

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 200**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08758308 .4**  
96 Fecha de presentación: **04.07.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2164964**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.03.2010**

54 Título: **NANOPARTÍCULAS DESHIDRATADAS DE QUITOSANO.**

30 Prioridad:  
**06.07.2007 DK 200701004**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.03.2012**

73 Titular/es:  
**AARHUS UNIVERSITET  
NORDRE RINGGADE 1  
8000 AARHUS C, DK**

72 Inventor/es:  
**KJEMS, Jørgen;  
HOWARD, Kenneth Alan;  
BESENBACHER, Flemming y  
ANDERSEN, Morten Østergaard**

74 Agente/Representante:  
**García Egea, Isidro José**

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).

ES 2 376 200 T3

**DESCRIPCIÓN**

Nanopartículas deshidratadas de quitosano

**ANTECEDENTES**

Desde el descubrimiento del mecanismo de la interferencia por Acido Ribonucleico (iARN), ARNs interferentes pequeños (ARNips) han demostrado ser valiosas herramientas para examinar la función genética y potencialmente terapéuticas. La iARN tiene lugar cuando el ARN de doble hebra (dh) citoplásmica guía un complejo silenciador inducido por ARN (CSIA) para adherir las secuencias homólogas en una molécula mensajera de ARN resultando en un silenciamiento génico. Los sistemas portadores son una exigencia para un suministro eficiente de ARNips por la superación de barreras extracelulares e intracelulares. Los sistemas no virales lípidos (lipoplexos) y basados en polímeros policationicos (poliplexos) son candidatos atractivos debido a las cuestiones de inmunogenicidad y seguridad asociados con un suministro viral.

En genómica y en validación de objetivos farmacológicos, la tendencia se dirige hacia una alta pérdida de rendimiento de exploración de función utilizando iARN. Se han desarrollado diferentes aproximaciones utilizando genotecas de secuencias suministradas como ARNips químicamente sintetizados o plásmidos de expresión de ARNip de tallo-bucle corto por vectores virales. El suministro no viral de ARNips ofrece un mayor control de la concentración de ARNip y muestras predecibles de toxicidad. En los sistemas de alto rendimiento de exploración usando ARNip, la estrategia común es mezclar ARNip con un agente de transfección lípido catiónico para formar lipoplexos, estos pueden ser entonces añadidos conjuntamente con gelatina con el objeto de facilitar el reconocimiento del reagente sobre platinas de microscopio para su análisis.

Desafortunadamente, el agente de transfección no viral, por sí mismo, con frecuencia altera la expresión génica; en consecuencia, cualquier procedimiento exhaustivo de exploración debería usar diversos vehículos de suministro para reducir este efecto sobre los resultados obtenidos. Una combinación de sistemas tradicionales y nuevos de formulaciones de ARNip reconocibles y almacenables ofrecería, por consiguiente, una certeza mejorada de los resultados obtenidos en exploraciones de ARNip de alto rendimiento.

El ARNip está siendo también desarrollado como una droga terapéutica para silenciar genes implicados en enfermedades. Con objeto de que las drogas basadas en nucleótidos atraigan un uso clínico universalmente extendido, se necesitan fórmulas con dosificación, actividad y efectos secundarios controlados. Las formulaciones acuosas de complejos no virales tienen un problema para cumplir con estas exigencias en cuanto se deterioran rápidamente por agregación si se almacenan a 25° C, 4° C ó -20° C.

En cuanto tanto las exploraciones de ARNip como la terapéutica con ARNip podría beneficiarse de formulaciones de ARNip almacenables, localmente activas, se necesita desarrollar dichos sistemas. Las nanopartículas de quitosano que comprenden ARNip se conocen de *Biomaterials*, 28, Febrero 2007, 1280-8.

**Resumen de la invención**

La presente invención proporciona una nanopartícula deshidratada que comprende un ARNip y quitosano. El ARNip es apto para modular la expresión de un gen objetivo. Tales nanopartículas son útiles en genómica y validación de objetivos farmacológicos. Además, son útiles como medicamentos.

**Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Efecto de la sucrosa en el remanente pARNi/quitosano de eGFP en células H1299. Las muestras de ARNip/quitosano fueron añadidas en la presencia de concentraciones variables de sucrosa en los pocillos de 24 planchas de pocillos en las concentraciones indicadas de ARNip. Las planchas fueron entonces secadas con congelación, sembradas con línea celular H1299 y transfectadas durante 48 horas. La Fluorescencia fue medida por citometría de flujo y normalizada a un control no transfectado. Todas las muestras fueron tratadas por triplicado.

Figura 2. Remanente de eGFP en células H1299 con TKO/ ARNip Trans-IT y quitosano/ARNip.

Las muestras de quitosano/ARNip que contienen un 10 % de sucrosa y TKO/Mirus/ARNip fueron añadidas en las concentraciones indicadas en los pocillos de una plancha de 24 pocillos. Las planchas fueron entonces secadas con congelación, sembradas con línea celular H1299 y transfectadas durante 48 horas. La Fluorescencia fue medida por citometría de flujo y normalizada a un control no transfectado. Todas las muestras fueron tratadas por triplicado.

Figura 3. Efecto del almacenaje sobre la actividad de quitosano/ARNip y Mirus/ARNip. Las formulaciones de quitosano/ARNip (10% de sucrosa) secadas con congelación y plancheadas y de Trans-IT TKO/ARNip fueron almacenadas a 25° C en una luz solar moderada. En diferentes momentos, las células H1299 fueron plancheadas y el remanente de eGFP fue medido. Los niveles de fluorescencia fueron normalizados a un control no transfectado.

Figura 4. Viabilidad de H1299 y células en bruto sujetas a quitosano/pARNi y Trans-IT TKO/pARNi. Las muestras de quitosano/ARNip fueron secadas por congelación en pocillos de planchas de 24 pocillos. Las planchas

fueron sembradas con células H1299 (Figura 4A) o células en bruto (Figura 4B) y transfectadas durante 48 horas. Fueron añadidos entonces 20 µl de solución de citotoxicidad acuosa a los pocillos y, después de 90 minutos, la absorbencia estaba lista. Los valores de viabilidad fueron normalizados al control no transfectado. Todas las muestras por triplicado.

5           Figura 5. Revestimiento de estructuras de ingeniería de tejidos con quitosano/ARNip que contenga un 10 % de sucrosa. Las estructuras de Poli-ε-caprolactona fueron revestidas con partículas de quitosano/ARNip. Las estructuras sin (Figura 5A) y con (Figura 5B) revestimiento de partículas de quitosano/ARNip fueron visualizadas usando microscopía de escaneo por electrones. Ver el ejemplo 2 para más detalle.

10           Figura 6. A las estructuras revestidas se les añadió también agua y la presencia de partículas de quitosano fabricadas con ARNip fluorescente fue investigada usando microscopía de fluorescencia con – focal (Figura 6A). Finalmente, fueron sembradas células madre mesenquimatosas de rata sobre las estructuras y su absorción de pARNi fue evaluada tras 24 horas usando microscopía de fluorescencia con – focal (Figura 6B). Se muestran imágenes representativas. Ver ejemplo 2 para más detalle.

15           Figura 7. Absorción de quitosano/ARNip en diversas líneas celulares neurales. Se añadieron muestras de quitosano/ARNip conteniendo 10 % de sucrosa en los pocillos de planchas de 24 pocillos. Las planchas fueron entonces secadas por congelación, sembradas con células y transfectadas durante 24 horas. La absorción de ARNip fluorescente fue investigada usando microscopía fluorescente. Todas las muestras fueron tratadas por triplicado, se exhiben imágenes representativas.

#### **Divulgación de la invención**

20           En un primer aspecto, la invención proporciona una nanopartícula deshidratada que comprende un ARNip y quitosano. La nanopartícula deshidratada es ventajosa, por ejemplo, porque prolonga el período de tiempo en el que la nanopartícula de ARNip mantiene su actividad. Además, en algunas realizaciones permite el almacenaje a temperatura ambiente. Como resultará claro de las realizaciones descritas infra, las nanopartículas son también favorables porque pueden ser inmovilizadas sobre soportes sólidos, que permiten nuevas aplicaciones de las nanopartículas.

25           El término quitosano, tal como se usa aquí, tiene el mismo significado como el que normalmente tiene en el estado de la técnica. El quitosano se refiere a un polisacárido lineal compuesto de D-glucosamina (unidad deacetilada) β-(1-4)-enlazada y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). El quitosano es generalmente producido por deacetilación de quitina, que es el elemento estructural en el exoesqueleto de crustáceos (cangrejos, camarón, etc.). El grado de deacetilación en quitosano comercial está en el intervalo de entre 60-100 %. En una realización preferida, pueden ser usados también derivados de quitosano, por ejemplo, los obtenidos por modificación química del quitosano.

30           Preferiblemente, el contenido en agua de la partícula deshidratada es de menos de 5 % (peso por agua de agua/nanopartícula). En otras realizaciones, el contenido en agua es de menos de 4 %, 3 %, 2 % y 1 % respectivamente. Es más preferido un contenido en agua de menos de 0,1 %.

            El ácido nucleico de la nanopartícula es una molécula de ARN capaz de mediar la interferencia de ARN para silenciar un gen apuntado. El ARN es un pequeño ARN de interferencia (ARNip).

