

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



00 76243

SOLICITUD DE
PATENTE DE
INVENCION

RAMITE 02 EVENTO 01 ACTUACION 411

SECRETARÍA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Folios. 35
Código: 0076243 0000000
Fecha: 1999-10-16 16:41:05
Tipo: 02 PATENTES : 1 DESISTEN/ 4.2 P. AUTOMATICA
Destino: 0000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social NIKA HEALTH PRODUCTS LIMITED

Nº. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio Liechtenstein

Departamento o Estado

Dirección Stadtle 36

Ciudad FL- 9490 Vaduz Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre EMILIO FERRERO

Dirección y Domicilio Carrera 4 No 72 35

Ciudad Bogotá Colombia Teléfono 3-47-36-11

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor(es) 1 Ernst Rudolf WALT 2 Reinhard GLUCK
3 Peter KLEIN

Identificación 1- Moosgasse 84, CH-3053 Münchenbuchsee, Suiza
Dirección 2- Chasseralstrasse 156, CH- 3028 Spiegel bei Bern Suiza
3- Neu Hof, CH-4438 Langenbruck, Suiza

Ciudad

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención VIROSOMAS CATIONICOS DOSPER

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

(33) País

(32) Fecha

(31) No. Solicitud

US

08 de Octubre de 1999

09/414 872

Convención de París

Para Publicar a los ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

Colo 08027 801 008-0 / JJC/mrm ID 22

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K 048/000

= 6 OCT. 2000

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

La presente invención está relacionada con un virosoma catiónico que incluye al menos un péptido activo inductor de la fusión que es una hemaglutinina de un virus distinto del Sendai y donde la membrana del virosoma incluye entre 5% y 30% en peso, con respecto a los lípidos totales, de 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER) en combinación con otros lípidos incluyendo la fosfatidilcolina (FC) o un derivado suyo y opcionalmente fosfatidiletanolamina (FE) y/u otros lípidos catiónicos.

Los virosomas son altamente eficaces en el transporte de material cargado negativamente, especialmente compuestos de ácidos nucleicos, a las células diana.

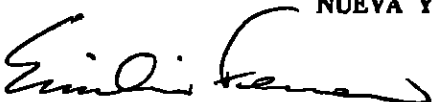
Esta invención también está relacionada con un procedimiento para la fabricación de los virosomas y los usos de estos para propósitos de diagnóstico, cosmético, médicos o científicos.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

- | | |
|---|-------------------------------------|
| Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica | ☒ |
| Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC | ☒ |
| Recibo de la tasa respectiva <i>por v/o de \$608.000</i> | ☒ |
| Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Andina: | |
| Copia de la primera solicitud | ☐ |
| Traducción oficial | ☐ |
| Si se reivindica prioridad Unionista: | |
| Copia certificada de la primera solicitud: | ☐ |
| <small>Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior</small> | |
| Traducción simple | ☐ |
| Capítulo descriptivo | ☒ |
| Dibujos, planos necesarios <i>(7 pags.)</i> | ☒ |
| Capítulo reivindicatorio | ☒ |
| Tarjeta archivo propietarios según formato | ☒ |
| Tarjeta archivo temático según formato | ☒ |
| Extracto para publicación según formato | ☒ |
| Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms | ☐ |
| Otros Documentos | ☐ |

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCIÓN Y DECLARO QUE LA INVENCIÓN ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA



NOMBRE EMILIO FERRERO

438.019 de Usaqué

T.P.No. 31.929

WCR

VIROSMAS CATIONICOS DOSPER

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención está en los campos de la bioquímica, biotecnología génica y terapia génica y está relacionada con nuevos virosomas, es decir, vesículas liposómicas cargadas positivamente
5 que contienen glicoproteínas virales en la membrana, para transferencia altamente eficiente del material deseado, especialmente material genético, a localizaciones diana, y sus aplicaciones útiles. Los virosomas catiónicos presentes son especialmente apropiados para la distribución no infectiva específica y no
10 específica de compuestos cargados negativamente, preferentemente genes, a células diana in vitro e in vivo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El documento WO92/13525, cuyos contenidos completos serán incorporados aquí por referencia, informa de que los virosomas
15 hechos de membranas de bicapa de fosfolípidos que son marcados con proteínas de espículas virales del virus de la gripe y con marcadores específicos de células como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, se fusionan muy eficientemente con membranas modelo y células animales debido a un mecanismo de penetración similar al de
20 los virus mediante endocitosis mediada por receptor. Mientras que estos virosomas son aplicados con éxito para distribuir sustancias químicas y fármacos deseados a localizaciones diana, tienen ciertas desventajas con respecto a la incorporación estable y el transporte de moléculas cargadas como, por ejemplo, ácidos nucleicos cargados
25 negativamente.

El documento WO97/41834, cuyos contenidos completos serán incorporados aquí por referencia, informa de los virosomas catiónicos para la distribución eficiente específica de célula de material genético a células diana in vitro e in vivo. Además informa
30 de una forma de fabricación de tales virosomas así como de procedimientos para la aplicación de estos virosomas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención es un desarrollo posterior de la invención descrita en el documento WO97/41834 y está relacionada con
35 un virosoma catiónico nuevo que debido a la composición específica

de su membrana puede cargarse muy eficazmente con cualquier material deseado cargado negativamente, especialmente con material genético incluyendo DNA o RNA de cadena corta o larga, oligodesoxinucleótidos, ribonucleótidos, ácidos nucleicos péptido (NAP), ribozimas (moléculas de RNA con actividades enzimáticas), genes, plásmidos y vectores. De forma inesperada, se encontró que cuando se usaba el DOSPER como lípido catiónico en combinación con otros lípidos podían producirse virosomas de alto rendimiento que incluso excedían hasta en diez veces la ya alta eficiencia de transfección de los virosomas DOTAP del documento WO97/41834. Sin embargo, este sorprendente efecto se consigue sólo cuando el DOSPER se usa como lípido catiónico y cuando el DOSPER se combina con otros lípidos en una proporción que es diferente de la proporción conocida de los lípidos catiónicos (DOTAP) con respecto a los otros lípidos explícitamente descrita y reivindicada en el documento WO97/41834.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Fig. 1: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. 5×10^5 células de la línea celular transformada de riñón humano embrionario primario 293 T en 0,5 ml de medio se transfectaron con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con ^3H .

Fig. 2: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. 5×10^5 células de la línea celular de fibroblasto de mono COS-1 se transfectaron con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con ^3H .

Fig. 3: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. 5×10^5 células de la línea celular de carcinoma epiteloide de cuello del útero humano HeLa en 0,5 ml de medio se transfectaron con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con ^3H .

Fig. 4: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. 5×10^5 células de la línea celular de fibroblasto de ratón NIH3T3 se transfectaron con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con

³H.

Fig. 5: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. 5×10^5 células de la línea celular de leucemia mielógena crónica humana K562 se transfectaron con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con ³H.

Fig. 6: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. 5×10^5 células de la línea celular de mieloma de ratón P3 se transfectaron con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con ³H.

Fig. 7: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. 5×10^5 células de las líneas celulares COS-1, 293T, K562 y P3X63Ag8 se transfectaron con virosomas DOSPER que contenían plásmido pcDNA3.1/His B/lacZ marcado con ³H.

Fig. 8: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. 5×10^5 células de la línea celular transformada de riñón humano embrionario primario 293 T en 0,5 ml de medio se transfectaron con virosomas DOSPER y virosomas DOTAP que contenían plásmido pcDNA3.1/His B/lacZ his marcado con ³H (0,4 µg de DNA; 24.000 dpm = 100%).

Fig. 9: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. 5×10^5 células de la línea celular de leucemia mielógena crónica humana K562 en 0,5 ml de medio se transfectaron con virosomas DOSPER y virosomas DOTAP que contenían plásmido pcDNA3.1/His B/lacZ his marcado con ³H (0,4 µg de DNA; 24.000 dpm = 100%).

Fig. 10: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. 5×10^5 células de la línea celular de ratón híbrida y no secretora Sp2 en 0,5 ml de medio se transfectaron con virosomas DOSPER y virosomas DOTAP que contenían plásmido pcDNA3.1/His B/lacZ his marcado con ³H (0,4 µg de DNA; 24.000 dpm = 100%).

Fig. 11: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. 5×10^5 células de la línea celular de

carcinoma epiteloide humano HeLa se transfectaron con virosomas DOSPER y virosomas DOTAP que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con ³H.

Fig. 12: Expresión de β -galactosidasa en células NIH3T3 que han sido transfectadas con virosomas DOSPER o liposomas DOSPER respectivamente; principales valores de los tres experimentos A, B y C.

Fig. 13: Expresión de β -galactosidasa en células NIH3T3 y 293T que han sido transfectadas con virosomas DOSPER (experimento A) usando plásmido pcDNA3.1/His B/lacZ en diferentes concentraciones y suministrado mediante diferentes números de virosomas; valores en ng/mg de proteína después de 4 días.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERENTES

Los virosomas de la presente invención son vesículas lipídicas que típicamente tienen una membrana de vesícula con una carga neta positiva debido a la presencia de lípidos catiónicos. Además tienen péptidos de origen viral que inducen la fusión, predominantemente glicopéptidos de envueltas de virus tales como la hemaglitinina del virus de la gripe, péptidos que provocan que las células diana incorporen los virosomas mediante un mecanismo de penetración mediado por receptor. Además pueden equiparse opcionalmente con marcadores específicos de célula para la adhesión preferente a las células diana deseadas in vivo.

Es preferible la presencia de fosfatidiletanolamina (FE) en la membrana para anclar tal marcador específico de célula al virosoma a través de un acoplador bifuncional. Donde no se requiere dirigir los virosomas a células específicas (por ejemplo, para aplicación en cultivos definidos de células in vitro) o donde el marcador específico de célula está unido a la membrana de una manera distinta que mediante un acoplador bifuncional, la FE puede estar opcionalmente ausente de la membrana del virosoma.

En una forma de realización que es preferible para las aplicaciones in vivo de los virosomas, la presente invención también está relacionada con el enlace covalente irreversible de marcadores específicos de célula con los virosomas catiónicos incluyendo pero

no limitándose a anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos F(ab')₂ y Fab', citoquinas y/o factores de crecimiento, útiles para una detección selectiva y unión a las células diana. Están unidas a la membrana de la vesícula de tal forma que se extienden hacia el exterior y presentan esencialmente una actividad funcional completa con respecto a la detección del receptor y su unión. Un procedimiento preferible para hacer virosomas que lleven el acoplamiento orientado de un marcador específico de célula se explica en el Ejemplo 1 del documento WO97/41834 para los virosomas DOTAP. De acuerdo con ese procedimiento, los marcadores específicos de célula se acoplan a las moléculas formadas previamente de fosfatidiletanolamina-acoplador tales como, por ejemplo, N-[4-(p-maleimido-fenilbutiril)]-fosfatidiletanolamina (MFB.FE) en presencia de un detergente.

Para conseguir los mejores resultados posibles es ventajoso aislar y purificar cuidadosamente las glicoproteínas virales antes de la reconstitución para impedir la inactivación por digestión proteolítica o por reducción de los puentes S-S intramoleculares. De acuerdo con esto, es preferible que los marcadores conjugados, por ejemplo, el marcador MFB.FE, se separen de las moléculas no conjugadas de fosfatidiletanolamina-acoplador (por ejemplo, MFB.FE) por cromatografía de afinidad con una matriz de garosa activada, preferiblemente con Tiopropil Sefarosa 6B reducida. Después se añaden alícuotas de los complejos de moléculas conjugadas purificadas de fosfatidiletanolamina-acoplador-marcador a la solución de detergente que contiene la mezcla de lípidos de membrana disueltos, péptidos de fusión y otros ingredientes deseados, para que los virosomas catiónicos se formen.

Es mejor llevar a cabo el procedimiento de unión del acoplador bifuncional con el fosfolípido y el marcador específico de célula en un proceso aparte antes de la preparación de los virosomas. Este procedimiento permite controlar mejor y optimizar la densidad de superficie de las membranas de los virosomas, especialmente con respecto al número de marcadores específicos de célula unidos a ellos. Es importante mejorar el control de la concentración de

moléculas de proteína embebidas en o unidas a la membrana dado que una relación desajustada de péptidos de fusión (por ejemplo, hemaglutinina) y marcadores específicos de células (por ejemplo, fragmentos Fab' de anticuerpo) en la membrana del virosoma puede
 5 reducir o incluso destruir las propiedades selectivas y -en último caso- puede llevar a la coagulación y precipitación de las vesículas.

La ventaja de usar fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ y Fab' en vez de las moléculas completas de anticuerpos como marcadores
 10 específicos de células se ha discutido ampliamente en el documento W097/41834. Los presentes virosomas específicos de célula presentan selectividad por varios tipos de células debido a sus marcadores específicos de células en la membrana y, simultáneamente, una alta capacidad de penetración en la célula por endocitosis debido al
 15 péptido viral que induce la fusión, por ejemplo, la hemaglutinina. Los virosomas con fragmentos Fab' que reconocen antígenos asociados a tumores tales como TAG72, CEA, 17-1A, CA 19-9 o antígenos asociados con leucemia tales como CD10 (ALLAC= Antígeno de la Leucemia Linfocítica Aguda Común) y CD20 se unen selectivamente, es
 20 decir, de forma preferente, a células tumorales o leucémicas que llevan los antígenos mencionados en su superficie celular.

