

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier-abogados.com
E-MAIL: cavelier@colomsat.net.co

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señora Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comer
E. S. D.

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00076243 00000001 Folios: 147
Fecha (ORD): 2000-12-07 17:23:55
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 444 REPUESTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Referencia : Expediente No.00.076.243
Solicitante : NIKA HEALTH PRODUCTS LTD.
Asunto : Solicitud de patente para:
"VIROSOMAS CATIONICOS DOSPER"
Fecha de la solicitud : 6 de octubre de 2000

TRAMITE:02 - EVENTO:01 - ACTUACION:444

1. Yo, Emilio FERRERO, obrando como apoderado del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al auto número 3615, notificado por estado del 10 de noviembre de 2000.

2. Mediante el auto número 3615 se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

2.1. Dibujos. Presento junto con este escrito los dibujos de las figuras 12 y 13 que se mencionan en la descripción.

2.2. Copia Certificada. Presento con este escrito copia certificada de la solicitud de patente americana número 09/414.872 del 8 de octubre de 1999 junto con su respectiva traducción de sus reivindicaciones y carátula, en la cual se basa la reivindicación de la prioridad.

RESPUESTA AUTO No. 3615 DEL ESTADO
DEL D. 10 de noviembre de 2000

5861

3. Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, atentamente solicito que se continúe su tramitación.

Bogotá, -7 DIC. 2000
Señora Jefe,



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

WCA
COLO 08027-801-003-0
JJC-ID-24

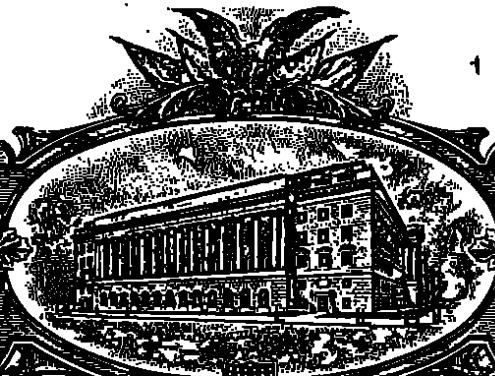
Nota
Folio 62

Se retina (Dibujos)

Enero 23/03/82
Tarjeta de archivo
tem ótico y prop.

5963

7A 309960



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

October 04, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 09/414,872

FILING DATE: October 08, 1999



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

H. L. Jackson
H. L. JACKSON

Certifying Officer

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

OLIFF & BERRIDGE, PLC
P.O. Box 19928
Alexandria, Virginia 22320
Telephone: (703) 836-6400
Facsimile: (703) 836-2787

Attorney Docket No.: 101909.01

Date: October 8, 1999

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

BOX PATENT APPLICATION

CONTINUING APPLICATION TRANSMITTAL RULE 1.53(b)

Sir:

Transmitted herewith for filing under 37 C.F.R. §1.53(b) is a

- ☐ Continuation ☐ Divisional ☒ Continuation-in-Part

application of prior pending Application No. 09/171,882, filed December 30, 1998.

For (Title): CATIONIC VIROSOMES AS TRANSFER SYSTEM FOR GENETIC MATERIAL

By (Inventors): Ernst Rudolf WALT; Reinhard GLUCK; and Peter KLEIN

1. ☒ A Declaration and Power of Attorney is attached. The attached Declaration and Power of Attorney is:
- ☐ a. A copy of the Declaration and Power of Attorney from the parent application. (Used with the same or fewer inventors and (a) a copy of the prior application or (b) a revised, reformatted or edited version of the prior application that does not contain new matter.)
- ☒ b. A new Declaration and Power of Attorney. (Used with the same, fewer or additional inventors and (a) a copy of the prior application, (b) a revised, reformatted or edited version of the prior application that does not contain new matter, or (c) a new specification.)

2. ☒ The filing fee is calculated below:

CLAIMS IN THE APPLICATION AFTER ENTRY OF ANY PRELIMINARY AMENDMENT NOTED BELOW

FOR:	NO. FILED	NO. EXTRA
BASIC FEE		
TOTAL CLAIMS	30 - 20	= 10*
INDEP CLAIMS	2 - 3	= 0*
☐ MULTIPLE DEPENDENT CLAIMS PRESENTED		

* If the difference is less than zero, enter "0".

SMALL ENTITY

RATE	FEE
	\$ 380
x 9 =	\$90
x 39 =	\$
+130 =	\$
TOTAL	\$470

OTHER THAN A SMALL ENTITY

RATE	FEE
	\$ 760
x 18	\$
x 78	\$
+260	\$
TOTAL	\$

3. ☒ Check No. 103533 in the amount of \$470 to cover the filing fee is attached. The Commissioner is hereby authorized to charge any other fees that may be required to complete this filing, or to credit any overpayment, to Deposit Account No. 15-0461. Two duplicate copies of this sheet are attached.
4. ☐ Cancel claims _____ of the application before calculating the filing fee. At least one independent claim is retained for filing purposes.

DEPOSIT ACCOUNT USE AUTHORIZATION

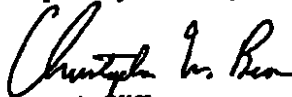
Please grant any extension
necessary for entry;
Charge any fee due to our
Deposit Account No. 15-0461

5. ☒ Amend the specification by inserting before the first line the sentence:
—This is a ☐ Continuation ☐ Division ☒ Continuation-in-Part of Application No. 09/171,882 filed December 30, 1998, which in turn is a U.S. National Stage of PCT/EP97/02268 filed May 4, 1997. The entire disclosures of the prior applications are hereby incorporated by reference herein in their entirety.--
6. ☒ Formal drawings (Figs. 1-26) are attached.
7. ☒ Priority of foreign application(s) No. 96107282.4 filed May 8, 1996 in Europe is claimed under 35 U.S.C. §119 and/or §365(b).
☒ The certified copy was filed in prior Application No. 09/171,882 on October 28, 1998.
☐ A certified copy of the above foreign application(s) is filed herewith.
8. ☐ Priority of U.S. Provisional Application(s) No. _____ filed _____ is claimed under 35 U.S.C. §119.
☐ Amend the specification by inserting before the first line the sentence:
—This nonprovisional application claims the benefit of U.S. Provisional Application(s) No. _____ filed _____.
9. ☒ The prior application is assigned of record to NIKA HEALTH PRODUCTS LIMITED recorded at Reel 9853, Frame 0864.
10. ☐ This application is filed by fewer than all the inventors named in the prior application (37 C.F.R. §1.53(b)(1)). Delete the following inventor(s) named in the prior application:

11. ☐ A Preliminary Amendment is attached. Claims added by this Amendment are properly numbered consecutively beginning with the number next following the highest numbered claim in the application.
12. ☒ An Information Disclosure Statement is attached.
13. ☒ Small entity status:
☐ a. A small entity statement is attached.
☒ b. A small entity statement was filed in the parent application and such status is still proper and desired.
☐ c. Small entity status is no longer claimed.
14. ☐ Other: _____
15. ☒ The power of attorney in the application is to James A. Oliff, Registration No. 27,075, William P. Berridge, Registration No. 30,024, Kirk M. Hudson, Registration No. 27,562, Thomas J. Pardini, Registration No. 30,411, Edward P. Walker, Registration No. 31,450, Robert A. Miller, Registration No. 32,771, Mario A. Costantino, Registration No. 33,565 and/or Caroline D. Dennison, Registration No. 34,494.
☐ a. The power appears in the attached Declaration and Power of Attorney.
☐ b. Since the power does not appear in the attached Declaration and Power of Attorney, a substitute Power of Attorney is also attached.
16. ☒ Address all future communications to:

OLIFF & BERRIDGE, PLC
P.O. Box 19928
Alexandria, Virginia 22328

Respectfully submitted,


James A. Oliff

Registration No. 27,075

Christopher W. Brown
Registration No. 38,025

668007-22847460
JAO:CWB/tzg

Applicant or Patentee: David Rudolf WALL, Reinhold GLUCK and Peter KLEIN
 Application or Patent No.: _____ Attorney Docton No.: 101909.01
 Filed or Invented: _____
 For: CATIONIC VIRUS-LIKE AS TRANSFER SYSTEM FOR GENETIC MATERIAL

**STATEMENT CLAIMING SMALL ENTITY STATUS
(37 CFR 1.501 and 1.27(c)) - SMALL BUSINESS CONCERN**

- ☐ the owner of the small business concern identified below:
☒ an official of the small business concern empowered to act on behalf of the concern identified below:

NAME OF CONCERN Niba Health Products Limited
ADDRESS OF CONCERN Stadla 36, FL-9490 Vaduz, LIECHTENSTEIN

The above identified small business concern qualifies as a small business concern as defined in 15 CFR 121.2-12, and reproduced in 37 CFR 1.34(a), for purposes of paying reduced fees under sections 41(a) and (b) of Title 35, United States Code, in that the number of employees of the concern, including those of its affiliates, does not exceed 500 persons. For purposes of this statement, (1) the number of employees of the business concern is the average over the previous fiscal year of the concern of the persons employed on a full-time, part-time or temporary basis during each of the pay periods of the fiscal year, and (2) concerns are affiliates of each other when either, directly or indirectly, one concern controls or has the power to control the other, or a third party or parties controls or has the power to control both.

Rights under contract or law have been assigned to and remain with the small business concern identified above with regard to the invention, entitled: **CATING VIRUS-LIKE AS TRANSFER SYSTEM FOR GENETIC MATERIAL** by inventor(s) **Ernst Rudolf WALT, Reinhold GLUCK and Peter KLEIN** described in:

- ☒ the specification filed herewith.
- ☐ application no. _____, filed _____
- ☐ patent no. _____ issued _____

If the rights held by the above identified small business concern are not exclusive, each individual, company or organization having rights to the invention is listed below and no rights to the invention are held by any person, other than the inventor, who would not qualify as an independent inventor under 37 CFR 1.9(c) if that person made the invention, or by any concern which would not qualify as a small business concern under 37 CFR 1.9(d) or a nonprofit organization under 37 CFR 1.9(e).

NOTE: Separate statements are required from each named person, company or organization having rights to the invention covering its status as small entities (37 CFR 1.27).

FULL NAME _____
ADDRESS _____
☐ INDIVIDUAL ☐ SMALL BUSINESS CONCERN ☐ NONPROFIT ORGANIZATION

FULL NAME _____
ADDRESS _____
☐ INDIVIDUAL ☐ SMALL BUSINESS CONCERN ☐ NONPROFIT ORGANIZATION

I acknowledge the duty to file, in this application or permit, notification of any change in status resulting in loss of entitlement to small entity status prior to paying, or at the time of paying, the portion of the issue fee or my maintenance fee due after the date on which status as a small entity is no longer appropriate (37 CFR 1.301(b)).

TYPEWRITTEN NAME OF PERSON SIGNING Wojciech Mazowiecki
 TYPEWRITTEN ADDRESS OF PERSON SIGNING Pracowni
 SIGNATURE Wojciech Mazowiecki DATE: OCT. 6, 1999

CATIONIC VIROSOMES AS TRANSFER SYSTEM FOR GENETIC MATERIAL

This application is a continuation-in-part application of U.S. Patent Application No. 09/171,882, filed December 30, 1998, which in turn is a U.S. national stage application of PCT/EP97/02268, filed May 4, 1997. The entire disclosure of these prior applications is hereby incorporated by reference herein.

FIELD OF INVENTION

- 10 The present invention is in the field of gene biotechnology and gene therapy and relates to novel virosomes, i.e., positively charged liposomal vesicles containing viral glycoproteins in the membrane, for efficient transfer of genetic material to target locations, a method of manufacture and useful applications thereof. The present cationic virosomes are particularly suitable for the specific and unspecific, non-infectious delivery of genes to target cells *in vitro* and *in vivo*.

BACKGROUND OF THE INVENTION

- Liposomes are widely used as carriers for drug delivery and as protective shelters for short-lived pharmaceutical substances or against (bio)chemical attack by bodily fluids. Liposomes containing reconstituted membrane proteins or parts thereof from viral envelopes are usually called "virosomes" (Sizer et al., Biochemistry 26:5108-5113, 1987). They have been applied for non-specific delivery of various drugs and DNA molecules (Vainstein et al., Methods Enzymol. 101:492-512, 1983). It turned out to be a major drawback that these virosomes fused with the cell membrane of the target cells resulting in an uncontrolled release of the transported material into the cytoplasm of the target cells where the unprotected material was readily attacked by degradative intracellular processes.

- WO 92/13525, the whole contents of which shall herewith be incorporated by reference, reports that virosomes made of phospholipid bilayer membranes which are targeted with viral spike proteins from influenza virus and with cell-specific markers such as, e.g., monoclonal antibodies, very efficiently fuse with model membranes and animal cells due to a virus-like penetration mechanism by way of

receptor-mediated endocytosis. While these virosomes are successfully applied to deliver chemical substances and desired drugs to target locations, they suffer from certain disadvantages with respect to stable incorporation and transfer of charged molecules such as, for instance, negatively charged nucleic acids.

5

Within the last few years the delivery, notably the cell-specific delivery, of genetic material incorporated in liposomes has gained more and more attention and importance, particularly with regard to applications in anti-cancer and gene therapy. Several methods are currently available for delivery of DNA or RNA to cells: Virus mediated methods, lipid mediated methods, and other methods like microinjection and electroporation. The advantages and disadvantages of current gene transfer techniques can be summarized as follows:

10

a) *Virus mediated gene transfer:* Genes can be introduced stably and efficiently into mammalian cells by means of retroviral vectors. However, the efficiency of gene transfer to non-replicating cells is very low because retroviruses infect only dividing cells. Further, general safety concerns are associated with the use of retroviral vectors relating to, for instance, the possible activation of oncogenes. Replication-defective adenovirus has become the gene transfer vector-of-choice for a majority of investigators. The adenovirus vector mediated gene delivery involves either the insertion of the desired gene into deleted adenovirus particles or the formation of a complex between the DNA to be inserted and the viral coat of adenovirus by a transferring-polylysine bridge. The drawback of this very efficient system *in vivo* is an undefined risk of infection or inflammation: Despite the E1 gene deletion that renders the virus defective for replication, the remaining virus genome contains numerous open reading frames encoding viral proteins (Yang et al. 1994; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4407-4411). Expression of viral proteins by transduced cells elicits both humoral and cellular immune responses in the animal and human body and thus, may provoke inflammation and proliferation.

20

25

30

In the HVJ (Sendai virus) mediated method the foreign DNA is complexed with liposomes. The liposomes are then loaded with inactivated Sendai virus (hemagglutinating virus of Japan; HVJ). This method has already been used for

66805F 2284460

gene transfer *in vivo* to various tissues. In addition, cellular uptake of antisense oligonucleotides by HVJ-liposomes was reported (Morishita et al. 1993; J. Cell. Biochem. 17E, 239). A particular disadvantage is, however, that the HVJ-liposomes tend to non-specifically bind to red blood cells.

5

- b) *Lipid mediated gene transfer:* Positively charged liposomes made of cationic lipids appear to be safe, easy to use and efficient for *in vitro* transfer of DNA and antisense oligonucleotides. The highly negatively charged nucleic acids interact spontaneously with cationic liposomes. Already by simple mixing of the
- 10 polynucleotides with preformed cationic liposomes a complete formation of DNA-liposome complexes is achieved. However, due to the lack of fusion peptides and cell-specific markers on the liposomal membrane the *in vivo* transfection efficiency is very low and the incubation times are long, wherefore high doses have to be administered in order to achieve a desired effect.
- 15 Consequently, undesired side-effects may occur since there is evidence that large amounts of cationic lipids can exhibit toxic effects *in vivo*.

- Small oligonucleotides are currently being tested as therapeutic agents for the treatment of cancer and as antiviral agents. Only one of the two DNA strands is
- 20 transcribed to synthesize messenger RNA (mRNA). The DNA strand transcribed into RNA is called the coding strand or sense strand. The complementary, non-coding or antisense strand has the same sequence as the mRNA. When the non-coding strand is transcribed, it produces antisense RNA molecules that are able to bind to target (sense) mRNA. Once the antisense RNA is bound to the
- 25 sense RNA the resulting RNA duplex molecules cannot be translated and the production of the protein is blocked. Usually, short synthetic antisense oligonucleotides of 18 to 22 bases effectively bind to the mRNA and inhibit mRNA translation. By this mechanism antisense oligonucleotides can stop the proliferation of human cancer cells. Genes that are involved in cancer exert their
- 30 effect through overexpression of their normal structural proteins. Genes such as c-fos, c-myc, L-myc, N-myc, c-myb, abl, bcr-abl, c-raf, c-erb-2, K-ras may be potential targets for antisense cancer therapy. Antisense oligonucleotides are also an attractive potential alternative to conventional drugs such as, for example,

66800T 2284460

antiviral agents such as, e.g., the antisense oligonucleotides of tat and gag gene of the human immunodeficiency virus (HIV).

5 Liposomal membranes comprising reconstituted virus envelopes as described in the literature (Stegmann et al.; EMBO J. 6:2651-2659, 1987) may be called virosomes. They usually comprise a phospholipid bilayer containing phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) together with viral envelope, e.g., spike proteins embedded in the membrane. The conventional methods to incorporate genetic material into PC, PE-virosomes suffer from the
10 drawback of a rather low efficiency of nucleic acid incorporation.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention therefore relates to a novel cationic virosome which due to its specific membrane composition may very efficiently be loaded with any desired
15 genetic material comprising long and short chain DNA or RNA, oligodeoxynucleotides, ribonucleotides, peptide nucleic acids (PNA), ribozymes (RNA molecules with enzymatic activities), genes, plasmids and vectors and, thus, convincingly overcomes the drawbacks of the prior art.

20 The invention further relates to a method for the efficient reconstitution of hemagglutinin of influenza virus A, particularly of strain A/Singapore, into substantially unilamellar cationic lipid vesicles resulting in the formation of cationic virosomes with a mean diameter of approximately 120 - 180 nm and a continuous lipid bilayer, which is substantially free from the disadvantage of leakage seen with
25 many conventional virosome preparations. The structure of the - preferably unilamellar - cationic bilayer membrane is such that the hydrophilic, positively charged heads of the lipids are oriented towards the aqueous phase(s) and the hydrophobic fatty acid tails are oriented towards the center of the bilayer. It could be shown by electron microscopy that the reconstituted viral spike proteins
30 (hemagglutinin) are integrated in the lipid bilayer and extend from the surface of the cationic vesicles (Fig. 1).

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- Fig. 1 shows a micrograph of DOTAP virosomes with viral spike proteins.
- Fig. 2 shows the pH-induced fusion activity of octadecyl rhodamine B labeled DOTAP-virosomes with model liposomes.
- Fig. 3 shows DOTAP-virosomes with encapsulated antisense FITC-OPT incorporated into human small cell lung cancer cells.
- Fig. 4 and Fig. 5 show the extraordinary uptake and transfection efficiency of antisense-L-myc-DOTAP-virosomes into human small cell lung cancer cells.
- Fig. 6 shows the incubation of different human small cell lung cancer cells, with Antisense-L-myc virosomes.
- Fig. 7a, 7b show the transfection efficiency of pRSVcat-DOTAP virosomes for Jurkat cells.
- Fig. 8: Fusion of DOTAP-virosomes with phospholipid-liposomes. Fusion was measured with the R18 assay at 37°C.
- Fig. 9: Thymidine incorporation into virosome-treated NCI-H209 cells. 75 μ l of virosomes containing 200 picomol of either antisense, sense, or msc FITC-OPT and 625 μ l of fresh medium containing 0.5 μ Ci 14 C-thymidine were added to 5×10^4 cells/ml per well.
- Fig. 10: Dose-dependent inhibition of thymidine incorporation into NCI-H209 cells upon addition of virosomes containing antisense-L-myc-OPT. NCI-H209 cells were incubated at an initial cell concentration of 1×10^6 per well and per ml. Values are the means $\pm$ standard deviations of three experiments.
- Fig. 11: Incubation of different human small cell lung cancer cell lines with 75 μ l of antisense-L-myc virosomes. L-myc oncogen expression decreases in the cell lines as indicated: H82 < H51OA < H209. The virosomes of lot 1 contained a smaller amount of antisense-L-myc than the ones of lot 2.
- Fig. 12: Transfection of Sp2 cells by two differently produced virosome preparations.
- Fig. 13: Transfection of P3/NS1 cells by two differently produced virosome preparations.

668007-2284460

Fig. 14: Transfection of NIH/3T3 cells by two differently produced virosome preparations.

Figs. 15, 16, 17: Cell growth of KG1 cells upon treatment with sense and antisense c-myc-DOTAP virosomes. Addition of 25, 50 or 100 μ l of virosome

5 solution containing 18, 36, or 72 pmol OPT, respectively. Values are the means $\pm$ standard deviations of three experiments.

Fig. 18: Cell growth of CEM-C3 cells upon treatment with DOTAP-virosomes at the addition of 50 μ l of sense and antisense c-myc virosome solution. Values are the means $\pm$ standard deviations of three experiments.

10 Fig. 19: Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of human, transformed primary embryonal kidney cell line 293 T were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

Fig. 20: Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid.

15 5×10^5 cells of monkey fibroblast cell line COS-1 were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

Fig. 21: Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid.

5×10^5 cells of human epithelioid carcinoma cell line HeLa were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

20 Fig. 22: Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^4 cells of mouse fibroblast cell line NIH3T3 were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

25 Fig. 23: Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of human chronic myelogenous leukemia cell line K562 were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

Fig. 24: Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid.

30 5×10^5 cells of mouse myeloma cell line P3 were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

094487-100899
668087-2284460

Fig. 25: Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of human epithelioid carcinoma cell line HeLa were transfected with DOSPER-virosomes and DOTAP-virosomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

- 5 Fig. 26: Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of human chronic myelogenous leukemia cell line K562 were transfected with DOSPER-virosomes and DOTAP-virosomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

10 DETAILED DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS

The lipid composition of the vesicle membrane comprises cationic and/or polycationic lipids together with phosphatidylethanolamine and optionally other phospholipids such as phosphatidylcholine.

- 15 For most cases, it is advantageous to choose a lipid composition of the membrane comprising - based on total lipids - 10% by weight or less, preferably 1-10%, of phosphatidylethanolamine together with 90% by weight or more, preferably 90-99%, of other lipids including the cationic and/or polycationic lipids, and optionally
20 further including phosphatidylcholine. If present, phosphatidylcholine should be present in an amount of, for example, 5-50% by weight, based on total lipids.

- The presence of phosphatidylethanolamine (PE) in the membrane is preferred for anchoring a cell-specific marker to the virosome by means of a bifunctional
25 crosslinker. Where cell-specific targeting of the virosomes is not required (e.g., for application in defined cell cultures *in vitro*) or where the cell-specific marker is attached to the membrane other than by way of a bifunctional crosslinker, PE may optionally be absent from the virosome membrane.

- 30 In a preferred embodiment, the present invention also relates to the irreversible covalent linkage of cell-specific markers to the cationic virosomes including but not being limited to monoclonal antibodies, antibody fragments such as F(ab')_2 and Fab' fragments, cytokines, and/or growth factors, useful for a selective detection

and binding of target cells. They are linked to the vesicle membrane such that they extend to the exterior and exert essentially full functional activity with respect to receptor detection and binding.

- 5 Coupling cell-specific markers such as antibody fragments to preformed vesicles as described by, e.g., Martin et al. (J. Biol. Chem. 257: 286-288, 1982) often leads to low and frequently irreproducible coupling yields - a complication that imposes a significant limitation to the targeting strategy. Therefore, according to a preferred embodiment of the present invention the markers are coupled to preformed
- 10 phosphatidylethanolamine-crosslinker molecules such as, for example, N-[4-(p-maleimido-phenyl)butyryl]-phosphatidylethanolamine (MPB.PE) in the presence of a detergent.

- 15 In order to achieve the best possible results it is advantageous to carefully isolate and purify the viral glycoproteins before reconstitution in order to avoid inactivation by either proteolytic digestion or reduction of intramolecular S-S bonds. Accordingly, it is preferred that the conjugated markers, e.g., marker-MPB.PE, be separated from unconjugated phosphatidylethanolamine-crosslinker molecules (e.g., MPB.PE) by affinity chromatography with an activated agarose matrix,
- 20 preferably with reduced Thioethyl Sepharose 6B. Aliquots of the purified conjugated markers (phosphatidylethanolamine-crosslinker-marker molecule complexes) are then added to the detergent solution containing the mixture of dissolved membrane lipids, fusion peptides and other desired ingredients, before the cationic virosomes are formed thereof.

- 25 It is advantageous to carry out the coupling procedure of the bifunctional crosslinker with the phospholipid and the cell-specific marker in a separate process prior to the preparation of the virosomes. This procedure allows to better control and optimize the surface density of the virosome membranes, particularly
- 30 with respect to the number of cell-specific markers linked thereto. The improved control of the concentration of protein molecules embedded in or linked to the membrane is important in as much as an unbalanced ratio of fusion peptides (e.g., hemagglutinin) and cell-specific markers (e.g., antibody Fab' fragments) on the

668007-2484460

virosome membrane may reduce or even destroy their selective properties and -
at the extreme - may result in clotting and precipitation of the vesicles.

The use of antibody fragments $F(ab')_2$ and Fab' instead of whole antibody
5 molecules as cell-specific markers is particularly advantageous, because they are
far less immunogenic than the whole antibody. Also, the absence of the Fc
domain eliminates a range of undesired Fc -mediated biological and immunological
activities such as, for example, complement activation via the classical pathway
and acute humoral responses eventually resulting-amongst others - in the
10 clearance of attached virosomes from the target cell surface via interaction
between the antibody and its Fc -receptor on the target cell.

Unlike known liposomal compositions for delivery of nucleic acids, the present
cationic virosomes usually need not fuse with or destabilize the plasma cell
15 membrane to enter the cytoplasm. They are capable of entering the host cells via
a two step mechanism: 1. attachment and 2. penetration. In the first step they
bind via the fusion peptides (e.g. hemagglutinin) and/or the cell-specific markers to
cell receptors, particularly to membrane glycoproteins or glycolipids with a terminal
sialic acid, and are then very efficiently incorporated by receptor-mediated
20 endocytosis. In case of virosomes bearing cell-specific markers, e.g., antibody
fragments, these markers will additionally recognize antigenic structures on the
target cell surface, resulting in an attachment by two different binding
mechanisms. Thus, the present cell-specific virosomes exert a selectivity for
various cell types owing to their cell-specific markers on the membrane and,
25 simultaneously, a high capability for cell penetration by endocytosis owing to the
viral fusion peptide, e.g., hemagglutinin. Virosomes with Fab' fragments that
recognize tumor-associated antigens such as TAG72, CEA, 17-1A, CA 19-9 or
leukemia-associated antigens such as CD10 (CALLA = Common Acute
Lymphocytic Leukemia Antigen) and CD20 will bind selectively to tumor or
30 leukemia cells carrying the mentioned antigens on their cell surface.

In the second step, when entering the host cells via receptor-mediated
endocytosis the virosomes get entrapped in endosomes. Subsequently, the pH

66800F 2284460

within the endosomes decreases to about pH 5 - 6, which activates the hemagglutinin fusion peptide and triggers the fusion of the virosomal membrane with the endosomal membrane. The membrane fusion reaction opens the lipid envelope of the virosomes and liberates the entrapped genetic material into the
 5 cytosol. This mechanism considerably improves the chances of the transferred genetic material to reach the nucleus before getting cleared by digestive degradation and/or exocytosis.

An objective of the present invention is to provide positively charged lipid vesicles
 10 comprising cationic or polycationic lipids and an internal - usually aqueous - space, and further comprising at least one viral fusion peptide embedded or integrated in or covalently linked to the vesicle membrane. The vesicle preferably also comprises at least one cell-specific marker on the membrane. It is a further
 15 object of the present invention to provide vesicles having full biological fusion activity, i.e., having essentially the same fusion activity as intact influenza virus. The fusion peptide is a viral-glycoprotein such as hemagglutinin or a derivative thereof, or a synthetic fusion peptide being capable of inducing a rapid fusion of said vesicles with the endosomal membranes of the target cells after endocytosis.

20 The novel vesicles or virosomes are particularly useful to transfer any desired genetic material to target locations, in particular to animal and human cells and tissues *in vitro* and *in vivo*. It is emphasized that the novel virosomes are not only able to penetrate proliferating, i.e., replicating cells but also non-proliferating, i.e.,
 resting cells, which feature makes them widely applicable in the fields of
 25 biosciences, pharmacology and medicine, both as a research and/or diagnostic tool and as a medicament. For the use as a medicament, the present virosomes may be part of a pharmaceutical composition which further comprises usual additives and pharmaceutically suitable carriers. It is preferred that the pharmaceutical composition is prepared as an injection solution, but other forms of
 30 preparation, e.g., emulsions, cremes, gels, ointments, for topical or systemic administration may be advantageous for some applications.

665007 22847460

Therefore, it is also an objective of the present invention to use the present virosomes for the manufacture of a pharmaceutical composition suitable for the prophylactic and/or therapeutic treatment of animal or human individuals who may benefit from such treatment. It is another objective of the present invention to use
 5 the present virosomes for the manufacture of a diagnostic kit for *in vitro* and *in vivo* applications.

In one embodiment the present vesicles are obtained by a process comprising an efficient reconstitution of hemagglutinin (HA) of influenza virus A. Accordingly, it is
 10 also an object of the present invention to teach a method of preparing cationic virosomes. In a preferred embodiment, the method further comprises the steps of incorporating genetic material into the cationic lipid vesicles. Basically, the method of preparation comprises the following steps:

- 15 1) Dissolution of the cationic lipids in a non-ionic detergent, preferably octaethyleneglycol mono-n-dodecylether (OEG, C₁₂E₈), together with - preferably purified - viral spike glycoproteins, genetic material desired or delivery and optionally preformed complex molecules made of phosphatidylethanolamine, crosslinker and cell-specific marker; and
- 20 2) vesicle formation through - preferably repeated - detergent removal with detergent absorbing micro-carrier beads, preferably polystyrene beads of the SM-2 Biobeads type with a preferred mesh size (wet) of 20-50 (0-84 - 0.30 mm).

25 In a preferred embodiment of the invention, a suitable bifunctional crosslinker is applied to link the cell-specific marker irreversibly to the vesicle membrane. The cell-specific marker, which is directed to a cell-receptor responsible for the selective binding of the virosome to the cell, is bound to the crosslinker in such a manner that it is still fully biologically active. It is preferred that the crosslinker be
 30 employed in the form of a preformed molecule-complex wherein the crosslinker is covalently bound to either phosphatidylethanolamine or to both phosphatidylethanolamine and a cell-specific marker.

666007-2284460

5

10

15

30

094420Z FEB 68

penetration mechanism as the Influenza hemagglutinin. Candidate hemagglutinins include, for example, rhabdovirus, parainfluenza virus type III, Semliki Forest virus and togavirus, as disclosed in U.S. Serial No. 07/930,593 (assignee: NIKA HEALTH PRODUCTS LTD.), incorporated herein by reference.

5

The term "crosslinker" refers to an organic heterobifunctional molecule capable of linking to the surface of vesicles prepared according to this invention and capable of binding polypeptides. In a preferred embodiment of the present invention, this molecule contains a N-hydroxysuccinimide group for coupling to the amino group

10

of phosphatidylethanolamine and a maleimide group for conjugation of monoclonal antibody fragments, such as succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate, m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimide ester, succinimidyl

15

4(p-maleimidophenyl)-butyrate, sulfosuccinimidyl 4(p-maleimidophenyl)butyrate; or it contains a N-hydroxysuccinimide group and a photoreactive azido group for coupling to cytokines, such as N-hydroxysuccinimidylsuberate (NHS-SA), N-hydroxysuccinimidyl-4-azidobenzoate (HASAB), N-succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate (SANPAH), N-sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2-nitrophenylamino)hexanoate.

094487:1089
6680072284760

7650

Table 1:

CCCGLFG	AIAGFIENGWEGMIDG	WYG
GLFG	AIAGFIENGWEGMIDG	WYGCCC
CCCGLFG	AIAGFIENGWEGMIDG	
GLFG	AIAGFIENGWEGMIDG	CCC
CCCGLFE	AIAGFIENGWEGMIDG	
GLFE	AIAGFIENGWEGMIDG	CCC
CCCELFG	AIAGFIENGWEGMIDG	
ELFG	AIAGFIENGWEGMIDG	CCC
CCCLFG	AIAGFIENGWEGMIDG	
LFG	AIAGFIENGWEGMIDG	CCC
CCC	PFGAVIGTIALGVATAAGIT	
	PFGAVIGTIALGVATAAGIT	CCC
CCC	PAGVVIGLAALGVATAAGVT	
	PAGVVIGLAALGVATAAGVT	CCC
CCC	PIGAIIGGVALGVATAAGIT	
	PIGAIIGGVALGVATAAGIT	CCC

It is preferred that the crosslinker be used in the form of a preformed molecule complex of crosslinker and lipid, notably of crosslinker and phosphatidylethanolamine, or of lipid plus crosslinker plus cell-specific marker.

5

The term "cell-specific" protein or marker refers to a protein capable of linking to the crosslinker or crosslinker-lipid complex, respectively, and further being capable of binding to the receptor of target cells. In a preferred embodiment of the present invention, this molecule refers to a cell receptor-specific compound such as a

10

monoclonal antibody, an antibody fragment, a cytokine or a growth factor. The cell-specific marker provides for selective detection and binding of target cells and thus improves the action of the fusion peptide concomitantly present in the

668067-22847460

virosomal membrane. The preferred antibody fragments comprise the F(ab')₂ and Fab' fragments, while the cell-specific markers further comprise interleukins and other cytokines, particularly the ones listed in Table 2 below.