40           Lo pARNis son, generalmente, complejos de ARN de doble hebra que comprenden una hebra pasajera y una hebra guía, dirigiendo la hebra guía la interferencia de ARN a un gen apuntado. El experto en la materia conoce diversas realizaciones de pARNis (con extremos abruptos, 3' de proyección, etc.).

            La nanopartícula deshidratada de la invención puede ser preparada por cualquier actividad de secado, que conserva la actividad del ácido nucleico. Los parámetros obvios que pueden ser ajustados son la presión y la temperatura y un procedimiento preferido de secado es la liofilización. Así, el secado es realizado preferentemente a una temperatura y presión, en la que el agua de la nanopartícula es sólida.

45           En otra realización preferida, la nanopartícula se prepara por secado de pulverización.

            La nanopartícula de la invención puede comprender además un lioprotector. Preferentemente, el lioprotector se selecciona del grupo consistente en sucrosa, glucosa, inulina y trehalosa. La cantidad de lioprotector se preferentemente de menos de 20 % y incluso más preferente de menos de 10 % (peso/agua). En otra realización, se prefiere que la cantidad de lioprotector esté entre 5 % y 10 %.

50           La nanopartícula de la invención puede también comprender un agente de reconocimiento, tal como gelatina o colágeno o cualquier otro componente de matriz extracelular o derivado del mismo además de agarosa o cualquier otro carbohidrato. Esto es favorecedor, por ejemplo, cuando la partícula va a ser secada sobre una superficie.

La nanopartícula puede comprender también una sustancia de adherencia celular seleccionada del grupo consistente en fibronectina, péptidos RGD, anticuerpos, aptámeros, lípidos, poli-L-lisina, carbohidratos y componentes de matriz extracelulares o derivados de los mismos.

5 También puede estar comprendido en la partícula un medio de apuntado tal como transferrina, un anticuerpo y/o un aptámero.

10 La nanopartícula de la invención puede ser también incluida en un material que pueda controlar la liberación de pARNi tal como una partícula de liberación controlada más grande, un depósito implantable de droga o una estructura biodegradable para ingeniería de tejidos. En tal realización, las partículas están incrustadas en una matriz degradante y liberadas cuando la matriz se degrada. Preferentemente, la matriz es un polímero biodegradable tal como poli-ε-caprolactona, ácido poliláctico, poliglicólico o poli(láctico-co-glicólico). La nanopartícula de la invención puede ser secada sobre una superficie. Preferiblemente, la superficie es parte de un pocillo de cultivo, frasco, un implante para ingeniería de tejido o un implante protético.

Así, puede ser, por ejemplo, directamente liofilizado en platos de cultivo celular o sobre superficies y usado después en una fase simplemente por la adición directa de suspensión celular.

15 En una realización en donde la nanopartícula ha sido secada sobre un implante, el ARNip apunta a una citocina, preferiblemente una citocina pro-inflamatoria y más preferiblemente citocina FNT-alfa, para reducir la respuesta inmune hacia el implante.

20 En otra realización en la que la nanopartícula ha sido secada sobre un implante, el ARNip apunta a un ARNm que codifica una proteína que reprime o intensifica la diferenciación de células madre, para, o bien, fortalecer, o bien reprimir una o más rutas específicas de diferenciación, respectivamente.

Procedimiento de formación de la nanopartícula que va a ser deshidratada.

Preferiblemente, la nanopartícula de la invención se prepara por un procedimiento que comprende

- a. Disponer de una solución de quitosano
- b. Disponer de una solución de ARNip
- 25 c. Mezclar la solución de la fase a con la solución de la fase b
- d. Incubar la solución de la fase c bajo condiciones de formación compleja tales como forma de nanopartículas de quitosano/ARNip.

En una realización, la partícula de quitosano/ARNip comprende un reticulador inicial, tal como un polifosfato.

30 En otra realización preferida del procedimiento de preparación de una partícula de quitosano/ARNip, el quitosano no comprende un reticulador inicial.

35 El término reticulador inicial se usa para un reticulador que se añade a un quitosano para formar una partícula, antes de que se añada la molécula de ARNip. Generalmente, en el estado de la técnica, por ejemplo, cuando se forman nanopartículas de quitosano/plásmido, las partículas son preformadas usando un reticulador inicial tal como el polifosfato. Así, se cree que la estructura y actividad de una partícula formada sin un reticulador inicial difiere de la de una partícula formada con un reticulador inicial. En concreto, el uso de un reticulador inicial parece implicar que el ARNip será distribuido en la superficie de la partícula preformada, donde, cuando se use el ARNip como reticulador, el ARNip será distribuido armónicamente por la partícula. Se espera que una distribución armónica tenga un efecto positivo en la bioestabilidad de las moléculas de ARNip de la nanopartícula, en cuanto serán menos accesibles a las ARNasas.

40 Además, la omisión del reticulador inicial proporciona un procedimiento más sencillo de preparación. En lugar de un procedimiento de dos etapas, en donde las partículas se forman primero y entonces se añade el ARNip, se proporciona un procedimiento de una etapa en el que el ARNip y el quitosano se mezclan directamente para formar nanopartículas.

45 Así, en una realización preferente, el ARNip funciona como un reticulador en la formación de una nanopartícula. En otras palabras, el ARNip es el componente forma – activo.

Concentraciones

Concentración de ARNip

En una realización del procedimiento de preparación de una nanopartícula de quitosano/ ARNip, la solución de ARNip comprende ARNip en una concentración seleccionada entre el grupo consistente en al menos 5 µM, al menos

10  $\mu\text{M}$ , al menos 20  $\mu\text{M}$ , al menos 30  $\mu\text{M}$ , al menos 40  $\mu\text{M}$ , al menos 50  $\mu\text{M}$ , al menos 60  $\mu\text{M}$ , al menos 70  $\mu\text{M}$ , al menos 80  $\mu\text{M}$ , al menos 90  $\mu\text{M}$  y al menos 100  $\mu\text{M}$ .

#### Concentración de quitosano

- 5 En otra realización, la solución de quitosano comprende quitosano en una concentración del grupo consistente en al menos 50  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 60  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 70  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 80  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 90  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 100  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 110  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 120  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 130  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 140  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 150  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 160  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 170  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 180  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 190  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 200  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 250  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 500  $\mu\text{g/ml}$ , al menos 750  $\mu\text{g/ml}$ , y al menos 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

#### Grado de deacetilación

- 10 Preferiblemente, el quitosano tiene un grado relativamente alto de deacetilación. Así, en una realización, el quitosano tiene un grado de deacetilación seleccionado del grupo consistente en al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 % y al menos 95 %.

#### Peso molecular del quitosano

- 15 El peso molecular del quitosano es preferiblemente de más de 10 kDa. En otra realización, el peso molecular es de más de 50 kDa e incluso es más preferido un peso molecular de más de 100 kDa.

Las muestras de quitosano con un peso molecular en el intervalo de 100-170 kDa y un alto grado de deacetilación (mayor de 70%) son especialmente favorables.

#### Relación N:P

- 20 Los parámetros mencionados *supra* pueden ser todos usados para controlar las características de la nanopartícula formada. Otro parámetro importante es la llamada relación N:P, definida aquí como la relación de grupos de amino quitosano (N) a grupos de fosfato ARN (P).

- 25 En una realización preferida, la nanopartícula se forma en una relación N:P mayor que 50. Los experimentos documentan que el incremento en la relación N:P lleva a partículas más grandes. En otras realizaciones, la relación N:P se selecciona del grupo consistente de una relación N:P mayor que 60, mayor que 70, mayor que 80, mayor que 90, mayor que 100 y mayor que 150.

En esta realización preferida, en donde la relación N:P es mayor que 70, la solución ARNip comprende ARNip en una concentración inferior a 100  $\mu\text{M}$ , tal como la inferior a 90  $\mu\text{M}$ , inferior a 80  $\mu\text{M}$ , inferior a 70  $\mu\text{M}$ , inferior a 60  $\mu\text{M}$ , inferior a 50  $\mu\text{M}$ , inferior a 40  $\mu\text{M}$ , inferior a 30  $\mu\text{M}$ , inferior a 20  $\mu\text{M}$ , inferior a 10  $\mu\text{M}$ , inferior a 5  $\mu\text{M}$ , o inferior a 1  $\mu\text{M}$ .

- 30 Cuando se utiliza una relación N:P alta y una concentración de ARN baja, pueden ser formadas nanopartículas que comprenden quitosano débilmente enlazado.

- 35 Como el grado de quitosano débilmente enlazado depende tanto de la concentración de ARNip en la solución de ARNip y en la relación N:P, el experto en la materia apreciará cómo manipular estos parámetros para crear nanopartículas con quitosano débilmente enlazado. Por ejemplo, puede ser usada una alta concentración de ARNip de la solución de ARNip, si también se mantiene alta la relación N:P, esto es, se usa una alta concentración de quitosano.

En una realización, la nanopartícula que comprende quitosano débilmente enlazado tiene una alta relación N:P.

- 40 Una nanopartícula con quitosano débilmente enlazado de interés, por ejemplo, para mejorar la administración a través de la mucosa. En consecuencia, en una realización, la nanopartícula con quitosano débilmente enlazado es para administración a través de la mucosa, en concreto para administración a través de los pulmones.

- 45 Una nanopartícula con un carácter discreto es de interés, por ejemplo, para administración sistémica. Una partícula así puede estar también formada por el control de diversos parámetros implicados en el procedimiento de formación de la nanopartícula. Especialmente, una baja relación N:P favorece la formación de una nanopartícula discreta. Como se mencionó *supra*, la concentración de pARNi y quitosano puede ser modificada manteniendo una relación N:P razonablemente constante.