Las nuevas vesículas o virosomas son especialmente útiles para transportar cualquier material cargado negativamente que se desee, preferiblemente material genético, a las localizaciones diana, en
 25 particular a células animales y humanas y tejidos in vitro e in vivo. Se recalca que los nuevos virosomas no son sólo capaces de penetrar en células proliferantes, es decir, que se replican, sino también en las no proliferantes, es decir, células en reposo, aspecto que los hace ampliamente aplicables en los campos de las
 30 biociencias, farmacología y medicina, tanto como herramienta de investigación y/o de diagnóstico y como medicamento. Usar los presentes virosomas como lanzaderas para la distribución de agentes citotóxicos o de material de ácidos nucleicos los hace adecuados para aplicaciones en varias condiciones patológicas tales como, por
 35 ejemplo, infecciones virales, cánceres, tumores, leucemias u otras

enfermedades incluyendo enfermedades que son debidas a defectos genéticos y que pueden ser susceptibles de procedimientos de terapia génica usando los presentes virosomas.

Los virosomas de la presente invención pueden aplicarse in vitro o in vivo. Por ejemplo, la purgación de la médula ósea se usa como parte del tratamiento de varias neoplasias, incluidas las leucemias agudas y crónicas. En la actualidad, la médula se limpia de células leucémicas mediante diversos agentes tales como reactivos inmunológicos y fármacos quimioterapéuticos. El ODN encapsulado en virosomas dirigidos contra un oncogen que confiere una ventaja en el crecimiento de las células leucémicas se demostrará útil terapéuticamente y, lo más importante de todo, más selectivo que los agentes quimioterapéuticos convencionales en eliminar las células leucémicas mientras que permite vivir a las células progenitoras normales.

Para su uso como medicamento, los presentes virosomas pueden formar parte de una composición farmacéutica que además lleve los aditivos usuales y los transportadores farmacéuticamente apropiados. Es preferible que la composición farmacéutica se prepare como una solución inyectable, pero para algunas aplicaciones pueden ser ventajosas otras formas de preparación, por ejemplo, emulsiones, cremas, geles, ungüentos, para administración tópica o sistémica.

Por tanto, también es un objetivo de la presente invención usar los presentes virosomas para la fabricación de una composición farmacéutica apropiada para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de individuos concretos animales o humanos que pueden beneficiarse de tal tratamiento. Otro objetivo de la presente invención es usar los presentes virosomas para la fabricación de un equipo de diagnóstico para aplicaciones in vitro e in vivo.

Las presentes vesículas se obtienen preferiblemente por un proceso análogo a cualquiera de los procesos para hacer virosomas DOTAP expuestos en los Ejemplos 1 a 3 y 6 del documento WO97/41834, excepto que el DOTAP se sustituye por DOSPER y que la concentración de DOSPER en la membrana final del virosoma se ajusta de forma apropiada como se define más adelante y, en particular, no excede

del 30% en peso del contenido total en lípidos del virosoma. Básicamente, el procedimiento de preparación de los presentes virosomas comprende los siguientes pasos:

- a) preparar una solución tampón que lleva un detergente no iónico y que además lleva DOSPER y otros lípidos y al menos un péptido activo inductor de la fusión que es la hemaglutinina de virus distinto de Sendai que provoca que las vesículas sean internalizadas por las células diana a través de fagocitosis o endocitosis mediadas por receptor;
- b) ajustar las concentraciones de lípidos -con respecto a los lípidos totales de membrana- entre 5% y 30% en peso de DOSPER y a una proporción entre 95% y 70% en peso de dichos otros lípidos incluyendo la fosfatidilcolina (FC) o un derivado de ella y opcionalmente fosfatidiletanolamina (FE) y/o lípidos catiónicos distintos del DOSPER; y
- (c) eliminar el detergente mediante diálisis o por tratamiento de la solución con microbolas transportadoras, dando lugar a la formación de dichas vesículas de bicapa lipídica cargadas positivamente; y preferiblemente
- (d) incorporar en las vesículas una cantidad de un fármaco o sustancia deseada para su distribución a células diana, siendo dichos fármaco o sustancia preferiblemente con carga negativa y siendo especialmente seleccionada del grupo formado por un tinte, una sustancia trazadora, un agente cosmético, una sustancia farmacéutica o biológicamente activa y un material de ácido nucleico.

En otra forma de realización de la invención preferible para las aplicaciones in vivo de los virosomas, se aplica un acoplador bifuncional apropiado para unir irreversiblemente un marcador específico de célula a la membrana de la vesícula. El marcador específico de célula, que está dirigido a un receptor celular responsable de la unión selectiva del virosoma a la célula, se une al acoplador de tal manera que es aún biológicamente activo de forma completa. Es preferible que el acoplador se use en la forma de un complejo molecular formado previamente donde el acoplador está

covalentemente unido a fosfatidiletanolamina y a un marcador específico de célula, como se define en las reivindicaciones.

El término "péptido inductor de la fusión" se refiere a péptidos o proteínas capaces de inducir y/o promover una reacción de fusión entre la membrana del virosoma y una membrana lipídica de la célula diana. En la mayoría de las formas de realización, se refiere a glicoproteínas de las espículas virales que contienen el péptido de fusión, especialmente al trímero completo de hemaglutinina de las espículas virales de superficie, un monómero suyo o una o ambas subunidades digeridas, los glicopéptidos HA1 y HA2, que contienen el péptido de fusión funcional. En otra forma de realización de la presente invención el término se refiere al mismo péptido de fusión puro, aislado de fuentes naturales o producido sintéticamente. En una forma de realización particularmente preferida de la presente invención, estos polipéptidos que contienen el péptido de fusión se refieren a las hemaglutininas del virus de la gripe, por ejemplo, el del subtipo A-H1N1.

En vez de o además de la hemaglutinina del virus de la gripe, las hemaglutininas de otros virus también pueden ser usadas adecuadamente como péptidos (proteínas) de fusión para los presentes virosomas dado que presentan esencialmente el mismo mecanismo de penetración en la célula mediado por pH que la hemaglutinina de la gripe. Las hemaglutininas candidatas incluyen, por ejemplo, rhabdovirus, el virus parainfluenza tipo III, el virus Semliki Forest y togavirus, como se explica en el documento WO97/41834.

El término "acoplador" se refiere a una molécula orgánica heterobifuncional capaz de unirse a la superficie de las vesículas preparadas de acuerdo con esta invención y capaz de unir polipéptidos. En una forma de realización preferible de la presente invención, esta molécula contiene un grupo N-hidroxisuccinimida para acoplarse al grupo amino de la fosfatidiletanolamina y un grupo maleimida para la conjugación de un marcador específico de célula como, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo monoclonal. Los acopladores adecuados llevan succinimidil 4-(N-maleimidometil)-cilcohexano-1-carboxilato, éster de m-maleimidobencil-N-

hidroxisuccinimida, éster de m-maleimidobencil-N-hidroxisulfosuccinimida, succinimidil 4(p-maleimidofenil)-butirato, sulfosuccinimidil 4(p-maleimidofenil)butirato; alternativamente, el acoplador puede ser una molécula que contenga un grupo N-
5 hidroxisuccinimida y un grupo azido fotorreactivo para el acoplamiento a los marcadores, por ejemplo, citoquinas, tales como el N-hidroxisuccinimidilsuberato (NHS-SA), N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato (HASAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato (SANPAH), N-sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-
10 2-nitrofenilamino)hexanoato.

Es preferible que el acoplador se use en la forma de una complejo molecular formado previamente de lípidos más el acoplador más el marcador específico de célula.

El término "proteína específica de célula" o "marcador
15 específico de célula" se refiere a una proteína capaz de unirse al acoplador o al complejo acoplador-lípido, respectivamente, y además es capaz de unirse al receptor de las células diana. En una forma de realización preferida de la presente invención, esta molécula se refiere a un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, una
20 citoquina o un factor de crecimiento. El marcador específico de célula permite una detección selectiva y una unión de las células diana y así mejora la acción del péptido inductor de la fusión presentado concomitantemente el la membrana del virosoma. Los fragmentos de anticuerpos preferibles incluyen los fragmentos
25 F(ab')₂ y Fab', mientras que los marcadores específicos de célula además incluyen interleukinas y otras citoquinas, especialmente las enumeradas en la Tabla 1 de abajo.

Tabla 1

Citoquinas (abreviaturas internacionales)			
BDNF	IFN α	MIP-1 α	PDGF
CNTF	IFN β	MIP-1 β	PF-4
EGF	IFN γ	MIP-2	RANTES
Epo	IL-1 a IL-15	NGF	SCF
FGF	LIF	NT-3	TGF α
GM-CSF	MCP-1 a MCP-3	OSM	TGF β

15
13

1-309/TCA-3	M-CSF	PBP	Tpo
γIP-10	MIF	PBSF	jVEGF

El término "lípidos catiónicos" como se usa aquí se refiere a una molécula orgánica que contiene un componente catiónico y una cola apolar, lo que se llama una anfifática cabeza-a-cola, como el cloruro de N-[(1,2,3-dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) (Felger y col.; Proc Natl Acad Sci USA 84:7413-7417, 1987), N-[1,2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio metilsulfato (DOTAP); o N-t-butyl-N'-tetradecil-3-tetradecilamonio propionamida (Ruysschaert y col.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 203:1622-1628, 1994). A menos que se mencione explícitamente otra cosa, el término también incluye los lípidos policationicos definidos más abajo.

El término "lípidos policationicos" se refiere a una molécula orgánica que contiene un componente policationico y una cola apolar como la lipoespermina: 1,3-dipalmitoil-2-fosfatidiletanolamido-espermina (DPFEE) y dioctadecilamidoglicil espermina (DOGE) (Behr et al. ; Proc. Natl. Acad. USA 86:6982-6986, 1989); trifluoroacetato de 2,3-dioleoiloxi-N-[2(esperminacarboxamido) etil]-N,N-dimetil-1-propanoaminio (DOEPA); 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER); yoduro de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis(2-hidroxietil)-2,3-dioleoiloxi-1,4-butanodiamonio (THDOB).

Es esencial que todos los virosomas de la presente invención contienen DOSPER y uno o más de otros lípidos naturales o sintéticos que están cargados positivamente o son neutros. Por "cargado positivamente" se entiende que los lípidos tienen una carga positiva neta a pH fisiológico. Así, los lípidos, membranas o virosomas "cargados positivamente" querrán decir lípidos, membranas o virosomas que tienen una carga positiva neta a pH fisiológico. Los "lípidos neutros" no llevan ninguna carga neta a pH fisiológico e incluyen lípidos tales como colesterol o derivados suyos y/o fosfolípidos del tipo zwitterion, que tienen áreas cargadas positivamente y negativamente dentro de la molécula con balance estequiométrico

de unas cargas con respecto a las otras.

El término "material cargado negativamente" como se usa aquí incluye cualquier fármaco o sustancia que se desee que lleva una carga neta negativa a pH fisiológico.

5 El término "fármaco o sustancia deseada" como se usa aquí se comprende que incluye cualquier sustancia química, compuesto o mezcla de compuestos que es utilizable para fines cosméticos, de diagnóstico, farmacéuticos, médicos o cualquier otro fin científico. Tales sustancias incluyen compuestos que pueden
10 controlados analíticamente in vitro o in vivo tales como tintes, tintes fluorescentes, compuestos marcados radiactivamente o de otra forma, sustancias trazadoras o marcadoras; también incluyen, sin embargo, fármacos proteicos o no proteicos o cualquier otra sustancia farmacéutica o biológicamente activa; especialmente
15 agentes antivirales o anticancerosos convencionales, pero también compuestos de ácidos nucleicos como se definen aquí. Dado que los presentes virosomas están cargados positivamente a pH fisiológico es preferible que se cargen con fármacos o sustancias que se desee neutras o cargadas negativamente, porque permiten una
20 incorporación a los virosomas más eficaz y estable.

Los términos "ácido nucleico" o "material genético" como se usan aquí incluyen DNA o RNA de cadena corta, desoxirribonucleótidos, oligodesoxirribonucleótidos, selenoatos de oligodesoxirribonucleótidos, fosforotioatos de
25 oligodesoxirribonucleótidos (FTOs), fosforamidatos de oligodesoxirribonucleótidos, metilfosfonatos de oligodesoxirribonucleótidos, ácidos nucleicos péptidos (NAPs), ribonucleótidos, oligorribonucleótidos, fosforotioatos de oligorribonucleótidos, fosfatos de 2'-Ome-oligorribonucleótidos,
30 fosforotioatos de 2'-Ome-oligorribonucleótidos, ribozimas (moléculas de RNA con actividades enzimáticas), genes, plásmidos y vectores (vehículos de clonación).

El término "virosomas" como se usa aquí se refiere - en su forma más simple - a vesículas liposómicas con una membrana bicapa
35 que contiene lípidos catiónicos y un espacio interno -

preferiblemente acuoso -, donde la membrana contiene además proteínas virales, en especial glicoproteínas virales. En la forma de realización preferida, las proteínas virales incluyen al menos un péptido o proteína inductores de la fusión que tiene actividad biológica de fusión completa, especialmente la glicoproteína, hemaglutinina de espículas y/o la neuraminidasa del virus A de la gripe (por ejemplo, el virus A/Singapur). Se comprenderá que las proteínas virales también comprenden las secuencias de aminoácidos producidas sintéticamente correspondientes a o iguales al péptido de fusión del virus de la gripe como se describe aquí. Los lípidos de membrana incluyen los lípidos catiónicos definidos más arriba, pero pueden también opcionalmente incluir otros lípidos naturales y/o sintéticos, preferiblemente fosfolípidos tales como la fosfatidilcolina (FC) y la fosfatidiletanolamina (FE).

Aunque los virosomas catiónicos de la presente invención pueden en muchos casos - notablemente para experimentos de cultivo celular in vitro - aplicarse con éxito sin marcadores específicos de célula en la membrana, se prefiere especialmente para aplicaciones in vivo que incluyan además al menos un marcador específico de célula en la membrana como se definió aquí antes. El diámetro medio de las vesículas está en el intervalo de 120-180 nm, como se determinó por microscopía electrónica y difracción de luz dinámica.

