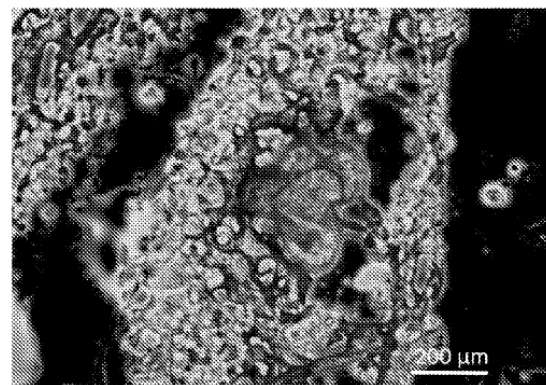
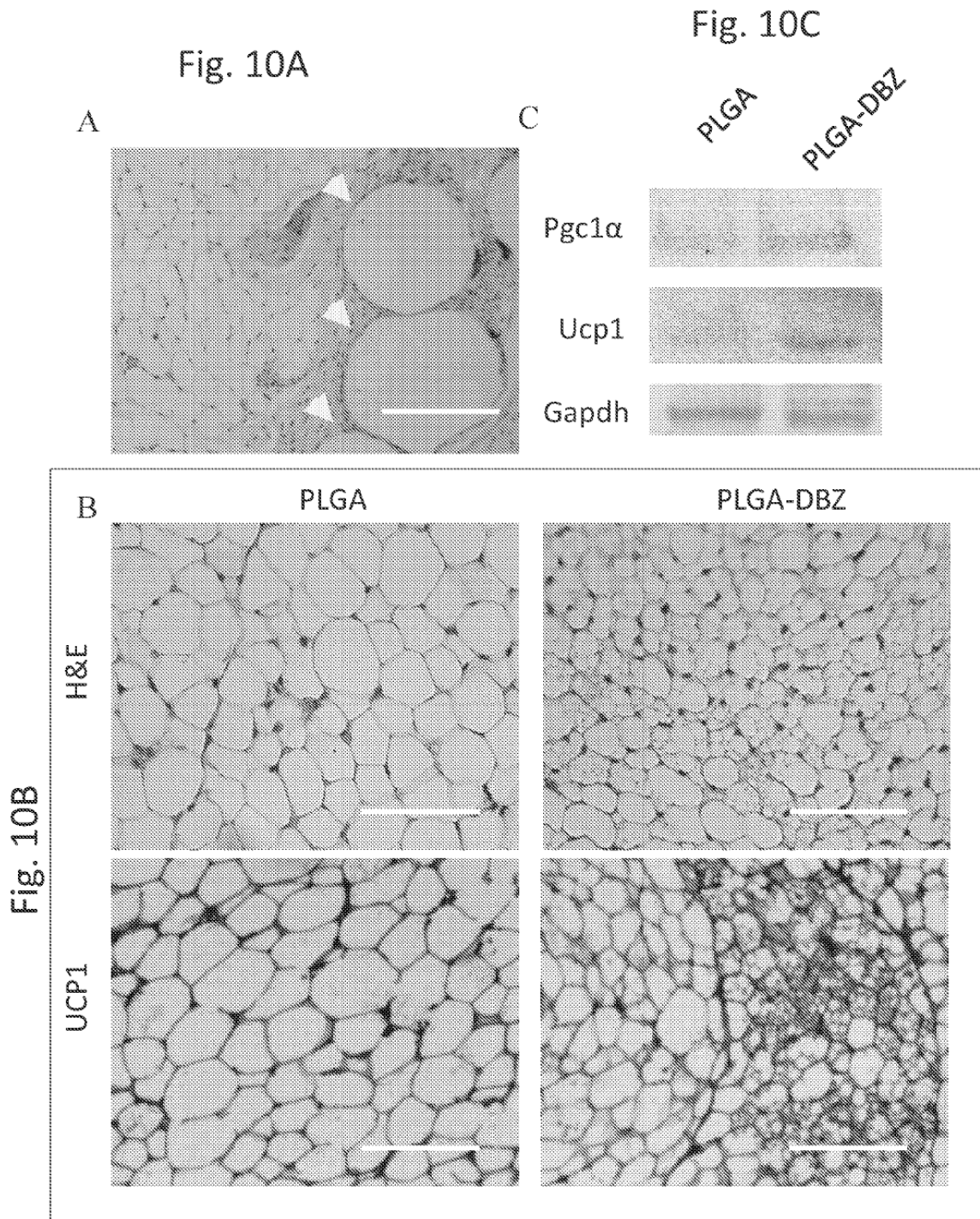


Fig. 9D

Figs. 9A-9D



Figs. 10A-10C

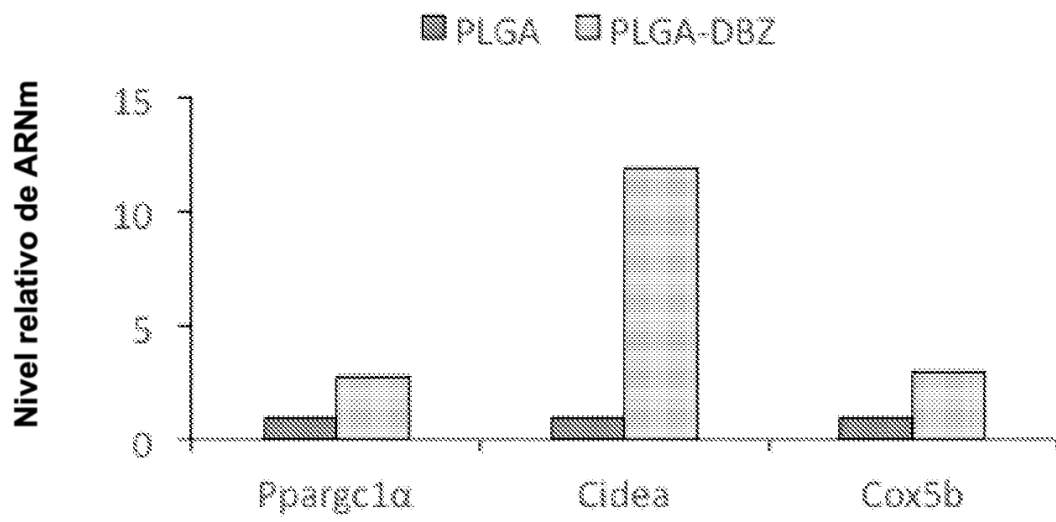
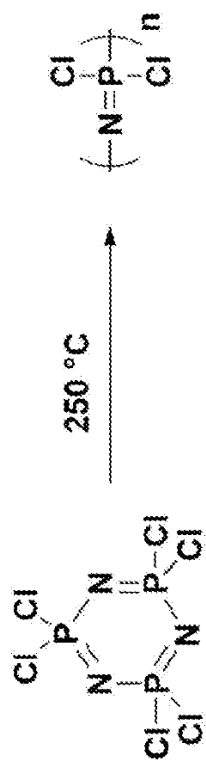