5 Table 2

Cytokines (International abbreviations)			
BDNF	IFN α	MIP-1 α	PDGF
CNTF	IFN β	MIP-1 β	PF-4
EGF	IFN γ	MIP-2	RANTES
Epo	IL-1 to IL-15	NGF	SCF
FGF	LIF	NT-3	TGF α
G-CSF	LT (TNF β)	NT-4	TGF β
GM-CSF	MCP-1 to MCP-3	OSM	TNF α
1-309/TCA-3	M-CSF	PBP	Tpo
γ IP-10	MIF	PBSF	VEGF

10 The term "cationic lipid" as used herein refers to an organic molecule that contains a cationic component and a nonpolar tail, a so-called head-to-tail amphiphile, such as N-[(1,2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA) (Felgner et al.; Proc Natl Acad USA 84:7413-7417, 1987), N-[(1,2,3-dioleoyloxy)-propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethanesulfate (DOTAP); or N-4-butyl-N'-tetradecyl-3-tetradecylaminopropionamidinium (Ruysschaert et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 203:1622-1628, 1994). Unless explicitly mentioned otherwise, the term also includes the below defined polycationic lipids.

15

The term "polycationic lipid" refers to an organic molecule that contains a polycationic component and a nonpolar tail such as the lipospermine: 1,3-dipalmitoyl-2-phosphatidylethanolamido-spermine (DPPEs) and dioctadecylamidoglycyl spermine (DOGS) (Behr et al. ; Proc. Natl. Acad. USA 20 86:6982-6988, 1989); 2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminecarboxamido) ethyl]-N,N-dimethyl-1-propaneaminium trifluoroacetate (DOSPA); 1,3-dioleoyloxy-2-(6-

668007-22847460

78 57

carboxy-spermyl)-propylamide (DOSPER); N,N,N',N'-tetramethyl-N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2,3-dioleoyloxy-1,4-butanediammonium iodide (THDOB).

The lipids preferably comprise one or more natural or synthetic lipids that are positively charged. By "positively charged" is meant that the lipids have a positive net charge at physiological pH. Thus, "positively charged" lipids, membranes or virosomes shall mean lipids, membranes or virosomes that have a positive net charge at physiological pH. It is not intended to include neutral lipids, e.g., phospholipids of the zwitterionic-type, which have positively charged areas within the molecule but which do not exhibit any net charge at physiological pH due to the presence of negatively charged parts of the molecule which stoichiometrically offset the positive charges.

The terms "nucleic acid" or "genetic material" as used herein comprise short chain DNA or RNA, deoxyribonucleotides, oligodeoxyribonucleotides, oligodeoxyribonucleotide selenoates, oligodeoxyribonucleotide phosphorothioates (OPTs), oligodeoxyribonucleotide phosphoramidates, oligodeoxyribonucleotide methylphosphonates, peptide nucleic acids (PNAs), ribonucleotides, oligoribonucleotides, oligoribonucleotide phosphorothioates, 2'-Ome-oligoribonucleotide phosphates, 2'-Ome-oligoribonucleotide phosphorothioates, ribozymes (RNA molecules with enzymatic activities), genes, plasmids and vectors (cloning vehicles).

The term "virosomes" as used herein refers - in its simplest form - to liposomal vesicles with a bilayer membrane comprising cationic lipids and an internal - preferably aqueous - space, wherein the membrane further contains viral proteins, in particular viral glycoproteins. In the preferred embodiment, the viral proteins comprise at least one fusogenic peptide or protein having full biological fusion activity, particularly the spike glycoprotein hemagglutinin and/or neuraminidase of Influenza A (e.g., A/Singapore) virus. It shall be understood that the viral proteins also encompass synthetically produced amino acid sequences corresponding to or equal to the fusion peptide of influenza virus as herein described. The membrane lipids comprise the cationic lipids defined above but may optionally further

668007-2284460

comprise other natural and/or synthetic lipids, preferably phospholipids such as phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE).

5 Although the cationic virosomes of the present invention may in many cases -
notably for *in vitro* cell culture experiments - successfully be applied without
cell-specific markers on the membrane, it is particularly preferred for *in vivo*
applications that they further comprise at least one cell-specific marker on the
membrane as hereinbefore defined. The mean diameter of the vesicles is in the
10 range of 120 - 180 nm, as determined by electron microscopy and dynamic light
scattering.

The term "full (biological) fusion activity" as used herein shall express that the
virosomes of the present invention comprising reconstituted viral proteins in the
vesicle membrane have essentially the same fusion activity towards target cells as
15 the intact virus from which they are usually reconstituted. Preferably, the
comparison of the cationic virosomes, fusogenicity is drawn to intact influenza A
virus. The fusion activity is measured according to known procedures, particularly
as reported by Hoekstra et al. (Biochemistry 23:5675-5681, 1984), or Luscher et al.
(Arch. Virol. 130:317-326, 1993).

20 Before antisense technology can therapeutically or prophylactically be applied to a
patient in need thereof a number of technical problems, particularly relating to the
development of a suitable carrier system, need be resolved beforehand. For
instance, genetic material such as, e.g., antisense oligonucleotides, can be
25 unstable and break down or be otherwise more or less inactivated before it
reaches the target cells and it may thus be necessary to use large quantities of
such material entrapped in conventional cationic liposomes. Due to these large
amounts a question arises about the potential toxicity in the human or animal
body.

30 By using the cationic virosomes of the present invention as carriers for genetic
material these problems can be successfully overcome and undesired side effects
due to toxicity can be prevented or at least considerably decreased. This

66800F 22847460

8084

beneficial effect is achieved because the present cationic virosomes have -
compared to liposomes or virosomes known hitherto - a far higher activity and
efficiency of up to a factor of 1,000-20,000 for the transfer of entrapped genetic
material such as antisense oligonucleotides into target cells. As a consequence, it
is practically impossible to compare the performance of conventional virosomes or
cationic liposomes with the performance of the present cationic virosomes.
In order that the invention described herein may be more fully understood, the
following examples are set forth. The examples are for illustrative purposes only
and are not to be construed as limiting this invention in any respect.

Example 1

Preparation of a cationic lipid vesicle with fully fuson active viral hemagglutinin
trimers from Influenza virus containing encapsulated antisense L-myc-FITC (=
fluorescein labeled)-oligodeoxynucleotides.

*Preparation of DOTAP virosomes and DOTAP-Phosphatidylcholine (PC)-
virosomes*

Hemagglutinin (HA) from the A/Singapore/6/86 strain of Influenza virus was
isolated as described by Skehel and Schild (1971), Proc. Natl. Acad. Sci. USA
79:968-972. In short, virus was grown in the allantoic cavity of hen eggs, and was
purified twice by ultracentrifugation in a sucrose gradient. Purified virus was
stabilized in a buffer containing 7.9 mg/ml NaCl, 4.4 mg/ml trisodiumcitrate-2H₂O,
2.1 mg/ml 2-morpholinoethane sulfonic acid, and 1.2 mg/ml N-hydroxyethyl-
piperazine-N'-2-ethane sulfonic acid pH 7.3. 53 ml of the virus suspension
containing 345 µg HA per ml were pelleted by ultracentrifugation at 100,000 x g
for 10 minutes. 7.7 ml of a buffered detergent solution containing 145 mM NaCl,
2.5 mM HEPES and 54 mg/ml of the non-ionic detergent octaethyleneglycol
monododecylether (OEG = C₁₂E₈), pH 7.4, were added to the Influenza virus
pellet. The pellet was completely dissolved by using ultrasonication for 2 minutes
at room temperature. The solution was subjected to ultracentrifugation at 100,000
x g for 1 hour. The obtained supernatant contained the solubilized HA trimer
(1.635 mg HA/ml) and trace amounts of neuraminidase. 6 mg of DOTAP were

668007-2287165

8185

added to 3.7 ml of supernatant (6 mg HA) and dissolved. The solution was sterilized by passage through a 0.2 µm filter and then transferred to a glass container containing 1.15 g of sterile microcarrier beads, preferably Biobeads SM-2. The container was shaken for 1 hour by using a shaker REAX2 from
 5 Heidolph (Kelheim, Germany). When necessary, this procedure was repeated up to three times with 0.58 mg of Biobeads. After these procedures a slightly transparent solution of DOTAP virosomes was obtained.

For the production of DOTAP-PC virosomes 3 mg of DOTAP and 3 mg of PC
 10 were added to the supernatant containing 6 mg HA, and dissolved. The subsequent steps were the same as described for the DOTAP virosomes.

Preparation of virosomes with synthetic fusion peptide

- 15 One possibility of preparing cationic virosomes carrying synthetic fusion peptides in the membrane comprises the following steps:
1. Activation of phosphatidylethanolamine (PE) by the crosslinker N-[γ-maleimidobutyryloxy]succinimide ester (GMBS) in a reaction

$$PE + GMBS \rightarrow MBS-PE + N-Hydroxysuccinimid,$$

 20 as described by Martin et al., Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles; J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982).
 2. Preparation of lipid vesicles with activated PE (GMB-PE), wherein 20% Phosphatidylcholine, 70 % DOTAP and 10% GMB-PE are dissolved in a
 25 buffered detergent solution as described above for the HA containing DOTAP virosomes. The subsequent steps of preparing the lipid vesicles are the same as described above for the DOTAP virosomes.
 3. Coupling of the synthetic fusion peptide to the lipid vesicles, wherein a
 30 peptide comprising 20 amino acids is used having the amino acid sequence G-L-F-E-A-I-A-G-F-I-E-N-G-W-E-G-M-I-D-C, and which contains a free amino group at the N-terminus and an amide group at the C-terminus. Since the amino acid at the C-terminus is cysteine, there is a free thiol group available for

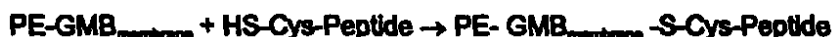
668007-2281160

82 56

the coupling of the peptide to the GMP-PE in the membrane of the lipid vesicles.

For carrying out the coupling reaction:

5



a solution of freshly prepared lipid vesicles in a buffer (40 mM citric acid, 35 mM disodium phosphate, 100 mM NaCl, and 2 mM EDTA, pH 5.5) is mixed with the peptide solution in the same buffer. The mixture is gently stirred under nitrogen atmosphere overnight at 4°C. Lipid vesicles are separated from unconjugated peptides by gel filtration on a High Load Superdex 200 column.

10

As an alternative, the fusion peptides may also be coupled to the lipid vesicles by means of preformed PE-crosslinker-peptide complexes as described below in this example for the Fab' fragments.

15

Incorporation of phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides into DOTAP virosomes

20 The antisense and sense oligodeoxyribonucleotide phosphorothioates (OPTs) of the L-myc gene were used as an example for the demonstration of the high efficiency of cationic virosomes in transfection. 5'-FITC-OPTs were synthesized via phosphoramidite chemistry (Microsynth GmbH, Balgach, Switzerland). The pentadecamer (5'-FITC-GTAGTCCATGTCCGC-3') and the pentadecamer (5'-FITC-GCGGACATGGACTAC-3') were used as the antisense OPT and sense OPT, respectively. A mixed sequence control (msc) OPT consisting of the same length of nucleotides as antisense and sense OPTs was synthesized.

25

1 ml of DOTAP virosomes or DOTAP-PC virosomes was added to each of

30

- a) 2 mg of antisense FITC-OPT (1.3 µmol)
- b) 3.4 mg sense FITC-OPT (1.3 µmol) and
- c) 3.1 mg msc FITC-OPT (1.3 µmol).

09414872-100899

The FITC-OPTs were dissolved and the solutions were then treated by sonication for 2 minutes at 26°C. Non-encapsulated FITC-OPTs were separated from the virosomes by gel filtration on a High Load Superdex 200 column (Pharmacia, Sweden). The column was equilibrated with sterile PBS. The void volume fractions containing the DOTAP virosomes with encapsulated FITC-OPT were eluted with PBS and collected. Virosome-entrapped FITC-OPT concentrations were determined fluorometrically after the virosomes were fully dissolved in 0.1 M NaOH containing 0.1 % (v/v) Triton X-100. For calibration of the fluorescence scale the fluorescence of empty DOTAP-virosomes that were dissolved in the above detergent solution was set to zero.

Coupling of Fab'-fragments to virosomes by means of preformed phosphatidylethanolamine-bifunctional crosslinker molecule complexes

3 mg of freshly reduced Fab' from murine monoclonal anti-CD10- (AntiCALLA) antibody, dissolved in 2.8 ml of a citric acid buffer solution (100 mM NaCl, 40 mM citric acid, 35 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 2 mM EDTA, pH 5.5) were added to a solution of 0.524 mg of N-[4-(p-maleimido-phenyl)butyryl] phosphatidylethanolamine (MPB.PE) in 215 µl of citric acid buffer containing 0.5% of n-octyl-oligo-oxyethylene. The mixture was then incubated under nitrogen for 16 h at 4°C with gentle stirring. After incubation the non-coupled MPB.PE was removed by a batch of 400 µl of freshly reduced wet Thiopropyl Sepharose 6B (Pharmacia, Sweden). The mixture was incubated for 4 h at room temperature. The Thiopropyl Sepharose 6B was removed by centrifugation and the resulting solution neutralized to pH 7.0. The neutralized solution was supplemented with OEG (54 mg/ml).

The solutions prepared as described above were added to the solutions for the preparation of DOTAP virosomes. The Fab'-MPB.PE molecules are inserted into the lipid bilayer during the formation of virosomes.

66800F, 2284460

84 98

Electron Microscopy Observations

Micrographs of DOTAP virosomes confirm the preferred unilamellar structure of the vesicles with an average diameter of approximately 120 to 180 nm as determined by laser light scattering. The HA protein spikes of the influenza virus are clearly visible (Fig. 1).

Determination of the Fusion Activity of DOTAP Virosomes

The fusion activity of the present DOTAP virosomes was measured by the quantitative assay based on fluorescence dequenching described by Hoekstra et al. (1984), *Biochemistry* 23:5675-5681 and L. Lüscher et al. (1993), *Arch. Virol.* 130:317-326. The fluorescent probe octadecyl rhodamine B chloride (R18) (obtained from Molecular Probes Inc., Eugene, USA) was inserted at high densities into the membrane of DOTAP virosomes by adding the buffered OEG (C₁₂E₈) solution containing DOTAP and HA to a thin dry film of the fluorescent probe, followed by shaking for 5 to 10 minutes for dissolving the probe, then continuing as described above under "Preparation of a cationic lipid vesicle...". Dilution of the quenching rhodamine was observed by incubation of the rhodamine-labeled DOTAP virosomes with model liposomes (ratio of DOTAP: liposomal phospholipid = 1:20). The fluorescence was measured by a Perkin-Elmer 1000 spectrofluorimeter at 560 and 590 nm excitation and emission wavelengths, respectively. Fig. 2 shows the pH-induced fusion reaction of DOTAP virosomes expressed as percent of fluorescence dequenching (% FDQ).

Cellular uptake of encapsulated Antisense-L-myc-FITC-OPT

It proved very useful to label the OPT with fluorescein to study the mechanism of cellular uptake of DOTAP virosomes.

Human small cell lung cancer cells (ATCC-NCI-H209) which express high levels of L-myc gene (Nau et al. 1985; *Nature* 318, 69-73) were grown in 2-well tissue culture chamber slides (Nunc, Naperville, IL 60566, USA). 50 µl of FITC-OPT-virosomes were added to the cells. They were incubated for 5, 15, and 30 min at 37°C, washed twice with PBS and then examined by fluorescence

668007-22847460

85 39

microscopy. DOTAP virosomes with encapsulated antisense FITC-OPT were rapidly incorporated into the cells as can be seen in Fig. 3.

Examination of the biological effect of Antisense-L-myc-FITC-OPT-DOTAP

virosomes measured by the thymidine incorporation method

- Human small cell lung cancer cells (ATCC-NCI-H209 American Type Culture Collection, Rockville, USA) were cultured in 24-well Costar plates at an initial concentration of 1×10^5 per well and per ml. After an incubation of 24 hours, medium was removed and 625 μ l of fresh medium containing 0.5 μ Ci 14 C-thymidine (prepared from (2- 14 Cl thymidine, 52.0 mCi/mmol; Amersham, England) and 75 μ l of DOTAP virosomes containing 0.2 nmol of either antisense, sense, or msc FITC-OPTs were added. The cultures were gently shaken at very slow agitation for 1 hr at 37°C and then transferred to the incubator. After 48 hours the cell suspensions were removed, transferred to centrifuge vials, and centrifuged. Obtained cell pellets were washed twice. When the cells could not sufficiently be dispersed into a single cell suspension, they were exposed briefly to a trypsin/EDTA solution. Cell pellets were dissolved in 1.5 ml of 0.1 M NaOH/Triton-X-100 (0.1%) solution. 3 ml of liquid scintillation cocktail (Ready Protein +, Beckman, Fullerton, CA, USA) were added to 1 ml of solution. 14 C-radioactivity was counted in a liquid scintillation counter (Beckman, Fullerton, CA, USA).

Figures 4 and 5 clearly demonstrate the extraordinary uptake and transfection efficiency of antisense-L-myc-DOTAP virosomes.

- Fig. 6 demonstrates that cells that do not express L-myc are not influenced or inhibited by the antisense-L-myc virosomes. Also, empty virosomes did not show any effects on cancer cells and normal cells. It appears therefore that an anti-cancer therapy with antisense OPT encapsulated in the present virosomes may have a great potential, particularly because of their lack of the hereinbefore mentioned disadvantages of conventional cationic liposomes.

668007-22847460

86 40

Example 2

Preparation of a cationic lipid vesicle with fully fusion active viral hemagglutinin trimers from influenza virus containing the encapsulated vector pcDNA3 with human IL-6 gene cloned into the polylinker site

5 (= pcDNA3-IL-6)

Preparation of DOTAP virosomes and incorporation of pcDNA3-IL-6

pcDNA3 (Invitrogen Corporation, San Diego, USA) is a 5.4 kb vector designed for high-level stable and transient expression in eukaryotic hosts. HA was isolated and purified as described in Example 1.

10

4 mg of DOTAP were dissolved in 0.5 ml of the buffered detergent solution containing 145 mM NaCl, 2.5 mM HEPES and 54 mg/ml of OEG (= C₁₂E₈), pH 7.4, and added to 2 ml of supernatant containing 4 mg HA. To the resulting mixture 100 µg of pcDNA3-IL-6 were added and dissolved. The solution was subjected to ultrasonication for 30 seconds. OEG was removed by Biobeads as described in Example 1.

15

Transfection of DOTAP virosomes loaded with pcDNA-IL-6 into murine myeloma cells

20 The obtained solution comprising the pcDNA-IL-6 loaded DOTAP virosomes was diluted 1:1000 with PBS. 20 µl and 50 µl of this solution containing 1 ng and 2.5 ng pcDNA-IL-6, respectively, were added to 2 x 10⁶ myeloma cells (P3/NS1/1-Ag4-1; American Type Culture Collection, Rockville, USA). After 48 h incubation the supernatants of the cell cultures were tested for human IL-6 by an ELISA assay. A content of 20 to 45 pg IL-6 per ml was measured.

25

Comparison of transfection efficiency of pcDNA-IL-6 loaded DOTAP virosomes with pcDNA-IL-6 loaded DOTAP liposomes

No IL-6 was found in myeloma cell cultures transfected with conventional DOTAP liposomes (which are devoid of viral fusion peptides) containing the same amount of pcDNA-IL-6 as the DOTAP virosomes. In order to obtain the same transfection results as with the pcDNA-IL-6 loaded DOTAP virosomes it was necessary to

30

66800F E26hF160

87-27

Increase the amount of the pcDNA-IL-6 loaded DOTAP liposomes by a factor of one thousand 1000.

- 5 **Example 3:** Preparation of a cationic lipid vesicle with fully fusion active viral hemagglutinin trimers from influenza virus containing the encapsulated vector pRSVcat

Preparation of DOTAP virosomes and incorporation of pRSVcat

- 10 The expression vector pRSVcat (from ATCC, Rockville, USA) contains the CAT gene which codes for the chloramphenicol acetyltransferase (CAT).

The enzyme catalyzes the transfer of an acetyl group from acetyl-CoA to the 3'-hydroxy position of chloramphenicol. CAT vectors are useful for monitoring transfection efficiency in general.

- 15 pRSVcat was encapsulated into DOTAP virosomes under the conditions described in Example 2.

Transfection of DOTAP virosomes loaded with pRSVcat into Jurkat cells

- 20 Jurkat cells (10^6 cells/ml) were incubated with different amounts of pRSVcat-loaded DOTAP virosomes (0.0001 μ l - 25 μ l). After 48 hours incubation at 37°C the CAT activity in the Jurkat cells was measured by the CAT-ELISA assay (Boehringer Mannheim, Germany).

- 25 Figures 7a and 7b demonstrate that a maximum transfection is achieved by addition of 0.01 μ l of DOTAP virosomes. Contrary to the aforementioned, the addition of 0.01 μ l of pRSVcat-loaded DOTAP liposomes to Jurkat cells under the same incubation conditions did not result in any detectable CAT activity.

Example 4: Uptake of virosomes by cells

- 30 Entry of virosomes into target cells can be divided into two distinct steps:
1. Attachment
2. Penetration.

Attachment involves binding of the virosomes via HA to the cell receptors which are membrane glycoproteins or glycolipids with a terminal sialic acid. In case of

668007-2284460

28 97

specific virosomes Fab' fragments will additionally recognize antigenic structures on the target cell surface, resulting in an attachment to target cells by two different binding mechanisms. Thus, specific virosomes exert a selectivity for special cell types. Virosomes with Fab' fragments that recognize tumor associated antigens such as TAG72, CEA, 17- 1A, CA19-9 or leukemia associated antigens such as CD10 (CALLA) and CD20 will bind selectively to tumor or leukemia cells carrying the mentioned antigens on their cell surface. The hemagglutinin glycoproteins are carefully isolated and purified. There is no inactivation either by proteolytic digestion or by reduction of its intramolecular disulfide (-S-S-) bonds.

10

Penetration involves entry of virosomes into the cells by receptor-mediated endocytosis. The virosomes get trapped in endosomes. The acidic pH (5-6) within the endosomes triggers fusion of the virosomal membrane with the endosomal membrane. The fusion is mediated by the viral spike glycoprotein hemagglutinin (HA). The membrane fusion reaction in the endosome liberates the virosome from its lipid envelope and provides access for the encapsulated drugs to the cytosol. Fusion activity of these virosome-preparations were tested by fluorescence dequenching. Virosomes were labeled with the fluorescent probe octadecyl rhodamine B (R18) and the fusion activity of HA was monitored as fluorescence dequenching due to the dilution of the probe from the virosomal into a liposomal target membrane. Fig. 8 shows the fluorescence observed upon addition of DOTAP-virosomes, labeled with R18, to phospholipid-liposomes. The fluorescence started to increase rapidly indicating an intact HA mediated fusion.

25 Time dependent uptake by cells

The uptake of virosomes was measured by incubation of cells with ¹⁴C-labeled virosomes. P3/NS1 cells at a concentration of 1×10^5 /ml were incubated with 40 μ l of virosomes at 37°C for 5, 10, 15, 20 and 30 minutes. After washing, the cells were lysed and the amount of ¹⁴C-label virosomes was measured. As can be seen in Table 3, the cellular uptake is very fast: During the first five minutes 10% of the virosomes were incorporated. Longer incubation times did not enhance the uptake any further. 1 ml of virosome solution contained approximately 10^{11} - 10^{12}

30

66800F-226hFh60

virosomes, hence 4,000 - 40,000 virosomes per cell were incorporated within 5 minutes.

Table 3

Incubation Time [min]	dpm
5	6414
10	6832
15	6096
20	6610
30	6626

Example 5: Antisense strategies in the treatment of cancers

5

So-called "antisense" oligodeoxynucleotides (ODN) are short nucleotide sequences of DNA synthesized as reverse complements of the desired mRNA target's nucleotide sequence. By formation of the RNA-DNA duplex translation of the message is prevented and the destruction of the molecule by RNase H is promoted. Delivery of ODN targeting oncogene-encoded mRNA to cancer cells may be associated with inhibition of cell proliferation and, in some circumstances, cell death.

10

Antisense ODN have a great potential as therapeutic agents. Many preclinical animal studies as well as clinical trials of Phases I-III have shown that antisense ODN directed against oncogenes and viral genes are therapeutically active.

15

Transfer of functional DNA molecules into cells by DNA-loaded liposomes or conventional virosomes is not very efficient. Therefore virosomes with a positively charged lipid bilayer (cationic) were developed for transfer of genetic material. The positively charged lipid bilayer interacts with nucleic acids and causes them to concentrate within the vesicles formed.

20

Antisense-L-myc-virosomes

The L-myc gene, first discovered in a small cell lung cancer (SCLC) cell line, is frequently amplified and overexpressed in SCLC. 5'-FITC-phosphorothioate oligodeoxynucleotides (OPT) were synthesized via phosphoramidite chemistry

25

09414872-108899

90 74

(Microsynth GmbH, Balgach, Switzerland). The pentadecamer (5'-FITC-GTAGTCCATGTCCGC-3') and the pentadecamer (5'-FITC-GCGGACATGGACTAC-3') were used as the antisense OPT and sense OPT, respectively. A mixed sequence control (msc) OPT consisting of the same length of nucleotides as antisense and sense OPT was synthesized. The antisense OPT covering the translational initiation site acts by inhibiting ribosomal translation of the target mRNA. Antisense-L-myc-phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides were encapsulated into the virosomes. The antiproliferative effect of virosome-encapsulated L-myc antisense DNA in the SCLC cell lines H209, H510, and H82 was evaluated. Antisense-L-myc virosomes were added to the cells of human small cell lung cancer cell lines. Sense-L-myc virosomes and msc (mixed sequence control)-virosomes were used as controls (Fig. 9).

Antisense-L-myc virosomes were 20,000-fold more active than non-encapsulated antisense OPT. To induce the same effects as seen in Fig. 10 concentrations of non-encapsulated L-myc-antisense OPT in the range of micromoles had to be added to the cell cultures. Hence, cationic virosomes are far more efficient in the delivery of ODN than the cellular uptake of nonencapsulated ODN and also more efficient than cationic liposomes.

The growth-inhibitory effect of antisense-L-myc virosomes correlated with levels of L-myc expression in the three SCLC cell lines, H209, H510, and H82. From Fig. 11 it was concluded that those cells that do not express the L-myc gene are not influenced by antisense-L-myc virosomes. Empty cationic virosomes did not show any or only minor effects on normal cells and cancer cells. Since the L-myc gene is frequently amplified and overexpressed in SCLC and very restricted and low-level expressed in human adult tissues, L-myc might be a good target for an antisense virosome therapy.

Example 6: Non-infectious transfer of plasmid-based vectors for gene therapy: transfection of vectors for mammalian expression by cationic virosomes

668007-2484460

9/95

Current approaches to cancer gene therapy use plasmid-based vectors to express suitable target genes in human cancer cells either *ex vivo* or *in vivo*. The following therapeutic gene targets are evaluated: Susceptibility genes such as herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) genes (Moolten FL; Cancer Res. 48:5276-5281, 1988); genes which target the immune system to eliminate cancer cells such as cytokine genes (Tepper RJ et al.; Cell 57:503-512, 1989), genes coding for costimulatory molecules (Townsend SE et al.; Science 259:368-370, 1993), foreign histocompatibility genes (Plautz GE et al.; Proc Natl Acad Sci USA 90: 4645-4649, 1993); and replacement of wild-type tumor suppressor genes such as p53 (Chen PL et al.; Science 250:1576-1580, 1990).

Because of certain limitations of currently used viral-based vectors for gene therapy such as, for instance, lack of specificity in targeting tumor cells for gene transfer, and because of safety concerns regarding the possible induction of secondary malignancies and the possibility of recombination to form replication competent virus, a non-infectious gene transfer technology for *in vivo* gene delivery of plasmid-based expression vectors needed to be developed. The use of the herein disclosed cationic virosomes is a promising alternative of a non-infectious, receptor-mediated gene transfer technology.

The typical transfection efficiencies by using commercially available lipids are between 5-50%. Not only provide virosomes higher transfection efficiency than commercially available liposomes but the entrapment of DNA into virosomes results also in stable transformation of cells.

Human interleukin 6 (IL-6) gene was cloned into the polylinker site of pcDNA3, a 5.4 kb vector designed for high-level stable and transient expression in eukaryotic hosts. The vector contains the neomycin resistance marker, expressed from the SV40 early promoter for the selection of stable transformants in the presence of G418.

668007-2284460

920.6
7.6

Encapsulation of the vector was performed by 3 different methods:

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
1. Dialysis: Plasmids were encapsulated during formation of virosomes. Detergent Octyl-POE (from Alexis Corp., Laeufelfingen, Switzerland) was removed by dialysis.
 2. Biobeads: Plasmids were encapsulated during formation of virosomes. Detergent OEG was removed by Biobeads.
 3. Ultrasonication: Plasmids were encapsulated by DOTAP and the obtained DOTAP-liposomes were fused with DOTAP-virosomes by ultrasonication.
- ¹⁴C-thymidine-labeled pcDNA3-clL-6-DNA was produced for measuring the amount of encapsulated plasmid.

Method of encapsulation	Amount of encapsulated plasmid
Dialysis (1)	0.02 µg DNA per µl of virosomes
Biobeads (2)	0.008 µg DNA per µl of virosomes
Ultrasonication (3)	0.04 µg DNA per µl of virosomes

Sp2/0-Ag14 cells (Hybrid, non-secreting, mouse; ID-No: ATCC CRL-1581; herein termed Sp2), P3/NSI/1-Ag4-1 cells (Non-secreting myeloma, mouse; ID-No: ATCC TIB-18; herein termed P3/NS1) and NIH/3T3 cells (Embryo, contract-Inhibited, NIH Swiss mouse; ID-No: ATCC CRL-1658) at a cell concentration of 1 x 10⁵ in 1 ml medium were transfected by the virosome preparations (1) - (3). Ten days after transfection the amounts of expressed IL-6 were measured by ELISA (Fig. 12, Fig. 13, Fig. 14). All cell lines are available from ATCC, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA.

Transfected Sp2 and P3/NS1 cells were selected twice by G418. After 2 months of culturing the production of IL-6 was measured again. The values are listed in Table 4.

Table 4: Production of IL-6 by transfected cells after re-selection with G41 8

93 97

Table 4: Production of IL-6 by transfected cells after re-selection with G418

Cell line		Method of preparation	Number of cells per ml	Total number of cells	IL-6 [pg/ml]	Total amount of IL-6 [pg]	IL-6 (pg/10 ⁶ cells)
P3/ NS1	Pellets of cells	Dialysis	1.2 x 10 ⁶	6.0 x 10 ⁶ 3 ml buffer	277	831	138
		Biobeads	1.6 x 10 ⁶	7.8 x 10 ⁶ 4 ml buffer	32	128	16
		Ultrasonication	1.54 x 10 ⁶	8.0 x 10 ⁶ 4 ml buffer	289	1156	144
P3/ NS1	Super-natant	Dialysis		5 ml supern.	8	40	6.7
		Biobeads		4.9 ml supern	4	20	2.5
		Ultrasonication		5.2 ml supern.	25	130	16.2
Sp2	Pellets of cells	Dialysis	2.25 x 10 ⁶	1.13 x 10 ⁷ 5.5 ml buffer	> 1200	> 6600	> 584
		Biobeads	1.8 x 10 ⁶	9.5 x 10 ⁶ in 4.5 ml buffer	232	1044	110
		Ultrasonication	2.8 x 10 ⁶	1.37 x 10 ⁷ 7 ml buffer	680	4760	347
Sp2	Super-natant	Dialysis		5 ml supern.	268	1340	119
		Biobeads		5.2 ml supern.	8	42	4.4
		Ultrasonication		4.9 ml supern.	651	3190	233

The volume of lysis buffer added to the cell pellets was adjusted so that a cell number of ca. 2 x 10⁶ per ml was obtained.

5 Example 7: Antisense strategies in the treatment of leukemias

The most common genetic abnormality in human leukemias is the Philadelphia Chromosome (Ph¹) translocation. The translocation of the protooncogene *abl*

from chromosome 9 to the breakpoint cluster region (bcr) on chromosome 22 results in the formation of bcr-abl hybrid genes. The abl protooncogene normally encodes a protein with tyrosine kinase activity which is augmented in cells carrying bcr-abl hybrid genes. The bcr-abl transcripts are found in the vast majority of chronic myelogenous leukemia (CML) patients and in Ph⁺ acute lymphocytic leukemia patients. The targeting of bcr-abl genes in CML is clearly the most rational therapeutic procedure. Synthetic ODN complementary to the junction of bcr-abl transcripts produced from the splicing of either the second or third exon of the bcr gene to the second exon of c-abl were shown to suppress Philadelphia 1 leukemic cell proliferation in vitro and to spare the growth of normal marrow progenitors (Szczalik C et al.; Science 253:562-565, 1991). However, the bcr-abl antisense therapy is restricted to CML patients.