Usando los virosomas catiónicos de la presente invención como transportadores de fármacos o sustancias que se deseen incluyendo material genético pueden prevenirse o al menos disminuir considerablemente los efectos secundarios no deseados debidos a la toxicidad. Este efecto beneficioso se obtiene porque los virosomas catiónicos presentes tienen - comparados con los liposomas o virosomas conocidos hasta ahora - una actividad y eficacia mucho mayores en la transferencia de material atrapado, especialmente material cargado negativamente como oligonucleótidos antisentido, a las células diana y - lo que es más importante - en la expresión del material ácido nucleico transfectado por parte de la célula diana.

De acuerdo con esto, es objeto de la presente invención estipular los virosomas DOSPER definidos en la reivindicación 1 y sus variaciones definidas como otras formas de realización en las reivindicaciones subsecuentes 2 a 11. También es objeto de la invención estipular una composición que contiene los nuevos virosomas junto con un transportador adecuado para varias aplicaciones como se define por ejemplo en la reivindicación 12.

Otro objeto de la presente invención es estipular un procedimiento para hacer los nuevos virosomas como se define en la reivindicación 13 con las variaciones definidas en las reivindicaciones 14 a 24.

También es objeto de la presente invención enseñar y reivindicar procedimientos más específicos para usar los presentes virosomas, como se define en las reivindicaciones 25 a 29.

Para que la invención aquí definida pueda ser mejor comprendida, se exponen los siguientes ejemplos. Los ejemplos tienen sólo propósitos ilustrativos y no para ser interpretados como limitantes de esta invención en ningún sentido.

Ejemplo 1: Preparación de virosomas DOSPER con trómeros de hemaglutinina viral del virus de la gripe con actividad de fusión completa.

Se aisló la hemaglutinina (HA) de la cepa A/Singapur/6/86 del virus de la gripe como describieron Skehel y Schild (1971), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:968-972. Brevemente, el virus se cultivó en la cavidad alantoica de huevos de gallina y se purificó dos veces mediante ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa. El virus purificado se estabilizó en un tampón que contenía NaCl, 7,9 mg/ml; citrato trisódico-2H₂O, 4,4 mg/ml; ácido 2-morfolinoetano sulfónico, 2,1 mg/ml; y ácido N-hidroxietil-piperazina-N'-2-etano sulfónico, 1,2 mg/ml, pH 7,3. Se precipitaron 53 ml de la suspensión de virus que contenía 345 µg de HA por ml mediante ultracentrifugación a 100.000 x g durante 10 minutos. Se añadieron al precipitado de virus de la gripe 7,7 ml de una solución tamponada de detergente que contenía

NaCl 145 mM, HEPES 2,5 mM y 54 mg/ml del detergente no iónico monododeciléter de octaetilenglicol (OEG = C12E8), pH 7,4. El precipitado se disolvió completamente usando sonicación durante 2 minutos a temperatura ambiente. La solución se sometió a ultracentrifugación a 100.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante obtenido contenía el trómero solubilizado de HA (1,635 mg de HA/ml) y trazas de neuraminidasa. Se añadieron 0,5 - 2 mg de DOSPER y 5,5 - 4 mg (llevando al balance total de 6 mg de lípidos totales) de dioleoilfosfatidilcolina (DOFC) a 3,7 ml de sobrenadante (6 mg de HA) y se disolvieron. La solución se esterilizó pasándola a través de un filtro de 0,2 µm y luego se transfirió a un recipiente de cristal que contenía 1,15 g de microbolas transportadoras, preferiblemente Biobolas SM-2. El recipiente se agitó durante 1 hora usando un agitador REAX2 de Heidolph (Kelheim, Alemania). Cuando era necesario, este procedimiento se repitió hasta tres veces con 0,58 mg de Biobolas. Tras estos procedimientos se obtuvo una solución ligeramente transparente de virosomas DOSPER.

Los mejores resultados se obtuvieron con preparaciones de virosomas que contenían una proporción de lípidos de 1,5 mg de DOSPER (25% en peso del total de lípidos) para 4,5 mg de DOFC. Mayores concentraciones de DOSPER, por ejemplo por encima del 30% - 35% en peso, no dieron lugar a la formación adecuada del virosoma tras la eliminación del detergente.

Es posible la sustitución parcial de DOFC por FE (fosfatidiletanolamina) y/u otros lípidos catiónicos tales como DOTAP o DOSPA sin pérdida significativa de la actividad de transfección.

Incorporación de fosforotioato de oligodesoxirribonucleótidos en virosomas DOSPER: Se usaron los fosforotioatos de oligodesoxirribonucleótidos (FTOs) antisentido y sentido del gen L-myc como ejemplo para la demostración de la alta eficiencia de los virosomas catiónicos en la transfección. Se sintetizaron 5'-FITC-FTOs via química de fosforamidita (Microsynth GmbH, Balgach, Suiza). Se usaron el pentadecámero

(5'-FITC-GTAGTCCATGTCCGC-3') y el pentadecámero (5'-FITC-GCGGACATGGACTAC-3') como FTO antisentido y FTO sentido, respectivamente. Se sintetizó una FTO con secuencia control mezclada (scm) con la misma longitud de nucleótidos que las FTOs antisentido y sentido.

Se añadió 1 ml de virosomas DOSPER a

- a) 2 mg de FITC-FTO antisentido (1,3 μ moles)
- b) 3,4 mg de FITC-FTO sentido (1,3 μ moles) y
- c) 3,1 mg de FITC-FTO scm (1,3 μ moles).

Los FITC-FTOs se disolvieron y luego las soluciones se trataron mediante sonicación durante 2 minutos a 26°C. Los FITC-FTOs no encapsulados se separaron de los virosomas mediante filtración en gel en una columna de Superdex 200 de Alta Carga (Pharmacia, Suecia). La columna se equilibró con PBS estéril. Las fracciones del volumen de exclusión que contenían los virosomas DOSPER con el FITC-FTO encapsulado se eluyeron con PBS y se recolectaron. Las concentraciones del FITC-FTO atrapado en virosomas se determinaron fluorométricamente después de que los virosomas se disolvieron completamente en NaOH 0,1 M que contenía 0,1 % (v/v) de Tritón X-100. Para la calibración de la escala de fluorescencia se tomó como cero la fluorescencia de virosomas DOSPER vacíos que se disolvieron en la solución de detergente de más arriba.

Acoplamiento de fragmentos Fab' a los virosomas por medio de complejos moleculares fosfatidiletanolamina-acoplador bifuncional formados previamente.

Se añadieron 3 mg de Fab' reducido recientemente de anticuerpo monoclonal de murina anti-CD10- (AntiALLAC), disueltos en 2,8 ml de una solución tampón de ácido cítrico (NaCl 100 mM, ácido cítrico 40 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 35 mM, EDTA 2 mM, pH 5.5) a una solución de 0,524 mg de N-[4-(p-maleimido-fenil)butiril] fosfatidiletanolamina (MFB.FE) in 215 μ l de tampón de ácido cítrico que contenía 0,5% de n-octil-oligo-oxietileno. La mezcla se incubó después en nitrógeno durante 16 h a 4°C con una suave agitación. Tras la incubación la MFB.FE no acoplada se eliminó a

través de un lote de 400 µl de Tiopropil Sefarosa 6B (Pharmacia, Suecia) húmeda reducida recientemente. La mezcla se incubó durante 4 h a temperatura ambiente. La Tiopropil Sefarosa 6B se eliminó mediante centrifugación y la solución resultante de
5 neutralizó a pH 7,0. La solución neutralizada se suplementó con OEG (54 mg/ml).

Las soluciones preparadas como se describió arriba se añadieron a las soluciones para la preparación de virosomas DOSPER. Las moléculas de Fab'-MFB.FE se insertan en la bicapa
10 lipídica durante la formación de los virosomas.

Las micrografías de los virosomas DOSPER confirman la estructura preferible unilamelar de las vesículas con un diámetro medio de aproximadamente 120 a 180 nm como se determinó mediante difracción de luz láser. Las espículas de proteína HA del virus
15 de la gripe son claramente visibles.

La completa actividad inductora de la fusión de los presentes virosomas DOSPER se confirmó mediante el ensayo cuantitativo basado en el desapantallamiento de fluorescencia descrito por Hoekstra y col. (1984), Biochemistry 23:5675-5681 y
20 L. Lüscher y col. (1993), Arch. Virol. 130:317-326. La sonda fluorescente cloruro de octadecil rodamina B (R18) (obtenida de Sondas Moleculares Inc., Eugene, EE.UU.) se insertó a altas densidades en la membrana de virosomas DOSPER mediante la adición de la solución OEG tamponada (C₁₂E₈) que contenía DOSPER y HA a
25 una fina película seca de la sonda fluorescente, seguida de agitación durante 5 a 10 minutos para disolver la sonda, luego se continuó como se describió más arriba en "Preparación de virosomas DOSPER...". Se observó la dilución de la rodamina apantalladora mediante incubación de los virosomas DOSPER marcados
30 con rodamina con liposomas modelo (proporción de DOSPER/DOFC: fosfolípido liposomal = 1:20). La fluorescencia se midió con un espectrofluorímetro Perkin-Elmer 1000 a longitudes de onda de excitación y de emisión de 560 y 590 nm, respectivamente.

Ejemplo 2: Incorporación de los virosomas en las células.

35 Incorporación de plásmidos marcados con ³H en los virosomas

DOSPER:

Básicamente, la incorporación de los compuestos de ácidos nucleicos dentro de los virosomas se llevó a cabo mediante los siguientes tres procedimientos:

- 5 1. Diálisis: Los compuestos de ácidos nucleicos se encapsularon durante la formación de los virosomas, donde el detergente Octil-POE (de Alexis Corp., Laeufelfingen, Suiza) se eliminó mediante diálisis.
2. Biobolas: Los compuestos de ácidos nucleicos se encapsularon durante la formación de los virosomas, donde el detergente OEG se eliminó mediante microtransportadores, por ejemplo, Biobolas SM2.
- 10 3. Ultrasonificación: Los compuestos de ácidos nucleicos fueron encapsulados por lípidos catiónicos, preferiblemente DOSPER, y los liposomas cargados de ácido nucleico o complejos de lípidos obtenidos, preferiblemente liposomas DOSPER o complejos de lípidos, se fusionaron con virosomas DOSPER mediante ultrasonificación.
- 15

20 Dado que los mejores niveles de incorporación se obtuvieron mediante el tercer procedimiento, la mayoría de los experimentos se hicieron usando este procedimiento de fusión para la incorporación de material de ácido nucleico en los virosomas.

 El plásmido pGEEN LANTERNTM-I (GIBCO-BRL) se sintetizó en E. coli en presencia de 3H-metilimidina para obtener plásmidos marcados radiactivamente para la cuantificación exacta de la eficiencia de transfección. La actividad específica del plásmido fue $6,625 \times 10^{10}$ dpm/g (= 29,84 mCi/g).

 Se disolvieron 11,6 µg de plásmido marcado con ³H (17,5 µl) en 480 µl de tampón HEPES-NaCl. Tras la adición de 116 µg de DOSPER (1µg/µl) la mezcla resultante se sometió a ultrasonificación durante 30 segundos y a continuación se la dejó reposar durante 15 min. Mediante este tratamiento se forman los complejos lipídicos de DOSPER y plásmido. Alternativamente, en vez de complejos lipídicos los liposomas DOSPER pueden producirse

mediante procedimientos convencionales, por ejemplo de una solución tamponada de OEG que contiene DOSPER y el plásmido y la subsecuente eliminación del detergente usando diálisis o microtransportadores que absorban detergente, opcionalmente
5 seguido de ultrasonificación, produciendo liposomas DOSPER cargados con los plásmidos.

Se añaden 93 μ l de virosomas DOSPER vacíos formados previamente (por ejemplo de acuerdo con el Ejemplo 1) a la solución que contenía los complejos lipídicos cargados de
10 plásmido o liposomas. La mezcla se ultrasonica durante 1 min para fusionar los virosomas DOSPER con los liposomas o complejos lipídicos para incorporar los plásmidos dentro de los virosomas. Este procedimiento de incorporación del material que se desee en los virosomas puede aplicarse también para la incorporación de
15 fármacos o sustancias diferentes de material de ácido nucleico, preferiblemente para sustancias cargadas negativamente.

Comparación de la eficiencia de transfección de plásmido marcado con ^3H mediante virosomas DOSPER y liposomas DOSPER: Se encapsularon 33 μ g del DNA de plásmido marcado en virosomas
20 DOSPER y 11,7 μ g en liposomas DOSPER formados previamente. Cuatro diferentes líneas celulares adherentes, es decir, HeLa, 293T, COS-1 y NIH3T3 y, adicionalmente, las líneas celulares K562 y P3/NSI/1-Ag4-1 crecidas en cultivo en suspensión, se transfectaron con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER.

25 5×10^5 células de cada tipo celular se incubaron en 500 μ l (=0.5 ml) de medio con 25 μ l de solución de virosomas DOSPER que contenían plásmido o de liposomas DOSPER que contenían plásmido durante 2, 4, 6 y 24 h a 37°C. Las alícuotas añadidas de virosomas DOSPER y liposomas DOSPER contenían 400 ng de plásmido
30 marcado que correspondía a una radiactividad de 26.500 dpm (=100%). Tras la incubación, las células se lavaron, se lisaron y se midió la radiactividad incorporada con un contador beta.

