

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 990**

51 Int. Cl.:

**C08L 5/08** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 9/14** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/CA2013/050218**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13138930**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13763497 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2828332**

54 Título: **Nanopartículas de quitosano derivado dualmente y los métodos para fabricar y usar las mismas para la transferencia génica in vivo**

30 Prioridad:

**21.03.2012 US 201261613885 P**

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

**05.10.2017**

73 Titular/es:

**ENGINE, INC. (100.0%)  
2386 East Mall Suite 111  
Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, CA**

72 Inventor/es:

**GAO, JUN;  
HSU, ERIC y  
CHEUNG, ANTHONY**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 635 990 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**

Nanopartículas de quitosano derivado dualmente y los métodos para fabricar y usar las mismas para la transferencia génica in vivo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere generalmente a nanopartículas que comprenden quitosano derivado dualmente, y a métodos para fabricar y usar los mismos para suministrar ácidos nucleicos, por ejemplo, transferencia de genes, in vivo.

Antecedentes de la invención

10 El quitosano es un copolímero catiónico no tóxico de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. El quitosano puede formar un complejo con ácido nucleico y, como polisacárido biocompatible y no tóxico, se ha utilizado como vehículo de administración de ADN para transfectar células. Mucho interés se ha centrado en el uso de quitosano en la administración no viral de ácido nucleico debido a las complejidades y toxicidad potencial de la envoltura viral.

15 Se han examinado varios complejos de quitosano/ADN, incluyendo complejos entre quitosano modificado y ácidos nucleicos, en un intento de identificar composiciones apropiadas para la transfección génica. Véase, por ejemplo, WO2010/088565; WO2008/082282. Se ha encontrado que los complejos varían entre otras propiedades, solubilidad, propensión a la agregación, estabilidad del complejo, tamaño de partícula, capacidad para liberar ADN y eficiencia de transfección.

20 Se proporciona en este documento el sorprendente descubrimiento de que la arginina y el ácido glucónico actúan sinérgicamente para mejorar la eficiencia de transfección del quitosano. El uso de nanopartículas basadas en quitosano modificadas con arginina para la administración de ácidos nucleicos se conoce de Int. J. Pharmaceutics, 359, 2008, 241-246.

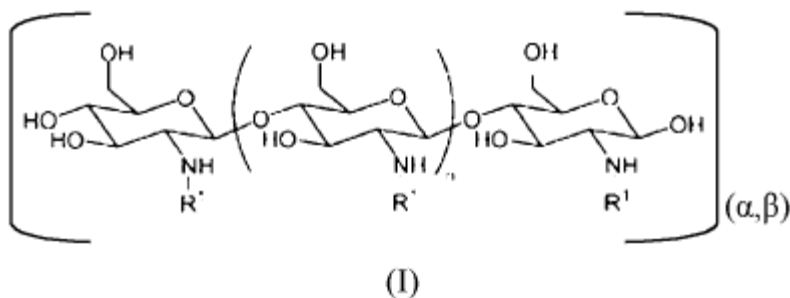
Resumen de la invención

25 En este documento se describe el hallazgo inesperado de que la arginina y el ácido glucónico aumentan sinérgicamente la eficiencia de transfección de las nanopartículas de quitosano. De acuerdo con lo anterior, se proporcionan en este documento composiciones novedosas para facilitar la administración de ácidos nucleicos a células, tejidos y órganos, por ejemplo, in vivo. En particular, se proporcionan en este documento nanopartículas basadas en quitosano derivadas dualmente, en donde dichas nanopartículas comprenden opcionalmente además ácido nucleico.

En una realización, las nanopartículas comprenden quitosano que está acoplado al menos a un aminoácido. En una realización preferida, el aminoácido está cargado positivamente. En una realización más preferida, el aminoácido es arginina.

30 En otra realización, las nanopartículas comprenden quitosano que está acoplado a un ácido orgánico, preferiblemente a ácido glucónico.

En otra realización, las nanopartículas comprenden quitosano que está acoplado tanto a la arginina como al ácido glucónico, véase, por ejemplo, la fórmula I

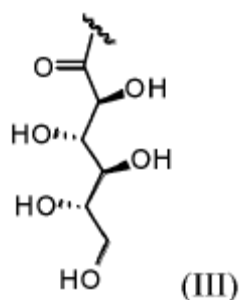
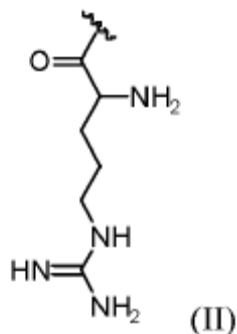


35 en la que n es un número entero de 1 a 2000,

$\alpha$  es el grado de funcionalización de la arginina,

$\beta$  es el grado de funcionalización del ácido glucónico; y

cada  $R^1$  se selecciona independientemente entre hidrógeno, acetilo, fórmula (II) y fórmula (III).



El quitosano derivado dualmente, como se describe en este documento, comprende arginina y ácido glucónico a diferentes porcentajes de concentración inicial o porcentaje de funcionalización final. El porcentaje de concentración inicial se utiliza para el quitosano modificado con ácido glucónico, que representa la relación molar del grupo carboxilo sobre el ácido glucónico dividido por los grupos amina totales sobre quitosano o quitosano modificado con arginina, mientras que el porcentaje de funcionalización final representa el grado de funcionalización del quitosano modificado final calculado a partir de la relación en peso de carbono y nitrógeno como resultado del análisis elemental. En una realización, el quitosano se acopla con ácido glucónico a una concentración inicial de aproximadamente 5% a aproximadamente 60%, por ejemplo, de aproximadamente 8% a aproximadamente 30%. En otra realización, preferiblemente aproximadamente 30%. En otra realización, el quitosano se acopla con arginina a una concentración final de aproximadamente 10% a aproximadamente 55%.

En particular, los polyplexos de ácido nucleico-quitosano formados con tal quitosano derivado dualmente ("quitosano DD") presentan una eficiencia de transfección más alta que los polyplexos de ácido nucleico-quitosano formados con ya sea quitosano no funcionalizado o quitosano que está conjugado con residuos de aminoácidos individuales, polímeros de aminoácidos o residuos de ácido glucónico solos. Otras propiedades deseables conferidas por el uso de quitosano funcionalizado dualmente en los polyplexos descritos en este documento incluyen una capacidad mejorada para penetrar en la barrera mucosa, una estabilidad mejorada del polyplex, una toxicidad celular reducida y una liberación intracelular mejorada del ácido nucleico. Además, en algunas realizaciones preferidas, las composiciones de polyplex de quitosano DD objeto se pueden administrar a pH fisiológico (por ejemplo, administración sistémica).

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto, la invención proporciona polyplexos de ácido nucleico quitosano DD. Los polyplexos de ácido nucleico quitosano DD comprenden quitosano que es derivado dualmente con arginina y ácido glucónico.

En una realización, el polyplex de ácido nucleico quitosano DD se forma a un pH por debajo del pKa de quitosano DD.

En una realización, el polyplex de ácido nucleico quitosano DD se forma a un pH por debajo de 7.

En una realización, el polyplex de ácido nucleico quitosano DD tiene un grado combinado de funcionalización con arginina y ácido glucónico de 1-60%.

En una realización, el polyplex de ácido nucleico quitosano DD tiene un grado combinado de funcionalización con arginina y ácido glucónico de 1-30%.

En una realización, la relación molar de arginina a ácido glucónico en el polyplex de ácido nucleico quitosano DD está entre 100:1 y 1:100.

En una realización, la relación molar de arginina a ácido glucónico en el polyplex de ácido nucleico quitosano DD está entre 50:1 y 1:50.

En una realización, la relación molar de arginina a ácido glucónico en el polyplex de ácido nucleico quitosano DD está entre 10:1 y 1:10.

En una realización, la relación molar de arginina a ácido glucónico en el polyplex de ácido nucleico quitosano DD está entre 5:1 y 1:5.

En una realización, la relación molar de arginina a ácido glucónico en el polyplex de ácido nucleico quitosano DD está entre 2:1 y 1: 2.

En realizaciones preferidas, la relación molar de arginina a ácido glucónico es inversamente proporcional al peso molecular del quitosano, esto es, un quitosano DD de menor peso molecular requiere una relación molar más alta de arginina a quitosano y viceversa.

En una realización, el ácido nucleico del polyplex de ácido nucleico quitosano DD es ADN.

En una realización, el ácido nucleico del polyplex de ácido nucleico quitosano DD es ARN.

En una realización, el ácido nucleico del polyplex de ácido nucleico quitosano DD es un ácido nucleico artificial. En una realización preferida, el ácido nucleico artificial se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico peptídico (PNA), oligo morfolino fosforodiamidato (PMO), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico glicólico (GNA) y ácido nucleico treosa (TNA).

En una realización, el ácido nucleico del polyplex de ácido nucleico quitosano DD es un ácido nucleico terapéutico. En una realización, el ácido nucleico terapéutico es un ARN terapéutico. En una realización preferida, el ARN terapéutico se selecciona del grupo que consiste en ARN antisentido, ARNip, ARN de horquilla corta, micro ARN y ARN enzimático.

En una realización, el ácido nucleico terapéutico es ADN.

10 En una realización, el ácido nucleico terapéutico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica.

En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una pluralidad de polyplexos de ácido nucleico quitosano DD.

15 En una realización, la composición tiene un pH entre 3.0-8.0, más preferiblemente entre 4.0-7.0, y lo más preferiblemente entre 4.5-6.5.

En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polyplex de ácido nucleico quitosano DD de la invención. En una realización preferida, el polyplex de ácido nucleico quitosano DD comprende un ácido nucleico terapéutico.

20 En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar una enfermedad, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la invención a un paciente.

En una realización, la composición farmacéutica objeto se administra a pH fisiológico.

En una realización, la composición farmacéutica objeto se administra sistémicamente.

25 En una realización, la composición farmacéutica objeto se administra localmente a un tejido diana. En una realización preferida, la composición farmacéutica objeto se administra al tejido mucoso. En una realización, el tejido mucoso es tejido GI.

En un aspecto, la invención proporciona una vacuna, que comprende un polyplex de ácido nucleico quitosano DD, en el que el ácido nucleico codifica un antígeno.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para vacunar a un paciente. Los métodos comprenden administrar una vacuna de la invención a un paciente.

30 En un aspecto, la invención proporciona una composición inmunogénica, que comprende un polyplex de ácido nucleico quitosano DD, en el que el ácido nucleico codifica un inmunógeno.

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos para iniciar o aumentar una respuesta inmune a una molécula del interés. Los métodos comprenden administrar una composición inmunogénica de la invención a un paciente, en la que el ácido nucleico codifica un epítipo de la molécula de interés.

35 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo del procedimiento de fabricación de quitosano derivado dualmente con arginina y ácido glucónico conduciendo a una combinación óptima de grados de funcionalización entre dos componentes acoplados.

40 La figura 2 muestra la eficiencia de transfección (ng SEAP/mg de proteína; eje y) de quitosano 24mer acoplado con (A) ácido glucónico a una concentración inicial (eje x) del 10%, 30% o 60% o (B) arginina en un grado de funcionalización final (eje x) del 9.7%, 12.3%, 26%, o 52%.

45 La figura 3 muestra la eficiencia de transfección (ng de SEAP/mg de proteína; eje y) de polyplexos fabricados a una proporción amina/fosfato (N/P) de 20 con quitosano 24mer que estaba (A) acoplado dualmente con arginina y ácido glucónico hasta grados de funcionalización final de 26% de arginina y 5% de ácido glucónico; (B) acoplado con arginina sola al grado de funcionalización final de 26%, o (C) acoplado con ácido glucónico solo a una concentración inicial de 30% de ácido glucónico a amina total.

La figura 4 muestra la eficiencia de transfección (ng de SEAP/mg de proteína, eje y) de polyplexos hechos a una proporción amina/fosfato (N/P) de 20 con quitosano 24mer acoplado con una funcionalización final de 26% de arginina

sola (0%; eje x) o acoplado adicionalmente con ácido glucónico a grados de funcionalización final de ácido glucónico de 3%, 5%, 6% y 9% (eje x).

5 La figura 5 muestra el efecto de una proporción amina/fosfato (N/P) (eje x) de 40 (N40), 20 (N20) o 10 (N10) sobre la eficiencia de transfección (ng de SEAP/mg/proteína; eje y) de quitosano 24mer derivado dualmente con arginina y ácido glucónico en grados de funcionalización final de 26% y 5%, respectivamente (cajas pequeñas de cuadros) o quitosano unido con 26% de arginina sola (cajas grandes de cuadros).

10 La figura 6 muestra el efecto del pH de la formulación (eje x) sobre la eficiencia de transfección (ng de SEAP/mg de proteína) de quitosano 24mer derivado dualmente con arginina y ácido glucónico en grados de funcionalización final de 26% y 5%, respectivamente (cajas pequeñas de cuadrados) o quitosano acoplado con arginina solo en un grado de funcionalización final de 26% (cajas grandes de cuadrados).

15 La figura 7 muestra el efecto de la funcionalización de la arginina en porcentaje sobre la eficiencia de transfección (ng de SEAP/mg/proteína; eje y) por quitosano 24mer derivado con arginina a una concentración final de 52% (A, B) o 26% (C, D) solo (A, C) o también con ácido glucónico a una concentración final de 8% (B) o 6% (D). El quitosano 24mer acoplado con el ácido glucónico de concentración inicial al 30% solo (E) también se incluye como referencia.

20 La figura 8 muestra la eficiencia de transfección del quitosano 24mer derivado dualmente con arginina y ácido glucónico en grados de funcionalización final de 26% y 5%, respectivamente (cajas pequeñas de cuadrados) o quitosano acoplado con 26% de arginina sola (cajas grandes de cuadrados) en (A) células 293T, (B) HT1080 o líneas celulares humanas Hela o (C) líneas celulares VERO de monos o NIH3T3 murinas.

25 La figura 9 muestra la expresión génica en el músculo, 2 días después de la inyección intramuscular de quitosano (A), el quitosano funcionalizado con 26% de arginina (B), y quitosano funcionalizado dualmente con grados de funcionalización final de 26% de arginina y 5% de ácido glucónico (C).

La figura 10 muestra la expresión génica en el colon distal, 2 días después de la administración colónica de quitosano (A), el quitosano funcionalizado con 26% de arginina (B), y el quitosano funcionalizado dualmente con arginina y ácido glucónico en los grados de funcionalización final de 26% de arginina y 6% de ácido glucónico (C).

30 La figura 11 muestra in vitro la eficiencia de modificación genética de los polyplexos de ARNip de luciferasa que comprenden quitosano 24mer producido a una proporción amina/fosfato (N/P) de 40 y acoplado con (A) 26% de arginina solo o (B) derivado dualmente con 26% de arginina y ácido glucónico en un grado de funcionalización final del 5%.

La figura 12 muestra la propiedad fisicoquímica de los polyplexos de ácido nucleico quitosano DD liofilizados después de la reconstitución con agua después de 3 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.

35 Descripción detallada

El quitosano es la forma desacetilada de quitina, que es un polímero de N-acetilglucosamina es decir el componente principal de los exoesqueletos de crustáceos (por ejemplo, camarón, cangrejo, langosta). El quitosano se forma a partir de quitina por desacetilación, y como tal no es una molécula polimérica sola, sino una clase de moléculas que tienen diferentes pesos moleculares y diferentes grados de desacetilación. El porcentaje de desacetilación en quitosanos comerciales es por lo general entre 50-100%.

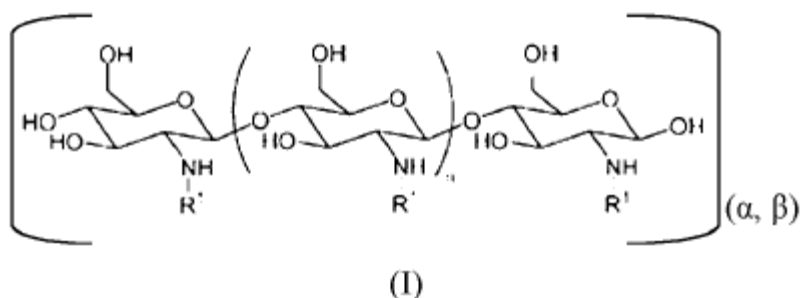
40 Los derivados de quitosano descritos en este documento se generan funcionalizando los grupos amino libres resultantes con unidades estructurales neutras o cargas positivas, como se describe en este documento. Los quitosanos derivados descritos en este documento tienen un número de propiedades que son ventajosas para un vehículo de administración de ácido nucleico que incluyen: se unen y forman complejos eficazmente los ácidos nucleicos cargados negativamente, se pueden formar en nanopartículas de un tamaño controlable, pueden ser absorbidas por las células y pueden liberar los ácidos nucleicos en el momento apropiado dentro de las células.

45 En la presente invención se utilizan quitosanos con cualquier grado de desacetilación superior al 50%, con funcionalización entre 1% y 50%. (El porcentaje de funcionalización se determina en relación con el número de unidades estructurales amino libres en el polímero de quitosano). Los grados de desacetilación y funcionalización imparten una densidad de carga específica al derivado de quitosano funcionalizado. La densidad de carga resultante afecta a la solubilidad, la unión a ácidos nucleicos y la liberación subsiguiente, y la interacción con membranas de células de mamífero. De este modo, de acuerdo con la presente invención, estas propiedades se deben optimizar para una eficiencia óptima. Ejemplos de derivados de quitosano se describen en Baker et al; 11/657,382 presentada el 24 de enero de 2007, la cual se incorpora en este documento como referencia. En una realización, el quitosano derivado dualmente descrito en este documento comprende quitosano que tiene un grado de desacetilación de al menos 50%. En una realización, el grado de desacetilación es al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% y lo más preferiblemente al menos 95%. En una realización preferida, el quitosano derivado dualmente descrito en este documento comprende quitosano que tiene un grado de desacetilación de al menos 98%.

Los derivados de quitosano descritos en este documento tienen un intervalo de pesos moleculares promedio que son solubles a pH neutro y fisiológico e incluyen, para los propósitos de esta invención, pesos moleculares que varían de 3-110 kDa. Las realizaciones descritas en este documento son características de peso molecular promedio inferior de quitosanos derivados (<25 kDa, por ejemplo, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 25 kDa), que pueden tener propiedades de administración y transfección deseables, y son de tamaño pequeño y tienen solubilidades favorables. Un quitosano derivado de peso molecular promedio inferior es generalmente más soluble que uno con un peso molecular más alto, el formador produce de este modo un complejo ácido nucleico/quitosano que liberará más fácilmente el ácido nucleico y proporcionará transfección aumentada de células. Mucha literatura se ha dedicado a la optimización de todos estos parámetros para los sistemas de administración basados en quitosano.

Un experto en la técnica reconocerá que el quitosano se refiere a una pluralidad de moléculas que tienen una estructura de fórmula I, en la que n es cualquier número entero, y cada R<sup>1</sup> es hidrógeno. También, el quitosano referido como teniendo un peso molecular promedio, por ejemplo, de 3kD a 110kD, se refiere generalmente a una pluralidad de moléculas de quitosano que tienen un peso molecular promedio ponderado de, por ejemplo, 3kD a 110kD, respectivamente, en el que cada una de las moléculas de quitosano puede tener diferentes longitudes de cadena (n+2). También es bien reconocido que el quitosano denominado como "quitosano n-mer", no comprende necesariamente moléculas de quitosano de fórmula I, en el que cada molécula de quitosano tiene una longitud de cadena de n+2. Más bien, el "quitosano n-mer", como se utiliza en este documento, se refiere a una pluralidad de moléculas de quitosano, cada una de las cuales puede tener diferentes longitudes de cadena, en la que la pluralidad tiene un peso molecular promedio sustancialmente similar o igual a una molécula de quitosano que tiene una longitud de cadena de n. Por ejemplo, el quitosano 24-mer puede comprender una pluralidad de moléculas de quitosano, cada una de las cuales tiene diferentes longitudes de cadena que van desde, por ejemplo, 7-50, pero que tiene un peso molecular promedio ponderado sustancialmente similar o equivalente a una molécula de quitosano que tiene una longitud de cadena de 24.