Another molecular target for antisense therapy is the myb gene. Myb, the encoded product of the protooncogene c-myb, functions as a DNA binding specific transcription factor. It is preferentially expressed in hematopoietic cells and is required for hematopoietic cell proliferation. A 18-mer antisense ODN targeted to codons 2-7 of c-myb strongly inhibited or completely abolished clonogenic growth of a T-cell leukemia line (CCRF-CEM), as well as 76% of primary acute myelogenous leukemia cases examined, and 4 of 5 primary chronic myelogenous leukemia (CML) cases in blast crisis (Calabretta B et al.; Proc Natl Acad Sci USA 88:2351-2355, 1991).

Purging of bone marrow is used as a component in the treatment of several neoplasms, including acute and chronic leukemias. At present, marrow is cleansed of leukemic cells by a variety of agents such as immunologic reagents and chemotherapeutic drugs. Virosome encapsulated ODN targeted against one oncogene that confers a growth advantage to leukemic cells will prove therapeutically useful and, most important, more selective than conventional chemotherapeutic agents in eliminating leukemic cells while sparing normal progenitor cells.

668805F 22847460

95 99

Antisense-c-myb virosomes

Sense and antisense OPT corresponding to c-myb codons 2-9 were prepared.

The sense and antisense c-myb sequences were 5' -

GCCCCGAAGACCCCGGCAC-3' and 5'-TGTGCCGGGGTCTTCGGGC-3',

5 respectively. Encapsulation of OPT into DOTAP-virosomes was performed by the same method used for L-myc DOTAP virosomes. The human myeloid leukemia cell line KG-1 and the human acute lymphoblastic leukemia cell line CEM-C3 were exposed to sense and antisense c-myb virosomes. Proliferation of KG-1 cells is dependent on the protooncogene myb gene product, whereas CEM-C3 cells are
10 not dependent on the product of c-myb gene. KG-1 cells were incubated with 25, 50, and 100 µl of sense and antisense c-myb virosomes containing 18, 36, and 72 pmol of sense and antisense OPT, respectively. The number of cells was determined at days 2, 3 and 4.

15 Addition of 25 µl of sense and antisense c-myb virosomes had only marginal effects on the cell growth (Fig.15). However, addition of 50 µl (Fig. 16) and 100 µl (Fig. 17) strongly inhibited the cell growth. Higher doses of sense c-myb virosomes also showed inhibitory effects. It is assumed that these effects were not elicited by the virosomal membrane, because CEM-C3 cells were not
20 influenced by the same virosome preparations (Fig. 18).

Example 8: DOSPER-Virosomes: Reagent for the Transfection of Eukaryotic Cells; Transfection of ³H-labeled plasmid by DOSPER-Virosomes; a comparison of DOSPER-Virosomes to DOSPER-Liposomes

25 The plasmid pGEEN LANTERN™-I (GIBCOBRL) was produced in presence of ³H-methylthymidine. 33 µg of the labeled plasmid DNA were encapsulated into DOSPER-virosomes and 11.7 µg into DOSPER-liposomes.

30 The lipid bilayer of the DOSPER-virosomes consists of 25% of DOSPER and 75% of PC (phosphatidylcholine). It is impossible to produce DOSPER-virosomes with a 100% DOSPER bilayer. In particular, it has been found that if the concentration

66800F-2284460

96-100

of DOSPER in the reaction mixture is more than, for example, 30%, virosomes may not form.

5x10⁵ cells of each cell type were incubated in 500 µl of medium either with 25 µl of plasmid-containing DOSPER-virosomes or DOSPER-liposomes solution for 2, 4, 6 and 24 h at 37°C. The added aliquots of DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes corresponded to a radioactivity of 26,500 dpm. After incubation, cells were washed, lysed and the radioactivity measured. The influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid were evaluated with various cell lines, and the results are graphed in Figures 19-26. The Brief Description of the Figures above summarizes the cell lines in each of the Figures.

Figures 19-24 show clearly that DOSPER-virosomes are superior in transfection to DOSPER-liposomes for all cell types and for all incubation times. Longer incubation times of 6 and 24 h with DOSPER-liposomes only resulted in very minimal increases of DNA uptake, whereas longer incubation times with DOSPER-virosomes led to considerably higher DNA uptake. This result suggests that the HA-mediated uptake of virosomes is far more efficient than the uptake induced by DOSPER-liposomes without the help of any viral binding ligands to cell receptors. It is interesting that in the case of DOSPER-virosomes, incubation times of 6-24 h did not lead to a saturation of DNA incorporation but to a further increase of DNA uptake, an effect which may be due to a rapid replacement of membrane receptors after their removing by receptor-mediated endocytosis of the virosomes on the cell surface.

25

Example 9: A comparison of DOSPER-Virosomes to DOTAP-Virosomes

The same amount of ³H-labeled plasmid as described in Example 8 for DOSPER-virosomes was encapsulated into DOTAP-Virosomes. HeLa and K562 cells were incubated with DOTAP-Virosomes under the same conditions as described above in Example 8. The results are graphed in Figures 25 and 26.

30

0244872-100899

The results in Figures 25 and 26 demonstrate that the transfection efficiency of DOTAP-virosomes is lower than that of DOSPER-virosomes. The reasons why are not clear. We suppose, without being bound by theory, that encapsulation of plasmid into virosomes containing DOSPER may lead to higher amounts of useful virosomes. In contrast, encapsulation of plasmid into DOTAP-virosomes may result in a high number of defective vesicles with low transfection potential. A second hypothesis would implicate an enhancing effect of DOSPER during binding of the virosomes to the cell membrane, a viewpoint we cannot exclude.

The results thus demonstrate that use of the polycationic lipid DOSPER exhibits surprisingly superior transfection efficiency compared to the most frequently used cationic lipid DOTAP.

Abbreviations used in the description

15	2'-OMe	2'-O methyl
	CALLA	common acute lymphoblastic leukemia antigen
	CAT	chloramphenicol acetyltransferase
	DOTAP	N-[(1,2,3-dioleoyloxy)-propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethyl-
20		sulfate
	DOTMA	N-[(1,2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
	FITC-OPT	fluorescein isothiocyanate-labeled oligodeoxynucleotide
		phosphorothioate
	G418	Geneticin® disulfat (antibiotic G418)
25	HA	hemagglutinin
	IL-6	Interleukin 6
	MPB.PE	N-[4-(p-maleimido)-phenylbutyryl]-phosphatidylethanolamine (= a
		crosslinker-phospholipid complex)
	msc	mixed sequence control
30	NA	neuraminidase
	Octyl-POE	n-octyl-oligo-oxyethylene
	ODN	oligodeoxynucleotides

665007-284460

	OEG	octaethyleneglycol monododecylether (C ₁₂ E ₈)
	OPT	oligodeoxyribonucleotide phosphorothioate(s)
	PC	phosphatidylcholine
	PE	phosphatidylethanolamine
5	PNA	peptide nucleic acid
	SCLC	small cell lung cancer
	SV40	Simlan virus 40

6688007 22847460

99+03

CLAIMS

1. A lipid bilayer vesicle having at least one desired drug or pharmaceutically active substance therein, said vesicle comprising:

5 (a) a membrane having phosphatidylethanolamine (PE) in combination with one or more lipids comprising natural or synthetic lipids having a positive net charge;

10 (b) at least one active fusion peptide that is a viral hemagglutinin, that is capable of causing the vesicles to be internalized by target cells through phagocytosis or endocytosis, and that exerts fusogenic activity at acidic pH within a range of pH5 to pH7, said hemagglutinin being attached directly or indirectly to said membrane;

(c) a bifunctional crosslinker linked to phosphatidylethanolamine (PE) of said membrane; and

15 (d) at least one cell-specific marker linked via a sulfur of the cell-specific marker to the PE-bound crosslinker, said marker being a biologically active protein for binding to a receptor of target cells.

2. The vesicle according to claim 1, wherein the membrane comprises - based on total lipids - 10% by weight or less of phosphatidylethanolamine, and 20 90% by weight or more of said other lipids comprising positively charged lipids.

25 3. The vesicle according to claim 1, wherein the cell-specific marker is selected from the group consisting of an antibody, an antibody fragment, a cytokine and a growth factor.

4. The vesicle according to claim 1, wherein the positively charged lipids comprise at least one cationic or polycationic lipid selected from the group consisting of

30 N-[(1,2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA);
N-[(1,2,3-dioleoyloxy)-propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfate (DOTAP); N-t-butyl-N'-tetradecyl-3-tetradecylaminopropionamidide;

66807-2484460

1,3-dipalmitoyl-2-phosphatidylethanolamidospemine (DPPES);
 dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS); 2,3-dioleyloxy-N-[2(spermine-
 carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propaneaminiumtrifluoroacetate
 (DOSPA); 1,3-dioleyloxy-2-(6-carboxy-spermyl)-propylamide (DOSPER);
 and N,N,N',N'-tetramethyl-N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2,3-dioleyloxy-1,4-
 butanediammoniumiodide (THDOB).

5

5. The vesicle according to claim 4, wherein the membrane comprises 5 to
 30% by weight, based on total lipids, of 1,3-dioleyloxy-2-(6-carboxy-spermyl)-
 propylamide (DOSPER).

10

6. The vesicle according to claim 1, wherein the desired drug or
 pharmaceutically active substance is a nucleic acid material.

15

7. The vesicle according to claim 6, wherein said nucleic acid material
 entrapped in said vesicle is selected from the group consisting of short chain DNA
 or RNA, deoxyribonucleotides, oligodeoxyribonucleotides,
 oligodeoxyribonucleotide selenoates, oligodeoxyribonucleotide phosphorothioates,
 oligodeoxyribonucleotide phosphoramidates, oligodeoxyribonucleotide
 methylphosphonates, peptide nucleic acids, ribonucleotides, oligoribonucleotides,
 oligoribonucleotide phosphorothioates, 2'-OMe-oligoribonucleotide phosphates, 2'-
 OMe-oligoribonucleotide phosphorothioates, ribozymes, genes, plasmids and
 vectors.

20

8. The vesicle according to claim 1, wherein its diameter is in a range of 120-
 180 nm.

25

9. The vesicle according to claim 1, wherein the hemagglutinin is fusogenic at
 acidic pH within a range of pH7-pH5 and is derived from a virus selected from the
 group consisting of rhabdovirus, parainfluenza virus type III, Semliki Forest virus
 and togavirus.

30

668007-2281460

101/103

10. A process for the manufacture of a lipid bilayer vesicle having a membrane that contains natural or synthetic lipids having a positive net charge together with phosphatidylethanolamine, at least one functionally active viral fusogenic peptide integrated in or covalently linked to the membrane, at least one cell-specific marker attached to the membrane, and a desired nucleic acid material, comprising the steps of
- (a) dissolving purified virus with a non-ionic detergent solution and separating therefrom a fraction containing hemagglutinin;
 - (b) preparing conjugate molecule complexes consisting of phosphatidylethanolamine (PE), a bifunctional crosslinker, and a cell-specific marker in a way such that the bifunctional crosslinker with one binding site links to the amino group of PE and with another one to a thiol group of the cell-specific marker, and removing unconjugated material;
 - (c) preparing a solution containing:
 - a buffered non-ionic detergent; viral hemagglutinin obtained in step (a); natural or synthetic lipids other than PE comprising lipids that have a positive net charge; and at least one cell-specific marker in the form of said preformed molecule complexes of PE/crosslinker/marker;
 - (d) adjusting the lipid concentrations to - based on total lipids -10% by weight or less of phosphatidylethanolamine and to 90% by weight or more of said natural or synthetic lipids other than PE comprising lipids that have a positive net charge;
 - (e) removing the detergent by treating the solution with microcarrier beads, resulting in the formation of positively charged targeted virosomes; and
 - (f) incorporating into the virosomes a quantity of a desired nucleic acid material.
11. The process according to claim 10, wherein said lipids other than PE include phosphatidylcholine.
12. The process according to claim 10, wherein said microcarrier beads are polystyrene beads having a net mesh size of 20-50 (0.84-0.30 nm).

004487-1089
66806F-284160

102-106

13. The process according to claim 10, wherein incorporation of nucleic acid material into the virosomes is accomplished by adding to the virosomes resulting from step (e) the desired nucleic acid material, sonicating the mixture to integrate the material into the vesicles, and removing non-integrated material.

14. The process according to claim 13, wherein the non-integrated material is removed by gel filtration.

15. The process according to claim 10, wherein incorporation of nucleic acid material into the virosomes is accomplished by adding to the virosomes resulting from step (e) positively charged liposomes containing the desired nucleic acid material and sonicating the mixture to fuse the liposomes with the virosomes to integrate the nucleic acid material into the virosomes.

16. The process according to claim 8, wherein the positively charged lipids comprise at least one cationic or polycationic lipid selected from the group consisting of

N-[(1,2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA);
N-[(1,2,3-dioleoyloxy)-propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfate (DOTAP); N-t-butyl-N'-tetradecyl-3-tetradecylaminopropionamide;
1,3-dipalmitoyl-2-phosphatidylethanolamidospervine (DPPES);
dioctadecylamidoglycylspermine (DOGS); 2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermine-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propaneminiun trifluoroacetate (DOSPA); 1,3-dioleoyloxy-2-(6-carboxy-spermyl)-propylamide (DOSPER);
and N,N,N',N'-tetramethyl-N,N'-bis(2-hydroxyethyl)-2,3-dioleoyloxy-1,4-butanediammonium iodide (THDOB).

17. The process according to claim 8, wherein the positively charged lipids comprise 5 to 30% by weight of 1,3-dioleoyloxy-2-(6-carboxy-spermyl)-propylamide (DOSPER), based on total lipids.

668007-2284460

18. The process according to claim 10, wherein the weight ratio of hemagglutinin to total membrane lipids is adjusted to approximately 1 (mg/mg) or less.
- 5 19. The process according to claim 10, wherein the cell-specific marker is selected from the group consisting of an antibody, an antibody fragment, a cytokine and a growth factor.
20. The process according to claim 19, wherein the cell-specific marker is a Fab' or F(ab')₂ fragment and is applied in a weight ratio of hemagglutinin to Fab' or F(ab')₂ fragment of about 2:1.
- 10 21. The process according to claim 10, wherein the desired nucleic acid material is selected from the group consisting of short chain DNA or RNA, deoxyribonucleotides, oligodeoxyribonucleotides, oligodeoxyribonucleotide selenoates, oligodeoxyribonucleotide phosphorothioates, oligodeoxyribonucleotide phosphoramidates, oligodeoxyribonucleotide methylphosphonates, peptide nucleic acids, ribonucleotides, oligoribonucleotides, oligoribonucleotide phosphorothioates, 2'-OMe-oligoribonucleotide phosphates, 2'-OMe-oligoribonucleotide phosphorothioates, ribozymes, genes, plasmids and vectors.
- 15 22. The process according to claim 10, wherein the non-ionic detergent solution comprises C₁₂E₈ (octaethyleneglycol monododecylether) or n-octyl-oligoxyethylene.
- 20 23. The process according to claim 10, wherein the crosslinking agent is a heterobifunctional organic molecule having at least one maleimido and at least one carboxyl group.
- 25 24. The process according to claim 23, wherein the crosslinking agent is selected from the group consisting of bis-N-succinimidyl derivatives and photactivatable succinimidyl derivatives.
- 30

668887-2481160

SECRET

5

10

15

29.

20

105 709+

ABSTRACT

The present invention relates to a positively charged virosome for efficient
5 delivery of genetic material to resting or proliferating mammalian cells in vitro and
in vivo. The virosome membrane contains cationic and/or polycationic lipids, at
least one viral fusion peptide and preferably at least one cell-specific marker,
advantageously selected from the group consisting of monoclonal antibodies,
antibody fragments $F(ab')_2$ and Fab' , cytokines, and growth factors, for a selective
10 detection and binding of target cells. The invention further relates to a method for
the manufacture of the novel virosomes and to applications thereof, particularly for
the manufacture of pharmaceutical compositions to treat cancer or leukemia.

668007 2284460

106-110

DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY
FOR CONTINUATION-IN-PART APPLICATION (PCT)

As a below named inventor, I hereby declare that
my residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name;

I verily believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or an original, first and joint
inventor (if plural names are listed below) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention
entitled: CATIONIC VIROSOMES AS TRANSFER SYSTEM FOR GENETIC MATERIAL described and claimed in the
specification:

Check one

- a. ☒ attached hereto.
b. ☐ filed on _____ as Application Serial No.

This application in part discloses and claims subject matter disclosed in my or our earlier filed pending application,
Application No. 09/171,882, filed December 30, 1998 and International Application No. PCT/EP97/02268, filed May 4, 1997.

I have reviewed and understand the contents of this application, including the claims, as amended by any amendment
referred to above.

I acknowledge the duty to disclose to the Office all information known to me to be material to patentability as defined in
Title 37, Code of Federal Regulations §1.56.

Under Title 35, U.S. Code §119, the priority benefits of the following foreign application(s) filed within one year prior to
said international application are hereby claimed:

European Patent Application No. 96107282.4 filed May 8, 1996

The following application(s) for patent or inventor's certificate on this invention were filed in countries foreign to the
United States of America either (a) more than one year prior to said international application, or (b) before the filing date of the
above-named foreign priority application(s)

As to any and all subject matter of this application which is not common to said earlier application, I acknowledge the
duty to disclose to the Office all information known to me to be material to patentability as defined in Title 37, Code of Federal
Regulations, §1.56, which became available between the filing date of the international application and the filing date of this
application.

Under Title 35, U.S. Code §119, the priority benefits of the following foreign application(s) filed within one year prior to
this application are hereby claimed:

The following application(s) for patent or inventor's certificate on such subject matter were filed in countries foreign to the
United States of America either (a) more than one year prior to this application, or (b) before the filing of the above-named foreign
priority application(s):

I hereby appoint the following as my attorneys of record with full power of substitution and revocation to prosecute this
application and to transact all business in the Patent Office:

James A. Oliff, Reg. No. 27,075; William P. Berridge, Reg. No. 38,024;
Kirk M. Hudson, Reg. No. 27,562; Thomas J. Fardini, Reg. No. 30,411;
Edward P. Walker, Reg. No. 31,450; Robert A. Miller, Reg. No. 32,771;
Mario A. Costantino, Reg. No. 33,565; and
Caroline D. Dennison, Reg. No. 34,494.

ALL CORRESPONDENCE IN CONNECTION WITH THIS APPLICATION SHOULD BE SENT TO OLIFF &
BERRIDGE, P.L.C., P.O. BOX 19928, ALEXANDRIA, VIRGINIA 22320, TELEPHONE (703) 836-6400.

I hereby declare that I have reviewed and understand the contents of this Declaration, and that all statements made herein
of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that those
statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment,
or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity
of the application or any patent issued thereon.

09/171,882, 100899

3 S. 5603

BUECHEL, KAMINSKI & PARTNERS, 004233991091

15. SEP. 1999 15:42

107-447

1 **Typewritten Full Name of Sole or First Inventor** Ernst Rudolf WALT
2 **Inventor's Signature** Given Name Middle Initial Family Name
3 **Date of Signature** 16. Sept. 1989 Month Day Year
Residence: Munchenbuchsee City State or Province SWITZERLAND Country
Citizenship: SWITZERLAND
Post Office Address: Moosgasse 84
(insert complete mailing address, including country) CH-3053 Munchenbuchsee SWITZERLAND

1 **Typewritten Full Name of Joint Inventor** Reinhard GLUCK
2 **Inventor's Signature:** Given Name Middle Initial Family Name
3 **Date of Signature:** 16 - Sept 1989 Month Day Year
Residence: Spiegel bei Bern City State or Province SWITZERLAND Country
Citizenship: SWITZERLAND
Post Office Address: Chasseralstrasse 156
(insert complete mailing address, including country) CH-3028 Spiegel bei Bern SWITZERLAND

1 **Typewritten Full Name of Joint Inventor** Peter KLEIN
2 **Inventor's Signature:** Given Name Middle Initial Family Name
3 **Date of Signature:** 9 - 16 - 1989 Month Day Year
Residence: Langenbruck City State or Province SWITZERLAND Country
Citizenship: SWITZERLAND
Post Office Address: Neuhof
(insert complete mailing address, including country) CH-4438 Langenbruck SWITZERLAND

1 **Typewritten Full Name of Joint Inventor**
2 **Inventor's Signature:** Given Name Middle Initial Family Name
3 **Date of Signature:** Month Day Year
Residence: City State or Province Country
Citizenship:
Post Office Address:
(insert complete mailing address, including country)

1 **Typewritten Full Name of Joint Inventor**
2 **Inventor's Signature:** Given Name Middle Initial Family Name
3 **Date of Signature:** Month Day Year
Residence: City State or Province Country
Citizenship:
Post Office Address:
(insert complete mailing address, including country)

If Box 2 is checked, this form may be executed only when attached to the specification (including claims) at the end thereof. This form may be executed only when attached to the first page of the Declaration and Power of Attorney of the application to which it pertains. Note to Inventor: Please sign name on line 2 exactly as it appears in line 1 and insert the actual date of signing on line 3.

668007-2284160

FIG. 1

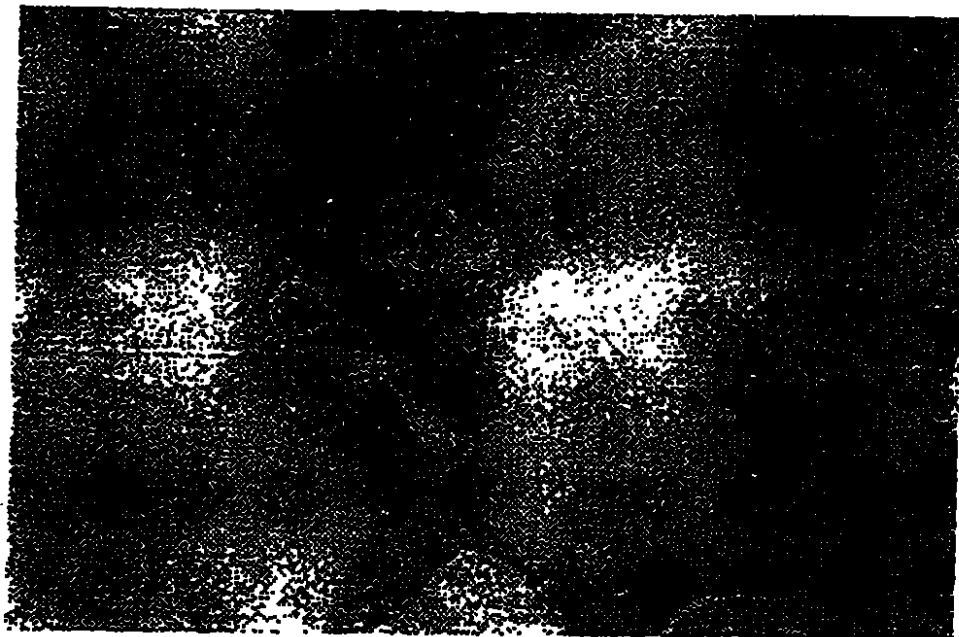
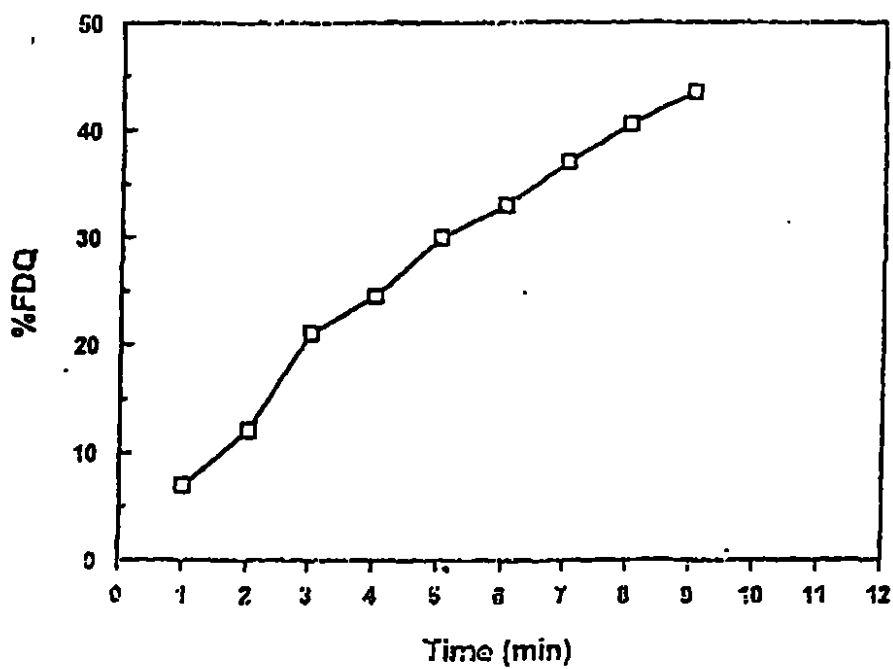


Fig. 2



66800T-2484460

FIG. 3



668007-22867460

Fig.4

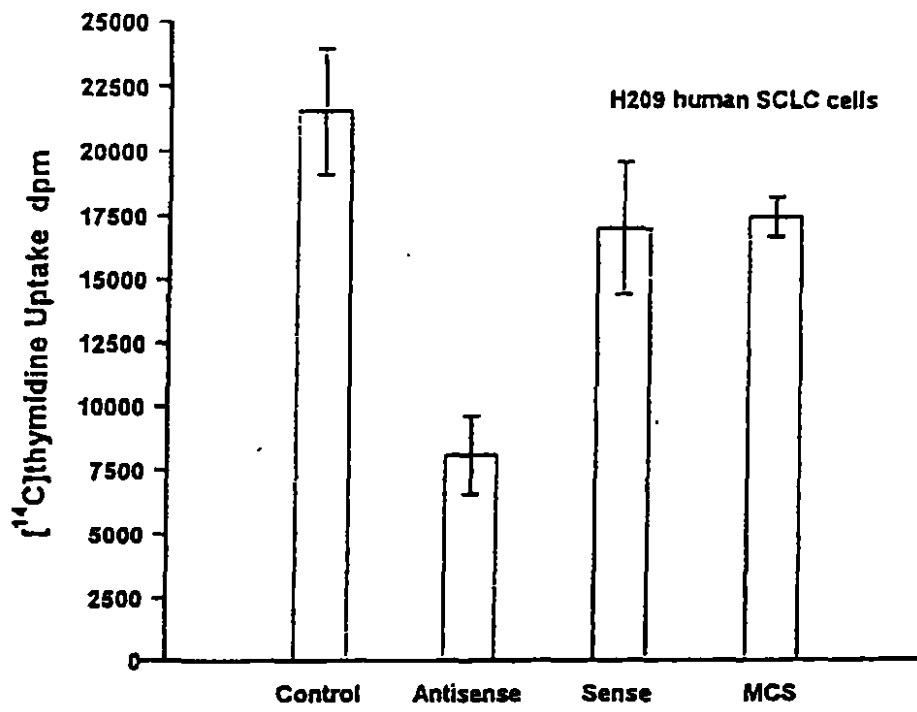


Fig.5

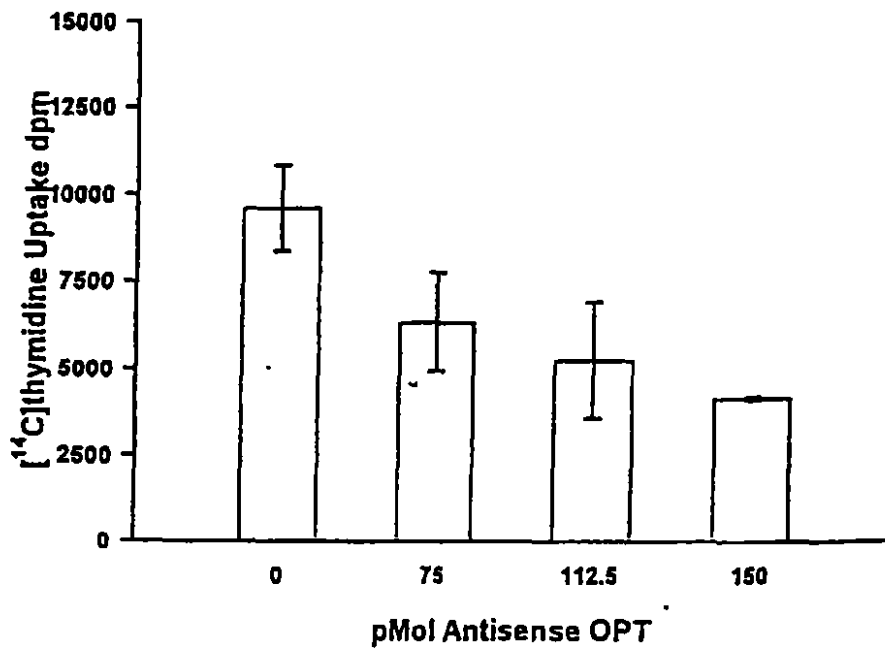
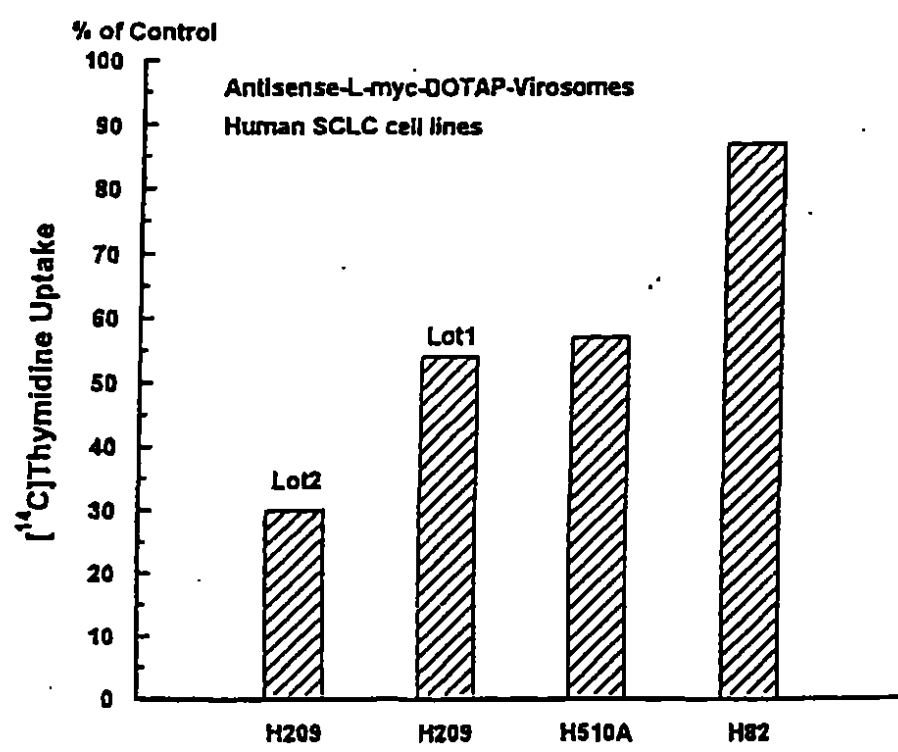


Fig.6



66800T-228hFh60

Fig.7a

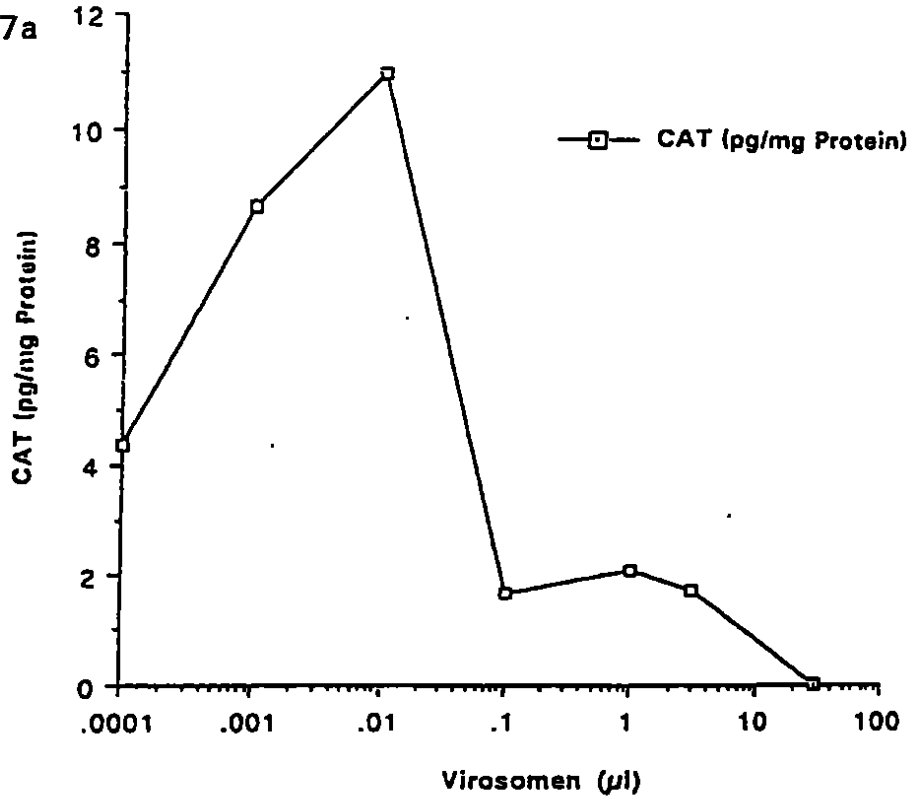
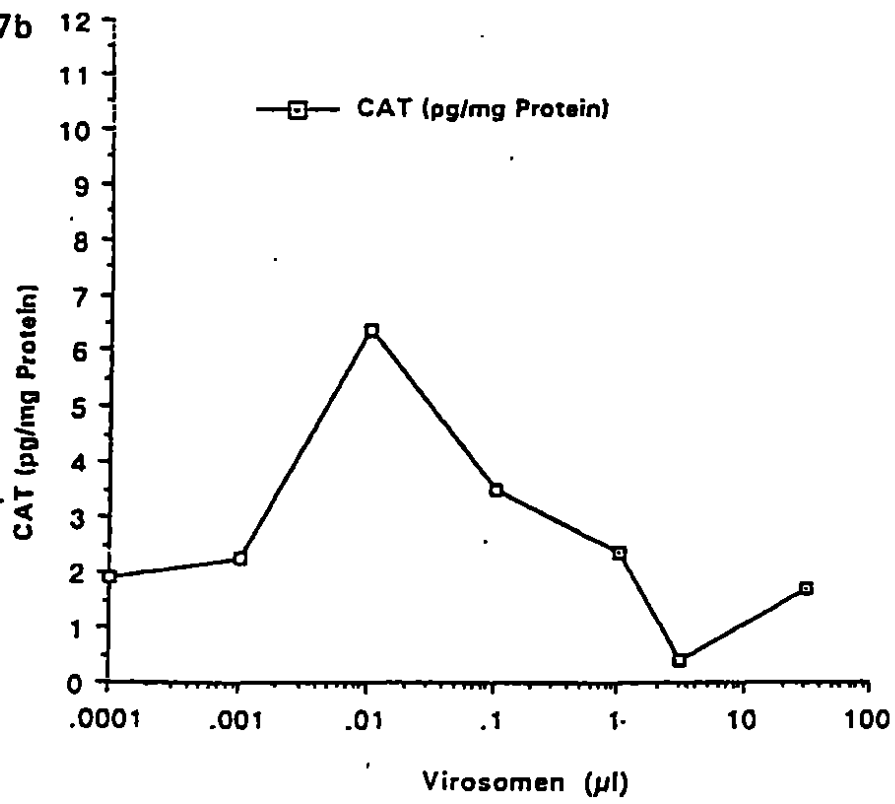