Se evaluó la influencia del tiempo de transfección (período de incubación) en la cantidad de DNA de plásmido incorporado y
35 los resultados están representados en las Figuras 1 a 6. Las

Leyendas de las Figuras de más abajo resumen las líneas celulares en cada una de las Figuras.

Las Figuras 1 a 6 muestran claramente que los virosomas DOSPER son superiores en transfección a los liposomas DOSPER para todos los tipos celulares y para todos los tiempos de incubación. Tiempos más largos de incubación de 6 y 24 h con liposomas DOSPER sólo resultaron en mínimos incrementos de incorporación de DNA, mientras que tiempos más largos de incubación con virosomas DOSPER llevaron a una incorporación de DNA considerablemente mayor. Este resultado sugiere que la incorporación mediada por HA de los virosomas es mucho más eficiente que la incorporación inducida por liposomas DOSPER sin la ayuda de ningún conector viral que se una a los receptores celulares. Es interesante que en el caso de los virosomas DOSPER, los tiempos de incubación de 6-24 h no llevaron a la saturación de la incorporación de DNA sino a un incremento mayor de incorporación de DNA, un efecto que puede ser debido a una rápida sustitución de receptores de membrana tras su eliminación por endocitosis mediada por receptor de los virosomas en la superficie celular. En general, se encontró que las líneas celulares adherentes (creciendo en monocapas) fueron transfectadas más eficientemente que las líneas celulares creciendo en cultivo en suspensión.

Ejemplo 3: Incorporación de plásmidos dependiente de tiempo por las células eucarióticas.

El Ejemplo 2 se repitió con otro plásmido marcado con ^3H , es decir, pcDNA3,1/His B/lacZ (Proveedor: Invitrogen, Groningen, Holanda). Las líneas celulares COS-1, K562, 293 T y P3X63Ag8 se transfectaron con virosomas DOSPER cargados con este plásmido y se incubaron durante un período de 2, 4 y 72 horas. En este experimento no se hizo una comparación con los liposomas DOSPER.

Los resultados se representan en la Fig. 7. Se deduce de ahí que una prolongación del tiempo puede resultar perfectamente en un incremento mayor en la incorporación de plásmido marcado por parte de las células cuando se usan los presentes virosomas. En realidad, usando los presentes virosomas DOSPER como un sistema

de transferencia de alto rendimiento para material de ácido nucleico es posible distribuir entre 60% y 80% de la cantidad total de entrada de ácido nucleico (por ejemplo, plásmido) en las células diana que se deseen. Todas las líneas celulares probadas fueron comparablemente susceptibles a la incorporación de plásmido desde virosomas.

Ejemplo 4: Una comparación de virosomas DOSPER con virosomas DOTAP.

Los virosomas penetran en las células de mamífero mediante el mecanismo mediado por HA que conduce al receptor conocido del virus de la gripe A. No se esperaba que la naturaleza química de la bicapa lipídica de la membrana del virosoma pudiera jugar un papel importante en el hecho de que se mantuviesen adecuadamente el estado natural y la actividad inductora de la fusión de la HA. Por lo tanto, se creyó que los virosomas DOSPER y los virosomas DOTAP tendrían aproximadamente la misma eficiencia de transfección de material de ácido nucleico en células de mamífero.

Sin embargo, sorprendentemente, los experimentos diseñados para comparar las eficiencias de transfección de virosomas DOSPER y DOTAP rindieron unos resultados diferentes, es decir, marcadamente desviados de las expectativas. Los experimentos se realizaron de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2 y se usó el plásmido pcDNA3,1/His B/lacZ marcado con tritio para la encapsulación y la transfección. Los virosomas DOTAP se prepararon de acuerdo con el Ejemplo 1 del documento WO97/41834 y la incorporación del plásmido se llevó a cabo como se ha descrito aquí antes usando el mismo procedimiento que para los virosomas DOSPER. La misma cantidad de plásmido marcado con ^3H tal y como se describió en el Ejemplo 2 para los virosomas DOSPER se encapsuló en los virosomas DOTAP. Las líneas celulares 293T, K562, Sp2 y HeLa se incubaron con virosomas DOSPER y DOTAP en las mismas condiciones que se describieron más arriba en el Ejemplo 2.

Los resultados se representan en las Figuras 8 a 11. Claramente muestran que la eficiencia de transfección de los

virosomas DOSPER el al menos el doble de la de los virosomas DOTAP y puede incluso ser de hasta 10 veces más. Especialmente con las líneas celulares creciendo en cultivo en suspensión tales como la línea celular Sp2 (Fig. 10) la diferencia en la eficiencia de transfección es más claramente visible. La razón de esto no se comprende aún totalmente, pero puede deberse en parte a la naturaleza química diferente de los dos lípidos, donde la cabeza polar de la molécula de DOSPER contiene cuatro grupos amino libres mientras que la cabeza polar de la molécula de DOTAP contiene sólo un grupo amino libre. Nosotros suponemos, sin estar apoyados por la teoría, que la encapsulación de material cargado negativamente, como plásmidos, en los virosomas que contienen DOSPER puede llevar a unas cantidades mayores de virosomas útiles. Por el contrario, la encapsulación de plásmido en virosomas DOTAP puede resultar en un mayor número de vesículas defectivas con un bajo potencial de tranfección. Una segunda hipótesis podría implicar un efecto incrementador del DOSPER durante la unión de los virosomas a la membrana celular de la célula diana, un punto de vista que nosotros no podemos excluir.

Así, los resultados demuestran que el uso del lípido policationico DOSPER resulta sorprendentemente en una superior eficiencia de transfección comparada con los lípidos cationicos DOTAP, usados más frecuentemente.

Ejemplo 5: Expresión génica tras la transfección con los presentes virosomas.

La determinación cuantitativa usando un equipo de ELISA de β -Gal (proveedor: Boehringer Mannheim) de la expresión de la β -galactosidasa llevada a cabo por las células diana en los experimentos del Ejemplo 3 que recibieron el plásmido pcDNA3,1/His B/lacZ a través de transfección por virosomas confirmó más aún que el nivel de transfección del plásmido llevado por los virosomas no sólo era superior al del plásmido llevado por los liposomas, sino que también lo era la expresión del aquel en las células diana. Los experimentos rindieron una expresión de veinte a cuarenta veces mayor de β -galactosidasa

cuando se usaron los virosomas DOSPER en vez de los liposomas DOSPER para la transfección del plásmido en las células diana (Fig. 12).

También se observó, sin embargo, que había una fuerte dependencia del nivel de expresión de β -galactosidasa de la concentración de plásmido dentro de los virosomas:

Tabla 2: Composición de las preparaciones de virosomas.

	Cantidad total de plásmido encapsulado en virosomas [μ g]	Cantidad total de DOSPER en los virosomas [μ g]	Número relativo de virosomas [unidades arbitrarias]	Relación plásmido/DOSPER [μ g/ μ g]
Prep. 1	0,4	6,45	100	0,062
Prep. 2	0,2	4,45	100	0,045
Prep. 3	0,4	8,9	200	0,045
Prep. 4	0,13	3,78	100	0,034
Prep. 5	0,4	11,35	300	0,035

Los virosomas de la preparación 2 contienen sólo la mitad de plásmido que los virosomas de la preparación 1, mientras que el número de virosomas es igual en ambas preparaciones. La preparación 1 corresponde a la preparación preferida de virosomas que se ha usado en la mayoría de los experimentos aquí descritos.

La preparación 3 contiene la misma cantidad de plásmido, pero distribuida en doble número de virosomas.

La preparación 4 contiene una cantidad aún más baja de plásmido encapsulado en el mismo número de virosomas que en las preparaciones 1 y 2.

La preparación 5 contiene la misma cantidad de plásmido que las preparaciones 1 y 3, pero encapsulado en un número de virosomas que es tres veces mayor que en la preparación 1.

Los resultados que se representan en la Figura 13 testimonian que la formulación preferida de los virosomas DOSPER empíricamente derivada era la óptima y que bajar la concentración

de plásmido en las preparaciones 2,3 y 4 no resultó en un mayor nivel de expresión. La hipótesis de que una sobrecarga de las células diana mediante transfección con preparaciones de virosomas similares a la Preparación 1 de más arriba podría posiblemente haber inhibido la expresión no puede por lo tanto sostenerse más.

Abreviaturas usadas en la descripción.

	2'-OMe	2'-O metil
	ALLAC	antígeno de la leucemia linfoblástica aguda común
10	ATC	cloranfenicol acetiltransferasa
	dpm	desintegraciones por minuto
	DOSPER	1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida
	DOTAP	N-[(1,2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamoniometil-sulfato
15	FITC-FTO	fosforotioato de oligodesoxirribonucleótido marcado con isotiocianato de fluoresceína
	G418	disulfato de Genetecin® (antibiótico G418)
	HA	hemaglutinina
	MFB.FE	N-[4-(p-maleimido)-fenilbutiril]-fosfatidiletanolamina
20		(= un complejo acoplador-fosfolípido)
	Scm	secuencia control mezclada
	NA	neuraminidasa
	Octil-POE	n-octil-oligo-oxietileno
	ODN	oligodesoxinucleótidos
25	OEG	monododeciléter de octaetileneglicol (C12E8)
	OPT	fosforotioato(s) de oligodesoxirribonucleótido
	FC	fosfatidilcolina
	FE	fosfatidiletanolamina
	NAP	ácido nucleico péptido
30	CCPP	cáncer de células pequeñas de pulmón
	SV40	virus de Simio 40

REIVINDICACIONES

1. Una vesícula lipídica con una membrana bicapa que tiene una carga neta positiva a pH fisiológico y donde la vesícula además
5 contiene al menos un péptido activo inductor de la fusión que no es la hemaglutinina del virus Sendai que provoca que las vesículas sean internalizadas por células diana a través de fagocitosis o endocitosis mediadas por receptor, caracterizada porque la membrana de la vesícula lleva entre 5% y 30% en peso,
10 referido a los lípidos totales de membrana, de 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER) y una proporción de entre 95% y 70% en peso de otros lípidos incluyendo fosfatidilcolina (FC) o un derivado suyo y opcionalmente fosfatidiletanolamina (FE) y/o lípidos catiónicos distintos de
15 DOSPER.

2. La vesícula de acuerdo con la reivindicación 1, que se caracteriza porque además contiene el fármaco o sustancia que se desee para distribuir a las células diana, estando dichos fármaco
20 o sustancia deseados preferiblemente cargados negativamente y siendo especialmente elegidos del grupo formado por un tinte, una sustancia trazadora, un agente cosmético, una sustancia farmacéutica o biológicamente activa y un material de ácido nucleico.

25 3. La vesícula de acuerdo con la reivindicación 2, que se caracteriza porque el fármaco o sustancia deseada es un material de ácido nucleico elegido del grupo formado por DNA o RNA de cadena corta, desoxirribonucleótidos,
30 oligodesoxirribonucleótidos, selenoatos de oligodesoxirribonucleótido, fosforotioatos de oligodesoxirribonucleótido, fosforamidatos de oligodesoxirribonucleótido, metilfosfonatos de oligodesoxirribonucleótido, ácidos nucleicos péptidos,
35 ribonucleótidos, oligorribonucleótidos, fosforotioatos de

oligorribonucleótido, fosfatos de 2'-Ome-oligorribonucleótido, fosforotioatos de 2'-Ome-oligorribonucleótido, ribozimas, genes, plásmidos y vectores.

5 4. La vesícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se caracteriza porque el fármaco o sustancia deseada es un material de ácido nucleico y la vesícula incluye dicho material de ácido nucleico en una cantidad que va de 0,03 a 0,1, preferiblemente de 0,045 a 0,065, µg de material de
10 ácido nucleico para 1 µg de DOSPER.

5. La vesícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se caracteriza porque el diámetro medio de la vesícula está en el intervalo de 120 - 180 nm.
15

6. La vesícula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se caracteriza porque además lleva al menos un marcador específico de célula unido a la membrana de la vesícula.
20

7. La vesícula de acuerdo con la reivindicación 6, que se caracteriza porque la membrana de la vesícula además incluye fosfatidiletanolamina (FE) y un acoplador bifuncional que está unido por uno de sus sitios de unión a un grupo amino libre de la
25 FE y con su otro sitio de unión al marcador específico de célula.

8. La vesícula de acuerdo con las reivindicaciones 6 ó 7, que se caracteriza porque el marcador específico de célula es una proteína biológicamente activa para unirse a un receptor de células diana elegida del grupo formado por un anticuerpo, un
5 fragmento de anticuerpo, una citoquina y un factor de crecimiento.

9. La vesícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que se caracteriza porque la
10 hemaglutinina está derivada de un virus elegido del grupo que incluye rhabdovirus, virus parainfluenza tipo III, virus Semliki Forest y togavirus.

10. La vesícula de acuerdo con una cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 9, que se caracteriza porque la membrana de la vesícula incluye DOSPER en una concentración entre 10% y 30%, preferiblemente entre 20% y 25% en peso, con respecto a los lípidos totales de membrana.

20 11. La vesícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que se caracteriza porque la membrana de la vesícula incluye, con respecto a los lípidos totales de membrana, 25% en peso de DOSPER y 75% en peso de FC, preferiblemente dioleoilfosfatidilcolina (DOFC).

25 12. Una composición que incluye una variedad de vesículas definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en combinación con un vehículo adecuado, para su uso en cosmética o aplicaciones farmacéuticas o de diagnóstico.