Fig. 11

Etapa 1



Etapa 2

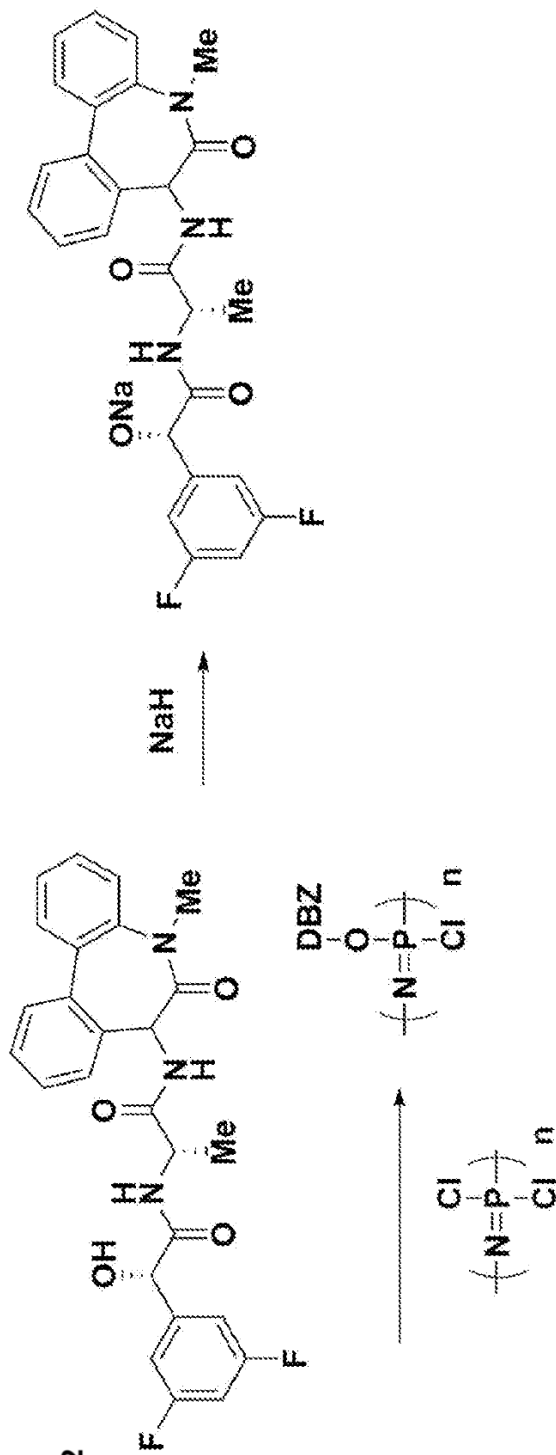


Fig. 12

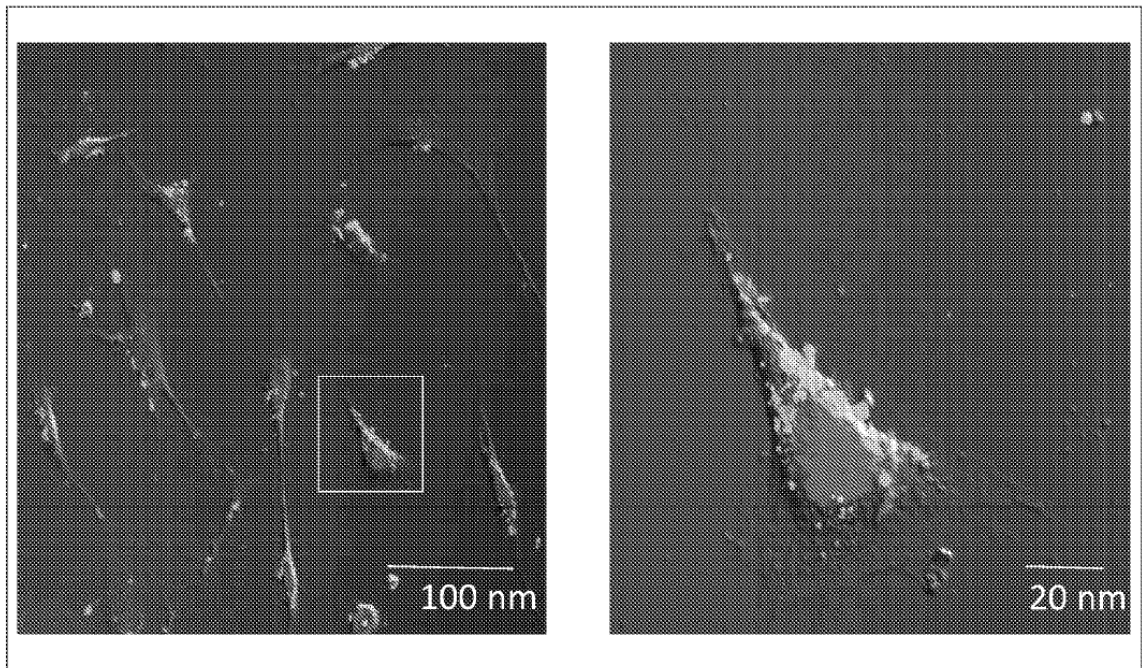


