



## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 030231 5

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 2

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 48031918000124

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rua Quirino de Andrade, 215

**Cidade:** São Paulo

**Estado:** SP

**CEP:** 01049-010

**País:** Brasil

**Telefone:** 11 56270217

**Fax:** 11 56270103

**Email:** auin@unesp.br

**Nome ou Razão Social:** VALORISATION RECHERCHE HSCM, LIMITED PARTNERSHIP

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:**

**Nacionalidade:** Canadense

**Qualificação Jurídica:** Pessoa Jurídica

**Endereço:** 3, Place Ville-Marie, Bureau 12350, Niveau L, nº 150

**Cidade:** Montreal

**Estado:**

**CEP:**

**País:** CANADÁ

**Telefone:** (11) 339 37904

**Fax:**

**Email:** auin@unesp.br

## Dados do Pedido

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE DIETIL(AMINO)ETIL QUITOSANA (CH-DEAE), DERIVADOS OBTIDOS, SEU USO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS À BASE DESTES DERIVADOS, NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS OBTIDAS E USOS DAS MESMAS

**Resumo:** A presente invenção faz referência a um processo de obtenção de derivados de dietil(amino)etil quitosana ligados a um LIGANTE via cadeias de poli(etileno-glicol) (PEG), assim como aos referidos derivados obtidos e seus usos. Além disso, a presente invenção refere-se a um processo de obtenção de nanopartículas multifuncionais à base desses derivados, bem como às nanopartículas obtidas e seus usos para a transferência gênica não viral, com o objetivo de tratar doenças de origem genética que tenham sido herdadas ou adquiridas, em particular os tratamentos via terapia gênica. Em uma modalidade preferida, a presente invenção se refere às nanopartículas de dietilaminoetil-quitosana-PEG-folato-siRNA-TNF-alfa (CH-DEAE-PEG-folato-siRNA-TNF $\zeta$ ) obtidas conforme processo descrito, para o tratamento de artrite reumatoide, psoríase, doença de CROHN e outras doenças inflamatórias.

**Figura a publicar:** 2

## Dados do Procurador

---

### Procurador:

**Nome ou Razão Social:** Fabíola de Moraes Spiandorello

**Numero OAB:** 244141SP

**Numero API:**

**CPF/CNPJ:** 13521027813

**Endereço:** Rua Faustina Barbosa Stackfleth, 149, Parque Centenário

**Cidade:** Jundiaí

**Estado:** SP

**CEP:** 13214-773

**Telefone:** (11) 992340347

**Fax:**

**Email:** spianfm@terra.com.br

## Dados do Inventor (72)

---

### Inventor 1 de 7

**Nome:** MARCIO JOSÉ TIERA

**CPF:** 04823780850

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Av. Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth

**Cidade:** São José do Rio Preto

**Estado:** SP

**CEP:** 15054-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (11) 339 37904

**Fax:**

**Email:** auin@unesp.br

### Inventor 2 de 7

**Nome:** ISADORA PFEIFER DALLA PICOLA

**CPF:** 81908601000

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** Av. Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth

**Cidade:** São José do Rio Preto

**Estado:** SP

**CEP:** 15054-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (11) 339 37904

**Fax:**

**Email:** auin@unesp.br

### Inventor 3 de 7

**Nome:** FRANCIELE DE PAULA PANSANI OLIVEIRA

**CPF:** 33701874859

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação

**Endereço:** Av. Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth

**Cidade:** São José do Rio Preto

**Estado:** SP

**CEP:** 15054-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (11) 339 37904

**Fax:**

**Email:** auin@unesp.br

**Inventor 4 de 7**

**Nome:** VERA APARECIDA DE OLIVEIRA TIERA

**CPF:** 05131912830

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Professor do ensino superior

**Endereço:** Av. Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth

**Cidade:** São José do Rio Preto

**Estado:** SP

**CEP:** 15054-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (11) 339 37904

**Fax:**

**Email:** auin@unesp.br

**Inventor 5 de 7**

**Nome:** JÚLIO CESAR FERNANDES

**CPF:** 56760590953

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** 1010, Raphaël Crescent, J4X 2E4

**Cidade:** Brossard (Quebec)

**Estado:**

**CEP:**

**País:** CANADÁ

**Telefone:** (11) 339 37904

**Fax:**

**Email:** auin@unesp.br

**Inventor 6 de 7**

**Nome:** QIN SHI

**CPF:**

**Nacionalidade:** Canadense

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** 420, Roy Avenue, Dorval, H9S 3E1

**Cidade:** Dorval (Quebec)

**Estado:**

**CEP:**

**País:** CANADÁ

**Telefone:** (11) 339 37904

**Fax:**

**Email:** auin@unesp.br

**Inventor 7 de 7**

**Nome:** MOHAMED BENDERDOUR

**CPF:**

**Nacionalidade:** Canadense

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** 5191, Perron Street, H8Z 2J8

**Cidade:** Pierrefonds (Quebec)

**Estado:**

**CEP:**

**País:** CANADÁ

**Telefone:** (11) 339 37904

**Fax:**

**Email:** auin@unesp.br

### Documentos anexados

---

| <b>Tipo Anexo</b>                   | <b>Nome</b>   |
|-------------------------------------|---|
| Comprovante de pagamento de GRU 200 | 15AUIN017 - QUITOSANA - GRU.pdf                           |
| Procuração                          | 15AUIN017 - QUITOSANA - POA<br>VALORISATION RECHERCHE.pdf |
| Procuração                          | PROCURACAO UNESP LEOPOLDO-FABIOLA<br>2016.pdf             |
| Portaria                            | DOESP_Nomeacao_Durigan_Marilza.pdf                        |
| Relatório Descritivo                | 15AUIN017 - QUITOSANA - RELATORIO<br>DESCRITIVO.pdf       |
| Reivindicação                       | 15AUIN017 - QUITOSANA -<br>REIVINDICACOES.pdf             |
| Desenho                             | 15AUIN017 - QUITOSANA - DESENHOS.pdf                      |
| Resumo                              | 15AUIN017 - QUITOSANA - RESUMO.pdf                        |

### Acesso ao Patrimônio Genético

---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

### Declaração de veracidade

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

001-9

## RECIBO DO SACADO

Local de Pagamento

Pagável em qualquer Banco

Vencimento

Contra-apresentação

Cedente

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Agência/Código Cedente

2234-9/333.028-1

Data do Documento

Nº documento

22/09/2016

1607579680

Espécie doc

RC

Acerte

N

Data Proces.

22/09/2016

Nosso Número

00.000.2.2.16.0757968.0

Uso Banco

Carteira

18/027

Espécie

RS

Quantidade

Valor

(-) Valor Documento

RS 70,00

Número:

NN Complementar:

Petição: Eletrônica

(-) Desconto/Abatimento

Natureza: 10 - Patente de

Cod

Serviço

Peção Vinculada RPI Valor

- RS 70,00

(-) Outras deduções

(+)/Mora/Multa

(+)/Outros Acréscimos

(-) Valor Cobrado

RS 70,00

OAB: 23503/SP

Procurador: Leopoldo Campos Zuanetti

Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança

Sacado

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010

Sacador/Avalista

Corte na linha pontilhada



Autenticação mecânica - Controle Cedente

001-9

00199.53637 10000.022169 07579.680211 1 00000000007000

Local de Pagamento

Pagável em qualquer Banco

Vencimento

Contra-apresentação

Cedente

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Agência/Código Cedente

2234-9/333.028-1

Data do Documento

Nº documento

22/09/2016

1607579680

Espécie doc

RC

Acerte

N

Data Proces.

22/09/2016

Nosso Número

00.000.2.2.16.0757968.0

Uso Banco

Carteira

18/027

Espécie

RS

Quantidade

Valor

(-) Valor Documento

RS 70,00

Instruções:

1. Valores expressos em reais.
2. Pagamento em cheque, anotar no verso o 'Nosso Número'.
3. Pagamento via SIAFI(OB-FATURA): Identificar na 'ob' o 'Nosso Número'.
4. Vencimento contra apresentação.

(-) Desconto/Abatimento

(-) Outras deduções

(+)/Mora/Multa

(+)/Outros Acréscimos

(-) Valor Cobrado

RS 70,00

OAB: 23503/SP

Procurador: Leopoldo Campos Zuanetti

Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança

Sacado

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010

Sacador/Avalista



Corte na linha pontilhada

Autenticação mecânica - Ficha de Compensação

- GRU ÚNICA: a GRU apresentada ao INPI, como comprovante da retribuição, deve ser única. Não utilize cópias desta GRU para outro pagamento.- PAGAMENTO: o pagamento da GRU deve ser providenciado no PRAZO ADMINISTRATIVO, regulamentado em lei ou Ato Normativo próprio.

**FUNDAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP FUNDUNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 13-002911-5****DETALHE DO COMPROMISSO**

**Convênio:** 0033-0239-004900019792 **Conta de Débito:** 0239-000130027340  
**Tipo do Documento:** CNPJ **CPF/CNPJ do Fornecedor:**  
**Nome do Fornecedor:** 000009853INPI - INST. NACIONAL  
**No. compromisso banco:** 1023666000200007 **No. compromisso cliente:** 757968/DS1 1011  
**Tipo de Pagamento:** BLQ Outros  
**Código de Barras:** 00199536371000002216907579680211100000000007000  
**Valor Nominal:** 70,00  
**Desc./Abat.:** 0,00 **Juros:** 0,00  
**Data de Vencimento:** 10/10/2016  
**Data de Pagamento:** 10/10/2016  
**Situação:** Efetivado **No. Protocolo:** PGTFORNB10102016900115618  
**No. Lista de Débito:**  
**Autenticação:**

**Valor a Pagar: 70,00**

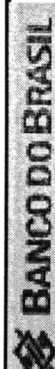
**Tipo de Serviço:** Pagamento Fornecedor  
**Complemento do Tipo de Serviço:**

**Emitir Aviso:** Não emitir

**Central de Atendimento Santander Empresarial** 4004-2125 (Regiões Metropolitanas)  
0800 726 2125 (Demais Localidades)

**SAC 0800 762 7777**  
**Ouvidoria 0800 726 0322**

[retornar](#)[imprimir](#)



001-9

RECIBO DO SACADO

Local de Pagamento

Pagável em qualquer Banco

Cedente

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Nº documento  
1609970835

Data do Documento  
09/12/2016

Uso Banco  
Carteira  
18/086

Especie doc.  
RC

Acerto  
N

Data Process.  
09/12/2016

Valor

Nosso Número  
00.000.2.8.16.0997083.5

(-) Valor Documento

RS 105,00

Número:  
NN Complementar: 0000221607579080

Participamento: Papel

Cod  
800 - Complementação de retribuição

Serviço  
Petição Vinculada RPI Valor  
RS 105,00

OAB: 23503/SP

Procurador: Leopoldo Campos Zuareti

Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança

Sacado

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010

Sacador/Avalista

Corte na linha pontilhada

Autenticação mecânica - Controle Cedente



Vencimento

Contra-apresentação

Agência Código Cedente

2234-9/333.028-1

09/12/2016

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

003/008 20/57

## COMMON REPRESENTATIVE / PROCURAÇÃO

**VALORISATION RECHERCHE HSCM, LIMITED PARTNERSHIP**, acting through its general partner **Gestion Univalor, Limited Partnership**, itself acting through its general partner **Univalor Inc.**, and having its head office at 3, Place Ville-Marie, Bureau 12350, niveau L, # 150, Montreal (Quebec) H3B 0E7, hereby grants powers to **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**, a special regime state autarchy created under Law nº 952 dated 30.01.1976, registered address Rua Quirino de Andrade, 215, ZIP CODE 01.049-010, in São Paulo (SP), Brazil, duly registered with CNPJ/MF 48.031.918/0001-24, represented under the terms of its Statutes by its President, or any legal substitute, to represent the grantor before the competent federal, state and municipal governmental agencies and authorities in Brazil, for the purposes of obtaining and maintaining intellectual property rights, such as patents of invention and utility models, certificates of addition to patents of invention, registration of trade, service, collective and certification marks as well as registration of geographical indications, and of industrial designs and software. To that end, the grantee is empowered to apply for renewal of protection, make declarations, file oppositions, contestations, replies or appeals; request voluntary reversal of decisions, respond to oppositions and appeals, have access to the official records; comply with official requirements; present written or oral defences; desist, answer, settle, and/or effect payments and receive returns, and emit the respective receipts, of official fees of any nature, including governmental taxes; receive, submit and withdraw documents; apply for and reply to applications for forfeiture; initiate or submit replies to administrative nullity proceedings; apply for or contest applications for compulsory licenses; comply with any formal requirements; apply for the recordal of transfer of title and ownership, and/or change of name and address; apply for inventors assignments; apply for the recordal of patent, design and trade mark license agreements as well as of any agreements related to intellectual property rights and transfer of know-how and, finally, to take any steps necessary in order to defend the interests of the grantor. The grantee is further entitled to substitute the powers hereby granted, in whole or in part. Any acts previously practised by the grantee on behalf of the grantor are hereby expressly ratified, everything regarding the patent application named **PREPARATION METHOD OF DIETHYLETHYLAMINE-CHITOSAN DERIVATIVES (DEAE-CH), DERIVATIVES AND USE THEREOF, PREPARATION METHOD OF MULTIFUNCTIONAL NANOPARTICLES BASED ON SUCH DERIVATIVES, MULTIFUNCTIONAL PARTICLES AND USE THEREOF.**

**VALORISATION RECHERCHE HSCM, LIMITED PARTNERSHIP**, agindo por meio de sua parceira geral **Gestion Univalor, Limited Partnership**, por meio de seu quotista geral **Univalor Inc.**, e tendo a sua sede na 3, Place Ville-Marie, Bureau 12350, niveau L, nº 150, Montreal (Quebec) H3B 0E7, pela presente outorga poderes à **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, nº 215, Centro, CEP 01.049-010, em São Paulo (SP), Brasil, inscrita no CNPJ do MF sob nº 48.031.918/0001-24, representada nos termos de seu Estatuto por seu Magnífico Reitor, ou quem legalmente o substitua, para representar a Outorgante perante as autoridades e órgãos governamentais federais, estaduais e municipais do Brasil, com vistas a obter e manter a proteção de direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção e de modelo de utilidade, certificado de adição de invenção, registro de marca de produto e de serviço, de marca coletiva, de marca de certificação e das indicações geográficas, registro de desenho industrial, registro de programa de computador, podendo, para tanto, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, de taxas, retribuições e impostos, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, firmar termos de cessão de inventores, alterações de nome e de sede, de contratos de licença de exploração de patente, de licença de uso de marca, de licença de uso de desenho industrial, bem como de qualquer outro contrato que envolva propriedade intelectual e transferência de tecnologia, promover notificações, interpelações e protestos extrajudiciais e mais quaisquer outros atos em defesa dos interesses da Outorgante e, ainda, substabelecer, no todo ou em parte, os presentes poderes, ficando expressamente ratificados todos os atos anteriormente praticados pela outorgada em nome da outorgante, tudo especialmente para o pedido de depósito de patente intitulado **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE DIETIL(AMINO)ETIL QUITOSANA (CH-DEAE), DERIVADOS OBTIDOS, SEU USO, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS À BASE DESTES DERIVADOS, NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS OBTIDAS E USOS DAS MESMAS.**

Montréal,  2016.

**VALORISATION RECHERCHE HSCM, LIMITED PARTNERSHIP**, acting through its general partner **Gestion Univalor, Limited Partnership**, itself acting through its general partner **Univalor Inc.**

**Jacques Simoneau**  
President and CEO


15AUI017

VAL-1441-UM

**PROCURAÇÃO**

Por este instrumento, a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30/01/1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, nº 215, Centro, CEP 01049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ do MF sob o nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente **UNESP**, neste ato representada por seu Magnífico Reitor, de acordo com o Art. 34 de seu Estatuto, Prof. Dr. **JÚLIO CEZAR DURIGAN**, brasileiro, casado, professor universitário, portador do RG nº 5.872.573-3 SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 833.745.238-20, ou quem legalmente o substitua, nomeia e constitui seus procuradores, **1) LEOPOLDO CAMPOS ZUANETI**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 235.031; e **2) FÁBIO DE MORAES SPIANDORELLO**, brasileira, advogada, devidamente inscrita na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo, Subseção de Jundiaí sob o número 244.141, ambos lotados junto à Agência UNESP de Inovação, outorgando-lhes poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópia, termos de cessão de direitos, acordos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade industrial, incluindo, mas não se limitando, aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e de sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

Este instrumento é válido até 31 de janeiro de 2017.

  
Julio Cezar Durigan  
Reitor

São Paulo, 7 de janeiro de 2016.

# 9.º TABELIÃO DE NOTAS

Rua Marconi, 124 • 1.º ao 6.º andar • CEP 01047-006 São Paulo/SP  
Escritório de Cartório  
Telefones: (11) 3258-2611 - Fax: (11) 2174-6858  
www.nonocartorio.com.br

Reconheço a 1 firma sem valor econômico por semelhança de **JULIO CEZAR DURIGAN**, do que dou fé.