#### Procedimiento concentrado vs. Relación N:P

En esta realización, la relación N:P es inferior a 70 tal como, pero no limitada a, una relación menor que 60, menor que 50, menor que 40, menor que 30, menor que 20, o menor que 10, respectivamente.

- 50 En una realización, la nanopartícula de carácter discreto tiene una baja relación N:P. En otra realización, la concentración de la solución de ARNip es de, al menos, 100  $\mu\text{M}$ , tal como, pero no limitada a, al menos, 250  $\mu\text{M}$ , al

menos 200  $\mu\text{M}$ , al menos 150  $\mu\text{M}$ , al menos 90  $\mu\text{M}$ , al menos 80  $\mu\text{M}$ , al menos 70  $\mu\text{M}$ , al menos 60  $\mu\text{M}$ , o al menos 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

El uso de una concentración alta de ARNip en la solución de ARNip resulta tener varias ventajas. Como se subrayó en la sección de ejemplos, cuando las partículas se forman usando una solución de ARNip con una concentración de 250  $\mu\text{M}$ , las partículas son más discretas y mono - dispersadas, en comparación con las partículas formadas usando una solución de ARNip pre - diluida de 20  $\mu\text{M}$  (como se puede ver de las medidas PDI en la tabla 3). Además, de forma sorprendente, resulta que las nanopartículas formadas usando la solución de ARNip concentrado tienen un efecto más específico, esto es, no dan lugar a ningún remanente no específico, que puede ser el caso para partículas formadas usando una solución de ARNip con una concentración más baja de ARNip.

- 5
- 10

Adicionalmente, el uso de una concentración alta de ARNip en la solución de ARNip significa que la cantidad de ARNip en las partículas se incrementa, lo que disminuye la cantidad de solución de partícula que tiene que ser administrada a una célula u organismo.

En otra realización, la concentración de quitosano es de menos de 250  $\mu\text{g/ml}$ .

En una realización particularmente preferida, la concentración de quitosano es de menos de 250  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que la concentración de ARNip es mayor de 100  $\mu\text{M}$ .

- 20

En otra realización, las partículas formadas son de forma discreta y tienen un índice de polidispersión menor que 0,4.

- 25

La superficie puede ser parte de un pocillo de cultivo, frasquito, un implante para ingeniería de tejidos o un implante prostético.

- 30

En cuanto la parte de ARN de la nanopartícula puede ser usada para modular la actividad de un objetivo concreto, una nanopartícula que comprenda el ARNip puede ser usada para tratamientos. La secuencia del ARNip puede ser diseñada tal como para secuenciar como objetivo específico un ARNm. Así, si se sabe que una proteína en particular está causando enfermedad o afección no deseada, la expresión de la proteína puede ser infra - regulada por el uso de un ARNip que tiene como objeto el ARNm que codifica la proteína. En consecuencia, la enfermedad o afección puede ser aliviada. Esto es notoriamente conocido en el campo del ARN de pequeña interferencia (y micro - ARNs). En general, el ARN anti - sensación puede ser usado para tomar como objetivo, de forma específica, un ARNm. Los aptámeros tendrán generalmente una proteína como objetivo, que, en términos generales, puede también hacerlos adecuados para la terapéutica.

- 35
- 40

Las nanopartículas de la invención pueden ser útiles en la administración a través de la mucosa al llevar a cabo un tratamiento.

- 45

Otro aspecto de la invención es una nanopartícula deshidratada de la invención para su uso como un medicamento.

- 50

Y aún otro aspecto de la invención es el uso de la nanopartícula deshidratada de la invención para la preparación de un medicamento para tratamiento seleccionado del grupo del tratamiento del cáncer, tratamiento de infecciones virales, tales como la gripe, virus sintético respiratorio e infecciones bacterianas, por ejemplo, tuberculosis y tratamientos de afecciones inflamatorias tales como artritis, enfermedad de Crohn y fiebre del heno.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Introducción

En este estudio, describimos un procedimiento para producir formulaciones ARNip (quitosano) de polímero catiónico liofilizado activo-silenciador génico. Demostramos un específico y eficiente silenciamiento de Proteína Fluorescente Verde Intensificada (PFVI) en células de carcinoma de pulmón humano H1299 transfectadas en placas pre – recubiertas con una formulación de quitosano/ ARNip que contenga sucrosa como lioprotector (~ 70%). Este procedimiento elimina la necesidad tanto de reconstitución de ARNip inmediatamente previa al uso y adición sobre células. Además, el silenciamiento de la actividad de la placa fue mantenida en el período estudiado (~2 meses) cuando está almacenada a temperatura ambiente.

Una viabilidad celular más alta se observó usando el sistema de quitosano comparado a la formulación de lípidos. El silenciamiento del Factor de Necrosis Tumoral de citocina pro – inflamatoria (FNT- $\alpha$ ) fue demostrado también en la línea celular macrofágica RAW usando el sistema ARNip/polímero liofilizado sugiriendo que el revestimiento puede mejorar la biocompatibilidad de implantes médicos.

Este trabajo describe una metodología de silenciamiento génico eficiente usando formulaciones secadas por congelación con aplicaciones potenciales como una herramienta de exploración de alto rendimiento para función génica, componentes de implante médicamente biocompatibles y productos terapéuticos de vida más larga.

El material liofilizado, sin embargo, puede ser almacenado a temperatura ambiente sin perder actividad durante largos períodos y reconstituido en forma reproducible de forma inmediatamente previa a su uso.

Una aplicación alternativa es la incorporación de complejos de ARNip liofilizado en estructuras de ingeniería de tejidos tal como ha sido hecho con complejos de ADN/polietilenimina liofilizado (PEI).

Desafortunadamente, la mayoría de las estructuras inducen respuestas inflamatorias huésped después de la implantación. Las formulaciones de ARNip liofilizado dirigidas contra citocinas pro – inflamatorias tales como el Factor de Necrosis Tumoral (FNT- $\alpha$ ) podrían ser usadas para revestir implantes como un procedimiento para reducir respuestas inflamatorias.

#### Materiales & Procedimientos

##### Secuencias ARNip

ARNip como objetivo de eGFP (cadena homosenidido: 5'- GACGUAAACGGCCACAAGUUC-3', cadena antisidido: 3'-GCUGCAUUUGCCGGUGUUCA-5') y ARNip no emparejado de eGFP (cadena homosenidido:5'- GACGUUAGACUGACAAGUUC-3', cadena antisidido: 3'-CGCUGAAUCUGACCUGUGGUUCA-5'), el ARNip objetivo 27mero de sustrato Dicer FNT- $\alpha$  (ARNipsd) (cadena homosenidido: 5'- GUCUCAGCCUCUUCUCAUCCUGCT-3', antisidido 5'-GUCUCAGCCUCUUCUCAUCCUGCT-3',) y sin emparejar (cadena homosenidido: 5' CUUCCUCUCUUUCUCUCCCUUGUGA-3', cadena antisidido: 3'- UCACAAGGGAGAGAAAGAGAGGAAGGA-5'.

##### *Nanopartículas Quitosano/ ARNip y Formulaci3n TransIT-TKO*

Las partículas de quitosano/ARNip fueron preparadas como se describi3 supra, se disuelve brevemente el quitosano durante la noche en pH 4.3 en amortiguador de acetato que se ajusta a pH 5.5 con 1M NaOH. Se a3ade entonces 1 ml de 0.2 mg/ml de quitosano a un ARNip de 20  $\mu$ l 20  $\mu$ M (relaci3 N:P de 50) mientras que se agita y despu3 de 1 horas, se le a3ade a la mezcla agua o sucrosa en concentraciones que varían, y se planchea. Los radios hidrodinámicos de las nanopartículas fueron medidos usando espectroscopia de correlaci3 fot3nica (ECF). Las partículas de Trans-IT TKO/ ARNip fueron producidas de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, 3  $\mu$ l de reagente Trans-IT TKO y 3  $\mu$ l de ARNip de 5  $\mu$ M fueron mezclados separadamente con 25  $\mu$ l RPMI de media y, entonces, mezclados. Despu3 de 20 minutos, la mezcla se planchea.

Al referirse a la cantidad de complejo ARNip plancheado usamos la concentraci3 (en nMs) del ARNip cuando la muestra se a3ade en 250  $\mu$ l de agua, un 50 nM de plancheado se refiere a un volumen de pre – liofilizaci3 de 38,4  $\mu$ l de quitosano/ARNip 3 50  $\mu$ l de partículas de Trans-IT TKO/ ARNip. Todas las formulaciones plancheadas fueron congeladas a -20° C antes de 48 horas de liofilizaci3 a 80 mT y -20° C. Despu3 de la liofilizaci3, las formulaciones plancheadas fueron almacenadas a 25° C sobre el banquillo.

##### *Cultivo celular y transfecciones*

Usamos una l3nea celular de carcinoma pulmonar humano H1299 expresando, de forma estable, prote3na fluorescente verde y una l3nea celular macrofágica murina RAW FNT- $\alpha$ . Ambas l3neas celulares fueron mantenidas a 37° C a 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad. Las células fueron sembradas a densidades de 4 x 10<sup>5</sup> células/ml en una media de RPMI frescas conteniendo un 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina & estreptomycin y 0.5% G418

en el interior de pocillos revestidos con reagente de transfección liofilizado. Después de 24 horas, el medio fue reemplazado con medio fresco bien de medio de 500 µl (planchas de 24 pocillos) ó medio de 100 µl (planchas de 96 pocillos). Después de 24 horas adicionales, la transfección fue completada. Todas las muestras de la transfección fueron hechas por triplicado.