Los derivados de quitosano funcionalizados descritos en este documento son compuestos de quitosano derivado dualmente, por ejemplo, compuesto de quitosano-arginina-ácido glucónico. En general, los compuestos de quitosano-arginina-ácido glucónico tienen la siguiente estructura de fórmula I

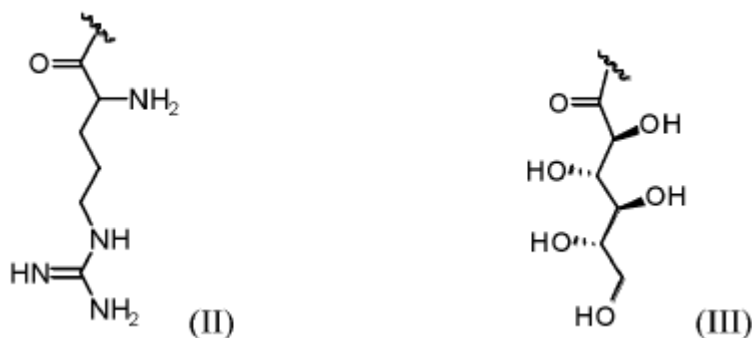


en la que n es un número entero de 1 a 2000,

α es el grado de funcionalización de la arginina,

β es el grado de funcionalización del ácido glucónico; y

cada R<sup>1</sup> se selecciona independientemente entre hidrógeno, acetilo, fórmula (II) y fórmula (III).

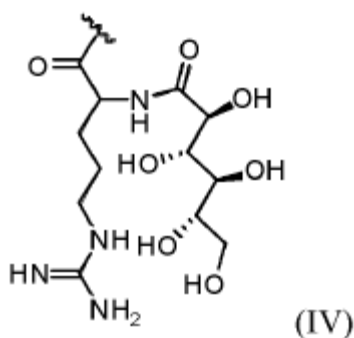


En este documento se describe un método preferido para conjugar quitosano con arginina o ácido glucónico en un medio acuoso, de acuerdo con la presente invención, en el que se usan Boc-L-arginina (Boc-R) y ácido glucónico (Glucó). El método utiliza la conocida 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) soluble en agua y la N-hidroxisuccinimida (NHS) para catalizar la formación de amida entre una amina en el esqueleto de quitosano y un ácido carboxílico sobre Boc-R o ácido glucónico.

Generalmente, el quitosano en solución diluida de HCl con un pH ajustado para un pH de acoplamiento dirigido de, por ejemplo,  $6.0 \pm 0.5$  y más preferiblemente  $6.0 \pm 0.2$ , se acopla primero a Boc-R o Gluco, se purifica y después se acopla con el segundo grupo funcional. Por ejemplo, si el quitosano se acopla primero a la arginina, el quitosano acoplado con arginina (R-quitosano) se puede purificar y luego acoplarse al ácido glucónico. Por el contrario, si el quitosano se acopla primero al ácido glucónico, el quitosano acoplado con ácido glucónico (gluco-quitosano) se puede purificar y luego acoplarse a arginina. Independientemente del orden de acoplamiento, la arginina y el ácido glucónico se pueden acoplar al quitosano usando métodos bien conocidos.

Por ejemplo, la arginina se puede acoplar a quitosano o quitosano gluco-funcionalizado (gluco-quitosano) adicionando una mezcla de solución acuosa de Boc-R y NHS de pH ajustado a quitosano en HCl diluido seguido por adición de solución acuosa de EDC para iniciar el acoplamiento a temperatura ambiente durante 24 horas. La concentración de amina de quitosano, el pH de reacción y las relaciones molares de R-COOH sobre quitosano-amina y EDC:NHS:R-COOH pueden ser calculadas previamente y satisfechas de tener un grado de funcionalización final reproducible de arginina. El Boc-R-quitosano se puede purificar antes de la reacción De-Boc. De Boc puede proceder en medio HCl con una concentración controlada de HCl y tiempo de reacción. Cualquier despolimerización de quitosano durante el de-Boc se puede monitorizar midiendo la viscosidad de la solución de reacción, que se demostró que era insignificante, y la eficiencia de de-Boc se puede determinar por RMN de protones sobre Boc-R-quitosano y Boc -R-quitosano. El grado de funcionalización se puede determinar a partir del análisis elemental de C, N del de-Boc-R-quitosano purificado.

El ácido glucónico se puede acoplar a quitosano o quitosano acoplado a arginina (R-quitosano) a un pH de reacción de  $6.0 \pm 0.3$ . A este pH, el grupo de ácido carboxílico del ácido glucónico puede ser atacado por aminas desacopladas en el esqueleto de quitosano de acuerdo con un mecanismo de reacción de sustitución nucleofílica. Un experto de la técnica reconocerá que, al acoplar ácido glucónico a R-quitosano, también es posible que una pequeña cantidad de ácido glucónico pueda formar un enlace covalente con el grupo amina de arginina a través del mismo mecanismo, aunque es probable que la reacción de sustitución nucleofílica ocurrirá predominantemente con el grupo amina del esqueleto de quitosano. Como tal, en ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> de fórmula I también se puede seleccionar independientemente entre hidrógeno, acetilo, fórmula (II), fórmula (III) y fórmula (IV).



Boc-R-quitosano, de-Boc-R-quitosano, gluco-quitosano y/o quitosano derivado dualmente se puede purificar vía precipitación, o tratamiento en columna, o diálisis regular, o diálisis de flujo inverso contra agua Milli-Q usando un tubo de diálisis de celulosa de corte de peso molecular apropiado (MWCO), o a través de cartuchos de diafiltración y de filtración de flujo tangencial (TFF).

De acuerdo con lo anterior, "quitosano derivado dualmente" o "quitosano DD" también se refiere al quitosano que ha sido dualmente funcionalizado ("quitosano dualmente funcionalizado" o "DF-quitosano), por ejemplo, acoplado tanto con arginina como con ácido glucónico, ambos de los cuales están unidos covalentemente al quitosano. La arginina se puede unir covalentemente al quitosano ya sea como aminoácido único o como un polipéptido.

Como se usa en este documento, a menos que se indique otra cosa, el término "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente.

El término "polipéptido" se usa en su sentido más amplio para referirse a polipéptidos convencionales (esto es, polipéptidos cortos que contienen L o D-aminoácidos), así como equivalentes peptídicos, análogos peptídicos y peptidomiméticos que retienen la actividad funcional deseada. Los equivalentes peptídicos pueden diferir de los péptidos convencionales por la sustitución de uno o más aminoácidos con ácidos orgánicos relacionados, aminoácidos o similares, o la sustitución o modificación de cadenas laterales o grupos funcionales.

Los peptidomiméticos pueden tener uno o más enlaces peptídicos sustituidos por un enlace alternativo, como es conocido en la técnica. Las porciones o la totalidad del esqueleto peptídico también se pueden reemplazar por sustituyentes alquilo o arilo cíclicos conformacionalmente restringidos para restringir la movilidad de las cadenas laterales de aminoácidos funcionales, como se conoce en la técnica.

Los polipéptidos de esta divulgación se pueden reproducir por métodos reconocidos, tales como métodos recombinantes y sintéticos que son bien conocidos en la técnica. Las técnicas para la síntesis de péptidos son bien conocidas e incluyen las descritas en Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2456 (1963), Atherton, et al., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press (1989), y Merrifield, Science 232:341-347 (1986).

5 Como se usa en este documento, "polipéptido lineal" se refiere a un polipéptido que carece de grupos ramificados unidos covalentemente a sus cadenas laterales de aminoácidos constituyentes. Como se usa en este documento, "polipéptido ramificado" se refiere a un polipéptido que comprende grupos ramificados unidos covalentemente a sus cadenas laterales de aminoácidos constituyentes.

10 Como se usa en este documento, el término "aminoácido" incluye aminoácidos de origen natural, así como aminoácidos de origen no natural tales como análogos de aminoácidos. El término aminoácido se refiere a aminoácidos (D) o (L) de origen natural, aminoácidos modificados químicamente, aminoácidos de origen natural tales como norleucina y compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica como características de un aminoácido.

Los residuos de aminoácidos en péptidos se abrevian como es estándar en la técnica.

15 En algunas realizaciones, cuando sea apropiado, el quitosano DD incluye derivados de quitosano DD, por ejemplo, quitosano DD que incorporan una funcionalización adicional, por ejemplo, quitosano DD con un ligando unido. Se entenderá que "derivados" incluye la categoría amplia de polímeros basados en quitosano que comprenden unidades de N-acetil-D-glucosamina modificadas covalentemente y/o unidades de D-glucosamina, así como polímeros a base de quitosano que incorporan otras unidades o se unen a otras unidades estructurales. Los derivados se basan  
20 frecuentemente en una modificación del grupo hidroxilo o del grupo amina de glucosamina, tal como se hace con quitosano funcionalizado con arginina. Ejemplos de derivados de quitosano incluyen, pero no se limitan a, quitosano trimetilado, quitosano PEGilado, quitosano tiolado, quitosano galactosilado, quitosano alquilado, quitosano incorporado en PEI, quitosano modificado con ácido urónico, glicol quitosano y similares. Para más información sobre los derivados de quitosano, véase, por ejemplo, pp.63-74 de "Non-viral Gene Therapy", K. Taira, K. Kataoka, T. Niidome (editors), Springer-Verlag Tokyo, 2005, ISBN 4-431-25122-7; Zhu et al., Chinese Science Bulletin, December 2007, vol. 52 (23), pp. 3207-3215; y Varma et al., Carbohydrate Polymers 55 (2004) 77-93.

Los sistemas dispersos consisten en materia en partículas, conocida como fase dispersa, distribuida a través de un medio continuo. Una "dispersión" de polyplex de ácido nucleico quitosano DD es una composición que comprende polyplexos de ácido nucleico quitosano DD hidratado, en los que se distribuyen polyplexos en todo el medio.

30 Como se usa en este documento, una dispersión "preconcentrada" es aquella que no ha sufrido el procedimiento de concentración para formar una dispersión concentrada.

Como se usa en este documento, "sustancialmente libre" de precipitado de polyplex significa que la composición está esencialmente exenta de partículas que se pueden observar en inspección visual.

Como se usa en este documento, el pH fisiológico se refiere a un pH entre 6 y 8.

35 Por "polyplex de ácido nucleico quitosano DD" o sus equivalentes gramaticales se entiende un complejo que comprende una pluralidad de moléculas de quitosano DD y una pluralidad de moléculas de ácido nucleico. En una realización preferida, el quitosano derivado dualmente forma un complejo con dicho ácido nucleico.

40 Los polyplexos de ácido nucleico quitosano DD comprenden un componente de ácido nucleico y un componente de quitosano DD. El quitosano y los polyplexos de ácido nucleico quitosano DD se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las concentraciones funcionalizadas de materia prima de quitosano y nucleótido se pueden ajustar para acomodar diversas proporciones de amina-fosfato (N/P), proporciones de mezcla y concentraciones de nucleótidos diana. En algunas realizaciones, particularmente lotes pequeños, por ejemplo, lotes de menos de 2 mL, las materias primas funcionalizadas de quitosano y nucleótido se pueden mezclar por goteo lento de la materia prima de nucleótido en la materia prima de quitosano funcionalizado mientras se agita en vórtex el recipiente. En otras  
45 realizaciones, las materias primas funcionalizadas de quitosano y nucleótido se pueden mezclar mezclando en línea las dos corrientes de fluido. En otras realizaciones, la dispersión de polyplex resultante se puede concentrar mediante TFF. En el documento WO2009/039657 se describe un procedimiento preferido para la formación de polyplex.

50 Un ácido nucleico de la presente divulgación contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener esqueletos alternos u otras modificaciones o unidades estructurales incorporados para cualquiera de una variedad de propósitos, por ejemplo, estabilidad y protección. Otros ácidos nucleicos análogos contemplados incluyen aquellos con estructuras no ribosas. Además, se pueden preparar mezclas de ácidos nucleicos de origen natural, análogos y ambos. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios o contener porciones de ambas secuencias bicatenarias o monocatenarias. Los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, ADN, ARN e híbridos en los que el ácido nucleico contiene cualquier combinación de desoxirribo- y  
55 ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc. Los ácidos nucleicos incluyen ADN en cualquier forma, ARN en cualquier forma, incluyendo triplex, dúplex o monocatenario, antisentido, ARNip, ribozimas, desoxirribosimas,



polinucleótidos, oligonucleótidos, quimeras, microARN y derivados de los mismos. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos artificiales, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, ácido nucleico peptídico (PNA), oligo morfolino fosforodiamidato (PMO), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido glicólico nucleótido (GNA) y ácido nucleico treosa (TNA).

5 En una realización, el componente de ácido nucleico comprende un ácido nucleico terapéutico. Los polyplexos de ácido nucleico quitosano DD sujetos son susceptibles al uso de cualquier ácido nucleico terapéutico conocido en la técnica. Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen ARN terapéuticos, que son moléculas de ARN capaces de ejercer un efecto terapéutico en una célula de mamífero. Los ARN terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, ARN antisentido, ARNip, ARN de horquilla corta, micro ARN y ARN enzimáticos. Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos destinados a formar moléculas triplex, ácidos nucleicos de unión a proteínas, ribozimas, desoxiribozimas, y moléculas de nucleótidos pequeños.

10 En la técnica se conocen muchos tipos de ARN terapéuticos. Por ejemplo, véase Grimm et al., Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? J. Clin. Invest., 117:3633-3641, 2007; Aagaard et al., RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges, Adv. Drug Deliv. Rev., 59:75-86, 2007; Dorsett et al., siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics, Nat. Rev. Drug Discov., 3:318-329, 2004. Éstos incluyen ARN de interferencia corto de doble hebra (ARNip).

Los ácidos nucleicos terapéuticos también incluyen ácidos nucleicos que codifican proteínas terapéuticas, incluyendo proteínas citotóxicas y profármacos.

20 En una realización preferida, el componente de ácido nucleico comprende una construcción de ácido nucleico terapéutico. La construcción de ácido nucleico terapéutico es una construcción de ácido nucleico capaz de ejercer un efecto terapéutico. Las construcciones de ácido nucleico terapéuticas pueden comprender ácidos nucleicos que codifican proteínas terapéuticas, así como ácidos nucleicos que producen transcritos que son ARN terapéuticos. Se puede usar un ácido nucleico terapéutico para efectuar la terapia genética sirviendo como un reemplazo o mejora para un gen defectuoso o para compensar la falta de un producto génico particular, codificando un producto terapéutico. Un ácido nucleico terapéutico también puede inhibir la expresión de un gen endógeno. Un ácido nucleico terapéutico puede codificar la totalidad o una parte de un producto de traducción, y puede funcionar recombinando con ADN ya presente en una célula, reemplazando así una porción defectuosa de un gen. También puede codificar una porción de una proteína y ejercer su efecto en virtud de la cosupresión de un producto génico. En una realización preferida, el ácido nucleico terapéutico se selecciona entre los descritos en el documento U.S.S.N. 11/694852.

30 En una realización preferida, el ácido nucleico terapéutico codifica una proteína terapéutica que se selecciona del grupo que consiste en hormonas, enzimas, citocinas, quimiocinas, anticuerpos, factores mitogénicos, factores de crecimiento, factores de diferenciación, factores que influyen en la angiogénesis, factores que influyen en la formación de coágulos de sangre, factores que influyen en los niveles de glucosa en sangre, factores que influyen en el metabolismo de la glucosa, factores que influyen en el metabolismo de los lípidos, factores que influyen en los niveles de colesterol en la sangre, factores que influyen en los niveles de LDL o HDL en sangre, factores que influyen en la apoptosis celular, factores que influyen en la ingesta de alimentos, factores que influyen en el gasto energético, factores que influyen en el apetito, factores que influyen en la absorción de nutrientes, factores que influyen en la inflamación, y factores que influyen en la formación ósea. Son particularmente preferidos los ácidos nucleicos terapéuticos que codifican insulina, leptina, antagonista de glucagón, GLP-1, GLP-2, ghrelina, colecistoquinina, hormona del crecimiento, factores de coagulación, PYY, eritropoyetina, inhibidores de la inflamación, IL-10, antagonistas de IL-17, antagonistas de TNF $\alpha$ , hormona liberadora de la hormona del crecimiento, u hormona paratiroidea.

#### Regiones de control de expresión

45 En una realización preferida, un polyplex de la invención comprende un ácido nucleico terapéutico, que es una construcción terapéutica, que comprende una región de control de la expresión unida operativamente a una región codificante. La construcción terapéutica produce ácido nucleico terapéutico, que puede ser terapéutico por sí solo, o puede codificar una proteína terapéutica.

50 En algunas realizaciones, la región de control de expresión de una construcción terapéutica posee actividad constitutiva. En una serie de realizaciones preferidas, la región de control de expresión de una construcción terapéutica no tiene actividad constitutiva. Esto proporciona la expresión dinámica de un ácido nucleico terapéutico. Por expresión "dinámica" se entiende la expresión que cambia con el tiempo. La expresión dinámica puede incluir varios de tales períodos de expresión baja o ausente separados por períodos de expresión detectable. En un número de realizaciones preferidas, el ácido nucleico terapéutico está unido operativamente a un promotor regulable. Esto proporciona la expresión regulable de ácidos nucleicos terapéuticos.

55 Las regiones de control de expresión comprenden polinucleótidos reguladores (a veces referidos en este documento como elementos), tales como promotores y potenciadores, que influyen en la expresión de un ácido nucleico terapéutico unido operativamente.

Los elementos de control de expresión incluidos en este documento pueden ser de bacterias, levaduras, plantas o animales (mamíferos o no mamíferos). Las regiones de control de expresión incluyen secuencias promotoras de

longitud completa, tales como promotores nativos y elementos potenciadores, así como subsecuencias o variantes de polinucleótidos que retienen toda o parte de la función de longitud completa o no variante (por ejemplo, conservan cierta cantidad de regulación de nutrientes o expresión específica de tejido/células). Como se usa en este documento, el término "funcional" y sus variantes gramaticales, cuando se usa en referencia a una secuencia, subsecuencia o fragmento de ácido nucleico, significa que la secuencia tiene una o más funciones de la secuencia de ácido nucleico nativa (por ejemplo, secuencia no variante o no modificada). Como se usa en este documento, el término "variante" significa una sustitución, supresión o adición de secuencia, u otra modificación (por ejemplo, derivados químicos tales como formas modificadas resistentes a nucleasas).

Como se usa en este documento, el término "enlace operable" se refiere a una yuxtaposición física de los componentes descritos de tal modo que permitan que funcionen de la manera prevista. En el ejemplo de un elemento de control de expresión en enlace operable con un ácido nucleico, la relación es tal que el elemento de control modula la expresión del ácido nucleico. Por lo general, una región de control de expresión que modula la transcripción se yuxtapone cerca del extremo 5' del ácido nucleico transcrito (esto es, "en dirección 5'"). Las regiones de control de expresión también se pueden situar en el extremo 3' de la secuencia transcrita (esto es, "en dirección 3'") o dentro del transcrito (por ejemplo, en un intrón). Los elementos de control de expresión se pueden situar a una distancia lejos de la secuencia transcrita (por ejemplo, 100 a 500, 500 a 1000, 2000 a 5000, o más nucleótidos del ácido nucleico). Un ejemplo específico de un elemento de control de expresión es un promotor, que se sitúa normalmente en 5' de la secuencia transcrita. Otro ejemplo de un elemento de control de expresión es un potenciador, que puede situarse 5' o 3' de la secuencia transcrita, o dentro de la secuencia transcrita.

Algunas regiones de control de expresión confieren una expresión regulable a un ácido nucleico terapéuticamente unido operativamente. Una señal (a veces denominada estímulo) puede aumentar o disminuir la expresión de un ácido nucleico terapéutico unido operativamente a dicha región de control de expresión. Tales regiones de control de expresión que aumentan la expresión en respuesta a una señal a menudo se denominan como inducibles. Tales regiones de control de expresión que disminuyen la expresión en respuesta a una señal a menudo se denominan como reprimibles. Por lo general, la cantidad de aumento o disminución conferida por tales elementos es proporcional a la cantidad de señal presente; cuanto mayor sea la cantidad de señal, mayor será el aumento o disminución de la expresión.