Em tes.º da verdade. **GUSTAVO FONTANA ANDOLPHO** -  
São Paulo Capital, 7 de janeiro de 2016. Valor recebido R\$ **4,80**  
\*Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba\*





# Diário Oficial

Estado de São Paulo  
Geraldo Alckmin - Governador

PODER  
Executivo

SEÇÃO I

Palácio dos Bandeirantes Av. Morumbi 4.500 Morumbi São Paulo CEP 05650-000 Tel. 2193-8000

Volume 122 • Número 198 • São Paulo, sexta-feira, 19 de outubro de 2012

www.imprensaoficial.com.br

Imprensa oficial

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO

## Decretos

DECRETO Nº 58.467,  
DE 18 DE OUTUBRO DE 2012

Dispõe sobre abertura de crédito suplementar ao Orçamento Fiscal na Secretaria de Gestão Pública, visando ao atendimento de Despesas Correntes

GERALDO ALCKMIN, Governador do Estado de São Paulo, no uso de suas atribuições legais, considerando o disposto no Artigo 8º da Lei nº 14.675, de 28 de dezembro de 2011, e de conformidade com a legislação discriminada na Tabela 3, anexa:

Artigo 1º - Fica aberto um crédito de R\$ 4.167.344,00 (Quatro milhões, cento e sessenta e sete mil, trezentos e quarenta e quatro reais), suplementar ao orçamento da Secretaria de Gestão Pública, observando-se as classificações Institucional, Econômica, Funcional e Programática, conforme a Tabela 1, anexa.

Artigo 2º - O crédito aberto pelo artigo anterior será coberto com recursos a que alude o inciso III, do § 1º, do artigo 43, da Lei Federal nº 4.320, de 17 de março de 1964, combinado com o Artigo 8º, § 2º, Item 1, da Lei nº 14.675, de 28 de dezembro de 2011, e de conformidade com a legislação discriminada na Tabela 3, anexa.

Artigo 3º - Este decreto entra em vigor na data de sua publicação, retroagindo seus efeitos à 26 de maio de 2012. Palácio dos Bandeirantes, 18 de outubro de 2012

GERALDO ALCKMIN

Andréa Sandra Calabi

Secretária da Fazenda

Julio Francisco Semeghini Neto

Secretário de Planejamento e Desenvolvimento Regional

Sidney Estanislau Beraldo

Secretário-Chefe da Casa Civil

Publicado na Casa Civil, aos 18 de outubro de 2012.

| TABELA 1                                      |    | SUPLEMENTAÇÃO |       | VALORES EM REAIS |              |
|---|----|---------------|-------|------------------|--------------|
| ORGÃO/O.FE/PROGRAMÁTICA                       | FR | GD            | VALOR | FR               | GD           |
| 44000 SECRETARIA DE GESTÃO PÚBLICA            |    |               |       |                  |              |
| 4001 SECRETARIA DE GESTÃO PÚBLICA             |    |               |       |                  |              |
| 339039 OUTROS SERV DE TERCEIROS               |    |               |       |                  |              |
|   |    |               |       | 1                | 700.000,00   |
| 449052 EQUIPAMENTOS E MATERIAL PERMANENTE     |    |               |       | 1                | 3.467.344,00 |
| TOTAL   |    |               |       | 1                | 4.167.344,00 |
| FUNCCIONAL PROGRAMÁTICA                       |    |               |       |                  |              |
| 04.126.4401.5948 APOIO TÉCNICO ADMINISTRATIVO |    |               |       | 3                | 700.000,00   |
| 04.126.4410.5636 GERENCIAMENTO DO ACESSA      |    |               |       | 1                | 3.467.344,00 |
| SÃO PAULO                                     |    |               |       | 4                | 3.467.344,00 |
| TOTAL   |    |               |       | 4                | 3.467.344,00 |

| TABELA 2                                 |    | REDUÇÃO |       | VALORES EM REAIS |              |
|--|----|---------|-------|------------------|--------------|
| ORGÃO/O.FE/PROGRAMÁTICA                  | FR | GD      | VALOR | FR               | GD           |
| 44000 SECRETARIA DE GESTÃO PÚBLICA       |    |         |       |                  |              |
| 4001 SECRETARIA DE GESTÃO PÚBLICA        |    |         |       |                  |              |
| 339039 OUTROS SERV DE TERCEIROS          |    |         |       |                  |              |
|  |    |         |       | 1                | 700.000,00   |
| 449039 OUTROS SERVIÇOS DE TERCEIROS      |    |         |       | 1                | 3.467.344,00 |
| PESSOA JURÍDICA                          |    |         |       | 1                | 3.467.344,00 |
| TOTAL                                    |    |         |       | 4                | 3.467.344,00 |
| FUNCCIONAL PROGRAMÁTICA                  |    |         |       |                  |              |
| 04.126.4410.5636 GERENCIAMENTO DO ACESSA |    |         |       | 3                | 700.000,00   |
| SÃO PAULO                                |    |         |       | 1                | 3.467.344,00 |
| TOTAL                                    |    |         |       | 4                | 3.467.344,00 |

| TABELA 3                  |            | MARGEM ORÇAMENTARIA       |              | VALORES EM REAIS          |            |
|---------------------------|------------|---------------------------|--------------|---------------------------|------------|
| RECURSOS DISPONÍVEIS      |            | RECURSOS DISPONÍVEIS      |              | RECURSOS DISPONÍVEIS      |            |
| ESPECIFICAÇÃO/VALOR TOTAL | VINCULADOS | ESPECIFICAÇÃO/VALOR TOTAL | VINCULADOS   | ESPECIFICAÇÃO/VALOR TOTAL | VINCULADOS |
| LEI ART PAR INC ITEM      |            |                           |              |                           |            |
| 14675 8º 1º               | 2          | 4.167.344,00              | 4.167.344,00 | 0,00                      |            |
| TOTAL GERAL               |            | 4.167.344,00              | 4.167.344,00 | 0,00                      |            |

DECRETO Nº 58.468,  
DE 18 DE OUTUBRO DE 2012

Declara de utilidade pública, para fins de desapropriação, pela CONCESSIONÁRIA AUTO RAPOSO TAVARES S.A., imóveis necessários às obras de implantação de dispositivo tipo 4), no km 591+970m da Rodovia Raposo Tavares, SP-270, Município e Comarca de Presidente Bernardes, no trecho que especifica e dá providências correlatas

GERALDO ALCKMIN, Governador do Estado de São Paulo, no uso de suas atribuições legais e nos termos dos artigos 2º e 6º do Decreto-Lei federal nº 3.365, de 21 de junho de 1941, alterado pela Lei federal nº 2.786, de 21 de maio de 1956, e do disposto no Decreto estadual nº 53.311, de 8 de agosto de 2008.

Decreto:

Artigo 1º - Ficam declarados de utilidade pública, para fins de desapropriação pela CONCESSIONÁRIA AUTO RAPOSO TAVARES S.A., empresa concessionária de serviço público, por via amigável ou judicial, imóveis descritos na planta cadastral de código nº DE-SPD591270-591.592-616-D03/001 e memo-

riais descritivos constantes do processo ARTESP-13.15712-SIT, necessários às obras de implantação de dispositivo (tipo 4), no km 591+970m da Rodovia Raposo Tavares, SP-270, Município e Comarca de Presidente Bernardes, com área total de 64.453,15m² (sessenta e quatro mil, quatrocentos e cinquenta e três metros quadrados e quinze decímetros quadrados), dentro dos perímetros a seguir descritos, imóveis estes que constam pertencer aos proprietários, a saber:

I - área 1 - a área a ser desapropriada, conforme planta nº DE-SPD591270-591.592-616-D03/001, situa-se no km 591+883m da Rodovia Raposo Tavares, SP-270, Município e Comarca de Presidente Bernardes, que consta pertencer a Yvonne Neves Baptista Cardoso e/ou outros, com linha de divisa partindo do ponto denominado 1 de coordenadas N=7565274,487625 e E=437305,855295, sendo constituída pelos segmentos a seguir relacionados: segmento 1-2 - em linha reta com azimute 275º52'58", distância de 268,82m; segmento 2-3 - em linha reta com azimute 300º29'39", distância de 13,02m; segmento 3-4 - em linha reta com azimute 30º40'5", distância de 13,62m; segmento 4-5 - em linha reta com azimute 31º3'28", distância de 19,17m; segmento 5-6 - em linha reta com azimute 31º12'10", distância de 17,40m; segmento 6-7 - em linha reta com azimute 31º11'11", distância de 35,18m; segmento 7-8 - em linha reta com azimute 30º54'11", distância de 12,62m; segmento 8-9 - em linha reta com azimute 28º46'50", distância de 13,60m; segmento 9-10 - em linha reta com azimute 120º46'44", distância de 9,21m; segmento 10-11 - em linha reta com azimute 120º20'21", distância de 20,49m; segmento 11-12 - em linha reta com azimute 120º35'50", distância de 19,13m; segmento 12-13 - em linha reta com azimute 120º15'33", distância de 18,79m; segmento 13-14 - em linha reta com azimute 120º34'47", distância de 19,46m; segmento 14-15 - em linha reta com azimute 120º23'34", distância de 12,17m; segmento 15-16 - em linha reta com azimute 119º54'39", distância de 19,04m; segmento 16-17 - em linha reta com azimute 120º28'34", distância de 20,64m; segmento 17-18 - em linha reta com azimute 119º57'38", distância de 17,38m; segmento 18-19 - em linha reta com azimute 120º37'26", distância de 10,82m; segmento 19-20 - em linha reta com azimute 120º18'20", distância de 21,19m; segmento 20-21 - em linha reta com azimute 120º51'57", distância de 19,91m; segmento 21-22 - em linha reta com azimute 119º54'3", distância de 19,38m; segmento 22-23 - em linha reta com azimute 121º3'50", distância de 20,63m; segmento 23-1 - em linha reta com azimute 120º14'27", distância de 13,80m, perfazendo uma área de 15.613,10m² (quinze mil, seiscentos e treze metros quadrados e dez decímetros quadrados);

II - área 2 - a área a ser desapropriada, conforme planta nº DE-SPD591270-591.592-616-D03/001, situa-se no km 592+000m da Rodovia Raposo Tavares, SP-270, Município e Comarca de Presidente Bernardes, que consta pertencer a Angelo Munhoz Benko e/ou outros, com linha de divisa partindo do ponto denominado 1 de coordenadas N=7565316,627529 e E=437013,680698, sendo constituída pelos segmentos a seguir relacionados: segmento 1-2 - em linha reta com azimute 300º29'39", distância de 16,96m; segmento 2-3 - em linha reta com azimute 325º11'31", distância de 271,93m; segmento 3-4 - em linha reta com azimute 120º26'44", distância de 10,90m; segmento 4-5 - em linha reta com azimute 120º33'55", distância de 19,21m; segmento 5-6 - em linha reta com azimute 120º34'30", distância de 168,47m; segmento 6-7 - em linha reta com azimute 121º46'27", distância de 6,62m; segmento 7-8 - em linha reta com azimute 120º42'44", distância de 20,38m; segmento 8-9 - em linha reta com azimute 120º37'12", distância de 20,46m; segmento 9-10 - em linha reta com azimute 145º22'48", distância de 22,07m; segmento 10-11 - em linha reta com azimute 209º57'54", distância de 17,75m; segmento 11-12 - em linha reta com azimute 211º24'14", distância de 35,73m; segmento 12-13 - em linha reta com azimute 212º39'33", distância de 17,44m; segmento 13-14 - em linha reta com azimute 212º10'47", distância de 17,30m; segmento 14-1 - em linha reta com azimute 212º15'38", distância de 15,66m, perfazendo uma área de 15.983,42m² (quinze mil, novecentos e oitenta e três metros quadrados e quarenta e dois decímetros quadrados);

III - área 3 - a área a ser desapropriada, conforme planta nº DE-SPD591270-591.592-616-D03/001, situa-se no km 591+927m da Rodovia Raposo Tavares, SP-270, Município e Comarca de Presidente Bernardes, que consta pertencer a Afonso Arthur Neves Baptista, Teresa Araújo Neves Baptista e/ou outros, com linha de divisa partindo do ponto denominado 1 de coordenadas N=7565308,309441 e E=437350,33662, sendo constituída pelos segmentos a seguir relacionados: segmento 1-2 - em linha reta com azimute 300º6'30", distância de 16,35m; segmento 2-3 - em linha reta com azimute 300º21'11", distância de 15,68m; segmento 3-4 - em linha reta com azimute 300º40'42", distância de 18,52m; segmento 4-5 - em linha reta com azimute 300º15'22", distância de 11,34m; segmento 5-6 - em linha reta com azimute 300º44'30", distância de 17,84m; segmento 6-7 - em linha reta com azimute 300º36'17", distância de 15,43m; segmento 7-8 - em linha reta com azimute 300º15'19", distância de 15,95m; segmento 8-9 - em linha reta com azimute 300º9'54", distância de 15,70m; segmento 9-10 - em linha reta com azimute 301º25'19", distância de 14,82m; segmento 10-11 - em linha reta com azimute 300º36'56", distância de 14,98m; segmento 11-12 - em linha reta com azimute 300º17'50", distância de 18,10m; segmento 12-13 - em linha reta com azimute 300º27'10", distância de 30,98m; segmento 13-14 - em linha reta com azimute 301º2'32", distância de 33,54m; segmento 14-15 - em linha reta com azimute 299º37'40", distância de 9,28m; segmento 15-16 - em linha reta com azimute 305º1'39", distância de 13,37m; segmento 16-17 - em linha reta com azimute 297º55'22", distância de 35,44m; segmento 17-18 - em linha reta com azimute 306º31'50", distância de 17,44m;

segmento 18-19 - em linha reta com azimute 300º35'31", distância de 16,26m; segmento 19-20 - em linha reta com azimute 300º30'37", distância de 20,82m; segmento 20-21 - em linha reta com azimute 300º30'10", distância de 16,95m; segmento 21-22 - em linha reta com azimute 300º20'56", distância de 9,97m; segmento 22-23 - em linha reta com azimute 301º59'38", distância de 11,75m; segmento 23-24 - em linha reta com azimute 299º53'11", distância de 16,02m; segmento 24-25 - em linha reta com azimute 300º12'26", distância de 13,03m; segmento 25-26 - em linha reta com azimute 298º11'29", distância de 9,95m; segmento 26-27 - em linha reta com azimute 298º11'29", distância de 4,78m; segmento 27-28 - em linha reta com azimute 300º55'14", distância de 24,56m; segmento 28-29 - em linha reta com azimute 95º36'26", distância de 260,38m; segmento 29-30 - em linha reta com azimute 120º29'39", distância de 52,94m; segmento 30-1 - em linha reta com azimute 143º30'55", distância de 279,75m, perfazendo uma área de 32.856,63m² (trinta e duas mil, oitocentos e cinquenta e seis metros quadrados e sessenta e três decímetros quadrados).

Parágrafo único - Ficam excluídos da presente declaração de utilidade pública, os imóveis que pertençam a pessoas jurídicas de direito público que estejam abrangidos pelos perímetros descritos no "caput" deste artigo.

Artigo 2º - Fica a CONCESSIONÁRIA AUTO RAPOSO TAVARES S.A. autorizada a invocar o caráter de urgência no processo judicial de desapropriação, para fins do disposto no artigo 15 do Decreto-Lei federal nº 3.365, de 21 de junho de 1941, alterado pela Lei federal nº 2.786, de 21 de maio de 1956, devendo a carta de adjudicação ser expedida em nome do Departamento de Estradas de Rodagem - DER.

Artigo 3º - As despesas decorrentes da execução do presente decreto correrão por conta de verba própria da CONCESSIONÁRIA AUTO RAPOSO TAVARES S.A.

Artigo 4º - Este decreto entra em vigor na data de sua publicação.

Palácio dos Bandeirantes, 18 de outubro de 2012

GERALDO ALCKMIN

Saulo de Castro Abreu Filho

Secretário de Logística e Transportes

Sidney Estanislau Beraldo

Secretário-Chefe da Casa Civil

Publicado na Casa Civil, aos 18 de outubro de 2012.