30 13. Un procedimiento para la fabricación de un vesícula lipídica como se define en la reivindicación 1, que se caracteriza porque incluye los pasos de

a) preparar una solución tampón que incluye un detergente
35 no iónico y además incluye DOSPER y otros lípidos y al

- menos un péptido activo inductor de la fusión que no es una hemaglutinina del virus Sendai que provoca que las vesículas sean internalizadas por las células diana mediante fagocitosis o endocitosis mediadas por receptor;
- 5
- b) ajustar las concentraciones de lípidos -referidas a los lípidos totales de membrana- entre 5% y 30% en peso de DOSPER y a una proporción de entre 95% y 70% en peso de dichos otros lípidos incluyendo fosfatidilcolina (FC) o
- 10 un derivado suyo y opcionalmente fosfatidiletanolamina (FE) y/o lípidos catiónicos distintos de DOSPER; y
- c) eliminar el detergente mediante diálisis o mediante tratamiento de la solución con microbolas transportadoras, resultando en la formación de dichas
- 15 vesículas con bicapa lipídica cargadas positivamente.

14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, que se caracteriza porque además incluye un paso de incorporación dentro de las vesículas de una cantidad de un fármaco o sustancia que se

20 desee para su transporte a células diana, estando dicho fármaco o sustancia preferiblemente cargados negativamente y estando especialmente elegidos de un grupo formado por un tinte, una sustancia trazadora, un agente cosmético, una sustancia farmacéutica o biológicamente activa y un material de ácido

25 nucleico.

15. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 13 ó 14, que se caracteriza porque además incluye un paso de preparación de complejos de moléculas conjugadas que consisten en

30 fosfatidiletanolamina (FE), un acoplador bifuncional y un marcador específico de célula de tal manera que el acoplador bifuncional con un sitio de unión se une al grupo amino de la FE y con otro a un grupo tiol del marcador específico de célula, eliminación del material sin conjugar y adición de los complejos

35 moleculares a la solución del paso a).

31

16. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 14 ó 15, que se caracteriza porque la incorporación del fármaco o sustancia que se desee se realiza añadiendo a la solución del
5 paso (a) el fármaco o sustancia que se desee, con lo que en el paso (c) se forman las vesículas conteniendo dicho fármaco o sustancia.

17. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 14 ó 15, que se caracteriza porque la incorporación del fármaco o
10 sustancia que se desee dentro de las vesículas se realiza añadiendo a las vesículas resultantes del paso (c) el fármaco o sustancia que se desee, sonicando la mezcla para integrar el fármaco o sustancia en las vesículas y eliminando el material no
15 integrado, preferiblemente mediante filtración en gel.

18. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 14 ó 15, que se caracteriza porque la incorporación del fármaco o sustancia que se desee dentro de las vesículas se realiza
20 añadiendo a las vesículas resultantes del paso (c) complejos lipídicos cargados positivamente o liposomas cargados con el fármaco o sustancias que se desee y sonicando la mezcla resultante para fusionar los complejos lipídicos o los liposomas con dichas vesículas para integrar el fármaco o sustancia en
25 dichas vesículas.

19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 18, que se caracteriza porque los complejos lipídicos cargados positivamente o los liposomas incluyen entre 50% y 100% en peso, con respecto a
30 su contenido total en lípidos, de lípido DOSFER.

20. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, donde el marcador específico de célula se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo, un
35 fragmento de anticuerpo, una citoquina y un factor de

crecimiento.

21. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, que se caracteriza porque el fármaco o
5 sustancia deseada es un material de ácido nucleico elegido del grupo que consiste en DNA o RNA de cadena corta, desoxirribonucleótidos, oligodesoxirribonucleótidos, selenoatos de oligodesoxirribonucleótido, fosforotioatos de oligodesoxirribonucleótido, fosforamidatos de
10 oligodesoxirribonucleótido, metilfosfonatos de oligodesoxirribonucleótido, ácidos nucleicos péptidos, ribonucleótidos, oligorribonucleótidos, fosforotioatos de oligorribonucleótido, fosfatos de 2'-Ome-oligorribonucleótido, fosforotioatos de 2'-Ome-oligorribonucleótido, ribozimas, genes,
15 plásmidos y vectores.

22. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 21, que se caracteriza porque el material de ácido nucleico se incorpora en los virosomas a una concentración entre 0,03 y 0,1,
20 preferiblemente entre 0,045 y 0,065, µg de material de ácido nucleico para 1 µg de lípido DOSPER.

23. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22, que se caracteriza porque el detergente
25 no iónico es el monododeciléter de octaetilenglicol ($C_{12}E_8$) (I) o n-octil-oligooxi-etileno.

24. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, que se caracteriza porque el agente
30 acoplador es una molécula orgánica heterobifuncional que tiene al menos un grupo maleimido y al menos un grupo carboxilo y que preferiblemente se selecciona de un grupo que consiste en derivados bis-N-succinimidilo y derivados succinimidilo fotoactivable.

25. El uso de una vesícula definida en la reivindicación 1 para la fabricación de una composición para aplicaciones cosméticas, de diagnóstico o médicas, especialmente para transportar un fármaco o sustancia que se desee a células diana en reposo o proliferantes.

26. El uso de acuerdo con la reivindicación 25, que se caracteriza porque incluye la incubación de dichas células diana in vitro en presencia de dichas vesículas y opcionalmente la transferencia de las células diana incubadas a un organismo in vivo.

27. El uso de acuerdo con las reivindicaciones 25 ó 26, que se caracteriza porque las células diana se eligen del grupo formado por células cancerosas, células leucémicas y células infectadas por virus.

28. El uso de acuerdo con la reivindicación 27, que se caracteriza porque la actividad metabólica o proliferativa de dichas células diana se reduce tras la incubación en presencia de dichas vesículas.

5

29. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, que se caracteriza porque dicho fármaco o sustancia deseada es un material de ácido nucleico que incluye al menos un oligonucleótido antisentido, preferiblemente un oligonucleótido
10 antisentido que se dirija al RNAm codificado por un protooncogen o un oncogen.

RESUMEN

La presente invención está relacionada con un virosoma catiónico que incluye al menos un péptido activo inductor de la fusión que es una hemagglutinina de un virus distinto del Sendai y
5 donde la membrana del virosoma incluye entre 5% y 30% en peso, con respecto a los lípidos totales, de 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER) en combinación con otros lípidos incluyendo la fosfatidilcolina (FC) o un derivado suyo y opcionalmente fosfatidiletanolamina (FE) y/u otros lípidos
10 catiónicos.

Los virosomas son altamente eficaces en el transporte de material cargado negativamente, especialmente compuestos de ácidos nucleicos, a las células diana.

Esta invención también está relacionada con un procedimiento
15 para la fabricación de los virosomas y los usos de estos para propósitos de diagnóstico, cosméticos, médicos o científicos.