En la técnica se conocen numerosos promotores regulables. Las regiones de control de expresión inducibles preferidas incluyen aquellas que comprenden un promotor inducible que se estimula con un compuesto químico de pequeña molécula. En una realización, una región de control de expresión responde a un producto químico que es administrado por vía oral pero que normalmente no se encuentra en el alimento. Ejemplos particulares se pueden encontrar, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nos. 5,989,910; 5,935,934; 6,015,709; y 6,004,941.

En una realización, la construcción terapéutica comprende además una secuencia de integración. En una realización, la construcción terapéutica comprende una única secuencia de integración. En otra realización, la construcción terapéutica comprende una primera y una segunda secuencias de integración para integrar el ácido nucleico terapéutico o una parte del mismo en el genoma de una célula diana. En una realización preferida, la secuencia o secuencias de integración son funcionales en combinación con un medio de integración que se selecciona del grupo que consiste en "Mariner", "Sleeping Beauty", FLP, Cre, ΦC31, R, lambda, y medios para integración de virus integradores tales como AAV, retrovirus, y lentivirus.

En una realización, la presente composición comprende además una construcción no terapéutica además de una construcción terapéutica, en la que la construcción no terapéutica comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un medio para la integración unida operativamente a una segunda región de control de expresión. Esta segunda región de control de expresión y la región de control de expresión unida operativamente al ácido nucleico terapéutico pueden ser iguales o diferentes. Los medios codificados para la integración se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en "Mariner", "Sleeping Beauty", FLP, Cre, ΦC31, R, lambda, y medios para integración de virus integradores tales como AAV, retrovirus y lentivirus.

Para una enseñanza adicional, véase el documento WO200802031 8. En una realización, el ácido nucleico del polyplex de ácido nucleico quitosano DD es un ácido nucleico artificial.

Los ácidos nucleicos artificiales preferidos incluyen, pero no se limitan a, ácido nucleico peptídico (PNA), oligo morfolino fosforodiamidato (PMO), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico glicólico (GNA) y ácido nucleico treosa (TNA).

En una realización, el ácido nucleico del polyplex de ácido nucleico quitosano DD es un ácido nucleico terapéutico. En una realización, el ácido nucleico terapéutico es un ARN terapéutico. Los ARN terapéuticos preferidos incluyen, pero no se limitan a, ARN antisentido, ARNip, ARN de horquilla corta, micro ARN y ARN enzimático.

En una realización, el ácido nucleico terapéutico es ADN.

En una realización, el ácido nucleico terapéutico comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica.

Polyplexos

- 5 En una realización preferida, los polyplexos de las composiciones comprenden moléculas de quitosano que tienen un peso molecular promedio de menos de 110 kDa, más preferiblemente menos de 65 kDa, más preferiblemente menos de 50 kDa, más preferiblemente menos de 40 kDa, y lo más preferiblemente menos de 30 kDa antes de la funcionalización. En algunas realizaciones, los polyplexos de las composiciones comprenden quitosano que tiene un peso molecular promedio de menos de 15 kDa, menos de 10 kDa, menos de 7 kDa, o menos de 5 kDa antes de la funcionalización.
- 10 En una realización preferida, los polyplexos comprenden moléculas de quitosano que tienen en promedio menos de 680 unidades de monómero de glucosamina, más preferiblemente menos de 400 unidades de monómero de glucosamina, más preferiblemente menos de 310 unidades de monómero de glucosamina, más preferiblemente menos de 250 unidades de monómero de glucosamina, y lo más preferiblemente menos de 190 unidades de monómero de glucosamina. En algunas realizaciones, los polyplexos comprenden moléculas de quitosano que tienen en promedio menos de 95 unidades de monómero de glucosamina, menos de 65 unidades de monómero de glucosamina, menos de 45 unidades de monómero de glucosamina, o menos de 35 unidades de monómero de glucosamina.
- 15 En una realización preferida, los polyplexos objeto tienen una proporción de amina a fosfato (N/P) de 2 a 100, por ejemplo, 2 a 50, por ejemplo, 2 a 40, por ejemplo, 2 a 30, por ejemplo, 2 a 20, por ejemplo, 2 a 5. Preferiblemente, la proporción N/P es inversamente proporcional al peso molecular del quitosano, esto es, un quitosano DD de menor peso molecular requiere una proporción N/P más alta y viceversa.
- 20 En una realización preferida, los polyplexos objeto tienen un diámetro hidrodinámico promedio de menos de 1000 nm, más preferiblemente menos de 500 nm y lo más preferiblemente menos de 200 nm.
- En una realización, los polyplexos de ácido nucleico quitosano DD tienen un potencial zeta promedio de al menos 0 mV a un pH ácido, por ejemplo, un pH por debajo de 7, lo más preferiblemente un pH entre aproximadamente 4 y 6.
- En una realización, los polyplexos de ácido nucleico quitosano DD tienen un potencial zeta promedio entre +1 y +60 mV, más preferiblemente +1 y +40 mV, más preferentemente +1 y +30 mV a un pH ácido.
- 25 En una realización preferida, el polipéptido tiene una carga neta positiva, neutra o neta negativa baja a pH fisiológico y un pKa por debajo de 6. Tales polyplexos de ácido nucleico quitosano DD presentan una toxicidad celular reducida y una liberación intracelular mejorada de ácido nucleico.
- 30 Los polyplexos de ácido nucleico quitosano DD de la composición son preferiblemente homogéneos con respecto al tamaño de polyplex. De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida, la composición tiene un índice de polidispersidad promedio bajo ("PDI"). En una realización especialmente preferida, la dispersión de polyplex de ácido nucleico quitosano DD tiene un PDI de menos de 0.5, más preferiblemente menor de 0.4, más preferiblemente menos de 0.3, y lo más preferiblemente menos de 0.25.
- 35 Los polyplexos de las presentes composiciones son preferiblemente de un tamaño sustancialmente estable en la composición. En una realización preferida, una composición de la invención comprende polyplexos que aumentan en diámetro promedio en menos de 100%, más preferiblemente menos de 50%, y lo más preferiblemente menos de 25%, a temperatura ambiente durante 6 horas, más preferiblemente 12 horas, más preferiblemente 24 horas, y lo más preferiblemente 48 horas.
- 40 Los polyplexos de las presentes composiciones son preferiblemente de tamaño sustancialmente estable bajo condiciones frías. En una realización preferida, una composición de la invención comprende polyplexos que aumentan en diámetro promedio en menos de 100%, más preferiblemente menos de 50%, y lo más preferiblemente menos de 25%, a 2-8 grados Celsius durante 6 horas, más preferiblemente 12 horas, más preferiblemente 24 horas, y lo más preferiblemente 48 horas.
- 45 Los polyplexos de las presentes composiciones son preferiblemente sustancialmente estables en condiciones de congelación-descongelación. En una realización preferida, una composición de la invención comprende polyplexos que aumentan en diámetro promedio en menos de 100%, más preferiblemente menos de 50%, y lo más preferiblemente menos de 25% a temperatura ambiente durante 6 horas, más preferiblemente 12 horas, más preferiblemente 24 horas, y lo más preferiblemente 48 horas después del descongelamiento del congelado a -20 a -80 grados Celsius.
- 50 En una realización preferida, la composición tiene una concentración de ácido nucleico superior a 0.5 mg/ml, y está sustancialmente exenta de polyplex precipitado. Más preferiblemente, la composición tiene una concentración de ácido nucleico de al menos 0.6 mg/ml, más preferiblemente al menos 0.75 mg/ml, más preferiblemente al menos 1.0 mg/ml, más preferiblemente al menos 1.2 mg/ml y lo más preferiblemente al menos 1.5 mg/ml, y está sustancialmente exenta de polyplex precipitado. Las composiciones se hidratan. En una realización preferida, la composición está sustancialmente exenta de ácido nucleico no complejo.
- 55 En una realización preferida, la composición de polyplex de ácido nucleico quitosano DD es isotónica. El logro de la isotonicidad, mientras que se mantiene la estabilidad del polyplex, es altamente deseable en la formulación de composiciones farmacéuticas, y estas composiciones preferidas son bien apropiadas para la formulación farmacéutica y aplicaciones terapéuticas.

Generalmente, las composiciones que comprenden los polyplexos de ácido nucleico quitosano DD se usan para contactar con una célula diana. Dicho contacto generalmente da lugar a la liberación del ácido nucleico para su expresión por la célula diana. Las composiciones apropiadas para los polyplexos de ácido nucleico quitosano DD descritos en este documento son bien conocidas en la técnica y generalmente se describen a continuación.

## 5 Formulaciones en Polvo

Las composiciones de polyplex de ácido nucleico quitosano DD de la invención incluyen polvos. En una realización preferida, la invención proporciona una composición de polyplex de ácido nucleico quitosano DD en polvo seco. En una realización preferida, la composición de polyplex de ácido nucleico quitosano DD en polvo seco se produce a través de la deshidratación de una dispersión de polyplex de ácido nucleico quitosano de la invención.

## 10 Formulaciones farmacéuticas

La presente invención también proporciona formulaciones "farmacéuticamente aceptables" o "fisiológicamente aceptables" que comprenden composiciones de polyplex de ácido nucleico quitosano DD de la invención. Tales formulaciones se pueden administrar in vivo a un sujeto con el fin de practicar métodos de tratamiento.

15 Como se usa en este documento, los términos "farmacéuticamente aceptables" y "fisiológicamente aceptables" se refieren a portadores, diluyentes, excipientes y similares que se pueden administrar a un sujeto, preferiblemente sin producir efectos secundarios adversos excesivos (por ejemplo, náuseas, dolor abdominal, dolores de cabeza, etc.). Tales preparaciones para administración incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles.

20 Las formulaciones farmacéuticas se pueden preparar a partir de portadores, diluyentes, excipientes, solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, compatibles con la administración a un sujeto. Tales formulaciones pueden estar contenidas en un comprimido (recubierto o no revestido), cápsula (dura o blanda), microperlas, emulsión, polvo, gránulo, cristal, suspensión, jarabe o elixir. También pueden estar presentes compuestos activos suplementarios y conservantes, entre otros aditivos, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

25 Los excipientes pueden incluir una sal, un agente isotónico, una proteína de suero, una solución reguladora u otro agente de control del pH, un antioxidante, un espesante, un polímero no cargado, un conservante o un crioprotector. Los excipientes usados en las composiciones de la invención pueden incluir además un agente isotónico y una solución reguladora u otro agente de control del pH. Estos excipientes se pueden adicionar para el logro de rangos preferidos de pH (aproximadamente 6.0-8.0) y osmolaridad (aproximadamente 50-300 mmol/L). Ejemplos de soluciones reguladoras apropiadas son acetato, borato, carbonato, citrato, fosfato y solución reguladora de molécula orgánica sulfonada. Tales soluciones reguladoras pueden estar presentes en una composición en concentraciones desde 0.01 a 1.0% (p/v). Un agente isotónico se puede seleccionar entre cualquiera de los conocidos en la técnica, por ejemplo, manitol, dextrosa, glucosa y cloruro de sodio u otros electrolitos. Preferiblemente, el agente isotónico es glucosa o cloruro de sodio. Los agentes isotónicos se pueden usar en cantidades que imparten a la composición la misma o una presión osmótica similar a la del entorno biológico en el que se introduce. La concentración de agente isotónico en la composición dependerá de la naturaleza del agente isotónico particular usado y puede variar desde aproximadamente 0.1 a 10%. Cuando se usa glucosa, se usa preferiblemente en una concentración desde 1 a 5% p/v, más particularmente 5% p/v. Cuando el agente isotónico es cloruro de sodio, se emplea preferiblemente en cantidades de hasta 1% p/v, en particular 0.9% p/v. Las composiciones de la invención pueden contener además un conservante. Ejemplos de conservantes son polihexametileno-biguanidina, cloruro de benzalconio, complejos oxiclora estabilizados (tales como los conocidos como PuriteR), acetato fenilmercurio, clorobutanol, ácido sórbico, clorhexidina, alcohol bencílico, parabenos y timerosal. Por lo general, dichos conservantes están presentes en concentraciones desde aproximadamente 0.001 a 1.0%. Además, las composiciones de la invención también pueden contener un agente crioconservador. Los crioconservadores preferidos son glucosa, sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, sorbitol, dióxido de silicio coloidal, dextrano de peso molecular preferiblemente de menos de 100,000 g/mol, glicerol y polietilenglicoles de pesos moleculares inferiores a 100,000 g/mol o mezclas de los mismos. Más preferidos son glucosa, trehalosa y polietilenglicol. Por lo general, tales crioconservantes están presentes en concentraciones desde aproximadamente 0.01 a 10%.

50 Una formulación farmacéutica se puede formular para ser compatible con su ruta de administración deseada. Por ejemplo, para administración oral, se puede incorporar una composición con excipientes y usarla en forma de comprimidos, trociscos, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina o recubrimientos, por ejemplo, revestimientos entéricos (Eudragit® o Sureteric®). Se pueden incluir agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes en formulaciones orales. Los comprimidos, pastillas, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante.

Las formulaciones también pueden incluir portadores para proteger la composición frente a la rápida degradación o eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de

administración microencapsulados. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo solo, o en combinación con una cera.

5 También se contemplan los supositorios y otras formulaciones administrables por vía rectal (por ejemplo, las que se pueden administrar mediante enema). Además, con respecto a la administración rectal, véase, por ejemplo, Song et al., *Mucosal drug delivery: membranes, methodologies, and applications*, Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst., 21:195-256, 2004; Wearley, *Recent progress in protein and peptide delivery by noninvasive routes*, Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst., 8:331-394, 1991.

10 Las formulaciones farmacéuticas adicionales apropiadas para la administración son conocidas en la técnica y son aplicables en los métodos y composiciones de la invención (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa.; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, N.J.; y Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993)).

#### Administración

15 En una realización, el uso de quitosano DD en polyplexos de ácido nucleico quitosano DD proporciona una estabilidad prolongada de polyplexos a pH fisiológico. Esto proporciona una administración sistémica eficaz, así como otros modos de administración.

Cualquiera de un número de rutas de administración es posible y la elección de una ruta particular dependerá en parte del tejido diana. Se pueden utilizar jeringas, endoscopios, cánulas, tubos de intubación, catéteres y otros artículos para la administración.

20 Las dosis o "cantidad eficaz" para tratar un sujeto son preferiblemente suficientes para mejorar uno, varios o todos los síntomas del estado, hasta un grado medible o detectable, aunque la prevención o inhibición de una progresión o empeoramiento del trastorno o afección, o un síntoma, es un resultado satisfactorio. De este modo, en el caso de una afección o trastorno tratable mediante la expresión de un ácido nucleico terapéutico en el tejido diana, la cantidad de ARN terapéutico o proteína terapéutica producida para mejorar una afección tratable por un método de la invención  
25 dependerá de la condición y el resultado deseado y puede ser fácilmente comprobado por el experto. Las cantidades apropiadas dependerán de la afección tratada, del efecto terapéutico deseado, así como del sujeto individual (por ejemplo, la biodisponibilidad dentro del sujeto, género, edad, etc.). La cantidad eficaz se puede determinar midiendo los efectos fisiológicos relevantes.

30 Las aplicaciones veterinarias también se contemplan en la presente invención. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la invención proporciona métodos para tratar mamíferos no humanos, que implican administrar una nanopartícula basada en quitosano de la invención a un mamífero no humano que necesita tratamiento.

#### Administración parenteral

35 Los compuestos de la invención se pueden administrar directamente en el torrente sanguíneo, en el músculo o en un órgano interno. Los medios apropiados para la administración parenteral incluyen administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular y subcutánea. Los dispositivos apropiados para administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microaguja), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

40 Las formulaciones parenterales son por lo general soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes reguladores, pero, para algunas aplicaciones, se pueden formular más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para ser usada en conjunto con un vehículo apropiado tal como agua estéril, libre de pirógenos.

La preparación de formulaciones parenterales bajo condiciones estériles, por ejemplo, mediante liofilización, se puede realizar fácilmente usando técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas para los expertos en el arte.

45 La solubilidad de los compuestos utilizados en la preparación de soluciones parenterales se puede incrementar mediante el uso de técnicas de formulación apropiadas, tales como la incorporación de agentes potenciadores de la solubilidad.

50 Las formulaciones para administración parenteral se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada. De este modo, los compuestos de la invención se pueden formular como un sólido, semisólido o líquido tixotrópico para administración como un depósito implantado que proporciona una liberación modificada del compuesto activo.

#### Administración oral

Las presentes composiciones se pueden administrar por vía oral. La administración oral puede incluir deglución, de modo que el compuesto entre en el tracto gastrointestinal. Las composiciones de la invención también se pueden administrar directamente al tracto gastrointestinal.

5 Las formulaciones apropiadas para la administración oral incluyen formulaciones sólidas tales como comprimidos, cápsulas, cápsulas recubiertas que contienen partículas o partículas recubiertas, líquidos, o polvos, comprimidos para deshacer en la boca (incluyendo rellenas de líquido), chicles, nanopartículas multibanda, geles, películas, óvulos, y vaporizadores.

Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, soluciones, jarabes y elixires. Las formulaciones líquidas se pueden preparar mediante la reconstitución de un sólido.

10 Las formas de dosificación de comprimidos contienen generalmente un desintegrante. Los ejemplos de disgregantes incluyen glicolato sódico de almidón, carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa de calcio, croscarmelosa de sodio, crospovidona, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropilcelulosa sustituida con alquilo inferior, almidón, almidón pregelatinizado y alginato de sodio. Generalmente, el desintegrante comprenderá desde 1% en peso a 25% en peso, preferiblemente de 5% en peso a 20% en peso de la forma de dosificación.

15 Los aglutinantes se utilizan generalmente para impartir cualidades cohesivas a una formulación de comprimido. Los aglutinantes apropiados incluyen celulosa microcristalina, gelatina, azúcares, polietilenglicol, gomas naturales y sintéticas, polivinilpirrolidona, almidón pregelatinizado, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Los comprimidos también pueden contener diluyentes, tales como lactosa (monohidrato, monohidrato secado por pulverización, anhidra y similares), manitol, xilitol, dextrosa, sacarosa, sorbitol, celulosa microcristalina, almidón y dihidrato de fosfato de calcio dibásico.

Los comprimidos también pueden comprender opcionalmente agentes con actividad de superficie, tales como laurilsulfato de sodio y polisorbato 80, y agentes deslizantes tales como dióxido de silicio y talco. Cuando están presentes, los agentes con actividad de superficie pueden comprender desde 0.2% en peso al 5% en peso del comprimido, y los agentes deslizantes pueden comprender desde 0.2% en peso al 1% en peso del comprimido.

25 Los comprimidos también contienen generalmente lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, estearil fumarato de sodio, y mezclas de estearato de magnesio con laurilsulfato de sodio. Los lubricantes comprenden generalmente desde 0.25% en peso al 10% en peso, preferiblemente desde 0.5% en peso al 3% en peso del comprimido.

30 Otros posibles ingredientes incluyen antioxidantes, colorantes, agentes aromatizantes, conservantes y agentes enmascaradores del sabor.

Las mezclas de comprimidos se pueden comprimir directamente o mediante rodillos para formar comprimidos. Las mezclas de comprimidos o porciones de mezclas pueden alternativamente ser granuladas en húmedo, en seco o en estado fundido, congeladas en estado fundido o extruidas antes de comprimir. La formulación final puede comprender una o más capas y puede estar recubierta o no recubierta; incluso puede ser encapsulada.

35 La formulación de comprimidos se describe en Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 1, de H. Lieberman and L. Lachman (Marcel Dekker, Nueva York, 1980).