DECRETO Nº 58.469,  
DE 18 DE OUTUBRO DE 2012

Define os parâmetros de priorização para seleção da demanda de beneficiários das unidades habitacionais a serem edificadas na execução do Programa Minha Casa Minha Vida, inserso no Programa Nacional de Habitação Urbana, com participação do Estado de São Paulo

GERALDO ALCKMIN, Governador do Estado de São Paulo, no uso de suas atribuições legais,

Considerando que o Estado de São Paulo aderiu ao Programa Federal Minha Casa Minha Vida, instituído pela Lei Federal nº 11.977, de 7 de julho de 2009, alterada pela Lei Federal nº 12.424, de 16 de julho de 2011;

Considerando que o Programa Federal é operacionalizado por meio das regras contidas na Portaria do Ministério das Cidades nº 610, de 6 de dezembro de 2011, alterada pela Portaria nº 198, de 9 de maio de 2012, que estabelece os parâmetros de priorização e o processo de seleção dos beneficiários;

Considerando a possibilidade de indicação de candidatas pelo Estado quando for o responsável pelas contrapartidas aportadas ao empreendimento, ou nos casos em que o município não possuir cadastro habitacional, mediante prévio entendimento entre os entes públicos formalizado em instrumento próprio;

Considerando que os Conselhos instituídos pela Lei nº 12.801, de 15 de janeiro de 2008, poderão estabelecer outras situações de dispensa da classificação da demanda por meio de sorteio, sem prejuízo do disposto na Lei nº 13.094, de 24 de junho de 2008, e da política estadual de habitação de interesse social e;

Considerando que o Conselho Estadual da Habitação aprovou proposta destinada a estabelecer critérios complementares aos critérios nacionais,

Decreto:

Artigo 1º - A hierarquização e seleção da demanda dos beneficiários do Programa Minha Casa Minha Vida no Estado de São Paulo em área urbana atenderá, além dos critérios nacionais, os seguintes critérios estaduais em relação à família inscrita:

I - confirmação de ao menos uma das seguintes condições de inadequação habitacional:

- a) barraco;
- b) localização em favela;
- c) cômodo em cortiço;
- d) domicílio congestionado, que tenha mais de 2 (duas) pessoas por cômodo em domicílio;

II - comprovação de dependência acima da média verificada no município, calculada com os dados demográficos do Censo 2010, considerando que a razão de dependência é a proporção de crianças e de idosos em relação à população adulta, representada pelo número de pessoas com menos de 15 (quinze) e mais de 64 (sessenta e quatro) anos de idade dividido pelo número de pessoas entre 15 (quinze) e 64 (sessenta e quatro) anos de idade;

III - comprovação de moradia ou trabalho no município do empreendimento nos últimos 3 (três) anos, a contar da data da inscrição, ou, conforme definido em lei municipal específica,

desde que o tempo de moradia ou trabalho seja igual ou superior a 3 (três) anos.

Artigo 2º - Do total das unidades habitacionais será feita reserva de 5% (cinco por cento), para atendimento aos idosos, conforme critérios adotados na política estadual de habitação de interesse social.

Artigo 3º - Do total das unidades habitacionais será feita reserva de 7% (sete por cento) para atendimento à pessoa com deficiência ou de cuja família façam parte pessoas com deficiência, conforme Lei nº 10.844, de 5 de julho de 2001.

Artigo 4º - Nos empreendimentos habitacionais do Programa Minha Casa Minha Vida com aporte de recursos estaduais, os municípios poderão indicar por meio de critérios próprios as famílias beneficiárias, desde que a inscrição e o processo de seleção tenham sido realizados de acordo com as regras federais e sido objeto de manifestação conclusiva da Secretaria de Estado da Habitação.

Artigo 5º - Este decreto entra em vigor na data de sua publicação.

Palácio dos Bandeirantes, 18 de outubro de 2012

GERALDO ALCKMIN

Silvio França Torres

Secretário da Habitação

Sidney Estanislau Beraldo

Secretário-Chefe da Casa Civil

Publicado na Casa Civil, aos 18 de outubro de 2012.

## Atos do Governador

DECRETO(S)

DECRETOS

DE 16-10-2012

Nomeando, com fundamento no § 1º do art. 7º da Lei 952-76, e nos termos do art. 30 do Estatuto da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp, aprovado pelo Dec. 29.720-89, e alterações:

Julio Cesar Durigan para exercer a função de Reitor da aludida Universidade, com mandato de 4 anos, a partir de 15-1-2013;

Marilza Vieira Cunha Rudge, para exercer a função de Vice-Reitor da aludida Universidade, com mandato de 4 anos, a partir de 15-1-2013.

(Publicado novamente por ter saído com incorreções)

DE 18-10-2012

Designando, à vista da exposição de motivos do Secretário Adjunto Respondendo pelo expediente da Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia, com efeitos a partir da vigência da LC 1.187-2012, os a seguir indicados para permanecerem como titulares dos respectivos cargos no Quadro de Pessoal da Junta Comercial do Estado de São Paulo - Jucesp:

José Constantino de Bastos Junior, RG 16.403.502-1, nomeado Presidente da Junta Comercial do Estado de São Paulo por decreto de 4-3-2011, até o término de seu mandato;

Alexandre Vaughn de Arruda Aniz, RG 19.824.038-7, nomeado Vice-Presidente da Junta Comercial do Estado de São Paulo por decreto de 4-10-2011, até o término de seu mandato;

Gisela Simiema Ceschin, RG 27.252.301-X, nomeado para o cargo de Secretário Geral da Junta Comercial do Estado de São Paulo por decreto de 2-4-2012.

## Casa Civil

FUNDO SOCIAL DE SOLIDARIEDADE DO ESTADO DE SÃO PAULO

CHEFIA DE GABINETE

Extrato de Termo de Convênio

Processo 68819/2012

Participes: O Estado de São Paulo, através do Fundo Social de Solidariedade do Estado de São Paulo e o Município de São João das Duas Pontes, por intermédio do seu Fundo Social de Solidariedade.

Objeto: Transferência de recursos materiais, consistentes no "Kit Costura", para implantação e execução do Projeto "Escola de Moda".

Valor do Convênio: R\$ 23.468,00, sendo R\$ 5.405,00 pelo FUSSESP relativos ao "Kit Costura" e R\$ 18.063,00 pelo Município.

Prazo de Vigência: 180 dias contados da data da assinatura Data da Assinatura: 17-10-2012

Extrato de Termo de Convênio

Processo 83430/2009

Participes: O Estado de São Paulo, através do Fundo Social de Solidariedade do Estado de São Paulo e a Prefeitura Municipal de São Sebastião, por intermédio do seu Fundo Social de Solidariedade.

Objeto: Transferência de recursos financeiros, a título de auxílio, para a aquisição de material para implantação da "Praça de Exercícios do Idoso".

Valor do Convênio: R\$ 117.089,94, sendo R\$ 15.000,00 pelo FUSSESP e R\$ 102.089,94 pelo Município.

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE DIETIL(AMINO)ETIL  
QUITOSANA (CH-DEAE), DERIVADOS OBTIDOS, SEU USO, PROCESSO  
DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS À BASE DESTES  
DERIVADOS, NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS OBTIDAS E USOS  
DAS MESMAS**

**Campo de aplicação:**

[001] A presente invenção se aplica no campo da ciência médica, de forma mais específica na área de preparações medicinais para terapia gênica não viral, e faz referência a um processo de obtenção de derivados de dietil(amino)etil quitosana ligados a um LIGANTE via cadeias de poli(etileno-glicol) (PEG), assim como aos referidos derivados obtidos e seus usos. Além disso, a presente invenção refere-se a um processo de obtenção de nanopartículas multifuncionais à base destes derivados, bem como às nanopartículas obtidas e seus usos para a transferência gênica não viral.

**Fundamentos da invenção:**

[002] A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, crônica, sistêmica e inflamatória caracterizada por dores, rigidez, inchaço e destruição nas articulações, evidenciada nas estruturas óssea e na cartilagem. Os pacientes são mais propensos a sofrer fraturas devido à fragilidade decorrente da osteoporose secundária e perda óssea, o que frequentemente resulta na incapacidade funcional com grande impacto econômico no sistema de saúde.

[003] O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) é considerado um dos principais responsáveis pela fisiopatologia na AR, especialmente na inflamação das articulações, na cartilagem e na reabsorção óssea. Por esta

razão, TNF- $\alpha$  tem sido escolhido como alvo, já que o bloqueio de sua produção melhora as condições de inflamação da artrite, como documentado por tratamentos que tem como alvo essa mesma citocina, e que utilizam anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$ .

[004] Outros alvos são também investigados para controlar a inflamação artrítica, tal como o receptor EP4, componentes C5 e C5aR1 do sistema complementar, *phosphatase 2* de especificidade dupla, entre outras.

[005] O RNA de interferência é uma molécula pequena (19-21 nucleotídeos) considerada um procedimento terapêutico inovador para o tratamento de várias doenças. Entretanto, além de ser carregada, sua dimensão é elevada considerando-se a captação por células, além disso, possui uma alta homologia para alvos não específicos, sendo também altamente susceptível à degradação por RNases.

[006] Portanto, um sistema de liberação eficiente é necessário para a encapsulação, transporte e proteção contra a degradação por nucleases, para que as células de interesse sejam alcançadas. Nesse sentido, para a liberação de siRNA dentro do citoplasma das células alvo, vários vetores virais e não-virais vem sendo estudados.

[007] Nos últimos anos uma grande variedade de vetores não-virais vem sendo propostos, incluindo modificações estruturais de siRNAs, de lipossomos catiônicos, polímeros, peptídeos e sistemas sítio-dirigidos.

[008] A quitosana e seus derivados têm sido utilizados como sistemas de liberação em estudos *in vitro* e *in vivo*, sobretudo devido às suas propriedades como

sistemas para a liberação de DNA plasmidial. A quitosana é amplamente utilizada como um biomaterial biodegradável com baixa toxicidade e imunogenicidade.

[009] Devido a isso, tendo como objetivo melhorar sua eficiência como carreador gênico e agente de transfecção, a quitosana foi modificada com ácido fólico visando sua utilização como carreador sítio dirigido. A transfecção *in vitro* e *in vivo* tendo como alvo os receptores de ácido fólico tem proporcionado uma aumento na captação de carreadores de DNA.

[010] Entretanto, uma das limitações da quitosana é sua baixa solubilidade em pH fisiológico. Neste sentido foram sintetizados derivados de quitosana contendo grupos dietilaminoetil (DEAE) ligados à cadeia principal para sobrepor este obstáculo.

[011] Na presente invenção, ácido fólico foi ligado à quitosana-DEAE (CH-DEAE) via cadeias de poli(etileno-glicol) (PEG) visando aumentar a estabilidade do nanocarreador.

[012] Tendo como objetivo comprovar a atividade do sistema carreador *in vivo*, foi utilizada a artrite induzida em cobaias por colágeno (CAIA), um modelo experimental amplamente aceito, pois apresenta características muito similares à artrite reumatoide em humanos.

[013] Neste estudo, CAIA foi induzida em camundongos fêmeas DBA/1, os quais foram tratados com CH-DEAE-siRNA-TNF $\alpha$ , com os carreadores marcados com ácido fólico via PEG (CH-DEAE PEG-folato-siRNA-TNF $\alpha$ ) e com o siRNA-TNF- $\alpha$  livre.

[014] A inflamação sistêmica foi avaliada pela medida de *scores* clínicos de artrite e pela concentração de TNF $\alpha$  nas articulações. O exame histológico das articulações e a medida da formação óssea e determinação de marcadores da destruição da cartilagem foram também avaliados. Mudanças na massa óssea, estrutura e erosão focal óssea foram medidas utilizando a microtomografia computadorizada.

[015] Portanto, além do processo de obtenção de derivados de dietil(amino)etil quitosana ligados a um LIGANTE via cadeias de poli(etileno-glicol) (PEG), assim como os derivados obtidos e seus usos, a presente invenção apresenta a construção de nanopartículas multifuncionais baseadas em dietilaminoetil- quitosana (CH-DEAE), modificados com ácido fólico ou aptameros sítio seletivos e contendo RNA de interferência (siRNA) conjugados.

[016] Desse modo, a inserção de grupos DEAE na estrutura de quitosana gera grupos aminas secundárias, na cadeia polimérica, aumentando a solubilidade e a capacidade de tamponamento. O controle do grau de substituição e da massa molecular permite otimizar a eficiência de transfecção, e confere grande potencial de utilização como agente para transferência/terapia gênica não viral.

**Estado da técnica:**

[017] Alguns documentos do estado da técnica descrevem a utilização de quitosana sem modificações adicionais para o transporte e liberação de siRNA.

[018] Em HK1199215(A1) é descrito uma composição e um método para o transporte e liberação de RNA de interferência às células *in vitro* e *in vivo* por meio de

formulações específicas de um sistema de entrega não viral utilizando quitosana, em que a mesma não possui modificações adicionais.

[019] Diferentemente, para a obtenção das nanopartículas da presente invenção são utilizados menores razões N/P (1 a 3) (proporção do derivado para siRNA) de quitosana, ao contrário do HK1199215(A1) que emprega razões que variam de 5 a 20.

[020] Os documentos CN103893757(A), CN103893756(A), CN103893755(A), CN103893754(A), CN103893753(A) e CN103893752(A) descrevem a utilização de quitosana como dispositivo para liberação de plasmídeo recombinante.

[021] Já os documentos CN103109800(A), CN103109799(A), CN103109798(A), CN103109797(A) e CN103081928(A) descrevem a preparação de um biopesticida a base de quitosana para o controle de fungos no repolho e outras aplicações.

[022] O documento CN102908315(A) refere-se à utilização de quitosana, sem modificações adicionais, para o transporte e liberação de RNA de interferência.

[023] Os documentos CN102671243(A) e CN102657880(A) referem-se à utilização de quitosana quaternizada, portanto um derivado quaternário, para o transporte e liberação de RNA de interferência.

[024] Já o documento KR20110068033(A) refere-se à utilização de um derivado de quitosana, enxertado com poli(etilenimina) e ácido fólico, para o transporte e liberação de RNA de interferência.

[025] O documento CA2729923(A1) refere-se à

utilização de nanopartículas desidratadas de quitosana, sem modificações adicionais, para o transporte e liberação de RNA de interferência.

[026] Os documentos CN101747451(A) e CN101747450(A) referem-se à utilização de material adesivo baseado em quitosana, modificado com hidroxisucnimida e azida, e decorados com polipeptídeos para o transporte e liberação de RNA de interferência.

[027] Em KR100825519(B1) é descrito a utilização de quitosana modificada com poliaminas, como poli(histidina) poli(lisina) ou poli(arginina), para o transporte e liberação de DNA ou RNA de interferência.

[028] O documento CN101780282 (A) refere-se à utilização de quitosana modificada com Poli(etileno)glicol e ácido fólico para transporte e liberação de mitomicina.

[029] E o documento US2009324726 (A1) refere-se à preparação de quitosana modificada com ácido fólico.

[030] Diferentemente dos documentos anteriormente citados, o método de preparação do derivado de quitosana proposto pela presente invenção inclui grupos dietilaminoetil, é mais simples e permite um controle preciso da composição.

[031] Outro ponto adicional é o fato das nanopartículas aqui propostas possuírem poli(etileno glicol) nas suas estruturas proporcionando, assim, maior estabilidade às mesmas.

[032] Ainda, a marcação com ácido fólico ou aptâmeros pode proporcionar direcionamento, aumento da eficiência diminuindo os efeitos colaterais.

[033] Portanto, nenhum dos documentos do estado da

técnica descrevem derivados contendo dietil(amino)etil quitosana, poli(etileno glicol), ácido fólico ou aptâmeros, tal como proposto pela presente invenção, para um processo de obtenção de nanopartículas multifuncionais à base destes derivados, bem como seus usos para a transferência gênica não viral, com o objetivo de tratar doenças de origem genética que tenham sido herdadas ou adquiridas, em particular os tratamentos via terapia gênica.

**Breve descrição da invenção:**

[034] Esta invenção faz referência aos derivados de dietil(amino)etil quitosana ligados a um LIGANTE via cadeias de poli(etileno-glicol) (PEG), assim como aos referidos derivados obtidos e seus usos.

[035] Adicionalmente, a presente invenção se refere a um processo de obtenção de nanopartículas multifuncionais à base destes derivados, bem como o seu uso para a transferência gênica não viral, com o objetivo de tratar doenças de origem genética que tenham sido herdadas ou adquiridas, em particular os tratamentos via terapia gênica.

[036] Em uma modalidade preferida, a presente invenção se refere às nanopartículas de dietilaminoetil-quitosana-PEG-folato-siRNA TNF-alfa (CH-DEAE-PEG-folato-siRNA-TNF $\alpha$ ), obtidas conforme processo descrito, para o tratamento de artrite reumatoide, psoríase, doença de CROHN e outras doenças inflamatórias.

[037] Ainda, a utilização de outros ligantes tais como aptâmeros ou diferentes siRNA terapêuticos poderá permitir a utilização para tratamento de vários tipos de neoplasias como câncer de ovário, de mama ou de pulmão.

**Breve descrição das figuras:**

[038] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se fazem referências, conforme segue.

[039] A Figura 1 representa os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN-H) da quitosana e seus derivados contendo proporções crescentes de dietilamonoetil-quitosana.

[040] A Figura 2 representa uma ilustração da montagem das nanopartículas obtidas a partir dos derivados de CH-DEAE-PEG-LIGANTE com o siRNA.

[041] A Figura 3 representa graficamente a viabilidade celular de células HeLa em função da concentração dos CH-DEAE<sub>15</sub>, CH-DEAE<sub>25</sub> e da lipofetamina.

[042] A Figura 4 representa graficamente a viabilidade celular de células HeLa em função das razões N/P, 0,5, 1, 3, 5, 10, 15 e 20 das nanopartículas preparadas com os derivados CH-DEAE<sub>x</sub> e o DNA plasmidial VR 1412 em pH 7,4.

[043] A Figura 5 representa graficamente a viabilidade celular de células HeLa em função de N/P de nanopartículas preparadas de siRNA-SSB com o polímero CH-DEAE<sub>15</sub> em pH 6,3.

[044] A Figura 6 representa graficamente a viabilidade de células HeLa em função da razão N/P para as nanopartículas preparadas com o derivado CH-DEAE<sub>15</sub>-PEG-FA e siRNA-SSB (dietil(amino)etil quitosana-PEG-LIGANTE-siRNA), em pH 6,3.