##### 5 Citotoxicidad celular de formulaciones liofilizadas

Las muestras de transfección fueron evaluadas para citotoxicidad celular usando un ensayo de viabilidad basado en tetrazolio. A los pocillos se les añadió 20 µl de solución de citotoxicidad acuosa y, después de 1.5 horas, la absorbencia estaba lista en 562 nm. La absorbencia de los pocillos no utilizados fue sustraída de la absorbencia de los pocillos de las muestras. Todas las muestras de citotoxicidad fueron hechas por triplicado.

##### 10 Determinación citométrica de flujo de fluorescencia celular

Fueron cosechadas células H1299 transfectadas por un protocolo de tripsinación normalizado. Las células cosechadas fueron lavadas con PBS y fijadas en PBS que contenía un 1% de paraformaldehído. La fluorescencia celular EGFP fue medida usando un citómetro de flujo. Una parcela de histograma con intensidad de fluorescencia verde leño sobre el eje x y número celular sobre el eje y fue usado para definir la intensidad de fluorescencia media de la población celular principal definida por propiedades de dispersión (dispersión delantera y lateral, no mostrada).

##### FNT-α EISEE

Se añadieron 10 µl 1 µg/ml de lipopolisacárido (LPS) a los pocillos que contenían células RAW y almacenados durante 5 horas. El sobrenadante fue ensayado para FNT-α usando un ensayo inmunosorbente enlazado a enzimas. Fueron revestidas planchas Maxisorp® durante toda la noche a temperatura ambiente con 100 µl de anticuerpo de captura FNT-α anti-ratón de cabra en una concentración de 2 µg/ml en un amortiguador de revestimiento (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.02 % NaN<sub>3</sub> [pH 9.6]). Después de bloquear durante al menos 1 horas a temperatura ambiente con 300 µl de 1% de albumina de suero bovino (ASB) en amortiguador bloqueante (salino amortiguado por fosfato con 5% de sucrosa y 0.05 % NaN<sub>3</sub> [pH 7.4]), se añadió sobrenadante de cultivo sucesivo o FNT-α murino recombinante a los pocillos (100 µl cada uno) y fue incubado toda la noche a 4° C. Subsiguientemente, los pocillos fueron incubados a temperatura ambiente durante 2 horas con 100 µl de anticuerpo de detección FNT-α anti-ratón de cabra, biotinilado (150 ng/ml). Fue añadida peroxidasa de armoracia rusticana-estreptavidina diluida a 1:200 en TBS con 0.1 % BSA, y la mezcla fue incubada durante 20 minutos. Para el desarrollo del color, fue añadida H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tetrametilbenzidina y las planchas fueron incubadas en la oscuridad durante una cantidad apropiada de tiempo. La reacción de color fue detenida con 50 µl 5 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y la absorbencia fue medida a 450 nm con 570 nm como referencia. Entre cada etapa, las planchas fueron lavadas tres veces con 0.05 % solución salina amortiguada con fosfato, polisorbato 20, pH 7.4. Finalmente, las concentraciones de FNT-alfa fueron normalizadas a la viabilidad medida de cada pocillo.

##### Resultados

Determinación del radio hidrodinámico de nanopartículas de quitosano/ARNip.

35 Con objeto de estudiar el efecto de la liofilización en la morfología de las partículas de quitosano, estudiamos los cambios en el tamaño hidrodinámico en la presencia de 0 ó 10 % de sucrosa utilizando PCS (Tabla 1).

Tabla 1: diámetro hidrodinámico de partículas antes y después de la liofilización. 500 ul de partículas de quitosano/ARNip fueron añadidas o bien 100 ul en 10% de sucrosa acuosa ó 100 ul de agua. Los diámetros hidrodinámicos fueron medidos con PCS antes después del secado por congelación (las muestras fueron reconstituidas en 600 ul de agua por pipetado de arriba y abajo). N/A se refiere al tamaño de partícula que está sobre el límite de detección de 6000 nm. Las medidas fueron realizadas tres veces a 25° C. La desviación normalizada está citada entre corchetes.

Partículas de quitosano/eGFP ARNip	Antes de la liofilización	Después de la liofilización
45 0% de sucrosa	126,0 (26,1)	N/A
10% de sucrosa	168,8 (13,7)	142,4 (25,4)

Para cada muestra de partícula, los tamaños fueron medidos tres veces a 25° C. Se listan el tamaño máximo medio y las desviaciones normalizadas de estas tres medidas. Tanto en la presencia y ausencia de muestras de sucrosa muestran un tamaño hidrodinámico de ~150 nm antes de la liofilización. Después de la liofilización, la muestra que contiene un 10 % de sucrosa produjo partículas con aproximadamente el mismo tamaño (~150 nm) mientras que la muestra sin sucrosa se disolvió para dar agregados grandes visibles que no podían ser medidos por PCS.

##### Silenciamiento de eGFP en Células H1299



Analizamos la capacidad de la formulación de nanopartícula de quitosano/ARNip secada por congelación para silenciar eGFP expresado establemente en la línea celular H1299 (Figura 1). La eficiencia del silenciamiento se incrementó con la concentración de ARNip y dependiendo de la presencia de sucrosa como lioprotector. A menor concentración de ARNip ( $\leq 25$  nM), el silenciamiento más elevado fue obtenido en concentraciones de sucrosa relativamente altas (60% de silenciamiento en 10 % de sucrosa) donde, en una elevada concentración de ARNip (50 nM), un 5 % de sucrosa fue suficiente para alcanzar una máxima eficiencia de silenciamiento (70 %).

Entonces comparamos el sistema de quitosano secado por congelación a sistema Trans-IT TKO secado por congelación (Figura 2). Mirus/ARNip secado por congelación y quitosano/ARNip, ambos silenciaron eGFP en todas las concentraciones analizadas, la eficiencia de silenciamiento disminuyó con la concentración. El silenciamiento no especificado, medido usando el control mal emparejado, fue baja en ambos sistemas en todas las concentraciones de ARNip analizadas. ( $<10$  %; Fig. 2).

#### *Estabilidad de nanopartículas de quitosano/ARNip secadas por congelación en almacenaje*

El efecto del almacenaje en la eficiencia de transfección de las formulaciones plancheadas fue investigado sobre un período de 2 meses. En diferentes puntos temporales, las células H1299 fueron plancheadas y la eficiencia de silenciamiento determinada (Fig. 3). Un silenciamiento específico fue observado durante el período completo estudiado con quitosano/ARNip.

#### *Silenciamiento de FNT- $\alpha$ en células RAW*

Para evaluar la capacidad de las formulaciones secadas por congelación para silenciar, fue estudiada la expresión de silenciamiento FNT- $\alpha$  de genes inflamatorios en macrófagos (Tabla 2). Después de la estimulación LPS, los macrófagos no transfectados produjeron grandes cantidades de FNT- $\alpha$  (11-pliegue estimulado: 1100 pg/ml comparado con 96 pg/ml en el control). La inducción fue reducida a 7 y 8.5-pliegues en la presencia de 50 y 25 nM de quitosano/ARNip, respectivamente. La producción de FNT- $\alpha$  fue casi completamente abolida usando Trans-IT TKO en ambas concentraciones de ARNip. De forma interesante, hubo una gran diferencia en el silenciamiento no específico de la expresión FNT- $\alpha$  entre los sistemas. En donde quitosano indujo débilmente la producción adicional de FNT- $\alpha$  (10-20 %), Trans-IT TKO lo redujo a cerca de aproximadamente el límite de detección del análisis a 50 nM y a 50 % a 25 nM de ARNip. De aquí que las partículas de quitosano aparenten producir un silenciamiento de FNT- $\alpha$  más específico que las partículas formadas con Trans-IT TKO.

Tabla 2: Silenciamiento de FNT- $\alpha$  en Macrófagos con Trans-IT TKO/ARNip y quitosano/ARNip. Las muestras de quitosano/ARNip que contienen 10% de sucrosa y Mirus/ARNip fueron añadidas en diferentes cantidades en pocillos de 24 planchas de pocillos para obtener las concentraciones investigadas de ARNip. Las planchas fueron entonces secadas por congelación y transfectadas durante 48 horas con células Raw. Las células fueron entonces incubadas con LPS durante 5 horas después de las cuales el FNT- $\alpha$  fue medido por EISEE (ver figura 5). Todas las muestras por triplicado. Las muestras con una producción de FNT- $\alpha$  por debajo del límite de detección fueron tratadas como teniendo concentraciones en el límite de detección de 40 pg/ml. La desviación normalizada no fue calculada para estas muestras (listada como N/A). La producción FNT- $\alpha$  fue corregida para su viabilidad.