Fig.7b



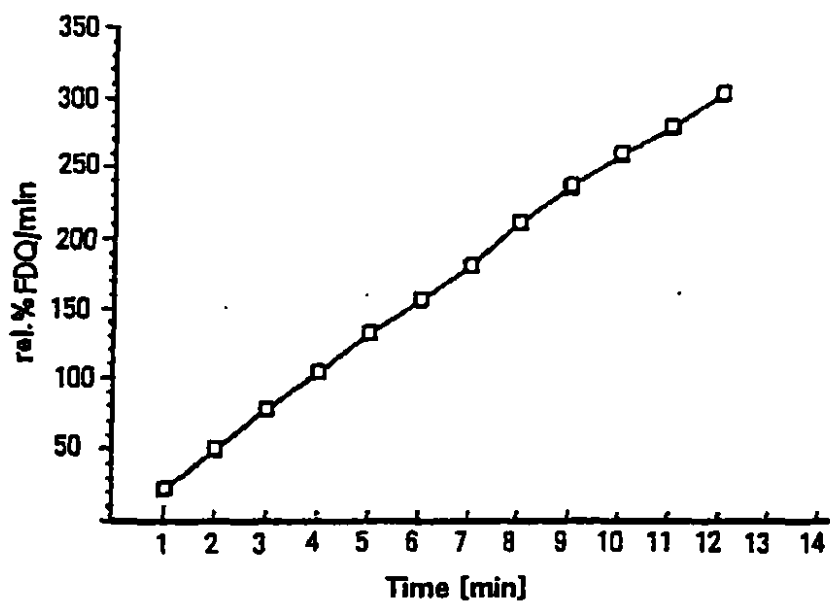


FIG. 8

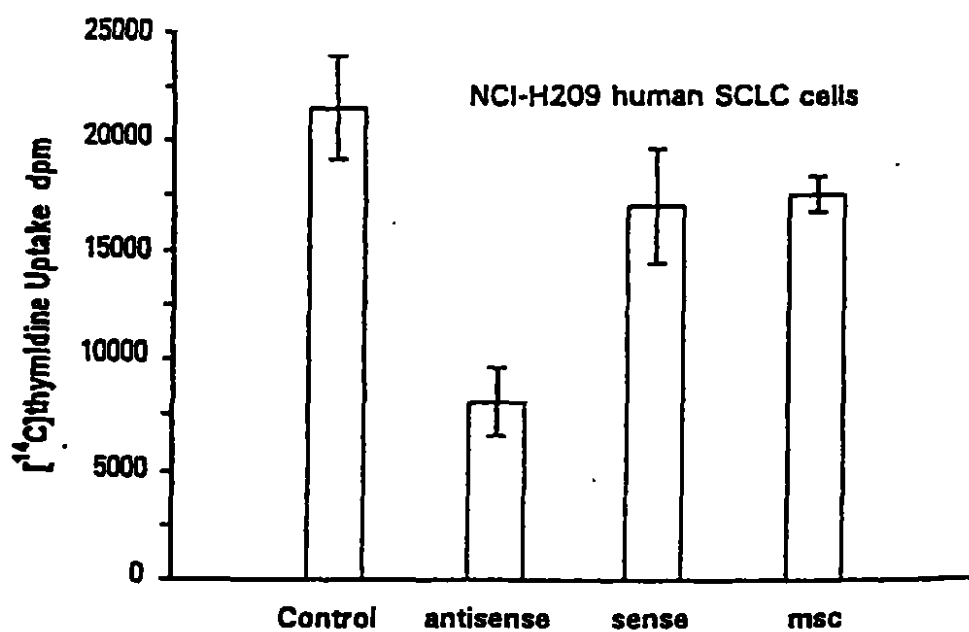


FIG. 9

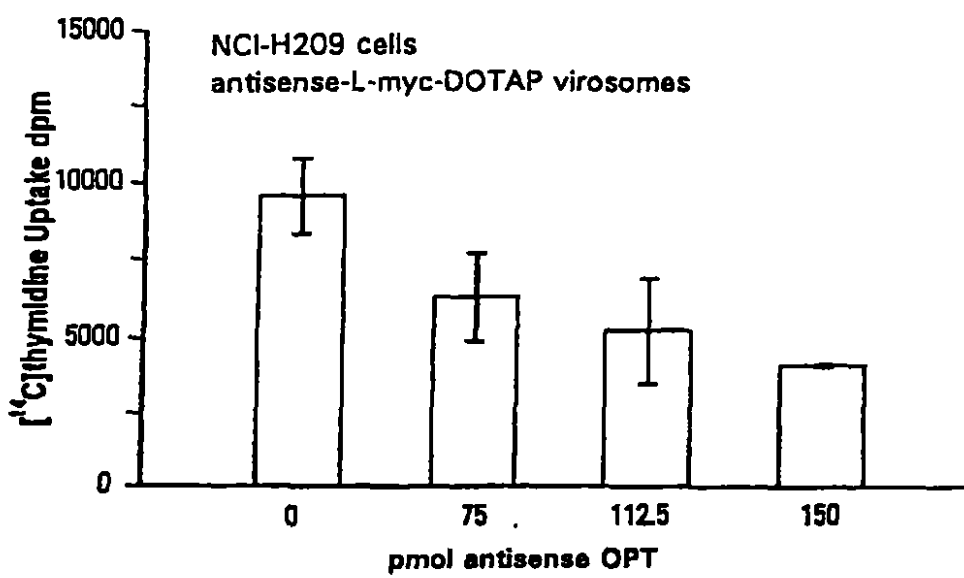


FIG. 10

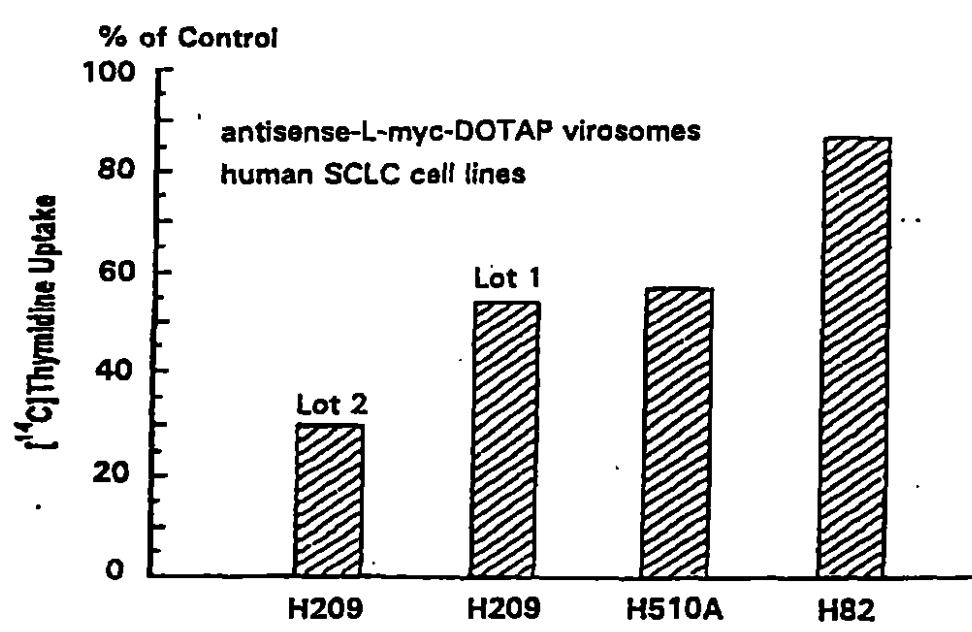


FIG. 11

668007 228460

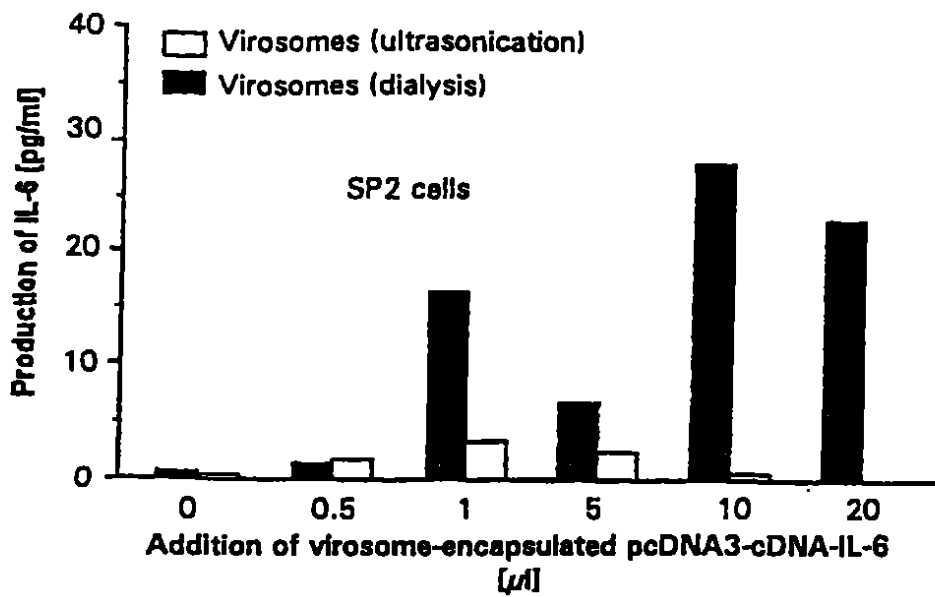


FIG. 12

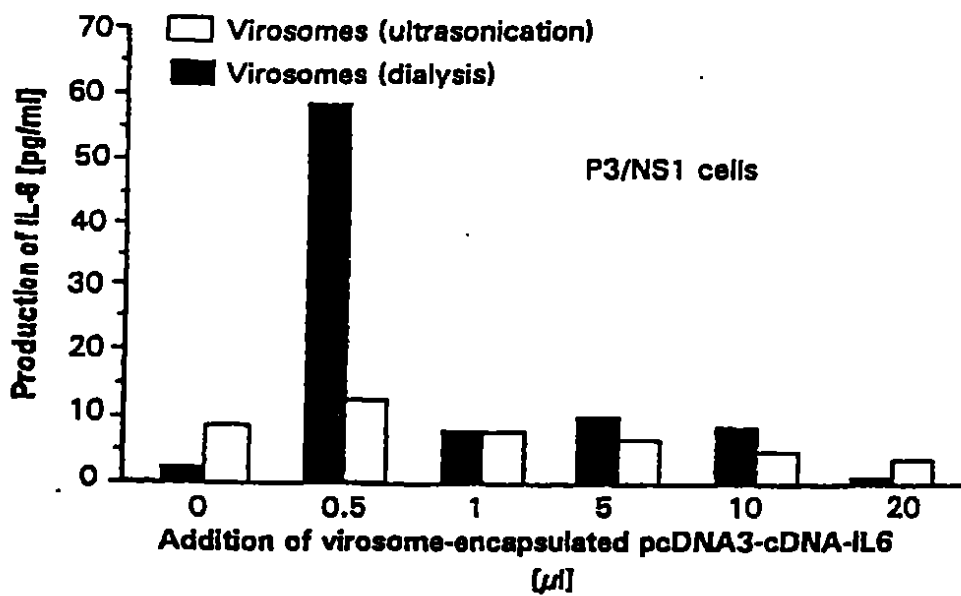


FIG. 13

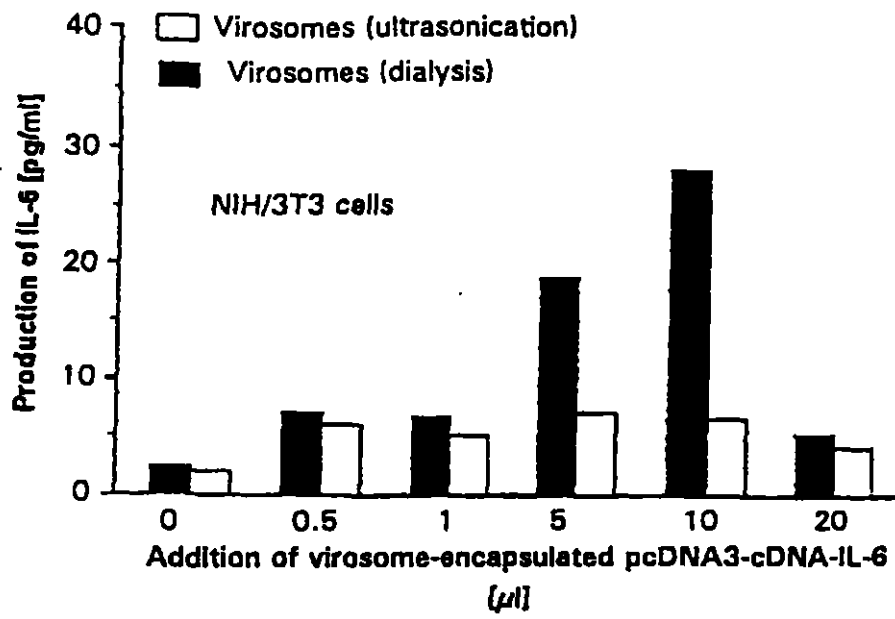


FIG. 14

094447-1084460

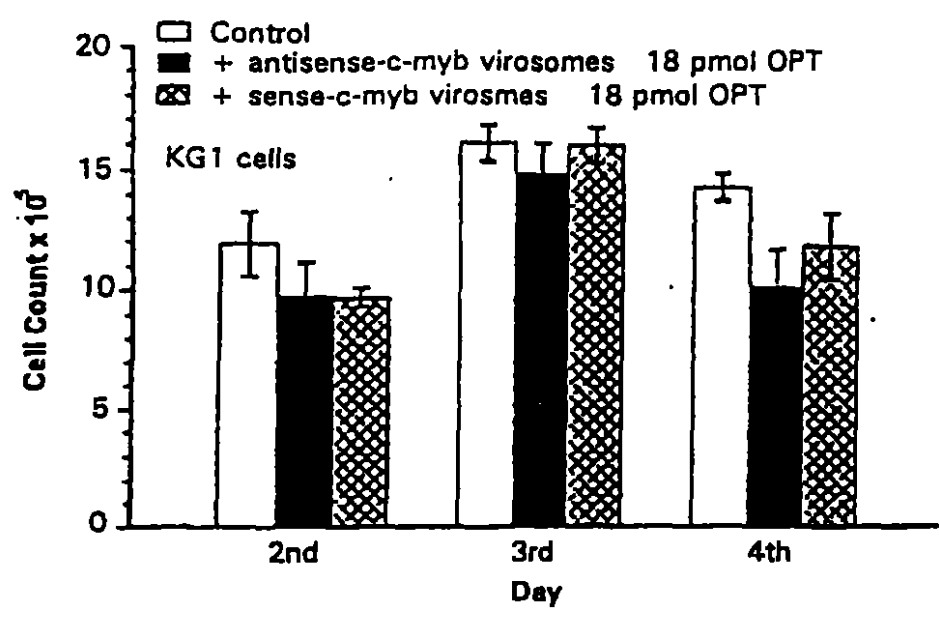


FIG. 15

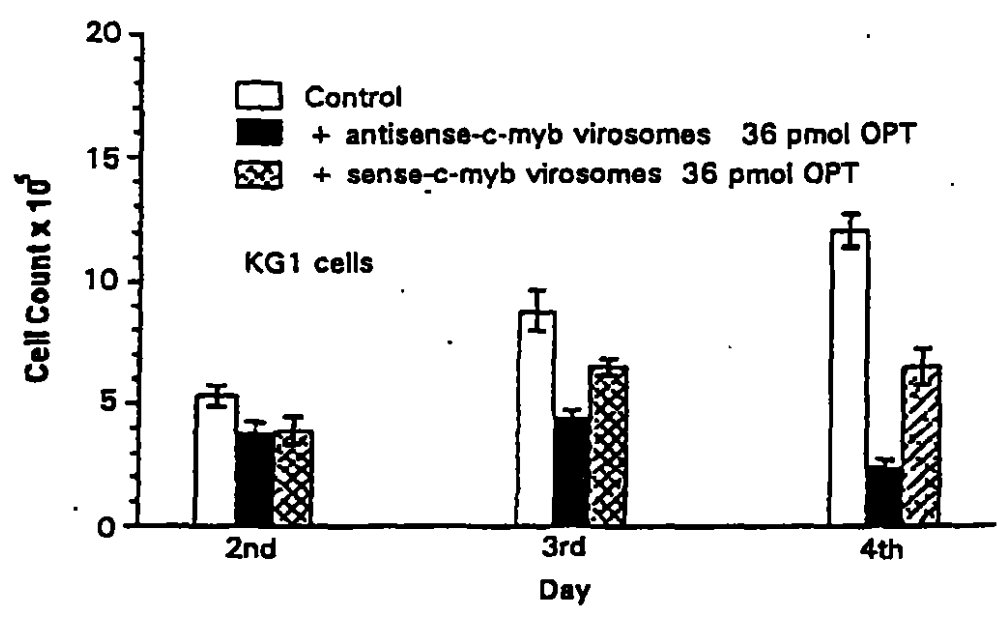


FIG. 16

668007-2284460

118 + 77

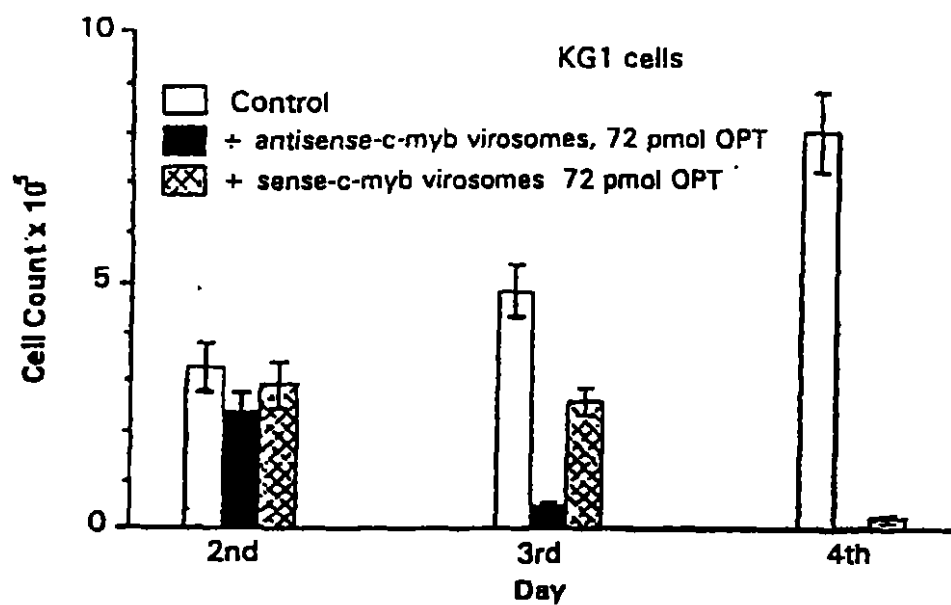


FIG. 17

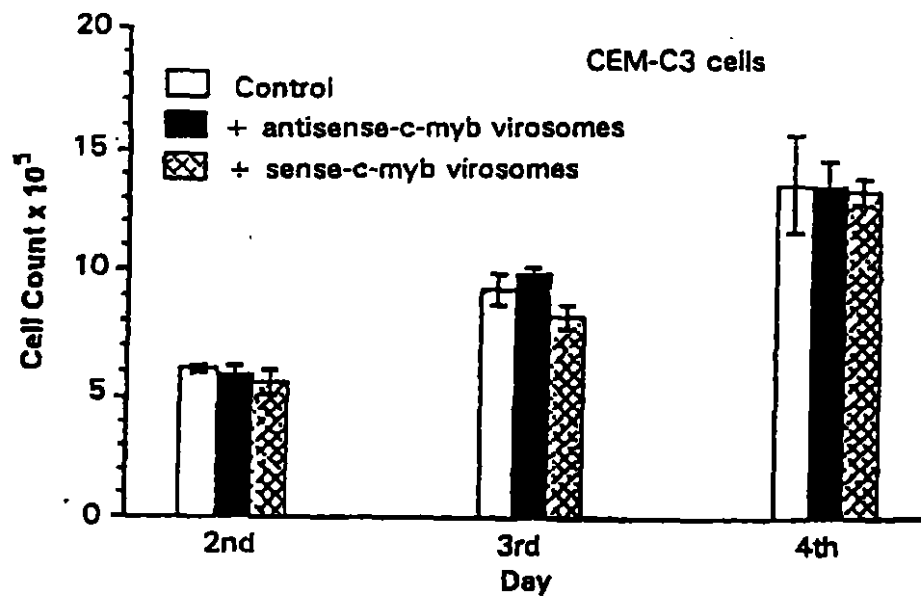


FIG. 18

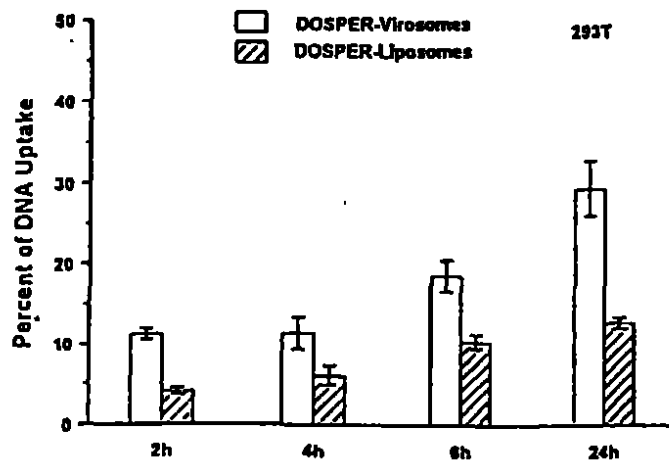


Fig. 19

Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of human, transformed primary embryonal kidney cell line 293 T were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

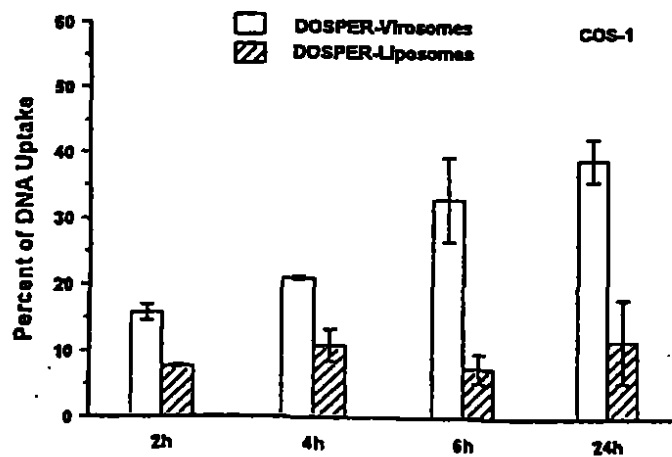


Fig. 20

Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of monkey fibroblast cell line COS-1 were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

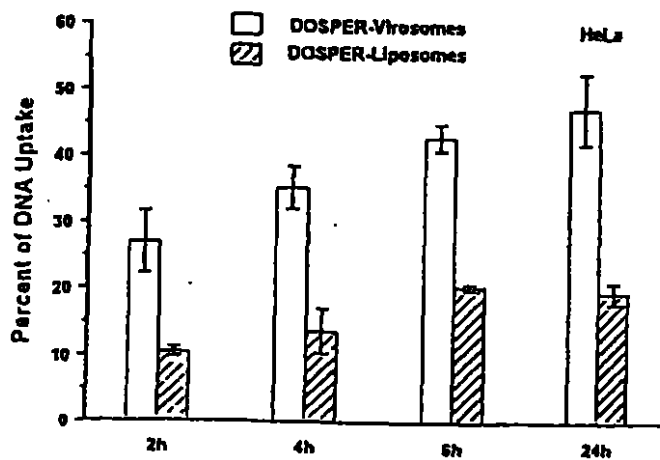


Fig. 21

Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of human epithelioid carcinoma cell line HeLa were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

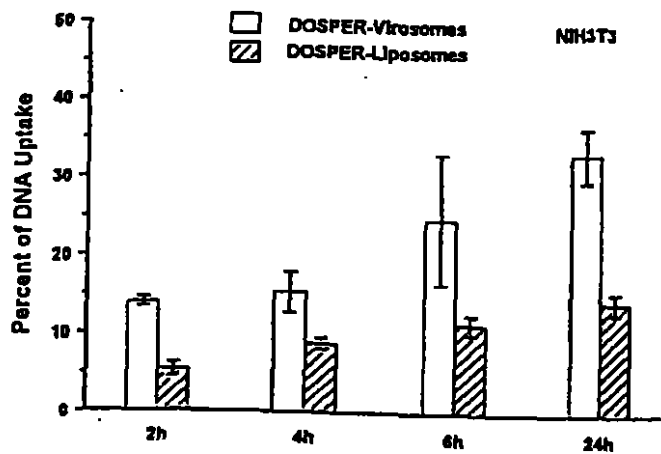


Fig. 22

Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of mouse fibroblast cell line NIH3T3 were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

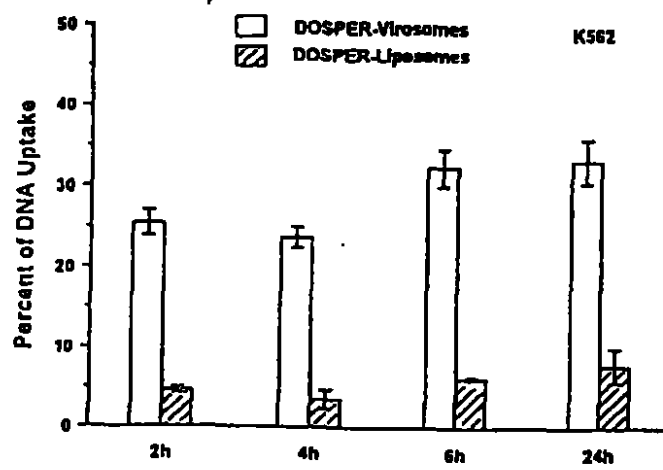


Fig. 23

Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of human chronic myelogenous leukemia cell line K562 were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

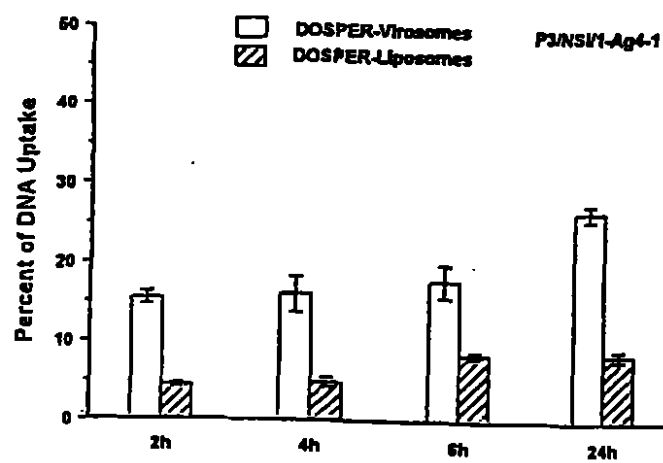


Fig. 24

Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of mouse myeloma cell line P3 were transfected with DOSPER-virosomes and DOSPER-liposomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

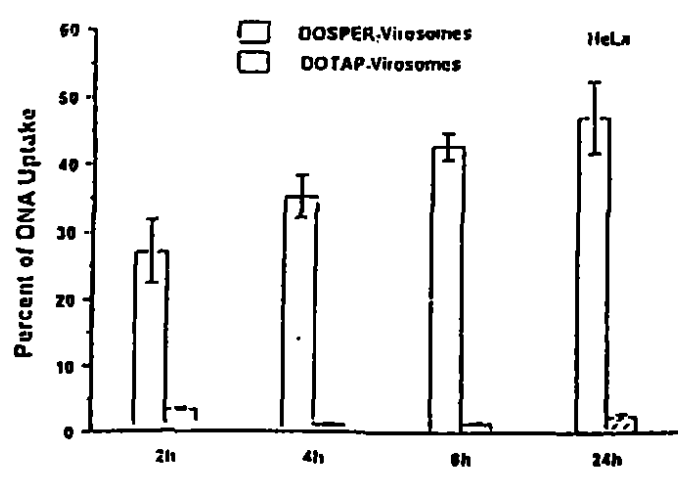


Fig. 25

Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of human epithelioid carcinoma cell line HeLa were transfected with DOSPER-virosomes and DOTAP-virosomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

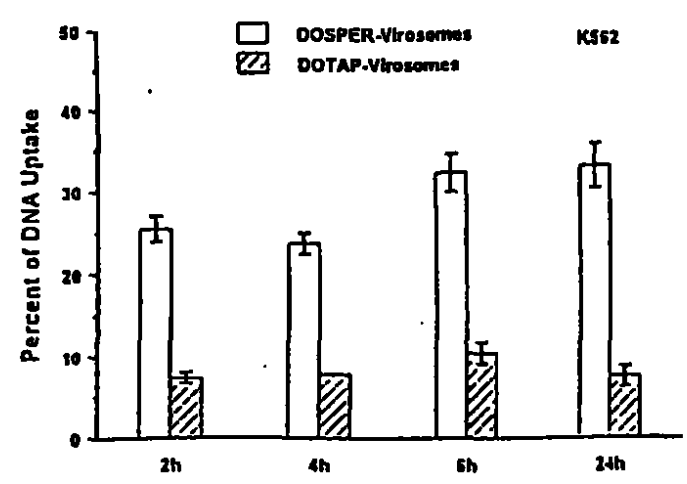


Fig. 26

Influence of time transfection on the amount of uptaken DNA-plasmid. 5×10^5 cells of human chronic myelogenous leukemia cell line K562 were transfected with DOSPER-virosomes and DOTAP-virosomes containing ^3H -labeled plasmid pGreen Lantern.

123 + 28

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

A TODOS AQUELLOS A LOS QUE LLEGUEN LAS PRESENTES:

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oficina de Patentes y Marcas Comerciales de los Estados Unidos

4 de octubre de 2000

POR LA PRESENTE SE CERTIFICA QUE EL ANEXO ES UNA COPIA FIEL DE LOS REGISTROS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS COMERCIALES DE LOS ESTADOS UNIDOS DE LOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE LA PATENTE ABAJO IDENTIFICADA QUE CUMPLIÓ LOS REQUISITOS PARA QUE SE LE CONCEDIESE UNA FECHA DE PRESENTACIÓN BAJO 35 USC 111.