[045] As Figuras 7A-B representam graficamente a eficiência de transfecção *in vitro* por DNA plasmidial (VR

1412) dos derivados de dietil(amino)etil-quitosana (CH-DEAEx).

[046] As Figuras 8A-B representam graficamente a eficiência de transfecção por RNA de interferência (SSB-siRNA) do derivado de dietil(amino)etil-quitosana (CH-DEAE<sub>15</sub>), em que "a" representa CH-DEAE<sub>15</sub> siRNA-TNF $\alpha$  e "b" representa CH-DEAE<sub>15</sub>-PEG-FA-siRNA-TNF $\alpha$ .

[047] As Figuras 9A-E representam graficamente o monitoramento dos efeitos terapêuticos no modelo *in vivo* de artrite induzidos em camundongos (CAIA) por anticorpos ao colágeno, após administração intraperitoneal (i.p.) de nanopartículas dietil(amino)etil quitosana-siRNA-TNF $\alpha$  ou dietil(amino)etil quitosana-PEG-FOLATO-siRNA-TNF $\alpha$  ou nanopartículas vazias.

[048] As Figuras 10A-B representam a melhora nos níveis de TNF- $\alpha$  determinados em sobrenadante de homogeneização do tecido da articulação do tornozelo por ELISA, em que representa graficamente o decréscimo de TNF- $\alpha$  no joelho dos animais (A), nos condrócitos (B).

[049] A Figura 10C é um conjunto de imagens representando o decréscimo de TNF- $\alpha$  na cartilagem.

[050] A Figura 11A é um conjunto de imagens representativas de um exame histológico da articulação do tornozelo traseira de camundongos de cinco diferentes grupos.

[051] As Figuras 11B-E representam graficamente o exame histológico da articulação do tornozelo traseiro de camundongos de cinco diferentes grupos, em que (B) é a severidade de sinovite, (C) é a erosão óssea, (D) é a destruição da cartilagem e (E) são as cartilagens de

colágeno do tipo II (CTX-II).

**Descrição detalhada da invenção:**

[052] A presente invenção refere-se à obtenção de novos derivados de dietil(amino)etil quitosana (CH-DEAE) que compreendem o grupo dietiletilamina (DEAE) e poli(etileno glicol) (PEG) em suas estruturas.

[053] Primeiramente, vale ressaltar que o processo de obtenção dos derivados CH-DEAE que compreendem somente grupos DEAE em suas estruturas está descrito no documento de patente solicitado de número BR 10 2012 023859.

[054] Desse modo, para a obtenção do CH-DEAE, os graus de substituição (GS) foram ajustados entre 7 e 25%. Vale ressaltar que os graus de substituição (GS) por grupos DEAE são determinados utilizando-se RMN-H (conforme mostrado na Figura 1) e os valores obtidos variaram de 5 a 100%, respectivamente.

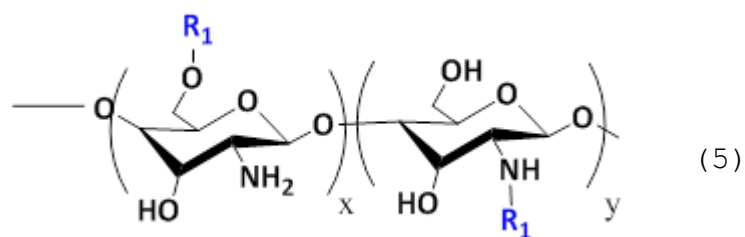
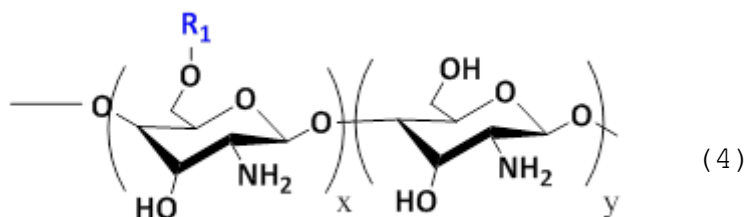
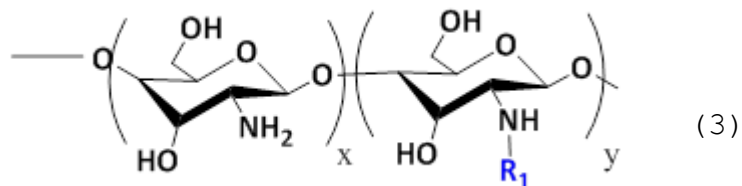
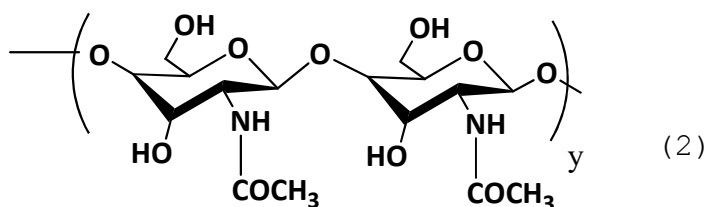
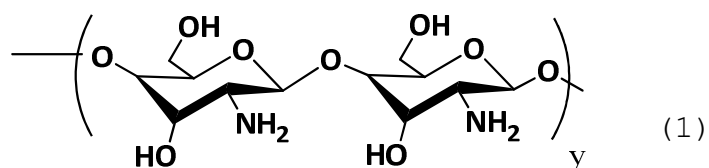
[055] Portanto, a proporção de grupos amino terciários (DEAE) foi variada e permitiu determinar uma composição específica, que se encontra entre 5 e 25%, e cujo conteúdo mais apropriado até o momento é de 15% (CH-DEAE<sub>15</sub>).

[056] Assim, em uma modalidade preferida, foram utilizados  $5,0 \times 10^{-3}$  mols de quitosana desacetilada (CH) com  $8,4 \times 10^{-3}$  mols de cloreto de 2-cloro-N,N-dietiletilamina (DEAE) para a obtenção de CH-DEAE com 15% de grupos dietil(amino)etil, aqui chamados de CH DEAE<sub>15</sub>.

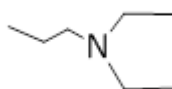
[057] Os derivados são sintetizados a partir de quitosana desacetilada com alto grau de desacetilação que varia de 80 a 99%. As massas moleculares das quitosanas

desacetiladas de partida podem variar de 800 Da até 1000 kDa.

[058] As estruturas da quitosana desacetilada, quitina e dos derivados CH-DEAE-com substituições nos grupos amino e grupos hidroxila estão representadas respectivamente pelas Estruturas 1, 2, 3, 4 e 5 abaixo:



em que  $R_1$  corresponde a:



em que os valores de "x" e "y" podem variar de "0" a "1" (de zero a um) e correspondem ao número de mols de unidades repetitivas que estão unidas sequencialmente ou aleatoriamente.

[059] Ainda, vale ressaltar que o derivado CH-DEAE<sub>15</sub> foi obtido e testado buscando-se avaliar a eficiência de transfecção.

[060] Desse modo, para a obtenção dos derivados da presente invenção foram utilizados os seguintes reagentes:

- dietil(amino)etil quitosana (CH-DEAE) com graus de substituição ajustados entre 7 e 25% (CH-DEAE<sub>7</sub> à CH-DEAE<sub>25</sub>);
- poli(etileno glicol) (PEG); e
- um ligante.

[061] Ainda, o PEG utilizado é selecionado dos grupos que consistem em PEG monofuncional com grupo tiol ou grupos bifuncionais compreendendo um grupo amino (-NH<sub>2</sub>) numa extremidade e grupo carboxílico (-COOH) noutra.

[062] O ligante utilizado pode ser selecionado, dependendo do alvo, do grupo que consiste em ácido fólico (FA), aptâmeros, proteínas, peptídeos, anticorpos monoclonais, preferencialmente o ácido fólico (FA).

[063] Dessa forma, a obtenção dos novos derivados de dietil(amino)etil quitosana (CH-DEAE) que compreendem o grupo dietiletilamina (DEAE) e poli(etileno glicol) (PEG) em suas estruturas, aqui chamados como CH-DEAE-PEG-LIGANTE está mais bem detalhada abaixo.

- Obtenção dos derivados CH-DEAE-PEG-LIGANTE:

[064] O processo de obtenção dos derivados CH-DEAE-PEG-LIGANTE compreendem as etapas de:

- a) Preparação e purificação dos derivados CH-DEAE;

- b) Modificação do LIGANTE-PEG-COOH;
- c) Incorporação do PEG-LIGANTE na CH-DEAE; e
- d) Purificação e isolamento do produto formado.

[065] Na etapa "a" é realizada a preparação e purificação dos derivados CH-DEAE, preferencialmente o CH-DEAE<sub>15</sub>, por meio da proteção ou não dos grupos amina da quitosana, seguido da reação com cloreto de 2-cloro-N,N-dietiletilamina.

[066] Na etapa "b", ativou-se  $1,2 \times 10^{-5}$  mols de LIGANTE-PEG-COOH em  $7,0 \times 10^{-2}$  mols de DMSO com  $1,3 \times 10^{-5}$  mols de hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDC) e  $5,0 \times 10^{-5}$  mols de NHS em uma proporção de 1:1,1:4, mantido em temperatura ambiente por pelo menos quatro horas, sob agitação de pelo menos 300 rpm.

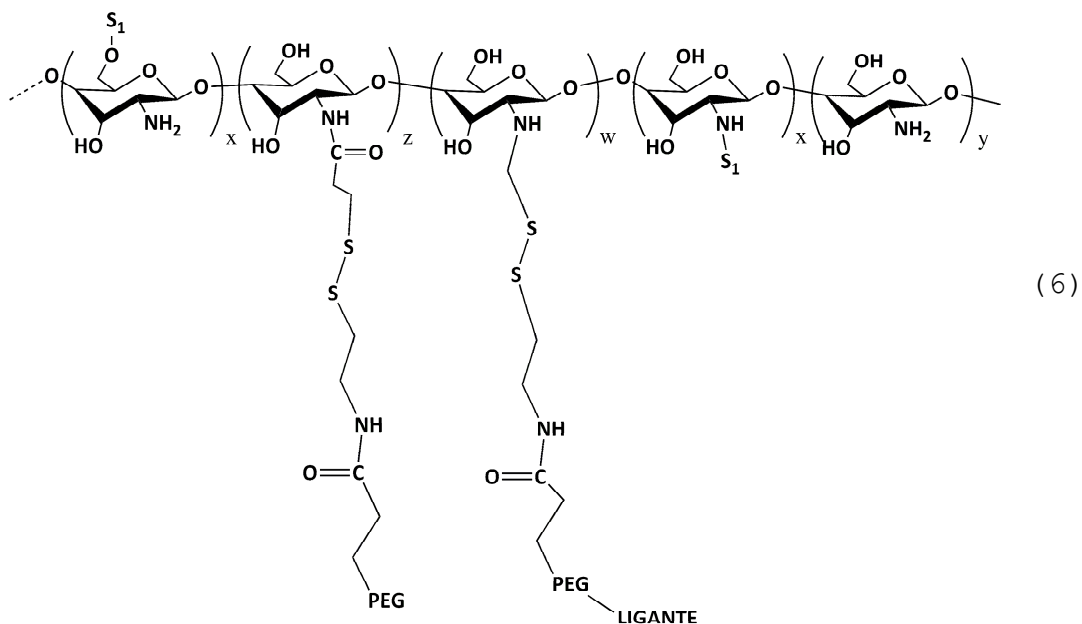
[067] Para o preparo de quitosana contendo PEG e um ligante, preferencialmente o ácido fólico, na etapa "c", cerca de  $1,13 \times 10^{-3}$  mols de CH-DEAE, preferencialmente o CH-DEAE<sub>15</sub> foi dissolvida em  $0,33 \text{ mol.L}^{-1}$  de ácido acético e o LIGANTE-PEG-COOH ativado foi adicionado à solução de CH-DEAE<sub>15</sub>. A reação foi realizada no escuro por pelo menos 20 horas.

[068] Na etapa "d" o produto final foi purificado por diálise (10-15 kDa de exclusão) em água deionizada por pelo menos 3 dias. Assim, o CH-DEAE-PEG-LIGANTE foi isolado por liofilização.

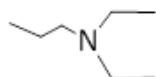
[069] Vale ressaltar que a análise da incorporação de PEG-LIGANTE na CH-DEAE<sub>15</sub> foi realizada por meio de medidas de absorvância do ligante, preferencialmente o ácido fólico, com espectrofotômetro UV-visível, utilizando

quitosana não modificada como padrão. Ainda, o coeficiente de extinção do ácido fólico é  $6165 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , em 363 nm.

[070] Dessa forma, adicionalmente, a presente invenção refere-se aos derivados CH-DEAE-PEG-LIGANTE obtidos, conforme processo aqui descrito, representados pela Estrutura 6.



em que  $S_1$  corresponde a:



em que:

os valores de  $w$ ,  $x$ ,  $y$  e  $z$  podem variar respectivamente de 0,1 a 2%, 7 a 25%, de 68 a 90,9% e de 2 a 5%; e

S-S corresponde à ponte de sulfeto redutível.

[071] Complementarmente, a presente invenção faz referência ao uso dos referidos derivados em formulações variadas, tais como filmes, biodispositivos, nanopartículas multifuncionais e géis.

[072] Deste modo, a presente invenção também se refere a um processo de obtenção de nanopartículas multifuncionais.

[073] As referidas nanopartículas multifuncionais obtidas são selecionadas do grupo que consiste em nanopartículas poliméricas compreendendo ligantes, fármacos ou ácidos nucleicos; ou nanopartículas híbridas compreendendo núcleo de material metálico ou poroso.

- Processo de obtenção das nanopartículas:

[074] O processo de obtenção de nanopartículas multifuncionais desta invenção compreende as etapas de:

a) Preparação da solução de CH-DEAE-PEG-LIGANTE em tampão fosfato pH 6,3; e

b) Adição da solução obtida na etapa "a" às soluções de pDNA ou siRNA diluídos no tampão fosfatos pH 6,3.

[075] Na etapa "a" soluções estoque de CH-DEAE-PEG-LIGANTE na concentração de  $9,3 \times 10^{-3}$  mol/L de grupos amina foram preparadas em tampão fosfato pH 6,3, filtradas em ambiente esterilizado com filtro esterilizado com membrana de polietersulfona com poros de 0,45  $\mu\text{m}$ .

[076] Para a formação das nanopartículas, na etapa "b" adicionou-se lentamente, sob agitação de 300 rpm, alíquotas de  $3,1 \times 10^{-3}$  mol/L da solução estoque de CH-DEAE-PEG-LIGANTE obtida na etapa "a" às soluções de pDNA ( $3,8 \times 10^{-5}$  mol/L em grupos fosfato) ou siRNA ( $7,6 \times 10^{-5}$  mol/L em grupos fosfato) diluídos no tampão fosfato pH 6,3.

[077] Vale ressaltar que para cada experimento realizado, utilizou-se uma concentração de grupos fosfato fixa e variou-se a concentração de grupos amina, obtendo-se razões N/P que variam de 0 a 10, em que N corresponde aos grupos amina do polycation e, P corresponde aos grupos fosfato do DNA ou siRNA.

[078] Para as medidas de tamanho e potencial zeta a concentração de grupos fosfatos foi de 0,02 mM, e para os demais experimentos foi de  $3,8 \times 10^{-5}$  mol/L com pDNA e  $7,6 \times 10^{-5}$  mol/L com siRNA.

[079] Os tampões utilizados são selecionados do grupo que consiste em acetato 50 mM pH 5,0 e força iônica 150 mM; tampão fosfato 25 mM pH 6,3 e força iônica 50 mM; e tampão fosfato 50 mM pH 7,4 e força iônica 150 mM.

[080] Desse modo, a presente invenção também se refere às nanopartículas obtidas conforme processo aqui descrito, em que as mesmas compreendem em sua estrutura o derivado CH-DEAE-PEG-LIGANTE e RNA de interferência (siRNA) ou DNA plasmidial (pDNA), em que se varia a concentração de grupos amina (N) de CH-DEAE-PEG-LIGANTE em relação aos grupos fosfato do DNA ou siRNA (P) na razão N/P que varia de 0 (zero) a 10.

[081] Ainda, alternativamente, as nanopartículas podem ser nanopartículas poliméricas compreendendo fármacos ou ácidos nucleicos e ligantes; ou nanopartículas híbridas compreendendo núcleo de material metálico ou poroso.

[082] Vale ressaltar que as nanopartículas podem ser modificadas ou decoradas com moléculas ligantes, tais como anticorpos monoclonais, aptâmeros e outras moléculas; ou com diferentes siRNA terapêuticos, tendo como alvo receptores celulares para tratamento de vários tipos de neoplasias como câncer de ovário, de mama ou de pulmão.

[083] Em uma modalidade preferida, a presente invenção se refere às nanopartículas de dietilaminoetil-quitosana-PEG-folato-siRNA-TNF-alfa (CH-DEAE-PEG-folato-siRNA-TNF $\alpha$ ), em que o referido siRNA é específico para

silenciar o TNF-alfa.