40 Las películas orales consumibles para uso humano o veterinario son por lo general flexibles formas de dosificación de película delgada hinchables en agua o soluble en agua, que pueden ser de disolución rápida o mucoadhesivas y comprenden por lo general un polímero formador de película, un aglutinante, un solvente, un humectante, un plastificante, un estabilizante o emulsionante, un agente modificador de la viscosidad y un solvente. Algunos componentes de la formulación pueden realizar más de una función.

También se incluyen en la invención perlas de multipartículas que comprenden una composición de la invención.

45 Otros ingredientes posibles incluyen antioxidantes, colorantes, aromatizantes y potenciadores del sabor, conservantes, agentes salivales estimulante, agentes de enfriamiento, cosolventes (incluyendo aceites), emolientes, agentes de carga, agentes antiespumantes, surfactantes y agentes de enmascaramiento del sabor.

Las películas de acuerdo con la invención se preparan por lo general mediante secado por evaporación de películas acuosas delgadas recubiertas sobre un soporte de respaldo pelable o papel. Esto se puede hacer en un horno o túnel de secado, por lo general un secador de recubrimiento combinado, o por liofilización o aspiración.

50 Las formulaciones sólidas para administración oral se pueden formular para ser liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Se conocen otras tecnologías de liberación apropiadas tales como dispersiones de alta energía y partículas osmóticas y recubiertas.

Administración tópica

5 Los compuestos de la invención también se pueden administrar por vía tópica a la piel o mucosa, es decir, dérmica o transdérmicamente. Las formulaciones típicas para este propósito incluyen geles, hidrogeles, lociones, soluciones, cremas, ungüentos, polvos para material de polvo, apósitos, espumas, películas, parches para la piel, obleas, implantes, esponjas, fibras, vendajes y microemulsiones.

Otros medios de administración tópica incluyen la administración por electroporación, iontoforesis, fonoforesis, sonoforesis y microaguja o inyección sin aguja (por ejemplo, Powderject™, Bioject™, etc.).

10 Las formulaciones para administración tópica se pueden formular para ser liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Administración por inhalación/intranasal

15 Los compuestos de la invención también se pueden administrar intranasalmente o por inhalación, por lo general en forma de un polvo seco (ya sea solo, como una mezcla, por ejemplo, en una mezcla seca con lactosa, o como partícula de componente mixta) desde un inhalador de polvo seco o como un aerosol pulverizado desde un recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor apropiado.

Las cápsulas, ampollas y cartuchos para uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para contener una mezcla en polvo del compuesto de la invención, una base en polvo apropiada tal como lactosa o almidón y un modificador de rendimiento tal como l-leucina, manitol, o estearato de magnesio.

20 Las formulaciones para administración inhalada/intranasal se pueden formular para liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Administración rectal/intravaginal

25 Los compuestos de la invención se pueden administrar por vía rectal o vaginal, por ejemplo, en forma de un supositorio, un pesario o un enema. La manteca de cacao es una base de supositorio tradicional, pero se pueden usar diversas alternativas según sea apropiado.

Las formulaciones para administración rectal/vaginal se pueden formular para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Administración ocular/auditiva

30 Los compuestos de la invención también se pueden administrar directamente al ojo o al oído, por lo general en forma de gotas. Otras formulaciones apropiadas para la administración ocular y aural incluyen ungüentos, implantes biodegradables (por ejemplo, esponjas de gel absorbibles, colágeno) y no biodegradables (por ejemplo, silicona), obleas, lentes y sistemas de partículas. Las formulaciones también se pueden administrar por iontoforesis.

35 Las formulaciones para la administración ocular/auricular se pueden formular para ser de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida o programada.

Métodos de uso

40 En una realización, las composiciones de polyplex de ácido nucleico quitosano DD de la invención se pueden usar para tratamiento terapéutico. Tales composiciones se denominan a veces en este documento como composiciones terapéuticas.

Las proteínas terapéuticas de la invención, como se discute más adelante, se producen mediante polyplexos de la invención que comprenden ácidos nucleicos terapéuticos. El uso de las proteínas objeto como se describe a continuación se refiere al uso de los polyplexos objeto para efectuar dicho uso de proteínas.

45 Las proteínas terapéuticas contempladas para su uso en la invención tienen una amplia variedad de actividades y encuentran uso en el tratamiento de una amplia variedad de trastornos. La siguiente descripción de las actividades de proteínas terapéuticas, e indicaciones tratables con proteínas terapéuticas de la invención, es ejemplar y no pretende ser exhaustiva. El término "sujeto" se refiere a un animal, siendo preferidos los mamíferos, siendo especialmente preferidos los seres humanos.

En la tabla 1 se muestra una lista parcial de proteínas terapéuticas y enfermedades diana.

Tabla 1.

| COMPUESTOS PRINCIPALES  | ENFERMEDAD DIANA   | FUNCIÓN   | EFEECTO TERAPÉUTICO   |
|---|--|---|---|
| Insulina  | Diabetes   | Reemplazo de insulina   | Mejora la tolerancia a la glucosa.<br><br>Retrasa/previene la diabetes. |
| Antagonistas del glucagón   | Diabetes   | Reducción producción endógena de glucosa  | Mejora la tolerancia a la glucosa.                                      |
| GLP-1   | Diabetes   | Estimula el crecimiento de las células $\beta$ , mejora la sensibilidad a la insulina, suprime el apetito | Mejora la tolerancia a la glucosa.<br><br>Induce la pérdida de peso     |
| Leptina   | Obesidad<br><br>Diabetes   | Supresión del apetito y mejora de la sensibilidad a la insulina   | Induce la pérdida de peso<br><br>Mejora la tolerancia a la glucosa.     |
| CCK   | Obesidad   | Supresión del apetito   | Induce la pérdida de peso   |
| Hormona de crecimiento (GH)   | Deficiencias de GH, debilitante y antienvjecimiento  | Sustitución de GH   | Mejora el crecimiento   |
| Factores de coagulación   | Hemofilia  | Reemplazo de los factores de coagulación  | Mejora el tiempo de coagulación   |
| Anticuerpos terapéuticos y fragmentos/porciones de anticuerpos                                      | Infecciones<br><br>Cáncer  | Neutralización de patógenos o modulaciones inmunes  | Previene infecciones o rechazos de trasplante                           |
| Inhibidores de inflamación, por ejemplo, IL-10, antagonistas de $TNF\alpha$ , antagonistas de IL-17 | Inflamación de los órganos gastrointestinales; por ejemplo, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) | Modulación inmune   | Prevenir la inflamación en el órgano gastrointestinal                   |

5 En otra realización, las composiciones terapéuticas de la invención comprenden ácidos nucleicos terapéuticos que no codifican proteínas terapéuticas, por ejemplo, ARN terapéuticos. Por ejemplo, seleccionando ARN terapéuticos que se dirigen a genes implicados en mecanismos de enfermedad y/o afecciones fisiológicas o celulares indeseables, las presentes composiciones se pueden usar en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades y afecciones. Las presentes composiciones son de tal carácter que los ARN terapéuticos utilizados no están limitados con respecto al alcance de la selección diana. De acuerdo con lo anterior, las presentes composiciones encuentran uso en cualquier enfermedad o afección que involucre un objetivo apropiado.

10 Los tejidos, enfermedades y afecciones preferidos incluyen los siguientes, que son ejemplares y no limitan en modo alguno:

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Órgano diana                    | Enfermedad diana   |
| Órganos gastrointestinales (GI) | Diabetes<br><br>Obesidad<br><br>Enfermedad inflamatoria intestinal<br><br>Síndrome del intestino irritable |



ES 2 635 990 T3

|  |   |
|--|---|
|  | <p>Infección GI</p> <p>Úlceras pépticas</p> <p>Reflujo gastroesofágico</p> <p>Gastroparesia</p> <p>Hemorroides</p> <p>Malabsorción de nutrientes</p>  |
|  | <p>Cánceres GI (cáncer colorrectal, pancreático, del estómago, del esófago, del conducto biliar, de la vesícula biliar)</p> <p>Pancreatitis</p> <p>Hemocromatosis</p> <p>Enfermedad celíaca</p> <p>Alergias a los alimentos</p> <p>Inducción de tolerancia inmune</p> |
| Ojos                                     | <p>Degeneración macular</p> <p>La degeneración macular relacionada con la edad</p> <p>Uveítis</p> <p>Retinitis pigmentosa</p> <p>Iritis</p> <p>Escleritis</p> <p>Glaucoma Keratitis</p> <p>Retinopatía</p> <p>Infección ocular (por ejemplo, queratomycosis)</p>      |
| Utero, vagina, ovario y cuello del útero | <p>Cánceres</p> <p>Infecciones</p> <p>Endometriosis</p> <p>Cervicitis</p> <p>Dolor urológico</p> <p>Pólipos</p> <p>Fibromas</p> <p>Hiperplasia endometrial</p>  |
| Vejiga y tracto urinario                 | <p>Incontinencia urinaria</p> <p>Infección de la vejiga y tracto urinario</p> <p>Vejiga hiperactiva</p> <p>Disfunción eréctil</p>   |

ES 2 635 990 T3

|                              |   |
|------------------------------|---|
|                              | Neuropatía diabética  |
| Riñón                        | Nefropatía diabética<br>Nefropatía membranosa<br>Hipertensión<br>Cáncer renal<br>Hipertensión<br>Enfermedad renal poliquística<br>Glomerulonefritis   |
| Hígado                       | Dislipidemia/hipercolesterolemia<br>Diabetes<br>Síndrome metabólico<br>Hepatoma   |
|                              | Hepatitis A/B/C<br>Hemocromatosis<br>Cirrosis<br>Esteatohepatitis<br>Enfermedades del almacenamiento de glucógeno   |
| Piel                         | Psoriasis<br>Acné<br>Rosácea<br>Dermatitis granulomatosa<br>Antiarrugas<br>Despigmentación  |
| Pulmón/Órganos respiratorios | Cáncer de pulmón<br>Enfermedad pulmonar obstructiva crónica<br>Infección del tracto respiratorio<br>Fibrosis quística<br>Enfermedades vasculares pulmonares<br>Miastenia gravis<br>Fibrosis<br>Asma |
| Cerebro                      | Enfermedad de Huntington<br>Enfermedad de Alzheimer<br>Enfermedad de Parkinson  |

|                      |  |
|----------------------|--|
|                      | <p>Cáncer de cerebro</p> <p>Obesidad</p> <p>Trastornos neurológicos</p>  |
| Células de la sangre | <p>Cánceres</p> <p>Enfermedad infecciosa</p> <p>Enfermedad autoinmune</p>  |
| Músculo              | <p>Síndrome metabólico</p> <p>Aterosclerosis</p> <p>Diabetes</p> <p>Sarcoma</p> <p>Inflamación (por ejemplo, polimiositis)</p> <p>Enfermedades del almacenamiento de glucógeno</p> <p>Miopatía</p> |
| Corazón              | <p>Infarto de miocardio</p> <p>Aterosclerosis</p> <p>Angina</p> <p>Cardiomiopatía</p> <p>Isquemia</p>  |
|                      | <p>Enfermedades hipertensivas del corazón</p> <p>Trombosis</p> <p>Aneurisma</p>  |
| Adiposa              | <p>Diabetes</p> <p>Obesidad</p> <p>Síndrome metabólico</p> <p>Aterosclerosis</p> <p>Dislipidemia</p>   |

Hiper glucemia y masa corporal

5 Las proteínas terapéuticas incluyen insulina y análogos de insulina. La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica debilitante causada por la producción de insulina ausente (tipo 1) o insuficiente (tipo 2) a partir de células  $\beta$  pancreáticas (Unger, R.H. et al., Williams Textbook of Endocrinology Saunders, Philadelphia (1998)). Las células beta son células endocrinas especializadas que fabrican y almacenan insulina para liberación después de una comida (Rhodes, et. al. J. Cell Biol. 105:145(1987)) y la insulina es una hormona que facilita la transferencia de glucosa de la sangre en los tejidos donde sea necesario. Los pacientes con diabetes deben controlar frecuentemente los niveles de glucosa en la sangre y muchos requieren múltiples inyecciones diarias de insulina para sobrevivir. Sin embargo, estos pacientes rara vez alcanzan los niveles ideales de glucosa mediante inyección de insulina (Turner, R. C. et al. JAMA 281:2005(1999)).

10 Además, la elevación prolongada de los niveles de insulina puede resultar en efectos secundarios perjudiciales tales como choque hipoglucémico y desensibilización de la respuesta del cuerpo a la insulina. En consecuencia, los pacientes

diabéticos todavía desarrollan complicaciones a largo plazo, tales como enfermedades cardiovasculares, enfermedad renal, ceguera, daño nervioso y trastornos de la cicatrización de la herida (UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, Lancet 352, 837 (1998)).

5 Los trastornos que se pueden tratar mediante un método de la divulgación incluyen una condición hiperglucémica, tal como la diabetes dependiente de insulina (tipo 1) o independiente (tipo 2), así como afecciones fisiológicas o trastornos asociados con o que resultan de la condición hiperglucémica. De este modo, las condiciones hiperglucémicas tratables mediante un método de la invención también incluyen un cambio histopatológico asociado con hiperglucemia crónica o aguda (por ejemplo, diabetes). Los ejemplos particulares incluyen degeneración del páncreas (destrucción de las células  $\beta$ ), calcificación de los túbulos renales, degeneración del hígado, daño ocular (retinopatía diabética), pie diabético, ulceraciones en la mucosa tal como boca y encías, sangrado excesivo, coagulación sanguínea retrasada o cicatrización de heridas y aumento del riesgo de enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, dislipidemia, hipertensión y obesidad.

15 Las presentes composiciones son útiles para disminuir la glucosa, mejorar la tolerancia a la glucosa, tratar una condición hiperglucémica (por ejemplo, diabetes) o para tratar trastornos fisiológicos asociados o resultantes de una condición hiperglucémica. Estos trastornos incluyen, por ejemplo, neuropatía diabética (autonómica), nefropatía (daño renal), infecciones cutáneas y otros trastornos cutáneos, cicatrización lenta o retardada de lesiones o heridas (por ejemplo, que conducen a carbunclos diabéticos), daño ocular (retinopatía, cataratas) que puede conducir a la ceguera, pie diabético y periodontitis acelerada. Tales trastornos también incluyen un mayor riesgo de desarrollar enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, dislipidemia, hipertensión y obesidad.

20 Como se usa en este documento, el término "hiperglucémico" o "hiperglicemia", cuando se usa en referencia a una condición de un sujeto, significa un nivel transitorio o crónico anormalmente alto de glucosa presente en la sangre de un sujeto. La condición puede ser causada por un retraso en la metabolización o absorción de la glucosa de tal manera que el sujeto exhibe intolerancia a la glucosa o un estado de glucosa elevada que no se encuentra por lo general en sujetos normales (por ejemplo, en sujetos subdiabéticos intolerantes a la glucosa en riesgo de desarrollar diabetes o en sujetos diabéticos). Los niveles de glucosa en plasma en ayunas (FPG) para la normoglucemia son inferiores a aproximadamente 110 mg/dl, para el metabolismo alterado de la glucosa, entre aproximadamente 110 y 126 mg/dl y para los diabéticos superiores a aproximadamente 126 mg/dl.

30 Los trastornos que se pueden tratar mediante la producción de una proteína en un tejido de la mucosa intestinal también incluyen obesidad o una masa corporal indeseable. Leptina, colecistoquinina, PYY y GLP-1 disminuyen el hambre, aumentan el gasto energético, inducen la pérdida de peso o proporcionan una homeostasis normal de la glucosa. De este modo, en diversas realizaciones, un método de la invención para tratar la obesidad o una masa corporal indeseable, o hiperglucemia, implica el uso de un ácido nucleico terapéutico que codifica leptina, colecistoquinina, PYY o GLP-1. En otra realización, se utiliza un ARN terapéutico dirigido a ghrelina. La ghrelina aumenta el apetito y el hambre. De este modo, en diversas realizaciones, un método de la invención para tratar la obesidad o una masa corporal indeseable, o hiperglucemia, implica el uso de un ARN terapéutico dirigido a la ghrelina para disminuir su expresión. Los trastornos que se pueden tratar también incluyen aquellos por lo general asociados con la obesidad, por ejemplo, LDL en suero/plasma anormalmente elevadas, VLDL, triglicéridos, colesterol, formación de placa que conduce al estrechamiento o bloqueo de vasos sanguíneos, aumento del riesgo de hipertensión/accidente cerebrovascular, enfermedad coronaria, etc.

40 Como se usa en este documento, el término "obeso" u "obesidad" se refiere a un sujeto que tiene al menos un aumento del 30% en la masa corporal en comparación con un sujeto normal coincidente en edad y en género. La "masa corporal indeseable" se refiere a sujetos que tienen un 1% -29% de masa corporal mayor que un sujeto normal coincidente, así como sujetos que son normales con respecto a la masa corporal pero que desean disminuir o prevenir un aumento en su masa corporal.

45 En una realización, una proteína terapéutica es un antagonista de glucagón. Glucagón es una hormona peptídica producida por las células  $\beta$  en los islotes pancreáticos y es un importante regulador del metabolismo de la glucosa (Unger R. H. & Orci L. N. Eng. J. Med. 304:1518(1981); Unger R. H. Diabetes 25:136 (1976)). Al igual que con la insulina, la concentración de glucosa en sangre media la secreción de glucagón. Sin embargo, en contraste con la insulina, el glucagón se secreta en respuesta a una disminución de la glucosa en la sangre. Por lo tanto, las concentraciones circulantes de glucagón son más altas durante los períodos de ayuno y más bajo durante una comida. Los niveles de glucagón aumentan para restringir la insulina de promover el almacenamiento de glucosa y estimular el hígado para liberar glucosa en la sangre. Un ejemplo específico de un antagonista de glucagón es [des-His1, des-Phe6, Glu9]glucagon-NH<sub>2</sub>. En ratas diabéticas con estreptozotocina, los niveles de glucosa en sangre se redujeron en un 37% en los 15 min de un bolo intravenoso (0.75  $\mu$ g/g de peso corporal) de este antagonista de glucagón (Van Tine B. A. et al. Endocrinology 137:3316 (1996)). En otra realización, la invención proporciona un método para tratar diabetes o hiperglucemia, que comprende el uso de un ARN terapéutico para disminuir los niveles de producción de glucagón desde el páncreas.

60 En otra realización, una proteína terapéutica útil para tratar una condición hiperglucémica o una masa corporal indeseable (por ejemplo, la obesidad) es un péptido 1 similar al glucagón (GLP-1). GLP-1 es una hormona liberada de las células L en el intestino durante una comida que estimula las células  $\beta$  pancreáticas para aumentar la secreción de insulina. GLP-1 tiene actividades adicionales que lo convierten en un atractivo agente terapéutico para el tratamiento de

la obesidad y la diabetes. Por ejemplo, el GLP-1 reduce el vaciamiento gástrico, suprime el apetito, reduce la concentración de glucagón, aumenta la masa de las células  $\beta$ , estimula la biosíntesis y la secreción de insulina de una manera dependiente de la glucosa, y probablemente aumenta la sensibilidad del tejido a la insulina (Kieffer T. J., Habener J. F. *Endocrin. Rev.* 20:876 (2000)). Por lo tanto, la liberación regulada de GLP-1 en el intestino para coincidir con una comida puede proporcionar un beneficio terapéutico para una condición hiperglucémica o una masa corporal indeseable. Los análogos de GLP-1 que son resistentes al dipeptidil peptidato IV (DPP IV) proporcionan una duración de acción más larga y un valor terapéutico mejorado. De este modo, los análogos de GLP-1 son polipéptidos terapéuticos preferidos. En otra realización, la invención proporciona un método para tratar diabetes o hiperglucemia, que comprende el uso de un ARN terapéutico para disminuir los niveles de DPP IV.