NÚMERO DE SOLICITUD: 09/414,872

FECHA DE PRESENTACIÓN: 8 de octubre de 2000

(sello)

Por autoridad de

EL COMISIONADO DE PATENTES Y MARCAS COMERCIALES

(firma ilegible)

H. L. JACKSON

Agente de Certificación

SOLICITUD DE PATENTE

EN LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

Oliff & Berridge, PLC
P.O.Box 19928
Alexandria, Virginia 22320
Teléfono: (703) 836-6400
Fax: (703) 836-7787

Expediente N°: 101509.01

Fecha: 8 de octubre de 1999

Subcomisionado para Patentes
Washington, D.C. 20231

SOLICITUD DE PATENTE

**NORMA 1.53(b) SOBRE TRANSMISIÓN DE
SOLICITUD CONTINUADA**

Sr.:

Enviada con la presente para su registro bajo 37 C.F.R. §1.53(b) se encuentra una solicitud

☐ de Continuación ☐ Divisional ☒ de Continuación en parte

de la anterior Solicitud pendiente N°09/171.882, presentada el 30 de diciembre de 1998,
Para (Título): VIROSOMAS CATIONICOS COMO SISTEMA DE
TRANSFERENCIA PARA EL MATERIAL GENETICO
Por (Inventores): Ernst Rudof WALTI; Reinhard GLUCK y Peter KLEIN

1. ☒ Se adjunta una Declaración y un Poder notarial. La Declaración y el Poder Notarial adjuntados son:
 - ☐ a. Una copia de la Declaración y el Poder notarial de la solicitud de patente. (Usada con el mismo o mismos inventores y (a) una copia de la solicitud anterior o (b) una versión revisada, reformada o editada de la solicitud anterior que no contiene ningún asunto nuevo).
 - ☒ b. Una nueva Declaración y Poder notarial. (Usados con el mismo, mismos o adicionales inventores y (a) una copia de la solicitud anterior, (b) una versión revisada, reformada o editada de la solicitud anterior que no contiene ningún asunto nuevo, o (c) una nueva descripción).
2. ☒ Los gastos de registro están calculados más abajo:

**REIVINDICACIONES EN LA SOLICITUD DESPUÉS DE LA
INTRODUCCIÓN DE CUALQUIER MODIFICACIÓN
PRELIMINAR ANOTADA DEBAJO**

PARA:	N° PRESENTADO	N° EXTRA
TASA BASICA		
REIVIND. TOTALES	30 - 20	- 10*
REIVIND. INDEP.	2 - 3	- 0*
☐ MÚLTIPLES REIVIND. DEPEND. PRESENTADAS		
* Si la diferencia es menor que cero, introducir "0"		

**PEQUEÑA
EMPRESA**

TARIFA	TASA
	\$380
x9 -	\$90
x39+	\$
+139 -	\$
TOTAL	\$470

**OTRA EMPRESA QUE
NO SEA PEQUEÑA**

TARIFA	TASA
	\$760
x18	\$
x78	\$
+260	\$
TOTAL	\$

3. ☒ Se adjunta cheque N°103533 por un importe de \$470 USD para cubrir los gastos de registro. Por la presente, el comisionado queda autorizado a cargar cualquier otro gasto que pudiera ser necesario para completar este registro, o para abonar cualquier pago excesivo, a la Cuenta de Depósito N°15-0461. Se adjuntan dos copias duplicadas de esta hoja.
4. ☐ Cancelar las reivindicaciones _____ de la solicitud antes de calcular los gastos de registro. Se retiene al menos una reivindicación independiente con fines de registro.

AUTORIZACIÓN DE USO
DE LA CUENTA DE DEPÓSITO
Por favor conceder cualquier extensión
Necesaria para la introducción;
Cargar cualquier gastos debido a nuestra
Cuenta de Depósito N°15-0461

5. ☒ Modificar la descripción insertando, antes de la primera línea, la frase:
- Esta es una ☐ Continuación, ☐ División, ☒ Continuación en parte de la solicitud N°09/171.882, presentada el 30 de diciembre de 1998, la cual es a su vez una U.S. National Stage de PCT/BP97/02268 presentada el 4 de mayo de 1997. Todas las divulgaciones de las solicitudes anteriores por la presente quedan incorporadas por la referencia que se hace a ellas en este documento en su totalidad.
6. ☒ Se adjuntan dibujos de la forma (Figs. 1-26)
7. ☒ Se reclama la prioridad de la(s) solicitud(es) extranjeras N° 96107282.4 presentada el 8 de mayo de 1996 en Europa bajo 35U.S.C. §119 y/o §365(b).
- ☒ La copia certificada fue presentada en la anterior solicitud N° 09/171.882, el 28 de octubre de 1998.
- ☐ Se presenta con este documento una copia certificada de la anterior solicitud extranjera
8. ☐ Se reclama la prioridad de la Solicitud Provisional N° _____ de Estados Unidos presentada _____ bajo 35U.S.C. §119.
- ☐ Modificar la descripción insertando, antes de la primera línea, la frase:
- Esta solicitud no provisional reclama el beneficio de la Solicitud(es) Provisional(es) N° _____ de Estados Unidos presentada el _____
9. ☒ A la solicitud anterior se le asigna el protocolo de NIKA HEALTH PRODUCTS LIMITED, registrado en el Tomo 9853, Marco 0864.
10. ☐ Esta solicitud está presentada por algunos de los inventores nombrados

en el solicitud anterior (37C.F.R. §1.53(b)(1)). Borrar el/los siguiente(s) inventor(es) nombrado(s) en la solicitud anterior.

11. ☐ Se adjunta una Modificación Preliminar. Las reivindicaciones añadidas por esta Modificación están debidamente numeradas de forma consecutiva empezando con el número siguiente a la reivindicación con el número más alto en la solicitud.
12. ☒ Se adjunta una Declaración de Divulgación de Información
13. ☒ Estado de la entidad pequeña
- ☐ a. Se adjunta declaración de pequeña empresa.
- ☐ b. Se presentó la declaración de pequeña empresa en la solicitud de patente y dicho estado es aún adecuado y deseado.
- ☐ c. Ya no se reclama el estado de pequeña empresa.
14. ☐ Otros: _____
15. ☒ El Poder Notarial de la Solicitud es para James A. Oliff, N° de Registro 27.075, William P. Berridge, N° de Registro 30.024, Kirk M. Hudson, N° de Registro 27.562, Thomas J. Pardini, N° de Registro 30.411, Edward P. Walker, N° de Registro 31.450, Robert A. Miller, N° de Registro 32.771, Mario A. Constantino, N° de Registro 33.565 y/o Caroline D. Dennison, N° de Registro 34.494.
- ☐ a. El poder aparece en la Declaración adjuntada y en el Poder Notarial,
- ☐ b. Dado que el poder no aparece en la Declaración y Poder Notarial adjuntados, se adjunta también un Poder Notarial sustituto.
16. ☒ Dirigir todas las comunicaciones futuras a:

Oliff & Berridge, PLC
P.O.Box 19928
Alexandria, Virginia 22320

Atentamente,

James A. Oliff
N° de Registro 27.075

Christopher W. Brown
N° de Registro 38.025

Solicitante o titular de la patente: Ernst Rudolf WALTI, Reinhard GLUCK y Peter KLEIN

Nº de solicitud o patente: _____ Nº de certificado de apoderado: 101909.01

Presentado o emitido: _____

Para: VIROSOMAS CATIÓNICOS COMO SISTEMA DE TRANSFERENCIA PARA MATERIAL GENÉTICO

DECLARACIÓN POR LA QUE SE SOLICITA ESTATUS DE PEQUEÑA EMPRESA

(37 CFR 1.9 (y 1.27(c)) – PEQUEÑAS EMPRESAS

- el propietario de la pequeña empresa identificada a continuación:
- un miembro de la pequeña empresa a quien se han concedido poderes para actuar en nombre de la empresa identificada a continuación:

NOMBRE DE LA EMPRESA Nika Health Products Limited

DIRECCIÓN DE LA EMPRESA Stadtle 36, FL-9490 Vaduz, LIECHTENSTEIN

La pequeña empresa identificada anteriormente cumple los requisitos de pequeña empresa como se define en 15 CFR 121,3-1B y se reproduce en 37 CFR 1.9(d) a los efectos de pagar tasas reducidas según la sección 41(a) y (b) del Título 35 del Código de Estados Unidos, dado que le número de empleados de la empresa, incluyendo los de sus filiales, no excede de 500 personas. A los efectos de esta declaración (1) el número de empleados de la empresa es la media del anterior año fiscal de la empresa de personas empleadas a tiempo completo, a tiempo parcial o de forma temporal durante cada período de paga de los salarios del año fiscal y (2) las empresas son filiales de otras bien cuando directa o indirectamente una empresa controla o tiene el poder de controlar a la otra, bien cuando un tercero o terceros controla(n) o tiene(n) el poder de controlar a ambas.

Se conceden a la pequeña empresa identificada anteriormente los derechos derivados de contrato o de la ley, de los que continuará siendo titular, con respecto a la invención titulada: VIROSOMAS CATIÓNICOS COMO SISTEMA DE TRANSFERENCIA PARA MATERIAL GENÉTICO del/de los inventor(es) Ernst Rudolf WALTI, Reinhard GLUCK y Peter KLEIN descrita en:

- la solicitud presentada con la misma.
- la solicitud número _____, presentada el _____
- la patente número _____, emitida el _____

Si los derechos de los que es titular la pequeña empresa anteriormente identificada no son exclusivos, se menciona a continuación cada individuo, empresa u organización que tenga derechos sobre la invención y no corresponderá ningún derecho sobre la invención a ninguna persona distinta del inventor que no cumplierse las condiciones de inventor independiente de acuerdo con 37 CFR 1.9(c) si esa persona realizase la invención ni a ninguna empresa que no cumplierse las condiciones de pequeña empresa de acuerdo con 37 CFR 1.9(d) u organización sin ánimo de lucro de acuerdo con 37 CFR 1.9(e).

NOTA: Se requiere una declaración por separado de cada persona, empresa u organización mencionadas que tengan derechos respecto a la invención afirmando su estatus de pequeña empresa (37 CFR 1.27).

NOMBRE COMPLETO _____

DIRECCIÓN _____
- INDIVIDUO - PEQUEÑA EMPRESA - ORGANIZACIÓN SIN ÁNIMO DE LUCRO
NOMBRE COMPLETO _____
DIRECCIÓN _____
- INDIVIDUO - PEQUEÑA EMPRESA - ORGANIZACIÓN SIN ÁNIMO DE LUCRO

Asumo la obligación de notificar en esta solicitud o en otra relacionada cualquier cambio de estatus que resulte de la pérdida de la titularidad de pequeña empresa antes de pagar o en el momento de pagar la primera tasa de emisión o cualquier tasa de mantenimiento que se deba después de la fecha en que ya no sea de aplicación el estatus de pequeña empresa (37 CFR 1.28(b)).

NOMBRE ESCRITO A MÁQUINA DE LA PERSONA QUE FIRMA Wojeibeh Plasecki
DIRECCIÓN ESCRITA A MÁQUINA DE LA PERSONA QUE FIRMA Director

FIRMA (Firma ilegible) FECHA: 6 de octubre de 1999

11/97

VIROSOMAS CATIONICOS COMO SISTEMA DE TRANSFERENCIA PARA
MATERIAL GENÉTICO

Esta solicitud es una solicitud ampliación de la Solicitud de Patente EE.UU. N° 09/171.882, presentada el 30 de Diciembre de 1998, que a su vez es una solicitud a escala nacional de EE.UU. de
 5 PCT/EP97/02268, presentada el 4 de Mayo de 1997. La descripción completa de estas solicitudes anteriores está aquí incluida por la presente mediante referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

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

20 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los liposomas son ampliamente usados como transportadores para la distribución de fármacos y como protectores para sustancias farmacéuticas de corta vida media o contra ataques (bio)químicos por fluidos
 25 corporales. Los liposomas que contienen proteínas de membrana reconstituida o partes suyas de envueltas virales se llaman comúnmente "virosomas" (Sizer y col., Biochemistry (Bioquímica) 26:5106-5113, 1987). Se han aplicado para transporte no específico de varios
 30 fármacos y moléculas de DNA (Valstein y col., Methods Enzymol. (Métodos en Enzimología) 101:492-512, 1983). Resultó ser un gran inconveniente que estos virosomas fusionados con la membrana celular de las células diana produjeran una liberación incontrolada del material
 35 transportado en el citoplasma de las células diana

donde el material desprotegido era realmente atacado por los procesos degradativos intracelulares.

El documento WO92/13525, cuyos contenidos completos serán incorporados aquí por referencia, informa de que los virosomas hechos de membranas de bicapa de fosfolípidos que son dirigidos con proteínas de espículas virales del virus de la gripe y con marcadores específicos de célula como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, se fusionan muy eficientemente con membranas modelo y células animales debido a un mecanismo de penetración similar al de 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 la transferencia de moléculas cargadas como, por ejemplo, ácidos nucleicos cargados negativamente.

En los últimos años, la distribución, especialmente la distribución específica de célula, de material incorporado en liposomas ha ganado cada vez más atención e importancia, particularmente en lo referido a aplicaciones terapia anticáncer y terapia génica. Actualmente hay varios procedimientos disponibles para la distribución de DNA o RNA a las células: Procedimientos mediados por virus, procedimientos mediados por lípidos y otros procedimientos tales como microinyección y electroporación. Las ventajas y desventajas de las técnicas actuales de transferencia génica pueden resumirse como sigue:

a) *Transferencia génica mediada por virus:* Los genes pueden introducirse de forma estable y eficiente en células de mamífero mediante vectores retrovirales. Sin embargo, la eficiencia de transferencia génica a

células no replicativas es muy baja porque los retrovirus infectan sólo células en división. Es más, existe una preocupación general por la seguridad en el uso de vectores retrovirales relacionada con, por ejemplo, la posible activación de oncogenes. El adenovirus defectivo en replicación se ha convertido en el vector de transferencia génica de elección para una mayoría de investigadores. La distribución génica mediada por vector de adenovirus implica la inserción del gene deseado en partículas deleccionadas de adenovirus o la formación de un complejo entre el DNA que va a ser insertado y la cápsida viral del adenovirus mediante un puente transferente de polilisina. El inconveniente de este sistema tan eficiente *in vivo* es un riesgo indefinido de infección o inflamación: A pesar de la delección del gen. El que produce el virus defectivo para la replicación, el genoma restante del virus contiene numerosos marcos abiertos de lectura que codifican para proteínas virales (Yang y col. 1994; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4407-4411). La expresión de proteínas virales por parte de las células transducidas produce respuestas tanto humorales como celulares en el cuerpo animal y humano y, así, puede provocar inflamación y proliferación.

En el procedimiento mediado por VHJ (virus Sendai), el DNA foráneo está acomplejado con liposomas. Los liposomas se cargan entonces con virus Sendai inactivado (virus hemaglutinante de Japón; VHJ). Este procedimiento ya ha sido usado para transferencia génica *in vivo* a varios tejidos. Además, se ha publicado la incorporación celular de oligonucleótidos antisentido mediante liposomas VHJ (Morishita y col. 1993; J. Cell. Biochem. 17E, 239). Una especial desventaja es, sin embargo, que los liposomas VHJ

tienden a unirse de forma no específica a células sanguíneas rojas.

b) *Transferencia génica mediada por lípidos*: Los liposomas cargados positivamente hechos de lípidos catiónicos parecen ser seguros, fáciles de usar y eficientes para la transferencia *in vitro* de DNA y de oligonucleótidos antisentido. Los ácidos nucleicos con alta carga negativa interaccionan espontáneamente con los liposomas catiónicos. Con una simple mezcla de los polinucleótidos con los liposomas catiónicos formados previamente tiene lugar una formación completa de complejos DNA-liposoma. Sin embargo, debido a la ausencia de péptidos de fusión y marcadores específicos de célula en la membrana del liposoma la eficiencia de transfección *in vivo* es muy baja y los tiempos de incubación son largos, por lo que tienen que administrarse altas dosis para obtener un efecto deseado. En consecuencia, pueden ocurrir efectos secundarios no deseados dado que hay evidencia de que grandes cantidades de lípidos catiónicos pueden mostrar efectos tóxicos *in vivo*.

Se están probando actualmente oligonucleótidos pequeños como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer y como agentes antivirales. Se transcribe sólo una de las dos cadenas del DNA para sintetizar RNA mensajero (RNAm). La cadena de DNA transcrita en RNA se llama la cadena codificante o cadena sentido. La, cadena no codificante o antisentido complementaria tiene la misma secuencia que el RNAm. Cuando la cadena no codificante se transcribe, produce moléculas de RNA antisentido que son capaces de unirse al RNAm diana (sentido). Una vez que el RNA antisentido está unido al RNA sentido las moléculas de RNA dúplex resultantes no pueden traducirse y la producción de proteínas está bloqueada. Normalmente, oligonucleótidos antisentido

sintéticos cortos de 18 a 22 bases se unen eficazmente al RNAm e inhiben la traducción del RNAm. Mediante este mecanismo, los oligonucleótidos antisentido pueden parar la proliferación de células humanas cancerosas.

5 Los genes que están implicados en el cáncer producen su efecto a través de la sobreexpresión de sus proteínas estructurales normales. Genes tales como c-fos, c-myc, L-myc, N-myc, c-myb, abl, bcr-abl, c-raf, c-erb-2, K-ras pueden ser dianas potenciales para la terapia de

10 cáncer antisentido. Los oligonucleótidos antisentido son también una potencial y atractiva alternativa a los fármacos convencionales tales como, por ejemplo, agentes antivirales como, por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de los genes tat y gag del

15 virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Las membranas liposomales que contienen envueltas reconstituidas de virus como se describe en la literatura (Stegmann y col.; EMBO J. 6:2651-2659, 1987) pueden llamarse virosomas. Normalmente contienen una

20 bicapa fosfolipídica que contiene fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE) junto con la envuelta viral, por ejemplo, proteínas de espículas embebidas en la membrana. El procedimiento convencional de incorporar material genético en virosomas FC, FE tiene

25 el inconveniente de una eficiencia más bien baja de incorporación de ácido nucleico.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención por lo tanto está relacionada con un virosoma catiónico nuevo que, debido

30 a la composición específica de su membrana, puede cargarse muy eficazmente con cualquier material genético deseado, incluyendo DNA o RNA de cadena corta y larga, oligodesoxinucleótidos, ribonucleótidos, ácidos nucleicos péptido (NAP), ribozimas (moléculas de

35 RNA con actividades enzimáticas), genes, plásmidos y

vectores y, así, sobrepasan convincentemente los inconvenientes de la técnica anterior.

La invención además se relaciona con un procedimiento para la reconstitución eficiente de la hemaglutinina del virus A de la gripe, concretamente de la cepa A/Singapur, en vesículas sustancialmente unilamelares de lípidos catiónicos dando lugar a la formación de virosomas catiónicos con un diámetro medio de aproximadamente 120-180 nm y una bicapa lipídica continua, que está esencialmente libre del inconveniente de las pérdidas que se observa en muchas preparaciones de virosomas convencionales. La estructura de la membrana bicapa catiónica - preferiblemente unilamelar - es tal que las cabezas hidrofílicas cargadas positivamente de los lípidos están orientadas hacia la(s) fase(s) acuosa(s) y las colas hidrofóbicas de los ácidos grasos están orientadas hacia el centro de la bicapa. Pudo mostrarse por microscopía electrónica que las proteínas de espículas virales reconstituidas (hemaglutinina) están integradas en la bicapa lipídica y se extienden desde la superficie de las vesículas catiónicas (Fig. 1).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 muestra una micrografía de virosomas DOTAP con proteínas de espículas virales.

La Fig. 2 muestra la actividad de fusión inducida por pH de los virosomas DOTAP marcados con octadecil rodamina B con liposomas modelo.

La Fig. 3 muestra los virosomas DOTAP con FITC-FTO antisentido encapsulado incorporados en células de cáncer de pulmón humano de células pequeñas.

La Fig. 4 y la Fig. 5 muestran la extraordinaria eficiencia de incorporación y transfección de los virosomas DOTAP L-myc antisentido en células de cáncer de pulmón humano de células pequeñas.

La Fig. 6 muestra la incubación de diferentes células de cáncer de pulmón humano de células pequeñas con virosomas L-myc antisentido.

Las Fig. 7a y 7b muestran la eficiencia de transfección de virosomas DOTAP pRSVcat para células Jurkat.

Fig.8: Fusión de virosomas DOTAP con liposomas de fosfolípidos. La fusión se midió con el ensayo R18 a 37°C.

Fig. 9: Incorporación de timidina en células NCI-H209 tratadas con virosomas. Se añadieron 75 µl de virosomas que contenían 200 picomoles de FITC-FTO antisentido, sentido o smc y 625 µl de medio fresco que contenía 0,5 µCi de ¹⁴C-timidina a 5x10⁴ células/ml por pocillo.

Fig. 10: Inhibición dependiente de dosis de la incorporación de timidina en células NCI-H209 tras la adición de virosomas que contenían FTO-L-myc antisentido. Las células NCI-H209 se incubaron a una concentración inicial de células de 1x10⁵ por pocillo y por ml. Los valores son las medias ± las desviaciones estándar de tres experimentos.

Fig. 11: Incubación de diferentes líneas celulares de cáncer de pulmón humano de pequeñas células con 75 µl de virosomas L-myc antisentido. La expresión del oncogén L-myc disminuye en las líneas celulares como se indica: H82<H510A<H209. Los virosomas del lote 1 contenían una cantidad menor de L-myc antisentido que los del lote 2.

Fig. 12: Transfección de células Sp2 por dos preparaciones de virosomas diferentes.

Fig. 13: Transfección de células P3/NS1 por dos preparaciones de virosomas diferentes.

Fig. 14: Transfección de células NIH/3T3 con dos preparaciones de virosomas diferentes.

Figs. 15, 16, 17: Crecimiento celular de células KG1 tras en tratamiento con virosomas DOTAP c-myb sentido y antisentido. Adición de 25, 50 o 100 μ l de solución de virosomas que contenía 18, 36 o 72 pmol de FTO, respectivamente. Los valores son las medias $\pm$ las desviaciones estándar de tres experimentos.

Fig. 18: Crecimiento celular de células CEM-C3 tras en tratamiento con virosomas DOTAP a la adición de 50 μ l de solución de virosomas c-myb sentido y antisentido. Los valores son las medias $\pm$ las desviaciones estándar de tres experimentos.

Fig. 19: 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 DOTAP y liposomas DOTAP que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con ^3H .

Fig. 20: 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 DOTAP y liposomas DOTAP que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con ^3H .

Fig. 21: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. Se transfectaron 5×10^5 células de la línea celular de carcinoma epiteloide humano HeLa con virosomas DOTAP y liposomas DOTAP que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con ^3H .

Fig. 22: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. Se transfectaron 5×10^5 células de la línea celular de fibroblasto de ratón NIH3T3 con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con ^3H .

Fig. 23: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. Se transfectaron 5×10^5 células de la línea celular de leucemia mielógena crónica humana K562 con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con 3H .

Fig. 24: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. Se transfectaron 5×10^5 células de la línea celular de mieloma de ratón P3 con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con 3H .

Fig. 25: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. Se transfectaron 5×10^5 células de la línea celular de carcinoma epiteloidal humano HeLa con virosomas DOSPER y virosomas DOTAP que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con 3H .

Fig. 26: Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmídico incorporado. Se transfectaron 5×10^5 células de la línea celular de leucemia mielógena crónica humana K562 con virosomas DOSPER y virosomas DOTAP que contenían plásmido pGreen Lantern marcado con 3H .

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERENTES

La composición lipídica de la membrana de la vesícula contiene lípidos catiónicos y/o policationicos junto con fosfatidiletanolamina y opcionalmente otros fosfolípidos tales como fosfatidilcolina.

Para la mayoría de los casos, es ventajoso escoger una composición de lípidos de membrana que incluyan - referido a los lípidos totales - el 10% en peso o menos, preferiblemente 1-10%, de fosfatidiletanolamina
35 junto con el 90% o más, preferiblemente 90-99%, de

otros lípidos incluyendo los lípidos catiónicos y/o policationicos y opcionalmente además incluyendo fosfatidilcolina. Si está presente, la fosfatidilcolina debería estarlo en una cantidad de, por ejemplo, 5-50%
5 en peso, referido a los lípidos totales.

Es preferible la presencia de fosfatidiletanolamina (FE) en la membrana para anclar un marcador específico de célula al virosoma a través de un acoplador bifuncional. Donde no se requiere
10 dirigir los virosomas a células específicas (por ejemplo, para aplicación en cultivos de células definidos 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
15 estar opcionalmente ausente de la membrana del virosoma.

En una forma de realización preferida, la presente invención también está relacionada con el enlace covalente irreversible de marcadores específicos de
20 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
25 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.

El acoplamiento de marcadores específicos de célula tales como fragmentos de anticuerpo a vesículas
30 formadas previamente tal como se describió por, por ejemplo, Martin y col. (J. Biol. Chem. 257:286-288, 1982) a menudo lleva a rendimientos bajos y frecuentemente irreproducibles - una complicación que
35 impone una limitación significativa a la estrategia de

distribución. Por lo tanto, de acuerdo con una forma de realización preferible de la presente invención, 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, 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 agarosa activada, preferiblemente con Tiopropil Sefarosa 6B reducida. Después se añaden alícuotas de los marcadores conjugados purificados (complejos de moléculas 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 se formen los virosomas catiónicos.

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 reducir o incluso destruir las propiedades selectivas y - en último caso- puede llevar a la coagulación y precipitación de las vesículas.

El uso de fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ y Fab' en vez de las moléculas completas de anticuerpos como marcadores específicos de células es especialmente ventajoso, porque son menos inmunogénicos que el anticuerpo completo. Además, la ausencia del dominio Fc elimina una serie de indeseables actividades biológicas e inmunológicas mediadas por Fc tales como, por ejemplo, activación del complemento mediante la vía clásica y respuestas humorales agudas dando lugar eventualmente a -entre otros- la eliminación de los virosomas adosados de la superficie de la célula diana vía interacción entre el anticuerpo y su receptor Fc en la célula diana.

A diferencia de las composiciones de liposomas conocidos para la distribución de ácidos nucleicos, los virosomas catiónicos presentes normalmente no necesitan fusionarse con o desestabilizar la membrana plasmática celular para entrar al citoplasma. Ellos son capaces de entrar en las células huésped via un mecanismo de dos pasos: 1. unión y 2. penetración. En el primer paso se unen vía los péptidos de fusión (por ejemplo, hemaglutinina) y/o los marcadores específicos de célula a los receptores celulares, especialmente a las glicoproteínas o glicolípidos de la membrana con un ácido siálico en el extremo, y entonces son incorporados muy eficientemente por endocitosis mediada por receptor. En el caso de los virosomas que llevan

marcadores específicos de célula, por ejemplo, fragmentos de anticuerpo, estos marcadores reconocerán adicionalmente estructuras antigénicas en la superficie de la célula diana, dando lugar a una unión mediante dos mecanismos diferentes. Así, 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 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 a células tumorales o leucémicas que llevan los antígenos mencionados en su superficie celular.

En el segundo paso, cuando entran en las células huésped vía endocitosos mediada por receptor los virosomas quedan atrapados en endosomas. Subsecuentemente, el pH en los endosomas disminuye hasta aproximadamente pH 5-6, lo que inactiva el péptido de fusión de la hemaglutinina y desencadena la fusión de la membrana del virosoma con la membrana del endosoma. La reacción de fusión de membranas abre la envuelta lipídica de los virosomas y libera el material genético atrapado en el citosol. Este mecanismo mejora considerablemente las oportunidades del material genético transferido de alcanzar el núcleo antes de ser eliminado por degradación digestiva y/o exocitosis.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar vesículas de lípidos cargados positivamente que incluyen lípidos catiónicos o policatiónicos y un espacio interno - normalmente

acuoso - y además incluyen al menos un péptido viral de fusión embebido o integrado en o covalentemente unido a la membrana de la vesícula. Preferentemente, la vesícula también incluye al menos un marcador específico de célula en la membrana. Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar vesículas que tienen actividad biológica de fusión completa, es decir, que tienen esencialmente la misma actividad de fusión que el virus de la gripe intacto.

10 El péptido de fusión es una glicoproteína viral tal como la hemaglutinina o un derivado suyo o un péptido de fusión sintético que es capaz de inducir una rápida fusión de dichas vesículas con las membranas de los endosomas de las células diana tras la endocitosis.

15 Las nuevas vesículas o virosomas son especialmente útiles para transportar cualquier material genético que se desee a las localizaciones diana, en particular a células animales y humanas y tejidos *in vitro* e *in vivo*. Se recalca que los nuevos virosomas no son sólo

20 capaces de penetrar en células proliferantes, es decir, células 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 biociencias, farmacología y medicina, tanto como

25 herramienta de investigación y/o de diagnóstico y como medicamento. 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

30 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

35 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 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*.

En una forma de realización, las presentes vesículas se obtienen por un proceso que incluye una eficiente reconstitución de la hemaglutinina (HA) del virus A de la gripe. De acuerdo con esto, también es un objeto de la presente invención enseñar un procedimiento para preparar virosomas catiónicos. En una forma de realización preferida, el procedimiento además incluye los pasos de incorporar material genético en las vesículas lipídicas catiónicas. Básicamente, el procedimiento de preparación incluye los siguientes pasos:

- 1) Disolución de los lípidos catiónicos en un detergente no iónico, preferiblemente mono-n-dodediléter de octaetileneglicol (OEG, $C_{12}E_8$), junto con glicoproteínas de espículas virales - preferiblemente purificadas -, material genético que se desee o distribución y opcionalmente complejos moleculares formados previamente de fosfatidiletanolamina, acoplador y marcador específico de célula; y
- 2) formación de la vesícula a través de la eliminación del detergente - preferiblemente de forma repetida - mediante bolas micro-transportadoras que absorben detergente, preferiblemente bolas de poliestireno del tipo Biobolas SM-2 con un tamaño de malla

(húmedo) preferible de 20-50 (0,84-0,30 mm).

En una forma de realización preferida de la invención, se aplica un acoplador bifuncional apropiado para unir irreversiblemente el marcador específico de
5 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
10 preferible que el acoplador se use en la forma de un complejo molecular formado previamente donde el acoplador está covalentemente unido a fosfatidiletanolamina o a la vez a la fosfatidiletanolamina y a un marcador específico de
15 célula.

Debido a los péptidos de fusión funcionalmente activos de los presente virosomas el material encapsulado es liberado en el citosol de una célula diana principalmente por descenso del pH del endosoma
20 (como se subrayó más arriba). Tal liberación controlada por una parte prolonga el tiempo de residencia del material distribuido dentro de la célula diana y por otra parte evita una indeseable estancia larga de los virosomas dentro de los endosomas y con eso reduce el
25 peligro de degradación inespecífica de las valiosas sustancias transportadas por los virosomas.

En otra forma más de realización, la presente invención se refiere a vesículas donde los lípidos de membrana adicionalmente incluyen fosfatidilcolina y
30 fosfatidiletanolamina, lo que además mejora las posibilidades diseño de virosomas específicos y/o facilita el anclaje de los péptidos de fusión y/o marcadores específicos de célula a la membrana.

El término "péptido de fusión" se refiere a
35 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. Los péptidos de fusión sintéticos se seleccionan preferiblemente de las secuencias de aminoácidos listados en la Tabla 1 más bajo, donde los aminoácidos se identifican por sus correspondientes códigos de una letra (ver también el Ejemplo 6 y la Fig. 2 del documento WO92/13525).

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 la Serie EE.UU. N° 07/930.593 (cesionario: NIKA HEALTH PRODUCTS, LTD.), incorporado aquí por referencia.

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
5 invención, esta molécula contiene un grupo N-hidroxisuccinimida para acoplarse al grupo amino de la fosfatidiletanolamina y un grupo maleimida para la conjugación de fragmentos de un anticuerpo monoclonal, tal como succinimidil 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-
10 1-carboxilato, éster de m-maleimidobencil-N-hidroxisuccinimida, éster de m-maleimidobencil-N-hidroxisulfosuccinimida, succinimidil 4(p-maleimidofenil)-butirato, sulfosuccinimidil 4(p-maleimidofenil)butirato; o contiene un grupo N-
15 hidroxisuccinimida y un grupo azido fotorreactivo para el acoplamiento a citoquinas, tales como el N-hidroxisuccinimidilsuberato (NHS-SA), N-hidroxisuccinimidil-4-azidobenzoato (HASAB), N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenilamino)hexanoato
20 (SANPAH), N-sulfosuccinimidil-6-(4'-azido-2-nitrofenilamino)hexanoato.

Tabla 1:

	CCCGLFG	AIAGFIENGWEGMIDG	WYG
	GLFG	AIAGFIENGWEGMIDG	WYGCCC
5	CCCGLFG	AIAGFIENGWEGMIDG	
	GLFG	AIAGFIENGWEGMIDG	CCC
	CCCGLFE	AIAGFIENGWEGMIDG	
	GLFE	AIAGFIENGWEGMIDG	CCC
	CCCELFG	AIAGFIENGWEGMIDG	
10	ELFG	AIAGFIENGWEGMIDG	CCC
	CCCLFG	AIAGFIENGWEGMIDG	
	LFG	AIAGFIENGWEGMIDG	CCC
	CCC	PPGAVIGTIALGVATAAGIT	
		PPGAVIGTIALGVATAAGIT	CCC
15	CCC	PAGVVIGLAALGVATAAGTV	
		PAGVVIGLAALGVATAAGTV	CCC
	CCC	PIGAIIGGVALGVATAAGIT	
		PIGAIIGGVALGVATAAGIT	CCC

20 Es preferible que el acoplador se use en la forma de una complejo molecular formado previamente de acoplador y lípido, notablemente de acoplador y fosfatidiletanilamina, o de lípido más el acoplador más el marcador específico de célula.

25 El término "proteína específica de célula" o "marcador 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

30 de realización preferida de la presente invención, esta molécula se refiere a un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, una citoquina o un factor de crecimiento. El marcador específico de célula permite una detección selectiva y una unión de las células

35 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 F(ab')₂ y Fab', mientras que los marcadores específicos de célula además incluyen interleukinas y otras citoquinas, especialmente las enumeradas en la Tabla 2 de abajo.

Tabla 2

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
1-309/TCA-3	M-CSF	PBP	Tpo
γ IP-10	MIF	PBSF	Jvegf

El término "lípidio catiónico" 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-trimetilamoniometilsulfato (DOTAP); o N-t-butil-N'-tetradecil-3-tetradecilamoniopropionamidina (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 "lípidio policationico" 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 (DOTAP); yoduro de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis(2-hidroxietil)-2,3-dioleoiloxi-1,4-butanodiamonio (THDOB).

Los lípidos preferiblemente incluyen uno o más lípidos naturales o sintéticos que están cargados positivamente. 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. No se intenta incluir lípidos neutros, por ejemplo, fosfolípidos del tipo zwitterion, que tienen áreas cargadas positivamente pero que no presentan ninguna carga neta a pH fisiológico debido a la presencia de partes de la molécula cargadas negativamente que estequiométricamente anulan las cargas positivas.

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 oligodesoxirribonucleótidos (FTOs), fosforamidatos de oligodesoxirribonucleótidos, metilfosfonatos de oligodesoxirribonucleótidos, ácidos nucleicos péptidos (NAPs), ribonucleótidos, oligorribonucleótidos, fosforotioatos de oligorribonucleótidos, fosfatos de 2'-Ome-oligorribonucleótidos, 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 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 microcopía electrónica y difracción de luz dinámica.

El término "actividad (biológica) de fusión completa" como se usa aquí expresará que los virosomas

de la presente invención que incluyen proteínas virales reconstituidas en la membrana de la vesícula tienen esencialmente la misma actividad de fusión hacia las células diana que el virus intacto del cual están normalmente reconstituidos. Preferiblemente, la comparación de los virosomas catiónicos, la actividad de fusión es igual que la del virus de la gripe A intacto. La actividad de fusión se mide de acuerdo con procedimientos conocidos, particularmente como fue publicado por Hoekstra y col. (Biochemistry (Bioquímica) 23:5675-5681, 1984) o Luscher y col. (Arch. Virol. 130:317-326, 1993).

Antes de que la tecnología antisentido pueda aplicarse terapéutica o profilácticamente a un paciente que lo necesite tiene que resolverse de antemano varios problemas técnicos, especialmente relacionados con el desarrollo de un sistema de transporte adecuado. Por ejemplo, el material genético como, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, puede ser inestable y romperse o de otra manera ser más o menos inactivado antes de que alcance las células diana y puede así ser necesario el uso de grandes cantidades de tal material atrapado en liposomas catiónicos convencionales. Debido a estas grandes cantidades se eleva una duda acerca de la potencial toxicidad en el cuerpo humano o animal.

Usando los virosomas catiónicos de la presente invención como transportadores de material genético estos problemas pueden ser evitados con éxito y los efectos secundarios no deseados debidos a la toxicidad pueden prevenirse o al menos disminuir considerablemente. 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 hasta un factor de 1.000-20.000 para la transferencia

de material genético atrapado tal como oligonucleótidos antisentido en células diana. Como consecuencia, es casi imposible comparar la actuación de virosomas convencionales o liposomas catiónicos con la actuación de los presentes virosomas catiónicos. Para que la invención aquí definida pueda ser comprendida mejor, 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 una vesícula lipídica catiónica con trimeros de hemaglutinina viral del virus de la gripe con actividad de fusión completa que contenían encapsulados oligodesoxinucleótidos antisentido L-myc-FITC (= marcados con fluoresceína).

Preparación de virosomas DOTAP y virosomas DOTAP-Fosfatidilcolina (FC).

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 = $C_{12}E_8$), 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 6 mg de DOTAP 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 μ m 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 DOTAP.

Para la producción de virosomas DOTAP-FC se añadieron 3 mg de DOTAP y 3 mg de FC al sobrenadante que contenía 6 mg de HA y se disolvieron. Los pasos posteriores fueron los mismos descritos para los virosomas DOTAP.

Preparación de virosomas con péptido de fusión sintético.

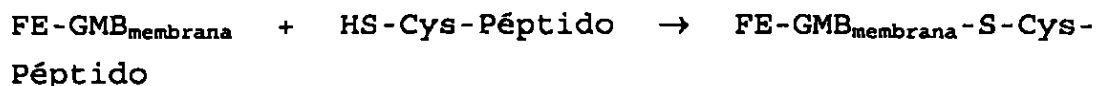
Una posibilidad de preparar virosomas catiónicos que lleven péptidos de fusión sintéticos en la membrana conlleva los siguientes pasos:

1. Activación de la fosfatidiletanilamina (FE) por el acoplador éster de N-[χ -maleimidobutiriloxisuccinimida (GMBS) en una reacción
- FE + GMBS $\rightarrow$ MBS-FE + N-Hidroxisuccinimida, como describieron Martin y col., Acoplamiento irreversible de fragmentos de inmunoglobulina a vesículas previamente formadas; J. Biol. Chem.

257:286-288 (1982).

2. Preparación de vesículas lipídicas con FE activada (GMB-FE), donde se disolvieron fosfatidilcolina al 20%, DOTAP al 70% y GMB-FE al 10% en una solución tamponada de detergente como se describió más arriba para los virosomas DOTAP que contenían HA. Los pasos siguientes para preparar las vesículas lipídicas son los mismos descritos más arriba para los virosomas DOTAP.
3. Acoplamiento del péptido sintético de fusión a las vesículas lipídicas, donde se usa un péptido que contiene 20 aminoácidos con la secuencia de aminoácidos G-L-F-E-A-I-A-G-F-I-E-N-G-W-E-G-M-I-D-C y que contiene un grupo amino libre en el extremo N y un grupo amido en el extremo C. Dado que el aminoácido en el extremo C es cisteína, hay un grupo tiol libre disponible para el acoplamiento del péptido al GMP-FE en la membrana de las vesículas lipídicas.

Para llevar a cabo la reacción de acoplamiento:



- se mezcló una solución de vesículas lipídicas recién preparadas en un tampón (ácido cítrico 40 mM, fosfato disódico 32 mM, NaCl 100 mM y EDTA 2 mM, pH 5,5) con la solución de péptido en el mismo tampón. La mezcla se agita suavemente bajo atmósfera de nitrógeno toda la noche a 4°C. Las vesículas lipídicas se separan de los péptidos no conjugados mediante filtración en gel en una columna de Alta Carga Superdex 200.

Como alternativa, los péptidos de fusión también pueden acoplarse a las vesículas lipídicas mediante complejos previamente formados de FE-acoplador-péptido

como se describe más abajo en este ejemplo para los fragmentos Fab'.

Incorporación de fosforotioato de oligodesoxirribonucleótidos en virosomas DOTAP.

5 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
10 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)
15 con la misma longitud de nucleótidos que las FTOs antisentido y sentido.

Se añadió 1 ml de virosomas DOTAP o virosomas DOTAP-FE a

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

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
25 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 DOTAP con el FITC-FTO
30 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.
35 Para la calibración de la escala de fluorescencia se

tomó como cero la fluorescencia de virosomas DOTAP vacíos que se disolvieron en la solución de detergente de más arriba.

5 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-
10 (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 µl de tampón de
15 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
20 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 neutralizó a pH 7,0. La solución
25 neutralizada se suplementó con OEG (54 mg/ml).

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

Observaciones de microscopía electrónica.

Las micrografías de los virosomas DOTAP confirman la estructura preferible unilamelar de las vesículas con un diámetro medio de aproximadamente 120 a 180 nm
35 como se determinó mediante difracción de luz láser. Las

espículas de proteína HA del virus de la gripe son claramente visibles (Fig. 1).

Determinación de la Actividad de Fusión de los Virosomas DOTAP.

5 La actividad de fusión de los presentes virosomas DOTAP se midió mediante el ensayo cuantitativo referido a el desapantallamiento de fluorescencia descrito por Hoekstra y col. (1984), Biochemistry 23:5675-5681 y L. Lüscher y col. (1993), Arch. Virol. 130:317-326. La
10 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 DOTAP mediante la adición de la solución OEG tamponada ($C_{12}E_8$) que contenía DOTAP y HA a una fina
15 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 una vesícula lipídica catiónica...". Se observó la dilución de la rodamina apantalladora
20 mediante incubación de los virosomas DOTAP marcados con rodamina con liposomas modelo (proporción de DOTAP/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
25 590 nm, respectivamente. La Fig. 2 muestra la reacción de fusión inducida por pH de virosomas DOTAP expresada como porcentaje de desapantallamiento de la fluorescencia (%DAF).

Incorporación celular de FITC-FTO-L-myc antisentido encapsulado.

Se comprobó que era muy útil marcar el FTO con fluoresceína para estudiar el mecanismo de incorporación celular de virosomas DOTAP.

Se cultivaron células de cáncer de pulmón humano
35 de células pequeñas (ATCC-NCI-H209) que expresan altos

niveles del gen L-myc (Nau y col. 1985; Nature 318, 69-73) en placas de cámaras de cultivo tisular de 2 pocillos (Nunc, Naperville, IL 60566, EE.UU.). Se añadieron 50 µl de virosomas-FITC-FTO a las células. Se
5 incubaron durante 5, 15 y 30 min a 37°C, se lavaron dos veces con PBS y luego se examinaron por microscopía de fluorescencia. Los virosomas DOTAP con FITC-FTO antisentido encapsulado se incorporaron rápidamente en las células como puede verse en la Fig. 3.

10 *Examen de efecto biológico de los virosomas DOTAP-FITC-FTO-L-myc antisentido medido por el procedimiento de incorporación de timidina.*

Se cultivaron células de cáncer de pulmón humano de células pequeñas (ATCC-NCI-H209 Colección Americana
15 de Cultivos Tipo, Rockville, EE.UU.) en placas Costar de 24 pocillos a una concentración inicial de 1×10^5 por pocillo y por ml. Tras una incubación de 24 horas, el medio fue eliminado y se añadieron 625 µl de medio fresco que contenía 0,5 µCi de ^{14}C -timidina (preparada
20 de (2- ^{14}C)-timidina, 52,0 mCi/mmol; Amersham, Inglaterra) y 75 µl de virosomas DOTAP que contenían 0,2 nmol de FITC-FTOs antisentido, sentido o scm. Los cultivos se agitaron suavemente con una agitación muy lenta durante 1 h a 37°C y luego se transfirieron al
25 incubador. Tras 48 horas las suspensiones celulares se sacaron, se transfirieron a tubos de centrifuga y se centrifugaron. Los precipitados celulares se lavaron dos veces. Cuando las células no se dispersaron lo suficiente en alguna suspensión celular, se expusieron
30 brevemente a una solución de tripsina/EDTA. Los precipitados celulares se disolvieron en 1,5 ml de una solución de NaOH/Tritón-X-100 0,1 M (0,1%). Se añadieron 3 ml de mezcla de líquido de centelleo (Proteína Preparada *, Beckman, Fullerton, CA, EE.UU.)
35 a 1 ml de solución. La radioactividad de ^{14}C se midió

en un contador de líquido de centelleo (Beckman, Fullerton, CA, EE.UU.).

Las Figuras 4 y 5 claramente demuestran la extraordinaria eficiencia de incorporación y transfección de los virosomas DOTAP-L-myc antisentido.

La Fig. 6 demuestra que las células que no expresan L-myc no están influenciadas o inhibidas por los virosomas L-myc antisentido. Además, los virosomas vacíos no presentan ningún efecto sobre las células cancerosas y las células normales. Por lo tanto, parece que una terapia anti-cáncer con FTO antisentido encapsulado en los presentes virosomas puede tener un gran potencial, especialmente por no tener las desventajas de los liposomas catiónicos convencionales mencionadas antes aquí.

Ejemplo 2.

Preparación de una vesícula lipídica catiónica con trómeros de hemaglutinina del virus de la gripe con actividad de fusión completa que contienen el vector pcDNA3 encapsulado con el gen humano IL-6 clonado en el sitio de poliligación (=pcDNA3-IL-6).

Preparación de virosomas DOTAP e incorporación de pcDNA3-IL-6.

pcDNA3 (Invitrogen Sociedad Anónima, San Diego, EE.UU.) es un vector de 5,4 kb diseñado para expresión estable y transitoria de alto nivel en huéspedes eucarióticos. La HA se aisló y purificó como se describió en el Ejemplo 1.

Se disolvieron 4 mg de DOTAP en 0,5 ml de la solución tamponada de detergente que contenía NaCl 145 mM, HEPES 2,5 mM y 54 mg/ml de OEG ($=C_{12}E_8$), pH 7,4 y se añadieron a 2 ml de un sobrenadante que contenía 4 mg de HA. A la mezcla resultante se añadieron 100 µg de pcDNA3-IL-6 y se disolvieron. La solución se sometió a ultrasonificación durante 30 segundos. El OEG se eliminó

con Biobolas como se describió en el Ejemplo 1.

Transfección de virosomas DOTAP cargados con pcDNA3-IL-6 en células de mieloma de murina.

La solución obtenida que contenía los virosomas
5 DOTAP cargados con pcDNA-IL-6 se diluyó 1:1000 con PBS.
20 µl y 50 µl de esta solución que contenían 1 ng y 2,5
ng de pcDNA-IL-6, respectivamente, se añadieron a 2×10^6
células de mieloma (P3/NS/1-Ag4-1; Colección Americana
de Cultivos Tipo, Rockville, EE.UU.). Tras 48 h de
10 incubación los sobrenadantes de los cultivos celulares
se ensayaron para IL-6 mediante un ensayo ELISA. Se
midió un contenido de 20 a 45 pg de IL-6 por ml.

*Comparación de la eficiencia de transfección de
virosomas DOTAP cargados con pcDNA-IL-6 con liposomas
15 DOTAP cargados con pcDNA-IL-6.*

No se encontró IL-6 en cultivos de células de
mieloma transfectadas con liposomas DOTAP
convencionales (que no tienen péptidos virales de
fusión) que contenían la misma cantidad de pcDNA-IL-6
20 que los virosomas DOTAP. Para obtener los mismos
resultados de transfección que con los virosomas DOTAP
cargados con pcDNA-IL-6 era necesario aumentar la
cantidad de liposomas DOTAP cargados con pcDNA-IL-6 por
un factor de mil 1000.

25 Ejemplo 3: Preparación de una vesícula lipídica
catiónica con trímeros de hemaglutinina del virus de la
gripe con actividad de fusión completa que contienen el
vector pRSVcat encapsulado.

*Preparación de virosmas DOTAP e incorporación de
30 pRSVcat.*

El vector de expresión pRSVcat (de la CACT,
Rockville, EE.UU) contiene el gen CAT que codifica para
la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).

La enzima cataliza la transferencia de un grupo
35 acetilo desde el acetil-CoA a la posición 3'-hidroxi

del cloranfenicol. Los vectores CAT son útiles para seguir la eficiencia de transfección en general.

pRSVcat se encapsuló en virosomas DOTAP en las condiciones descritas en el Ejemplo 2.

5 *Transfección de virosomas DOTAP cargados con pRSVcat en células Jurkat.*

Se incubaron células Jurkat (10^6 células/ml) con diferentes cantidades de virosomas DOTAP cargados con pRSVcat ($0,0001 \mu\text{l}$ - $25 \mu\text{l}$). Tras 48 horas de
10 incubación a 37°C se midió la actividad CAT en las células Jurkat mediante el ensayo CAT-ELISA (Boehringer Mannheim, Alemania).

Las Figuras 7a y 7b demuestran que se alcanza un máximo de transfección por la adición de $0,01 \mu\text{l}$ de
15 virosomas DOTAP. Contrariamente a lo mencionado más arriba, la adición de $0,01 \mu\text{l}$ de liposomas DOTAP cargados con pRSVcat a células Jurkat en las mismas condiciones de incubación no resultó en ninguna actividad CAT detectable.

20 Ejemplo 4: Incorporación de virosomas por las células.

La entrada de los virosomas en las células diana puede dividirse en dos diferentes pasos:

1. Unión.
- 25 2. Penetración.

La unión implica la unión de los virosomas vía HA a los receptores celulares que son glicoproteínas y glicolípidos de membrana con un ácido siálico final. En el caso de virosomas específicos los fragmentos Fab' reconocerán además estructuras antigénicas en la
30 superficie de la célula diana, dando lugar a una unión a las células diana mediante dos mecanismos de unión diferentes. Así, los virosomas específicos presentan una selectividad por tipos especiales de células. Los
35 virosomas con fragmentos Fab' que reconocen antígenos

asociados con tumores tales como TAG72, CEA, 17-1A, CA 19-9 o antígenos asociados con leucemia tales como CD10 (ALLAC) y CD20 se unirán selectivamente a células tumorales o leucémicas que llevan los antígenos mencionados en su superficie celular. Las glicoproteínas hemaglutinina se aíslan y purifican cuidadosamente. No hay inactivación por digestión proteolítica o por reducción de sus puentes disulfuro (-S-S-) intramoleculares.

La penetración implica la entrada de los virosomas en las células por endocitosis mediada por receptor. Los virosomas quedan atrapados en endosomas. El pH ácido (5-6) dentro de los endosomas dispara la fusión de la membrana del virosoma con la membrana del endosoma. La fusión está mediada por la glicoproteína de espículas virales hemaglutinina (HA). La reacción de fusión de membranas en el endosoma libera el virosoma de su envuelta lipídica y da acceso a los fármacos encapsulados al citosol. La actividad de fusión de estas preparaciones de virosomas se analizó mediante desapantallamiento de la fluorescencia. Los virosomas se marcaron con la sonda fluorescente octadecil rodamina B (R18) y se siguió la actividad de fusión de la HA como desapantallamiento de la fluorescencia debido a la dilución de la sonda de la membrana del virosoma a la de un liposoma diana. La fig. 8 muestra la fluorescencia observada tras la adición de virosomas DOTAP, marcados con R18, a los liposomas de fosfolípidos. La fluorescencia comenzó a aumentar rápidamente indicando una fusión mediada por HA intacta.

Incorporación en las células dependiente del tiempo.

La incorporación de virosomas se midió mediante incubación de las células con virosomas marcados con

¹⁴C. Se incubaron células P3/NS1 a una concentración de 1x10⁵/ml con 40 µl de virosomas a 37°C durante 5, 10, 15, 20 y 30 minutos. Tras el lavado, las células se lisaron y se midió la cantidad de virosomas marcados con ¹⁴C. Como puede verse en la Tabla 3, la incorporación en las células es muy rápida: Durante los primeros cinco minutos se incorporó el 10% de los virosomas. Tiempos de incubación más largos no aumentaron más la incorporación. 1 ml de solución de virosomas contenía aproximadamente 10¹¹-10¹² virosomas, por lo tanto se incorporaron 4.000-40.000 virosomas por célula en 5 minutos.

Tabla 3

Tiempo de incubación [min]	Dpm
5	6414
10	6832
15	6096
20	6610
30	6626

Ejemplo 5: Estrategias antisentido en el tratamiento de los cánceres.

Los llamados oligodesoxinucleótidos (ODN) "antisentido" son secuencias nucleotídicas cortas de DNA sintetizadas como complementarias reversas de la secuencia nucleotídica del RNAm diana deseado. Mediante formación del dúplex RNA-DNA se evita la traducción del mensaje y se promueve la destrucción de la molécula por la Rnasa H. La distribución de ODN dirigidos al mRNA codificado por oncogén hacia las células cancerosas puede asociarse con la inhibición de la proliferación celular y, en algunas circunstancias, la muerte celular.

Los ODN antisentido tienen un gran potencial como agentes terapéuticos. Muchos estudios preclínicos en animales así como ensayos clínicos de Fases I-III han mostrado que los ODN antisentido dirigidos contra
5 oncogenes y genes virales son terapéuticamente activos.

La transferencia de moléculas funcionales de DNA en células mediante liposomas cargados de DNA o virosomas convencionales no es muy eficiente. Por ello se desarrollaron los virosomas con una bicapa lipídica
10 cargada positivamente (catiónica) para la transferencia de material genético. La bicapa lipídica cargada positivamente interacciona con los ácidos nucleicos y causa su concentración dentro de las vesículas formadas.

15 Virosomas-L-myc antisentido.

El gen L-myc, descubierto por primera vez en una línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), está frecuentemente amplificado y sobreexpresado en CPCP. Se sintetizaron 5'-FITC-
20 fosforotioatos de oligodesoxirribonucleótidos (FTO) 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,
25 respectivamente. Se sintetizó una FTO con secuencia control mezclada (scm) con la misma longitud de nucleótidos que los FTO antisentido y sentido. El FTO antisentido que cubre el sitio de iniciación de la traducción actúa inhibiendo la traducción por parte de
30 los ribosomas del RNAm diana. Se encapsularon fosforotioatos de oligodesoxirribonucleótidos L-myc antisentido en los virosomas. Se evaluó el efecto antiproliferativo del DNA L-myc antisentido encapsulado en virosomas en las líneas celulares CPCP H209, H510 y
35 H82. Se añadieron virosomas L-myc antisentido a las

células de las líneas celulares de cáncer de pulmón humano de células pequeñas. Se usaron como controles virosomas L-myc sentido y virosomas scm (secuencia control mezclada) (Fig. 9).

5 Los virosomas L-myc antisentido fueron 20.000 veces más activos que los FTO antisentido no encapsulados. Para inducir los mismos efectos que se vieron en la Fig. 10 tienen que añadirse a los cultivos celulares FTO L-myc antisentido no encapsulados en el
10 intervalo de micromoles. Por lo tanto, los virosomas catiónicos son mucho más eficaces en la distribución de ODN que la incorporación celular de ODN no encapsulado y también más eficaces que los liposomas catiónicos.

El efecto inhibidor del crecimiento de los
15 virosomas L-myc antisentido se correlaciona con los niveles de expresión de L-myc en las tres líneas celulares, H209, H510 y H82. Se concluye de la Fig. 11 que aquellas células que no expresan el gen L-myc no están influenciadas por los virosomas L-myc
20 antisentido. Los virosomas catiónicos vacíos no mostraron ninguno o sólo efectos menores en las células normales y las células cancerosas. Dado que el gen L-myc está frecuentemente amplificado y sobreexpresado en SCLC y muy restringido y expresado a bajo nivel en
25 tejidos humanos adultos, L-myc podría ser una buena diana para una terapia con virosomas antisentido.

Ejemplo 6: Transferencia no infecciosa de vectores basados en plásmidos para terapia génica: transfección de vectores para expresión en mamíferos mediante
30 virosomas catiónicos.

Las aproximaciones actuales a la terapia génica del cáncer usan vectores basados en plásmidos para expresar genes diana adecuados en células cancerosas humanas ex vivo o in vivo. Se evalúan las siguientes
35 dianas génicas terapéuticas: Genes de susceptibilidad

tales como los genes de la quinasa de la timidina del virus de herpes simple (QT-HSV) (Moolten FL; Cancer Res. 46:5276-5281, 1986); genes que se dirigen al sistema inmune para eliminar las células cancerosas
5 tales como genes de citoquinas (Tepper RI y col.; Cell 57:503-512, 1989), genes que codifican para moléculas coestimuladoras (Townsend SE y col.; Science 259:368-370, 1993), genes de histocompatibilidad a foráneos (Plautz GE y col. Proc Natl Acad Sci USA 90: 4645-4649,
10 1993); y reemplazamiento de genes silvestres supresores de tumores tales como p53 (Chen PL y col.; Science 250:1576-1580, 1990).

A causa de ciertas limitaciones de los vectores basados en virus actualmente usados para la terapia
15 génica como, por ejemplo, la ausencia de especificidad al dirigirse a las células tumorales para la transferencia génica y a causa de problemas de seguridad relacionados con la posible inducción de malignidades secundarias y la posibilidad de
20 recombinación para formar virus competente en replicación, hacía falta desarrollar una tecnología de transferencia génica no infecciosa para la distribución de genes in vivo de vectores de expresión basados en plásmidos. El uso de los virosomas catiónicos aquí
25 explicados es una alternativa prometedora de una tecnología de transferencia génica no infecciosa mediada por receptor.

Las eficiencias de transfección típicas usando lípidos comerciales disponibles están entre 5-50%. Los
30 virosomas no sólo proporcionan una mayor eficiencia de transfección que los lípidos comerciales disponibles, sino que el atrapamiento del DNA en los virosomas produce también una transformación estable de las células.

35 El gen de la interleukina 6 humana (IL-6) se clonó

en el sitio de multiclonación de pcDNA3, un vector de 5,4 kb diseñado para expresión estable y transitoria a alto nivel en huéspedes eucarióticos. El vector contiene el marcador de resistencia a neomicina, expresada desde el promotor temprano de SV40 para la selección de transformantes estables en presencia de G418.

La encapsulación del vector se llevó a cabo por 3 diferentes procedimientos:

- 1. Diálisis: Los plásmidos se encapsularon durante la formación de los virosomas. El detergente Octil-POE (de Alexis S.A., Laeufelfingen, Suiza) se eliminó mediante diálisis.
- 2. Biobolas: Los plásmidos se encapsularon durante la formación de los virosomas. El detergente OEG se eliminó mediante Biobolas.
- 3. Ultrasonificación: Los plásmidos se encapsularon mediante DOTAP y los liposomas DOTAP obtenidos se fusionaron con virosomas DOTAP mediante ultrasonificación.

El DNA de pcDNA3-IL-6 marcado con ¹⁴C se hizo para medir la cantidad de plásmido encapsulado.

Procedimiento de encapsulación	Cantidad de plásmido encapsulado
Diálisis (1)	0,02 µg de DNA por µl de virosomas
Biobolas (2)	0,009 µg de DNA por µl de virosomas
Ultrasonificación (3)	0,04 µg de DNA por µl de virosomas

Se transfectaron células Sp2/0-Ag14 (Híbridas, no secretoras, de ratón; ID-Nº: ATCC CRL-1581; aquí llamadas Sp2), células Pe/NSI/1-Ag4-1 (Mieloma no secretor, de ratón; ID-Nº: ATCC TIB-18, aquí llamadas P3/NSI) y células NIH/3T3 (Embrión, contracción inhibida, de ratón Suizo NIH; ID-Nº ATCC CRL-1658) a una concentración celular de 1x10⁵ en 1 ml de medio con

las preparaciones de virosomas (1)-(3). Diez días tras la transfección las cantidades de IL-6 expresado se midieron mediante ELISA (Fig. 12, Fig. 13, Fig. 14). Todas las líneas celulares están disponibles en ATCC,
5 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, EE.UU.

Las células transfectadas Sp2 y P3/NS1 se seleccionaron dos veces mediante G418. Tras 2 meses de cultivo se midió otra vez la producción de IL-6. Los valores figuran en la Tabla 4.

10 Tabla 4: Producción de IL-6 en células transfectadas tras reselección con G418.

Línea celular		Procedimiento de preparación	Número de células por ml	Número total de células	IL-6 [pg/ml]	Cantidad total de IL-6 [pg]	IL-6 [pg/10 ⁶ células]
P3/NS1	Precipitado de células	Diálisis	1,2x10 ⁶	6,0x10 ⁶ 3 ml de tampón	277	831	138
		Biobolas	1,6x10 ⁶	7,8x10 ⁶ 4 ml de tampón	32	128	16
		Ultrasonificación	1,54x10 ⁶	8,0x10 ⁶ 4 ml de tampón	2889	1156	144
P3/NS1	Sobrenadante	Diálisis		5 ml sobren.	8	40	6,7
		Biobolas		4,9 ml sobren.	4	20	2,5
		Ultrasonificación		5,2 ml sobren.	25	130	16,2

Sp2	Precipitado de células	Diálisis	2,25 x10 ⁶	1,13 x10 ⁷ 5,5 ml de tampón	>1200	>6600	>584
		Biobolas	1,8 x10 ⁶	9,5 x10 ⁶ en 4,5 ml de tampón	232	1044	110
		Ultrasonica ción	2,8 x10 ⁶	1,37 x10 ⁷ 7 ml de tampón	680	4760	347
Sp2	Sobrenadante	Diálisis		5 ml sobren.	268	1340	119
		Biobolas		5,2 ml sobren.	8	42	4,4
		Ultrasonica ción		4,9 ml sobren.	651	3190	233

El volumen de tampón de lisis añadido a los precipitados de células se ajustó para obtener un número aproximado de 2x10⁶ por ml.

5 Ejemplo 7: Estrategias antisentido en el tratamiento de leucemias.

La anormalidad genética más común en leucemias humanas es la translocación del Cromosoma Filadelfia (F¹). La translocación del protooncogén abl del cromosoma 9 a la región del grupo de ruptura (bcr) en el cromosoma 22 da lugar a la formación de los genes híbridos bcr-abl. El protooncogén normalmente codifica para una proteína con actividad quinasa de la tirosina que está aumentada en las células que llevan los genes híbridos bcr-abl. Los transcritos bcr-abl se encuentran en la inmensa mayoría de los pacientes con leucemia mielógena crónica (LMC) y en pacientes con leucemia linfocítica aguda F¹. La dirección de genes bcr-abl en LMC es claramente el procedimiento terapéutico más racional. Se demostró que ODN sintéticos

10

15

complementarios a la unión de los transcritos bcr-abl producidos por el procesamiento del segundo o del tercer exón de c-abl podían suprimir la proliferación de células leucémicas Filadelfia 1 in vitro y permitir el crecimiento de las progenitoras de médula normales (Szczylik C y col.; Science 253:562-565, 1991). Sin embargo, la terapia antisentido bcr-abl está restringida a pacientes con LMC.

Otra diana molecular para terapia antisentido es el gen myb. Myb, el producto codificado por es protooncogen c-myb, funciona como un factor de transcripción específico de unión a DNA. Se expresa preferentemente en células hematopoyéticas y se requiere para la proliferación de células hematopoyéticas. Un ODN 18-mer antisentido dirigido a los codones 2-7 de c-myb inhibió fuertemente o eliminó completamente el crecimiento clonogénico de una línea de leucemias de células T (CCRF-CEM), así como el 78% de los casos examinados de leucemia mielógena primaria aguda y 4 de 5 casos de leucemia mielógena primaria crónica (CML) en crisis repentina (Calabretta B y col.; Proc Natl Acad Sci USA 88:2351-2355, 1991).

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.

Virosomas c-myb antisentido.

Se prepararon FTO sentido y antisentido correspondientes a los codones 2-9 de c-myb. Las secuencias c-myb sentido y antisentido eran 5'-
5 GCCCGAAGACCCCGGCAC-3' Y 5'-TGTGCCGGGTCTTCGGGC-3',
respectivamente. La encapsulación del FTO en virosomas DOTAP se llevó a cabo por el mismo procedimiento usado para los virosomas DOTAP L-myc. La línea celular de leucemia mieloide humana KG-1 y la línea celular de
10 leucemia linfoblástica aguda humana CEM-C3 se sometieron a virosomas c-myb sentido y antisentido. La proliferación de las células KG-1 depende del producto del protooncogén myb, mientras que las células CEM-C3 no dependen del producto del gen myb. Las células KG-1
15 se incubaron con 25, 50 y 100 µl de virosomas c-myb sentido y antisentido que contenían 18, 36 y 72 pmol de OPT sentido y antisentido, respectivamente. Se determinó en número de células a los 2, 3 y 4 días.

La adición de 25 µl de virosomas c-myb sentido y
20 antisentido tuvo sólo efectos marginales sobre el crecimiento celular (Fig. 15). Sin embargo, la adición de 50 µl (Fig. 16) y 100 µl (Fig. 17) inhibió fuertemente el crecimiento celular. Mayores dosis de virosomas c-myb sentido también mostraron efectos
25 inhibitorios. Se asume que estos efectos no estaban provocados por la membrana del virosoma, porque las células CEM-C3 no estaban influenciadas por las mismas preparaciones de virosomas (Fig. 18).

Ejemplo 8: Virosomas DOSPER: Reactivo para la
30 Transfección de Células Eucarióticas; transfección de plásmido marcado con ³H mediante virosomas DOSPER; una comparación de virosomas DOSPER con liposomas DOSPER.

El plásmido pGEEN LANTERNTM-I (GIBCO-BRL) se produjo en presencia de ³H-metilimidina. Se
35 encapsularon 33 µg de DNA de plásmido marcado en

virosomas DOSPER y 11,7 µg en liposomas DOSPER.

La bicapa lipídica de los virosomas DOSPER consiste en 25% de DOSPER y 75% de FC (fosfatidilcolina). Es imposible producir virosomas DOSPER con una bicapa de 100% DOSPER. En particular, se ha encontrado que si la concentración de DOSPER en la mezcla de reacción es mayor de, por ejemplo, 30%, los virosomas no pueden formarse.

5x10⁵ células de cada tipo celular se incubaron en 500 µl de medio con 25 µl 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 marcado que correspondía a una radiactividad de 26.500 dpm. Tras la incubación, las células se lavaron, se lisaron y se midió la radiactividad. Se evaluó la influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA de plásmido incorporado con varias líneas celulares y los resultados están representados en las Figuras 19-26. La Breve Descripción de las Figuras de más arriba resume las líneas celulares en cada una de las Figuras.

Las Figuras 19-24 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.

10 Ejemplo 9: Una comparación de virosomas DOSPER y virosomas DOTAP.

La misma cantidad de plásmido marcado con ^3H tal y como se describió en el Ejemplo 8 para los virosomas DOSPER se encapsuló en los virosomas DOTAP. Las células HeLa y K562 se incubaron con virosomas DOTAP en las mismas condiciones que se describieron más arriba en el Ejemplo 8. Los resultados se representan en las Figuras 25 y 26.

Los resultados en la Figuras 25 y 26 demuestran que la eficiencia de transfección de los virosomas DOTAP es menor que la de los virosomas DOSPER. Las razones de por qué no están claras. 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 transfección. 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 catiónicos DOTAP, usados más frecuentemente.

Abreviaturas usadas en la descripción.

5	2'-OMe	2'-O metil
	ALLAC	antígeno de la leucemia linfoblástica aguda común
	CAT	cloranfenicol acetiltransferasa
	DOTAP	N-[(1,2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonioetil-sulfato
10	DOTMA	cloruro de N-[(1,2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio
	FITC-FTO	fosforotioato de oligodesoxirribonucleótido marcado con isotiocianato de fluoresceína
15	G418	disulfato de Geneticin® (antibiótico G418)
	HA	hemaglutinina
	MFB.FE	N-[4-(p-maleimido)-fenilbutiril]-fosfatidiletanolamina (= un complejo acoplador-fosfolípido)
20	scm	secuencia control mezclada
	NA	neuraminidasa
	Octil-POE	n-octil-oligo-oxietileno
	ODN	oligodesoxinucleótidos
	OEG	monododeciléter de octaetileneglicol
25		(C12E8)
	OPT	fosforotioato(s) de oligodesoxirribonucleótido
	FC	fosfatidilcolina
	FE	fosfatidiletanolamina
30	NAP	ácido nucleico péptido
	CCPP	cáncer de células pequeñas de pulmón
	SV40	virus de Simio 40

REIVINDICACIONES

1. Una vesícula de bicapa lipídica que tiene dentro al menos un fármaco o sustancia farmacéuticamente activa deseados, comprendiendo dicha vesícula:
 - a) una membrana que tiene fosfatidiletanolamina (FE) en combinación con uno o más lípidos incluyendo lípidos naturales o sintéticos que tiene carga neta positiva;
 - b) al menos un péptido de fusión activo que es una hemaglutinina viral, que es capaz de provocar que las vesículas sean incorporadas por células diana a través de fagocitosis o endocitosis y que presenta actividad inductora de fusión a pH ácido dentro de un intervalo de pH5 a pH7; estando dicha hemaglutinina adosada directa o indirectamente a dicha membrana;
 - c) un acoplador bifuncional unido a la fosfatidiletanolamina (FE) de dicha membrana; y
 - d) al menos un marcador específico de célula unido vía un azufre del marcador específico de célula al acoplador unido a FE, siendo dicho marcador una proteína biológicamente activa para unirse a un receptor de las células diana.
2. La vesícula según la reivindicación 1, donde la membrana incluye - referido a los lípidos totales - 10% en peso o menos de fosfatidiletanolamina y 90% en peso o más de dichos otros lípidos incluyendo lípidos cargados positivamente.
3. La vesícula según la reivindicación 1, donde el marcador específico de célula se selecciona del

grupo formado por un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una citoquina y un factor de crecimiento.

- 5 4. La vesícula según la reivindicación 1, donde los lípidos cargados positivamente incluyen al menos un lípido catiónico o policationico seleccionado del grupo que consiste en cloruro de N-[(1,2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA); N-[(1,2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonioetil-sulfato (DOTAP); N-t-butil-N'-tetradecil-3-tetradecilaminopropionamida; 1,3-dipalmitoil-2-fosfatidiletanolamidoespermina (DPFES); dioctadecilamidoglicil-espermina (DOGS); 15 2,3-dioleoiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanoaminiofluoroacetato (DOSPA); 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER); y yoduro de N,N,N',N'-tetrametil-N,N'-bis(2-hidroxietil)-2,3-20 dioleoiloxi-1,4-butanediamonio (THDOB).
5. La vesícula según la reivindicación 4, donde la membrana incluye del 5 al 30% en peso, referido a los lípidos totales, de 1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER). 25
6. La vesícula según la reivindicación 1, donde el fármaco o sustancia biológicamente activa deseada es un material de ácido nucleico. 30
7. La vesícula según la reivindicación 6, donde dicho material de ácido nucleico atrapado en dicha vesícula es seleccionado del grupo que consiste en DNA o RNA de cadena corta, desoxirribonucleótidos, 35 oligodesoxirribonucleótidos, selenoatos de

- oligodesoxirribonucleótido, fosforotioatos de
oligodesoxirribonucleótido, fosforamidatos de
oligodesoxirribonucleótido, metilfosfonatos de
oligodesoxirribonucleótido, ácidos nucleicos
5 péptidos, ribonucleótidos, oligorribonucleótidos,
fosforotioatos de oligorribonucleótido, fosfatos
de 2'-Ome-oligorribonucleótido, fosforotioatos de
2'-Ome-oligorribonucleótido, ribozimas, genes,
plásmidos y vectores.
- 10
8. La vesícula según la reivindicación 1, donde su
diámetro está en el intervalo de 120-180 nm.
9. La vesícula según la reivindicación 1, donde la
15 hemaglutinina es inductora de fusión a pH ácido
dentro del intervalo de pH7-pH5 y deriva de un
virus seleccionado del grupo que consiste en
rhabdovirus, virus parainfluenza tipo III, virus
Semliki Forest y togavirus.
- 20
10. Un procedimiento de fabricación de una vesícula de
bicapa lipídica que tiene una membrana que
contiene lípidos naturales o sintéticos que tienen
una carga positiva neta junto con
25 fosfatidiletanolamina, al menos un péptido viral
activo inductor de la fusión integrado en o unido
covalentemente a la membrana, al menos un marcador
específico de célula adosado a la membrana y un
material de ácido nucleico deseado, incluyendo los
30 pasos de
- (a) disolver el virus purificado con una solución
de detergente no iónico y separar de ello una
fracción que contenga hemaglutinina;
- 35 (b) preparar complejos de moléculas conjugadas

- que consisten en fosfatidiletanilamina (FE), un acoplador bifuncional y un marcador específico de célula en tal manera que el acoplador bifuncional con un sitio de unión de
- 5 une al grupo amino de la FE y con otro a un grupo tiol del marcador específico de célula, y eliminar el material no conjugado;
- (c) preparar una solución que contiene: un detergente no iónico tamponado; hemaglutinina
- 10 viral obtenida en el paso (a); lípidos naturales o sintéticos diferentes de FE incluyendo lípidos que tienen una carga positiva neta; y al menos un marcador específico de célula en la forma de dichos
- 15 complejos moleculares formados previamente de FE/acoplador/marcador;
- (d) ajustar las concentraciones de lípidos a - referido a los lípidos totales - 10% en peso o menos de fosfatidiletanolamina y a 90% en
- 20 peso o más de dichos lípidos naturales o sintéticos diferentes de FE incluyendo lípidos que tienen una carga positiva neta;
- (e) eliminar el detergente tratando la solución con bolas microtransportadoras, dando lugar a
- 25 la formación de virosomas dirigidos cargados positivamente; y
- (f) incorporar en los virosomas una cantidad de material de ácido nucleico deseado.
- 30 11. El procedimiento según la reivindicación 10, donde dichos lípidos diferentes de FE incluyen fosfatidilcolina.
12. El procedimiento según la reivindicación 10, donde
- 35 dichas bolas microtransportadoras son bolas de

1-80-785

poliestireno que tienen un tamaño de malla neto de 20-50 (0,84-0,30 nm).

13. El procedimiento según la reivindicación 10, donde
5 la incorporación de material de ácido nucleico en los virosomas se lleva a cabo añadiendo a los virosomas resultantes del paso (e) el material de ácido nucleico deseado, sonicando la mezcla para integrar el material en las vesículas y eliminando
10 el material no integrado.
14. El procedimiento según la reivindicación 13, donde el material no integrado se elimina mediante filtración en gel.
- 15
15. El procedimiento según la reivindicación 10, donde la incorporación de material de ácido nucleico en los virosomas se lleva a cabo añadiendo a los virosomas resultantes del paso (e) liposomas
20 cargados positivamente que contienen el material de ácido nucleico deseado y sonicando la mezcla para fusionar los liposomas con los virosomas para integrar el material de ácido nucleico en los virosomas.
- 25
16. El procedimiento según la reivindicación 8, donde lípidos cargados positivamente incluyen al menos un lípido catiónico o policationico seleccionado del grupo que consiste en cloruro de N-[(1,2,3-
30 dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA); N-[(1,2,3-dioleoiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonioetil-sulfato (DOTAP); N-t-butil-N'-tetradecil-3-tetradecilaminopropionamidina; 1,3-dipalmitoil-2-fosfatidiletanilamidoespermina
35 (DPFES); dioctadecilamidoglicilespermina (DOGS);

- 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-
N,N-dimetil-1-propanoaminiofluoracetato (DOSPA);
1,3-dioleiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-
propilamida (DOSPER); y yoduro de N,N,N',N'-
5 tetrametil-N,N'-bis(2-hidroxietil)-2,3-
dioleiloxi-1,4-butanediamonio (THDOB).
17. El procedimiento según la reivindicación 8,
donde los lípidos cargados positivamente
10 incluyen del 5 al 30% en peso de 1,3-dioleiloxi-
2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER),
referido a los lípidos totales.
18. El procedimiento según la reivindicación 10, donde
15 la relación en peso de la hemaglutinina a los
lípidos totales de membrana se ajusta
aproximadamente a 1 (mg/mg) o menos.
19. El procedimiento según la reivindicación 10, donde
20 el marcador específico de célula se selecciona del
grupo formado por un anticuerpo, un fragmento de
anticuerpo, una citoquina y un factor de
crecimiento.
20. El procedimiento según la reivindicación 19, donde
25 el marcador específico de célula es un fragmento
Fab' o F(ab')₂ y se aplica en una relación en peso
de hemaglutinina a fragmento Fab' o F(ab')₂ de
alrededor de 2:1.
21. El procedimiento según la reivindicación 10, donde
30 el material de ácido nucleico deseado se
selecciona del grupo que consiste en DNA o RNA de
cadena corta, desoxirribonucleótidos,
35 oligodesoxirribonucleótidos, selenoatos de

- oligodesoxirribonucleótido, fosforotioatos de
oligodesoxirribonucleótido, fosforamidatos de
oligodesoxirribonucleótido, metilfosfonatos de
oligodesoxirribonucleótido, ácidos nucleicos
5 péptidos, ribonucleótidos, oligorribonucleótidos,
fosforotioatos de oligorribonucleótido, fosfatos
de 2'-Ome-oligorribonucleótido, fosforotioatos de
2'-Ome-oligorribonucleótido, ribozimas, genes,
plásmidos y vectores.
- 10
22. El procedimiento según la reivindicación 10, donde
la solución de detergente no iónico incluye $C_{12}E_8$
(monododeciléter de octaetileneglicol) o n-octil-
oligooxietileno.
- 15
23. El procedimiento según la reivindicación 10, donde
el agente acoplador es una molécula orgánica
heterobifuncional que tiene al menos un grupo
maleimido y al menos un grupo carboxilo.
- 20
24. El procedimiento según la reivindicación 23, donde
el agente acoplador se selecciona del grupo que
consiste en derivados de bis-N-succinimidil y
derivados de succinimidil fotoactivable.
- 25
25. El procedimiento según la reivindicación 10, donde
en el paso (b), el marial no conjugado se elimina
mediante cromatografía de afinidad usando una
matriz de agarosa.
- 30
26. Una vesícula de bicapa lipídica obtenida mediante
el proceso de la reivindicación 10.
- 35
27. Un procedimiento para llevar a cabo terapia génica
no infecciosa, incluyendo distribución de un

- material de ácido nucleico deseado a células diana en reposo o en proliferación vía la vesícula de bicapa lipídica cargada de la reivindicación 1 para la eficiente transferencia de dicho material a las células diana.
- 5
28. El procedimiento según la reivindicación 27, donde las células diana se seleccionan el grupo que consiste en células cancerosas, células leucémicas y células infectadas por virus y la actividad metabólica o proliferativa de dichas células diana se reduce tras la administración de los virosomas.
- 10
29. El procedimiento según la reivindicación 27, donde dicho material de ácido nucleico incluye al menos un oligonucleótido antisentido adecuado para terapia génica.
- 15
30. El procedimiento según la reivindicación 29, donde el oligonucleótido antisentido se dirige a RNAm codificado por un protooncogén o por un oncogén.
- 20

RESUMEN

La presente invención está relacionada con un virosoma cargado positivamente para la distribución eficiente de material genético a células de mamífero en
5 reposo o en proliferación in vitro e in vivo. La membrana del virosoma contiene lípidos catiónicos y/o policatiónicos, al menos un péptido de fusión viral y preferiblemente al menos un marcador específico de célula, preferiblemente seleccionado del grupo que
10 consiste en anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ y Fab', citoquinas y factores de crecimiento, para la detección selectiva y unión a las células diana. La invención además se relaciona con un procedimiento para la fabricación de los nuevos
15 virosomas y con aplicaciones suyas, particularmente para la fabricación de composiciones farmacéuticas para tratar el cáncer o la leucemia.

**DECLARACIÓN Y PODER DE REPRESENTACIÓN
PARA LA SOLICITUD DE PRÓRROGA PARCIAL (PCT)**

Como un inventor abajo mencionado, por la presente declaro que:

mi residencia, dirección postal y ciudadanía son las indicadas a continuación junto con mi nombre;

creo de buena fe que el único, original y primer inventor (si solamente se menciona un nombre más abajo) o un primer inventor original, en conjunto (si se mencionan varios nombres más abajo) del asunto que se reivindica, para el cual se pretende obtener una patente respecto a la invención titulada: VIROSOMAS CATIÓNICOS COMO SISTEMA DE TRANSFERENCIA PARA MATERIAL GENÉTICO descrita y reivindicada en la descripción:

Marque una de las opciones

- a. adjunta a la presente
- b. presentada el ____ como solicitud de serie N°

Esta solicitud describe y reivindica en parte el asunto descrito en mi / nuestra solicitud presentada con anterioridad aún pendiente, Solicitud N° 09/171.882, presentada el 30 de diciembre de 1998 y Solicitud Internacional N° PCT/EP97/02268, presentada el 4 de mayo de 1997.

He revisado y comprendo el contenido de esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones, tal y como han quedado modificadas por las modificaciones referidas con anterioridad.

Reconozco la obligación de desvelar a la Oficina toda la información que me sea conocida que sea relevante para la patentabilidad como se define en el Título 37, apartado 1.56 del Código de Reglamentos Federales.

Según el Título 35, apartado 119 del Código de Estados Unidos, los beneficios de prioridad de la(s) siguiente(s) solicitud(es) extranjera(s) presentada(s) en el plazo de un año antes de dicha solicitud internacional se reivindican por la presente:

Solicitud de patente europea N° 96107282.4 presentada el 8 de mayo de 1996

La(s) siguiente(s) solicitud(es) para patente o certificado de inventor de esta invención se presentaron en países distintos de los Estados Unidos de América bien (a) más de un año antes de dicha solicitud internacional, bien (b) antes de la fecha de presentación de la(s) solicitud(es) de prioridad extranjera mencionada(s) con anterioridad.

Por lo que se refiere a todos y cada uno de los asuntos objeto de esta solicitud que no sean

186-191

comunes a dicha solicitud previa, reconozco la obligación de desvelar a la Oficina toda la información que me sea conocida que sea relevante para la patentabilidad, como se define en el Título 37, apartado 1.56 del Código de Reglamentos Federales, que estuviese disponible entre la fecha de presentación de la solicitud internacional y la fecha de presentación de la solicitud.

Según el Título 35, apartado 119 del Código de Estados Unidos, los beneficios de prioridad de la(s) siguiente(s) solicitud(es) extranjera(s) presentada(s) en el plazo de un año antes de esta solicitud se reivindican por la presente:

La(s) siguiente(s) solicitud(es) para patente o certificado de inventor de dicho asunto se presentaron en países distintos de los Estados Unidos de América bien (a) más de un año antes de esta solicitud, bien (b) antes de la fecha de presentación de la(s) solicitud(es) de prioridad extranjera mencionada(s) con anterioridad.

Por la presente nombro a los siguientes como mis apoderados del registro con plenos poderes de sustitución y revocación para proseguir con esta solicitud y para llevar a cabo todos los trámites ante la Oficina de Patentes:

James A. Oliff, Reg. N° 27.075; William P. Berridge, Reg. N° 30.024;
Kirk M. Hudson, Reg. N° 27.562; Thomas J. Pardini, Reg. N° 30.411;
Edward P. Walker, Reg. N° 31.450; Robert A. Miller, Reg. N° 32.771;
Mario A. Costantino, Reg. N° 33.565; y
Caroline D. Dennison, Reg. N° 34.494.

TODA LA CORRESPONDENCIA CON RELACIÓN A ESTA SOLICITUD SE DEBERÍA ENVIAR A OLIFF & BERRIDGE, PLC, P.O. BOX 19928, ALEXANDRIA, VIRGINIA 22320, TELÉFONO (703) 836-6400.

Por la presente declaro que he examinado y comprendo el contenido de esta Declaración y que todas las afirmaciones que en ella se hacen de las que tengo conocimiento son verdaderas y que todas las afirmaciones hechas sobre la base de la información y de las opiniones se consideran como verdaderas, así como que estas afirmaciones se hicieron con el conocimiento de que las afirmaciones falsas y similares hechas a propósito son punibles por medio de una multa o del encarcelamiento o de ambos, según la Sección 1001 del Título 18 del Código de Estados Unidos y que dichas afirmaciones falsas hechas a propósito pueden poner en peligro la validez de la solicitud o cualquier patente emitida sobre la base de la misma.

1 Nombre completo escrito a máquina
del único o primer inventor Ernst Rudolf WALT

Nombre Intermedia Apellido Apellido

2 Firma del inventor (Firma ilegible)

3 Fecha de la firma 16 de septiembre de 1999

Residencia: Munchenbuchsee SUIZA

Ciudad Estado o Provincia País

Ciudadanía: SUIZA

Dirección postal: Moosgasse 84

(Escriba la dirección completa
incluyendo el país) CH-3053 Munchenbuchsee SUIZA

1 Nombre completo escrito a máquina
del único o primer inventor Reinhard GLUCK
Nombre Inicial intermedia Apellido

2 Firma del inventor (Firma ilegible)

3 Fecha de la firma 16 de septiembre de 1999

Residencia: Speigel bei Bern SUIZA
Ciudad Estado o Provincia País

Ciudadanía: SUIZA

Dirección postal: Chasseralstrasse 156
(Escriba la dirección completa
incluyendo el país) CH-3028 Speigel bei Bern SUIZA

1	Nombre completo escrito a máquina			
	del único o primer inventor	Peter		KLEIN
		Nombre	Inicial intermedia	Apellido
2	Firma del inventor	(Firma ilegible)		
3	Fecha de la firma	16 de septiembre de 1999		
	Residencia:	Langenbruck		SUIZA
		Ciudad	Estado o Provincia	País
	Ciudadanía:	SUIZA		
	Dirección postal:	Neuhof		
	(Escriba la dirección completa			
	incluyendo el país)	CH-4438 Langenbruck SUIZA		

1	Nombre completo escrito a máquina del único o primer inventor		Nombre	Inicial intermedia	Apellido
2	Firma del inventor				
3	Fecha de la firma				
4	Residencia:				
		Ciudad	Estado o Provincia	País	

288-193

Ciudadanía: _____
Dirección postal: _____
(Escriba la dirección completa
incluyendo el país) _____

- 1
- Nombre completo escrito a máquina
del único o primer inventor
- Nombre
- Inicial intermedia
- Apellido
- 2
- Firma del inventor
- 3
- Fecha de la firma

Residencia: _____
Ciudad Estado o Provincia Pais

Ciudadanía: _____
Dirección postal: _____
(Escriba la dirección completa
incluyendo el país) _____

Si se ha marcado la casilla (a), este impreso sólo se rellenará cuando se adjunte a la descripción (incluyendo las reivindicaciones) al final de la misma. Este impreso sólo se rellenará cuando se adjunte a la primera página de la Declaración y Poder de representación de la solicitud a la que pertenezca.
Nota para el inventor: Se ruega firme en la línea N° 2 exactamente con el mismo nombre que aparece en la línea N° 1 y escriba la fecha del momento en que se firme en la línea N° 3.

FIG. 1



Fig. 2

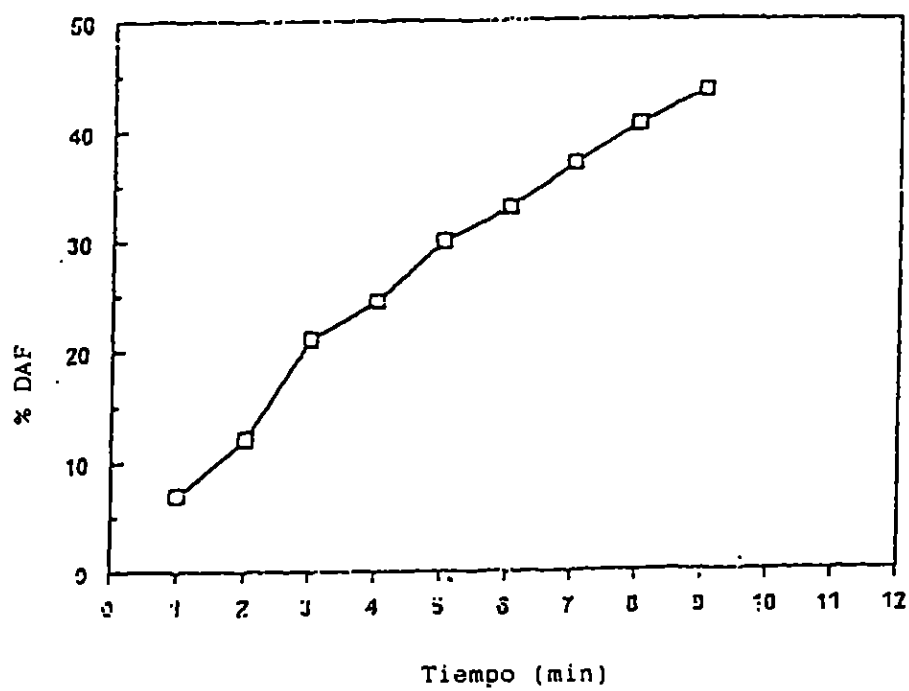


FIG. 3



19/1/96

Fig.4

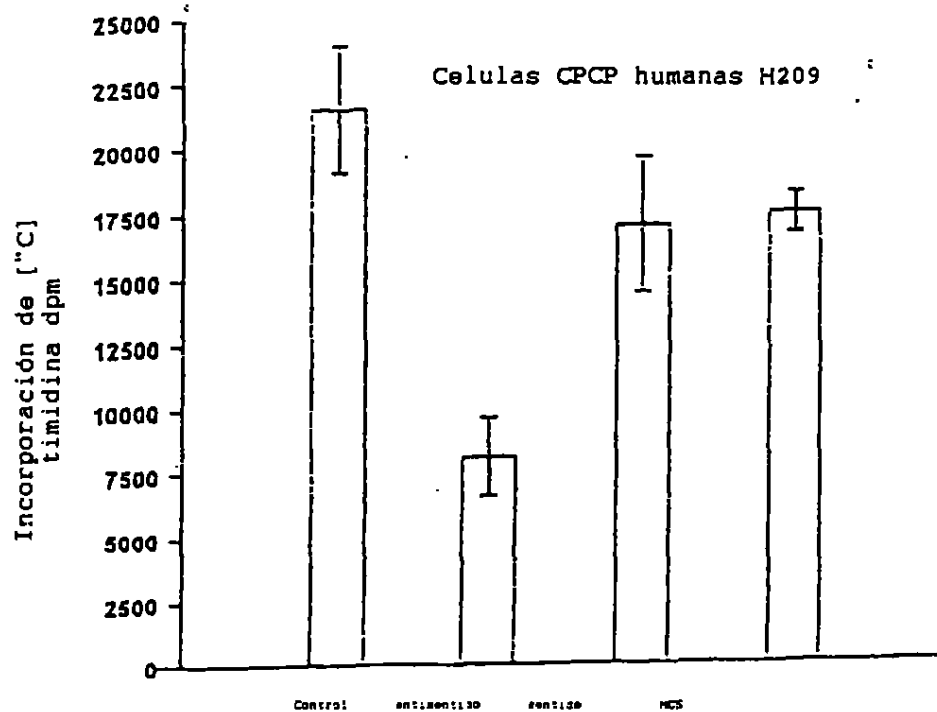


Fig.5

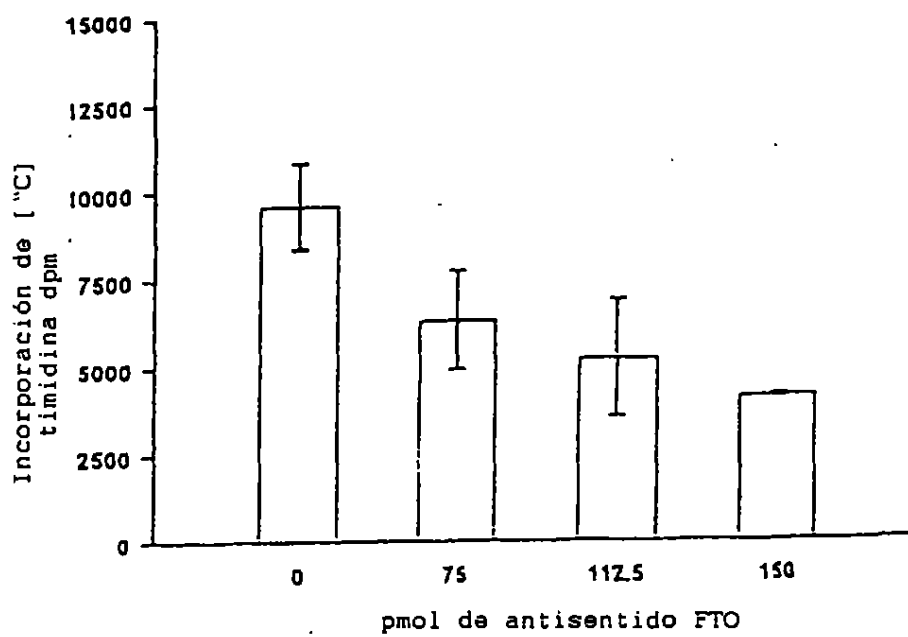


Fig.6

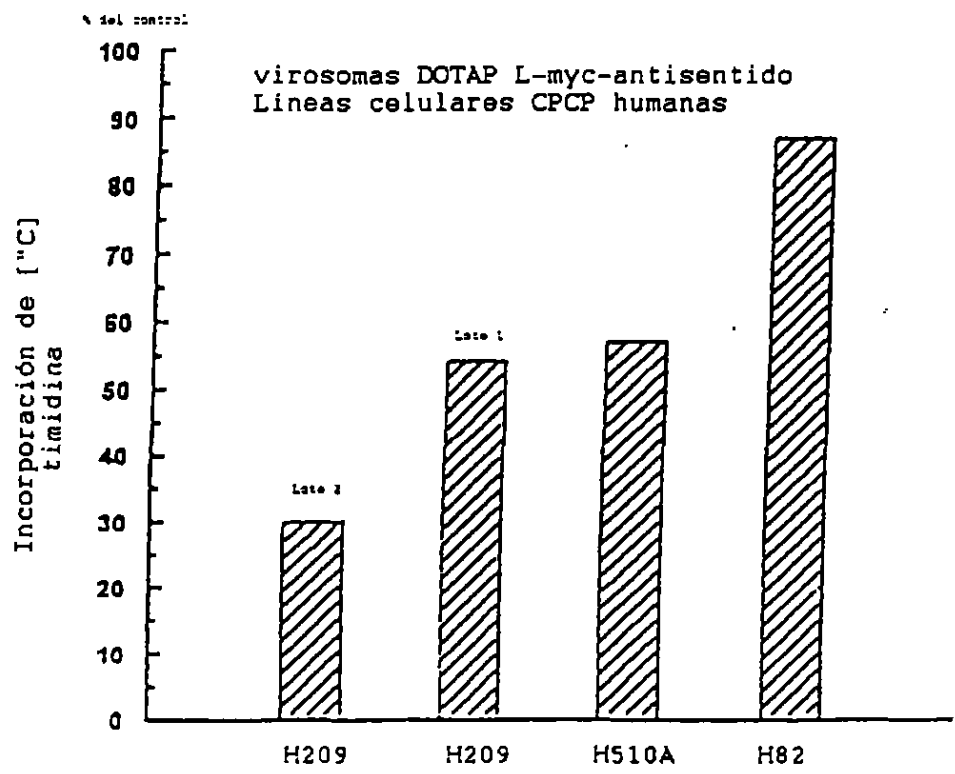


Fig.7a

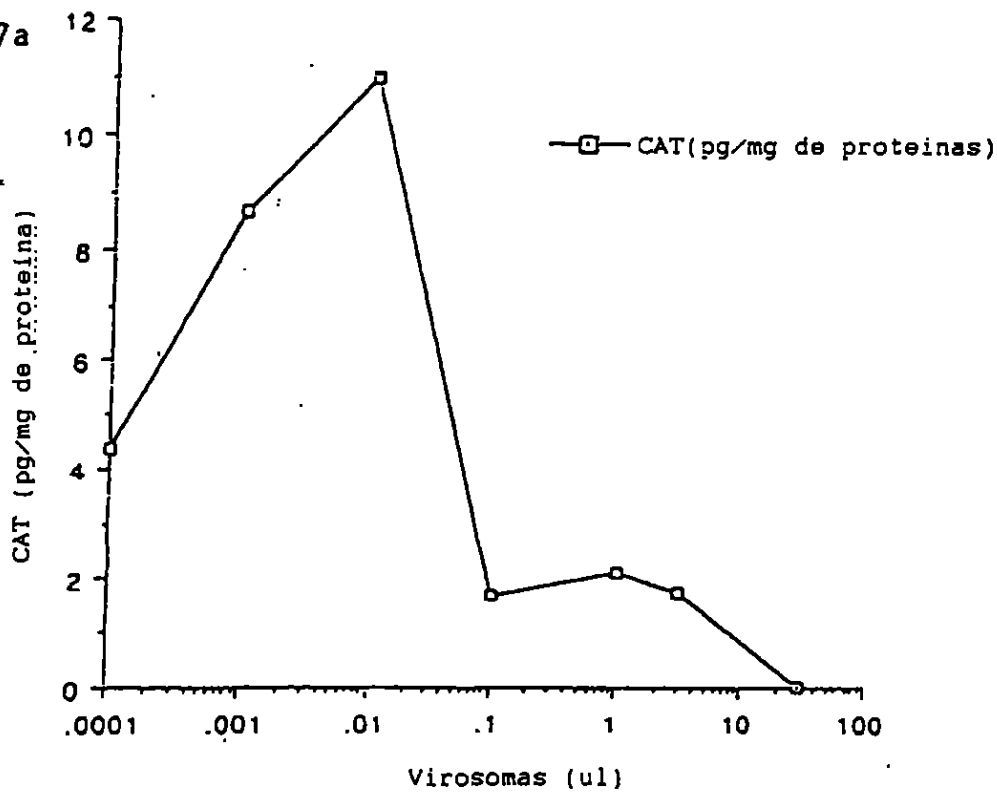
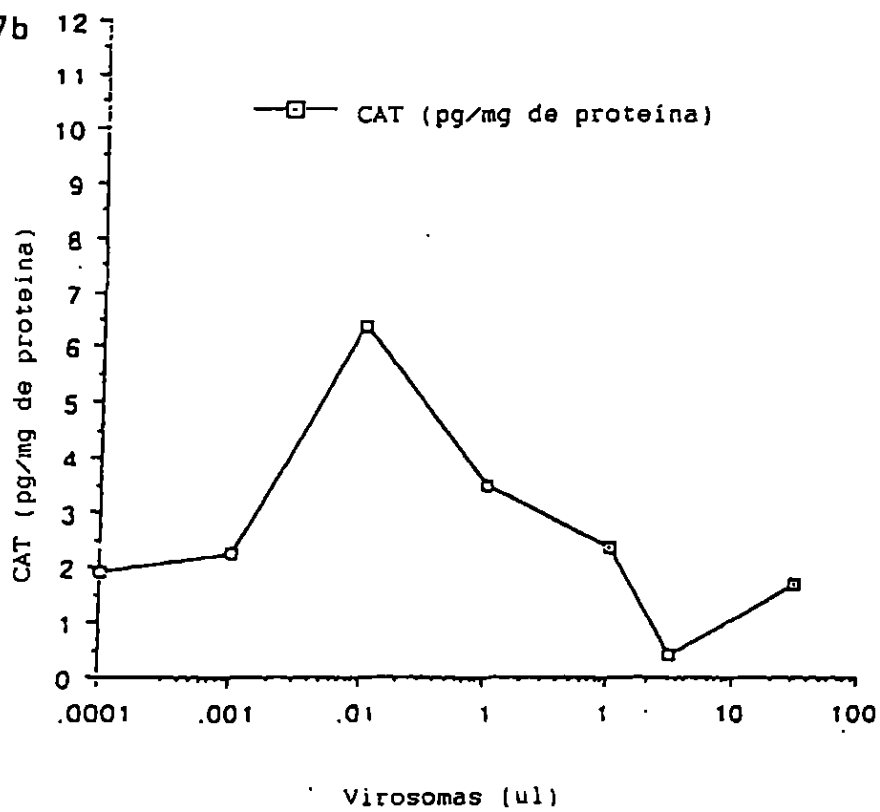


Fig.7b



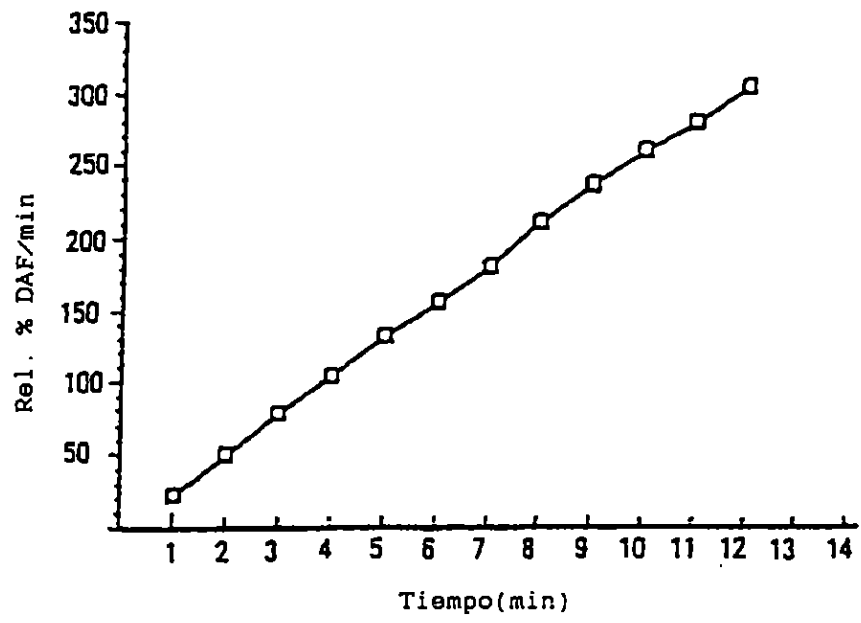


FIG. 8

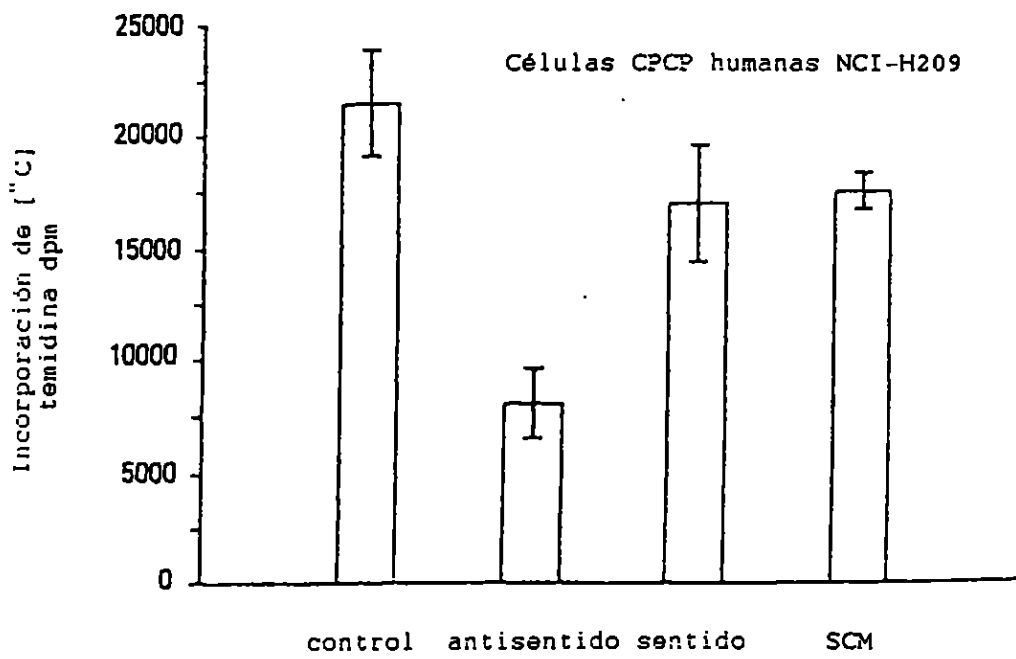


FIG. 9

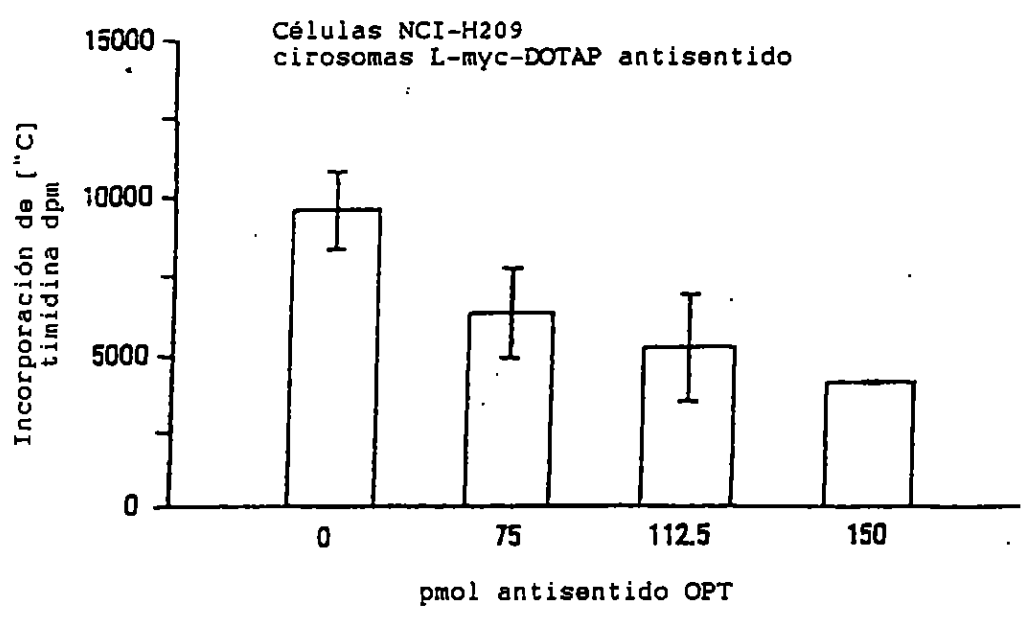


FIG. 10

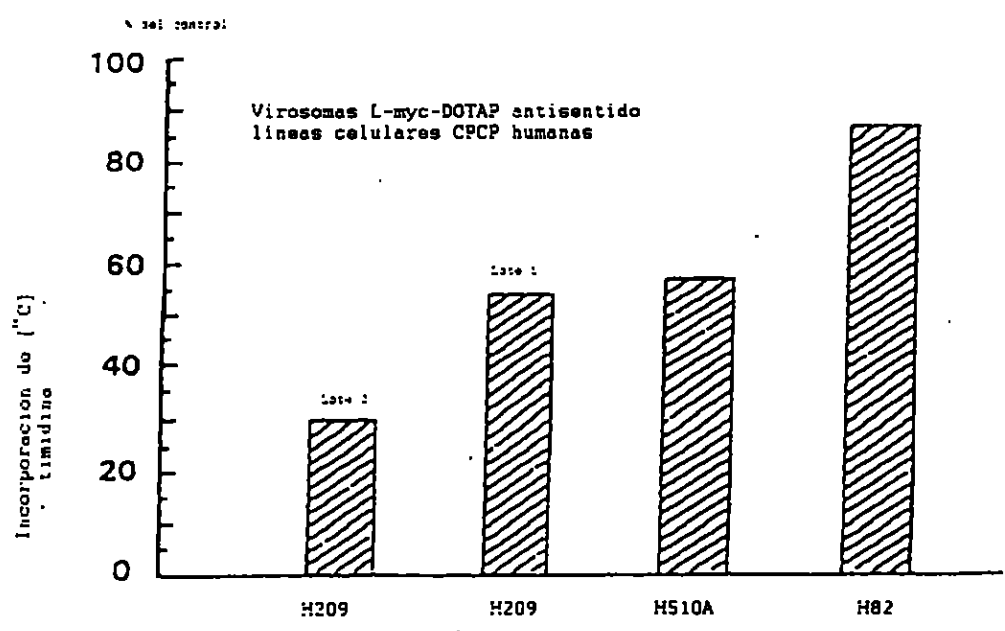


FIG. 11

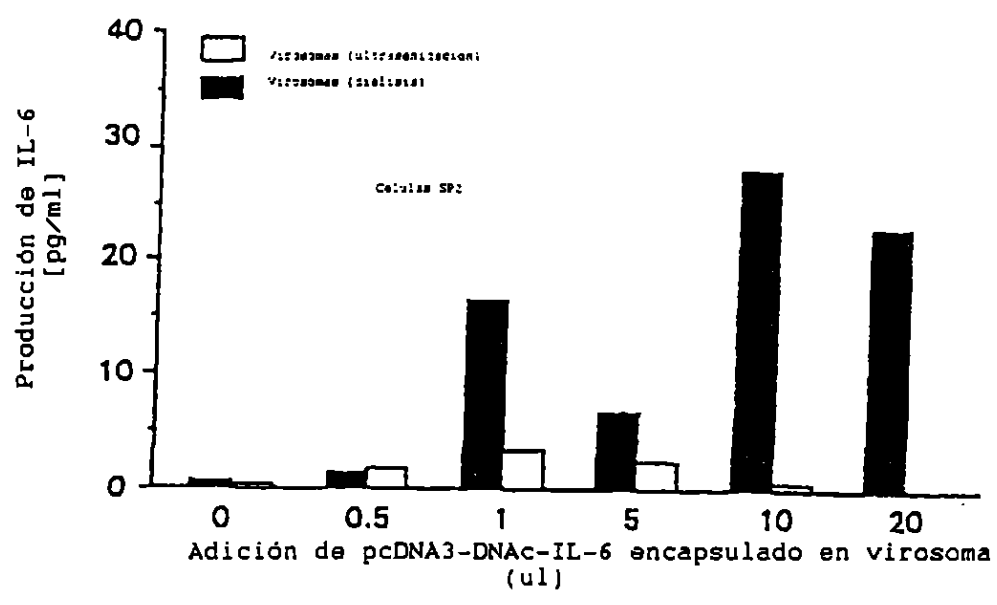


FIG. 12

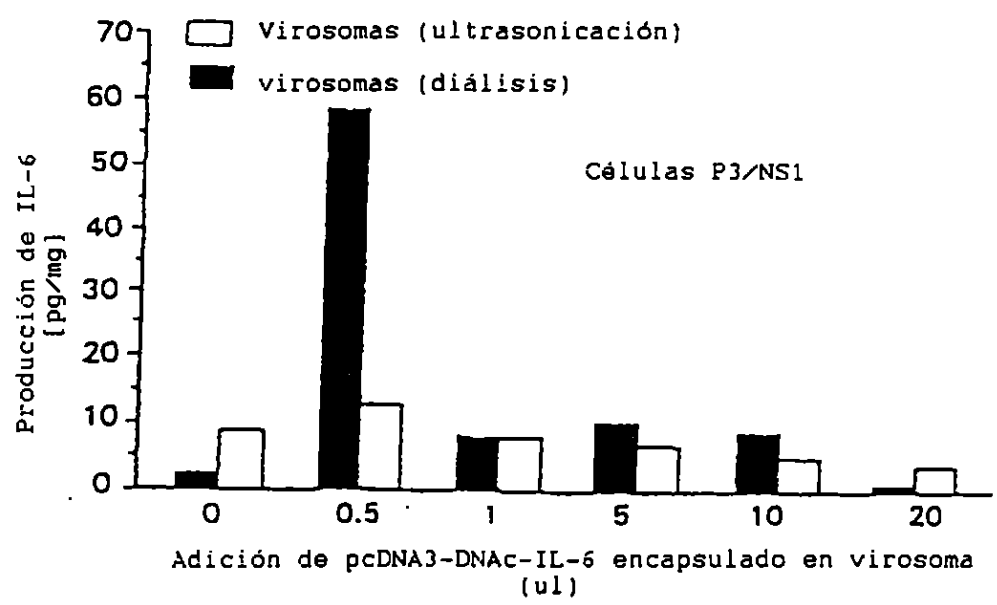


FIG. 13

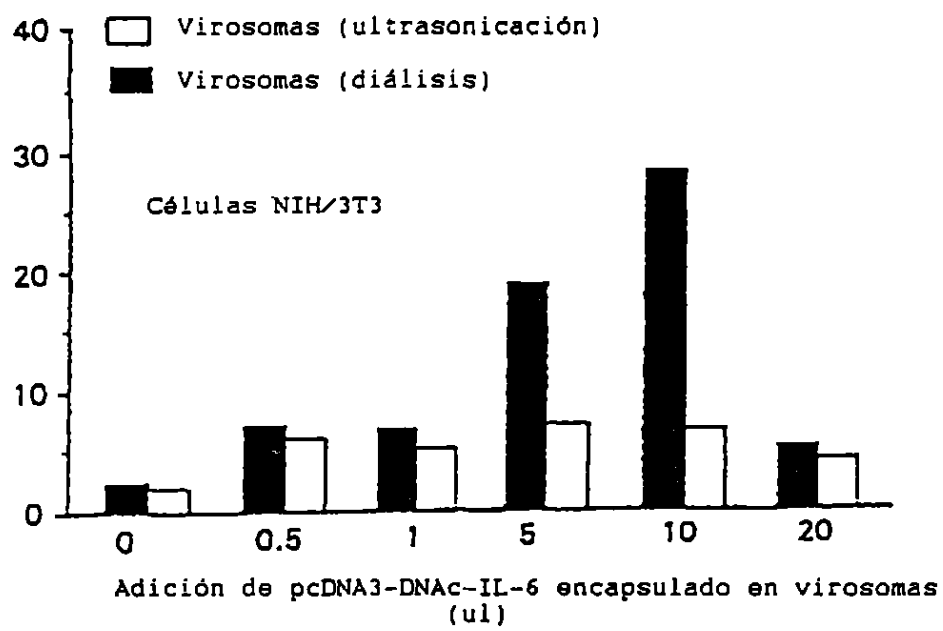


FIG. 14

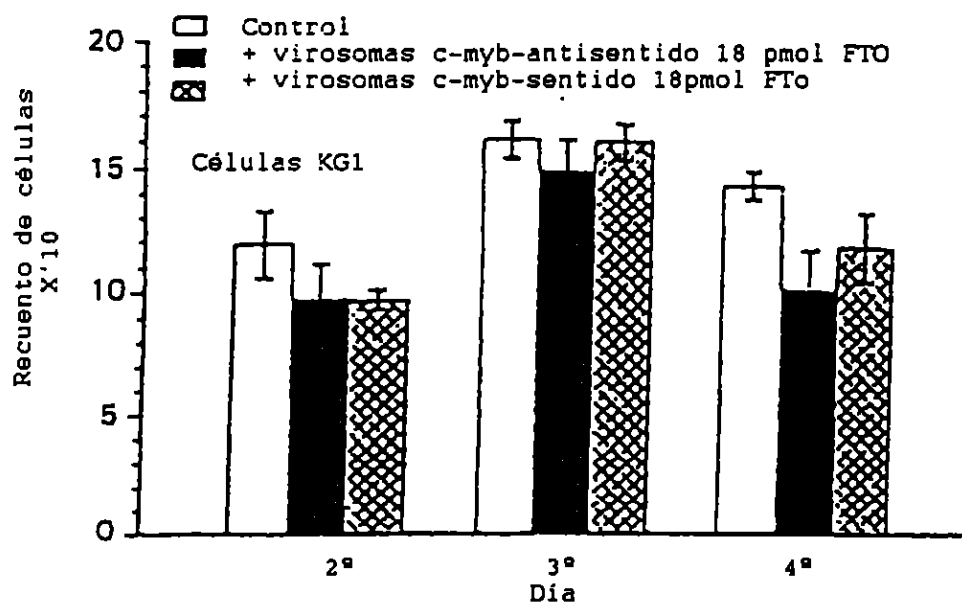


FIG. 15

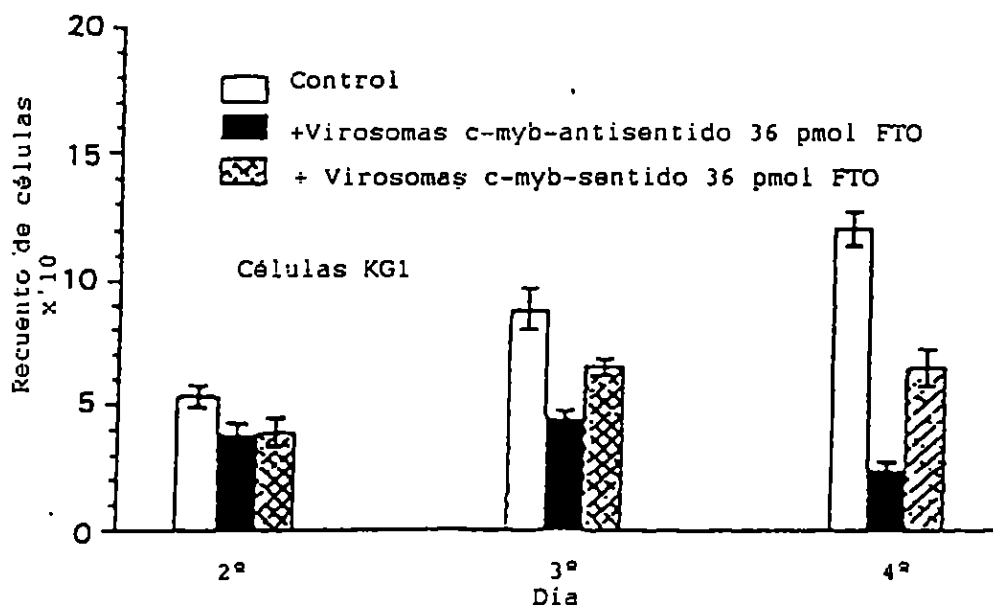


FIG. 16

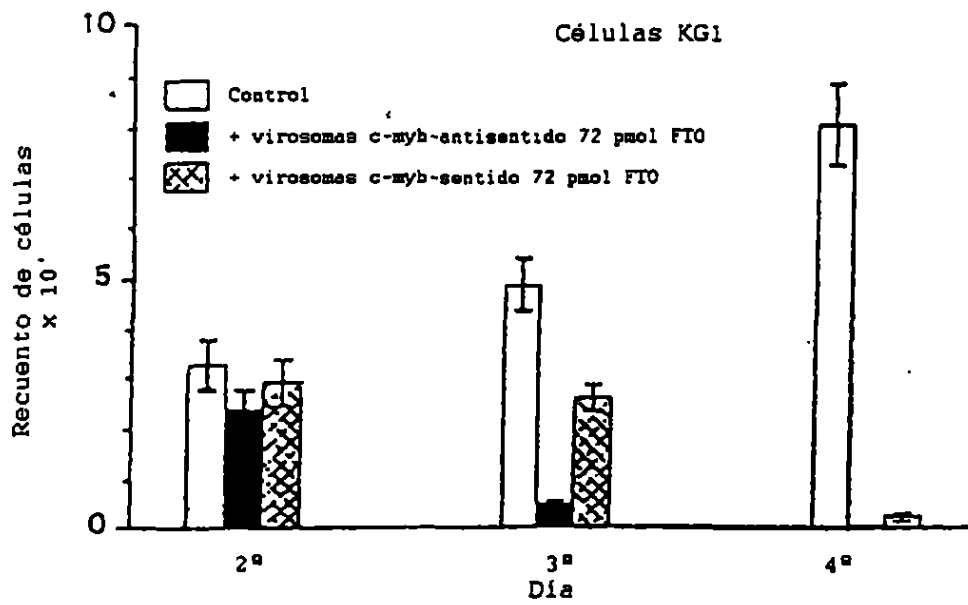


FIG. 17

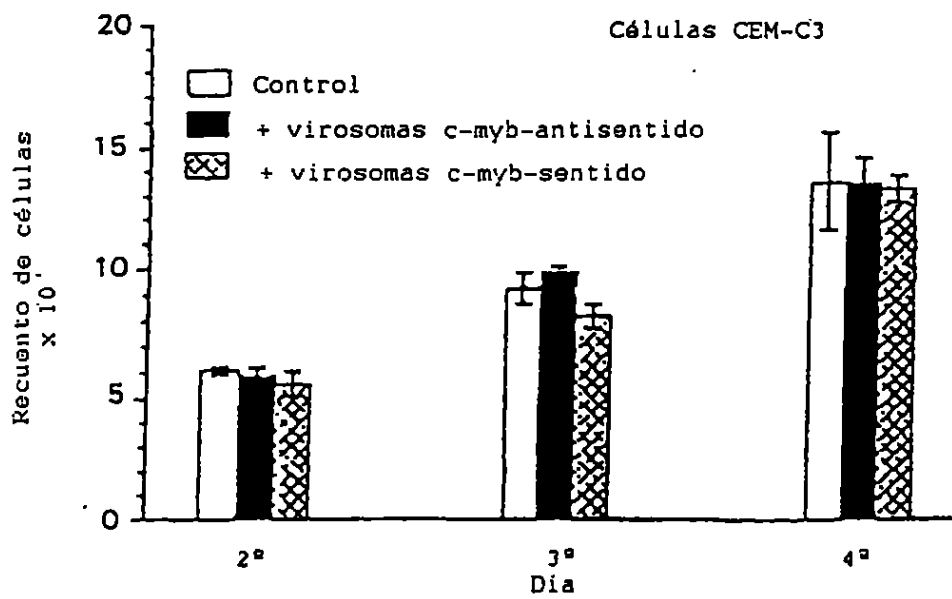


FIG. 18

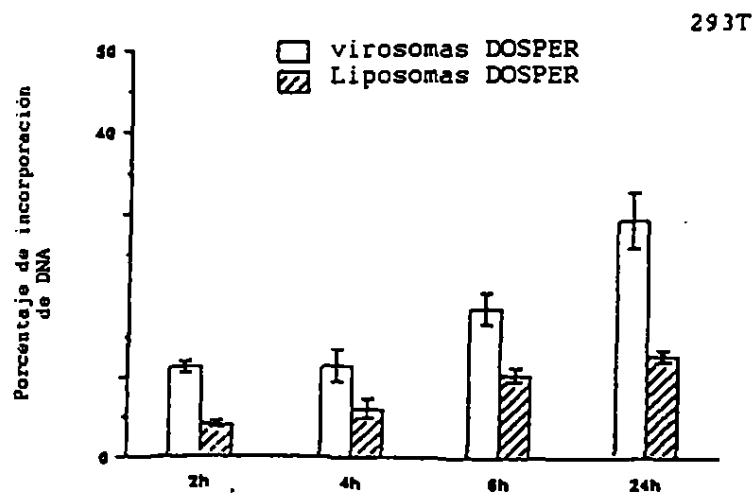


Fig. 19

Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmidico incorporado. Se transfectaron 5×10^5 células de la línea celular de riñón embrionario primaria humana transformada 293T con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenian plásmido pGreen Lantern marcado con 'H.

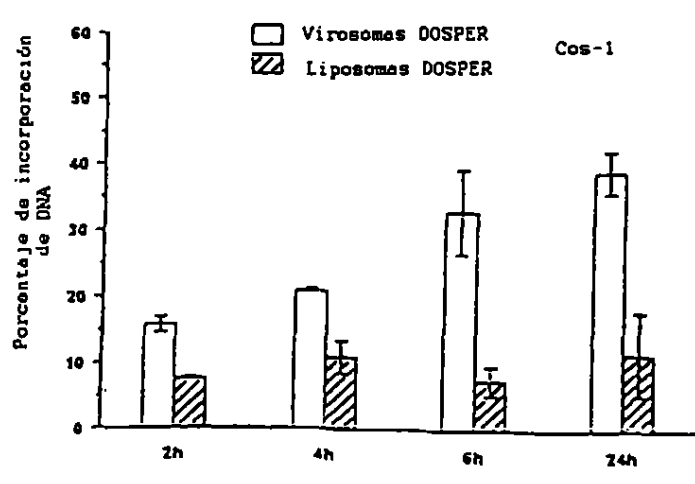


Fig. 20

Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plásmidico incorporado. Se transfectaron 5×10^5 células de la línea celular de fibroblastos fr mono COS-1 con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenian el plásmido pGreen Lantern marcado con 'H.

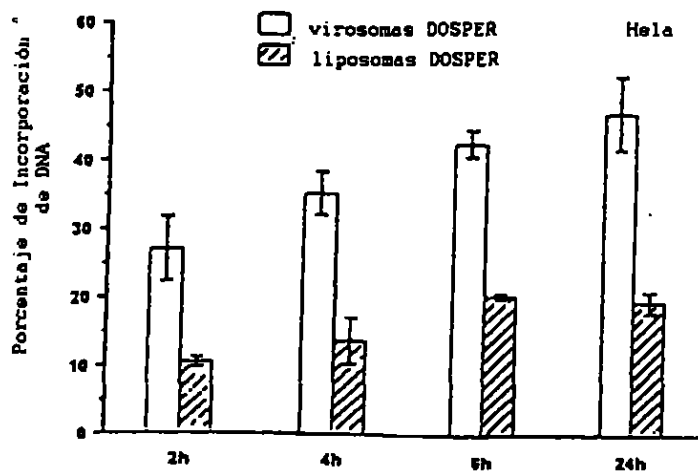


Fig. 21

Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plásmidico incorporado. Se transfectoron 5×10^5 células de la línea celular de carcinoma epiteloide humano Hela con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenian plásmido pGreen Lanterna marcado con ^3H .

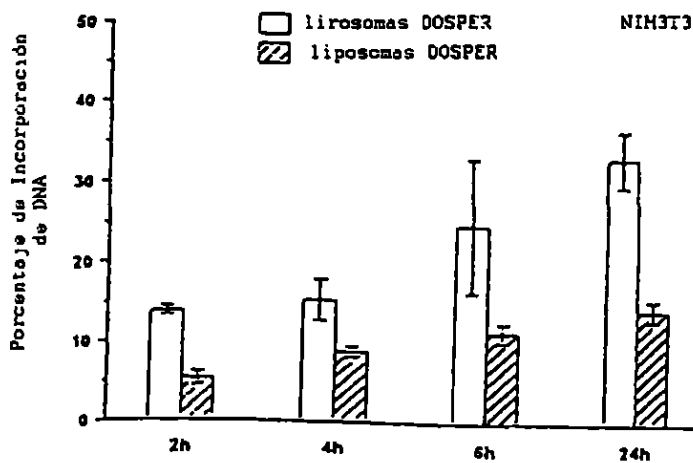


Fig. 22

Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmidico incorporado. Se transfectoron 5×10^5 células de la línea celular fibroblasto de raton NIH3T3 con virosomas DOSPER y liposomas DOSPER que contenian plásmido pGreen Lanterna marcado con ^3H .

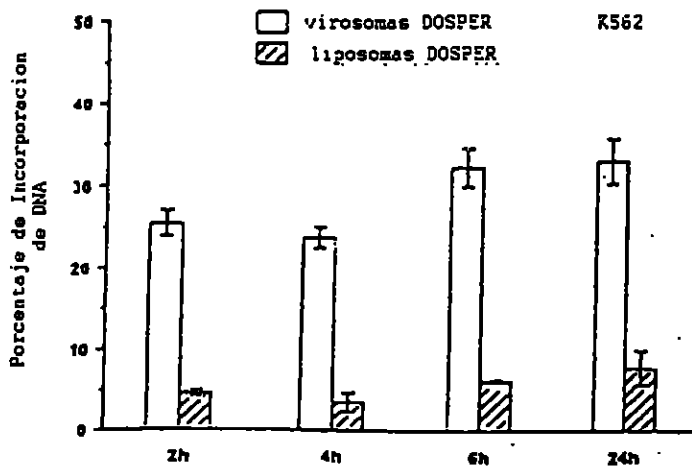


Fig. 23

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

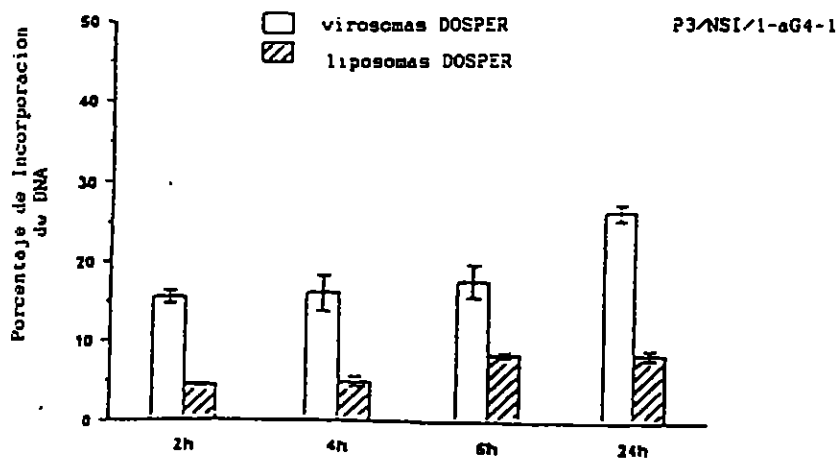


Fig. 24

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

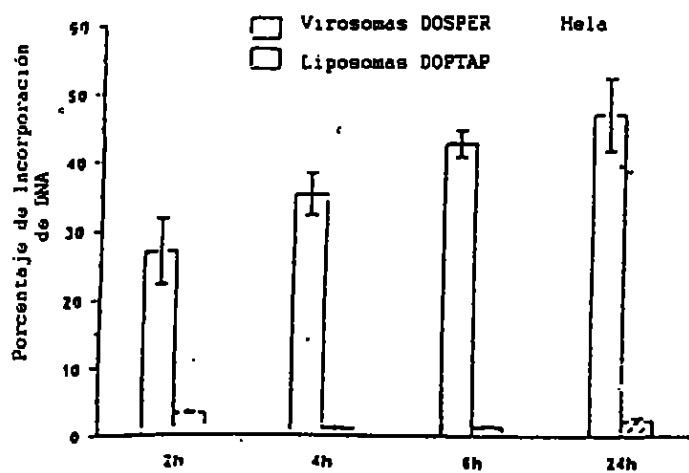


Fig. 25

Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmidico incorporado.
Se transfectaron 5×10^5 células de la línea celular de carcinoma epitelioide humano Hela con virosomas DOSPER y virosomas DOTAP que contenian plásmido pGreen Lantern marcado con ^3H .

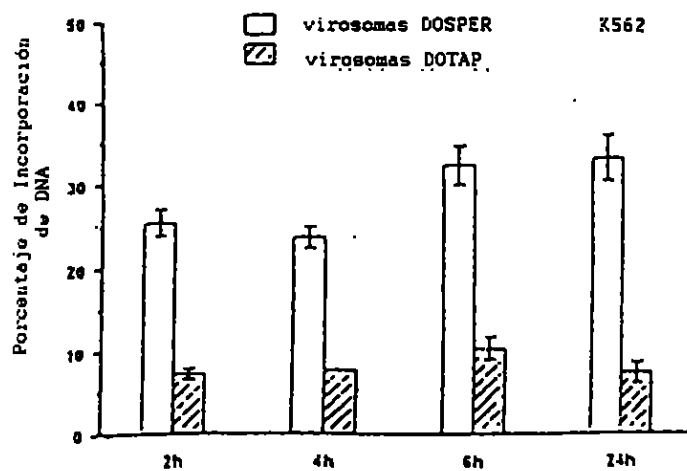


Fig. 26

Influencia del tiempo de transfección en la cantidad de DNA plasmidico incorporado.
Se transfectaron 5×10^5 células de la línea celular de leucemia mielógena crónica humana K562 con virosomas DOSPER y virosomas DOTAP que contenian plásmido pGreen Lantern marcado con ^3H .



2do. EXAMEN DE FORMA PATENTE DE INVENCION

Radicación no 00-76243

Folio 209

Concepto Técnico no 197

Clasificación Internacional de Patentes A61K 048/ 000

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 38 de la Decisión 486 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- | | |
|--|---|
| SI ☒ NO ☐ | Contiene un resumen de la invención (Art.26-e). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene el título o nombre de la invención (Art.27-d). |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene la descripción de la invención (Art.26-b). |
| SI ☒ NO ☐ | NO ES APLICABLE ☐ Contiene los dibujos necesarios para comprender la invención (Art.26-d) |
| SI ☒ NO ☐ | Contiene una o más reivindicaciones. (Art.26-c). |
| SI ☐ NO ☐ | NO ES APLICABLE ☒ Han sido desarrollados los productos y/o procedimientos a partir de recursos genéticos o de sus productos derivados de los que cualquiera de los Países Miembros es país de origen. (Art. 26- h). |
| SI ☐ NO ☐ | NO ES APLICABLE ☒ Los productos y/o procedimientos han sido obtenidos o desarrollados a partir de los conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas, afroamericanas, o locales de los países miembros, de acuerdo a lo establecido en la Decisión 391 y sus modificaciones y reglamentaciones vigentes.(Art.26-i). |
| SI ☒ NO ☐ | La invención se refiere a un producto relativo a un material biológico. (Art.26-J). |
| SI ☒ NO ☐ | La prioridad coincide con la materia reivindicada. |
| SI ☒ NO ☐ | CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS |

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

EXAMINADOR TÉCNICO
202044

Bogotá D. C. Enero 23 de 2003.

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: Info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia



Concepto técnico no.197

OBSERVACIONES

- Envía una copia de la solicitud mediante la cual reivindica la prioridad. Folios 63-127.
- Anexa la traducción de la prioridad que reivindica. Folios 128-208 .
- anexa los dibujos solicitados. Folio 62.

•
EXAMINADOR TECNICO
202044

Bogotá, Enero 23 de 2003.

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@dic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

Folio 211

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a)

REFERENCIA:	Radicación No.	00-76243
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	416
	Oficio No.	2245
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en los artículos 26 y 27 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, y en las demás disposiciones vigentes sobre la materia, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC, a los

30 ENE. 2003


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

202044

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No. 00-076243

**EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No 528, DE
FECHA 30 DE MAYO DE 2003, EL TERMINO HABIL SEÑALADO POR LA LEY
EXPIRA EL 29 DE AGOSTO DE 2003.**

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI

NO **X**

Bogotá D.C., Diciembre de 2003