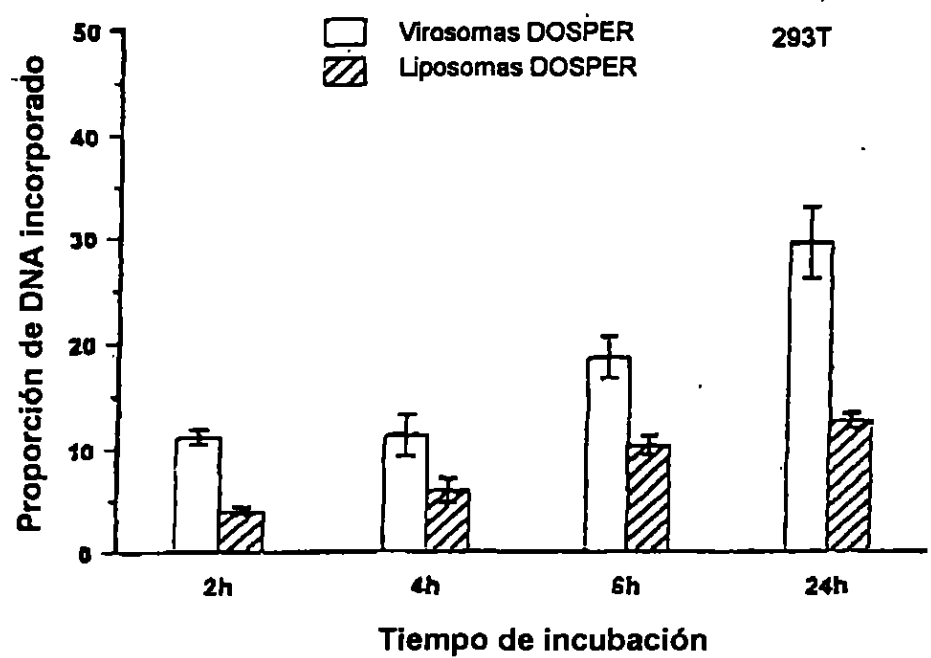


Fig. 1

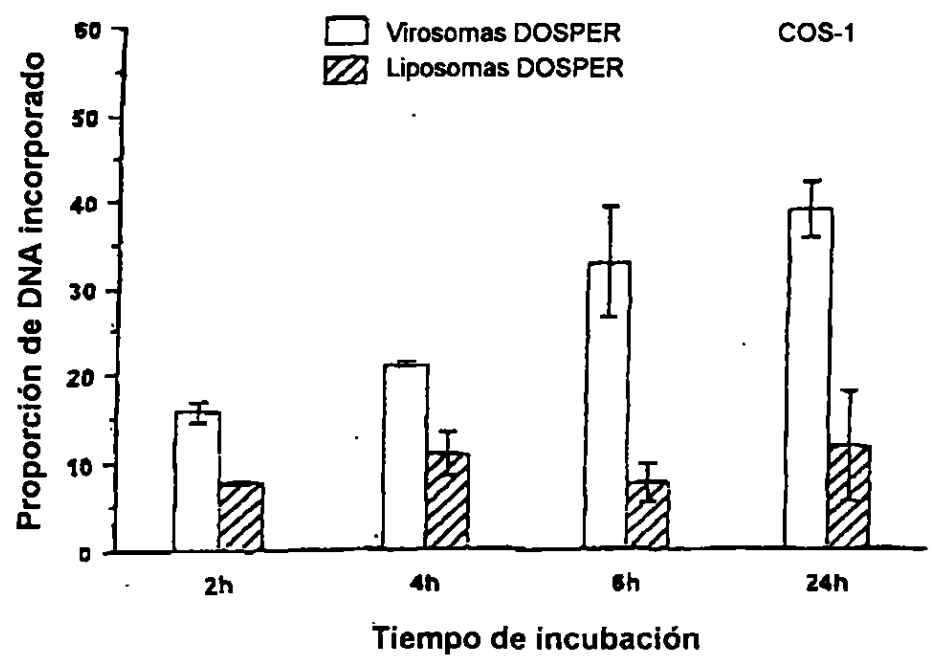


Fig. 2

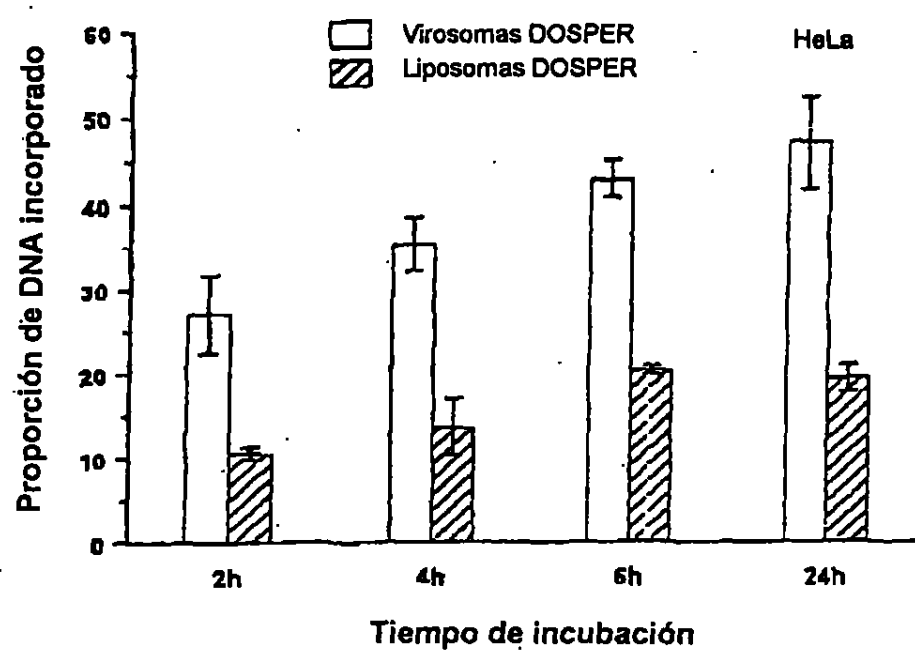


Fig. 3

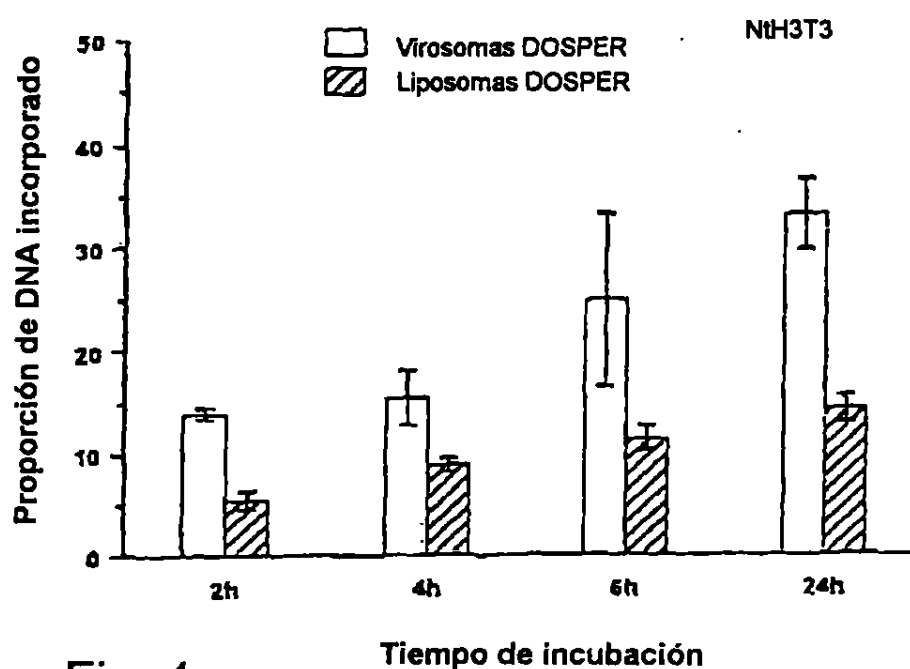


Fig. 4

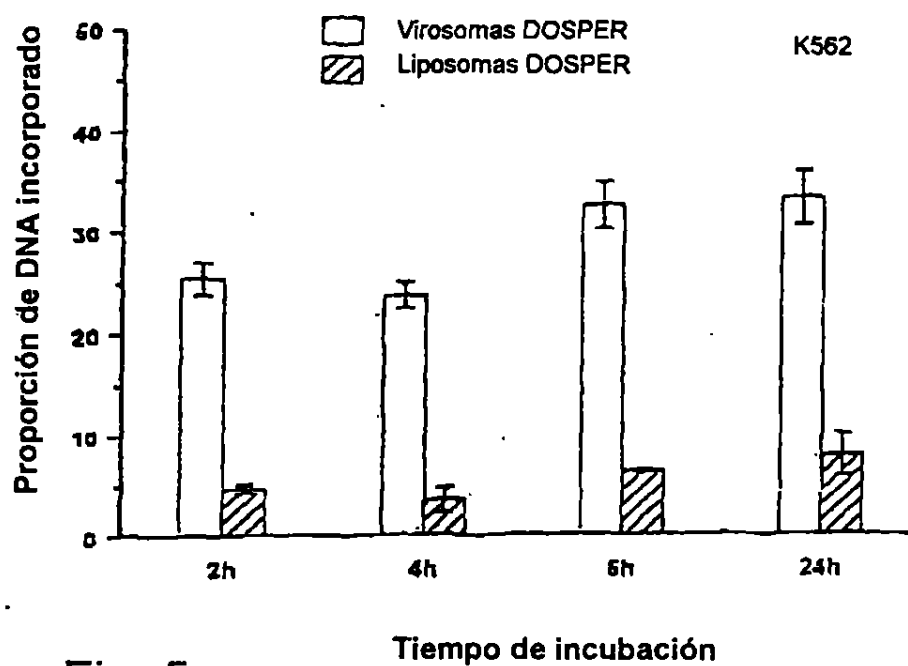


Fig. 5

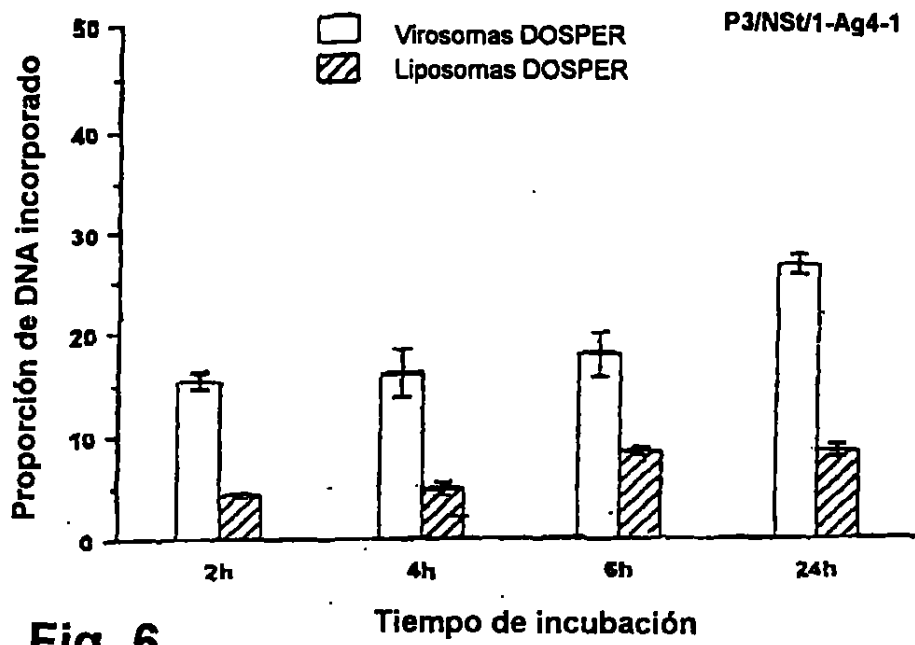


Fig. 6

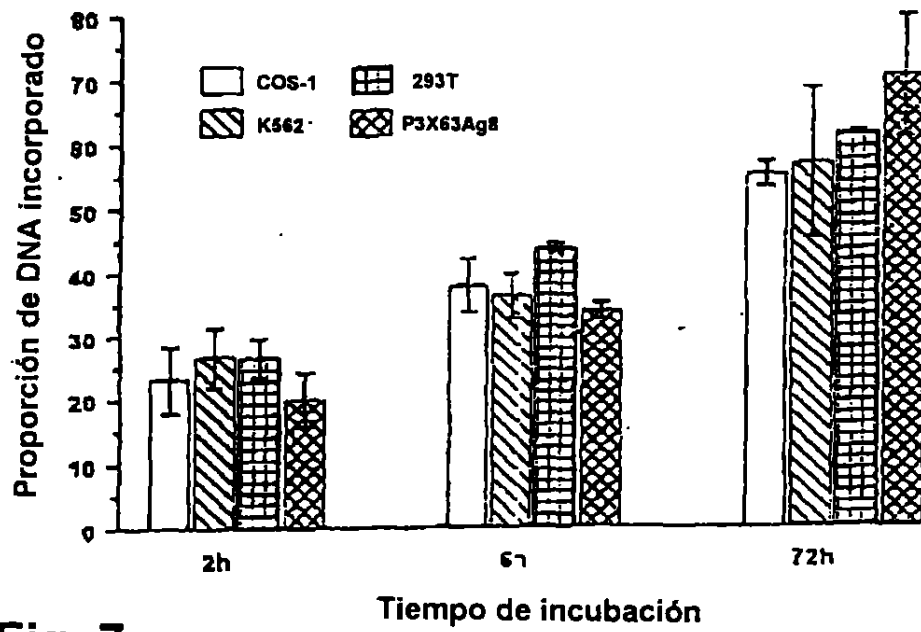


Fig. 7

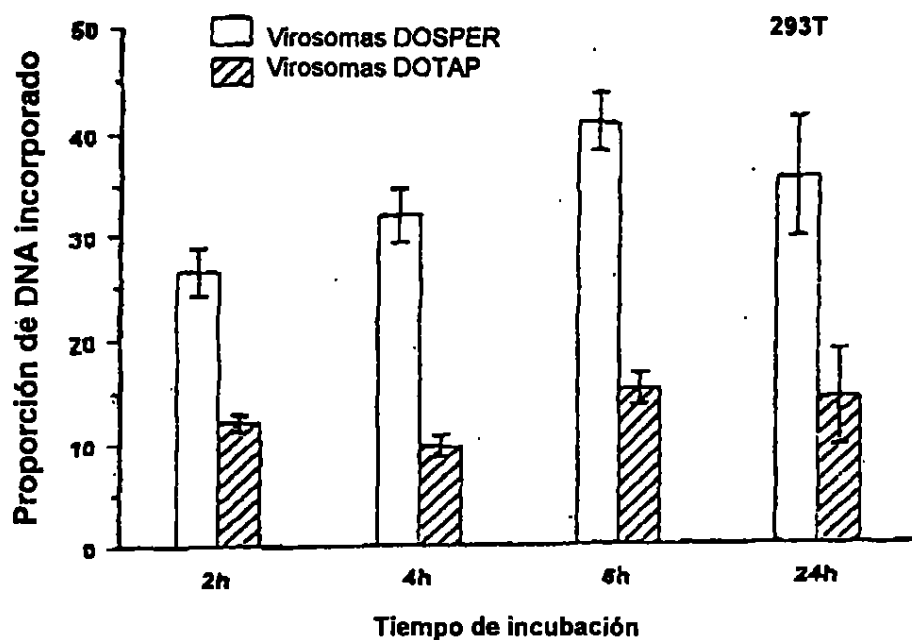


Fig. 8

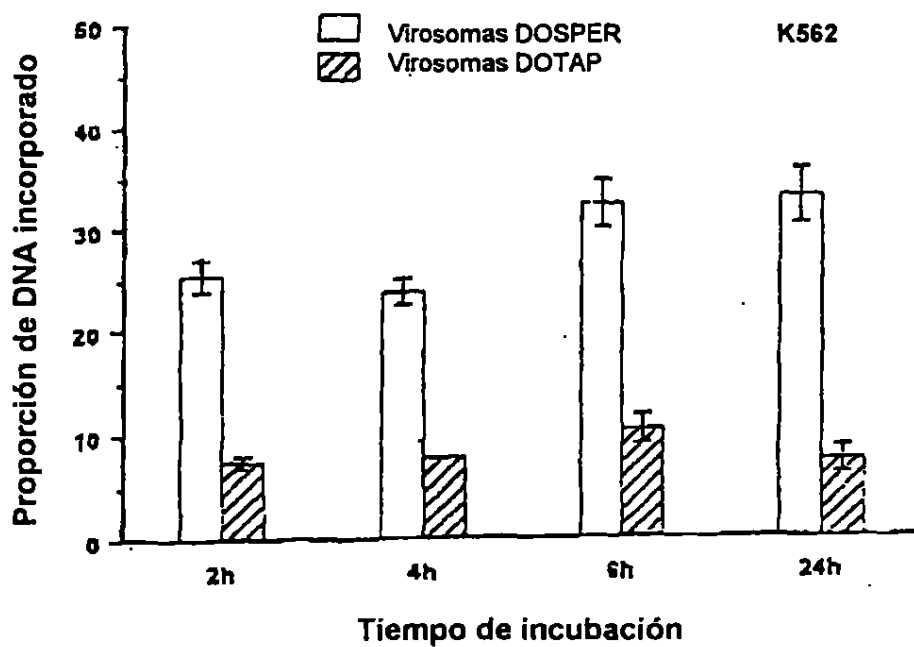


Fig. 9

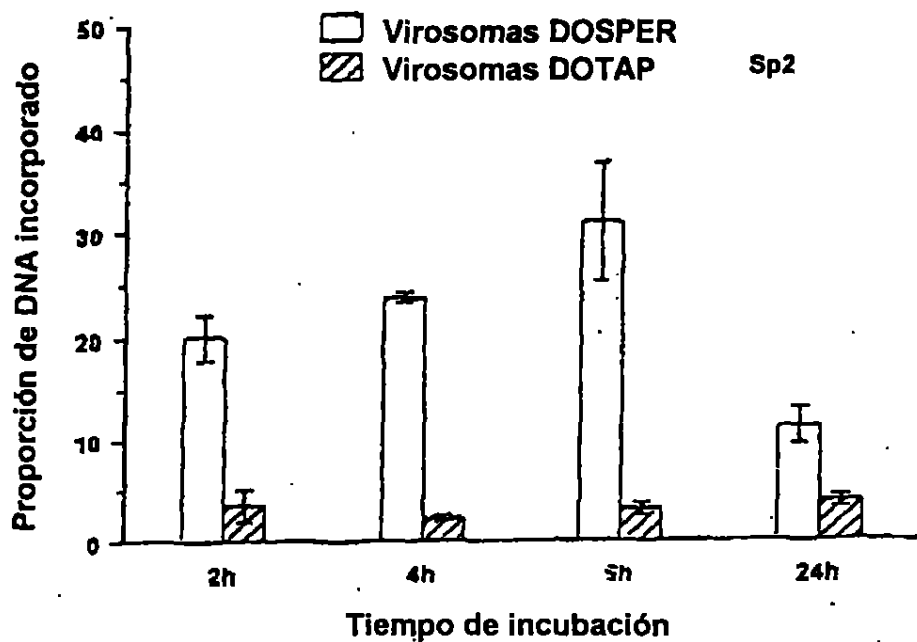


Fig. 10

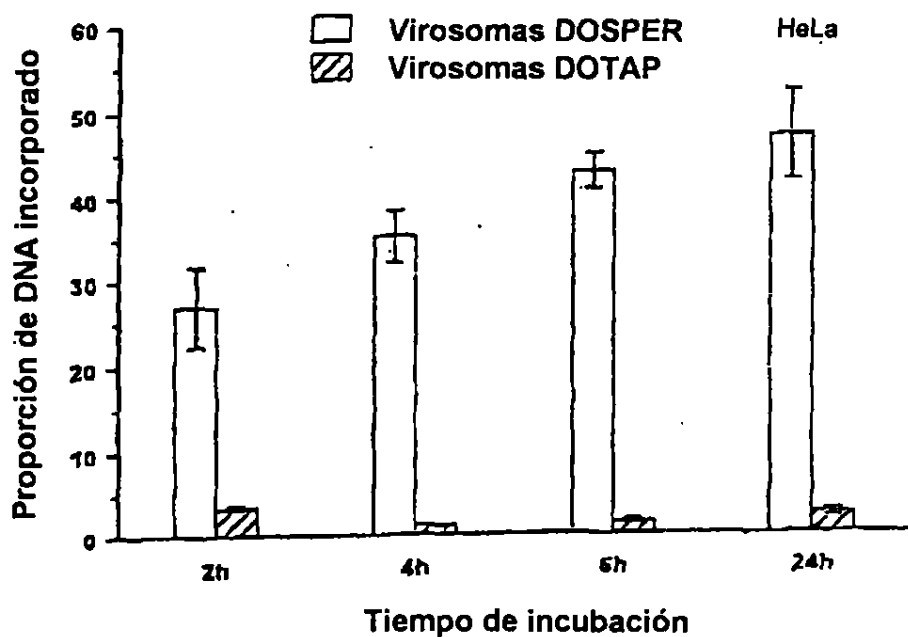


Fig. 11

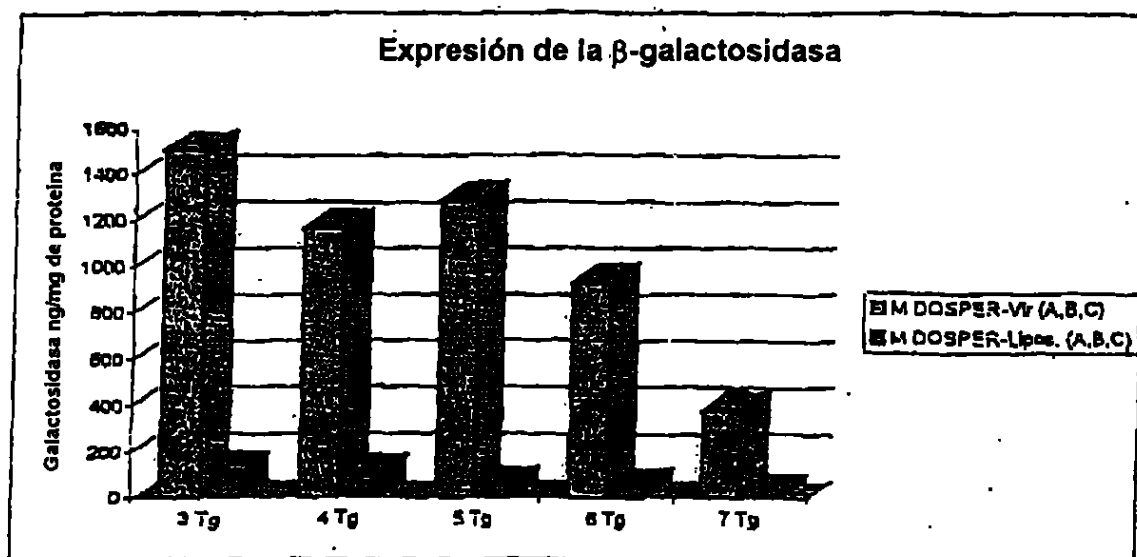


Fig. 12

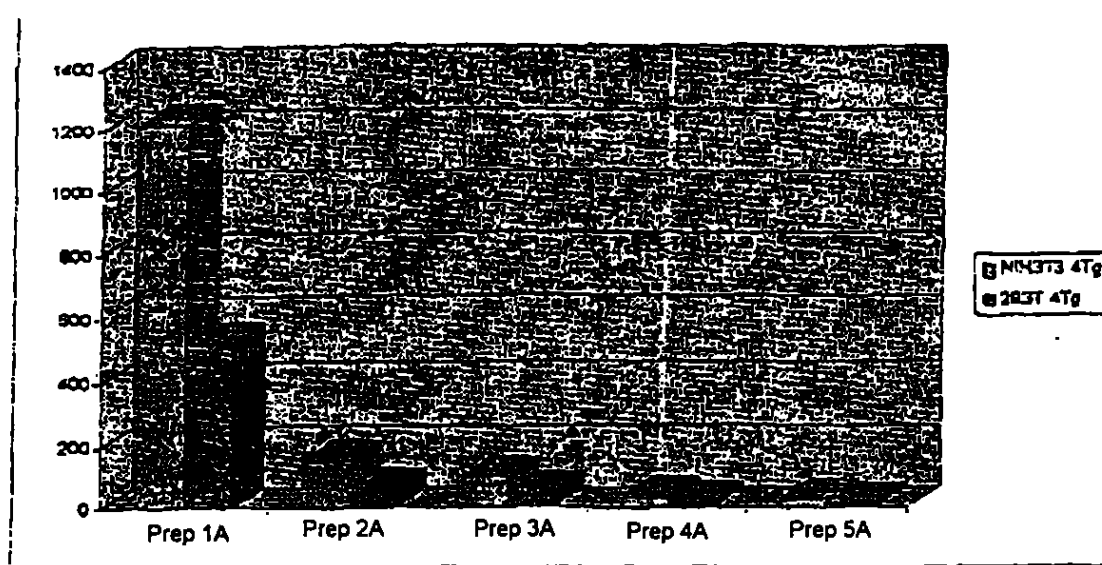


Fig. 13

SEQUENCE LISTING

A

<110> NIKA HEALTH PRODUCTS LIMITED

<120> Cationic DOSPER virosomes

<130> BLP-4886-PC (DOSPER Virosomes)

<140>

<141>

<150> US 09/414,872

<151> 1999-10-08

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: antisense
oligodeoxynucleotide of L-myc gene

<400> 1

gtagtccatg tccgc

15

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: sense
oligodeoxynucleotide of L-myc gene

<400> 2

gcggacatgg actac

. 15

xy

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

Nueva York

099610

Fecha

AUG 04 1993

se autentico la firma de

Daniel T. Ditt

que ejercía funciones de

puesta al pie de

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
IMPUESTO DE TERCER... 6
DERECHOS... 50
TOTAL PAGADO L\$ 56
VALOR EN LETRAS CINCUENTA
Y SEIS DOLARES
NUEVA YORK AUG 04 1993

FORMA DE LE Rev 10 86

COMO LO ARIO ESTO DE CINCUENTA
DOLARES Y SEIS DOLARES
TOS ATIL... CON... CON EL ORIGINAL QUE HE
ENCO A LA VIST
22 SET 200
JUAN MANUEL BOTERO MURINA
NOTARIO

08021
08002



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

10 EAST 46TH STREET
NUEVA YORK, N.Y. 10017

New York,

EL SUSCRITO CONSUL DE COLOMBIA, VISTOS LOS DOCUMENTOS PRESENTADOS
POR LOS INTERSADOS

No. 505429
MINISTERIO RELACIONES EXTERIORES
AREA LEJISLACION DE D. U.S.
HACE CONSTAR
Que el señor (a): LUZ HELENA PEREZ
Cuya firma aparece al pie del presente
documento, desempeñaba en esa fecha
las funciones de SECRETARY OF STATE
Santafé de Bogotá, D.C. 22 SET. 1993
La Oficina de Legalizaciones no asume
responsabilidad alguna por el contenido
de este documento.
OFICINA DE LEGALIZACIONES

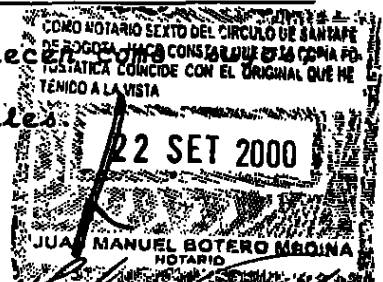
C E R T I F I C A :

Que ante la Oficina del señor Daniel T. Dalton
que autoriza el documento adjunto, ejercía legalmente en la fecha
allí expresada las funciones de Secretary of State
of New Jersey.

y que la firma y sello que en el documento aparecen
son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.



AGS 04 1993

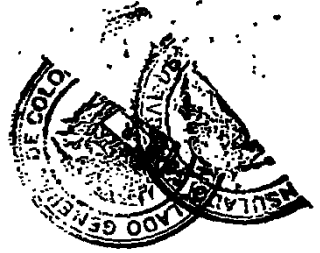


Consul de Colombia

LUZ HELENA PEREZ DUQUE

Consul

El consulado no asume responsabilidad alguna por el contenido de
los documentos anexos.



COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FO-
TOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE
TENIDO A LA VISTA

22 SET 2000

JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO



(Für Patente, Modelle und Zeichnungen; Warenzeichen und Servicezeichen; Handelsnamen und -zeichen).

REPRESENTACION Y PODER

VERTRETUNG UND VOLLMACHT

Yo (nosotros), abajo firmado (s)
Nika Health Products Limited

domiciliado(s) en Städtle 36,
FL-9490 Vaduz, Liechtenstein

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; ERNESTO CAVELIER, tpa. 11519; y EMILIO FERRERO, tpa. 31929; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el párrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como nuestros representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, y bajo las mismas reglas, conferimos poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas y de servicios; el depósito de nombres comerciales y enseñanzas; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de oposición, cancelación, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y juicios que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, desistír, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos hechos por agentes oficiosos.

Dado y firmado hoy
28 Julio 1993
en Princeton, NJ, USA



Firma

Ich (wir) unten Unterzeichnender (de)
Nika Health Products Limited
wohnhaft in Städtle 36, FL-9490