[084] A Figura 2 representa uma ilustração da montagem das nanopartículas obtidas conforme processo anteriormente descrito, em que "A" representa o CH-DEAE, "B" representa o RNA de interferência (siRNA) ou DNA plasmidial (pDNA), "A.1" representa os ligantes, "A.2" são as camadas hidrofílicas, "D" é a representação gráfica da condensação dos ácidos nucleicos com as cadeias de CH-DEAE e "n" o número de cadeias CH-DEAE-PEG-ligante para a formação da nanopartícula.

[085] Alternativamente, as nanopartículas podem ser preparadas pelo processo de coacervação, gelação iônica ou qualquer outro intercruzamento químico ou iônico.

[086] Ainda, vale ressaltar que as referidas nanopartículas, alternativamente, podem ser nanodispositivos híbridos compreendendo os derivados CH-DEAE-PEG-LIGANTE, metais, sílica e outros materiais porosos de naturezas orgânicas, tais como polímeros; ou inorgânicas, tais como óxidos, zeólitas ou outros.

[087] Adicionalmente, a invenção proposta se refere aos usos das nanopartículas aqui mencionadas para a transferência gênica não viral, bem como para a terapia gênica não viral e para liberação controlada de fármacos de qualquer natureza, tendo como objetivo o tratamento de doenças de origem genética que tenham sido herdadas ou adquiridas, em particular os tratamentos via terapia gênica tais como as doenças inflamatórias crônicas mediadas pelo TNF- $\alpha$ , Doença de Crohn, Colite ulcerosa, Psoríase e Espondilite ankylosante.

[088] Em uma modalidade preferida, a presente

invenção se refere ao uso das nanopartículas CH-DEAE-PEG-folato-siRNA-TNF $\alpha$  obtidas conforme processo descrito, para o tratamento de artrite.

**- Testes Realizados:**

**- Avaliação da Citotoxicidade dos Derivados e das Nanopartículas:**

[089] A citotoxicidade dos derivados e das nanopartículas foram avaliadas por meio da determinação da viabilidade celular com ensaio de *CellTiter96*<sup>®</sup> aquoso não radioativo de proliferação celular.

[090] Para isso, os polímeros foram preparados em ácido acético (60 mM) em uma concentração de 10 mg/mL, dissolvidos sob agitação e aquecimento a 55 °C.

[091] Células de carcinoma cervical HeLa (FR-positivo) foram cultivadas em placa de 96 poços a uma densidade de 10.000 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de PS e incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>.

[092] No dia seguinte, trocou-se o meio por novo meio DMEM suplementado e adicionaram-se diferentes quantidades das soluções de quitosanas e seus derivados, para concentrações finais de 0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 e 2 mg/mL e 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL, para lipofetamina.

[093] Cada concentração foi repetida em 3 poços, incubando-se por 24 horas. No último dia, o meio de cultura da placa foi trocado por meio DMEM contendo MTS e PMS, incubando-se por 30 minutos a 37 °C.

[094] O MTS é biorreduzido pelas células viáveis para formazana solúvel em meio de cultura. A absorvância

foi medida em 490 nm com um leitor de microplacas EL800 universal. A percentagem de viabilidade celular foi calculada ajustando as células de controle sem tratamento como 100%.

[095] Para as nanopartículas, a citotoxicidade foi avaliada como descrito acima e, após o cultivo das células HeLa por 24 horas, o meio de cultura foi removido e 50 µL de DNA livre ou poliplexos (equivalente a 0,025 µg de DNA do plasmídeo), em diferentes razões N/P, foram adicionados às células com 100 µL de meio completo e incubou-se durante 24 horas.

[096] A viabilidade celular foi avaliada por ensaio com *CellTiter96*<sup>®</sup> aquoso não radioativo de proliferação celular, assim como para os polímeros. A percentagem de viabilidade celular foi calculada ajustando as células de controle sem tratamento como 100%.

[097] A citotoxicidade de polímeros catiônicos é dependente de vários fatores, e, de forma geral, moléculas rígidas têm mais dificuldades para se ligar a membranas que as moléculas flexíveis. Portanto, altas densidades de carga positiva e polímeros altamente flexíveis devem causar efeitos citotóxicos mais elevados do que aqueles com baixa densidade de carga positiva.

[098] Na presença de quitosana desacetilada, CH, a viabilidade se mantém em 100% até a concentração 1 mg/ml, atingindo 95% em 1,5 mg/ml. O derivado CH-DEAE<sub>15</sub> não diminuiu a viabilidade celular abaixo de 80% até a concentração de 1,5 mg/ml.

[099] No entanto, todos os derivados apresentaram citotoxicidade inferior ao lipídeo comercial lipofetamina,

e para os menos substituídos, a viabilidade permaneceu próximo de 90% até a concentração de 1,0 mg/mL (Figura 3). Os valores de  $CI_{50}$  (concentração na qual ocorre inibição de 50% da viabilidade celular) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de  $CI_{50}$  dos derivados de dietil(amino)etil quitosana e do lipídeo comercial lipofetamina em células HeLa.

| Derivado             | CH  | CH-<br>DEAE <sub>15</sub> | CH-<br>DEAE <sub>25</sub> | CH-<br>DEAE <sub>80</sub> | CH-<br>DEAE <sub>100</sub> | Lipofectamina |
|----------------------|-----|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------|
| $CI_{50}$<br>(mg/mL) | 233 | 6,78                      | 2,74                      | 0,72                      | 0,3                        | 0,053         |

[0100] A citotoxicidade do polissacarídeo quitosana e de suas nanopartículas originam valores de  $CI_{50}$  similares, entretanto podem ser atenuadas pela diminuição do grau de desacetilação, mas são pouco afetadas pela redução na Mw.

[0101] A formação das nanopartículas neutraliza cargas positivas dos polications e, em baixas razões N/P, são esperadas viabilidades celulares maiores.

[0102] Para as nanopartículas a viabilidade celular em pH 7,4 se manteve acima de 80% em todas as razões N/P estudadas (Figura 4).

[0103] Para os derivados CH-DEAE<sub>15</sub> e CH-DEAE<sub>25</sub>, a viabilidade celular se mantém acima de 90% similar a observada para as nanopartículas preparadas com quitosana desacetilada. A citotoxicidade das nanopartículas contendo o RNA de interferência (siRNA-SSB) em pH 6,3, também foi analisada por meio de experimentos de viabilidade celular de células HeLa em função de N/P.

[0104] As Figuras 5 e 6 mostram a viabilidade celular dos poliplexos formados, respectivamente, com CH-DEAE<sub>15</sub> e CH-DEAE<sub>15</sub>-PEG-FA. Essas partículas não se mostraram citotóxicas para razões N/P até 10. Verifica-se que a substituição com PEG-FA no polímero CH-DEAE<sub>15</sub> não influenciou na viabilidade celular das células HeLa nas razões N/P avaliadas (Figura 6).

**- Avaliação da eficiência de transfecção in vitro:**

**- Estudo de Transfecção pelo plasmídeo VR1412:**

[0105] As células HeLa foram semeadas 24 horas antes da transfecção em placas de 24 poços a uma densidade de 50.000 células/poço em meio DMEM com 10% de FBS e 1% de PS. No dia da transfecção, as células foram lavadas com o meio de cultura, sem FBS e PS, e adicionou-se 200 µL de DNA livre ou 200 µL de poliplexos (5 µg de DNA/poço) e adicionou-se 200 µL de meio DMEM, sem FBS e PS.

[0106] Após 4 horas de incubação a 37 °C, as células receberam 1 mL de meio completo com 10% de FBS e 1% de PS e foram incubadas por 24 horas. Após esse período, o meio foi removido e adicionado um novo meio completo.

[0107] Depois de 72 horas, o meio foi removido e as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) frio. Determinou-se a concentração da proteína β-gal expressa nas células utilizando-se o kit Elisa para β-gal. Para a determinação da concentração de proteínas totais aplicou-se o kit BCA baseado no ácido bicinconínico (BCA), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão, de acordo com as instruções do fabricante.

[0108] A eficiência de transfecção é dada a partir da razão entre a concentração de  $\beta$ -gal, em pg, e das proteínas totais, em mg.

[0109] Os derivados foram utilizados para o preparo de nanopartículas com pDNA nas razões N/P 0,5 a 10, em pH 5,0 e 7,4 e sua eficiência de transfecção foi analisada em função da expressão da proteína  $\beta$ -gal (Figuras 7A e 7B). A transfecção foi realizada com o objetivo de avaliar o efeito dos grupos DEAE sobre a eficiência da transfecção.

[0110] Os crescentes graus de substituição por DEAE conferiram aos derivados maiores graus de ionização em pH fisiológico, bem como maiores capacidades de tamponamento. Esses parâmetros podem afetar a interação das nanopartículas com a superfície das células e a captação e entrega do pDNA no citoplasma.

[0111] A expressão do gene mostrou-se muito dependente da estrutura dos polímeros e do pH do meio. Em pH 5,0, verificou-se que a eficiência aumenta consideravelmente (100 x) a partir de N/P 1,0, atingindo o máximo em N/P 2-3, e diminuiu novamente para N/P maiores (Figura 7B).

[0112] Os resultados relacionam-se bem com os valores de potencial zeta, e as maiores eficiências foram obtidas para as NPs que apresentaram potenciais ligeiramente positivos (+ 4 mV). Verificou-se também que os resultados tem boa correlação com os experimentos de eletroforese onde, para N/P 2,0, o pDNA foi completamente retido no ensaio de eletroforese.

[0113] Por outro lado, as NPs preparadas com os derivados mais substituídos, CH-DEAE<sub>80</sub> e CH-DEAE<sub>100</sub>, exibiram

eficiências de transfecção inferiores às obtidas com a CH-DEAE<sub>15</sub> e CH-DEAE<sub>25</sub> e foram semelhantes às obtidas com a quitosana desacetilada (CH).

[0114] Esses resultados podem ser explicados comparando-se os graus de ionização ( $\alpha$ ), as forças da interação e as citotoxicidades dos derivados. Pode-se atribuir os decréscimos nas eficiências de transfecção por CH-DEAE<sub>80</sub> e CH-DEAE<sub>100</sub> à elevada força de interação desses com o pDNA, bem como as menores capacidades de tamponamento. Portanto, em pH 5,0 o derivado mais eficiente foi o CH-DEAE<sub>15</sub> de menor GS e que atingiu eficiência comparável ao lipídeo comercial lipofetamina.

[0115] Em pH 7,4, parte dos grupos amina dos derivados são desprotonados e a densidade de cargas dos polímeros, bem como o potencial zeta e estabilidade das NPs, diminui. Nesse pH, somente os poliplexos preparados com os derivados CH-DEAE<sub>80</sub> e CH-DEAE<sub>100</sub> foram eficientes no processo de transfecção (Figura 7A).

[0116] Comparando-se as eficiências de transfecção entre os polímeros CH-DEAE<sub>80</sub> e CH-DEAE<sub>100</sub>, observa-se que a expressão de  $\beta$ -gal foi 2 vezes maior para o derivado com maior GS e muito próximo daquela exibida por lipofectamina. A maior eficiência pode ser atribuída ao maior grau de ionização desses polímeros, maior potencial zeta das partículas e à maior estabilidade das NPs em função do tempo.

- Estudo de Transfecção pelo RNA de interferência siRNA-SSB:

[0117] No estudo de transfecção com siRNA-SSB, cultivaram-se  $10^5$  células por poço em placas de 6 poços com

3 mL de meio de cultura DMEM com 10% de FBS e 1% de PS a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub>. Após 24 horas, os poços foram lavados 3 vezes com meio DMEM novo, sem FBS e PS.

[0118] Logo após, adicionaram-se 500 µL de nanopartículas, contendo 5 µg de siRNA-SSB, e 500 µL de meio DMEM. Incubou-se por 4 horas a 37 °C, aplicaram-se mais 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de PS e incubou-se novamente por 24 horas.

[0119] No dia seguinte, o meio contendo nanopartículas foi trocado por meio DMEM novo com suplementos. Após 48 horas, os poços foram lavados 3 vezes com PBS e as células foram tratadas com o reagente TRIzol® para purificação de RNA, seguindo as instruções do fabricante. As amostras de RNA finais foram transcritas para cDNA com o kit de transcriptase reversa.

[0120] A partir do cDNA de cada amostra, um quinto foi utilizado para PCR em tempo real. Os *primers* aplicados foram: SSB, sequência senso e sequência antisenso, GAPDH, sequência senso e sequência antisenso. GAPDH é o cDNA do RNAm que codifica a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e foi usado como padrão relativo, gene de referência, para os valores de SSB.

[0121] O kit para PCR em tempo real utilizado foi o *Quantitect SYBR Green PCR* e o método para análise foi o *Mx3000P*. Esse método aplica a molécula *SYBR Green* que se liga a fita dupla de DNA, ligação não específica, e fluoresce. Dessa forma, pode-se monitorar o processo da reação de amplificação do cDNA, pois a intensidade de fluorescência aumenta proporcionalmente com o ciclo de amplificação.

[0122] A fluorescência gerada no primeiro ciclo é chamada de Ct, e esse valor pode ser diretamente correlacionado com a concentração de partida da amostra. Com isso, os valores de expressão do RNAm SSB podem ser calculados a partir das mudanças relativas a células controle, sem tratamento com siRNA-SSB.

[0123] A Equação 1 é utilizada para avaliar a porcentagem da expressão de RNAm SSB que foi bloqueada pelo siRNA-SSB, normalizada pelo GAPDH, em que  $\Delta Ct(SSB)$  é a diferença entre os valores de Ct entre a amostra controle e a amostra tratada com siRNA para o cDNA do SSB, e  $\Delta Ct(GAPDH)$  é a diferença entre os valores de Ct entre a amostra controle e para o cDNA do GAPDH.

$$\text{Equação 1 - } \textit{Nível de expressão de RNAm SSB} = \frac{2^{-\Delta Ct(SSB)}}{2^{-\Delta Ct(GAPDH)}}$$

[0124] O derivado que se mostrou mais eficiente na transfecção com o plasmídeo VR1412 foi selecionado e modificado com o ácido fólico (ligante FA) para o estudo com siRNA em células HeLa.

[0125] O CH-DEAE<sub>15</sub> foi utilizado para o preparo de nanopartículas com siRNA no mesmo pH em que apresentou a melhor eficiência com o plasmídeo, pH 6,3 para CH-DEAE<sub>15</sub>.

[0126] Para as nanopartículas formadas com o derivado CH-DEAE<sub>15</sub> e CH-DEAE<sub>15</sub>-PEG-FA-siRNA-TNF- $\alpha$ , houve bloqueio significativo na expressão do mRNA SSB em todas as razões estudadas, 1 à 5 N/P. Além disso, não houve variação significativa entre os valores de expressão observados com o derivado contendo ou não PEG-FA (Figuras 8A e 8B).

[0127] As Figuras 8A-B representam graficamente a eficiência de transfecção in vitro, em que foram utilizados 5  $\mu$ g de siRNA-SSB livre e complexos de CH-DEAE<sub>15</sub>/siRNA (A)

e CH-DEAE<sub>15</sub>-PEG-FA/siRNA (b) e lipofetamina/siRNA contendo o equivalente a 5 µg de siRNA-SSB incubados com células HeLa. A expressão do gene SSB é medida por meio de RT-PCR em tempo real e comparada às células não tratadas, considerada como 100%. \*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,005.

[0128] Os bloqueios na expressão do mRNA SSB observados foram de 80% para razão N/P 1 e 2, 72% para razão N/P 3 e 75% em N/P 5. As baixas razões N/P foram mais efetivas chegando próximo ao valor de bloqueio observado para o lipídeo comercial lipofetamina, cuja eficiência para o bloqueio foi de 88%.

[0129] Esses resultados mostram que o derivado CH-DEAE<sub>15</sub>, com ou sem folato, é mais eficiente no bloqueio de mRNA que outras quitosanas utilizadas na literatura.

[0130] Portanto, podemos concluir que, comparando-se com a quitosana não modificada, além de oferecer proteção aos ácidos nucleicos, os polímeros obtidos melhoraram a captação celular e a liberação do siRNA das NPs, duas propriedades importantes para entrega eficiente *in vivo*. Essas abordagens envolveram a modificação estrutural da quitosana pela inserção de grupos químicos que respondem às condições fisiológicas da via intracelular e acreditamos que podem ser otimizadas para permitir obter um carreador ainda mais eficiente para estudos *in vivo*.

**- Avaliação da eficiência de transfecção *in vivo*:**

- Eficácia terapêutica de Nanopartículas de Dietilaminoetil-quitosana-PEG-folato-siRNA-TNF-α para o silenciamento *In Vivo* de TNF-α em modelos de artrite induzida em cobaias contra colágeno de tipo II:

[0131] Estudos mostram que o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF-alfa) é uma das citocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel importante na progressão da artrite reumatóide (AR).

[0132] Uma estratégia terapêutica promissora no tratamento da AR está baseada em silenciar a expressão de TNF- $\alpha$  com siRNAs. Neste sentido, um sistema de entrega eficaz deve ter como função além do transporte do siRNA, a sua proteção contra a destruição por nucleases e a liberação no citoplasma das células-alvo.