Fig. 13

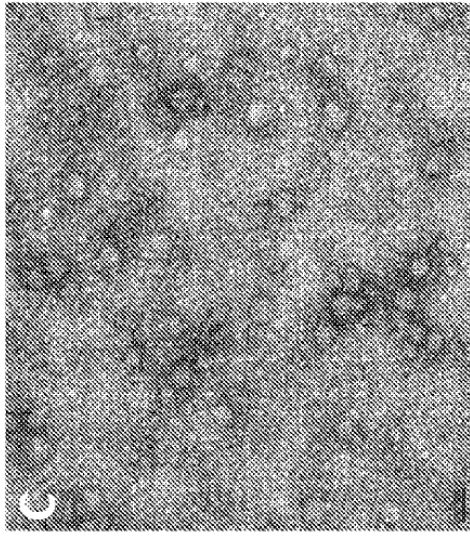


Fig. 14C

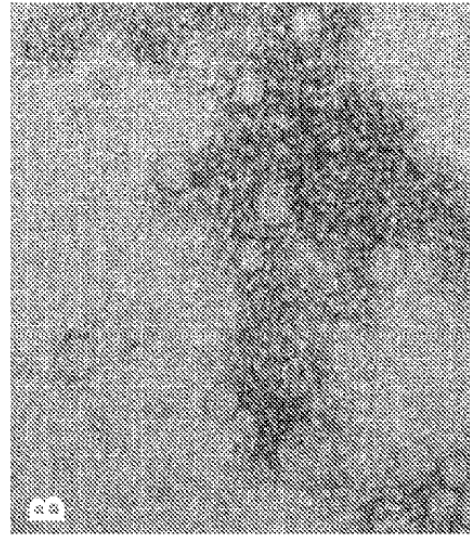