Vaduz, Liechtenstein

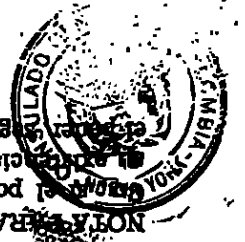
verleihen durch dieses Schreiben an GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; ERNESTO CAVELIER, tpa. 11519; und EMILIO FERRERO, tpa. 31929; wohnhaft in der Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Kolumbien, um die Verfügung des Absatzes 1 im Artikel 543 des Handelsgesetzbuch zu beachten, der erste als Hauptvertreter und die übrigen als Stellvertreter, beziehungsweise, als unsere Vertreter in allen was sich auf das industrielle Eigentum bezieht, berechtigt Meldungen zu empfangen und gerichtliche und aussergerichtliche Bevollmächtigte zu ernennen. Der erste Stellvertreter wird den Hauptvertreter ersetzen wegen zeitweiligen oder definitiven Abwesenheit oder Hindernisses des ersten. Dieselbe Regel wird angewandt werden wenn der zweite Stellvertreter den ersten ersetzen muss, oder der dritte den zweiten. In solchen Fälle der Hauptvertreter, oder der erste oder der zweite Stellvertreter, beziehungsweise, oder beide, werden ihre Absicht aussprechen um nicht die Vertretung auszuüben mittelst Aussage notariell beglaubigt in Kolumbien, oder vor Notar oder vor einem anderen öffentlichen Beamter, oder Kolumbianischen Konsul im Auslande; und wenn es ein Hindernis sei, mittels der betreffenden Beglaubigung. Wenn einer der Genannten immerfort abwesend wäre, der Folgende wird ihn ersetzen. Im Falle dass die Abwesenheit oder das Hindernis des Hauptvertreters, oder diejenigen seines ersten, zweiten oder dritten Vertreters, beziehungsweise, beendeten, einer oder anderen, ordnungsweise werden die Vertretung ausüben und sie zu sich nehmen nur auf Grund sie auszuüben, mit Aufhören zur Zeit der Ausübung der Vertretung durch den ersten, den zweiten oder den dritten Stellvertreter beziehungsweise.

Ausserdem, und unter dieselben Regeln, wir verleihen den genannten Rechtsanwälte die Vollmacht, und um den Schutz meines (unseres) industriellen Eigentum zu erhalten, und gegen den unlauteren Wettbewerb; zu diesem Zweck ich (wir) die genannten Bevollmächtigten ernenne(n), damit sie uns vor beliebigen Institutionen oder Personen, die die Rechte vorzuschreiben können oder nicht, vor allem vor dem Verwaltungs- und gerichtlichen Streitigkeiten, und sonstigen Angelegenheiten, in allen was sich auf folgende Angelegenheiten bezieht, zu vertreten: a) Erlangung von Patenten, Modellen, und Zeichnungen; Registrierung von Waren, Marken, Defensive- und Servicezeichen, Aufbewahrung von Handelsnamen- und -zeichen, ihre Erneuerung und Übertragung, Namen- und Wohnsitzänderung, freiwillige Annullierung und die Registrierung von Verträgen; b) Die Oppositionsaktionen, Annullierung, und sonstigen Vorsichtsmaßnahmen, Lizenzen, und im allgemeinen die Zivil-, Straf-, Verwaltungs- oder streitigen Verwaltungsprozesse, die mit diesen Rechten verbunden sind, Aktionen und Verhandlungen, die wir vorantreiben oder die man uns vorantreibt und; c) damit sie in allen oben bestimmten Angelegenheiten dieses Mandat ersetzen, regeln, davon Abstand nehmen, annullieren, empfangen, verzichten, Meldungen annehmen und gerichtliche und aussergerichtliche Bevollmächtigte ernennen, und die Handlungen der halbamtlichen Vertreter bestätigen.

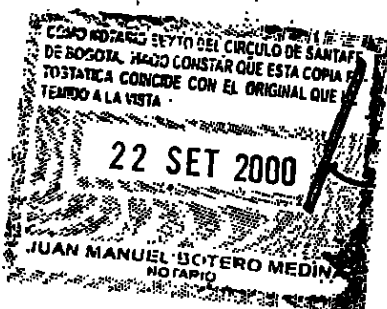
Unterzeichnet heute am 28 de Julio de 1993
in Princeton, NJ, U.S.A

Wojciech Piasecki
Unterschrift
Wojciech Piasecki, Director

NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL COLOMBIANO: Según los artículos 65 del C. de P. C. y 480 del C. de Comercio, que ejerce su objeto social, el señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad, que ejerce su objeto social, que quien confiere el poder es su representante y puede otorgar el poder, legalmente autenticar la firma de éste.



Die konsularische Legalisierung ist notwendig.



LEGALISIERUNG

Signed before me
at Princeton, NJ, USA on
July 28, 1993

RICHARD S. STACHOWICZ
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires Mar. 8, 1995

I hereby certify that the above firm is a juristic person organized under the laws of the Principality of Liechtenstein and that the signature above is that of Wojciech Plasecki, Director, who is duly authorized to sign on behalf of Nika Health Products, Ltd.