[0133] A principal desvantagem de nanopartículas de quitosana transportadores de genes é a sua baixa eficiência de transfecção e baixa solubilidade. A transfecção mediada por PEG-folato tem sido empregada para aumentar a biodisponibilidade e facilitar a internalização de siRNA em células através de receptores de membrana.

[0134] Os derivados de quitosana modificados com dietilaminoetilo (DEAE) e ácido fólico foram utilizados para preparar nanopartículas com siRNA-TNF- $\alpha$  pelo método de coacervação.

[0135] O tamanho e o potencial zeta das nanopartículas foram verificados por espalhamento de luz dinâmica. Os efeitos do bloqueio de TNF- $\alpha$  (TNF-alfa-*knockdown*) foram testados em um modelo de artrite induzida por anticorpos monoclonais contra colágeno de tipo II em cobaias.

[0136] Os marcadores de inflamação (TNF-alfa) e vários marcadores de cartilagem (CTX-II) e remodelação óssea (TRAP, osteocalcina e fosfatase alcalina) foram analisados, bem como o exame histológico e análise por

microtomografia computadorizada. Demonstrou-se que nanopartículas de dietilaminoetil-quitosana-folato-siRNA TNF-alfa exerceram uma inibição significativa da inflamação, tal como avaliado pela pontuação clínica (Figuras 9A-E) ou a expressão da proteína TNF- $\alpha$  no tecido das articulações (Figuras 10A e 10C).

[0137] Estas nanopartículas podem inibir a destruição da cartilagem articular e a perda de massa óssea induzida por inflamação (Figuras 11A-E). Estes resultados confirmam o efeito combinado do biodispositivo sobre as duas variáveis clínicas mais importantes da AR. Estes resultados indicam que o dietilaminoetil-quitosana-PEG-folato-siRNA-TNF- $\alpha$  é um candidato seguro e eficaz para a entrega de genes não virais de siRNA, e as nanopartículas apresentam potencial terapêutico para aplicação *in vivo*.

- Detalhamento das Figuras 9A-E:

[0138] As Figuras 9A-E representam o monitoramento da progressão e dos efeitos terapêuticos no modelo de artrite induzidos em camundongos (CAIA) induzida por anticorpos ao colágeno, após administração intraperitoneal (i.p.) de nanopartículas CH-DEAE-/siRNA-TNF- $\alpha$  ou CH-DEAE-PEG-folato-siRNA-TNF $\alpha$  ou nanopartículas vazias.

[0139] Em que (A) os animais foram avaliados por sintomas clínicos, através de um método de pontuação de artrite para o nível de inflamação das articulações na escala de 0-16 (0-4 para cada pata, somando as pontuações de todas as 4 patas. Escala: 0 = normal, 1 = inchaço leve, 2 = inchaço moderado, 3 = grave inchaço de toda a pata, 4 = inflamação máxima).

[0140] Dia 1 corresponde ao início da artrite e designações para os grupos de tratamento (n = 8). Os animais foram administrados por via i.p. nos dias 1, 3, 5 e 7, com 100 µl de nanopartículas contendo um equivalente a 50 µg de siRNA. (B) a pontuação artrítica no dia 10. (C) a gravidade da artrite avaliada por medição da espessura da pata posterior ao longo do tempo. (D) espessura da pata traseira no dia 10. (E) Pata traseira dos animais dos diferentes grupos A significância estatística foi avaliada pelo teste t de Student não pareado, \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001. Os animais foram divididos em cinco grupos, cada um consistindo de oito animais (grupo 5 consistiu em cinco animais). Grupo 1: controles normais. Grupo 2: controle CAIA. Grupo 3: Animais com CAIA tratados por nanopartículas de CH-DEAE-siRNA-TNF-α. Grupo 4: animais tratados CAIA por nanopartículas de CH-DEAE-PEG-folato - siRNA-TNF-α-. Grupo 5: Animais com CAIA tratados somente com siRNA-TNF-α.

- Detalhamento das figuras 10 A-C:

[0141] O gráfico da Figura 10A representa os níveis de TNF-α determinados em sobrenadante de homogeneização do tecido da articulação do tornozelo por ELISA.

[0142] Já o gráfico da Figura 10B representa a porcentagem de TNF - α em condrócitos. Os valores são a média ± SEM de oito animais. A significância estatística foi avaliada pelo teste t de Student não pareado, \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001 versus o controle CAIA.

[0143] Já as imagens da Figura 10C representa a identificação positiva de TNF - α em condrócitos (representada por setas) reveladas por imunomarcação.

[0144] Grupo 1: controles normais. Grupo 2: controle de CAIA. Grupo 3: Animais com CAIA tratados com nanopartículas de CH-DEAE-siRNA-TNF $\alpha$ . Grupo 4: Animais com CAIA tratados por nanopartículas de CH-DEAE-PEG-folato siRNA TNF- $\alpha$ . Grupo 5: animais com CAIA tratados somente com siRNA-TNF- $\alpha$ .

- Detalhamento das Figuras 11A-E:

[0145] A Figura 11A é um conjunto de imagens representativas da articulação do tornozelo traseira de camundongos de diferentes grupos reveladas com hematoxilina & eosina, safranina O e azul de toluidina. Magnificação: Tamanho original x20.

[0146] As pontuações de severidade de sinovite (b), a destruição da cartilagem (c), erosão óssea (d), e cartilagens (níveis séricos de produtos de degradação de C-terminal de telopeptídeos de colágeno do tipo II (CTX-II)) (e) avaliados no dia 10.

[0147] Os valores são a média  $\pm$  SEM de oito ratinhos. A significância estatística foi avaliada pelo teste t de *Student* não pareado, \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001 versus controle CAIA.

[0148] Grupo 1: controles normais. Grupo 2: controle CAIA. Grupo 3: Camundongos com CAIA tratados por nanopartículas de CH-DEAE-siRNA TNF $\alpha$ . Grupo 4: Camundongos com CAIA tratados com nanopartículas de CH-DEAE-PEG-folato-siRNA TNF $\alpha$ . Grupo 5: Camundongos com CAIA tratados somente com siRNA-TNF- $\alpha$  (siRNA Nú).

[0149] Portanto, embora a modalidade preferida da presente invenção tenha sido ilustrada e descrita por meio dos exemplos, os versados na arte valorizarão os

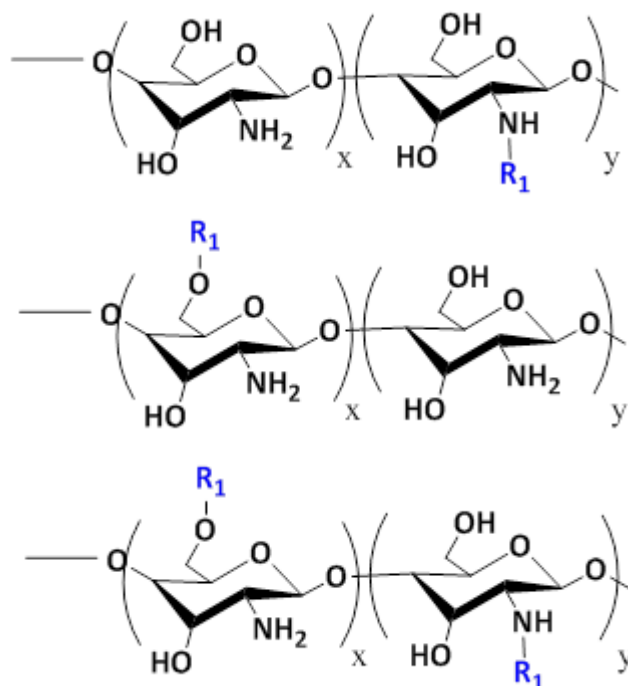
conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

### REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de derivados de dietil(amino)etil quitosana (CH-DEAE) **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de:

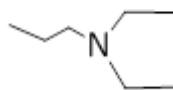
- a) Preparação e purificação dos derivados CH-DEAE;
- b) Ativação do LIGANTE-PEG-COOH;
- c) Incorporação do PEG-LIGANTE na CH-DEAE; e
- d) Purificação e isolamento do produto formado.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de os referidos derivados CH-DEAE possuírem graus de substituição ajustados entre 7 e 25% (CH-DEAE<sub>7</sub> à CH-DEAE<sub>25</sub>), preferencialmente 15% (CH-DEAE<sub>15</sub>), em que as substituições são nos grupos amino, grupos hidroxila e/ou em ambos respectivamente conforme estruturas:



em que:

R1 corresponde a

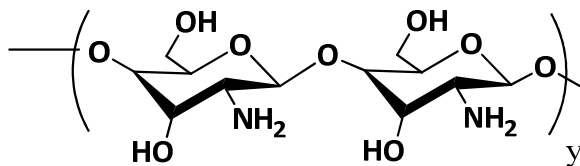


em que os valores de "x" e "y" variam de 0 a 1, e

correspondem ao número de mols de unidades repetitivas que estão unidas sequencialmente ou aleatoriamente.

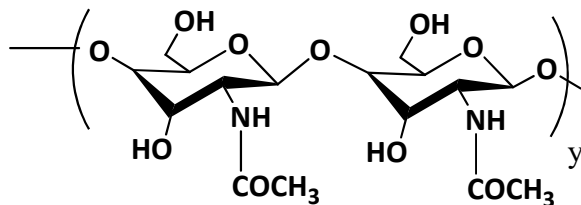
3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de ser utilizado preferencialmente,  $5,0 \times 10^{-3}$  mols de quitosana desacetilada (CH) com  $8,4 \times 10^{-3}$  mols de cloreto de 2-cloro-N,N-dietiletilamina (DEAE) para a obtenção de CH-DEAE<sub>15</sub>.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de a referida quitosana desacetilada possuir grau de desacetilação que varia de 80 a 99%, em que sua massa molecular de partida varia de 800 Da a 1000 kDa e apresenta estrutura:



em que o valor de  $y$  varia de 0 a 1, e corresponde ao número de mols de unidades repetitivas que estão unidas sequencialmente ou aleatoriamente.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de a referida quitina apresentar estrutura:



em que o valor de  $y$  varia de 0 a 1, e corresponde ao número de mols de unidades repetitivas que estão unidas sequencialmente ou aleatoriamente.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "a", ser realizada a preparação e purificação dos derivados

CH-DEAE, preferencialmente o CH-DEAE<sub>15</sub>, por meio da proteção ou não dos grupos amina da quitosana, seguido da reação com cloreto de 2-cloro-N,N-dietiletilamina.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 6, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "b", ativarem-se  $1,2 \times 10^{-5}$  mols de LIGANTE-PEG-COOH em  $7,0 \times 10^{-2}$  mols de DMSO com  $1,3 \times 10^{-5}$  mols de hidrocloreto de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDC) e  $5,0 \times 10^{-5}$  mols de NHS em uma proporção de 1:1,1:4, mantido em temperatura ambiente por pelo menos quatro horas, sob agitação de pelo menos 300 rpm.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de o referido poli(etileno glicol) (PEG) ser selecionado dos grupos que consistem em PEG monofuncional com grupo tiol ou grupos bifuncionais compreendendo um grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) numa extremidade e grupo carboxílico ( $-\text{COOH}$ ) noutra.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de o referido ligante ser selecionado do grupo que consiste em ácido fólico (FA), aptâmeros, proteínas, peptídeos, anticorpos monoclonais, preferencialmente o ácido fólico (FA).

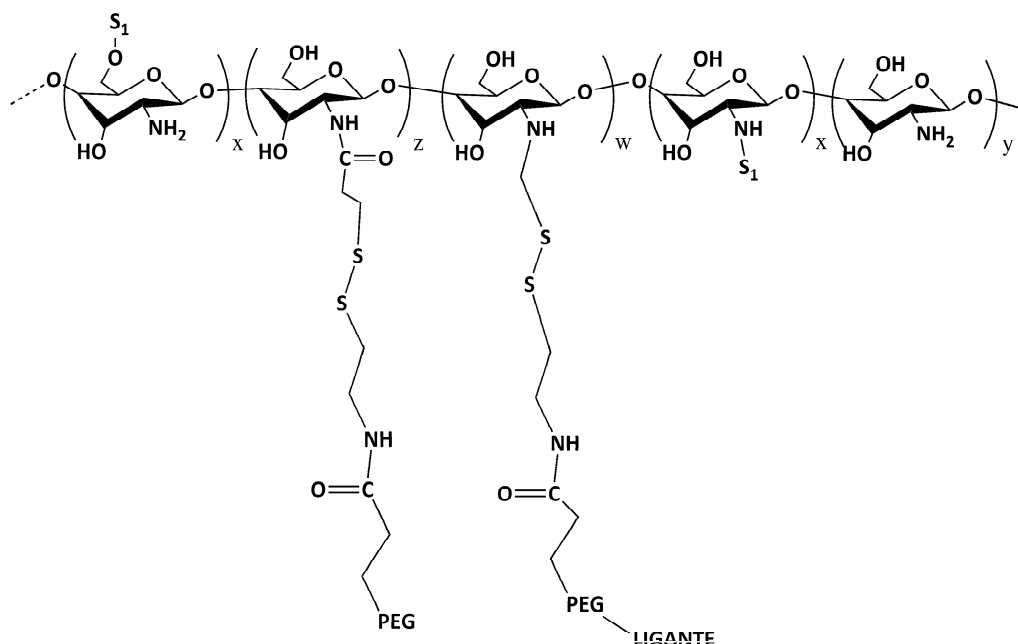
10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 9 ou 8, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "c", ser dissolvido  $1,13 \times 10^{-3}$  mols de CH-DEAE, preferencialmente o CH-DEAE<sub>15</sub> em  $0,33 \text{ mol.L}^{-1}$  de ácido acético para o preparo de quitosana contendo PEG e um ligante, preferencialmente o ácido fólico.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fato de, ainda na etapa "c", o LIGANTE-

PEG-COOH ativado ser adicionado à solução de CH-DEAE<sub>15</sub>, em que a reação é realizada no escuro por pelo menos 20 horas.

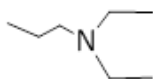
12. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 11, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "d", o produto final ser purificado por diálise (10-15 kDa de exclusão) em água deionizada por pelo menos 3 dias, em que o CH-DEAE-PEG-LIGANTE é isolado por liofilização.

13. Derivados de dietil(amino)etil quitosana (CH-DEAE) obtidos conforme processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizados** pelo fato de apresentarem a estrutura:



em que:

S<sub>1</sub> corresponde a:



e; S-S corresponde a ponte de sulfeto redutível.

em que os valores de w, x, y e z variam respectivamente de 0,1 a 2% , 7 a 25%, de 68 a 90,9% e de 2 a 5%

14. Derivados, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizados** pelo fato de o dietil(amino)etil quitosana (CH-DEAE) apresentar graus de substituição ajustados entre 7 e 25% (CH-DEAE<sub>7</sub> à CH-DEAE<sub>25</sub>).

15. Derivados, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizados** pelo fato de o referido PEG ser selecionado dos grupos que consistem em PEG monofuncional com grupo tiol ou grupos bifuncionais compreendendo um grupo amino (-NH<sub>2</sub>) numa extremidade e grupo carboxílico (-COOH) noutra.

16. Derivados, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizados** pelo fato de o referido ligante ser selecionado, de acordo com o alvo, do grupo que consiste em ácido fólico (FA), aptâmeros, proteínas, peptídeos, anticorpos monoclonais, preferencialmente o ácido fólico (FA).

17. Uso dos derivados dietil(amino)etil quitosana (CH-DEAE) conforme definido em qualquer uma das reivindicações 13 a 16, **caracterizado** pelo fato de ser no preparo de formulações variadas, tais como filmes, biodispositivos híbridos, nanopartículas multifuncionais e géis.

18. Processo de obtenção de nanopartículas multifuncionais **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de:

a) Preparação da solução de CH-DEAE-PEG-LIGANTE conforme definido em qualquer uma das reivindicações 13 a 16, em tampão fosfato pH 6,3; e

b) Adição da solução obtida na etapa "a" às soluções de pDNA ou siRNA diluídos no tampão fosfatos pH 6,3.

19. Processo, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "a", soluções estoque de CH-DEAE-PEG-LIGANTE na concentração de  $9,3 \times 10^{-3}$  mol/L de grupos amina serem preparadas em tampão fosfato pH 6,3, filtradas em ambiente esterilizado com filtro esterilizado com membrana de polietersulfona com poros de 0,45  $\mu\text{m}$ .

20. Processo, de acordo com a reivindicação 18 ou 19, **caracterizado** pelo fato de, na etapa "b", adicionar sob agitação de 300 rpm, alíquotas de  $3,1 \times 10^{-3}$  mol/L da solução estoque de CH-DEAE-PEG-LIGANTE obtida na etapa "a" às soluções de pDNA ( $3,8 \times 10^{-5}$  mol/L em grupos fosfato) ou siRNA ( $7,6 \times 10^{-5}$  mol/L em grupos fosfato) diluídos no tampão fosfato pH 6,3.

21. Processo, de acordo com a reivindicação 20, **caracterizado** pelo fato de utilizar-se uma concentração de grupos fosfato fixa e variar-se a concentração de grupos amina, o qual se obtém razões N/P que variam de 0 a 10, em que N corresponde aos grupos amina do polícatión e, P corresponde aos grupos fosfato do DNA ou siRNA.

22. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, **caracterizado** pelo fato de os tampões utilizados serem selecionados do grupo que consiste em acetato 50 mM pH 5,0 e força iônica 150 mM; tampão fosfato 25 mM pH 6,3 e força iônica 50 mM; e tampão fosfato 50 mM pH 7,4 e força iônica 150 mM.

23. Nanopartículas multifuncionais obtidas conforme processo definido em qualquer uma das reivindicações 18 a 22, **caracterizadas** pelo fato de compreenderem em sua estrutura o derivado CH-DEAE-PEG-LIGANTE e RNA de interferência (siRNA) ou DNA plasmidial (pDNA), em que

varia-se a concentração de grupos amina (N) de CH-DEAE-PEG-LIGANTE em relação aos grupos fosfato do DNA ou siRNA (P) na razão N/P que varia de 0 a 10.

24. Nanopartículas multifuncionais, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizadas** pelo fato de serem nanopartículas poliméricas compreendendo ligantes, fármacos ou ácidos nucleicos; ou nanopartículas híbridas compreendendo núcleo de material metálico ou poroso.

25. Nanopartículas multifuncionais, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizadas** pelo fato de serem ainda modificadas ou decoradas com moléculas ligantes, tais como anticorpos monoclonais, aptâmeros e outras moléculas; ou diferentes siRNA terapêuticos, tendo como alvo receptores celulares.

26. Nanopartículas multifuncionais, de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 25, **caracterizadas** pelo fato de, em uma modalidade preferida, serem de dietilaminoetil-quitosana-PEG-folato-siRNA-TNF-alfa (CH-DEAE-PEG-folato-siRNA-TNF $\alpha$ ), em que o referido siRNA utilizado é específico para TNF-alfa.

27. Nanopartículas multifuncionais, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizadas** pelo fato de, alternativamente, serem obtidas pelo processo de coacervação, gelação iônica ou outro intercruzamento químico ou iônico.

28. Nanopartículas multifuncionais, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 27, **caracterizadas** pelo fato de, alternativamente, serem nanodispositivos híbridos compreendendo os derivados CH-DEAE-PEG-LIGANTE, metais, sílica e materiais porosos de naturezas orgânicas,

tais como polímeros; ou inorgânicas, tais como óxidos, zeólitas ou outros.

29. Uso das nanopartículas multifuncionais conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 22 a 28, **caracterizado** pelo fato de serem para a transferência gênica não viral, bem como para a terapia gênica não viral e para liberação controlada de fármacos de qualquer natureza.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado** pelo fato de serem no preparo de medicamentos para o tratamento de doenças de origem genética que tenham sido herdadas ou adquiridas, preferencialmente os tratamentos via terapia gênica tais como as doenças inflamatórias crônicas mediadas pelo TNF- $\alpha$ , Doença de Crohn, Colite ulcerosa, Psoríase e Espondilite ankylosante.

31. Uso, de acordo com a reivindicação 29 ou 30, **caracterizado** pelo fato de, preferencialmente serem no preparo de um medicamento para tratar a doença de artrite.