En otra realización, una proteína terapéutica útil para tratar una condición hiperglucémica es un antagonista de la hormona resistina. La resistina es un factor derivado de los adipocitos para el cual la expresión se eleva en las formas genéticas e inducidas por la dieta de la obesidad. La neutralización de la resistencia circulante mejora la glucosa en sangre y la acción de la insulina en ratones obesos. Por el contrario, la administración de resistina en ratones normales altera la tolerancia a la glucosa y la acción de la insulina (Steppan CM et. al. *Nature* 409:307 (2001)). La producción de una proteína que antagoniza los efectos biológicos de la resistina en el intestino puede por lo tanto proporcionar una terapia eficaz para la resistencia a la insulina ligada a la obesidad y las condiciones hiperglucémicas. En otra realización, la invención proporciona un método para tratar diabetes o hiperglucemia, que comprende el uso de un ARN terapéutico para disminuir los niveles de expresión de resistina en el tejido adiposo.

En otra realización, un polipéptido terapéutico útil para tratar una condición hiperglucémica o una masa corporal indeseable (por ejemplo, obesidad) es la leptina. La leptina, aunque producida principalmente por las células grasas, también se produce en cantidades menores en una forma dependiente de la comida en el estómago. La leptina transmite información sobre el metabolismo de las células grasas y el peso corporal a los centros del apetito en el cerebro, donde indica una reducción en la ingesta de alimentos (promueve la saciedad) y aumenta el gasto energético del cuerpo.

En otra realización, un polipéptido terapéutico útil para tratar una condición hiperglucémica o una masa corporal indeseable (por ejemplo, obesidad) es el dominio de la cabeza globular C-terminal de la proteína relacionada con el complemento de los adipocitos (Acrp30). Acrp30 es una proteína producida por adipocitos diferenciados. La administración de un producto de escisión proteolítica de Acrp30 que consiste en el dominio de cabeza globular a ratones conduce a una pérdida de peso significativa (Fruebis J. et al. *Proc. NatL Acad. Sci USA* 98:2005 (2001)).

En otra realización, un polipéptido terapéutico útil para tratar una condición hiperglucémica o una masa corporal indeseable (por ejemplo, obesidad) es colecistoquinina (CCK). CCK es un péptido gastrointestinal secretado por el intestino en respuesta a nutrientes particulares en el intestino. La liberación de CCK es proporcional a la cantidad de alimento consumido y se cree que indica al cerebro que termina una comida (Schwartz M. W. et. al. *Nature* 404:661-71(2000)). Por consiguiente, la CCK elevada puede reducir el tamaño de la comida y promover la pérdida de peso o la estabilización del peso (es decir, prevenir o inhibir aumentos en la ganancia de peso).

Con respecto a PYY, véase, por ejemplo, Le Roux et al., *Proc Nutr Soc.* 2005 May; 64 (2): 213-6.

#### Trastornos inmunológicos

En una realización, una composición terapéutica de la invención posee actividad inmunomoduladora. Por ejemplo, un polipéptido terapéutico de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de deficiencias o trastornos del sistema inmunitario, mediante la activación o inhibición de la proliferación, diferenciación o movilización (quimiotaxis) de las células inmunitarias. Las células inmunitarias se desarrollan a través del proceso de hematopoyesis, produciendo células mieloides (plaquetas, glóbulos rojos, neutrófilos y macrófagos) y linfoides (linfocitos B y T) de células madre pluripotentes. La etiología de estas inmunodeficiencias o trastornos puede ser genética, somática, tal como cáncer o algunos trastornos autoinmunes, adquirida (por ejemplo, por quimioterapia o toxinas) o infecciosa.

Una composición terapéutica de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de deficiencias o trastornos de células hematopoyéticas. Por ejemplo, se podría usar un polipéptido terapéutico de la presente invención para aumentar la diferenciación o proliferación de células hematopoyéticas, incluyendo las células madre pluripotentes, en un esfuerzo para tratar aquellos trastornos asociados con una disminución en ciertos tipos (o muchos) de células hematopoyéticas. Ejemplos de síndromes de deficiencia inmunológica incluyen, pero no se limitan a: trastornos de la proteína sanguínea (por ejemplo, agammaglobulinemia, disgammaglobulinemia), ataxia telangiectasia, inmunodeficiencia variable común, síndrome de Digeorge, infección por HIV, infección por HTLV-BLV, síndrome de deficiencia de adhesión leucocitaria, linfopenia, disfunción de fagocito bactericida, inmunodeficiencia combinada severa (SCID), trastorno de Wiskott-Aldrich, anemia, trombocitopenia, o hemoglobinuria.

Una composición terapéutica de la presente invención también puede ser útil en el tratamiento de trastornos autoinmunes. Muchos trastornos autoinmunes resultan de un reconocimiento inadecuado de sí mismo como material extraño por las células inmunitarias. Este reconocimiento inadecuado resulta en una respuesta inmune que conduce a la destrucción del tejido huésped. De acuerdo con lo anterior, la administración de una composición terapéutica de la presente invención que inhibe una respuesta inmune, particularmente la proliferación, diferenciación o quimiotaxis de células T, puede ser una terapia eficaz para prevenir trastornos autoinmunes.

Los ejemplos de trastornos autoinmunes que pueden ser tratadas por la presente invención incluyen, pero no se limitan a: enfermedad de Addison, anemia hemolítica, síndrome antifosfolípido, artritis reumatoide, dermatitis, encefalomiелitis alérgica, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple, miastenia gravis, neuritis, oftalmia, penfigoide ampolloso, pénfigo, poliendocrinopatías, púrpura, enfermedad de Reiter, síndrome del hombre rígido, tiroiditis autoinmune, lupus eritematoso sistémico, inflamación pulmonar autoinmune, síndrome de Guillain-Barre, diabetes mellitis insulino-dependiente, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad ocular inflamatoria autoinmune.

De manera similar, las reacciones y condiciones alérgicas, tales como asma (particularmente asma alérgica) u otros problemas respiratorios, también se pueden tratar mediante una composición terapéutica de la presente invención. Además, estas moléculas se pueden usar para tratar la anafilaxia, hipersensibilidad a una molécula antigénica o incompatibilidad de grupos sanguíneos.

Una composición terapéutica de la presente invención también se puede usar para tratar y/o prevenir el rechazo de órganos o la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). El rechazo de órganos ocurre por la destrucción de células inmunitarias del huésped del tejido trasplantado a través de una respuesta inmune. De manera similar, una respuesta inmune también está implicada en la GVHD, pero, en este caso, las células inmunitarias trasplantadas extrañas destruyen los tejidos del huésped. La administración de una composición terapéutica de la presente invención que inhibe una respuesta inmune, particularmente la proliferación, diferenciación o quimiotaxis de células T, puede ser una terapia eficaz en la prevención del rechazo de órganos o GVHD.

De manera similar, también se puede usar una composición terapéutica de la presente invención para modular la inflamación. Por ejemplo, el polipéptido terapéutico puede inhibir la proliferación y diferenciación de células implicadas en una respuesta inflamatoria. Estas moléculas se pueden utilizar para tratar condiciones inflamatorias, tanto en condiciones crónicas como agudas, incluyendo inflamación asociada con infección (por ejemplo, choque séptico, sepsis o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), lesión por isquemia-reperfusión, letalidad por endotoxinas, artritis, pancreatitis, rechazo hiperagudo mediado por el complemento, nefritis, lesión pulmonar inducida por citocina o quimiocina, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad de Crohn, o resultantes de la sobreproducción de citocinas (por ejemplo, TNF o IL-1). En una realización, un ARN terapéutico dirigido contra TNF- $\alpha$  se usa en las presentes composiciones para tratar la inflamación. En otra realización preferida, se usa un ARN terapéutico dirigido contra IL-1 en las presentes composiciones para tratar la inflamación. ARN terapéuticos de ARNip son especialmente preferidos. Los trastornos inflamatorios de interés para el tratamiento en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), cistitis intersticial, y enfermedad inflamatoria intestinal.

#### Trastornos de coagulación

En algunas realizaciones, una composición terapéutica de la presente invención también se puede usar para modular la actividad hemostática (la interrupción del sangrado) o trombolítica (formación de coágulos). Por ejemplo, mediante el aumento de la actividad hemostática o trombolítica, se podría usar una composición terapéutica de la presente invención para tratar trastornos de la coagulación sanguínea (por ejemplo, afibrinogenemia, deficiencias de los factores), trastornos de las plaquetas (por ejemplo, trombocitopenia), o heridas resultantes de traumatismos, cirugía, u otras causas. Alternativamente, una composición terapéutica de la presente invención que puede disminuir la actividad hemostática o trombolítica se podría usar para inhibir o disolver la coagulación. Estas composiciones terapéuticas pueden ser importantes en el tratamiento de ataques cardíacos (infarto), accidentes cerebrovasculares o cicatrización. En una realización, un polipéptido terapéutico de la invención es un factor de coagulación, útil para el tratamiento de la hemofilia u otros trastornos de la coagulación/formación de coágulos (por ejemplo, Factor VIII, IX o X).

#### Trastornos hiperproliferativos

En una realización, una composición terapéutica de la invención es capaz de modular la proliferación celular. Dicho polipéptido terapéutico se puede usar para tratar trastornos hiperproliferativos, incluyendo neoplasias.

Ejemplos de trastornos hiperproliferativos que se pueden tratar mediante una composición terapéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a neoplasias localizadas en el: abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (adrenal, paratiroides, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, torácico y urogenital.

De manera similar, otros trastornos hiperproliferativos también se pueden tratar mediante una composición terapéutica de la presente invención. Ejemplos de tales trastornos hiperproliferativos incluyen, pero no se limitan a: hipergammaglobulinemia, trastornos linfoproliferativos, paraproteinemias, púrpura, sarcoidosis, síndrome de Sezary, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de Gaucher, histiocitosis y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de neoplasia, localizada en un sistema de órganos enumerados anteriormente.

La administración al sistema circulatorio proporciona el acceso de la proteína terapéutica a una amplia variedad de tejidos. Alternativamente, una composición terapéutica de la presente invención puede estimular la proliferación de otras células que pueden inhibir el trastorno hiperproliferativo.

Por ejemplo, mediante el aumento de una respuesta inmune, particularmente aumentando las cualidades antigénicas del trastorno hiperproliferativo o mediante la proliferación, diferenciación, o movilización de células T, se pueden tratar trastornos hiperproliferativos. Esta respuesta inmunitaria se puede aumentar aumentando ya sea una respuesta inmune existente o iniciando una nueva respuesta inmune. Alternativamente, la disminución de una respuesta inmune también puede ser un método de tratamiento de trastornos hiperproliferativos, tales como con un agente quimioterapéutico.

#### Enfermedad infecciosa

En una realización, una composición terapéutica de la presente invención se puede usar para tratar enfermedades infecciosas. Por ejemplo, al aumentar la respuesta inmune, particularmente aumentando la proliferación y diferenciación de células B y/o T, se pueden tratar enfermedades infecciosas. La respuesta inmunitaria se puede aumentar aumentando ya sea una respuesta inmune existente o iniciando una nueva respuesta inmune. Alternativamente, la composición terapéutica de la presente invención también puede inhibir directamente el agente infeccioso, sin necesariamente provocar una respuesta inmune.

Los virus son un ejemplo de un agente infeccioso que puede causar enfermedad o síntomas que pueden ser tratados por una composición terapéutica de la presente invención. Ejemplos de virus incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias de virus de ADN y ARN: Arbovirus, Adenoviridae, Arenaviridae, Arterivirus, Birnaviridae, Bunyaviridae, Caliciviridae, Circoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Hepadnaviridae (Hepatitis), Herpesviridae (tales como Cytomegalovirus, Herpes simple, Herpes Zoster), Mononegavirus (por ejemplo, Paramyxoviridae, Morbillivirus, Rhabdoviridae), Orthomyxoviridae (por ejemplo, influenza), Papovaviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Poxviridae (tal como la viruela o vaccinia), Reoviridae (por ejemplo, Rotavirus), Retroviridae (HTLV-I), HTLV-II, Lentivirus), y Togaviridae (por ejemplo, Rubivirus). Los virus que caen dentro de estas familias pueden causar una variedad de enfermedades o síntomas, incluyendo pero no limitado a: artritis, bronquiolitis, encefalitis, infecciones oculares (por ejemplo, conjuntivitis, queratitis), síndrome de fatiga crónica, hepatitis (A, B, C, E, activa crónica, Delta), meningitis, infecciones oportunistas (por ejemplo, AIDS), neumonía, linfoma de Burkitt, varicela, fiebre hemorrágica, sarampión, parotiditis, parainfluenza, rabia, resfriado común, poliomielitis, leucemia, rubéola, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel (Por ejemplo Kaposi, verrugas), y viremia. Una composición terapéutica de la presente invención se puede usar para tratar cualquiera de estos síntomas o enfermedades.

De manera similar, los agentes bacterianos o fúngicos que pueden causar enfermedad o síntomas y que se pueden tratar mediante una composición terapéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y hongos: Actinomycetales (por ejemplo, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia), Aspergillus, Bacillaceae (por ejemplo, Anthrax, Clostridium), Bacteroidaceae, Blastomycosis, Bordetella, Borrelia, Brucellosis, Candidiasis, Campylobacter, Coccidioidomycosis, Cryptococcosis, Dermatococcoses, Enterobacteriaceae (Klebsiella, Salmonella, Serratia, Yersinia), Erysipelothrix, Helicobacter, Legionellosis, Leptospiriosis, Listeria, Mycoplasmatales, Neisseriaceae (por ejemplo, Acinetobacter, Gonorrhea, Menigococcal), infecciones por Pasteurellaceae (por ejemplo, Actinobacillus, Heamophilus, Pastúrela), Pseudomonas, Rickettsiaceae, Chlamydiaceae, Syphilis, y Staphylococcal. Estas familias bacterianas o fúngicas pueden causar las siguientes enfermedades o síntomas, incluyendo, pero no limitado a: bacteremia, endocarditis, infecciones oculares (conjuntivitis, tuberculosis, uveitis), gingivitis, infecciones oportunistas (infecciones, por ejemplo, relacionadas con el AIDS), paroniquia, infecciones relacionadas con la prótesis, enfermedad de Reiter, infecciones del tracto respiratorio, tales como la tos ferina o empireuma, sepsis, enfermedad de Lyme, enfermedad por arañazo de gato, disentería, fiebre paratifoidea, envenenamiento por alimentos, fiebre tifoidea, neumonía, gonorrea, meningitis, clamidia, sífilis, difteria, lepra, paratuberculosis, tuberculosis, lupus, botulismo, gangrena, tétanos, impétigo, fiebre reumática, escarlatina, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel (por ejemplo, celulitis, dermatomycosis), toxemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas. Una composición terapéutica de la presente invención se puede usar para tratar cualquiera de estos síntomas o enfermedades.

Además, los agentes parasitarios que causan enfermedades o síntomas que pueden ser tratados por una composición terapéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias: amebiasis, babesiosis, coccidiosis, criptosporidiosis, dientamoebiasis, durina, ectoparásitos, giardiasis, helmintiasis, leishmaniasis, teileriasis, toxoplasmosis, tripanosomiasis y tricomonas. Estos parásitos pueden causar una variedad de enfermedades o síntomas, incluyendo, pero no limitado a: sarna, trombiculiasis, infecciones oculares, enfermedad intestinal (por ejemplo, disentería, giardiasis), enfermedad hepática, enfermedad pulmonar, infecciones oportunistas (por ejemplo, relacionadas con el AIDS), malaria, complicaciones del embarazo y toxoplasmosis. Una composición terapéutica de la presente invención se puede usar para tratar cualquiera de estos síntomas o enfermedades.

#### Regeneración

Una composición terapéutica de la presente invención se puede usar para diferenciar, proliferar y atraer células, fomentando la regeneración de tejidos. (Véase, Science 276:59-87 (1997)). La regeneración de tejidos se podría usar para reparar, sustituir o proteger el tejido dañado por defectos congénitos, trauma (heridas, quemaduras, incisiones o úlceras), la edad, la enfermedad (por ejemplo, osteoporosis, osteoartritis, enfermedad periodontal, insuficiencia hepática), cirugía, incluyendo cirugía plástica cosmética, fibrosis, lesión por reperusión o daño sistémico a citocinas.

Las composiciones terapéuticas de la invención pueden promover la regeneración de una variedad de tejidos, incluyendo, pero no limitados a órganos (por ejemplo, páncreas, hígado, intestino, riñón, piel, endotelio), músculo (liso,

esquelético o cardíaco), vascular (incluyendo el endotelio vascular), nervioso, hematopoyético y tejido esquelético (hueso, cartilago, tendón y ligamento). Preferiblemente, la regeneración sufre una pequeña cantidad de cicatrización, o se produce sin cicatrización. La regeneración también puede incluir angiogénesis.

5 Además, una composición terapéutica de la presente invención puede aumentar la regeneración de tejidos difíciles de curar. Por ejemplo, una mayor regeneración del tendón/ligamento aceleraría el tiempo de recuperación después del daño. Una composición terapéutica de la presente invención también se podría usar profilácticamente en un esfuerzo para evitar daños. Las enfermedades específicas que podrían ser tratadas incluyen tendinitis, síndrome del túnel carpiano y otros defectos del tendón o del ligamento. Otro ejemplo de regeneración tisular de heridas no cicatrizantes incluye úlceras por presión, úlceras asociadas con insuficiencia vascular, heridas quirúrgicas y traumáticas.

10 De forma similar, el tejido nervioso y cerebral también podría ser regenerado usando una composición terapéutica de la presente invención para proliferar y diferenciar células nerviosas. Las enfermedades que podrían ser tratadas usando este método incluyen enfermedades del sistema nervioso central y periférico, neuropatías, o trastornos mecánicos y traumáticos (por ejemplo, trastornos de la médula espinal, traumatismo craneal, enfermedad cerebrovascular, y accidente cerebrovascular). Específicamente, las enfermedades asociadas con lesiones de nervios periféricos, neuropatía periférica (por ejemplo, resultante de quimioterapia u otras terapias médicas), neuropatías localizadas, y enfermedades del sistema nervioso central (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, y síndrome Shy-Drager), se podrían tratar todos utilizando composiciones terapéuticas de la presente invención. Con respecto a trastornos del CNS, se conocen numerosos medios en la técnica para facilitar el acceso terapéutico al tejido cerebral, incluyendo métodos para interrumpir la barrera hematoencefálica, y métodos para acoplar agentes terapéuticos a unidades estructurales que proporcionan transporte al CNS. En una realización, se diseña un ácido nucleico terapéutico para codificar una proteína de fusión, cuya proteína de fusión comprende una unidad estructural de transporte y una proteína terapéutica. Alternativamente, las presentes composiciones se pueden suministrar directamente al CNS.

#### Quimiotaxis

25 En una realización, una composición terapéutica de la invención puede modular la quimiotaxis. Por ejemplo, en una realización, un polipéptido terapéutico de la presente invención posee una actividad de quimiotaxis. Una molécula quimiotóxica atrae o moviliza células (por ejemplo, monocitos, fibroblastos, neutrófilos, células T, mastocitos, eosinófilos, células epiteliales y/o endoteliales) a un sitio particular en el cuerpo, tal como inflamación, infección, o sitio de hiperproliferación. Las células movilizadas pueden entonces luchar y/o curar el trauma o la anomalía en particular.

30 Por ejemplo, un polipéptido terapéutico puede aumentar la actividad quimiotóxica de células particulares. Estas moléculas quimiotóxicas se pueden utilizar entonces para tratar la inflamación, la infección, los trastornos hiperproliferativos o cualquier trastorno del sistema inmune aumentando el número de células dirigidas a una localización particular del cuerpo. Por ejemplo, las moléculas quimiotóxicas se pueden usar para tratar heridas y otros traumatismos de los tejidos atrayendo células inmunitarias al lugar lesionado. Las moléculas quimiotóxicas de la presente invención también pueden atraer fibroblastos, que se pueden usar para tratar heridas.

También se contempla que una composición terapéutica de la presente invención puede inhibir la actividad quimiotóxica. Estas composiciones terapéuticas también podrían usarse para tratar trastornos. De este modo, una composición terapéutica de la presente invención se podría usar como un inhibidor de la quimiotaxis.

Especialmente preferidas son las proteínas proterapéuticas que se activan en la proximidad de los tejidos diana.

40 Los polipéptidos terapéuticos adicionales contemplados para su uso incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento (por ejemplo, hormona de crecimiento, factor de crecimiento similar a insulina 1, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de fibroblastos ácidos y básicos, factor de crecimiento transformante- $\beta$  etc.), para tratar trastornos del crecimiento o síndromes de desgaste; y anticuerpos (por ejemplo, humanos o humanizados), para proporcionar inmunización pasiva o protección de un sujeto frente a antígenos o patógenos extraños (por ejemplo, H. Pylori), o para proporcionar tratamiento de cáncer, artritis o enfermedad cardiovascular; citocinas, interferones (por ejemplo, interferón (IFN), IFN- $\alpha$ 2b y 2 $\alpha$ , IFN- $\alpha$ N1, IFN- $\beta$ 1b, IFN-gamma), interleucinas (por ejemplo, IL-1 a IL-10), factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$  TNF- $\beta$ ), quimiocinas, factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), hormonas de polipéptidos, polipéptidos antimicrobianos (por ejemplo, polipéptidos antibacterianos, antifúngicos, antivirales, y/o antiparasitarios), enzimas (por ejemplo, adenosina desaminasa), gonadotropinas, quimiotactinas, proteínas de unión a lípidos, filgrastim (Neupogen), hemoglobina, eritropoyetina, insulintropina, imiglucerasa, sarbramostim, activador del plasminógeno tisular (tPA), uroquinasa, estreptoquinasa, fenilalanina amonio liasa, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF), trombopoyetina (TPO), superóxido dismutasa (SOD), adenosina desaminasa, catalasa calcitonina, endotelina, L-asparaginasa pepsina, uricase tripsina, quimotripsina elastasa, carboxipeptidasa lactasa, factor intrínseco sucrasa, calcitonina, hormona del tipo de la hormona paratiroidea (PTH), CD4 soluble y anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno (por ejemplo, FAbs) de los mismos (por ejemplo, ortoclona OKT-e (anti-CD3), anticuerpo monoclonal GPIIb/IIIa). Se contemplan adicionalmente ARN terapéuticos dirigidos a ácidos nucleicos que codifican tales factores.



## Vacuna

5 En una realización, la divulgación proporciona métodos para vacunar a un paciente. Los métodos comprenden administrar una composición de la invención capaz de producir el epítipo deseado. En una realización preferida, la composición comprende una construcción terapéutica de ácido nucleico capaz de expresar una proteína que comprende el epítipo.

## Aplicaciones cosméticas

En una realización, la invención proporciona polyplexos de ácido nucleico quitosano DD para uso cosmético. Los cosméticos objeto comprenden polyplexos de ácido nucleico quitosano DD en una formulación apropiada para uso cosmético.

## 10 Ejemplos

## Formación de quitosano derivado dualmente y formación de polyplexos de ADN

El quitosano se derivó dualmente con arginina y ácido glucónico (quitosano DD) según métodos bien conocidos. El quitosano DD fue sometido a la formación del polyplex con un vector de ADN que codifica para la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) o el ARNip de la luciferasa.

## 15 Transfección in vitro con polyplex de ADN

En general, la transfección in vitro de células 293T con formulaciones de polyplex de ácido nucleico de quitosano DD se realizó en dos etapas: preparación de células seguida por transfección.

## Mantenimiento de líneas celulares

20 La línea celular 293T fue cortesía del laboratorio del laboratorio del Dr. Kieffer en UBC y se preparó de la siguiente manera. Las células de riñón humano se transformaron con el antígeno de T SV40; se cultivó en medio Eagle modificado por Dulbecco de glucosa alta (DMEM) que contiene suero fetal bovino al 10% (FBS) y penicilina/estreptomina; y se mantiene por debajo del 80% de confluencia. Se cultivan HT1080 (células epiteliales del tejido conectivo humano) y HeLa (células epiteliales cervicales humanas) en MEM (medio esencial mínimo) que contiene FBS al 10% y penicilina/estreptomina; y se mantienen por debajo del 90% de confluencia. Se cultivan VERO (células epiteliales de riñón de mono) en DMEM que contiene FBS inactivado por calor al 10% (56°C, durante 30 min), piruvato de sodio 1 mM y 500 µg/ml de gentamicina; y se mantienen por debajo del 90% de confluencia. Se cultivan NIH3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón) en DMEM que contiene FBS al 10% y penicilina/estreptomina; y se mantienen por debajo del 90% de confluencia.

## Preparación de células para la transfección

30 Se prepararon células para la transfección de la siguiente manera. El día antes de la transfección, se adicionaron células 293T a placas de cultivo tisular de 6 pozos ( $4.5 \times 10^5$  células/pozo) en 3 mL de medio completo (DMEM de glucosa alta + FBS al 10% + pen/estrep). El día de la transfección se determinó el recuento de células para dos pozos seleccionados lavando las células 1X con solución salina estandarizada con fosfato (PBS) tripsinizando las células con 0.5 mL de tripsina al 0.05%, adicionando 0.5 mL de medio completo y contando 10 µL usando un hemocitómetro. Si las células eran ~50% confluentes ( $\sim 7 \times 10^5$  células/pozo), entonces la transfección prosiguió. De forma similar, el día anterior a la transfección, se sembraron en placas células HeLa a  $1 \times 10^5$  células/pozo, mientras que las células HT1080, NIH3T3 y VERO se sembraron en placas a  $2 \times 10^5$  células/pozo en 3 ml de sus respectivos medios completos y la transfección se realizó al día siguiente a ~50% de confluencia.

## Transfección de células

40 La transfección se llevó a cabo de la siguiente manera. En primer lugar, se retiraron los medios de cada pozo seguido por la adición de 1 mL de Opti-mem (pH 7.4) a cada pozo, girando suavemente y después retirándolo. (Se lavaron seis pozos a la vez para evitar que las células se desalojaran). Después se adicionó cuidadosamente 1 mL más de Opti-mem (pH 7.4) a cada pozo para no desalojar las células. A continuación, se adicionaron muestras de polyplex a cada pozo (diana de 2 µg de ADN), se hicieron girar y se incubaron a 37°C, durante 2 h. Después de la incubación, el medio se retiró y se reemplazó con 2 mL de medio completo y se volvió a incubar a 37°C. En los puntos de tiempo requeridos, el sobrenadante se retiró y se almacenó a -20°C para el posterior ensayo de SEAP.

## Ensayo de proteína SEAP

50 El ensayo de SEAP se realizó utilizando el kit SEAP Chemiluminescent Assay. Todos los reactivos para el ensayo se equilibraron a 25°C, durante 30 minutos antes de su uso. Los patrones para el ensayo se prepararon disolviendo la fosfatasa alcalina placentaria a 1 mg/ml en solución reguladora de dilución 1X del kit reforzado con albúmina de suero bovino al 0.1% y glicerol al 50% y diluyendo a continuación por diluciones en serie de 10 veces con DMEM a 0.01 pg/uL. Los patrones y las muestras descongeladas se diluyeron después 1 en 4 con solución reguladora de dilución, se

5 inactivaron por calor a 65°C, durante 30 min, se incubaron en hielo durante 2 min, se centrifugaron (16100 x rcf durante 2 min a RT) y los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos. Después de equilibrar a 25°C, durante 5 min, se adicionaron 50 µL de las muestras y los patrones a cada pozo de una placa Microlite-1 por duplicado. A continuación, se adicionó solución reguladora de inactivación (50 µl) a cada pozo y se pipeteó hacia arriba y hacia abajo suavemente para mezclar, sin crear burbujas y se incubó durante 5 min. El reactivo sustrato/potenciador se preparó durante la incubación de 5 min en una proporción de 1:19 de sustrato a potenciador. A continuación, se adicionó el sustrato/potenciador a cada pozo, se incubó durante 20 minutos y luego se leyó la placa en el luminómetro (Lmax11384, Molecular Devices) con un tiempo de integración de 1 s.

Ensayo de ARNm de SEAP-Reacción en cadena cuantitativa en tiempo real de la polimerasa (Q-RT-PCR)

10 La cuantificación relativa de la expresión de ARNm de SEAP en diversas muestras se determinó mediante Q-RT-PCR. En resumen, se extrajo el ARNm total y se purificó usando reactivo TRIzol y se realizó Q-RT-PCR usando Superscript II. Los cebadores de genes de SEAP y la sonda fluorogénica se diseñaron usando Primer Express (Versión 1.5) (Applied Biosystems, Foster City, California). Se utilizó el sistema de detección de secuencias ABI 7000 (Applied Biosystems) para realizar todas las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen total de 25 µl. Cada mezcla de  
15 reacción contenía 1xTaqMan Universal Master Mix, 20 µM de cada cebador y 10 µM de sonda. Se utilizaron diez microlitros de cada ADN complementario (equivalente a 4.5-45 ng de ARN total transcrito inverso) en cada reacción de PCR. El procedimiento de PCR consistió en una incubación inicial a 50°C, durante 2 min, seguido de una incubación de 10 min a 95°C, 40 ciclos de PCR a 95°C, durante 15 segundos y 1 minuto a 60°C. Cada placa de ensayo de 96 pozos contenía menos transcriptasa inversa y menos controles de ADN complementarios. Los resultados se normalizaron con  
20 el gen de mantenimiento GAPDH (gen de referencia) y se expresaron como la proporción de expresión génica relativa diana entre el tejido tratado y el tejido de control no tratado. El método se denomina como método de Pfaffl's method (Pfaffl MW. Nucleic Acids Res (2001) 29:e45)

Transfección de modificación genética ARNip de células

25 La modificación genética de la expresión génica se llevó a cabo mediante la primera transfección de células huésped con polyplexos de ARNip/quitosano-dd-modificado seguido de transfección de las mismas células huésped con ADN/Lipofectamina 2000.

30 El día antes de la transfección, se sembraron en placas 9 x 10<sup>4</sup> 293 células T/pozo de una placa de 24 pozos en 1 ml de medio completo. El día de la transfección, las células (50% confluentes) se lavaron Opti-mem antes de la transfección. Las células se lavaron eliminando el medio en el pozo, adicionando de nuevo 0.25 ml de Opti-mem, girando en su lugar seguido de la eliminación de Opti-mem y reemplazando con 0.25 ml de Opti-mem nuevo. La transfección ARNip se llevó a cabo mediante la adición de 200 nM de ARNip/polyplex de quitosano modificado a cada pozo y la incubación a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5%. Después de 2 h, se retiró el Opti-mem y se reemplazó con 0.5 ml de medio completo. La transfección de ADN se llevó a cabo adicionando 0.4 µg de partículas de lipofectamina que contenían luciferasa a cada pozo y se incubó a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5%. Después de 2 h, el medio se retiró y se reemplazó con  
35 0.5 ml de medio completo fresco, y luego las células fueron devueltas a la incubadora. Cuarenta y ocho horas después de la transfección con ARNip, se recogieron lisados celulares para el ensayo de luciferasa. Para la recogida, las células se lavaron con solución salina estandarizada con fosfato de Dulbecco, y se reforzó con 500 µl de solución reguladora de lisis Glo, que contenía inhibidores de proteasa libres de EDTA, se recogieron en tubos después de 5 minutos de incubación y se ensayaron inmediatamente o se almacenaron a -80°C.

40 Ensayo de luciferasa

45 El ensayo de luciferasa se realizó usando el Bright-Glo Luciferase Assay System. La solución reguladora de lisis Glo, solución reguladora Bright-Glo y las muestras para el ensayo se equilibraron a temperatura ambiente antes de su uso. Los patrones para el ensayo se prepararon diluyendo la enzima Luciferasa Recombinante QuantiLum en solución reguladora de lisis Glo 1X que contenía inhibidor de proteasa libre de EDTA y 1 mg/ml de BSA a 90 ng/ml, a continuación, a 30 ng/ml y a continuación se diluyó por diluciones en serie de 10 veces hasta 0.003 ng/ml. El sustrato Bright-Glo se reconstituyó con solución reguladora Bright-Glo para hacer el reactivo de ensayo Bright-Glo durante al menos 10 minutos antes de su uso. Se adicionaron cien µL de las muestras y se adicionaron los patrones a cada pozo de una placa de 1 microlitro por duplicado. A continuación, se adicionó reactivo de ensayo Bright-Glo (100 µl) a cada pozo y se incubó durante 2 min en el luminómetro y se leyó con un tiempo de integración de 1 s.

50 Animales

55 Los protocolos quirúrgicos para los estudios con animales fueron aprobados por el University of British Columbia Committee for Animal Care. El trabajo con animales fue conducido por personal cualificado y capacitado, se adquirieron ratones C57BL/6 de ~8 semanas de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Los ratones se alojaron 2-4 animales por jaula en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se les dio una semana para aclimatarse, así como alimento de roedor estándar (Research Diets Inc., New Brunswick, NJ) y agua ad libitum. Los ratones fueron alojados en una instalación de animales en the Department of Physiology, University of British Columbia (UBC).

Transfección de colon en ratones

Se anestesiaron ratones C57BL/6 naive (inhalante de isoflurano 1.5-2.0%, Baxter CA2L9108) y se les administró un único enema de polyplex de ADN de quitosano DD funcionalizado o polyplex de ADN de quitosano no funcionalizado que llevaba el plásmido gWiz-SEAP a 0.25 mg/mL. Después de 2 días, los ratones fueron sacrificados y los tejidos fueron recolectados.

#### 5 Transfección in vivo de ratón: administración de polyplex a músculo

Para la administración de marcador a músculo de ratón, el polyplex de quitosano DD-ADN que comprende el vector de expresión de SEAP se administra por inyección en los isquiotibiales internos. Se anestesian los ratones y se inyectan 50 uL de polyplex mediante una jeringa. En diversos puntos de tiempo, los ratones son sacrificados y sus tejidos musculares se recolectaron y procesaron para la expresión de ARNm de SEAP. El ADN se inyecta solo como control.

10 Liofilización y reconstitución de polyplexos de quitosano DD-ácido nucleico con agua, los polyplexos de quitosano DD-ácido nucleico congelados a -80°C (280 ul cada uno) se colocaron en un recipiente enfriado previamente. El recipiente se conectó entonces a un liofilizador (SAVANT-Modulyo D). Los polyplex se liofilizaron bajo presión constante de 5 torr a temperatura <-40°C, durante más de 28 horas. Después de la liofilización, se reconstituyeron los polyplexos de quitosano DD-ácido nucleico con agua hasta la concentración original para los experimentos posteriores.

#### 15 Resultados

Las figuras 2-4 y 7 muestran las eficacias de transfección de quitosano derivado sólo con ácido glucónico (figura 2A), solo arginina (figura 2B) o quitosano derivado dualmente tanto con ácido glucónico como con arginina en comparación con quitosano derivado con sólo arginina o ácido glucónico (figuras 3 y 7). Las figuras 3 y 7 muestran un efecto sinérgico cuando el quitosano es derivado dualmente tanto con arginina como con ácido glucónico. El efecto sinérgico se puede observar cuando el quitosano está funcionalizado dualmente con arginina en un grado de funcionalización final del 26% y el ácido glucónico en los grados de funcionalización final que varían desde 3% al 9%, aunque el efecto más grande se observó en un grado de funcionalización final del ácido glucónico de aproximadamente 5% (figura 4; véase también la figura 7, que muestra un efecto sinérgico con quitosano dualmente funcionalizado con arginina y ácido glucónico en grados de funcionalización final del 26% y 6%, respectivamente). Las figuras 5 y 6 muestran el efecto de la proporción N/P y el pH de la formulación de polyplex, respectivamente, sobre la eficiencia de transfección. Las eficiencias de transfección tanto del quitosano derivado con (1) arginina solamente o (2) arginina como del glucónico se correlacionaron directamente con la proporción N/P, aunque el quitosano derivado dualmente tenía una eficiencia de transfección mayor que el quitosano derivado con arginina sola en todas las proporciones N/P ensayadas (figura 5). Por el contrario, el pH no afecta la eficiencia de la transfección (figura 6). El efecto sinérgico se puede observar también a través de diferentes líneas celulares ex vivo (figura 8), para el ARNip (figura 11) e in vivo (figuras 9-10). La administración intramuscular de polyplex de quitosano DD-ADN da lugar a una expresión de ARNm de SEAP significativamente aumentada en células musculares in vivo (figura 9). Adicionalmente, se muestran aumentos relativos en ARNm de SEAP en tejido de colon de ratones tratados sobre ratones naive (no transfectados) (figura 10). Ambos polyplexos de quitosano DD-ácido nucleico congelados y liofilizados mostraron estabilidad en propiedades fisicoquímicas después de almacenamiento a temperatura ambiente durante 3 meses. Estos polyplexos también mantuvieron su estabilidad después de una incubación durante la noche, seguida de la reconstitución con agua (figura 12).

40 Ciertas modificaciones y mejoras ocurrirán a los expertos en el arte tras una lectura de la descripción anterior. Se debe entender que todas estas modificaciones y mejoras se han suprimido en este documento en aras de la concisión y legibilidad, pero están adecuadamente dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Reivindicaciones

1. Una nanopartícula derivada de quitosano que comprende quitosano acoplado con ácido glucónico y arginina.
2. La nanopartícula según la reivindicación 1, en la que dicho quitosano se acopla con ácido glucónico a una concentración inicial de 5% a 60%, opcionalmente de 8% a 30% y además opcionalmente de 3% a 10%.
- 5 3. La nanopartícula según la reivindicación 2, en la que dicho quitosano se acopla con ácido glucónico a una concentración final del 5%.
4. La nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho quitosano se acopla con arginina a una concentración de 10% a 55%.
- 10 5. Una composición que comprende la nanopartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicho quitosano forma un complejo con un ácido nucleico para formar un polyplex de ácido nucleico quitosano derivado dualmente (DD).
6. La composición según la reivindicación 5, en la que dicho ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico peptídico (PNA), oligo morfolino fosforodiamidato (PMO), ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico glicólico (GNA) y ácido nucleico treosa (TNA).
- 15 7. La composición según la reivindicación 5, en la que dicho ácido nucleico es ADN o ARN.
8. La composición según la reivindicación 7, en la que dicho ARN se selecciona del grupo que consiste en ARN antisentido, ARNip, ARN de horquilla corta, micro ARN y ARN enzimático.
- 20 9. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la relación de amina a fosfato de dicho polyplex de ácido nucleico quitosano DD está entre 2 a 100 y está opcionalmente entre 2 a 50 y está además opcionalmente entre 2 a 30 y está además opcionalmente entre 2 y 15.
10. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en la que dicho polyplex de ácido nucleico quitosano DD tiene un grado combinado de funcionalización con dicha arginina y dicho ácido glucónico de 1-60% y opcionalmente tiene un grado combinado de funcionalización con dicha arginina y dicho ácido glucónico de 1-30%.
- 25 11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-10, en la que dicho polyplex de ácido nucleico quitosano DD comprende moléculas de quitosano que tienen un peso molecular promedio de menos de 110 kDa, opcionalmente menos de 65 kDa, además opcionalmente de menos de 50 kDa, además opcionalmente de menos de 30 kDa, además opcionalmente de menos de 10 kDa o además opcionalmente de menos de 5 kDa antes del acoplamiento con dicho ácido glucónico y dicha arginina.
- 30 12. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-11, en la que dicho polyplex de ácido nucleico quitosano DD tiene un índice de polidispersidad promedio (PDI) de menos de 0.5, opcionalmente menos de 0.4, además opcionalmente de menos de 0.3, o además opcionalmente de menos de 0.25.
- 35 13. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 5-12, en la que dicho polyplex de ácido nucleico quitosano DD tiene una relación molar de dicha arginina a dicho ácido glucónico entre 100:1 y 1:100, opcionalmente entre 50:1 y 1:50, además opcionalmente entre 10:1 y 1:10, además opcionalmente entre 5:1 y 1:5, o además opcionalmente entre 2:1 y 1:2.
14. Un método in vitro para suministrar una molécula de ácido nucleico a una célula que comprende poner en contacto dicha célula con una composición que comprende una nanopartícula derivada de quitosano según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 40 15. Una composición que comprende una nanopartícula derivada de quitosano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para uso en el tratamiento de la diabetes, en la que la nanopartícula forma un complejo con una molécula de ácido nucleico que codifica insulina, un antagonista de glucagón, GLP-1 o leptina para formar un polyplex de ácido nucleico quitosano derivado dualmente (DD).
- 45 16. Una composición que comprende una nanopartícula derivada de quitosano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal en la que la nanopartícula forma un complejo con una molécula de ácido nucleico que codifica IL-10, un antagonista de TNF $\alpha$  o un antagonista de IL -17 para formar un polyplex de ácido nucleico quitosano derivado dualmente (DD).
- 50 17. Una composición que comprende una nanopartícula derivada de quitosano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para uso en el tratamiento de la obesidad, en la que la nanopartícula forma un complejo con una molécula de ácido nucleico que codifica leptina, colecistoquinina, PYY o GLP-1 para formar un polyplex de ácido nucleico quitosano derivado dualmente (DD).

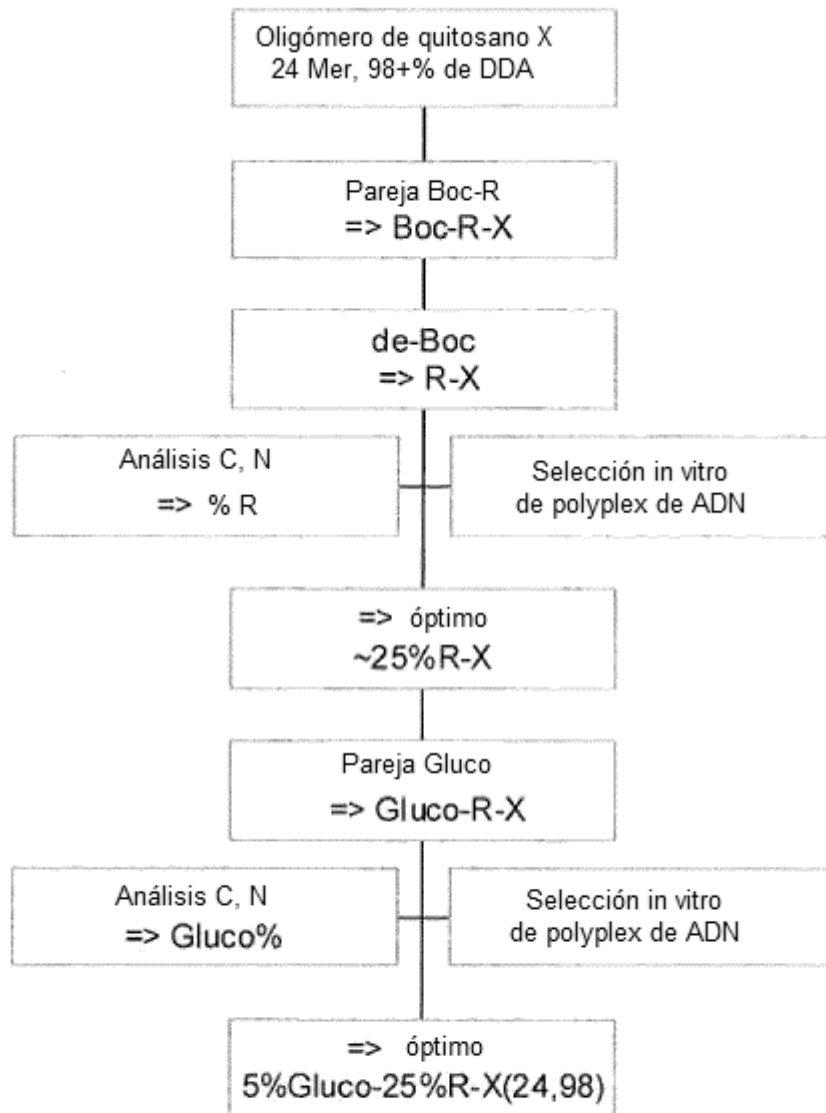


FIG. 1

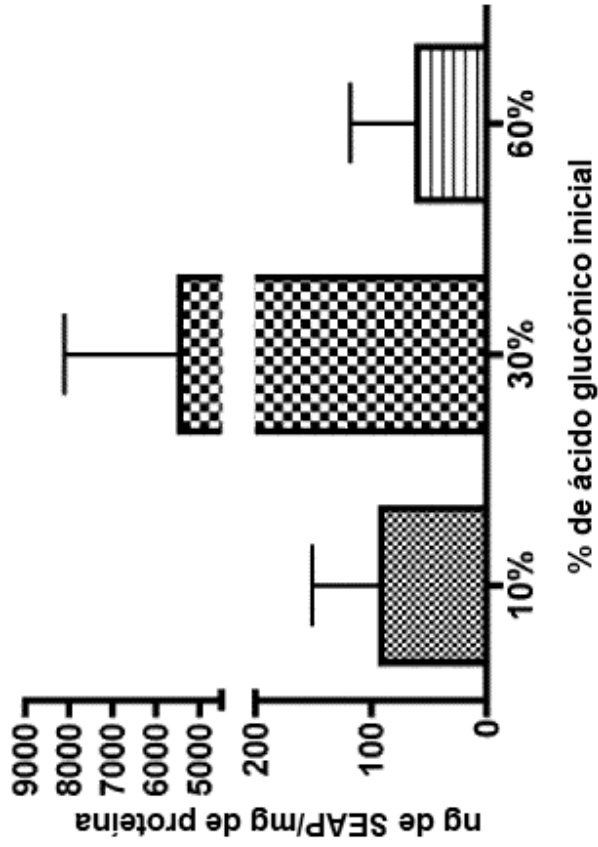


FIG. 2A

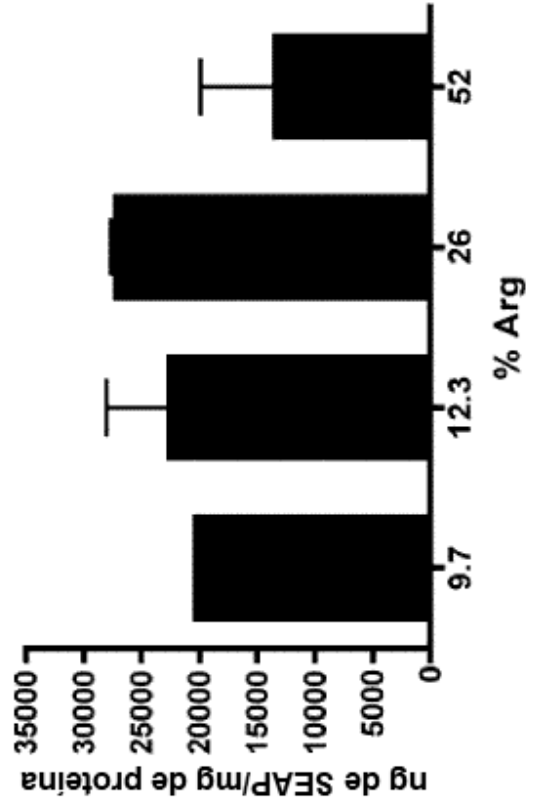


FIG. 2B

FIG. 3

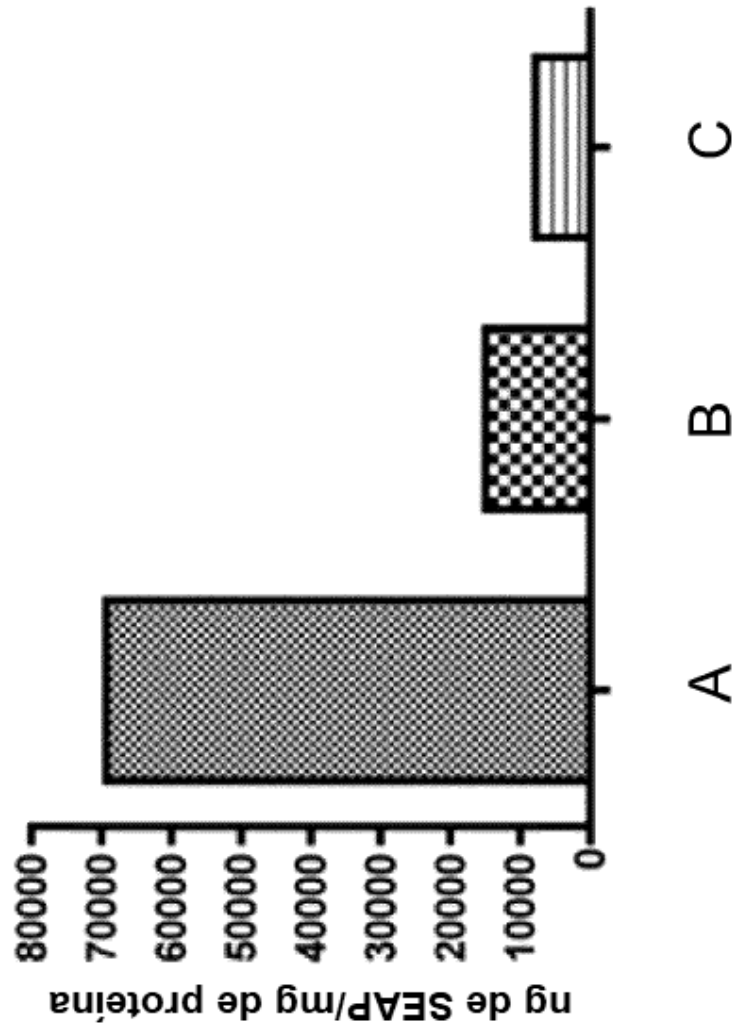


FIG. 4

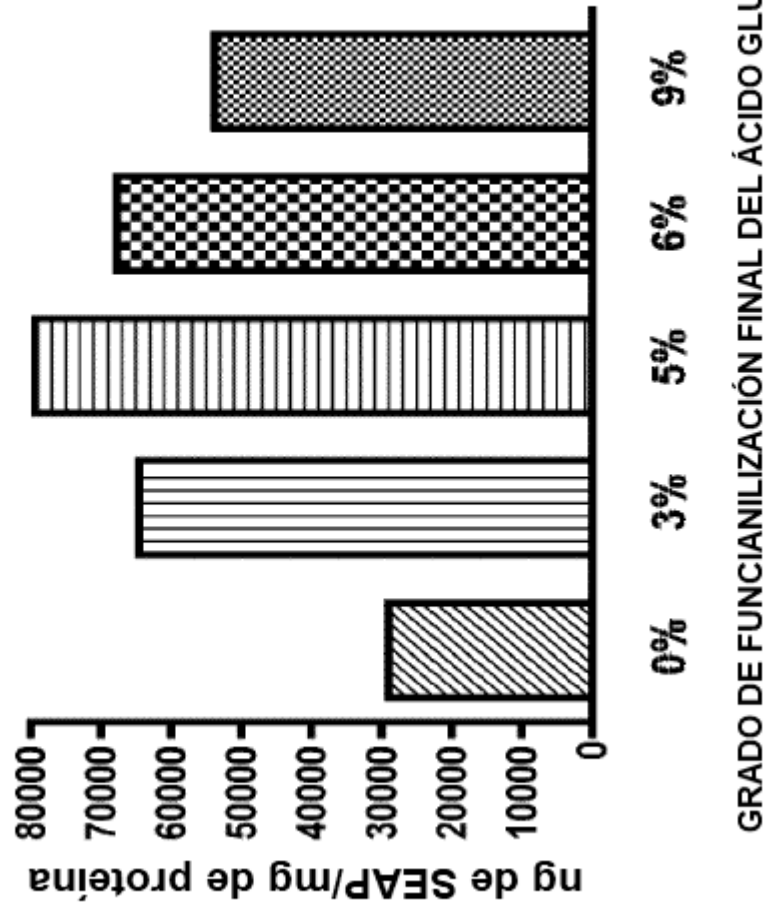




FIG. 5

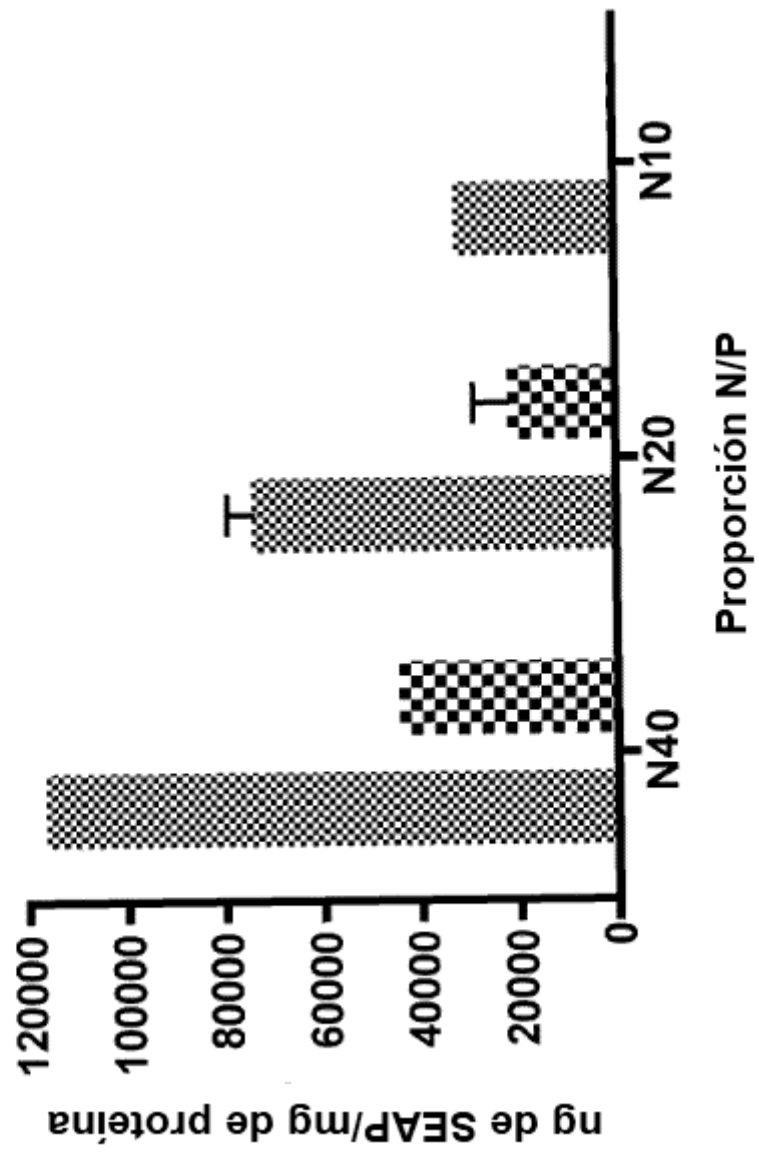


FIG. 6

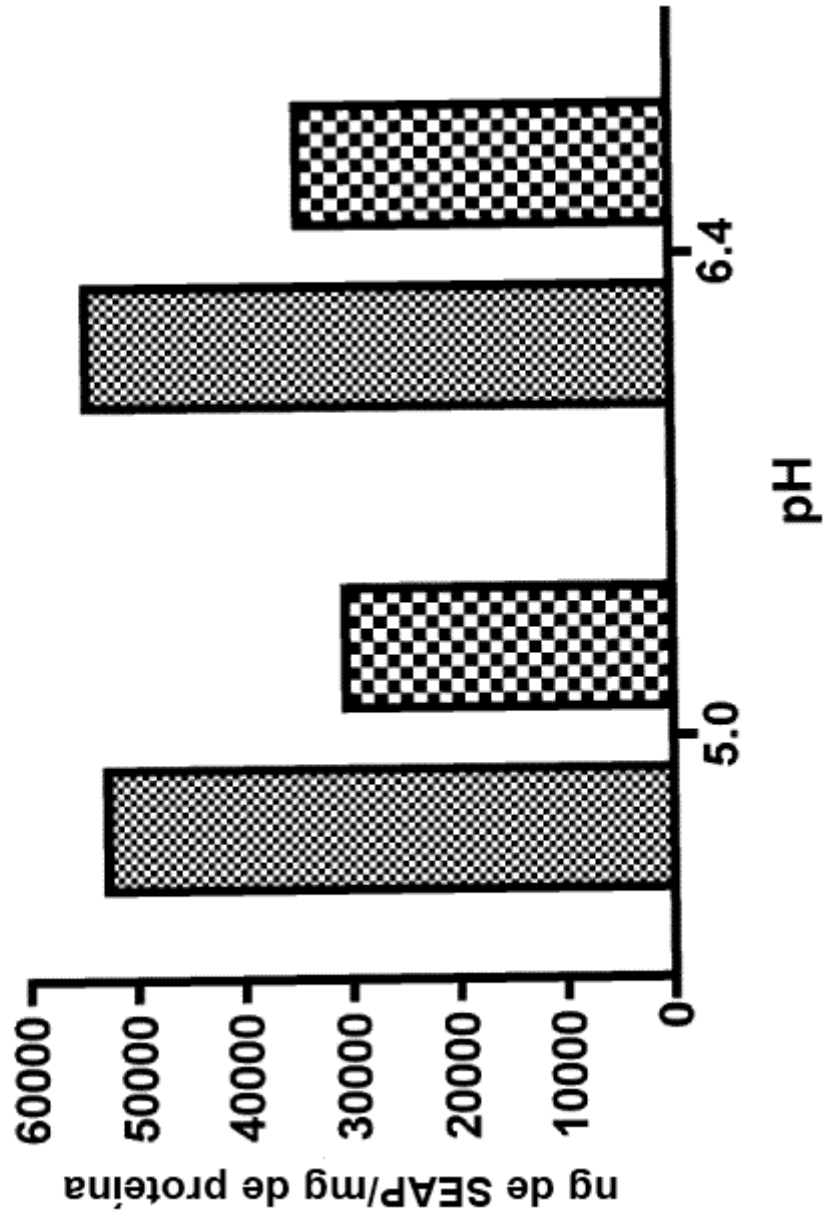


FIG. 7

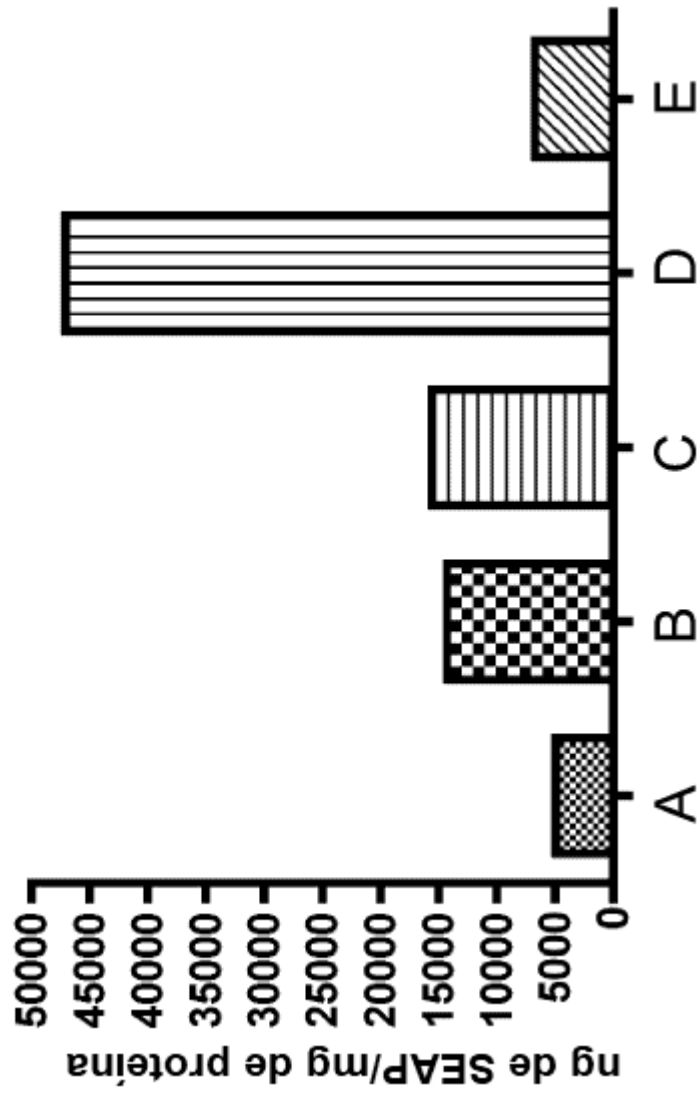


FIG. 8A

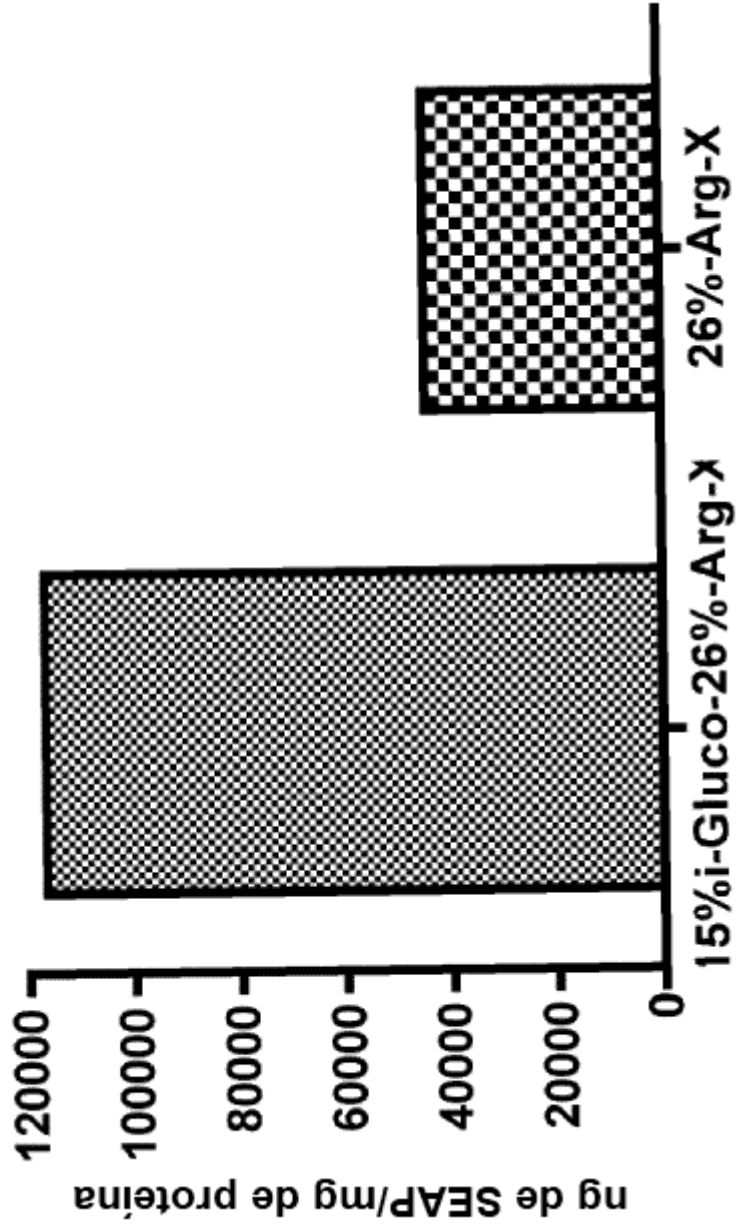


FIG. 8B

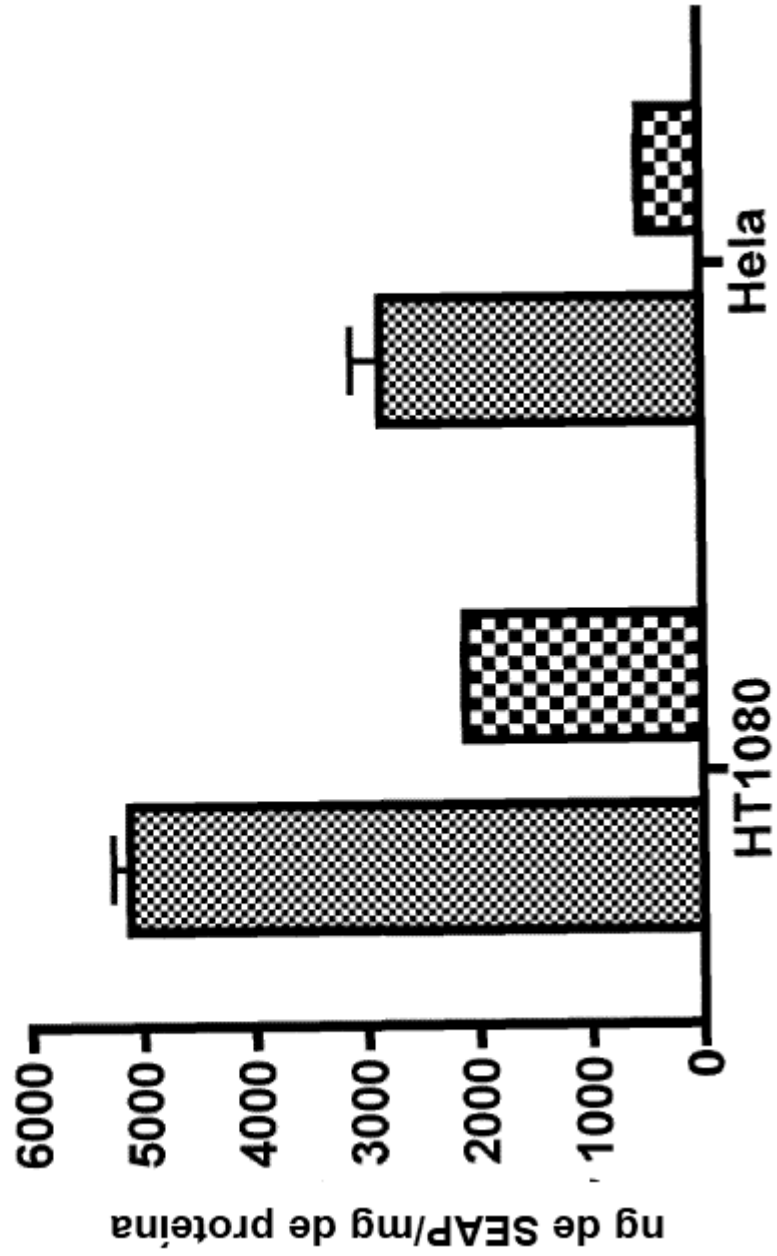


FIG. 8C

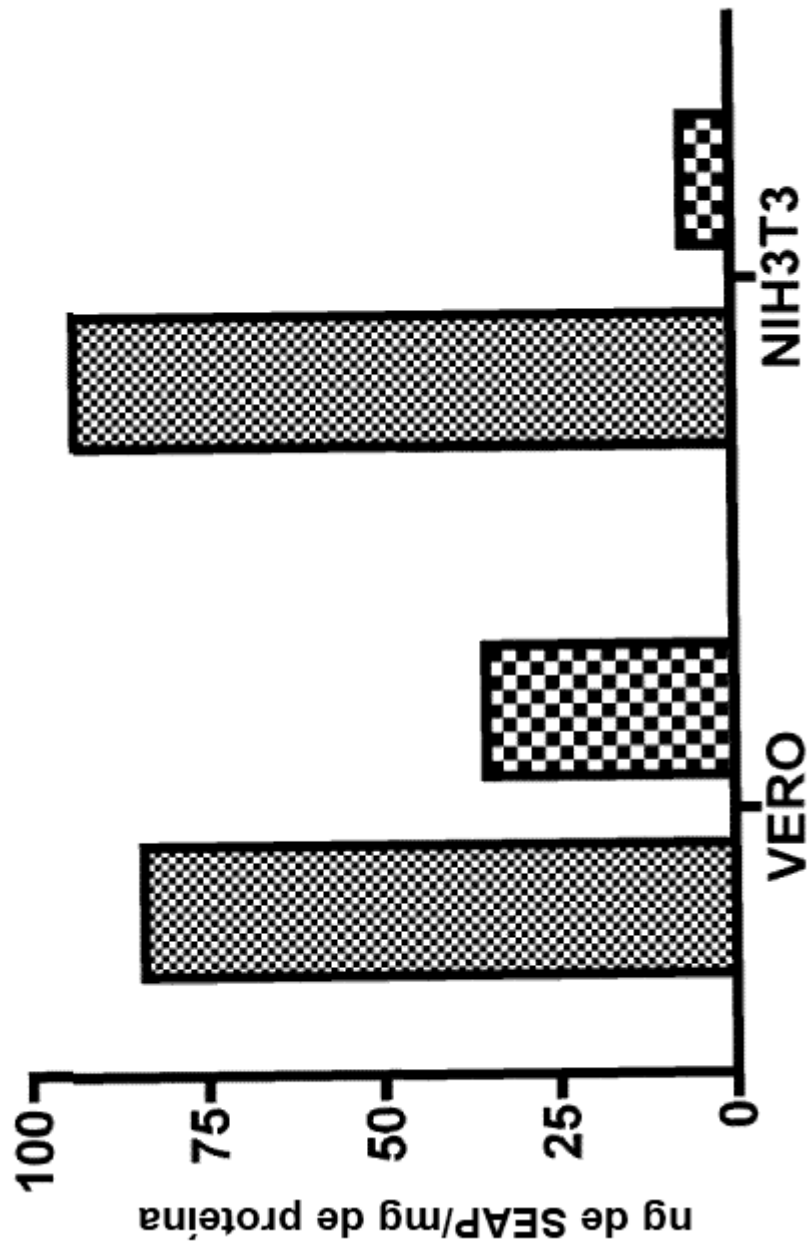


FIG. 9

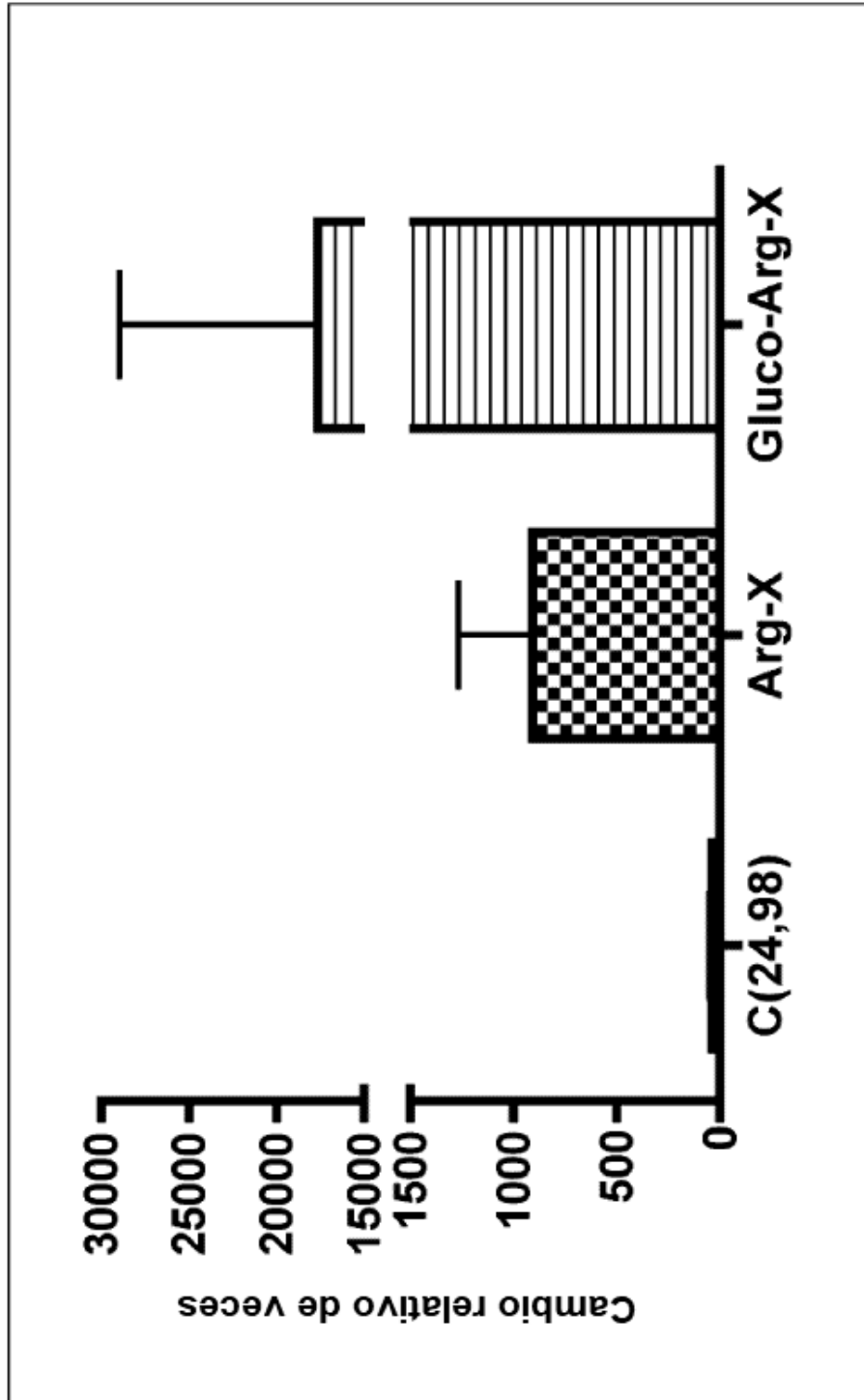


FIG. 10

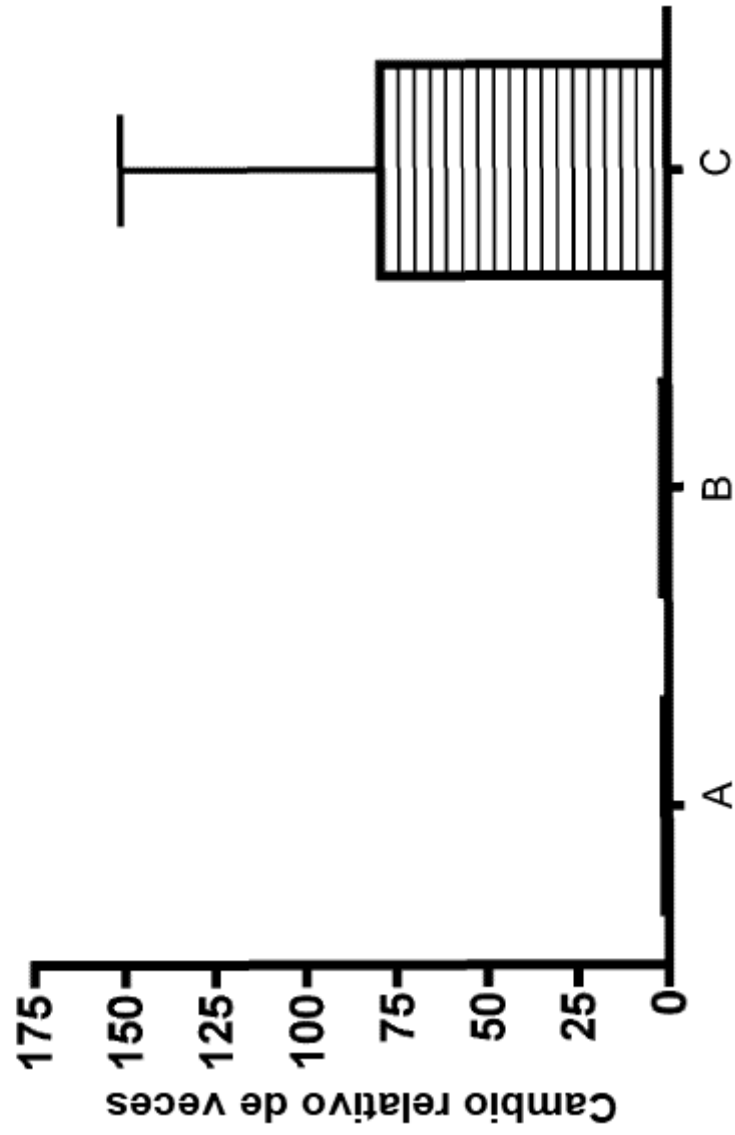




FIG. 11

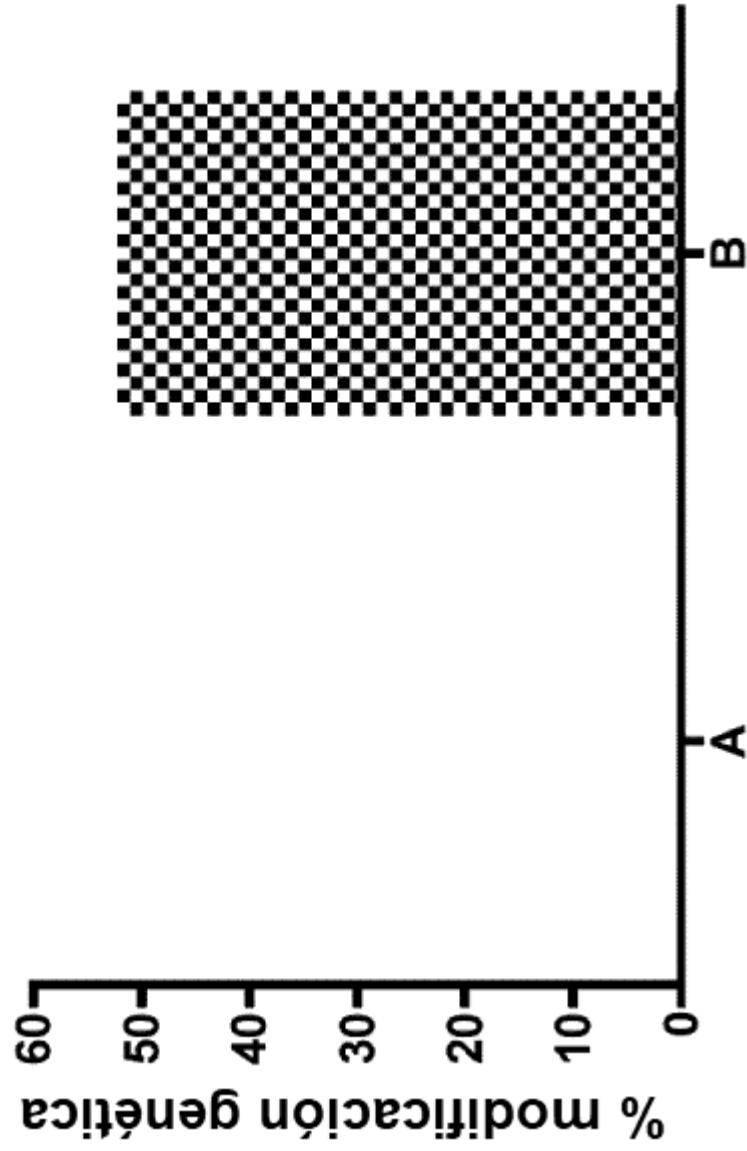


FIG. 12

| Prueba                            | Criterio de Aceptación | DD-EG-10 Congelado      | DD-EG-10 Liofilizado    | DD-EG-10 Liofilizado (después de 3 Mes) |
|-----------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| Plásmidos                         |                        | CMV-hIL-10              | CMV-hIL-10              | CMV-hIL-10                              |
| [ADN]                             |                        | 900 ug/ml (Lote 192-92) | 900 ug/ml (Lote 192-92) | 900 ug/ml (Lote 192-92)                 |
| <b>Propiedades fisicoquímicas</b> |                        |                         |                         |   |
| pH                                | 5.5-6.5                | 6.0                     | 6.0                     | 6.0                                     |
| Tamaño (nm)                       | <200nm                 | 96                      | 99                      | 99                                      |
| Potencial zeta (mV)               | >30 mV                 | 30                      | 29                      | 30                                      |
| PDI                               | <0.25                  | 0.081                   | 0.076                   | 0.09                                    |
| Estabilidad @ RT O/N              | Tamaño & PDI           | 96nm, 0.099             | 100nm, 0.101            | 97nm, 0.100                             |
| <b>Pureza</b>                     |                        |                         |                         |   |
| Ningún complejo de ADN (AGE)      | Sin ADN libre          | Sin ADN libre           | Sin ADN libre           | Sin ADN libre                           |