Muestra	Producción de FNT- $\alpha$ promedio en pg/ml	Desviación normalizada
Control no estimulado	96	2,4
Control estimulado	1101	7,0
Quitosano 50nm Emparejamiento 10% S	695	9,1
Quitosano 50nm sin Emparejar 10% S	1264	9,0
Quitosano 25nm Emparejamiento 10% S	865	23,1
Quitosano 25nm sin Emparejar 10% S	1365	52,1
Mirus 50nm Emparejamiento	200	N/A
Mirus 50nm sin Emparejar	264	8,4
Mirus 25nm Emparejamiento	114	N/A
Mirus 25nm sin Emparejar	633	8,4

### Estudios de citotoxicidad

Estudiamos la viabilidad de nuestras dos líneas celulares en la presencia de los reagentes secados por congelación. En la línea celular H1299 no se observó cambios en la viabilidad para quitosano/ARNip en baja concentración de sucrosa ( $\leq 1\%$ ) de quitosano/ARNip, disminuyendo hasta alrededor del 90 % en concentraciones de sucrosa más elevadas ( $\geq 5\%$ ; Fig. 4A). En contraste, la muestra de Trans-IT TKO exhibió una viabilidad significativamente más baja de aproximadamente el 60%.

La viabilidad de células Raw fue significativamente más sensitiva al protocolo de transfección que las células H1299 (Fig. 4B). En 50 nM, todas las muestras analizadas redujeron la viabilidad a por debajo de 40 % con la muestra de Trans-IT TKO reduciéndola a por debajo de 20%. La viabilidad se incrementó ligeramente a concentraciones más bajas (25 nM) de ARNip para ambos sistemas (de 33 % a 38 % con quitosano, de 18 % a 35 % con Trans-IT TKO). Concluimos con que la formulación de lípidos analizada es significativamente más tóxica que las partículas de quitosano.

### Discusión

Una ventaja de nuestro sistema de suministro de ARNip basado en quitosano comparado con sistemas basados en PEI es que PEI ha mostrado ser tóxico *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, el quitosano es un polímero natural, altamente biodegradable, mientras que el PEI necesita ser extensivamente modificado químicamente para conseguir esto. Encontramos que en ambas líneas celulares el nivel de toxicidad era más alto con nuestras formulaciones de lípidos que con nuestras formulaciones de quitosano. Esto está en línea con la observación de que los lípidos catiónicos inducen toxicidad por inhibir importantes proteínas como el PKC.

De forma interesante, nuestras dos formulaciones indujeron efectos no específicos opuestos de producción de FNT- $\alpha$  en macrófagos. Nuestras formulaciones de quitosano de ARNip no emparejadas incrementaron ligeramente la producción de FNT- $\alpha$  mientras que nuestra formulación de lípidos disminuyó la producción de FNT- $\alpha$ . Este descubrimiento subraya la importancia de usar múltiples reagentes de transfección en estudios de silenciamiento debido a los impredecibles efectos fuera de objetivo de los reagentes de transfección. Nuestro descubrimiento de que el quitosano estimula la producción de FNT- $\alpha$  apoya descubrimientos previos de que el quitosano puede estimular la respuesta inmune en determinada extensión. El uso de ARNip específico, sin embargo, permite superar esto.

Nuestro sistema de quitosano ofrece una transfección más rápida y conveniente, en comparación con protocolos actuales en los que los reagentes son preparados, mezclados y se forman complejos ( $>30$  minutos). Esto es de gran beneficio para aplicaciones que exigen grandes cantidades de complejos de transfección tales como en alta exploración total de silenciamiento de cientos o miles de genes.

El descubrimiento de que las superficies revestidas con nuestras formulaciones secadas por congelación fueron aptas para silenciar la producción de FNT- $\alpha$  en macrófagos vecinos podrían ser utilizados en tecnología de implante y medicina regenerativa. Los macrófagos son importantes mediadores de la respuesta de cuerpo extraño, una respuesta que provoca que el sistema inmune reaccione a antígenos no propios y daño en el tejido. En cuanto la producción de FNT- $\alpha$  es una citocina prominente en esta respuesta, los implantes y las estructuras de tejido revestidos con nuestra formulación dirigida FNT- $\alpha$  podría ser hecha más biocompatible por la disminución de respuestas inflamatorias. Se están llevando a cabo actualmente trabajos en nuestro laboratorio para evaluar la aplicación de esta estrategia a la ingeniería de tejidos.

### Conclusión

Hemos mostrado que el quitosano puede ser usado para formular reagentes de transfección de ARNip secado por congelación, fácil de usar, aptos para un eficiente silenciamiento de diferentes objetivos en dos diferentes líneas celulares. Hemos mostrado que este sistema puede ser almacenado durante períodos extendidos. El sistema muestra una toxicidad más baja que las formulaciones de lípidos. Finalmente, el sistema ofrece la posibilidad de avanzar los campos de alta exploración total basada en ARNi, suministro de ARNip mediado por superficie para implantes, además del almacenaje de lípido y la terapéutica con ARNip basado en quitosano.

### Ejemplo 2

A una solución de 0.8 mg/ml de quitosano (Mw= 100kDa, DA=80%) en 200 mM de amortiguamiento de acetato de sodio (pH 5,5) se le añadió 20  $\mu$ l de 100  $\mu$ M Cy3 de ARNip marcado sobre 1 minuto con agitación. La agitación fue interrumpida después de 1 hora y se añadieron 200  $\mu$ l de 60% de sucrosa y la solución fue mezclada con una pipeta. Las estructuras de poli- $\epsilon$ -caprolactona porosas (tamaño = 1mm<sup>3</sup>), diseñadas para ingeniería de tejidos, fueron sumergidas completamente en esta solución durante 10 min después de lo cual fueron congeladas a -20° C durante 24 horas y secadas por congelación a -20° C y 100 mT durante 3 días.

Las estructuras con (Fig. 5B) y sin (Fig. 5A) partículas de quitosano/ARNip fueron visualizadas entonces con microscopía de exploración con electrones. La comparación de estructuras con o sin partículas de

quitosano/ARNip mostró que las partículas habían sido depositadas en las paredes de las estructuras como un revestimiento cubriendo las características de superficie visibles en la estructura sin partículas.

Añadimos entonces agua a una estructura revestida y visualizamos la estructura con microscopía con – focal de fluorescencia (Fig. 6 A). El ARNip (que aparece brillando) podía verse adherido a las paredes (que aparecen más oscuras) indicando que las partículas permanecían unidas a la estructura.

Se añadieron 1.000.000 de células madre mesenquimales de ratas expresando una proteína fluorescente intensificada en 1 ml de medio de crecimiento completo a estructuras revestidas en seco y, tras 24 horas, las células fueron visualizadas usando microscopía con-focal (Fig. 6B). Observamos que algo del ARNip había sido absorbido (apareciendo así más brillantes) por las células (que aparecían brillantes) que se adherían a las paredes de las estructuras (que aparecían más oscuras) indicando una transfección exitosa.

Concluimos con que por secado por congelación, las partículas de quitosano/ARNip sobre implantes tales como estructuras de ingeniería de tejidos, podemos conseguir una transfección exitosa de las células que crezcan sobre el implante. Si un ARNip contra una citocina inflamatoria (tal como la “necrosis tumoral factor alfa” [FNT- $\alpha$ ]1) fuera incluida en las partículas de quitosano utilizadas para revestir una estructura o cualquier otro tipo de implante, podría reducir, probablemente, la inflamación asociada con la implantación de tales implantes. De forma alternativa, si un ARNip contra una proteína que reprime una senda de diferenciación de célula madre (tal como “BCL-2 como 2” (BCL2L2)2 ó “gen 6 específico de crecimiento-detención” (GAS-6)3) fue incluido en partículas de quitosano utilizadas para el revestimiento de una estructura o cualquier otro tipo de implante, podría, probablemente, inducir o reforzar la diferenciación de células madre sembradas sobre dichos implantes a un tipo específico de célula.

### Ejemplo 3

A una solución de 1 ml de quitosano de 800  $\mu$ g/ml (Mw= 100kDa, DA=80%) en 200 mM de amortiguador de acetato de sodio (pH 5,5) se le añadió 20  $\mu$ l de ARNip anti – Rhoa marcado con fluorescencia, de 100  $\mu$ M sobre 1 minuto mientras se agitaba. La agitación fue interrumpida tras 1 hora y se añadieron 200  $\mu$ l de un 60% de sucrosa y la solución se mezcló con una pipeta. Fueron colocados 7,6  $\mu$ l de la solución en el medio de pocillos sobre 24 planchas de pocillos. Estas planchas fueron entonces congeladas a -20° C durante 24 horas y secadas por congelación a -20° C y 100 mT durante 3 días.

Las planchas fueron entonces descongeladas a temperatura ambiente durante 10 minutos durante los cuales la tapa de la plancha fue sellada sobre el fondo de la plancha usando cinta adhesiva normalizada de oficina. Las planchas fueron entonces congeladas a -20° C durante 2 días, enviadas a temperatura ambiente durante 1 día y congeladas hasta -20° C durante 3 días. Las planchas fueron usadas entonces por adición de 250  $\mu$ l de medio de cultivo completo que contenía 100.000 células (células PC12, células Schwann y fibroblastos) a cada pocillo. Después de un día de absorción del ARNip fue evaluado usando microscopía de fluorescencia y microscopía de contraste de fase (Figura 7). El ARNip fue absorbido en todas las tres tipos de células indicando una transfección exitosa.

Concluimos con que, por secado por congelación de las partículas de quitosano/ARNip en pocillos sobre planchas de micro pocillos, podemos crear una plancha de transfección fácil de usar (1 fase) que produce un alto índice de transfección en múltiples tipos de células incluyendo células neuronales. Las partículas de quitosano/ARNip en las planchas pueden sobrevivir siendo descongeladas y re congeladas múltiples veces además de ser enviadas a clientes de ultramar.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Arhus Universitet

Kjems, Jorgen

Besenbacher, Flemming

Oetgergaard Andersen, Morten

Howard, Kenneth Alan

<120> Nanopartículas de quitosano deshidratadas

<130> 42397PC01

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210>1

	<211>21		
	<212>ARN		
	<213>Homo Sapiens		
	<400>1		
5	gacguaaacg gccacaaguu c	21	
	<210>2		
	<211>20		
	<212>ARN		
	<213>Homo Sapiens		
10	<400>2		
	acuuguggcc guuuacgucg	20	
	<210>3		
	<211>20		
	<212>ARN		
15	<213>Homo Sapiens		
	<400>3		
	gacguuagac ugacaaguuc	20	
	<210>4		
	<211>23		
20	<212>ARN		
	<213>Homo Sapiens		
	<400>4		
	acuugguguc cagucuaagu cgc	23	
	<210>5		
25	<211>25		
	<212>ARN		
	<213>Homo Sapiens		
	<400>5		
	gucucagccu cuucucauuc cugcu	25	
30	<210>6		
	<211>26		
	<212>ARN		
	<213>Homo Sapiens		
	<400>6		
35	uacagagucg ggaagaguaa ggacga	26	
	<210>7		

	<211>25	
	<212>ARN	
	<213>Homo Sapiens	
	<400>7	
5	cuuccucucu uucucucccu uguga	25
	<210>8	
	<211>27	
	<212>ARN	
	<213>Homo Sapiens	
10	<400>8	
	aggaaggaga gaaagagagg gaacacu	27

# REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula deshidratada que comprenda un ARNip y quitosano.
2. La nanopartícula de la reivindicación 1 comprendiendo menos de 1% de agua por peso total.
- 5 3. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes siendo preparada por liofilización.
4. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes siendo incluida en una partícula de liberación controlada más grande, un depósito de droga implantable o una estructura biodegradable para ingeniería de tejidos.
- 10 5. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes siendo secada sobre una superficie.
6. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes siendo preparada por un procedimiento que comprenda:
  - a. Disponer de una solución de quitosano.
  - b. Disponer de una solución de ARNip.
  - 15 c. Mezclar la solución de la fase a con la solución de la fase b.
  - d. Incubar la solución de la fase c bajo condiciones de formación compleja de tal manera que se formen nanopartículas de quitosano/ARNip.
7. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula de quitosano/ARNip no comprende un reticulador inicial.
- 20 8. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la solución de ARNip comprende ARNip en una concentración inferior a 100 µM.
9. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la nanopartícula con quitosano débilmente enlazado es para administración a través de la mucosa o para administración sistémica.
- 25 10. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la concentración de ARNip es mayor de 100 µM.
11. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la concentración de quitosano es de menos de 250 µg/ml.
- 30 12. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el tamaño de la partícula está entre 10 y 500 nm.
13. Una superficie que comprenda una nanopartícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en la que la nanopartícula haya sido secada sobre la superficie.
14. Un polvo de las nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 35 15. Una composición farmacéutica que comprenda la nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

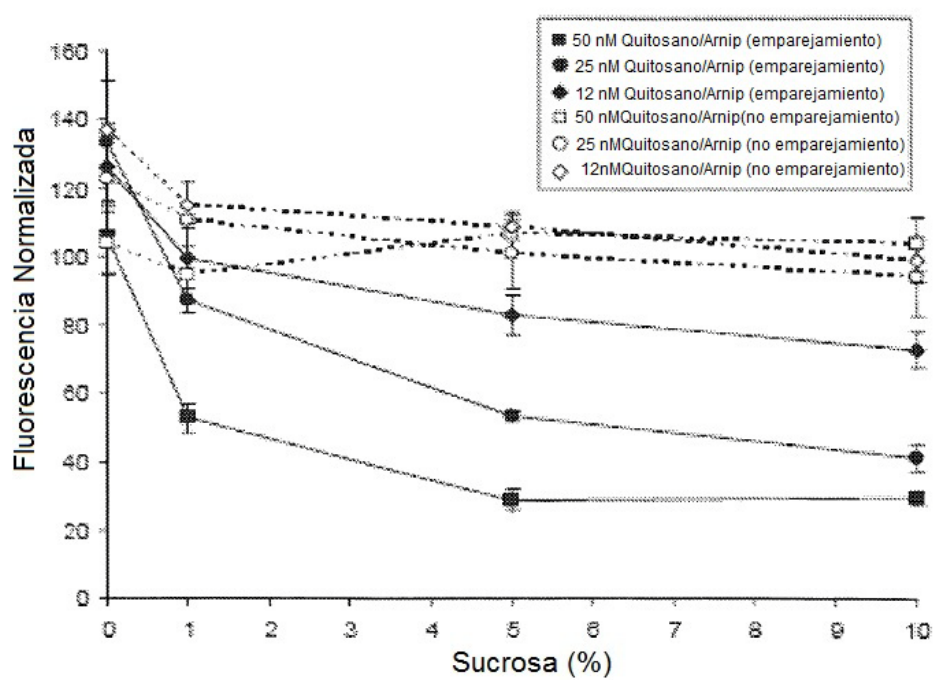


Fig. 1

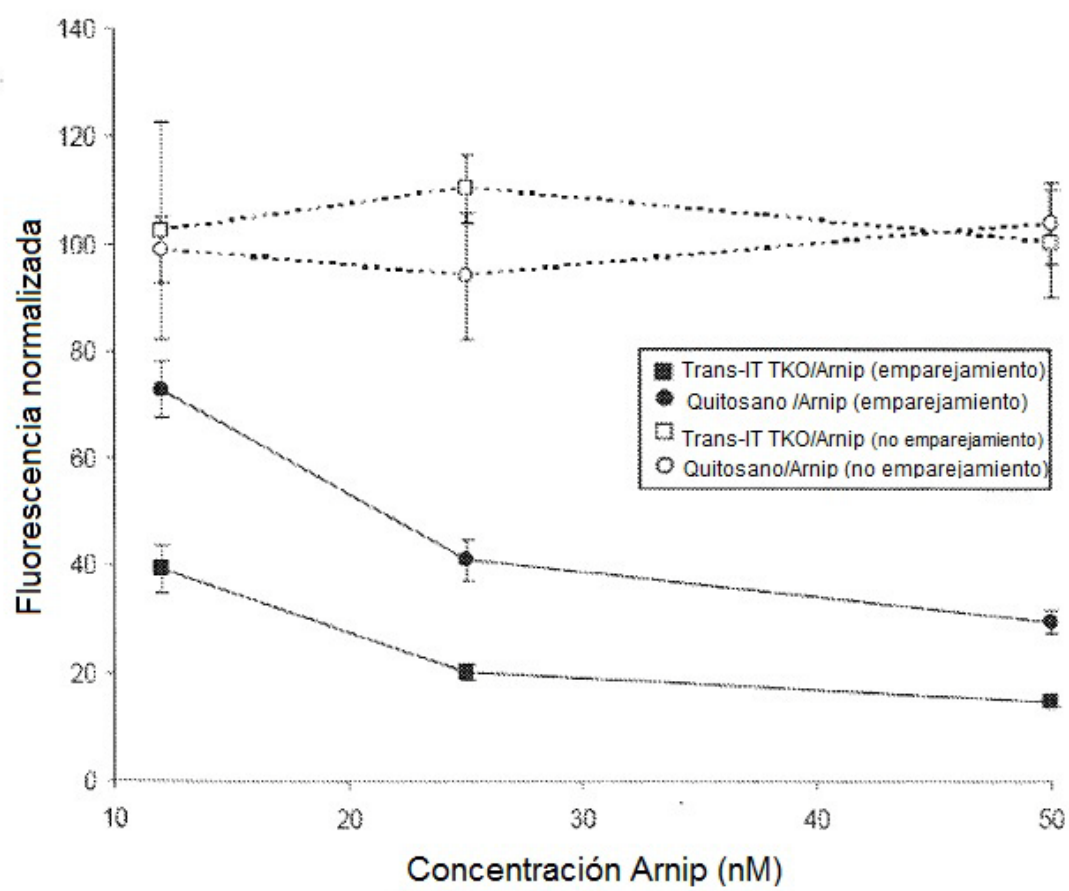


Fig. 2



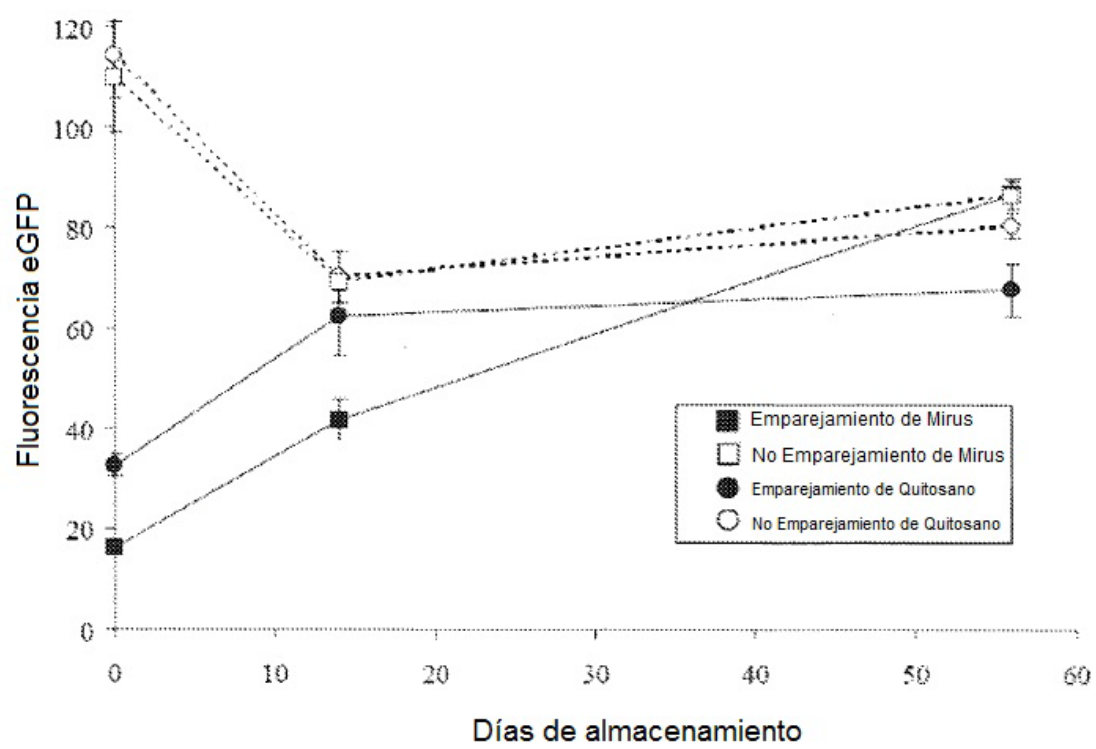
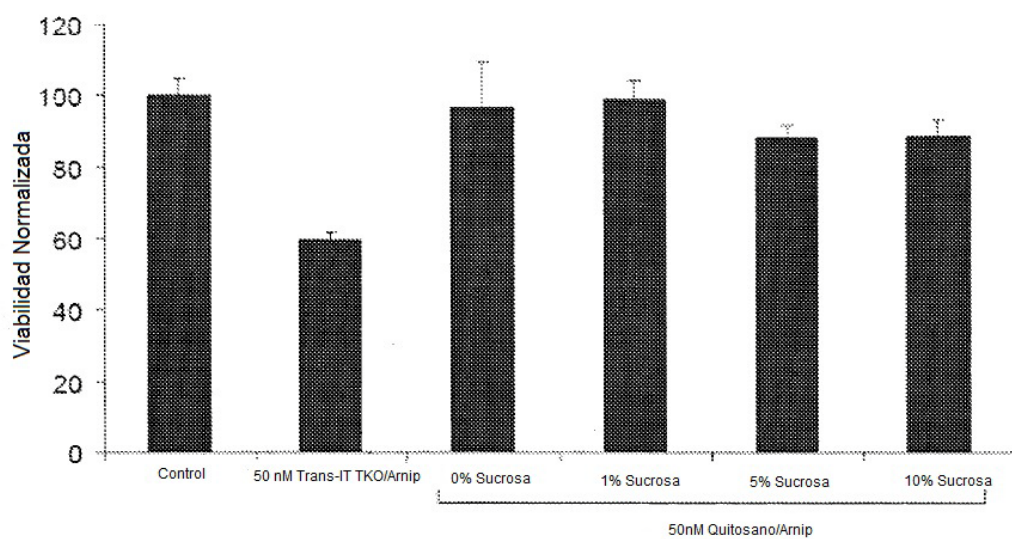
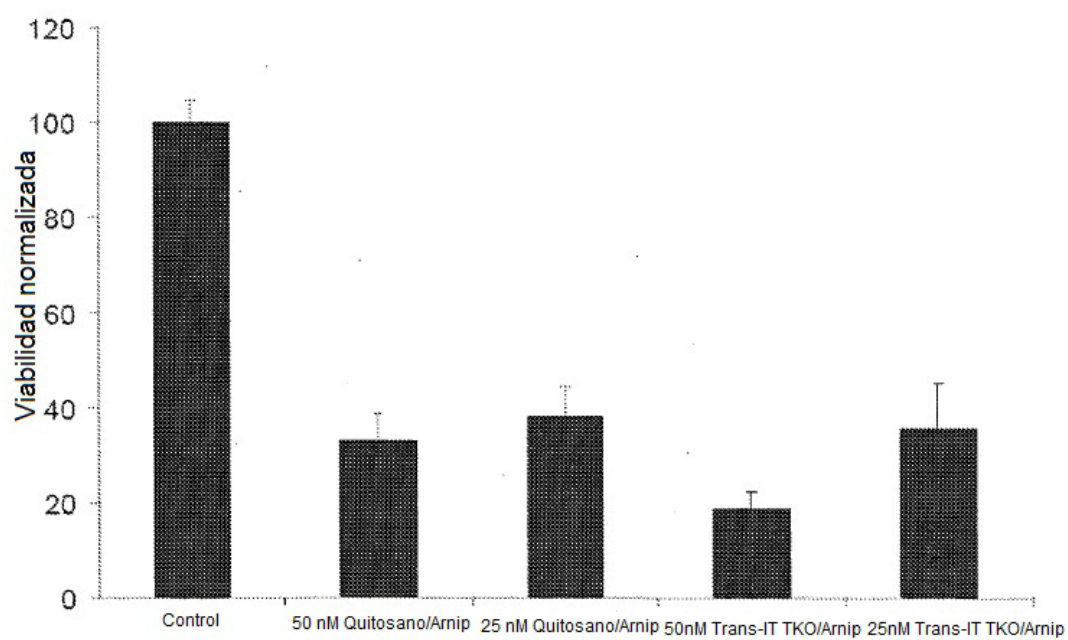