Fig. 14B

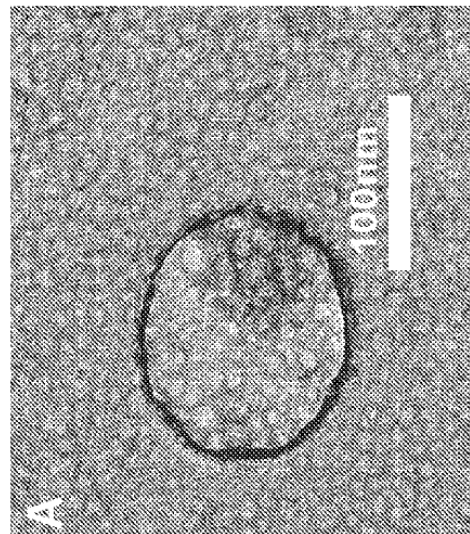


Fig. 14A



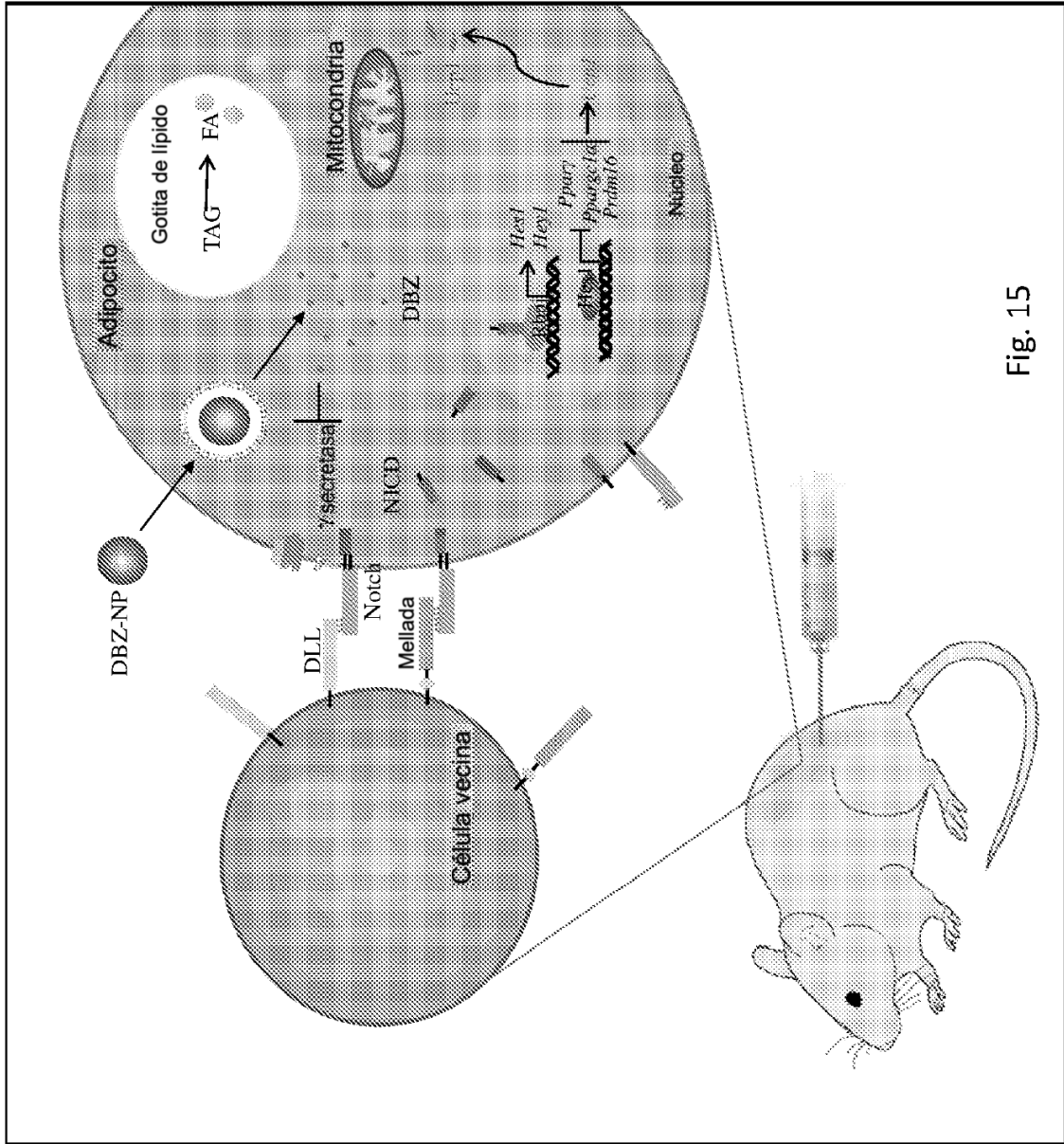


Fig. 15

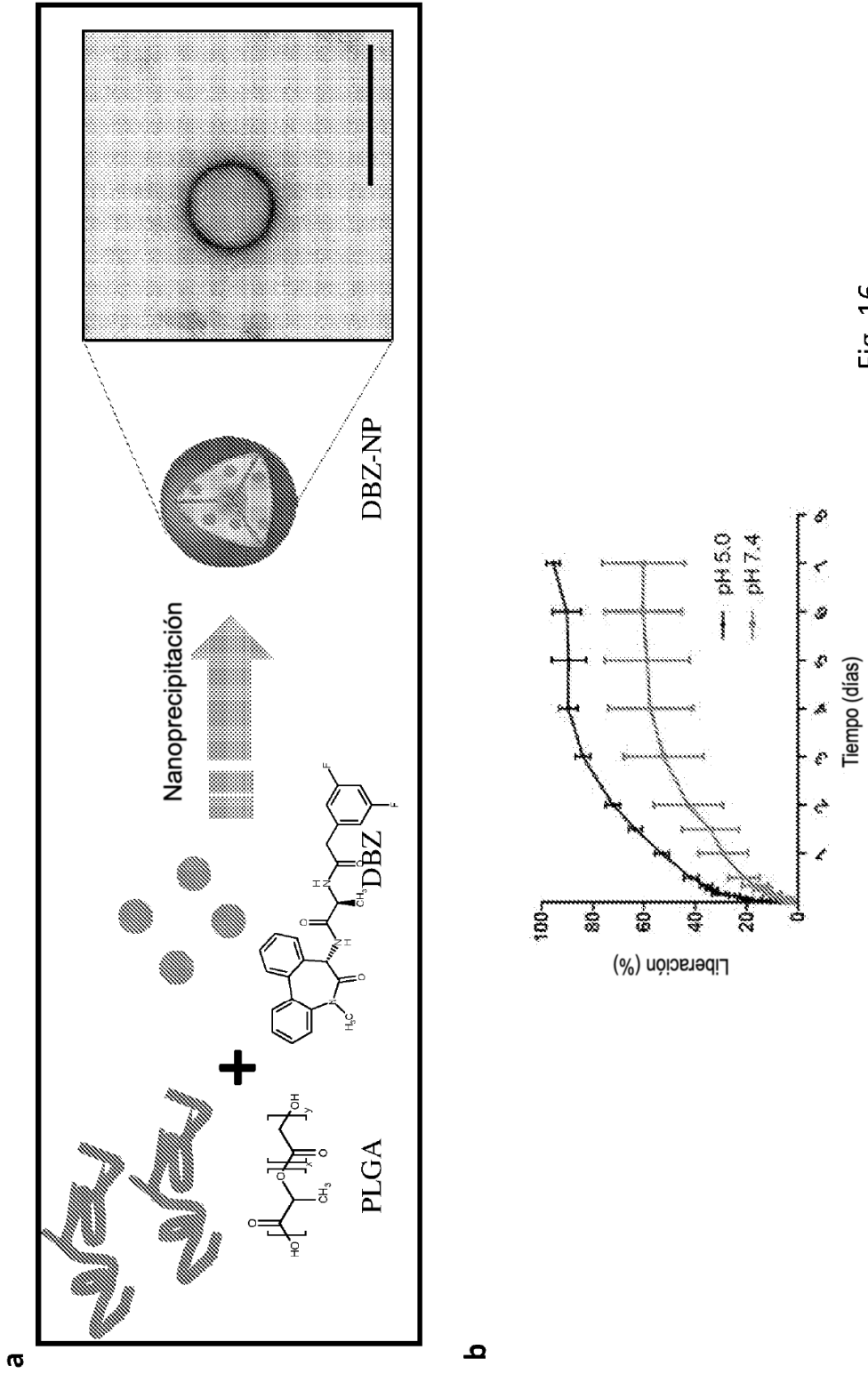


Fig. 16

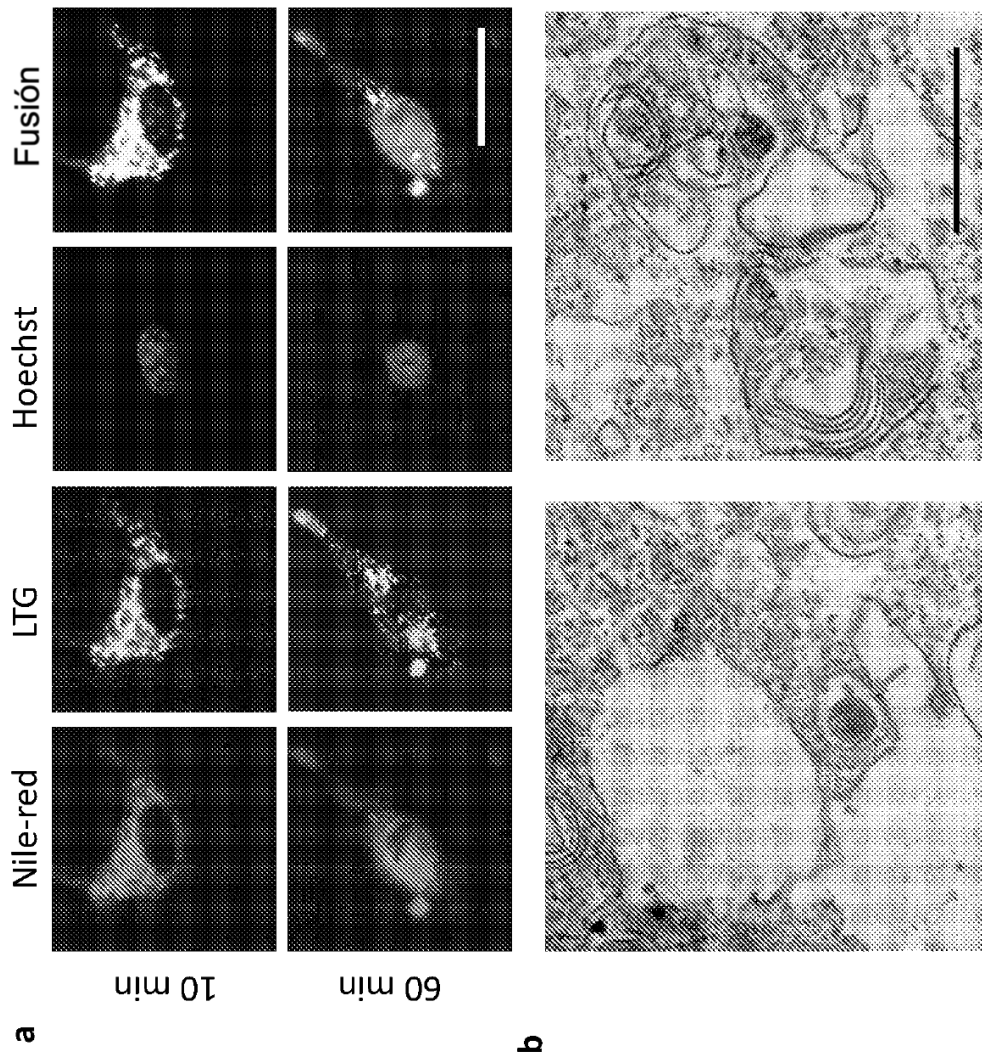


Fig. 17

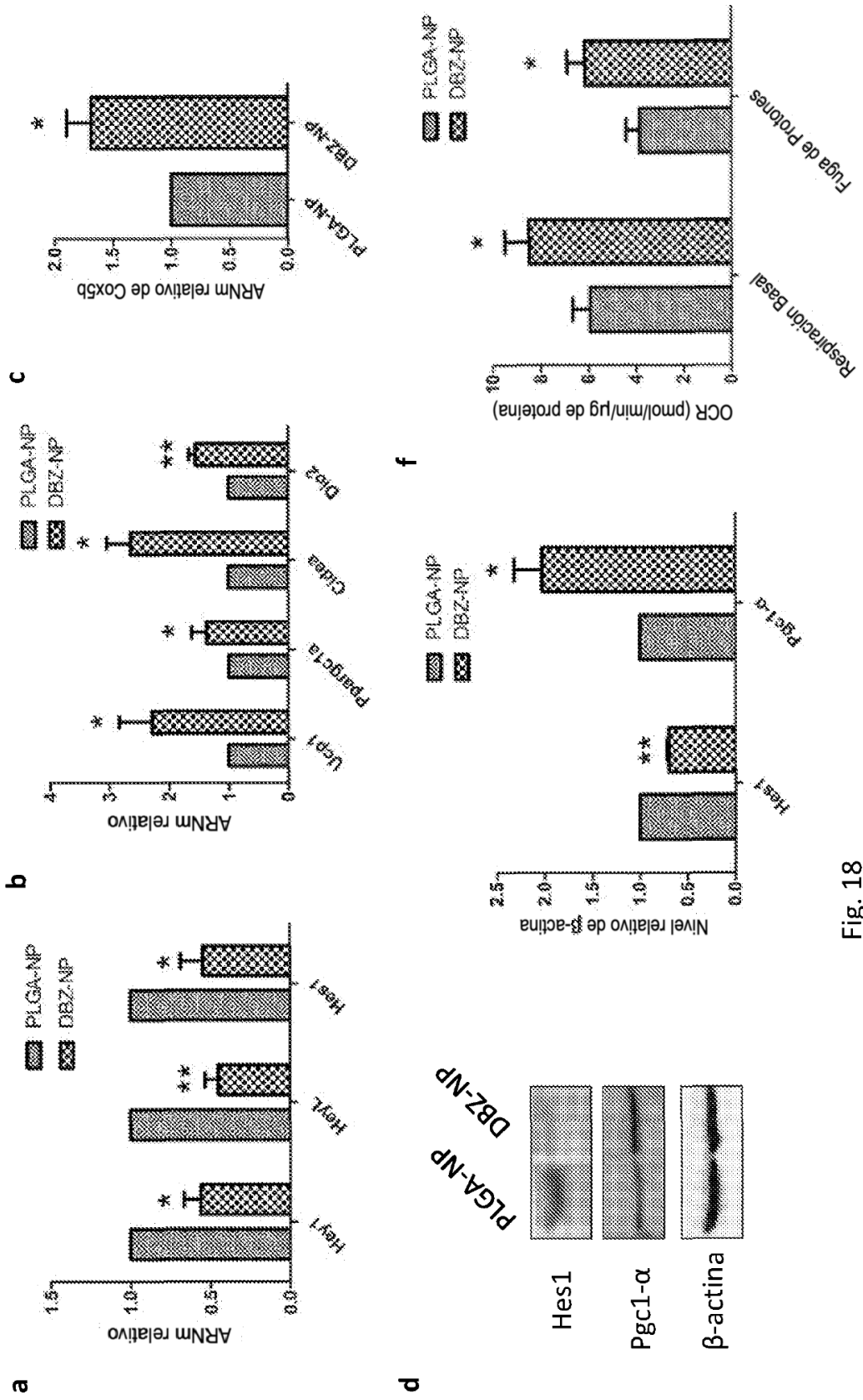


Fig. 18

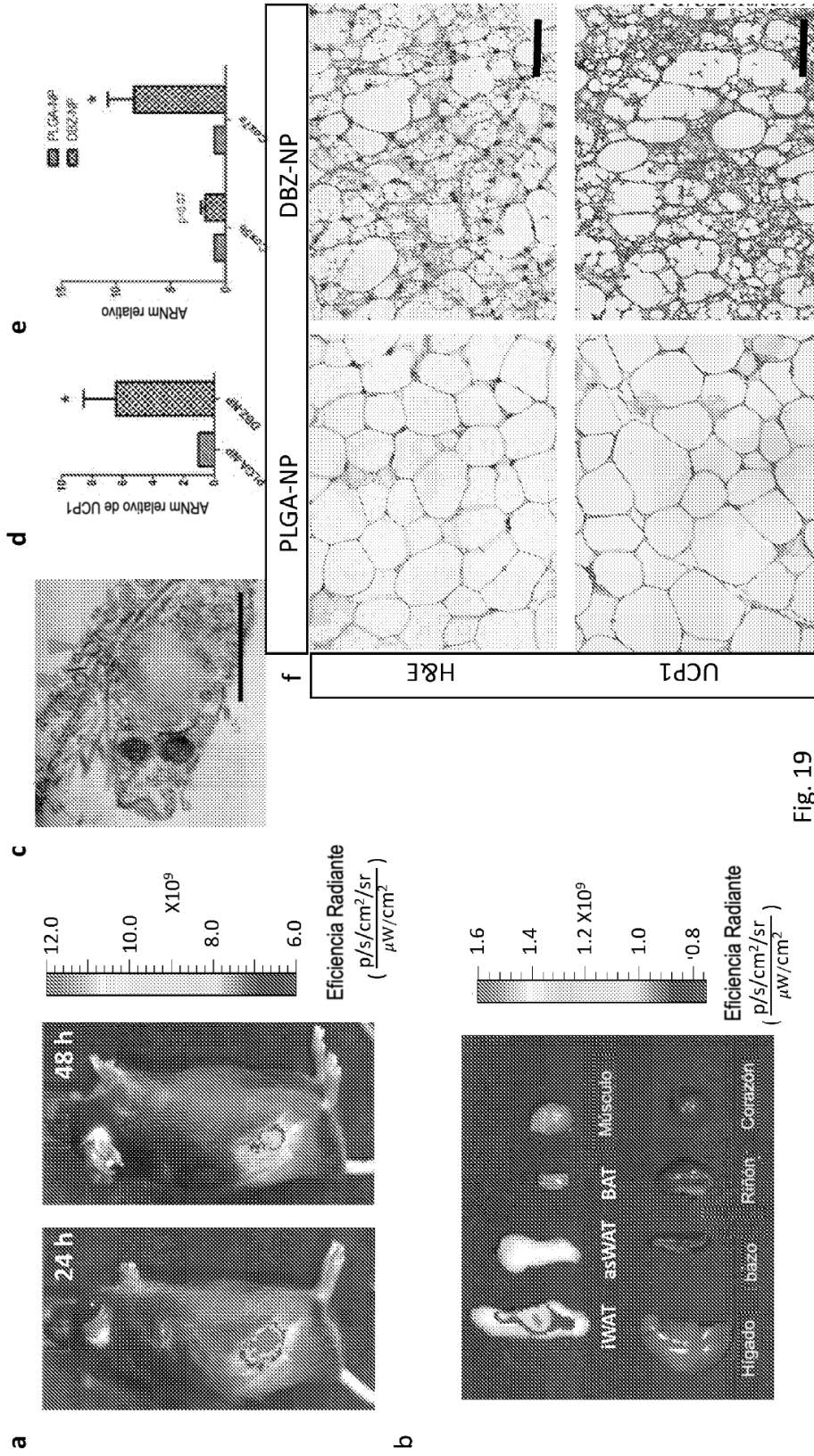


Fig. 19

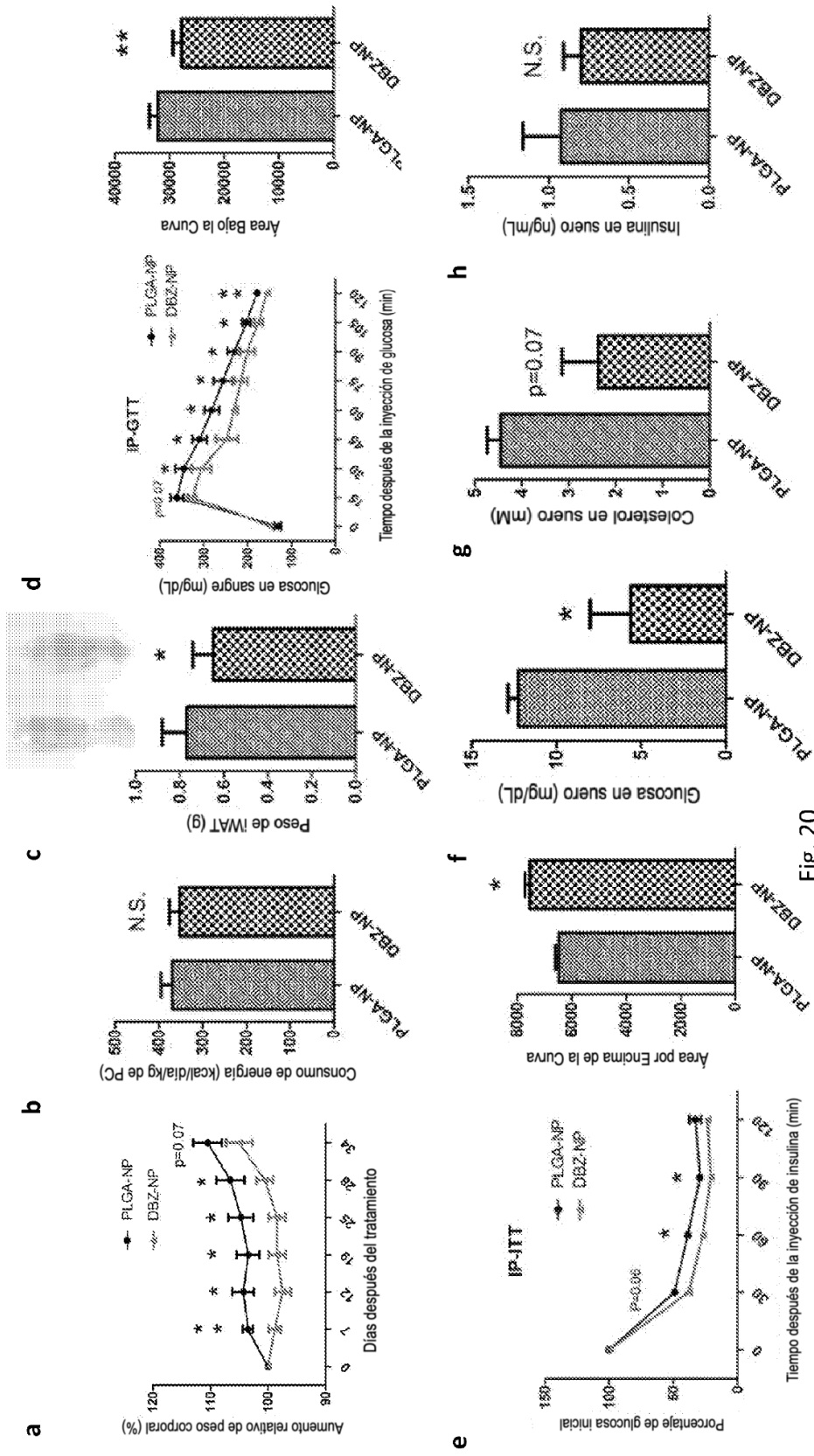


Fig. 20

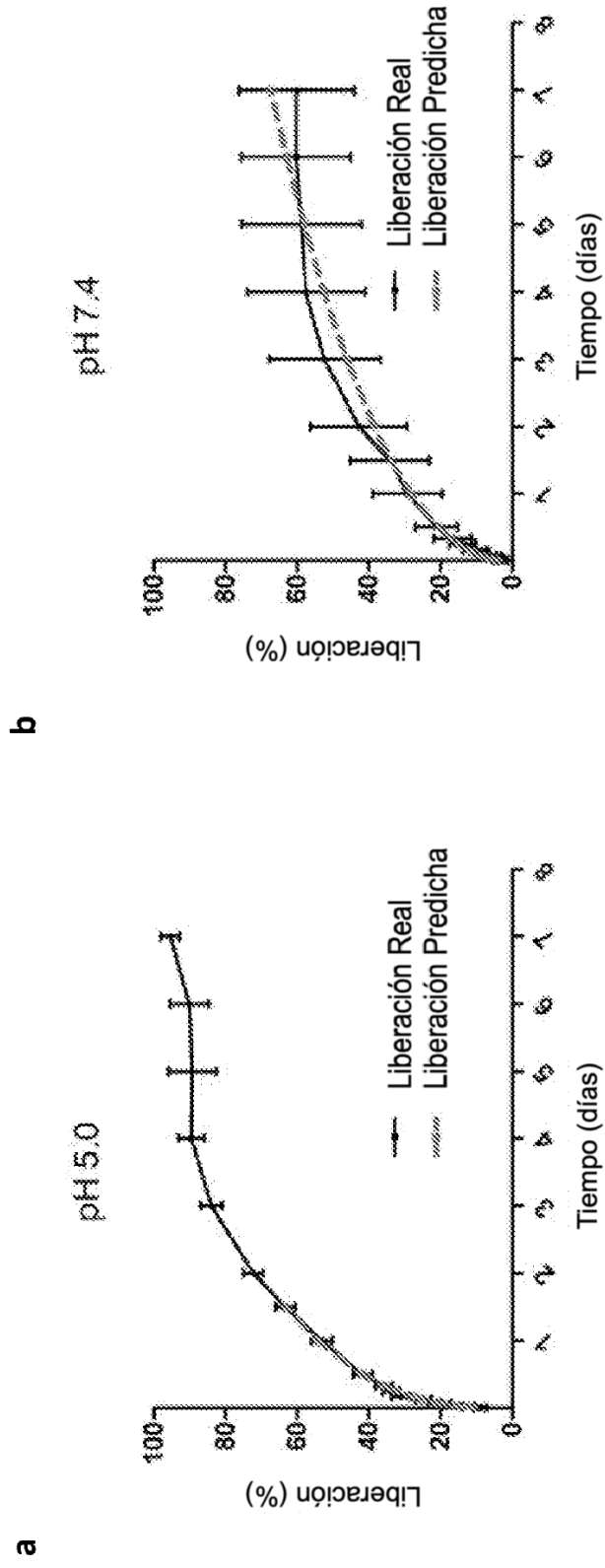


Fig. 21

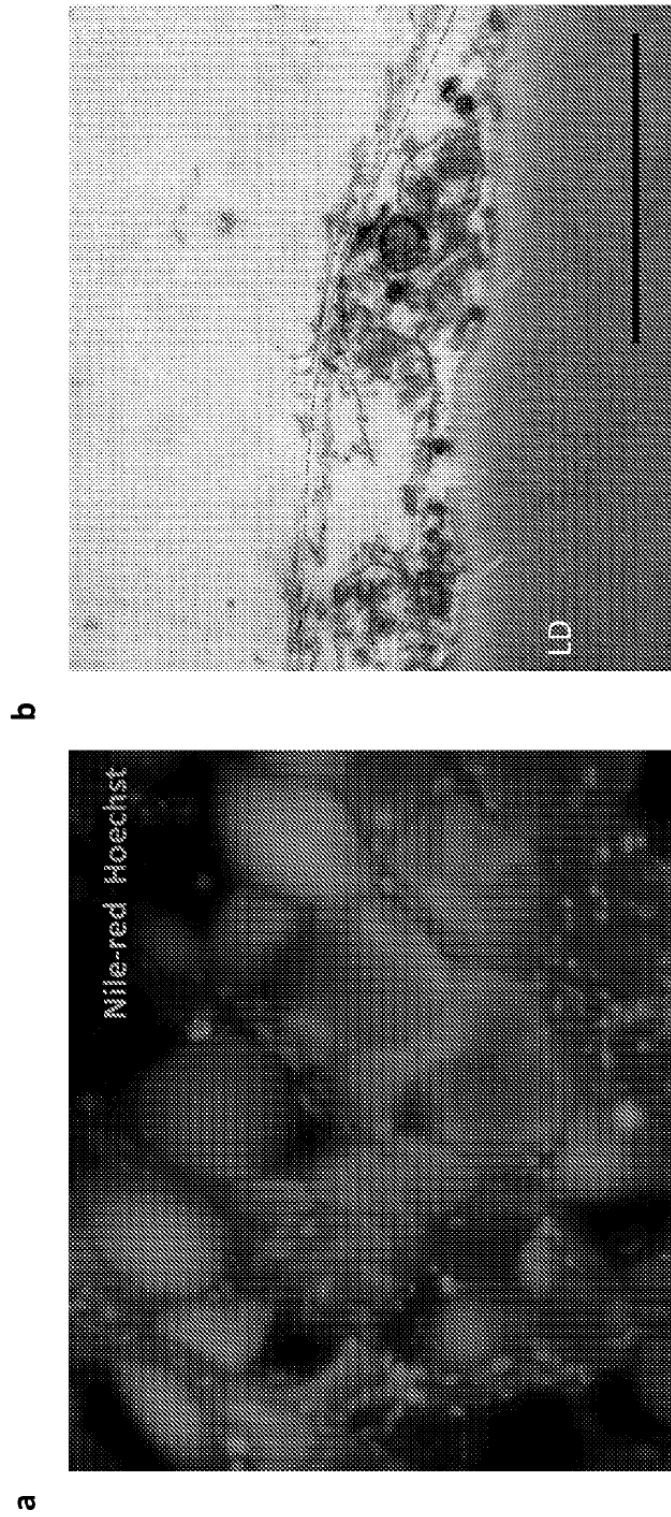


Fig. 22



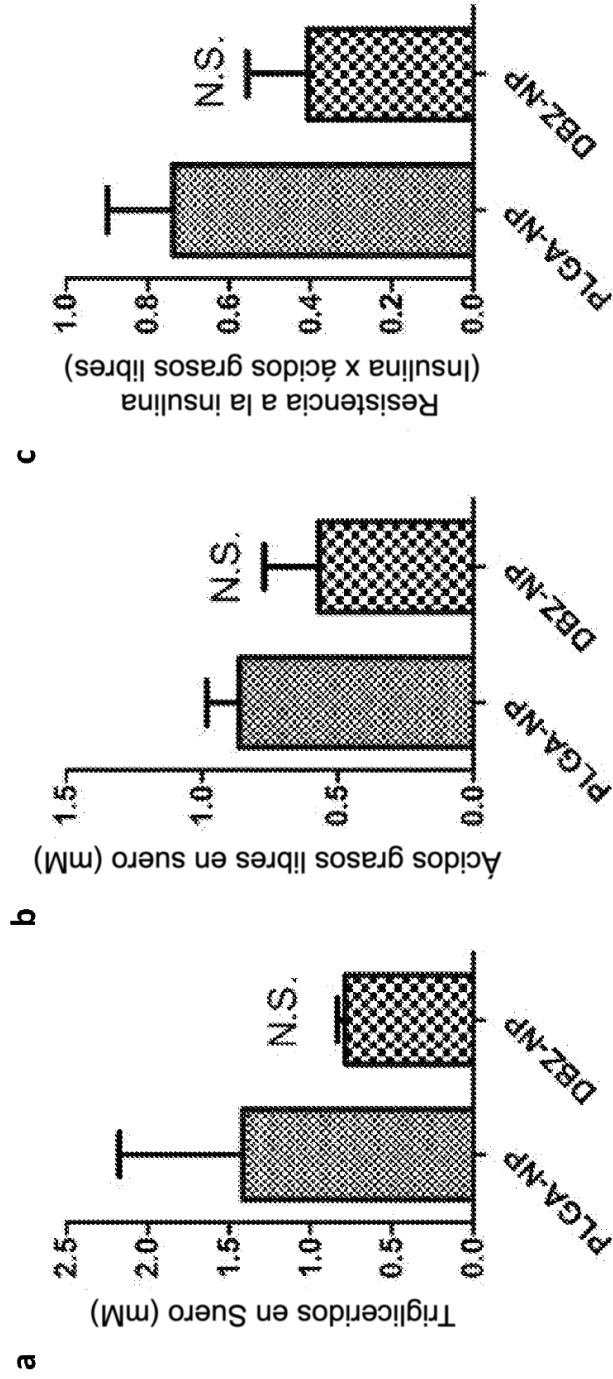


Fig. 23