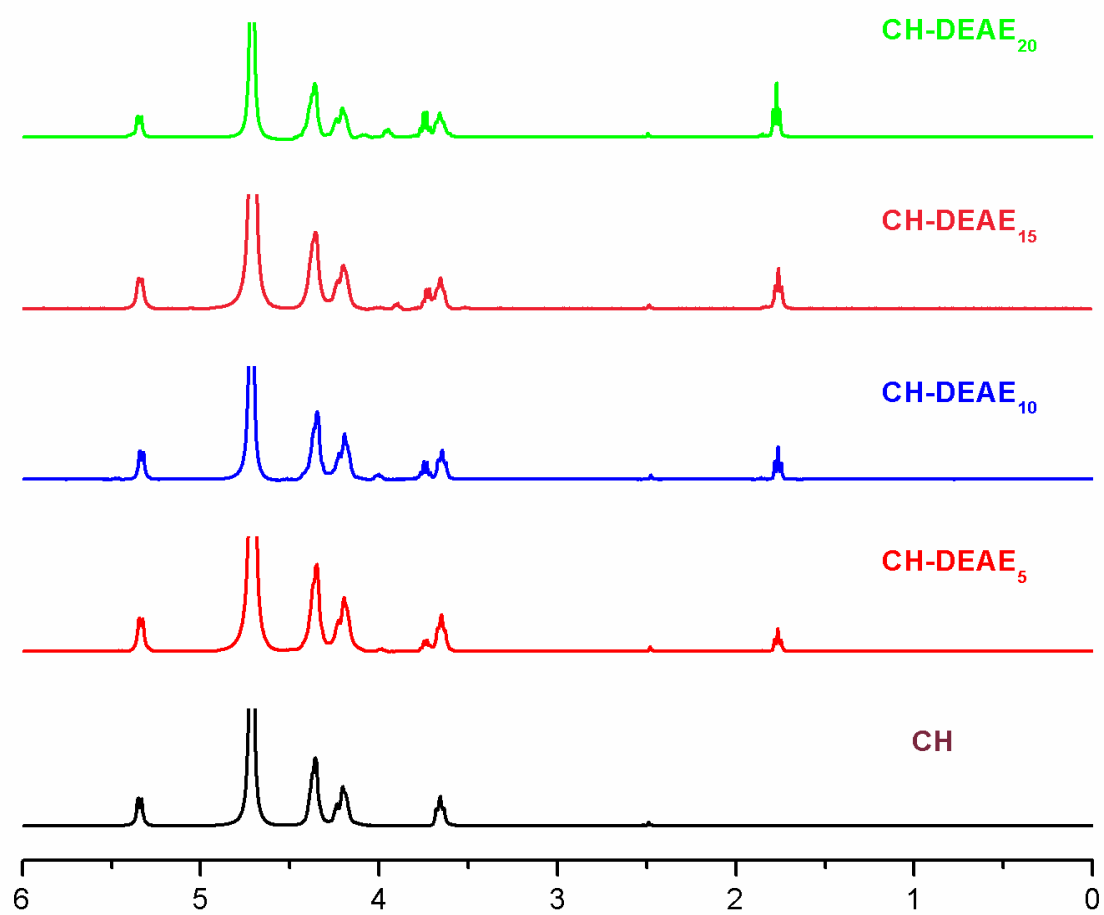


Figura 1

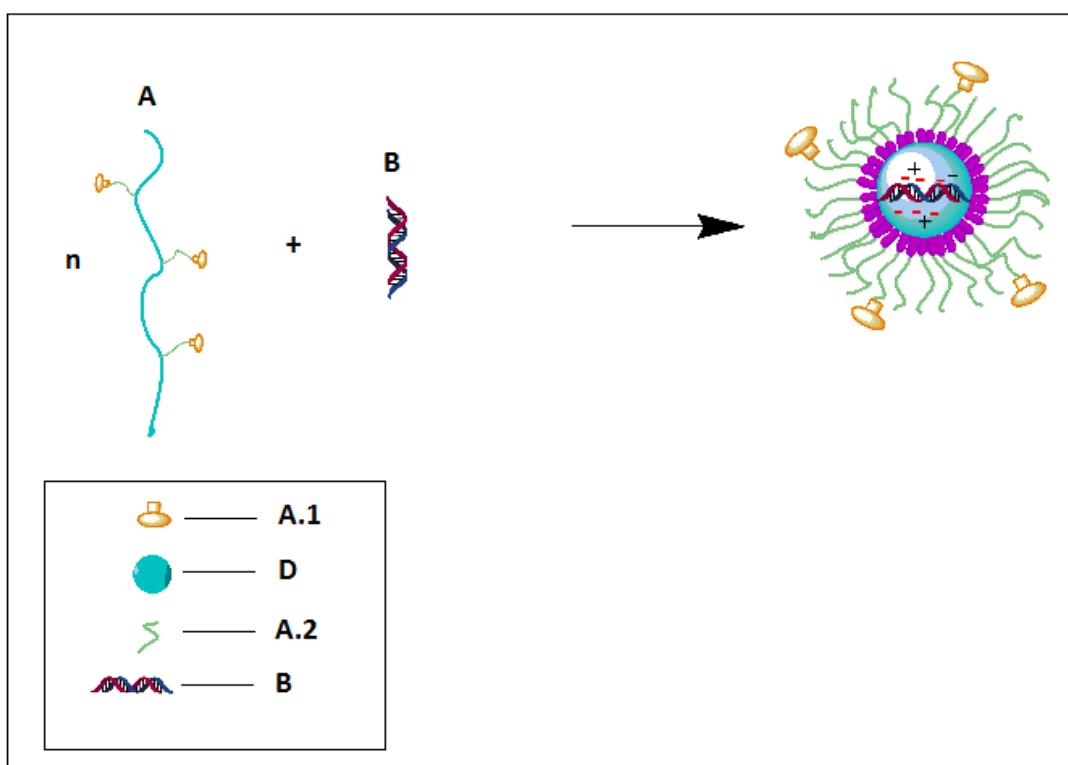


Figura 2

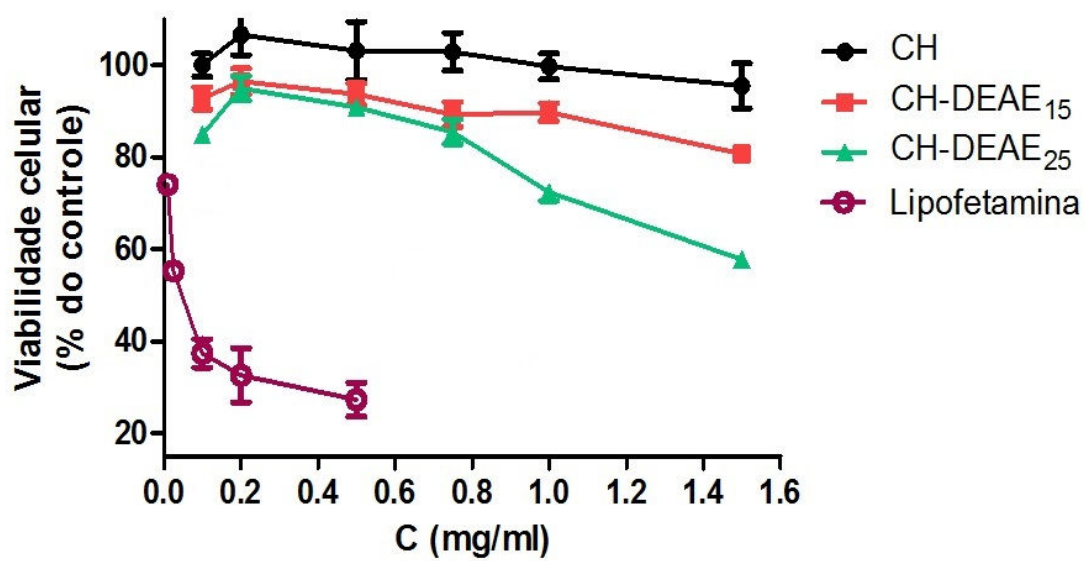


Figura 3

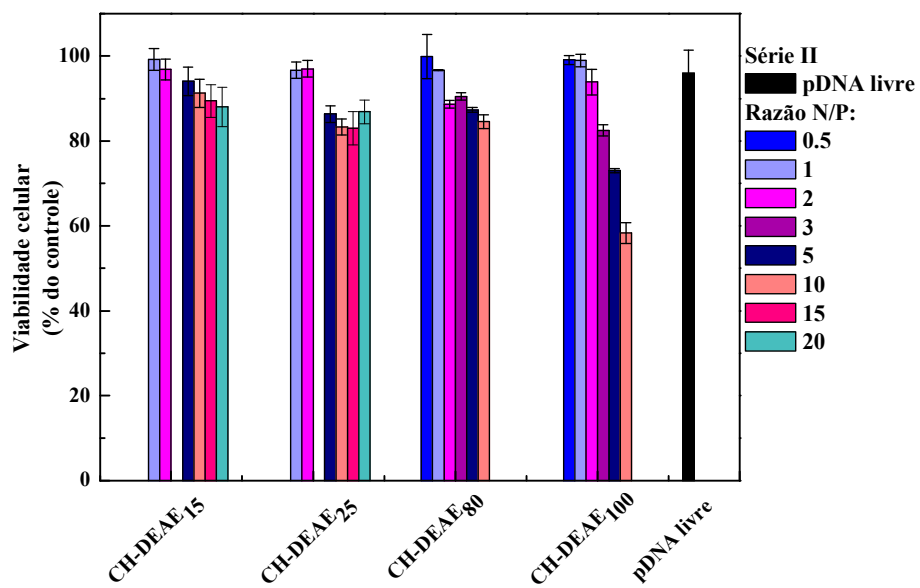


Figura 4

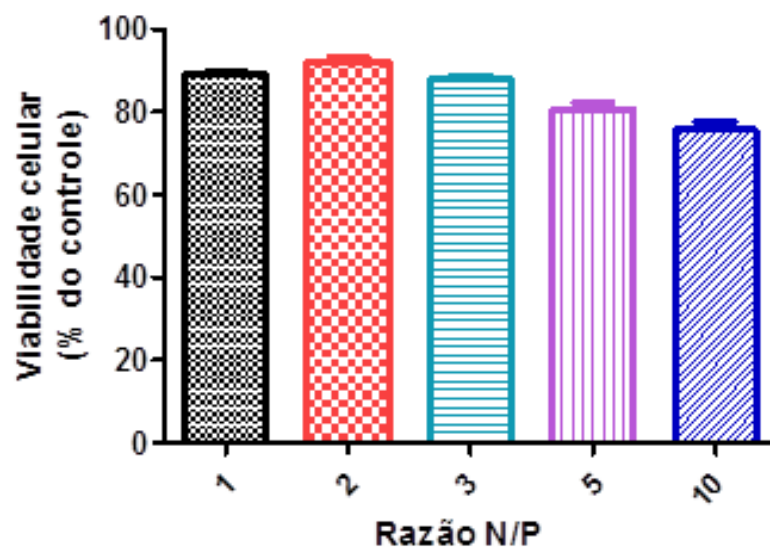


Figura 5

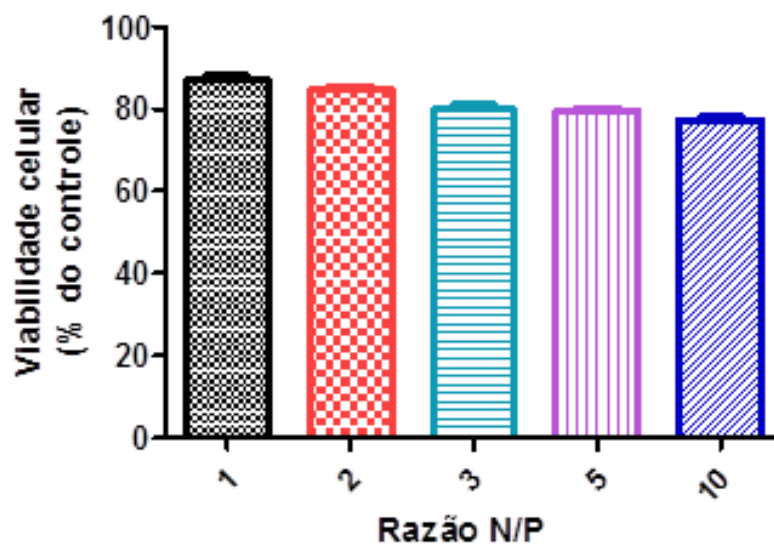


Figura 6

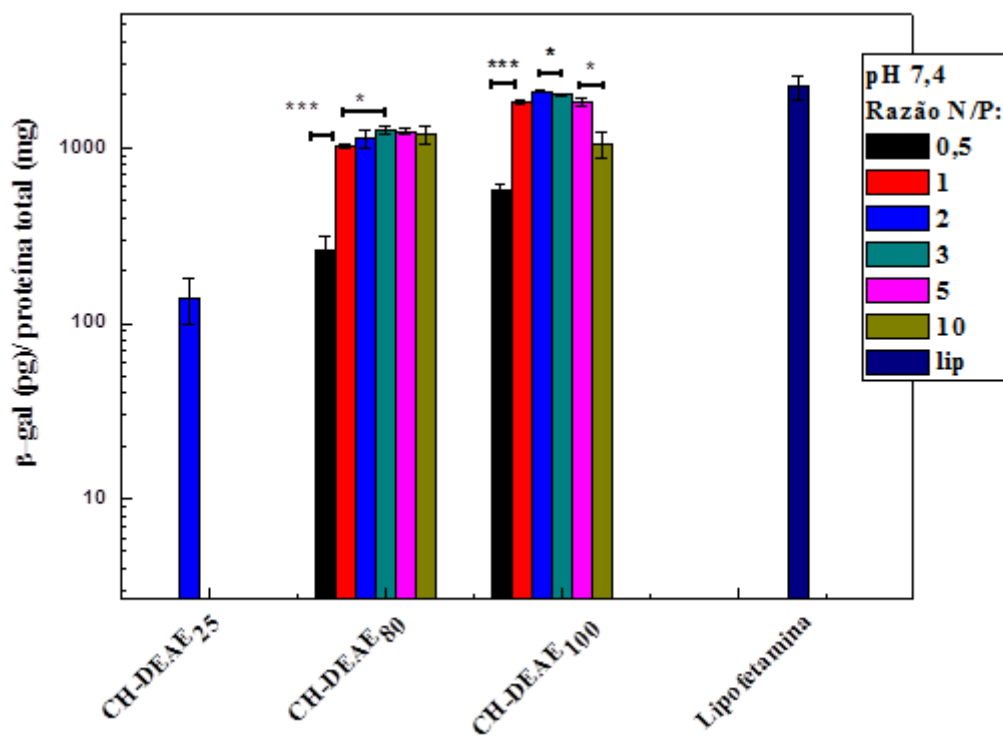


Figura 7A

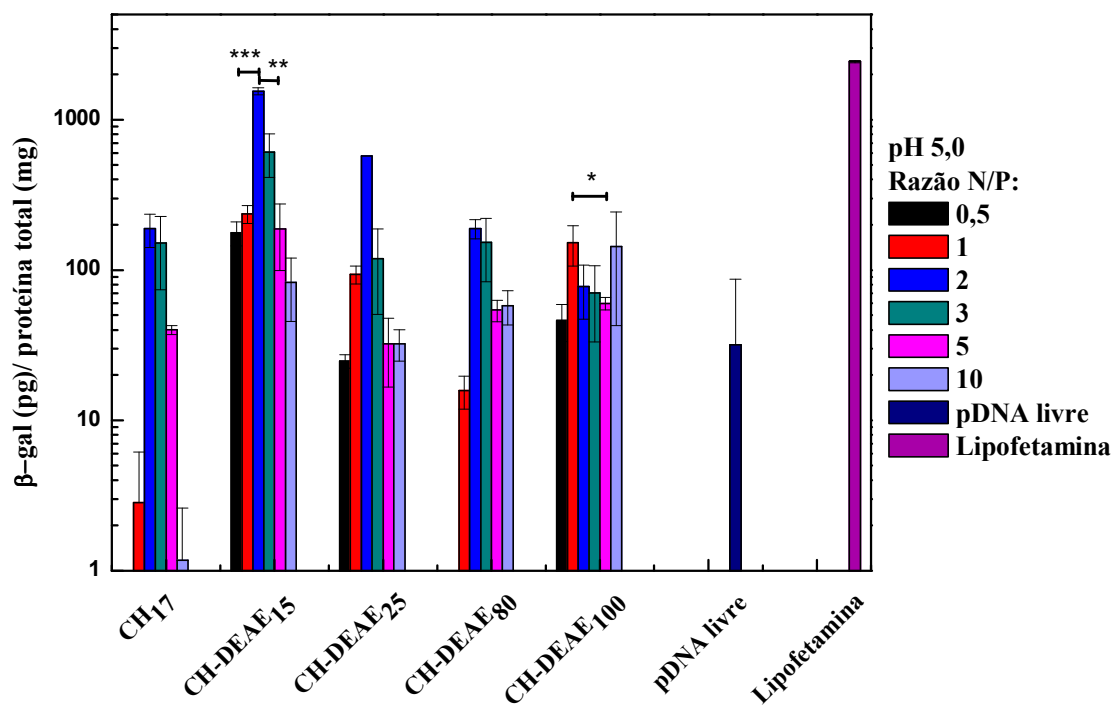


Figura 7B

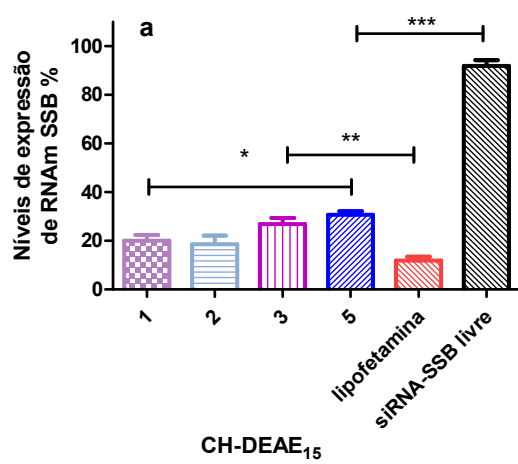


Figura 8A

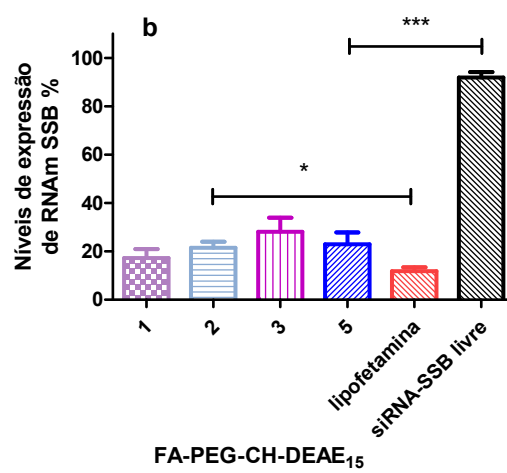


Figura 8B

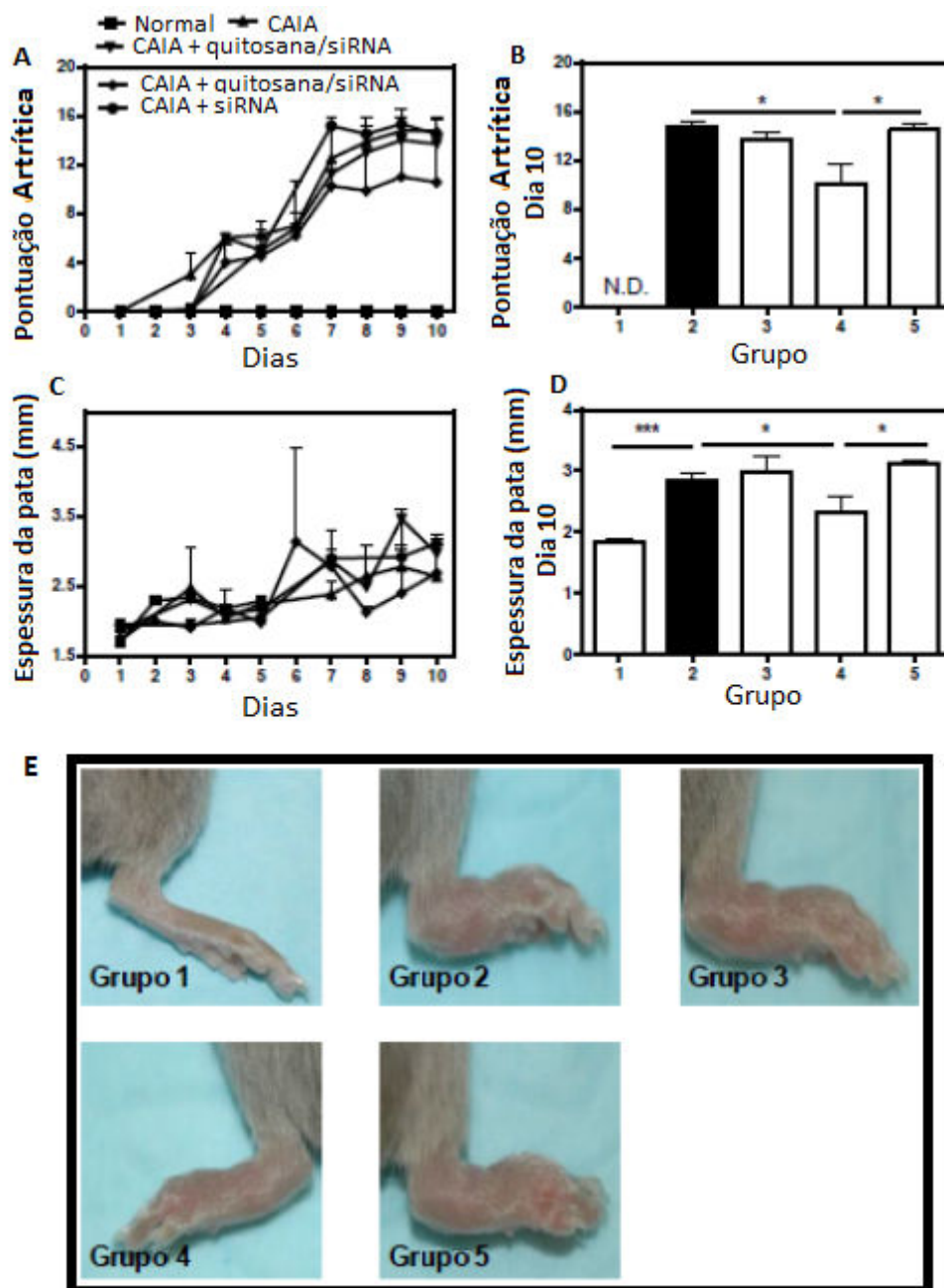


Figura 9

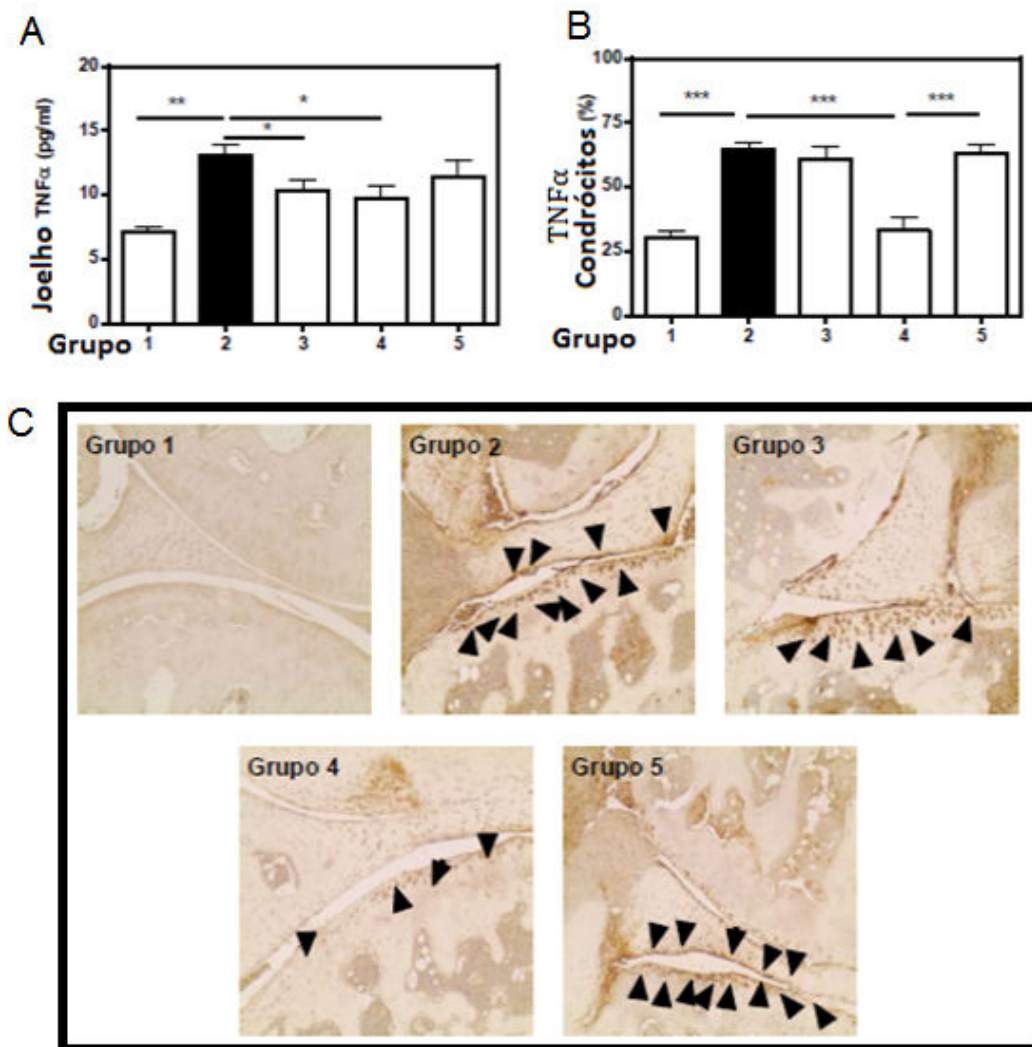


Figura 10

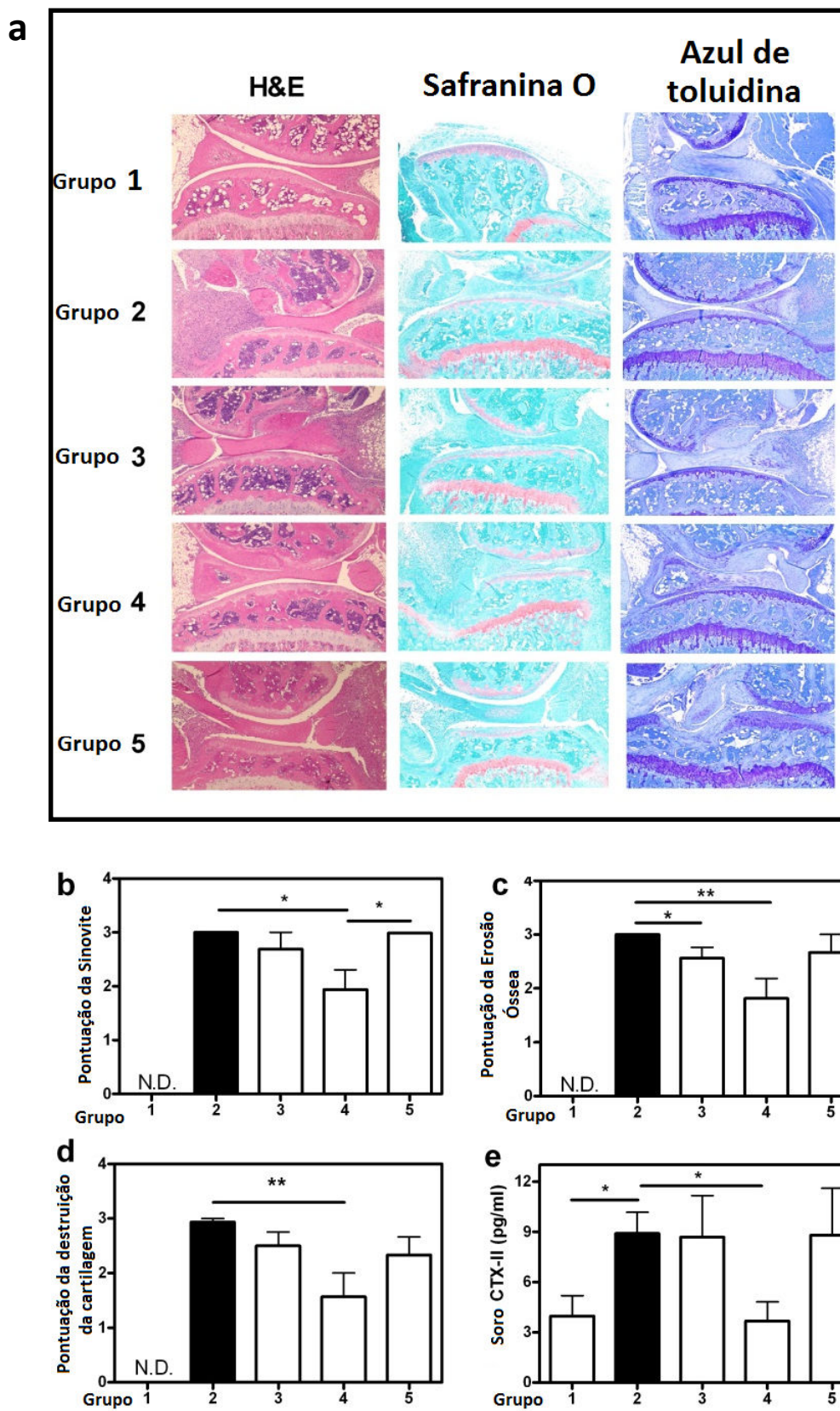


Figura 11

Resumo

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE DERIVADOS DE DIETIL(AMINO)ETIL  
QUITOSANA (CH-DEAE), DERIVADOS OBTIDOS, SEU USO, PROCESSO  
DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS À BASE DESTES  
DERIVADOS, NANOPARTÍCULAS MULTIFUNCIONAIS OBTIDAS E USOS  
DAS MESMAS**

A presente invenção faz referência a um processo de obtenção de derivados de dietil(amino)etil quitosana ligados a um LIGANTE via cadeias de poli(etileno-glicol) (PEG), assim como aos referidos derivados obtidos e seus usos. Além disso, a presente invenção refere-se a um processo de obtenção de nanopartículas multifuncionais à base desses derivados, bem como às nanopartículas obtidas e seus usos para a transferência gênica não viral, com o objetivo de tratar doenças de origem genética que tenham sido herdadas ou adquiridas, em particular os tratamentos via terapia gênica. Em uma modalidade preferida, a presente invenção se refere às nanopartículas de dietilaminoetil-quitosana-PEG-folato-siRNA-TNF-alfa (CH-DEAE-PEG-folato-siRNA-TNF $\alpha$ ) obtidas conforme processo descrito, para o tratamento de artrite reumatoide, psoríase, doença de CROHN e outras doenças inflamatórias.