FIG. 3



A



B

Fig. 4



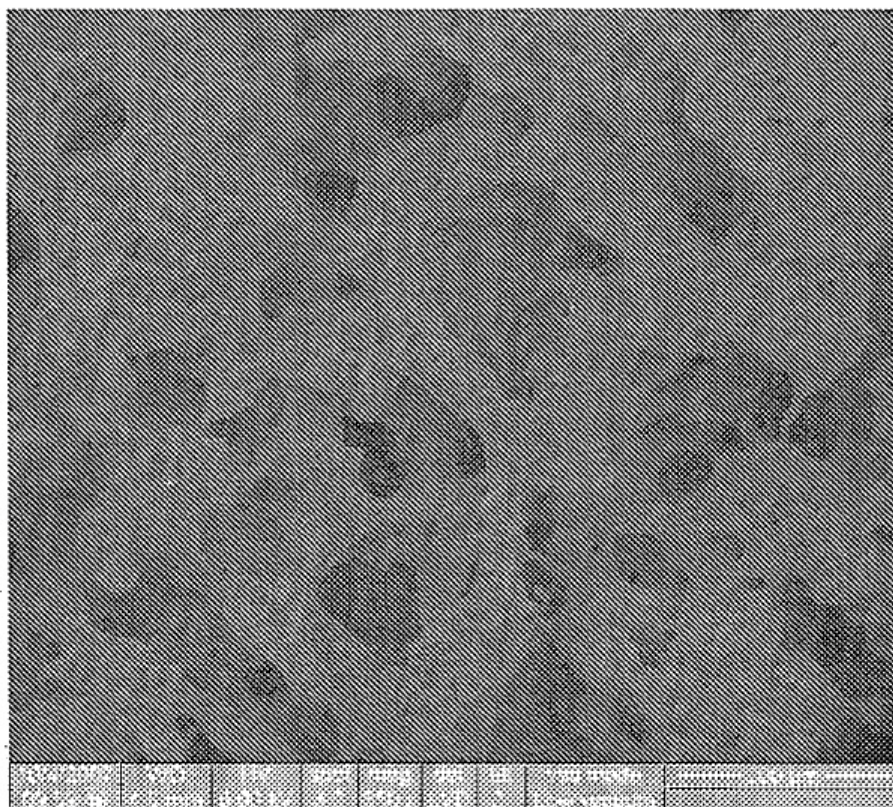


Fig. 5A

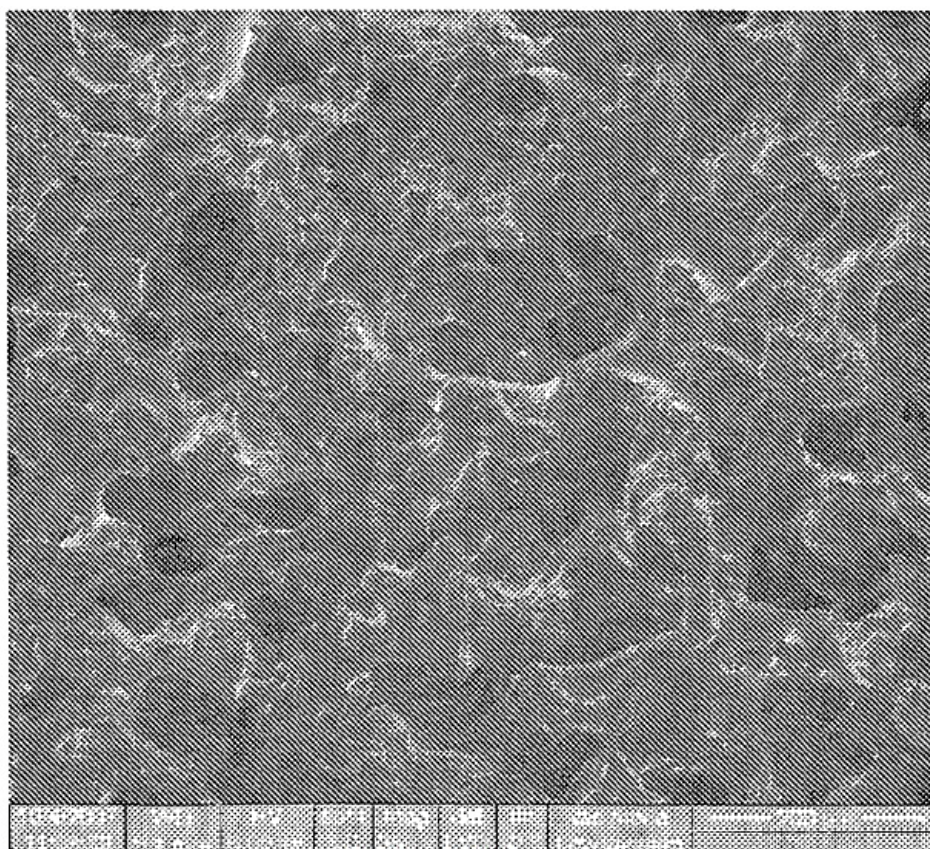


Fig. 5A



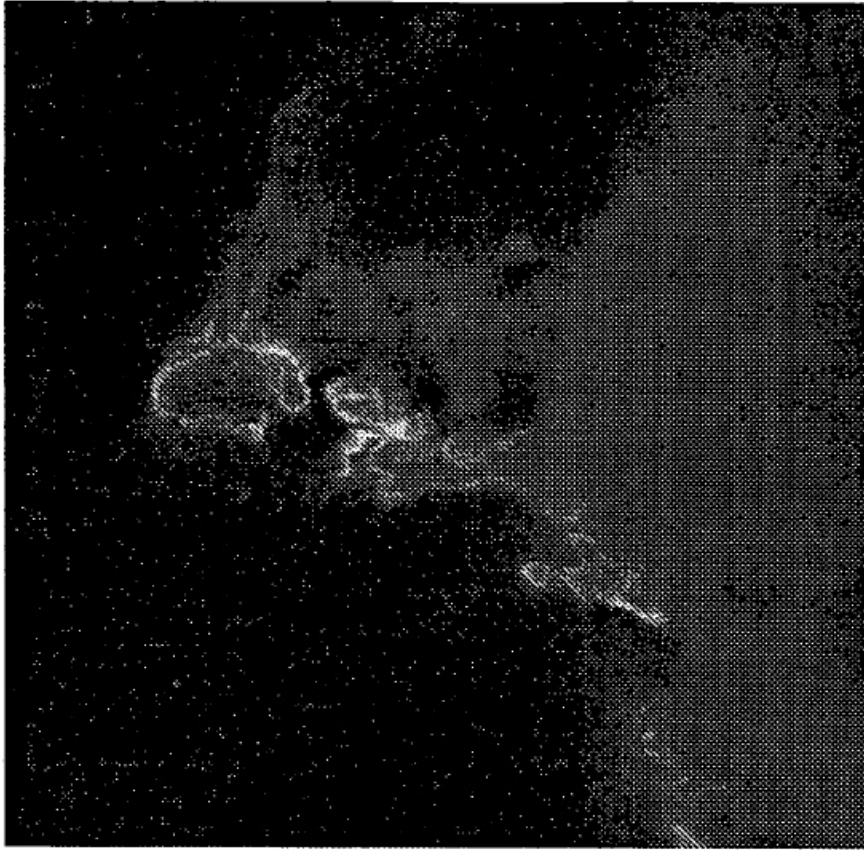


Fig. 6A

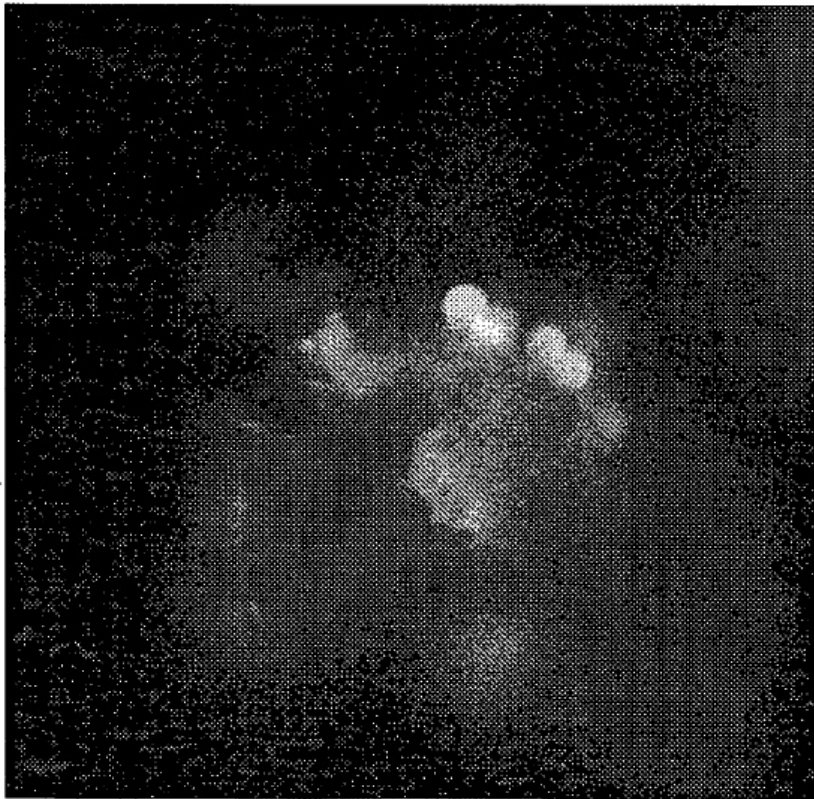


Fig. 6A



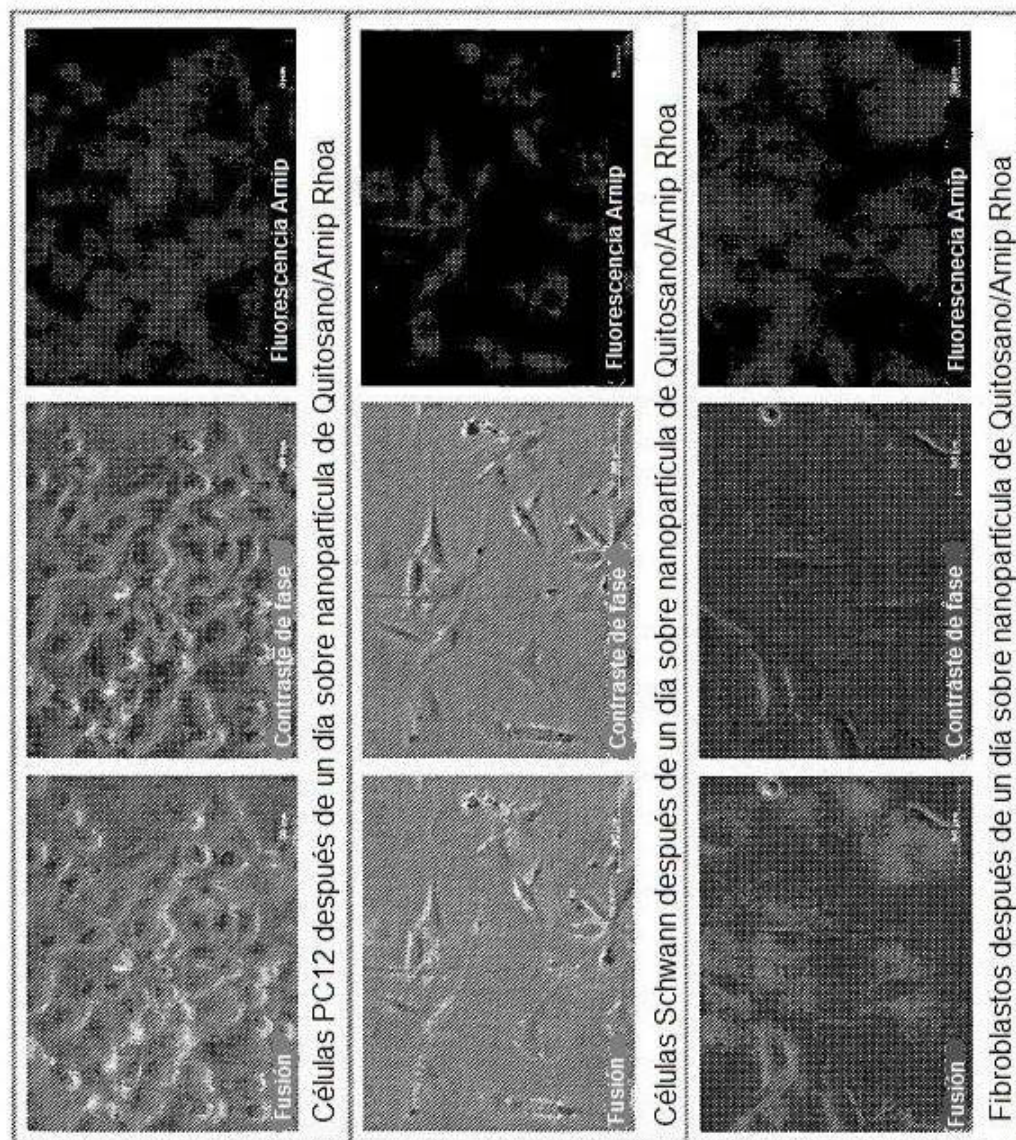


Fig. 7