State of New Jersey
DEPARTMENT OF STATE

I DANIEL J DALTON

Secretary of State of New Jersey do hereby Certify,

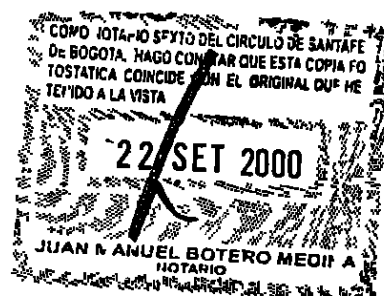
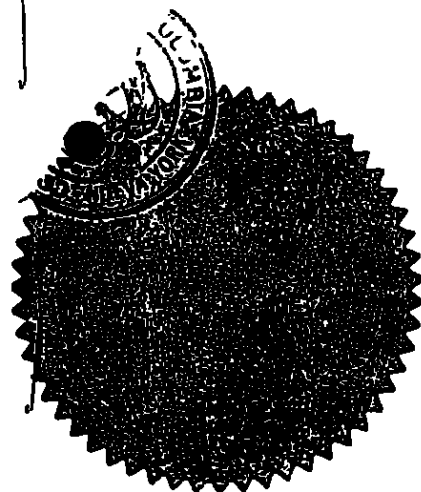
that RICHARD S STACHOWICZ the officer whose name is subscribed to the certificate of acknowledgment proof or affidavit attached to the annexed instrument was at the time of taking said acknowledgment proof or affidavit a NOTARY PUBLIC, in and for the State of New Jersey, duly commissioned and sworn and was as such an officer of said State duly authorized by the laws thereof to take and certify the same as well as to take and certify the proof and acknowledgment of deeds and other instruments in writing to be recorded in said State and that full faith and credit are and ought to be given to his official acts and

In Witness Whereof, I have hereunto set my hand and affixed my Official seal

this 30TH day of JULY

A D 19 93

Manuel J. Dalton Secretary of State



✓8

TRADUCCION OFICIAL No 10693 de un documento escrito en ingles, el cual para su identificacion se sella con el sello del Traductor al mismo tiempo que la presente Esta traduccion ha sido preparada por Ana Maria Salvetti, Traductora Oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobada por el Ministerio de Justicia colombiano mediante Resolucion No 158 de 1991

(Se traducen sellos y legalizaciones que aparecen a continuacion de un Poder escrito en español y aleman, otorgado por la sociedad Nika Health Products Limited, a favor de los Doctores German Cavelier, Gonzalo Perdomo, Ernesto Cavelier y Emilio Ferrero)

Dado y firmado el 28 de julio de 1993, en Princeton, NJ, Estados Unidos de America por Wojciech Piasecki, Director Aparece sello en tinta del Consulado General de Colombia en Nueva York

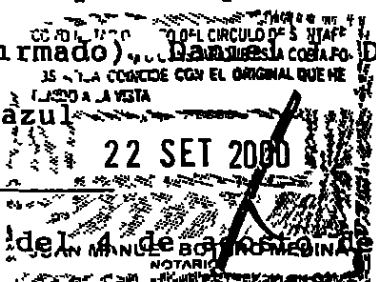
Por medio del presente certifico que la persona mencionada es una persona juridica constituida bajo las leyes del Principado de Liechtenstein y que la firma que antecede la de Wojciech Piasecki, Director, quien esta debidamente autorizado par firmar a nombre de Nika Health Products, (Texto manuscrito) Firmado ante mi en Princeton, NJ, Estados Unidos de America, el 28 de julio de 1993 (Firmado), Richard S Stachowicz, Notario Publico de Nueva Jersey Mi comision expira el 8 de marzo de 1995 Aparece sello Notarial

ESTADO DE NEW JERSEY

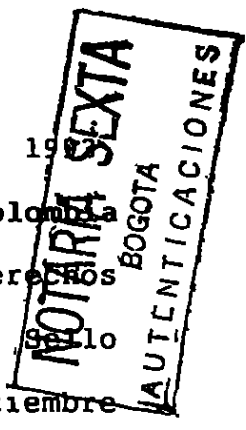
Departamento de Estado

Yo, DANIEL J DALTON, Secretario de Estado de New Jersey, por medio del presente Certifico, que RICHARD S STACHOWICS, el funcionario cuyo nombre suscribe el certificado de reconocimiento, prueba o declaracion juramentada adjunta al presente instrumento, era al tomar dicho reconocimiento, prueba o declaracion juramentada un NOTARIO PUBLICO, en y para el Estado de New Jersey, debidamente comisionado y juramentado y estaba como tal, un funcionario de dicho Estado, debidamente autorizado por las leyes del mismo para tomar y certificar la prueba y reconocimiento de escrituras y otros instrumentos escritos para su registro en dicho Estado, y que completa fe y credito son y deben darse a sus actos oficiales y

En Testimonio de lo Cual, he firmado y estampado mi sello Oficial, hoy 30 de julio de 1993 (Firmado) Dalton, Secretario de Estado Sello de oblea azul



(en español) Certificación No 099610 del 4 de agosto de 1993 de la firma que antecede por el Consulado General de Colombia en Nueva York Pagado el impuesto de timbre y derechos consulares (Firmado), Luz Helena Perez Duque, Consul consular en tinta Legalización No 505429 del 2 de septiembre de 1993 de la firma que antecede por el Ministerio de Relaciones Exteriores (Firmado), Gladys Mireya Paez Herrera, Legalizaciones



Es traduccion fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta Oficina para su confrontacion y a la cual me

remito

Bogota, 10 de septiembre de 1993

COLO-8027-801-001-4

ams/4

Ana Maria Salvetti
ANA MARIA SALVETTI
Traductora Oficial
Res No 158 Minjusticia

COMO NOTARIA SEXTA DE BOGOTA HAGO CONSTAR
QUE LA TRAYA QUE APORTA ESTE DOCUMENTO
A LA OFICINA

Ana Maria Salvetti

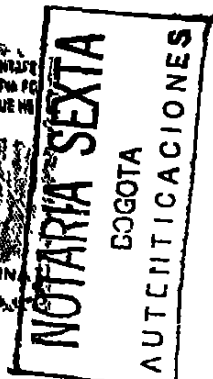
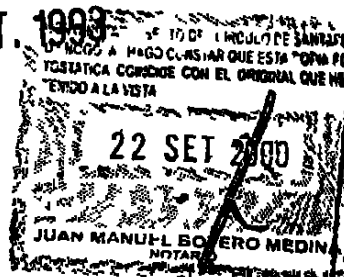
C C No

IDENTICA

CON LA TRAYA QUE APORTA ESTE DOCUMENTO



03 SET. 1993



Formulario de autenticación con el número 507480. Incluye el nombre ANA MARIA SALVETTI, la fecha 06 SET. 1993, y una firma manuscrita.

TELEFAX: (57) (1) 2358850
TELEX: 43479 CAVE CO
(2317407375 CAVE UC

CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª, No. 72-35
BOGOTA 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL: CAVE
TELEFONO (57) (1) 2120100
CABLES: CAVELEYES

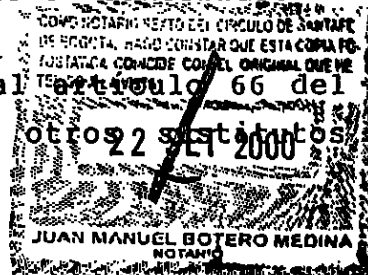
Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: NIKIA HEALTH PRODUCTS LIMITED

Poder conferido el: 28-07-93

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder conferido en el doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros 22 sustitutos faltan en este momento.



Señor Jefe,

GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

Acepto:

EMILIO FERRERO

T.P.A. No 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén

2e-780-2

Se retiraron fotos 5293
tarjetas 202014

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D. E., 03 SET. 1993

Ante MI, OLGA DUQUE DE OSPINA,
NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA

compareció(eron) personalmente

quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C. 28707924
438019

y la(s) Libreta(s) Militar(es)

domiciliado(s) en Bogotá, y declaró(eron) que la(s) firma(s) que apo-
recen(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y que el
contenido del mismo es cierto.

En constancia se firma esta Diligencia.

[Signature]

NOTARIA SEXTA
BOGOTA

[Signature]

COMPARADO SEPTIMO DEL CIRCULO DE SANTAFE
DE BOGOTA. SEGO CONSTA QUE ESTA COPIA FO-
TOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE
TENIDO A LA VISTA
22 SET 2000
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO





Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

MIT 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 00776243 CECOS232
Fecha (AND) 2000-10-05 16:44:06 Folios: 35
Tramite : 002 PATENTES D : REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Categoría: 0020 EXVIA J.C. DE NUESTROS CRISTIANOS

RECIBO OFICIAL DE CAJA .58,739
FECHA SEPTIEMBRE 18 DE 2000

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	N.º PAGO	Vr PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00110-6	2722042	20,319,500 00.

***** G O N C E P T O *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	608,000 00
		TOTAL	608,000 00

SUM SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS.

RESPONSABLE

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No



*Carrera 13 No 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador 334 12 21
Fax 281 31 25
e-mail info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá, D C ,Colombia

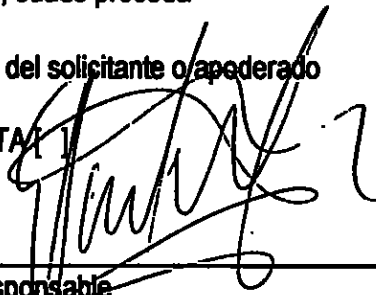
28
S3



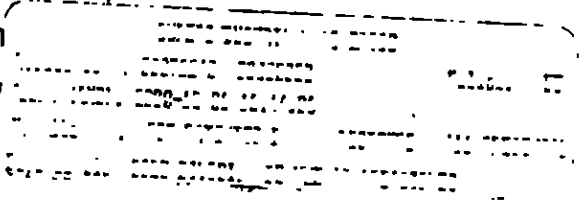
REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION 1	MODELO DE UTILIDAD []
• 1 Nombre e identificación del Solicitante 1	[]
• 1 Nombre e identificación del Inventor 1	[]
• 1 Título o nombre de la Invención 1	[]
• 2 Descripción 2	[]
• 2 Reivindicaciones 27	[]
• 3 Resumen 35	[]
• 5 Comprobante de Pago 55	[]
• Poder, cuando proceda	[]
• Copia de la primera solicitud de patente, si reivindica prioridad, señalándola expresamente	[]
• Firma del solicitante o apoderado 1	[]
COMPLETA []	INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []	
• Nombre e identificación del peticionario	[]
• Nombre e identificación del inventor o diseñador	[]
• Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse	[]
• Representación gráfica	[]
• Comprobante de pago	[]
• Poder, cuando proceda	[]
• Firma del solicitante o apoderado	[]
COMPLETA []	INCOMPLETA []



Firma Responsable

Fecha 

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

EXPEDIENTE 00-76243

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de Patente de Invención:

SI ☒] NO ☐] NO APLICABLE ☐] Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI ☒] NO ☐] NO APLICABLE ☐] Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI ☒] NO ☐] NO APLICABLE ☐] Presentó, en forma correcta, el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de Enero del 2000)

SI ☒] NO ☐] EXTEMPORANEAMENTE ☐] Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.

SI ☐] NO ☒] NO APLICABLE ☐] Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI ☐] NO ☒] NO APLICABLE ☐] Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de Paris; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI ☐] NO ☒] CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS

OBSERVACIONES JURÍDICAS CONVENIO DE PARIS: Deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI ☐] NO ☒] Se ajusta a los aspectos FORMALES indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI ☐] NO ☒] Se recomienda PUBLICAR el extracto correspondiente.

Bogotá, D.C., 9 de Octubre del 2000

EXAMINADOR JURIDICO.
202022

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO.
PRIMER EXAMEN DE FORMA.

Radicación No. 00-76243

Concepto Técnico No. 1723

Clasificación Internacional de Patentes: A61K 48/00

Practicado el examen, de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344, se determinó que la presente solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art. 8, Art 13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Art. 13-a)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art. 13-e)
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art. 13-b)
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art. 13-c)
- SI ☐ NO ☒ Contiene los dibujos correctos (Art. 14-c junto con el literal d) del Art. 4 del (Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art. 14-c junto con el Dto. 3464 del 26 de diciembre de 1980)
- SI ☒ NO ☐ Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual solicita protección mediante la patente (Art. 13-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 de Dto 117 del 94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 del 94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta de archivo temático (forma P-104) en forma correcta (Artc 14-c junto con el literal b) del 1rt. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta de archivo de propietarios (forma P-105) en forma correcta (Art. 14-c junto con el literal b) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☐ NO ☒ **CUMPLE CON LOS REQUISITOS TÉCNICOS DE FORMA.**

OBSERVACIONES DEL PRIMER EXAMEN TÉCNICO DE FORMA:

Las figuras 12 y 13 del folio 42 no son lo suficientemente nítidas para permitir una buena copia a través de Offset o Scanner. Adicionalmente no permiten distinguir entre los datos de NIH3T3 y los otros datos que no se alcanzan a leer. Sírvasse presentar una nueva copia con una mejorada resolución.

EXAMINADOR TÉCNICO: 202016.

Bogotá, D.C., 30 de octubre de 2000

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

EXPEDIENTE 00-76243

AUTO 3615

LA JEFE DE DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE:

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor EMILIO FERRERO como apoderado de la Sociedad solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido.

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Bogotá D.C., a los

07 NOV. 2000

LA JEFE DE LA DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Bogotá D.C., **08 NOV. 2000**

notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI _____ NO _____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA