



Handwritten: Mart 25 7:37 PM 02/26/1

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PGT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-140877

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO ARN CIRCULAR MONOCATENARIO Y METODO PARA PRODUCIRLO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE RIKEN, OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD, Y HAYASHI KASEI CO., LTD.

DOMICILIO SAITAMA, TOKIO Y OSAKA, JAPON, RESPECTIVAMENTE

74. APODERADO OSCAR CORREA
C.C. 79.524.634 de Bogotá

22. BOGOTÁ, D.C., _____

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-140877- -00000-0000

Fecha: 2009-12-09 17:03:25

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 119

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2
SOLICITANTE
(71)

Nombre: RIKEN, OTSUKA
PHARMACEUTICAL CO., LTD. y
HAYASHI KASEI CO., LTD.

Sociedades constituidas y existentes bajo las leyes de Japón.

Dirección: 2-1, Hirosawa, Wako-shi,
Saitama 3510198,
Japón;

9, Kanda-Tsukasamachi 2-
chome, Chiyoda-ku,
Tokio 1018535,
Japón

y

2-7, Tenjinbashi 1-chome,
Kita-ku, Osaka-shi,
Osaka 5300041,
Japón

Domicilio: Saitama,
Japón;

Tokio,
Japón

y

Osaka,
Japón

respectivamente.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3
REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: OSCAR CORREA
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 79.524.634 T.P 71.027

4
INVENTOR (ES)
(72)

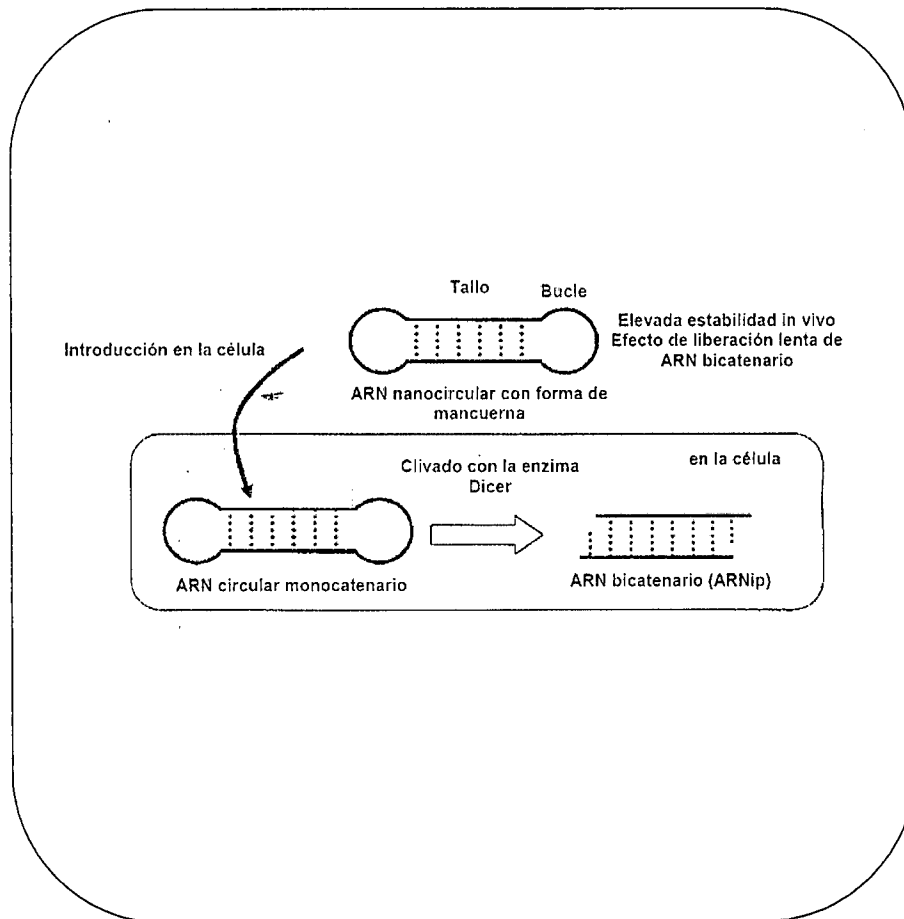
1. Hiroshi ABE
c/o Riken, 2-1, Hirosawa,
Wako-shi,
Saitama 3510198,
Japón

2. Yoshihiro ITO
c/o Riken, 2-1, Hirosawa,
Wako-shi,
Saitama 3510198,
Japón

	3. Naoko ABE c/o Riken, 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama 3510198, Japón	4. Hidekazu TOYOBUKU c/o Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 224-18, Hiraishi-Ebisuno, Kawauchi-cho, Tokushima-shi, Tokushima 7710182, Japón						
5	PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/JP2008/058990</u> Fecha: <u>9 de mayo de 2008</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2008/140126 A1</u> Fecha: <u>20 de noviembre de 2008</u>							
6	Título (54) <u>ARN CIRCULAR MONOCATENARIO Y MÉTODO PARA PRODUCIRLO</u>							
7	Clasificación Internacional (51) <u>C12N 015/000</u> <u>C12N 15/09</u> <u>A61P 43/00</u> <u>C12N 15/09</u>							
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	<table border="1"><tr><td>(33) País de Origen</td><td>(32) Fecha</td><td>(31) Número de Solicitud</td></tr><tr><td><u>JP</u></td><td><u>9 de mayo de 2007</u></td><td><u>2007-125045</u></td></tr></table>	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud	<u>JP</u>	<u>9 de mayo de 2007</u>	<u>2007-125045</u>
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud						
<u>JP</u>	<u>9 de mayo de 2007</u>	<u>2007-125045</u>						
9	Comprobante de pago No.: <u>09-84,006</u> Fecha: <u>9 de noviembre de 2009</u>							
10	Anexos: ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.00. ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por. ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. ☒ Poderes, si fuere el caso. ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. ☐ Declaraciones. ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso. ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas. ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico. ☒ Arte final 12x12 ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud. ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS							

11

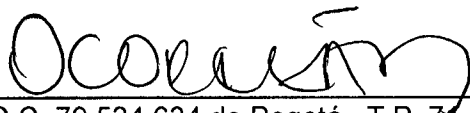
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: OSCAR CORREA

FIRMA : 
C.C. 79.524.634 de Bogotá T.P. 71.027

JGG

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/140126 A1

Descripción:

Páginas 16 en el idioma original

Páginas 18 en español

Reivindicaciones: Número (s) 11

Figuras: Número (s) 7

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 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 Comercio
E. S. D.

Asunto : Solicitud de la patente **ARN CIRCULAR
MONOCATENARIO Y METODO PARA PRODUCIRLO.**

Solicitante : **RIKEN; AND HAYASHI KASEI CO., LTD.**

Yo, ROSA MARGARITA SANTACRUZ, obrando en mi calidad de apoderada principal del solicitante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted que no ejerceré el poder otorgado y sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor OSCAR CORREA, Abogado con Tarjeta Profesional N° 71.027, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,


ROSA MARGARITA SANTACRUZ

T.P.A. No.49.434

C.C. No.35.501.911 de Suba (Bogotá, D.E.)

Acepto:


OSCAR CORREA

T.P.A. No. 71.027

C.C. No.79.524.634 de Bogotá

Colo 17281-841-001-8

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
Bogotá, D.C. **03 DIC 2009**
Ante mi AMPARO QUINTERO ARTURO,
NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
BOGOTÁ, D.C.
Compareció(eron) *[Handwritten signature]*
[Handwritten signature]
[Handwritten signature]
Quien(es) exhibió(aron) la(s) C.C. *[Handwritten signature]*
[Handwritten signature] 71027
[Handwritten signature] 49434
Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]



Notaría
Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 2

DE LA ESCRITURA NUMERO: 6281
FECHA: 27/Noviembre/2009

ACTO O CONTRATO:
PODER GENERAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
ROSA MARGARITA SANTA CRUZ



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41

Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co



ESCRITURA PUBLICA NUMERO: 6281 —

SEIS MIL DOSCIENTOS OCHENTA Y UNO — — — —

FECHA: NOVIEMBRE VEINTISIETE (27) — — —

DEL AÑO DOS MIL NUEVE (2009) — — — — —

NOTARIA SEXTA (6ª) DE BOGOTA

D.C.-----

CLASE DE ACTO: PODER ESPECIAL

RAZON SOCIAL : CAVELIER ABOGADOS NIT : 860.041.367-3

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, ante mí JAIME VARGAS —

CHAMBO — — — — — Notaria Sexta (6a) ENCARGADO — de

éste Círculo Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos: — — — — —

CONSTANCIA SOBRE COMPARECENCIA Y DECLARACIONES ANTE

EL NOTARIO : — — — — —

COMPARECIO : Con minuta (correo electrónico) compareció el señor

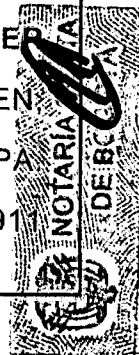
CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO, mayor de edad, vecino de esta ciudad, casado, identificado con la cédula de ciudadanía No. 19.066.425 de Bogotá, y dijo: — — — — —

ESTIPULACIONES:

PRIMERA. Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS**, NIT : 860.041.367-3 domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. — — — — —

SEGUNDA: Que **RIKEN**, sociedad constituida y existente bajo las leyes de Japón, domiciliada en 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198 Japón, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. — — — — —

TERCERA. Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **RIKEN** confiere poder a los abogados **ROSA MARGARITA SANTACRUZ**, T.P.A. No. 49.434, identificada con cédula de ciudadanía número 35.501.91



de Suba (Bogotá, D.E.), **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027, identificado con cédula de ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá, **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344 de Usaquen y **GERMAN HUMBERTO MARIN RUALES**, T.P.A. No. 64.239, identificado con cédula de ciudadanía número 79.155.665 de Bogotá, mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: - - - - -

a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. - - - - -

CUARTO. Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. - - - - -

QUINTO. Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

RIKEN

domiciliado (s) 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama
en/of 351-0198 Japan

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any action or process that we promote or that is promoted against us.

The representative may also, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear, or as intervenor ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed

© CAVELIER ABOGADOS

WPC17281 / ID.159128

...poderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 22nd day of October, 2009

En/in Tokyo, Japan

Por/by Ryoji NOYORI, President

Firma/Signature

Ryoji Noyori

Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía. Deberá ser presentado ante Notario Público para que certifique que la persona que firma es quien dice ser. La firma del señor Notario deberá ser legalizada.*

Adicionalmente deberá anexarse copia legalizada* del documento que pruebe la existencia y representación legal de la sociedad.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario. Una sola legalización que incluya ambos documentos sería suficiente.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante: El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document should be signed by the Legal Representative of the company. It should be produced before a Notary Public, who should certify that the person signing the same is in fact who he/she purports to be. The Notary's signature should then be legalized.*

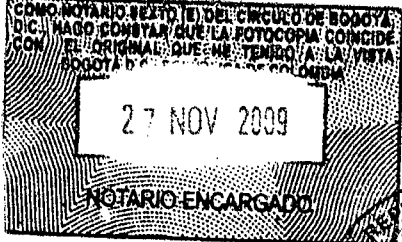
In addition a legalized copy* of the document proving the existence and legal representation of the company should also be attached.

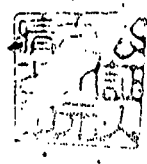
*Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise. A single legalization that would include both documents would be sufficient.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.



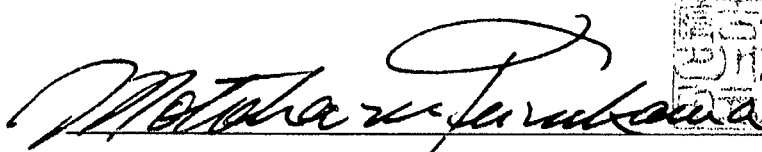


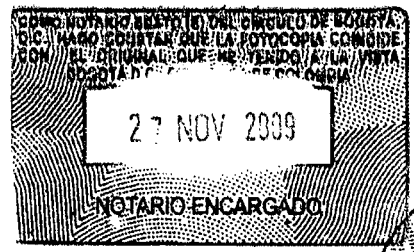
Registration No. 1865 of 2009

NOTARIAL CERTIFICATE

I, the undersigned, Notary in and for Tokyo, Japan, do hereby certify that Mr. Ryoji NOYORI who is President of RIKEN, a corporation duly organized and existing under the Laws of Japan, located at 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198 Japan and who is authorized to sign the attached document for and on behalf of said corporation, has acknowledged himself that signature on the foregoing document is his own.

Tokyo, Japan; on this 22nd day of October, 2009.


Notary: MOTOHARU FURUKAWA



11



嘱託人 独立行政法人理化学研究所（主たる事務所 埼玉県和光市
広沢 2 番 1 号）理事長 野依良治 は、日本国法に基づいて設立さ
れた同法人を代表しその権限に基づき添付証書に署名した旨、本
公証人に対し自認した。

よって、これを認証する。
平成 21 年 10 月 2 日、本公証人役場において
東京都千代田区麹町 5 丁目 2 番地 1
東京法務局所属

公 証 人
Notary

山 川 之 明
MOTOHARU FURUKAWA

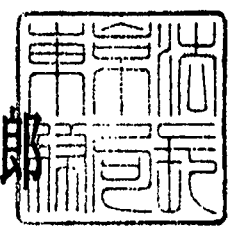
証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、
真実のものであることを証明する。

平成 21 年 10 月 2 日

東京法務局長

山 鋪 弥 一 郎



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN
This public document

2. has been signed by MOTOHARU FURUKAWA

3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of MOTOHARU FURUKAWA, Notary
Certified

5. at Tokyo

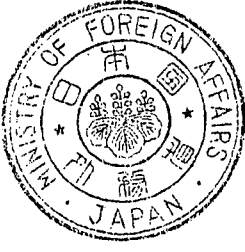
6. 22 nd October 2009

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. 09-Nº 029210

9. Seal/stamp:

10. Signature



Kazutoyo OYABE
For the Minister for Foreign Affairs

27 NOV 2009

NOTARIO ENCARGADO

REPUBLICA DE COLOMBIA
Jaime Vargas
NOTARIO ENCARGADO
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

TRADUCCIÓN OFICIAL 313/2009 DE UN DOCUMENTO EN IDIOMA INGLÉS
 REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL
 APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976
 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA Y
 DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES
 EXTERIORES DE COLOMBIA, POR EL CUAL **RIKEN** DOMICILIADA EN 2-1,
 HIROSAWA, WAKO-SHI, SAITAMA 351-0198. JAPÓN, OTORGA
 REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS RELACIONADOS CON PROPIEDAD
 INDUSTRIAL A **CAVELIER ABOGADOS**.

DADO Y FIRMADO HOY 22 DE OCTUBRE DE 2009 EN TOKIO, JAPÓN POR
 RYOJI NOYORI, PRESIDENTE. FIRMA ILEGIBLE

REGISTRO 1865 DE 2009

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

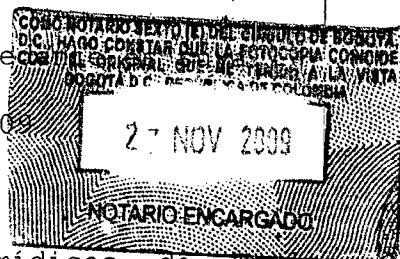
El notario abajo firmante, de Tokio, Japón por la presente
 certifico que el señor RYOJI NOYORI, presidente de RIKEN, una
 sociedad debidamente organizada y existente de conformidad
 con las leyes de JAPÓN, situada en 2-1, HIROSAWA, WAKO-SHI,
 SAITAMA 351-0198 Japón y quien está autorizado para firmar el
 documento adjunto a nombre de dicha sociedad, ha reconocido

que la firma en el documento precede
 Tokio, Japón, 22 de octubre de 2009

Firmado: MOTOHARU FURUKAWA

Sello: Oficina de asuntos juridicos de Tokio.

notarial. 5-2-1, KOJIMAICHI, CHIYODA-KU, TOKIO, JAPÓN



APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: JAPÓN

Eduardo Calado N.

- 2. Este documento público ha sido firmado por MOTOHARU FURUKAWA
 - 3. quien actúa en su calidad de NOTARIO DE LA OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE TOKIO
 - 4. lleva el sello/estampilla de MOTOHARU FURUKAWA, NOTARIO CERTIFICADO
 - 5. En TOKIO 6. el 22 de octubre de 2009
 - 7. Por el Ministerio de Asuntos Exteriores
 - 8. No. 029210
 - 9. Sello/estampilla: MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPÓN
 - 10. Firma: KAZUTOYO OYABE, A NOMBRE DEL MINISTRO DE RELACIONES EXTERIORES
- ECN\ECN\ID-161797\WPCL002G
- COLO-17281-841-001-8
- Bogotá, 25 de noviembre de 2009.

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2009 NOV 26 A 10:46

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

Edmundo Calisto

Edmundo Calisto Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Español - Inglés
Des. del Febrero de 1976

148177

Edmundo Calisto

NOTARIO ENCARGADO

SECRETARÍA DE ASUNTOS EXTERIORES

COMO NOTARIO SEATO 18 DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PRESENTADO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

27 NOV 2009

NOTARIO ENCARGADO

REPUBLICA DE COLOMBIA

Jaime Vargas

NOTARIO ENCARGADO

ARIA SEXTA DE BOGOTA

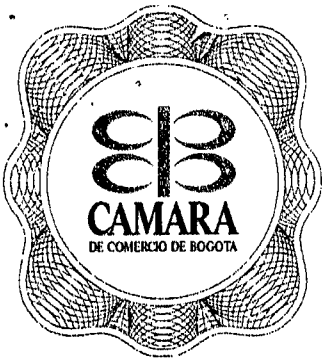
NOTARIA

DE BO

ESPACIO

EN

BLANCO



01



* 8 7 3 7 4 5 3 3 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

23 DE NOVIEMBRE DE 2009 HORA 11:02:25

09NLA1123120 PAGINA: 1 de 3

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA)..

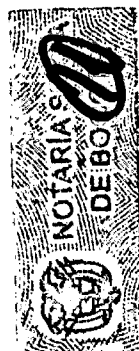
CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.	FECHA	NOTARIA	INSCRIPCION
842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-III-1.983-NO.129.337



7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO.	1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO.	1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO.	2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.	215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO.	2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO.	3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO.	3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA.	27-VIII-1991 NO.	4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA.	16-III -1992 NO.	4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO.	4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO.	4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO.	4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO.	4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO.	5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO.	5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO.	5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO.	5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO.	6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO.	6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO.	6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243

CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

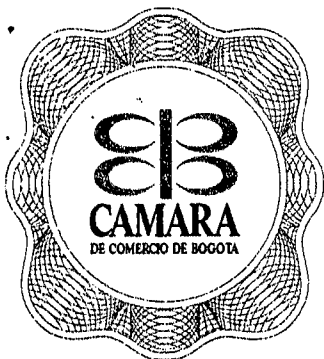
CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

- SOCIO CAPITALISTA (S)

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO

N.I.T. 000008001722568

14



01



* 8 7 3 7 4 5 3 4 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

23 DE NOVIEMBRE DE 2009

HORA 11:02:25

09NLA1123120

PAGINA: 2 de 3

NO. CUOTAS: 8,800.00	VALOR: \$8,800.00
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
NO. CUOTAS: 1,200.00	VALOR: \$1,200.00
- SOCIO INDUSTRIAL (S)	
CHAVARRO JORGE	C.C. 000000016209380
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA	C.C. 000000035456344
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
PEÑA VALENZUELA DANIEL	C.C. 000000079518915
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
MARIN RUALES GERMAN HUMBERTO	C.C. 000000079155665
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
TOTALES	
NO. CUOTAS: 10,000.00	VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR NO. 12 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 14 DE AGOSTO DE 2009, INSCRITA EL 24 DE SEPTIEMBRE DE 2009 BAJO EL NUMERO 00012200 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO)	



C.C. 000000019066425

NOMBRE

IDENTIFICACION

CAVELIER GAVIRIA GERMAN

C.C. 000000002877924

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

C.E. 0000000000131100

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

** REVISOR FISCAL **

NOMBRE

IDENTIFICACION

RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO

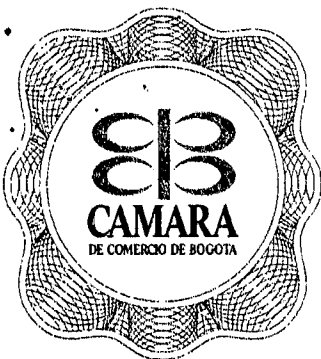
C.C. 000000002877024

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

★ ★ ★
★ ★ ★

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,

[illegible]



01



* 8 7 3 7 4 5 3 5 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

23 DE NOVIEMBRE DE 2009

HORA 11:02:25

09NLA1123120

PAGINA: 3 de 3

VALOR : \$ 3,500

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban D





constitución y personería de la sociedad
CAVELIER ABOGADOS, igualmente
protocoliza copia autenticada del documento
de representación otorgado el día **veintidos**
(22) de octubre de dos mil nueve (2009) por
por la Sociedad **RIKEN** documento que está

debidamente legalizado por apostille.-----

Presente el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, domiciliado
en Bogotá, identificado como aparece al pie de su firma y manifestó que
está conforme con el contenido de esta escritura pública.-----

HASTA AQUI LA MINUTA

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION : Leída la presente escritura
pública por el Compareciente y habiéndosele hecho las advertencias
sobre los trámites y formalidades de rigor le impartió su aprobación y en
constancia la firma por ante mí el Notario que **AUTORIZA**.

DERECHOS NOTARIALES : RESOLUCION 9500 del 31 de diciembre
año 2008, \$ 41,610 ----- IVA. \$ 14,297 <-----

PAPEL NOTARIAL : Esta escritura se extendió en las hojas de papel
sellado números : AA- 42355594 / 42355593 /-----

EN BLANCO... EN BLANCO


CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO

CC.No. 19.066421' 3 W

Representante legal **CAVELIER ABOGADOS**





JAIME VARGAS CHAMBO

NOTARIA SEXTA (6a) DE BOGOTÁ D.C.

NOTARIO ENCARGADO

ELABORO : Mac.09-poder-7135

ES FIEL EL Y SEGUNDA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERO 8281 DE FECHA 27 DE NOVIEMBRE DE 2009. COPIA QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO EN 11 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTA DE REVOCATORIA, MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTAD.C. NOVIEMBRE 27 DE 2009

RESOLUCION 01 DE 2009

POR LA NOTARIA SEXTA



Notaría
Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 2

DE LA ESCRITURA NUMERO: 6282
FECHA: 27/Noviembre/2009

ACTO O CONTRATO:
PODER GENERAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ



CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL
SERVICIO PUBLICO
NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41

Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co



ESCRITURA PUBLICA NUMERO: 6282

SEIS MIL DOSCIENTOS OCHENTA Y DOS

FECHA: NOVIEMBRE VEINTISIETE (27)

DEL AÑO DOS MIL NUEVE (2009)

NOTARIA SEXTA (6ª) DE BOGOTA

D.C.-----

CLASE DE ACTO: PODER ESPECIAL

RAZON SOCIAL : CAVELIER ABOGADOS NIT : 860.041.367-3

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, ante mí **JAIME VARGAS** CHAMBO -----Notaria Sexta (6a) ENCARGADO -----de

éste Círculo Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos: -----

CONSTANCIA SOBRE COMPARECENCIA Y DECLARACIONES ANTE EL NOTARIO : -----

COMPARECIO : Con minuta (correo electrónico) compareció el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, mayor de edad, vecino de esta ciudad, casado, identificado con la cédula de ciudadanía No. 19.066.425 de Bogotá, y dijo: -----

ESTIPULACIONES:

PRIMERA. Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS**, NIT : 860.041.367-3 domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. -----

SEGUNDA: Que **HAYASHI KASEI CO., LTD.**, sociedad constituida y existente bajo las leyes de Japón, domiciliada en 2-7, Tenjinbashi 1-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-0041 Japón, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. -----

TERCERA. Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **HAYASHI KASEI CO., LTD**, confiere poder a los abogados **ROSA MARGARITA**



SANTACRUZ, T.P.A. No. 49.434, identificada con cédula de ciudadanía número 35.501.911 de Suba (Bogotá, D.E.), **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027, identificado con cédula de ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá, **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344 de Usaquen y **GERMAN HUMBERTO MARIN RUALES**, T.P.A. No. 64.239, identificado con cédula de ciudadanía número 79.155.665 de Bogotá, mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: **a)** Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; **b)** Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.-----

CUARTO. Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.-----

QUINTO. Que protocoliza con la presente escritura, un certificado

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

HAYASHI KASEI CO., LTD.

domiciliado (s) 2-7, Tenjinbashi 1-chome, Kita-ku,
en/of Osaka-shi, Osaka 530-0041 Japan

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Circuito de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCUITO DE BOGOTÁ
D.C. HAYASHI KASEI CO. LTD. LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ - D.C. COLOMBIA

27 NOV 2009

The representative may designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without benefit of attorney, third party, when summoned to appear ad excludendum, or as intervenor ad excludendum. Under this authority, the representative may empower the attorneys ap

© CAVELIER ABOGADOS

WPC17281 / ID.159129

22

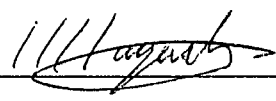
apoderados, que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 30th day of October, 2009

En/in Tokyo, Japan

Por/by Hirotake HAYASHI, Managing Director

Firma/Signature 

Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía. Deberá ser presentado ante Notario Público para que certifique que la persona que firma es quien dice ser. La firma del señor Notario deberá ser legalizada.*

Adicionalmente deberá anexarse copia legalizada* del documento que pruebe la existencia y representación legal de la sociedad.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario. Una sola legalización que incluya ambos documentos sería suficiente.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante: El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document should be signed by the Legal Representative of the company. It should be produced before a Notary Public, who should certify that the person signing the same is in fact who he/she purports to be. The Notary's signature should then be legalized.*

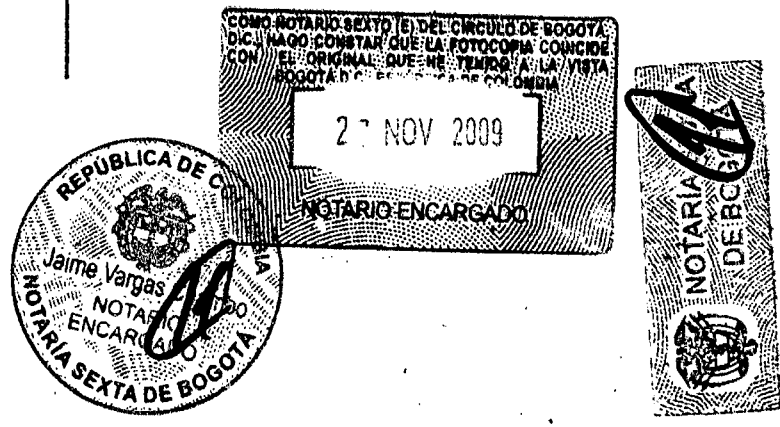
In addition a legalized copy* of the document proving the existence and legal representation of the company should also be attached.

*Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise. A single legalization that would include both documents would be sufficient.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.



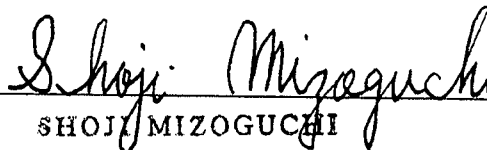
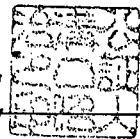


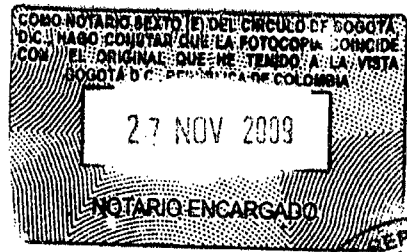
Registration No. 2276 of 2009

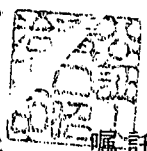
NOTARIAL CERTIFICATE

I, the undersigned, Notary in and for Tokyo, Japan, do hereby certify that Mr. Hirotake HAYASHI who is Managing Director of HAYASHI KASEI CO., LTD., a corporation duly organized and existing under the Laws of Japan, located at 2-7, Tenjinbashi 1-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-0041 Japan and who is authorized to sign the attached document for and on behalf of said corporation, has acknowledged himself that signature on the foregoing document is his own.

Tokyo, Japan; on this 30th day of October, 2009


Notary: SHOJI MIZOGUCHI 





嘱託人 林化成株式会社（本店 大阪市北区天神橋 1 丁目 2 番 7 号）
常務取締役 林 宏剛 は、日本国法に基づいて設立された同会社を代表
し、その権限に基づき添付証書に署名した旨、本公証人に対し自認した。

よって、これを認証する。
平成 2 1 年 1 0 月 3 0 日、本公証人役場において
東京都千代田区麹町 5 丁目 2 番地 1
東京法務局所属

公 証 人
Notary

溝口 昭 乃
SHOJI MIZOGUCHI

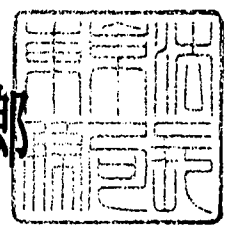


証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、
真実のものであることを証明する。
平成 2 1 年 1 0 月 3 0 日

東京法務局長

山 舗 弥 一 郎



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN
This public document

2. has been signed by SHOJI MIZOGUCHI

3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of SHOJI MIZOGUCHI, Notary
Certified

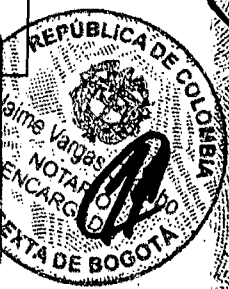
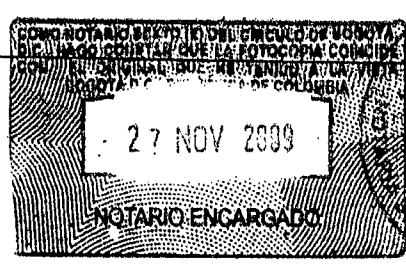
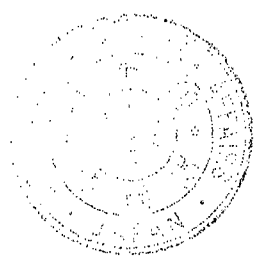
5. at Tokyo 6. 30th October, 2009

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. 09-Nº 030084

9. Seal/stamp: 10. Signature

Kazutoyo OYABE
For the Minister for Foreign Affairs



TRADUCCIÓN OFICIAL 312/2009 DE UN DOCUMENTO EN IDIOMA INGLÉS
 REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL
 APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976
 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA Y
 DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES
 EXTERIORES DE COLOMBIA, POR EL CUAL **HAYASHI KASEI CO., LTD.**
 DOMICILIADA EN 2-7, TENJINBASHI 1-CHOME, KITA-KU, OSAKA-SHI,
 OSAKA, 530-0041, JAPÓN, OTORGA REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS
 RELACIONADOS CON PROPIEDAD INDUSTRIAL A **CAVELIER ABOGADOS.**
 DADO Y FIRMADO HOY 30 DE OCTUBRE DE 2009 EN TOKIO, JAPÓN POR
 HIROTAKE HAYASHI, DIRECTOR GERENTE.

REGISTRO NO. 2276 DE 2009

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

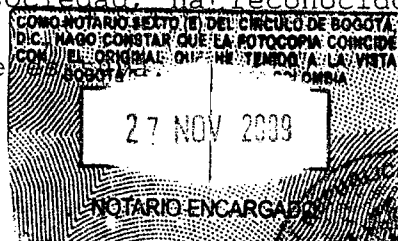
El notario abajo firmante, de Tokio, Japón por la presente
 certifico que el señor HIROTAKE HAYASHI, director gerencial
 de HAYASHI KASEI CO., LTD, una sociedad debidamente
 organizada y existente de conformidad con las leyes de JAPÓN,
 situada en 2-7, Tenjinbashi, 1-chome, Kita-ku, Osaka-shi,
 Osaka 530-0041, Japón y quien está autorizado para firmar el
 documento adjunto a nombre de dicha sociedad, ha reconocido
 que la firma en el documento precedente

Tokio, Japón, 30 de octubre de 2009

Firmado: SHOJI MIZOGUCHI

Sello: Oficina de asuntos jurídicos de Tokio.

notarial. 5-2-1, KOJIMAICHI, CHIYODA-KU, TOKIO, JAPÓN



APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: JAPÓN

Eduardo Calado
 Traductor Oficial
 Registrado en el Ministerio de Justicia
 Resolución 541 del 27 de febrero de 1976
 Registro No. 2276 de 2009

- 2. Este documento público ha sido firmado por SHOJI MIZOGUCHI
 - 3. quien actúa en su calidad de NOTARIO DE LA OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE TOKIO
 - 4. lleva el sello/estampilla de SHOJI MIZOGUCHI, NOTARIO
- CERTIFICADO
- 5. En TOKIO 6. el 30 de octubre de 2009
 - 7. Por el Ministerio de Asuntos Exteriores
 - 8. No. 030084
 - 9. Sello/estampilla: MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPÓN
 - 10. Firma: KAZUTOYO OYABE, A NOMBRE DEL MINISTRO DE RELACIONES EXTERIORES
- COLO-15277-841-001-8
- ECN\ECN\ID-161791\WPCL002G
- Bogotá, 25 de noviembre de 2009.

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL LEY
2009 NOV 26 A 10:46
Eduardo Calado
E.E. RELACIONES
EXTERIORES
BOGOTÁ D.C.

Eduardo Calado
Eduardo Calado Higuera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Y. de 1976

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES
14 6 178
Eduardo Calado
COPIA PARA EL ARCHIVO EN EL
BOGOTÁ D.C. DE ENFERMERIA
LAS FUENTES

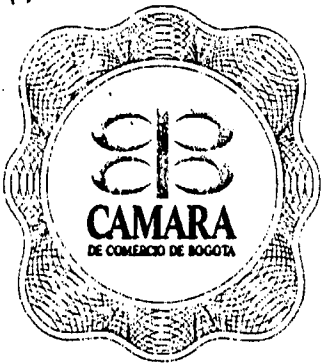
NOTARIO SEPTIMO DEL CIRCUITO DE BOGOTÁ
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCIDE
CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PRESENTADO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C. SEPTIEMBRE DE 2009
27 NOV 2009
NOTARIO ENCARGADO

REPUBLICA DE COLOMBIA
Jaime Vargas
NOTARIO ENCARGADO
NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
DE BOGOTÁ

ESPACIO

EN

BLANCO



01



* 8 6 5 4 4 3 0 4 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

29 DE OCTUBRE DE 2009 HORA 11:45:41

09NEB1029138

PAGINA: 1 de 3

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA) .-.

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.	FECHA	NOTARIA	INSCRIPCION
842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-III-1.983-NO.129.337

COMO NOTARIO SEXTA DE LA CAMARA DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME TENGO A LA VISTA BOGOTA D.C. SEPTIEMBRE DE 2009

27 NOV 2009

NOTARIO ENCARGADO



7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984	NO.	1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985	NO.	1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987	NO.	2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987	NO.	215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988	NO.	2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991	NO.	3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991	NO.	3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991	NO.	3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991	NO.	3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991	NO.	3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991	NO.	3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA.	27-VIII-1991	NO.	4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA.	16-III -1992	NO.	4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992	NO.	4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992	NO.	4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992	NO.	4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993	NO.	4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993	NO.	5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993	NO.	5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993	NO.	5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995	NO.	5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995	NO.	6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995	NO.	6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997	NO.	6.873

CERTIFICA:

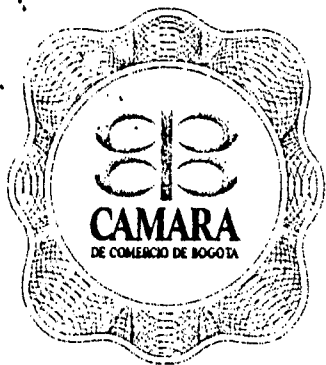
REFORMAS:

E.P.	NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA	D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA	D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA	D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA	D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA	D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA	D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA	D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA	D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/02/18	0006	BOGOTA	D.C.	2005/04/07	00009917
		0006	BOGOTA	D.C.	2005/08/26	00010008
		0006	BOGOTA	D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA	D.C.	2009/10/21	00012243

CERTIFICA:
VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024
NOTARIO ENCARGADO

CERTIFICA:
OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:
CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :
- SOCIO CAPITALISTA (S)
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO N.I.T. 000008001722568



01



* 8 6 5 4 4 3 0 5 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

29 DE OCTUBRE DE 2009

HORA 11:45:41

09NEB1029138

PAGINA: 2 de 3

NO. CUOTAS: 8,800.00	VALOR: \$8,800.00
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
NO. CUOTAS: 1,200.00	VALOR: \$1,200.00
- SOCIO INDUSTRIAL (S)	
CHAVARRO JORGE	C.C. 000000016209380
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA	C.C. 000000035456344
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
PEÑA VALENZUELA DANIEL	C.C. 000000079518915
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
MARIN RUALES GERMAN HUMBERTO	C.C. 000000079155665
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
TOTALES	
NO. CUOTAS: 10,000.00	VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

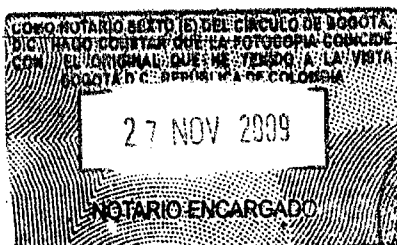
** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR NO. 12 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 14 DE AGOSTO DE 2009, INSCRITA EL 24 DE SEPTIEMBRE DE 2009 BAJO EL NUMERO 00012200 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

IDENTIFICACION

DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO)



C.C. 000000019066425

NOMBRE

IDENTIFICACION

CAVELIER GAVIRIA GERMAN

C.C. 000000002877924

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

C.E. 0000000000131100

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES: A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

**** REVISOR FISCAL ****

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

IDENTIFICACION

REVISOR FISCAL

RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO

C.C. 000000002877024

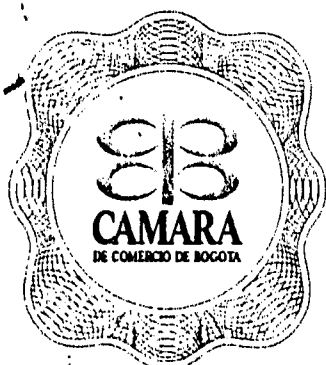
CERTIFICA:

CERTIFICA: ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE
 FIRMADOS EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES
 DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE
 RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE
* * * NOTARIO ENCARGADO FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO

EL SECRETARIO DE LA CAMARA

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
 JAVIERES



01



* 8 6 5 4 4 3 0 6 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

29 DE OCTUBRE DE 2009

HORA 11:45:41

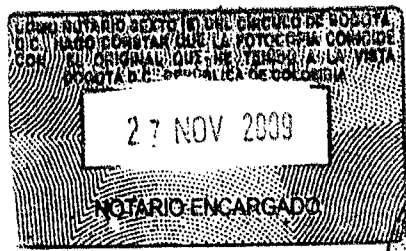
09NEB1029138

PAGINA: 3 de 3

VALOR : \$ 3,500

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban Q





expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad CAVELIER ABOGADOS, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día treinta (30) de octubre de

dos mil nueve (2009) por la Sociedad HAYASHI KASEI CO., LTD. documento que está debidamente legalizado por Apostille. - - - - -

Presente el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, domiciliado en Bogotá, identificado como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública. - - - - -

HASTA AQUI LA MINUTA

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION : Leída la presente escritura pública por el Compareciente y habiéndosele hecho las advertencias sobre los trámites y formalidades de rigor le impartió su aprobación y en constancia la firma por ante mí el Notario que AUTORIZA.

DERECHOS NOTARIALES : RESOLUCION 9500 del 31 de diciembre año 2008, \$ 41,610 / - - - - - IVA. \$ 14,617 / - - - - -

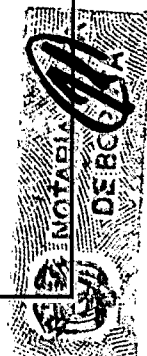
PAPEL NOTARIAL : Esta escritura se extendió en las hojas de papel sellado números : AA- 42355975 / 42355598 / - - - - -

EN BLANCO... EN BLANCO

Carlos Alberto Gallón Giraldo
CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO

CC.No. 19 066 628 RNT

Representante legal **CAVELIER ABOGADOS**





JAIME VARGAS CHAMBO

NOTARIA SEXTA (6a) DE BOGOTÁ D.C.

NOTARIO ENCARGADO

ELABORO : Mac.09-poder-

ES FIEL EL Y SEGUNDA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERO 6282 DE FECHA 27 DE NOVIEMBRE DE 2009. COPIA QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO EN 11 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTA DE REVOCATORIA, MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTAD.C. NOVIEMBRE 27 DE 2009

RESOLUCION 01 DE 2009

POR LA NOTARIA SEXTA



Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

domiciliado (s) en/of 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome.

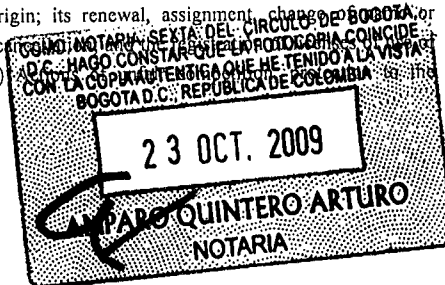
Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan

por el presente nombramos a LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 y GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos;

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555, DANIEL PEÑA, tpa. 65620 and GERMAN MARIN, tpa. 64239, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of domicile, voluntary cancellation, transfer, change of name or domicile, the above rights; b)





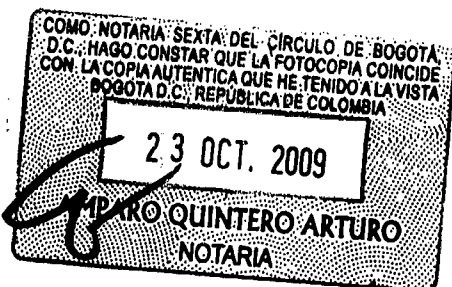
b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

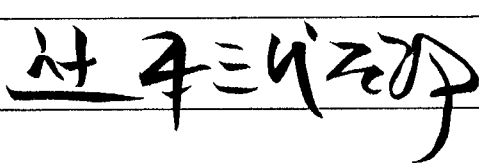
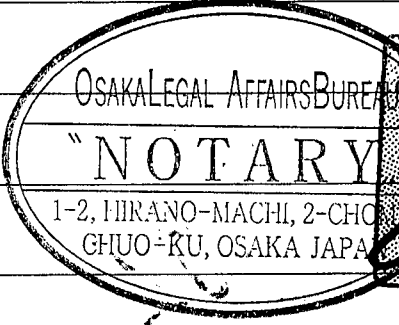
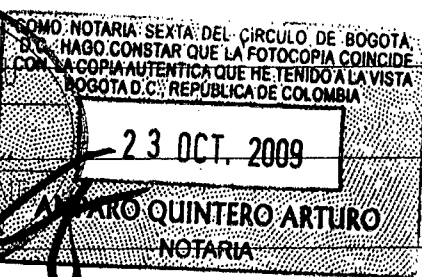
Dado y firmado hoy/Given and signed this 26th of June, 2009
en/in Japan
por/by Yoshio SAMEZAWA, Director of Intellectual Property Department

Firma

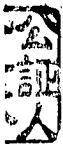
Signature



公証人

登簿平成 21 年第 387 号	
当公証人は次の認証をする。	
大 塚 製 薬 株 式 会 社	
知的財産部部長 鮫澤由夫	
上記の者は代理人 三 枝 英 二 により	
当公証人の前でこの証書の署名を自認した。	
上記の会社は日本国東京都千代田区神田司町 2	
丁目 9 番地に所在し日本の法律に基づいて設立	
された会社であることを東京法務局発行の証明	
書によって相違ないことが認められるものであ	
る。 _____	
平成 21 年 6 月 26 日当公証人役場において	
大阪市中央区平野町 2 丁目 1 番 2 号 (沢の鶴ビル内)	
大阪法務局所属	
公証人	 
	
	

大阪法務局所属 公証人役場



Registration No. 387-2009

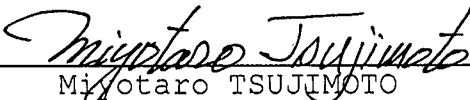
CERTIFICATE

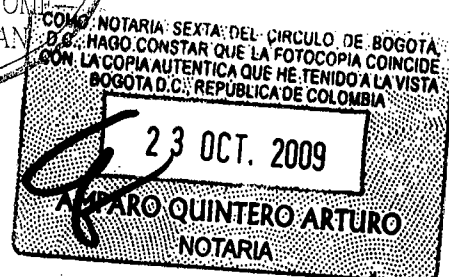
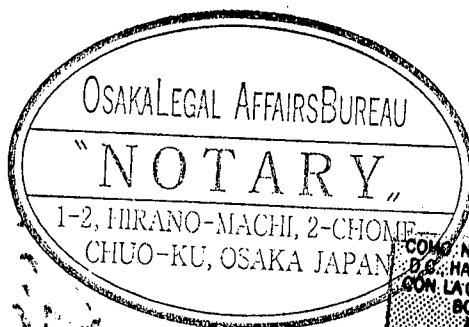
I, the undersigned, hereby certify :

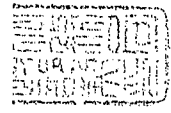
that Eiji SAEGUSA, a proxy for Yoshio SAMEZAWA, Director of Intellectual Property Department of OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., has stated in my presence that Eiji SAEGUSA has acknowledged as true the signature of Yoshio SAMEZAWA on the attached REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY.

that the abovementioned company is a corporation located at 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokyo 1018535, Japan; and was established under the laws of Japan ; as verified by the certificate issued by Tokyo District Legal Affairs Bureau.

Dated on this 26th day of June, 2009


Miyotaro TSUJIMOTO
Notary
Osaka Legal Affairs Bureau





証 明

大阪法務局所属公証人

辻本 三代太郎

平成 21 年 6 月 26 日付

平成 21 年 登簿 第 387 号

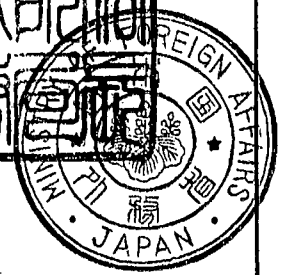
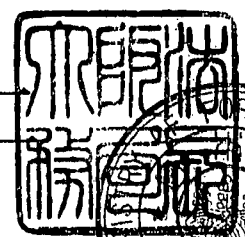
この認証の付与は、在職中の公証人が
その権限に基づいてしたものであり、
かつ、その押印は、真実のものであること
を証明する。

For legalization by the foreign consul in Japan,
this is to certify that the Seal affixed hereto
is genuine.
Osaka, JUN. 26 2009

平成 21 年 6 月 26 日
平成 年 月 日

Official
Ministry of Foreign Affairs
(Consular Service Division)

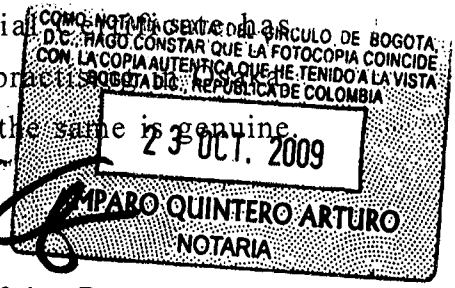
大阪法務局長 白石 研二



CERTIFICATE

This is to certify that the annexed Notarial
been executed by Notary, duly authorized and practicing in
Japan, and that the Official Seal appearing on the same is genuine.

Date JUN. 26. 2009



Director of the Osaka Legal Affairs Bureau

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

016576

2009 AGO -3 A 10-12

Jose Diaz
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

REGISTRACIONES
BOGOTA D.C.

EMBAJADA DE COLOMBIA - SECCION CONSULAR

Tokio, Japón, JUNIO 30, 2009

No. 173

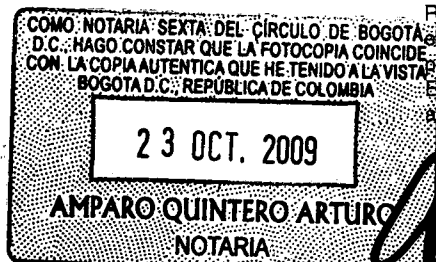
El encargado de las funciones consulares de Colombia

CERTIFICA:

Que el (la) Señor(a) NORIKO KAWAHITO, quien autoriza el presente documento, es la persona legalmente facultada para representar en la fecha señalada al (a la) MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPON y que la firma y sello que en

documento aparecen como suyos son las que usa y acostumbra para sus actos oficiales.

El Encargado de Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.



Firma del Encargado de Funciones Consulares

JOSE FRANCISCO DIAZ VILGA

Segundo Secretario

Encargado de Funciones Consulares

Derechos: US\$30.00

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 08.04/09b realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia, registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento mediante el cual **OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.**, domiciliada en 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tokio 1018535, Japón, otorga derechos de representación y poder a los Doctores Luz Clemencia de Páez, 23555; Daniel Peña, tpa. 65620 y Germán Marín, tpa. 64239, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia.

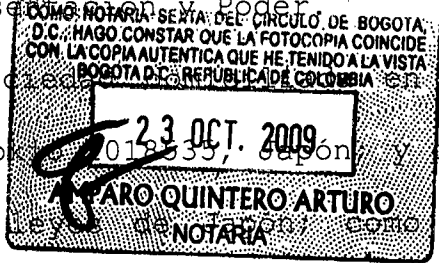
Dado y firmado el 26 de junio de 2009 en Japón por Yoshio SAMEZAWA, Director del Departamento de Propiedad Intelectual.

Firma Firma Ilegible

Registro No. 387 - 2009

CERTIFICADO

Yo, el suscrito, por el presente certifico:
que el señor Eiji SAEGUSA, apoderado de Yoshio SAMEZAWA, Director del Departamento de Propiedad Intelectual de OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD., ha declarado en mi presencia que Eiji SEAGUSA ha reconocido como verdadera la firma del señor Yoshio SAMEWAZA en el adjunto documento de Representación y Poder que la anterior compañía es una sociedad constituida en 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku, Tok 1018535, Japón y que fue constituida de conformidad con las leyes de Japón como lo constata el certificado expedido por la Oficina de Asuntos Legales de Tokio.



Fechado hoy 26 de junio de 2009

Diego F. Vargas
DIEGO F. VARGAS
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

Firma ilegible

Miyotaro TSUJIMOTO

Notario

Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Sello: Oficina de Asuntos Legales de Osaka

NOTARIO

1-2 HIRANO-MACHI, 2-CHOME,

CHUO-KU, OSAKA, JAPÓN

TEXTO EN JAPONÉS

CERTIFICADO

El presente es para certificar que el Certificado Notarial anexo fue suscrito por un Notario debidamente autorizado y en ejercicio en Osaka, Japón y que el sello oficial que aparece en el mismo es auténtico.

Fecha JUN.-26.2009

Director de la Oficina de Asuntos Legales de Osaka

Se anexa certificación No.173 expedida por la Sección Consular de la Embajada de Colombia en Tokio, Japón con fecha del 30 de junio de 2009 en donde se certifica la firma anterior del señor NORIKO KAWAHITO como funcionario del Ministerio de Relaciones Exteriores, Japón, así como el sello que aparece en el documento anexo. Certificación firmada por José Francisco Díaz Ulloa, Segundo Secretario de las Funciones Consulares. Pagados los Derechos Consulares.

Legalización de la firma anterior por

Legalizaciones en Bogotá D.C. del Ministerio de Relaciones Exteriores con número 016576 con fecha del 30 de junio de 2009



Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ\DVZ\ID-155360\WPCL002H\COLO 14055-841-003-5

TRABAJA EN EL ESPACIO DE TRABAJO - EN EL ESPACIO RES. OJO DE INERO 4 DE 1999

MINISTERIO DE JUSTICIA

CAVELIER

ABOGADOS

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

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

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 Comercio
E. S. D.

Asunto : Solicitud de la patente ARN CIRCULAR
MONOCATENARIO Y METODO PARA PRODUCIRLO.
Solicitante : OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

Yo, LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, obrando en mi calidad de apoderada principal del solicitante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted y sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor OSCAR CORREA, Abogado con Tarjeta Profesional N° 71.027, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,

Luz Clemencia Soárez
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N. 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

Acepto:

Oscar Correa

OSCAR CORREA

T.P.A. No. 71.027

C.C. No. 79.524.634 de Bogotá

Colo 17281-841-001-8

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C.

Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,

07 DIC 2009

NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE

BOGOTÁ, D.C.

Compareció(eron)

Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.

Y declaro(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n)
en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

Luz Clemencia Solís
TP # 23555 CSI.

[Handwritten signature]



CESION

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

(1) **Hiroshi ABE**

(2) **Yoshihiro ITO**

(3) **Naoko ABE**

(4) **Hidekazu TOYOBUKU**

domiciliado(s) en (1), (2) y (3) c/o Riken, 2-1, Hirosawa,
Wako-shi, Saitama 351-0198 Japón;

(4) c/o Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 224-18, Hiraishi-
Ebisuno, Kawauchi-cho, Tokushima-shi, Tokushima
771-0182 Japón.

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es)
de la invención:

declaro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin
limitación, a favor de la sociedad

RIKEN; OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
y HAYASHI KASEI CO., LTD.

constituidas y existentes de conformidad con las leyes de
Japón

domiciliadas en 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198
Japón; 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku,
Tokio 101-8535 Japón, y 2-7, Tenjinbashi 1-chome, Kita-
ku, Osaka-shi, Osaka 530-0041 Japón, respectivamente.

que los derechos inherentes a dicha invención y que la citada
Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de
invención correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned

(1) **Hiroshi ABE**

(2) **Yoshihiro ITO**

(3) **Naoko ABE**

(4) **Hidekazu TOYOBUKU**

of (1), (2) and (3) c/o Riken, 2-1, Hirosawa, Wako-shi,
Saitama 351-0198 Japan;

(4) c/o Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., 224-18, Hiraishi-
Ebisuno, Kawauchi-cho, Tokushima-shi, Tokushima
771-0182 Japan

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

**SINGLE-CHAIN CIRCULAR RNA AND METHOD
OF PRODUCING THE SAME**

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour
of

RIKEN; OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.
and HAYASHI KASEI CO., LTD.

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of
Japan

domiciled in 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198
Japan; 9, Kanda-Tsukasamachi 2-chome, Chiyoda-ku,
Tokyo 101-8535 Japan, and 2-7, Tenjinbashi 1-chome,
Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-0041 Japan, respectively.

all rights inherent to said invention and that the above mentioned
company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding
patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this 27th day of October, 2009
en/in Tokyo, Japan

por/by **Hiroshi ABE**

Firma/Signature



Dado y firmado hoy/Given and signed this 27th day of October, 2009
en/in Tokyo, Japan

por/by Yoshihiro ITO

Firma/Signature



Dado y firmado hoy/Given and signed this 27th day of October, 2009
en/in Tokyo, Japan

por/by Naoko ABE

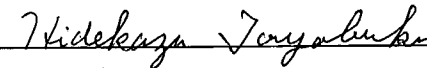
Firma/Signature



Dado y firmado hoy/Given and signed this 27th day of October, 2009
en/in Tokyo, Japan

por/by Hidekazu TOYOBUKU

Firma/Signature



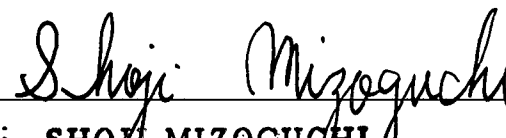


Registration No. 2243 of 2009

NOTARIAL CERTIFICATE

I, the undersigned, Notary in and for Tokyo, Japan, do hereby certify that Hiroshi ABE, Yoshihiro ITO, Naoko ABE and Hidekazu TOYOBUKU have acknowledged themselves that signatures on the foregoing document are their own and that their signatures are true and genuine.

Tokyo, Japan; on this 27th day of October, 2009.


Notary: **SHOJI MIZOGUCHI** 



認 証

43

嘱託人 阿 部 洋、伊 藤 嘉 浩、阿 部 奈 保 子 及 び 豊 福 秀 一
は、添付証書の署名がそれぞれ自己のものに相違ない旨、本公証人に対
し自認した。

よって、これを認証する。

平成 21 年 10 月 27 日、本公証人役場において

東京都千代田区麹町5丁目2番地1

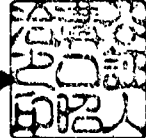
東 京 法 務 局 所 属

公 証 人

Notary

溝口昭侍

SHOJI MIZOGUCHI



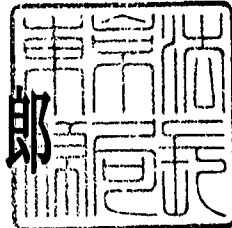
証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、
真実のものであることを証明する。

平成 21 年 10 月 27 日

東 京 法 務 局 長

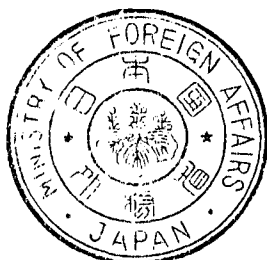
山 鋪 弥 一 郎



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN
This public document
2. has been signed by SHOJI MIZOGUCHI
3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of SHOJI MIZOGUCHI, Notary
Certified
5. at Tokyo
6. 27th October, 2009
7. by the Ministry of Foreign Affairs
8. 09- No 030070
9. Seal/stamp:
10. Signature



K. Oyabe

Kazutoyo OYABE

For the Minister for Foreign Affairs

TRADUCCIÓN OFICIAL 306/2009 DE UN DOCUMENTO EN INGLÉS Y ESPAÑOL POR EL CUAL LOS ABAJO FIRMANTES, 1) HIROSHI ABE; 2) YOSHIHIRO ITO Y 3) NAKO ABE, DOMICILIADOS EN C/O RIKEN, 2-1, HIROSAWA, WAKO-SHI, SAITAMA 351-0198, JAPÓN Y 4) HIDEKAZU TOYOBUKU, C/O OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD, 224-18, HIRAISHI-EBISUNO, KAWAUCHI-CHO, TOKUSHIMA-SHI, TOKUSHIMA 771-0182, JAPÓN, DECLARAN BAJO JURAMENTO SER LOS INVENTORES ÚNICOS Y VERDADEROS DEL INVENTO **ARN CIRCULAR MONOCATENARIO Y MÉTODO PARA PRODUCIRLO** Y QUE CEDEN Y TRANSFIEREN SIN LIMITACIÓN A FAVOR A RIKEN; OTSUKA PHARMACEUTICAL CO. LTD Y HAYASHI KASEI CO., LTD, UNA SOCIEDAD CONSTITUIDA Y EXISTENTE DE CONFORMIDAD CON LAS LEYES DE JAPÓN, DOMICILIADA EN 2-1, HIROSAWA, WAKO-SHI, SAITAMA 351-0198 JAPÓN; KANDA-TSUKASAMACHI 2-CHOME, CHIYODA-KU, TOKIO 101-8535 JAPON Y 2-7, TENJINBASHI 1-CHOME, KITA-KU, OSAKA-SHI, OSAKA 530-0041, JAPÓN RESPECTIVAMENTE TODOS LOS DERECHOS INHERENTES A DICHA INVENCION Y QUE LA CITADA COMPAÑIA QUEDA FACULTADA PARA SOLICITAR EN SU NOMBRE LA PATENTE DE INVENCION CORRESPONDIENTE EN LA REPUBLICA DE COLOMBIA.

DADO Y FIRMADO EL 27 DE OCTUBRE DE 2009 EN TOKIO, JAPÓN POR HIROSHI ABE. FIRMA ILEGIBLE

DADO Y FIRMADO POR YOSHIHIRO ITO EL 27 DE OCTUBRE DE 2009 EN TOKIO JAPÓN. FIRMA ILEGIBLE

DADO Y FIRMADO POR NAKO ABE EL 27 DE OCTUBRE DE 2009 EN TOKIO, JAPÓN, FIRMA ILEGIBLE

DADO Y FIRMADO EL 27 DE OCTUBRE DE 2009 EN TOKIO JAPÓN POR HIDEKAZU TOYOBUKU. FIRMA ILEGIBLE.

Eduardo Calado N.
Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

REGISTRO NÚMERO 2243 DE 2009

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

Yo, el abajo firmante, notario de Tokio, Japón, por la presente certifico que HIROSHI ABE, YOSHIHIRO ITO, NAKO ABE Y HIDEKAZU TOYOBUKU han reconocido que las firmas en el documento precedente son suyas y que sus firmas son verídicas y genuinas. Tokio, Japón, 27 de octubre de 2009.

FIRMADO: SHOJI MIZOGUCHI.

SELLO: OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE TOKIO

OFICINA NOTARIAL. 5-2-1 KOJIMACHI, CHIYODA-KU, TOKIO, JAPÓN.

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2. Este documento público ha sido firmado por SHOJI MIZOGUCHI
3. quien actúa en su calidad de notario de la Oficina de Asuntos Jurídicos de Tokio
4. lleva el sello/estampilla de SHOJI MIZOGUCHI

CERTIFICADO

5. En Tokio
6. el 27 de octubre de 2009
7. Por el Ministerio de Asuntos Exteriores

Eduardo Calado N.

Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

8. 09- No. 030070

9. Sello/estampilla: MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES,
JAPÓN

10. Firma: KAZUTOYO OYABE, a nombre del Ministro de
Relaciones Exteriores.

COLO-17281-841-001-8

ECN\ECN\ID-161603\WPCL002G

Bogotá, 23 de noviembre de 2009.

Eduardo Calado N.

Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 Febrero de 1976

NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TCYT

2009 NOV 24 A 10:36

Calado
JE E- LEGALIZACIONES
90601A D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

14 7723
Eduardo Calado
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

47

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008 年 11 月 20 日 (20.11.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/140126 A1

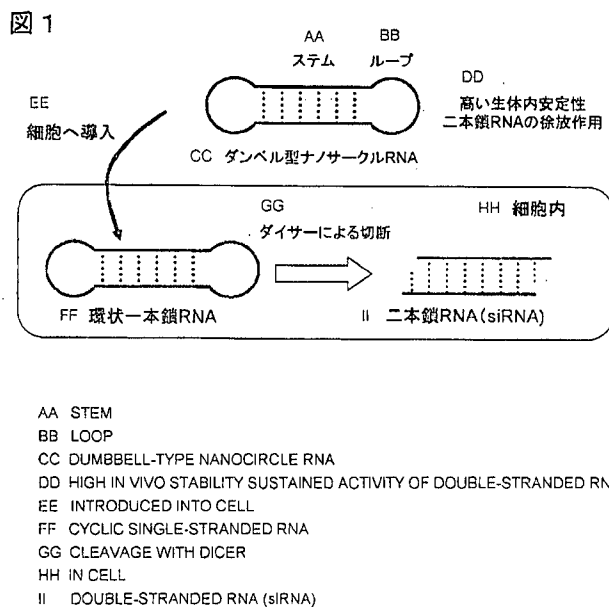
- (51) 国際特許分類:
CI2N 15/00 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) CI2N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/058990
(22) 国際出願日: 2008 年 5 月 9 日 (09.05.2008)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2007-125045 2007 年 5 月 9 日 (09.05.2007) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政
法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県
和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP). 大塚製薬株式会社
(OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP];
〒1018535 東京都千代田区神田司町 2 丁目 9 番地

- Tokyo (JP). 林化成株式会社 (HAYASHI KASEI CO.,
LTD.) [JP/JP]; 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋一
丁目 2 番 7 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 阿部洋 (ABE, Hi-
roshi) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号
独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 伊藤嘉浩
(ITO, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢
2 番 1 号独立行政法人理化学研究所内 Saitama (JP). 阿
部奈保子 (ABE, Naoko) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光
市広沢 2 番 1 号独立行政法人理化学研究所内 Saitama
(JP). 豊福秀一 (TOYOBUKU, Hidekazu) [JP/JP]; 〒
7710182 徳島県徳島市川内町平石夷野 2 2 4-1 8 大
塚製薬株式会社内 Tokushima (JP).
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町 MT
ビル 19 階 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: SINGLE-STRANDED CYCLIC RNA, AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: 1 本鎖環状 RNA およびその製造方法



(57) Abstract: Disclosed is single-stranded cyclic RNA having a sustained or extended RNA interference activity. The single-stranded cyclic RNA comprises a sense strand sequence, an antisense strand sequence complementary to the sense strand sequence, and two loop sequences which are the same as or different from each other and are located between the sense strand and the antisense strand so as to bind the both strands to each other, wherein the sense strand and the antisense strand are paired to form a stem.

(57) 要約: 本発明は、センス鎖配列と、該センス鎖配列に相補的なアンチセンス鎖配列と、該センス鎖と該アンチセンス鎖の間に両鎖を結合する同じか又は異なる 2 つのループ配列とを含み、該センス鎖と該アンチセンス鎖が対合してステムを

[続葉有]

WO 2008/140126 A1



(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,

KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- 添付公開書類:
- 国際調査報告書
 - 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

明 細 書

1 本鎖環状RNAおよびその製造方法

技術分野

本発明は、1本鎖環状RNA、その製造方法および1本鎖環状RNAを用いた医薬組成物に関する。

背景技術

これまでのRNA干渉法は、化学合成した2本鎖RNAを用いる方法とプラスミドベクターを用いる方法に大別される。後者のプラスミドベクターを用いたRNA干渉技術は、バイオテクノロジーとして汎用され、主に基礎生物学実験に用いられている。しかし、RNA干渉技術を医薬品開発に応用する場合、プラスミドベクターを用いた方法は人体への安全性が問題となるため、前者の化学合成した2本鎖RNAを用いることが望ましいようである。

しかしながら、化学合成した2本鎖RNAは、生体内不安定性、すなわち、細胞内の酵素（ヌクレアーゼ）で分解されやすいという問題があった。そこで、細胞内での2本鎖RNAの安定性を高めるために非天然核酸を導入したRNA鎖が開発されたが、安定性は高くなるが、生物活性は下がってしまうことが問題となっていた。さらに、非天然核酸が与える毒性も未知であり、医薬品への応用は難しかった。

RNA干渉法に用いる2本鎖RNAの形態は、平滑末端または突出末端を有する2本鎖RNA、2本鎖RNA末端の一方がループ状になっているヘアピン構造を有するRNA（特許文献1）、約19塩基対と2個のループを有し、かつ任意に化学修飾ポリヌクレオチドを有する環状核酸（特許文献2）などがある。しかしながら、この環状核酸は、RNA干渉効果について試験されていない。

また、RNA-DNAキメラのダンベル型核酸が開示されているが（特許文献3）、この核酸はRNA干渉に用いられるものではなく、細胞内でダンベル型核酸のRNA部分が酵素で切断されてアンチセンスDNA部分が細胞内のmRNAに

結合して阻害するものである。特許文献3には、核酸がダンベル型構造を有することにより、細胞内での核酸分解酵素耐性が高く、リボヌクレアーゼHが作用するまでは細胞内で安定に存在し、リボヌクレアーゼHの作用により相補的RNA部分が切除されて、はじめて、アンチセンスDNA部分を含む1本鎖オリゴヌクレオチドが細胞内に遊離されるので、投与量当たりのアンチセンス効果が高くなると考えられることが開示されている。

また、ダンベル型構造の環状核酸の合成方法については、例えば、線状にオリゴヌクレオチドを合成して、ステム部分とヘアピンループ部分を形成させ、目的とする環状ダンベル型オリゴヌクレオチドの1箇所（上記ヘアピンループ部分の反対側の末端）が結合されていないニックダンベル型オリゴヌクレオチドを得、その5'末端をリガーゼでライゲーションさせることにより、環状ダンベル型環状核酸を調製することが開示されている（特許文献3）。

特許文献1 特表2003-502012号公報

特許文献2 特開2006-271387号公報

特許文献3 特開平11-137260号公報

発明の開示

本発明は、1本鎖環状RNAおよびその製造方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、相補鎖を形成しない塩基配列を両端に有するセンス鎖とアンチセンス鎖を別々に合成して、両端の塩基にリガーゼを同時に作用させることにより、意外にも、高収率で1本鎖環状RNAを得られることを見出し、かつ、得られた1本鎖環状RNAがRNA干渉作用を持続的、徐放的に発揮することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

(1) センス鎖配列と、該センス鎖配列に相補的なアンチセンス鎖配列と、該センス鎖と該アンチセンス鎖の間に両鎖を結合する同じか又は異なる2つのループ配列とを含み、該センス鎖と該アンチセンス鎖が対合してステムを形成することを特徴とする、持続的又は徐放的RNA干渉作用を有する1本鎖環状RNA。

(2) 対照細胞における標的RNAの発現を1とした場合に、真核細胞に導入後

24時間の標的RNAの発現が0.4以下を示す、(1)に記載の1本鎖環状RNA。

(3) ヒト血清中で8時間経過したときに70%以上が保持されている、(1)または(2)に記載の1本鎖環状RNA。

(4) 相補鎖を形成しない塩基配列を5'末端および3'末端に有する、センス鎖およびアンチセンス鎖をそれぞれ合成し、センス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の5'末端の塩基とアンチセンス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の3'末端の塩基、およびセンス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の3'末端の塩基とアンチセンス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の5'末端の塩基を、リガーゼで同時に連結することを含み、

その際、センス鎖が5'末端に有する相補鎖を形成しない塩基配列とアンチセンス鎖が3'末端に有する相補鎖を形成しない塩基配列が互いに結合してループを形成し、センス鎖が3'末端に有する相補鎖を形成しない塩基配列とアンチセンス鎖が5'末端に有する相補鎖を形成しない塩基配列が互いに結合してループを形成し、ならびにセンス鎖とアンチセンス鎖が対合してステムを形成する、(1)～(3)のいずれかに記載の1本鎖環状RNAの製造方法。

(5) センス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列とアンチセンス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の5'末端をリン酸化することを更に含む、(4)に記載の製造方法。

(6) 前記ループの配列が互いに同じかまたは異なる、(4)または(5)に記載の製造方法。

(7) 前記ループの長さが2～20塩基である、(4)～(6)のいずれかに記載の製造方法。

(8) 前記ステムの長さが19～31塩基である、(4)～(7)のいずれかに記載の製造方法。

(9) (1)～(3)のいずれかに記載の1本鎖環状RNAをヒト由来の細胞に導入し、標的RNAを不能にしてタンパク質への翻訳を持続的に阻害することを含む、該タンパク質をコードする遺伝子の発現を*in vitro*で抑制する方法。

(10) (1)～(3)のいずれかに記載の1本鎖環状RNAを非ヒト動物、植物

又はその細胞に導入し、標的RNAを不能にしてタンパク質への翻訳を持続的に阻害することを含む、該タンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制する方法。

(11)(1)～(3)のいずれかに記載の1本鎖環状RNAを有効成分として含む、医薬組成物。

本明細書において、1本鎖環状RNAは、ダンベル型RNAともいう。ダンベル型RNAとは、センス鎖とアンチセンス鎖が相補的に対合してステムを形成し、ステムの両側に相補鎖を形成しない塩基配列によりループが形成され、1本鎖環状RNAの全体の形状としてダンベル状になっているものをいう。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2007-125045 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のダンベル型RNAを模式的に示す。

図2は、RNAの構造と各種RNAの電気泳動像を示す。

図3は、siRNAとダンベル型RNAの構造を示す。

図4は、ダイサーで切断したダンベル型RNAおよび2本鎖RNA (Linear) の電気泳動像を示す。

図5は、トランスフェクションから24時間後の各ダンベル型RNAの干渉効果を示す。

図6は、ダンベル型RNAの持続的なRNA干渉効果を示す。

図7は、ダンベル型RNAのヒト血清中の安定性を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の1本鎖環状RNAは、標的RNAの塩基配列又はその一部に相同なセンス鎖配列および該センス鎖配列に相補的であつて対合可能なアンチセンス鎖配列と、それらの鎖の間に相補鎖を形成しないループ配列を含む。

センス鎖とアンチセンス鎖は、対合してステムを形成する。ステムの長さは特に限定されず、標的RNAの種類や構造などに応じて長さを決定すればよいが、

例えば19～31塩基対、好ましくは21～25塩基対、より好ましくは22～24塩基対、さらに好ましくは23塩基対からなる。

相補鎖を形成しない塩基配列は、センス鎖とアンチセンス鎖のそれぞれ5'末端と3'末端にあつて、センス鎖の相補鎖を形成しない塩基配列の5'末端の塩基とアンチセンス鎖の相補鎖を形成しない塩基配列の3'末端の塩基とが連結してループを形成し、センス鎖の相補鎖を形成しない塩基配列の3'末端の塩基とアンチセンス鎖の相補鎖を形成しない塩基配列の5'末端の塩基とが連結してループを形成している。ループの長さは、好ましくは2～20塩基、より好ましくは6～12塩基からなる。従って、全体の1本鎖環状RNAは、好ましくは42～102塩基で形成される。

センス鎖の5'末端の相補鎖を形成しない塩基配列をA、アンチセンス鎖の3'末端の相補鎖を形成しない塩基配列をB、センス鎖の3'末端の相補鎖を形成しない塩基配列をC、アンチセンス鎖の5'末端の相補鎖を形成しない塩基配列をDとすると、例えばループの長さが20塩基の場合、Aは1～19塩基、Bは19～1塩基、Cは19～1塩基、Dは1～19塩基の長さを有し、Aの5'末端の塩基とBの3'末端の塩基が連結して20塩基のループを形成し、Cの3'末端の塩基とDの5'末端の塩基が連結して20塩基のループを形成する。

相補鎖を形成しない配列は、AとB間、CとD間で、例えば1塩基、2塩基または3塩基の長さの違いがあるか、または同じ長さであることが好ましい。従って、例えば、ループの長さが8塩基の場合、Aは3～5塩基、Bは5～3塩基、Cは5～3塩基、Dは3～5塩基の長さであることが好ましい。ループの長さが9塩基の場合、Aは3～6塩基、Bは6～3塩基、Cは6～3塩基、Dは3～6塩基であることが好ましい。ループの長さが10塩基の場合、Aは4～6塩基、Bは6～4塩基、Cは6～4塩基、Dは4～6塩基であることが好ましい。

なお、AとBで形成されるループとCとDで形成されるループの塩基配列は、同じでも異なってもよい。

本発明の1本鎖環状RNAは、RNA干渉法に用いることができる。

RNA干渉とは、RNA interference (RNAi) ともいい、標的RNAと相補的な配列を持つ小RNA分子が標的RNAに結合し、それを分

54

解するか又は翻訳を抑制する現象である。

ダンベル型RNAのアンチセンス鎖は、標的となるRNA（例えばmRNAまたはその前駆体RNA）に相補的な配列を有する。また、相補鎖を形成しない塩基配列は、特に限定されないが、例えばUUCAAGAGA、またはUGUGCUGUC（M. Miyagishiら、Oligonucleotides 2003, 13: 1-7）などが挙げられる。

更に、ダンベル型RNAのループは化学修飾されていてもよく、例えば分子量約2000～5000のポリエチレングリコールで修飾すると、生体内でのダンベル型RNAの安定性を向上することができる。細胞内でダイサーなどの酵素によりダンベル型RNAのループが切断され除去されるので、ステムがsiRNA又はmiRNAとしてRNA干渉作用を発揮する際、ポリエチレングリコールが影響を与えることはほとんどないと考えられる。

本発明のダンベル型RNAは、対照細胞（ダンベル型RNAが導入されていない）における標的RNAの発現を1とした場合に、該ダンベル型RNAを導入した細胞における細胞導入後24時間での標的RNAの発現が0.4以下を示すことが好ましい。本発明において、細胞は真核細胞であり、好ましくは動物細胞および植物細胞である。

標的RNAの発現は、例えばレポーター遺伝子（ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、グリーンフルオレッセンスプロテイン（GFP）など）を細胞に形質転換し、レポーター遺伝子のmRNAを標的RNAとして、該標的RNAの発現がダンベル型RNAによってどのくらい阻害されているかを、レポーター遺伝子由来のタンパク質の発色、蛍光を測定することにより確認することができる。

更に、本発明のダンベル型RNAは、ヒト血清中で8時間経過したときに70%以上が分解されずに保持されるという特徴を有する。例えばヒト血清中でダンベル型RNAをインキュベーションし、経時的に分解されるかどうかを電気泳動などで分子量を測定することにより確認することができる。

本発明のダンベル型1本鎖環状RNAの製造方法は、相補鎖を形成しない塩基配列を5'末端および3'末端に有する、センス鎖およびアンチセンス鎖をそれ

55

ぞれ合成し、センス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の5'末端の塩基とアンチセンス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の3'末端の塩基、およびセンス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の3'末端の塩基とアンチセンス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の5'末端の塩基を、リガーゼで同時に連結することを含む。

センス鎖およびアンチセンス鎖は、標的となる遺伝子を抑制できるように、標的遺伝子の塩基配列から設計する。設計は、複数のセンス鎖およびアンチセンス鎖を作製してそれぞれ抑制効率を確認してもよいが、例えばsiRNA設計用アルゴリズムなどによる設計を利用してもよい（参照文献：J. A. Jaeger et al., *Methods in Enzymology* (1989) 183:281-306; D. H. Mathews et al., *J. Mol. Biol.* (1999) 288:911-940)。設計時には、標的遺伝子と類似した配列を持つ、標的遺伝子以外の遺伝子の発現を抑制すること（Off target効果）がないことが望ましい。センス鎖およびアンチセンス鎖は、特に限定されないが、例えば19～31塩基、好ましくは21～25塩基、より好ましくは22～24塩基、さらに好ましくは23塩基の長さで設計する。

標的遺伝子は特に限定されないが、例えば、白血病のabl/bcr遺伝子、加齢性黄斑変性症のVEGF遺伝子、肝炎のHCV遺伝子が挙げられる。

後にループを形成する配列、例えば上記配列UUCAAGAGAを任意の箇所で2つに分けて相補鎖を形成しない塩基配列とし（該配列は9塩基であり、2つに分けたときに、上述のように長さの違いが1～3塩基の範囲にあることが好ましい）、一方をアンチセンス鎖の3'末端、もう一方をセンス鎖の5'末端に連結した配列を設計し、同様にして一方をセンス鎖の3'末端、もう一方をアンチセンス鎖の5'末端に連結した配列を設計する。設計したこれら2つの配列の1本鎖核酸を、それぞれ別に合成する。その際、化学的リン酸化試薬を用いて5'末端のリン酸化を行うことが好ましい。なお、ループを形成したときの長さが、例えば2～20塩基、好ましくは6～12塩基になるように設計することが好ましい。

核酸合成方法は、in vitro transcription合成方法、

プラスミド、ウイルスベクターを用いる方法、PCRカセットによる方法など種々の方法があり、特に限定されないが、純度の高さ、大量合成可能、*in vivo*での使用安全性の高さ、化学修飾可能などの点から、化学合成方法が好ましい。化学合成方法は、H-ホスホネート法、ホスホロアミダイト法などがあり、特に限定されず、市販の自動核酸合成機を使用することができる。

センス鎖およびアンチセンス鎖の両端にある相補鎖を形成しない塩基配列の末端をリガーゼ（例えばT4 RNAリガーゼ、T4 DNAリガーゼなど）で連結して、2つのループを同時に形成する。反応条件は、例えばポリエチレングリコール(PEG)、BSAなどを含む緩衝液中で低温下20時間インキュベーションすればよい。合成したダンベル型1本鎖環状RNAは、常法で回収・精製（例えば高速液体クロマトグラフィー、PAGE法など）することができる。

更に、1本鎖環状RNAをポリエチレングリコール(PEG)などで化学修飾してもよく、化学修飾はループ部分に行うことが好ましい。結合のために、PEGの両末端を改変して、たとえばホルミル基、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基などの、塩基のアミノ基と反応性の官能基を導入する。

以下、上記方法で製造したダンベル型RNAを用いた、RNA干渉法について説明する。

本発明によれば、本発明の1本鎖環状RNAを細胞に導入し、標的RNAを不能にしてタンパク質への翻訳を持続的に阻害することができ、前記細胞は、ヒト細胞または非ヒト細胞を用いることができる。

*in vitro*でRNA干渉法を行う場合、ダンベル型RNAを、例えばエレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、リン酸カルシウム法などで細胞に導入する。

*in vivo*でRNA干渉法を行う場合、まずダンベル型RNAを含む試料を透析、pH調節などを行って、生体に適合するように調製する。動物又は植物への導入方法は特に限定されず、例えば局所投与、静脈内投与、遺伝子銃を用いる方法などが挙げられ、ヒトに適用する場合、安全性の点から微生物等を用いない方法が好ましい。

細胞内に導入されたダンベル型RNAは、細胞内ダイサーにより切断を受けR

S7

NA干渉作用のあるRNA 2本鎖 (siRNA) を細胞内で生じる (図1)。siRNAの末端は、平滑末端または突出末端であり得る。siRNAが1本鎖となり、RNA-ヌクレアーゼ複合体 (RNA induced silencing complex (RISC)) を形成し、siRNAと相補的な配列の標的mRNAを認識して、mRNAを分解し、標的遺伝子の発現が抑制される。

本発明の1本鎖環状RNAは、植物、動物 (例えばヒト、ペット、家畜を含む哺乳動物など)、それらの細胞のいずれでも使用可能であり、特に医学、農学分野での広範な応用が期待される。例えば、植物又は動物レベルあるいは植物又は動物細胞レベルでの特定の遺伝子やタンパク質の機能の解明、例えばノックアウト法による機能の解明など、種々の目的のために本発明の1本鎖環状RNAを使用することができる。

また、本発明は、1本鎖環状RNAを有効成分として含む医薬組成物を含有する。

1本鎖環状RNAの医薬組成物への配合量は、組成物の種類や目的等によって調整することができ、組成物の全量に対して、例えば1重量%、3重量%、5重量%、10重量%、20重量%、30重量%、40重量%、50重量%、60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、100重量%であるが、これらに限定されない。

本発明の医薬組成物の剤形として、例えば液体製剤 (溶液剤、懸濁剤、乳濁剤など)、固体製剤 (用時調製の凍結乾燥剤など)、リポソーム (カチオン性リポソームが好ましい) 封入製剤などが挙げられ、また投与経路として、非経口投与が好ましく、例えば患部に直接投与する局所投与、経肺投与、経鼻投与等の経粘膜投与、静脈内投与などが含まれる。

本発明の医薬組成物は、製剤化、剤形等に応じて、賦形剤 (生理食塩水、滅菌水、リンゲル液など)、緩衝剤、等張化剤、安定化剤などを含めてもよい。

また、本発明の医薬組成物の投与量は、患者の性別、体重、年齢、重篤度、症状などに応じて変更し得る。

本発明の医薬組成物の適用は、特に限定されないが、例えば、癌などの疾患の治療、例えば癌細胞で特異的に発現する遺伝子やタンパク質の機能の抑制などが

挙げられる。

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものではない。

実施例 1

ダンベル型RNAの作製

ダンベル型RNAの原料となる5'リン酸化RNAは、全てホスホロアミダイト法に基づきDNA合成機(GeneWorld H8-SE)により合成した。RNAアミダイトはTBDMS保護体(Proligo)、5'リン酸化はChemical Phosphorylation Reagent(Glen Research)を用いた。脱保護は定法に従い、PAGE精製した。合成したRNA配列を、配列番号1(センス鎖28mer)、配列番号2(アンチセンス鎖28mer)、配列番号3(56mer)および図2に示す。なお、図2のRNA配列のうち、下線の配列がダンベル型RNAのループ部を形成する配列である。

次に、酵素反応を、2 μ M RNA double strand、2.0 units/ μ l T4 RNAリガーゼ、0.006%BSA、25%PEG6000、50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、10mM DTT、1mM ATPの組成で、反応スケール25 μ lで行った。

具体的には、まず、5'リン酸化RNA 2本鎖が4 μ Mとなるよう、100mM Tris-HCl (pH7.5)、20mM MgCl₂、20mM DTT、2mM ATP緩衝液中(2x緩衝液)12.5 μ lに溶解し、65℃で5分間加熱後、室温まで徐冷した。その後、BSA水溶液、PEG6000水溶液、T4 RNAリガーゼ(タカラバイオ)を上記の組成と反応スケールになるように加え、11℃で20時間インキュベートした。エタノール沈殿により、回収したRNAをPAGEにて解析した。

図2のPAGEの各レーンのサンプルは以下の通りである。

レーン1：28塩基のセンス鎖および28塩基のアンチセンス鎖の混合物(マーカー)

レーン2：57塩基のRNA(マーカー)

レーン3：28塩基のセンス鎖と28塩基のアンチセンス鎖から形成したダンベル型RNA

レーン4：56塩基（1本鎖）から形成したダンベル型RNA

レーン5：RNAリガーゼで処理した28塩基のセンス鎖（参考）

レーン6：RNAリガーゼで処理した28塩基のアンチセンス鎖（参考）

レーン4のダンベル型RNAは、配列番号3の56塩基の1本鎖を合成してステム部分およびヘアピンループ部分を形成し、最初の塩基と最後の塩基をT4リガーゼで結合して作製した。

レーン3の丸で囲んだバンドが、本発明の方法で作製したダンベル型RNAであり、その収率は約80%であった。レーン4のダンベル型RNAの収率は約5%以下であった。

実施例2

ダンベル型RNAのステムの長さの検討

上記DNA合成機で、配列番号4～13に示すRNAを合成した。配列番号4および5は18塩基対を形成する2本鎖RNA（siRNA-1）、配列番号6および7はステムの長さ19塩基のダンベル型RNA（Db-19）、配列番号8および9はステムの長さ23塩基のダンベル型RNA（Db-23）、配列番号10及び11はステムの長さ27塩基のダンベル型RNA（Db-27）、配列番号12および13はステムの長さ31塩基のダンベル型RNA（Db-31）を形成する（図3）。

酵素反応を、2 μ M RNA double strand、1.0 unit s / μ l T4 RNAリガーゼ、0.006% BSA、25% PEG 6000、50mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM MgCl₂、10mM DTT、1mM ATPの組成で、反応スケール1.5～2.5mlで行った。

具体的には、5'リン酸化RNA 2本鎖が4 μ Mとなるよう、100mM Tris-HCl (pH 7.5)、20mM MgCl₂、20mM DTT、2mM ATP緩衝液中（2x緩衝液、最終的な反応液量の半分量）に溶解し、65℃で5分間加熱後、室温まで徐冷した。その後、BSA水溶液、PEG 6000水

溶液、T4 RNAリガーゼ（タカラバイオ）を上記の組成と反応スケールになるように加え、11℃で20時間インキュベートした。

反応液からアルコール沈殿によりRNAを回収し、PAGEを用いて環化体を単離した。UV shadowing法で目的物を含むバンドを可視化して切り出し、細かく粉碎した後、溶出バッファー（0.2M NaCl、1mM EDTA（pH8.0））4mlで3回抽出した。Sep-Pakカートリッジを用いて脱塩（50%アセトニトリル水6mlで溶出）し、遠心エバポレーターを用いて濃縮し、さらに酢酸アンモニウム存在下アルコール沈殿した。UVスペクトルを測定し得られた目的物を定量した。

上記各ダンベル型RNA 2μgに20mM Tris-HCl（pH8.5）、150mM NaCl、2.5mM MgCl₂緩衝液中Cold Shock-DICER（タカラバイオ）2unitsを加え（反応液量20μl）、37℃でインキュベートした。1、6、18時間後に反応液3μlをサンプリングし、120mM EDTA水溶液2μlと混合し、酵素反応を停止した。これを未変性PAGE（10%PAGE、1x TBE）で解析した（1xSYBR Green Iで染色後、BioRad Molecular Imager FXで画像化・定量を行った）。

図4に各ダンベル型RNAのPAGEを示す。コントロールとして、ダンベル化反応前の2本鎖RNAを基質とする切断反応も同様に検討した。その結果、Db-19の切断反応は、1時間後に約5%進行し、20塩基長の2本鎖RNAの生成が確認された。Db-19の20塩基前後の切断断片は、6、18時間後とほぼ同程度の濃度を維持した。一方、コントロールの19塩基直鎖（Liner）は、1時間後にほぼ100%切断され20塩基長のRNA 2本鎖が観察された。その後、時間とともにその生成物のRNA 2本鎖は、分解され消失した。Db-23では、1時間後に約8%切断され20塩基長の2本鎖が生成した。ステムの長さが長くなるに従い、Db-27、Db-31と1時間後の切断速度が10%、20%と速くなることが確認された。18時間後、Db-19では原料が約75%残っているのに対して、Db-31では原料が完全に消失した。このことから、ステムの長さが短い方が酵素に対して安定であることが明らかとなった。

実施例 3

ダンベル型RNAのRNA干渉効果

上記ダンベル型RNA (Db-19、Db-23、Db-27、Db-31) のRNA干渉効果を蛍ルシフェラーゼレポーター遺伝子 pGL3 の発現阻害実験により評価した。

NIH 3T3細胞 (RIKEN CELL BANK) を10%FCSを含むDMEM (GIBCO) 培地中で37℃、5%CO₂下培養し、96穴プレートに、100μlずつ、1.6×10⁴細胞/ウェルとなるよう分注した。さらに37℃、5%CO₂下で39時間培養し、約70%コンフルエントの状態で2種のプラスミドベクター (pGL3-Control、pRL-TK (内部標準用)、いずれもPromega) と各種RNAをトランスフェクション試薬Gene Silencer (Genlantis) を用い、トランスフェクション試薬添付のプロトコルに従い、コトランスフェクションした。トランスフェクション時の濃度条件は以下の通りである。

0.2μg pGL3-Control / 0.02μg pRL-TK / 25nM RNA (最終量100μl)

Gene Silencer	1μl
DMEM培地	25μl
siRNA希釈液	2.5μl
DMEM培地	15μl
RNA (5pmol/μl)	0.5μl
pGL3-Control (1μg/μl)	0.2μl
pRL-TK (0.1μg/μl)	0.2μl
	44.4μl

トランスフェクション後、37℃、5%CO₂下4時間インキュベートし、20%血清入りDMEM培地100μlをそれぞれのウェルに加えた。37℃でさらに20時間インキュベート後、Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega) を用い、添付のプロトコ

ールに従い細胞を可溶化してルシフェラーゼ発現量を定量した（条件：試薬量 30 μ l、delay time 2 秒、read time 10 秒。機器 Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter）。

比較として、バッファーのみ（コントロール）の条件も同様に評価した。蛍光ルシフェラーゼの発光強度は、内部標準であるレニラルシフェラーゼの発光強度により補正した。その結果を図 5 に示す。24 時間後では、ダンベル型 RNA のうち、Db-23 の活性が最も高く、0.24 まで阻害効果を示した。この結果から、最適な二本鎖長を 23 塩基とした。

実施例 4

RNA 干渉効果の持続性

Db-23 と siRNA-1 の RNA 干渉効果の持続性について比較した。

NIH 3T3 細胞を、10% ウシ仔牛血清 (FCS、Invitro/Gibco) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、Gibco) で、5% CO₂ 加湿チャンバーで培養した。約 70% コンフルエントの状態のトランスフェクションの 40 時間前に、細胞を 96 穴プレートに、100 μ l ずつ、 1.6×10^4 細胞/ウェルになるように分注した。レポータープラスミドと RNA のコトランスフェクションを Gene Silencer (Gene Therapy Systems) を用いて NIH 3T3 細胞の製造者による説明に従って行った。実施例 3 と比べてトランスフェクション試薬で 10 倍に希釈した 16 ng/ml の pGL3-Control (Promega)、1.6 ng/ml の pRL-TK (Promega) および 25 nM の RNA を、ウェルに 100 μ l 適用した。4 時間のインキュベーション後、20% FCS を含む DMEM を 100 μ l 添加した。更に 3 日以上インキュベーションを行い、培地を随時交換した。ルシフェラーゼの発現を、Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer) に添付の指示書に従い、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) で、24 時間、72 時間、120 時間後にモニターした（図 6）。RNA の入っていないものをコントロールとした。

ルシフェラーゼの活性は、24時間ではDb-23とsiRNA-1ともにほぼ同等の活性を示したが、120時間後では、Db-23がより高い遺伝子発現抑制作用を示した。このことから、ダンベル型RNAの徐放作用、長期活性効果が示された。

実施例5

ヒト血清中でのダンベル型RNAの安定性

Db-23とsiRNAのヒト血清中での安定性を比較した。

アニーリングバッファー（100mM酢酸カリウム、30mM HEPES-KOH（pH7.4）、2mM酢酸マグネシウム）にアニーリング前のdsRNA（siRNA-1、20μM）またはダンベル型RNA（Db-23、20μM）を加えたその4μlと、PBS32μl、正常ヒト血清（Chemicon International）4μlを混合して37℃でインキュベーションした。アリコート5μlを0.5、1、1.5、3、8および20時間後に採取し、15%nativePAGEで、SYBR Green Iで染色、Molecular Imager FX（BioRad）を使用して分析した。

その結果、siRNAは、3時間後に50%まで分解されるのに対して、Db-23は依然として80%以上存在し、8時間後でも70%以上存在していた。従って、Db-23は、生体内での高い安定性が期待できた。

産業上の利用可能性

本発明により、安定性、持続性および徐放性に優れたダンベル型合成RNAを効率よく作製することができる。

特に、RNA干渉法に用いるダンベル型RNAは、2本のRNA鎖を環化することにより作製され、両端がループ状に閉じているために、RNA末端がなくなり、細胞内において、ダイサーなどの特異的酵素以外は、分解酵素エキソヌクレアーゼ（RNase）などの基質となりにくいので、酵素により分解されにくく、細胞内での安定性が飛躍的に増す。そのため、安定性を高めるために非天然型核酸を用いる必要がない。

また、ダンベル型RNAは、細胞内で生体内酵素ダイサーなどに特異的に認識されて、両側のループ部が切断されて天然型RNA 2本鎖になるため（図1）、2本鎖RNAと同等の活性を持ち得、また、従来の2本鎖RNAによるRNA干渉作用よりも持続的、徐放的な効果がある。

本発明のダンベル型RNAは、従来の2本鎖RNAよりもヒト血清中で安定であり、生体に適用できる核酸分子として利用可能である。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

1. センス鎖配列と、該センス鎖配列に相補的なアンチセンス鎖配列と、該センス鎖と該アンチセンス鎖の間に両鎖を結合する同じか又は異なる2つのループ配列とを含み、該センス鎖と該アンチセンス鎖が対合してステムを形成することを特徴とする、持続的又は徐放的RNA干渉作用を有する1本鎖環状RNA。

2. 対照細胞における標的RNAの発現を1とした場合に、真核細胞に導入後24時間の標的RNAの発現が0.4以下を示す、請求項1に記載の1本鎖環状RNA。

3. ヒト血清中で8時間経過したときに70%以上が保持されている、請求項1または2に記載の1本鎖環状RNA。

4. 相補鎖を形成しない塩基配列を5'末端および3'末端に有する、センス鎖およびアンチセンス鎖をそれぞれ合成し、センス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の5'末端の塩基とアンチセンス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の3'末端の塩基、およびセンス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の3'末端の塩基とアンチセンス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の5'末端の塩基を、リガーゼで同時に連結することを含み、

その際、センス鎖が5'末端に有する相補鎖を形成しない塩基配列とアンチセンス鎖が3'末端に有する相補鎖を形成しない塩基配列が互いに結合してループを形成し、センス鎖が3'末端に有する相補鎖を形成しない塩基配列とアンチセンス鎖が5'末端に有する相補鎖を形成しない塩基配列が互いに結合してループを形成し、ならびにセンス鎖とアンチセンス鎖が対合してステムを形成する、請求項1～3のいずれか1項に記載の1本鎖環状RNAの製造方法。

5. センス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列とアンチセンス鎖が有する相補鎖を形成しない塩基配列の5'末端をリン酸化することを更に含む、請求項4に記載の製造方法。

6. 前記ループの配列が互いに同じかまたは異なる、請求項4または5に記載の製造方法。

7. 前記ループの長さが2～20塩基である、請求項4～6のいずれか1項

に記載の製造方法。

8. 前記システムの長さが19～31塩基である、請求項4～7のいずれか1項に記載の製造方法。

9. 請求項1～3のいずれか1項に記載の1本鎖環状RNAをヒト由来の細胞に導入し、標的RNAを不能にしてタンパク質への翻訳を持続的に阻害することを含む、該タンパク質をコードする遺伝子の発現を*in vitro*で抑制する方法。

10. 請求項1～3のいずれか1項に記載の1本鎖環状RNAを非ヒト動物、植物又はそれらの細胞に導入し、標的RNAを不能にしてタンパク質への翻訳を持続的に阻害することを含む、該タンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制する方法。

11. 請求項1～3のいずれか1項に記載の1本鎖環状RNAを有効成分として含む、医薬組成物。

67

図 1

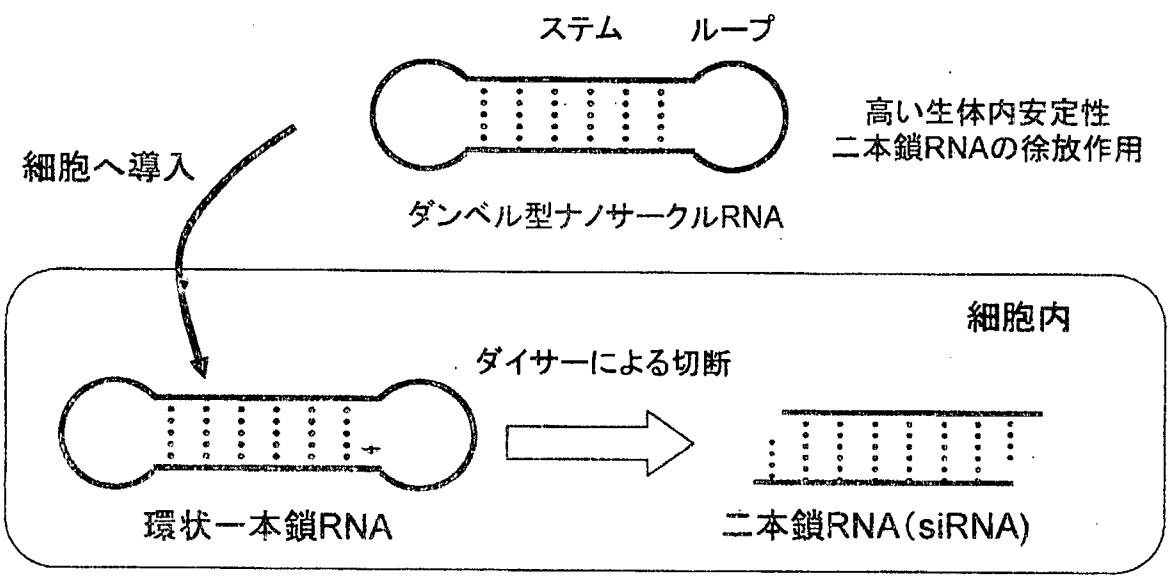
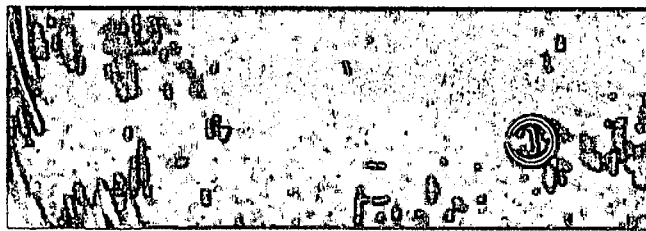


図 2

Lane 1 2 3 4 5 6



56塩基

5' -p-GAG A CUU ACG CUG AGU ACU UCG A U A
3' - AACU U GAA UGC GAC UCA UGA AGC U A G A G

28塩基 (上:センス鎖、下:アンチセンス鎖)

5' -p-GAG A CUU ACG CUG AGU ACU UCG A U UCAA -3'
3' - AACU U GAA UGC GAC UCA UGA AGC U A GAG -p- 5'

63

図 3

siRNA-1'

5' - GUG CGC UGC UGG UGC CAA CUU
UU CAC GCG ACG ACC ACG GUU G -5'

Db-19

 G A G U C A
A A GUG CGC UGC UGG UGC CAA C U A
 U CAC GCG ACG ACC ACG GUU G A A
A C U G A G

Db-23

 G A G U C A
A A A GUG CGC UGC UGG UGC CAA CCC U U A
 U U CAC GCG ACG ACC ACG GUU GGG A A A
A C U G A G

Db-27

 G A G U C A
A A AAA GUG CGC UGC UGG UGC CAA CCC UAU U A
 U UUU CAC GCG ACG ACC ACG GUU GGG AUA A A
A C U G A G

Db-31

 G A G U C A
A A UC AAA GUG CGC UGC UGG UGC CAA CCC UAU UC U A
 U AG UUU CAC GCG ACG ACC ACG GUU GGG AUA AG A A
A C U G A G

70

図 4

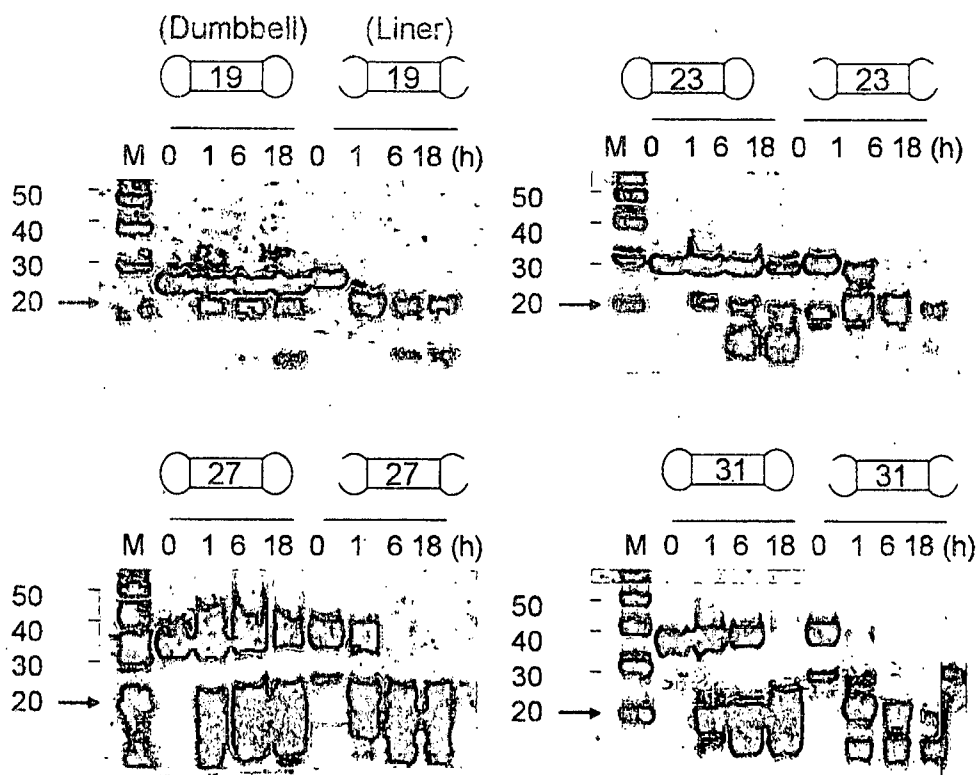
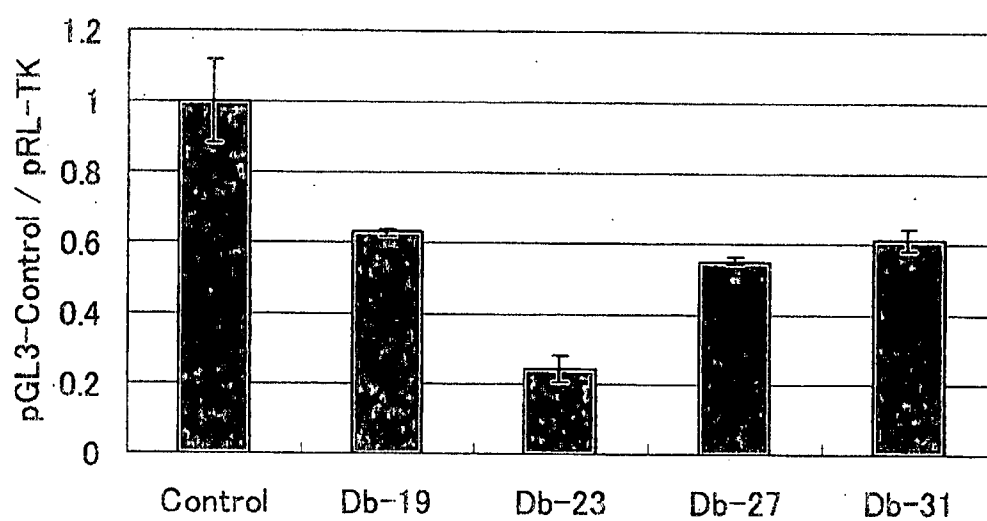
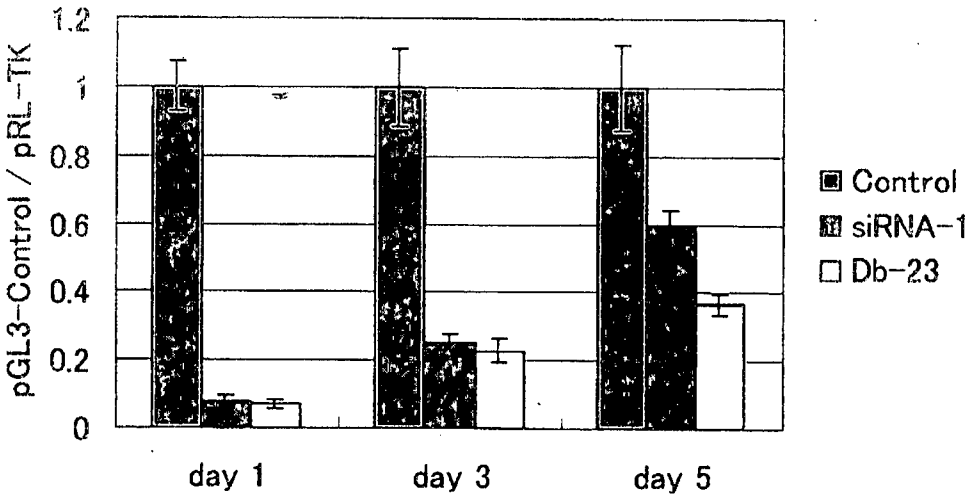


図 5



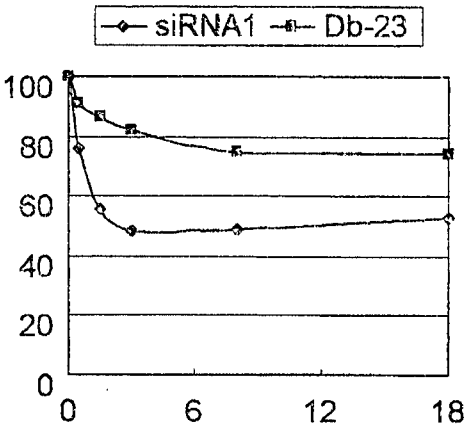
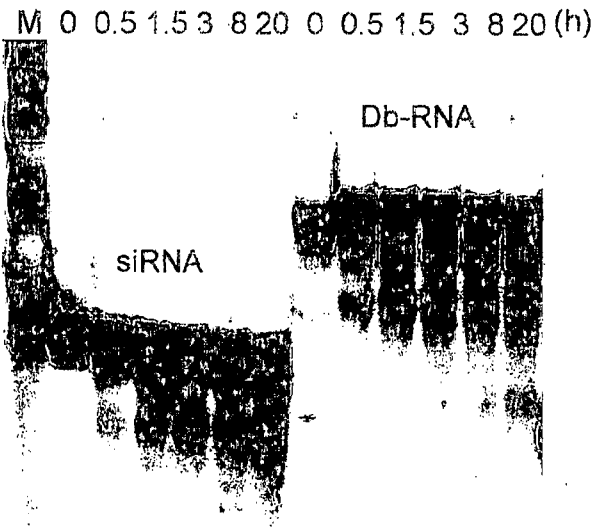
72

図 6



x3

図 7



74

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

Hayashi Kasei Co., Ltd.

<120> A single-chain circular RNA and method of producing the same

<130> PH-3542PCT

<150> JP 2007-125045

<150> 2007-05-09

<160> 13

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 28

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 1

gagacuuacg cugaguacuu cgauucaa

28

<210> 2

<211> 28

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 2

gagaucgaag uacucagcgu aaguucac

28

<210> 3

75

<211> 56
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 3
gagacuuacg cugaguacuu cgauucaaga gaucgaagua cucagcguaa guuca 56

<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 4
gugcgcugcu ggugccaacu u 21

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 5
guuggcacca gcagcgacu u 21

<210> 6
<211> 28
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

7b

<400> 6

gagagugcgc ugcuggugcc aacuucaa

28

<210> 7

<211> 28

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 7

gagaguuggc accagcagcg cacuucaa

28

<210> 8

<211> 32

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 8

gagaagugcg cugcuggugc caaccuuuc aa

32

<210> 9

<211> 32

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic

<400> 9

gagaagggug ggcaccagca gcgcacuuuc aa

32

<210> 10

77

<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 10
gagaaaagug cgcugcuggu gccaaaccua uuucua

36

<210> 11
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 11
gagaauaggg uuggcaccag cagcgacuu uuucua

36

<210> 12
<211> 40
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

<400> 12
gagaucaaag ugcgcugcug gugccaaccc uauucuucaa

40

<210> 13
<211> 40
<212> RNA
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic

78

<400> 13

gagagaauag gguuggcacc agcagcgcac uuugauucaa

40

29

MEMORIA

ARN CIRCULAR MONOCATENARIO Y MÉTODO PARA PRODUCIRLO

Campo técnico

La presente invención se refiere a un ARN circular monocatenario, un método para producir el ARN y una composición farmacéutica que comprende el ARN.

Arte previo

En general, los métodos de interferencia de ARN convencionales se clasifican en dos grupos: un método en el que se emplean ARN bicatenarios sintetizados en forma química y un método en el cual se utilizan vectores de plásmidos. El método de interferencia de ARN en el cual se utilizan vectores de plásmidos es ampliamente utilizado en el campo de la biotecnología, fundamentalmente en experimentos biológicos básicos. Sin embargo, cuando se aplica el método de interferencia de ARN para desarrollar preparaciones farmacéuticas, el método que utiliza vectores de plásmidos entraña un problema de seguridad para el organismo humano. Así, seguramente se prefiere utilizar los ARN bicatenarios sintetizados en forma química.

Sin embargo, existe el problema de que los ARN bicatenarios sintetizados en forma química son inestables *in vivo*, porque son susceptibles a la degradación con enzimas (nucleasas) en las células. Para resolver este problema, se desarrollaron las hebras de ARN con ácidos nucleicos no-naturales a fin de mejorar la estabilidad de los ARN bicatenarios en las células; sin embargo, existe otro problema porque se reduce su actividad biológica a la vez que se mejora la estabilidad. Del mismo modo, se desconoce la toxicidad causada por ácidos nucleicos no-naturales. Por lo tanto, sigue siendo difícil lograr que se aplique a preparaciones farmacéuticas.

Las formas de un ARN bicatenario que se puede utilizar en el método de interferencia de ARN incluyen un ARN bicatenario que tiene extremos sin punta o extremos salientes, un ARN que tiene una estructura en forma de horquilla con un bucle en cualquiera de los extremos del ARN bicatenario (JP2003-502012A), un ácido nucleico circular que contiene

aproximadamente 19 pares base, dos bucles y, opcionalmente, polinucleótidos modificados en forma química (JP2006-271387A), y similares. Sin embargo, este ácido nucleico circular no está sujeto a verificación para determinar el efecto de interferencia de ARN.

Sumado a ello, se revela un ácido nucleico ARN-ADN quimérico con forma de mancuerna (JP11-137260A(1999)). Este ácido nucleico no se utiliza en la interferencia de ARN. La porción ARN del ácido nucleico con forma de mancuerna se cliva mediante una enzima en las células, y la porción de ADN antisentido resultante se enlaza a ARNm en las células para inhibirlo. La JP11-137260A(1999) revela que un ácido nucleico posee una alta resistencia a las enzimas que degradan los ácidos nucleicos en las células y permanece estable en las células hasta que la ribonucleasa H actúa, debido a su estructura con forma de mancuerna. También se revela que, dado que un oligonucleótido monocatenario que contiene la porción de ADN antisentido puede liberarse en el citoplasma de las células sólo después de clivar la porción de ARN complementario con el efecto de la ribonucleasa H, el efecto antisentido por dosis se considera mejorado.

Igualmente, respecto del método para sintetizar un ácido nucleico circular que tiene una estructura con forma de mancuerna, por ejemplo, se revela que se sintetizan los oligonucleótidos lineales, se componen una región de tallo y una región de bucle con forma de horquilla para obtener un oligonucleótido con una mella y forma de mancuerna, donde un sitio del oligonucleótido diana circular con forma de mancuerna (el extremo opuesto de la región de bucle con forma de horquilla indicada previamente) no está enlazado, y el extremo 5' está ligado con una ligasa para preparar un ácido nucleico circular con forma de mancuerna (JP11-137260(1999)).

Constituye un objeto de la presente invención proporcionar un ARN circular monocatenario y un método para producirlo.

Revelación de la invención

Los inventores de la presente sorprendentemente hallaron que se puede obtener un ARN circular monocatenario con un alto rendimiento si: se sintetizan en forma separada una hebra sentido y una hebra antisentido, donde ambas comprenden una secuencia de nucleótidos con

nucleótidos no-apareados en cada extremo; se permite que la ligasa actúe sobre los nucleótidos en ambos extremos simultáneamente y que el ARN circular monocatenario obtenido ejerza un efecto de interferencia de ARN sostenido o de liberación lenta. Basados en estos hallazgos científicos, los inventores concretaron la presente invención.

Más específicamente, la presente invención incluye las invenciones que se describen a continuación.

(1) Un ARN circular monocatenario que tiene un efecto de interferencia de ARN sostenido o de liberación lenta, caracterizado porque el ARN circular monocatenario comprende una secuencia de hebras sentido, una secuencia de hebras antisentido que es complementaria de la secuencia de hebras sentido, secuencias de dos bucles idénticas o diferentes entre la hebra sentido y la hebra antisentido, que conectan ambas hebras, donde la hebra sentido y la hebra antisentido se aparean para formar un tallo.

(2) El ARN circular monocatenario según lo indicado en (1), donde la expresión de un ARN diana es 0,4 o menor 24 horas después de introducir el ARN circular monocatenario en células eucariotas, en comparación con las células de control, cuyo nivel de expresión del ARN diana se establece en 1.

(3) El ARN circular monocatenario según lo indicado en (1) ó (2) precedentes, donde el 70% o más de éste se retiene después de permanecer 8 horas en el suero humano.

(4) Un método para producir el ARN circular monocatenario según cualquiera de (1) a (3) precedentes, que comprende sintetizar una hebra sentido y una hebra antisentido, y ambas comprenden una secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 5' y en el extremo 3', y simultáneamente se liga el nucleótido en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra sentido, con el nucleótido en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra antisentido y viceversa, utilizando una ligasa,

donde la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 5' de la hebra sentido y la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 3' de la hebra antisentido se enlazan entre sí para formar un bucle, la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 3' de la hebra sentido y la secuencia de nucleótidos con

nucleótidos no-apareados en el extremo 5' de la hebra antisentido se enlazan entre sí para formar un bucle, y la hebra sentido y la hebra antisentido se aparean para formar un tallo.

(5) El método según lo indicado en (4) precedente, que también comprende fosforilar cada extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra sentido y la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no-apareados en la hebra antisentido.

(6) El método según lo indicado en (4) ó (5) precedentes, donde las secuencias en bucle son idénticas o diferentes entre sí.

(7) El método según cualquiera de (4) a (6) precedentes, donde la longitud del bucle es de 2 a 20 nucleótidos.

(8) El método según cualquiera de (4) a (7) precedentes, donde la longitud del tallo es de 19 a 31 nucleótidos.

(9) Un método para suprimir la expresión de un gen que codifica una proteína *in vitro*, que comprende introducir el ARN circular monocatenario según cualquiera de (1) a (3) precedentes a células derivadas de seres humanos, y desaparecer un ARN diana mediante el ARN circular monocatenario para inhibir la traducción del ARN diana en la proteína de manera sostenida.

(10) Un método para suprimir la expresión de un gen que codifica una proteína, que comprende introducir el ARN circular monocatenario según cualquiera de (1) a (3) precedentes a animales no humanos, plantas o células de éstos, y desaparecer un ARN diana mediante el ARN circular monocatenario para inhibir la traducción del ARN diana en la proteína de manera sostenida.

(11) Una composición farmacéutica que comprende el ARN circular monocatenario según cualquiera de (1) a (3) precedentes, a modo del ingrediente activo.

Tal como se lo emplea en la presente, el término "ARN circular monocatenario" puede referirse a un ARN con forma de mancuerna. Por ARN con forma de mancuerna se indica un ARN circular monocatenario, donde una hebra sentido y una hebra antisentido se aparean de manera complementaria para formar un tallo; se forman bucles en ambos lados del tallo mediante una secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados, y todo el ARN circular monocatenario tiene forma de mancuerna.

Según la presente invención, se puede producir de manera eficiente el ARN sintético con forma de mancuerna, que es excelente en cuanto a propiedades de estabilidad, sostenibilidad y liberación lenta.

En particular, el ARN con forma de mancuerna que se utiliza en el método de interferencia de ARN puede producirse si se ciclizan dos hebras de ARN. Dado que ambos extremos están cerrados en la forma de bucle, no tiene extremo de ARN y, por lo tanto, no es factible que sirva como sustrato para enzimas, exonucleasas (ribonucleasas) y similares, excepto las enzimas específicas como las Dicer, en las células. De esta manera, es menos susceptible a la degradación enzimática y tiene una significativamente mayor estabilidad en la célula. Como resultado de ello, no existe la necesidad de utilizar ácidos nucleicos no-naturales para mejorar la estabilidad.

Sumado a ello, el ARN con forma de mancuerna es reconocido específicamente por las enzimas *in vivo*, tal como las Dicer, en las células, y las regiones de bucle en ambos lados se clivan para formar un tipo de ARN bicatenario natural (Figura 1). Como resultado, puede tener actividad equivalente a la del ARN bicatenario, y ejerce un efecto más sostenido o de liberación lenta que el efecto de interferencia de ARN con los ARN bicatenarios convencionales.

El ARN con forma de mancuerna de la presente invención también es más estable que los ARN bicatenarios en el suero humano.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una vista esquemática del ARN con forma de mancuerna de la presente invención.

La Figura 2 muestra la estructura de los ARN y la imagen de la caracterización por electroforesis de cada ARN.

La Figura 3 muestra la estructura de los ARN interferentes pequeños (ARNip) y ARN con forma de mancuerna.

La Figura 4 muestra imágenes de la caracterización por electroforesis de los ARN con forma de mancuerna y los ARN lineales bicatenarios clivados por Dicer.

La Figura 5 muestra un efecto de interferencia de cada ARN con forma de mancuerna

24 horas después de la transfección.

La Figura 6 muestra un efecto de interferencia del ARN sostenible del ARN con forma de mancuerna.

La Figura 7 muestra la estabilidad del ARN con forma de mancuerna en el suero de seres humanos.

El mejor modo de poner en práctica la invención

El ARN circular monocatenario de la presente invención incluye una secuencia de hebras sentido homóloga a la secuencia de nucleótidos de un ARN diana o parte de éste, una secuencia de hebras antisentido que es complementaria de la secuencia de hebras sentido, y que tiene la capacidad de aparearse con ésta, y secuencias de bucle que no pueden formar pares entre las hebras.

La hebra sentido y la hebra antisentido se aparean para formar un tallo. La longitud del tallo, que no está específicamente limitada, puede determinarse según el tipo, estructura u otro parámetro del ARN diana. Por ejemplo, el tallo se compone de 19 a 31 pares base; con preferencia 21 a 25 pares base; con mayor preferencia 22 a 24 pares base; e incluso más preferentemente 23 pares base.

Las secuencias de nucleótidos con nucleótidos no-apareados están presentes en el extremo 5' y en el extremo 3', tanto de la hebra sentido como de la hebra antisentido. El nucleótido en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra sentido y el nucleótido en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra antisentido se ligan entre sí para formar un bucle. El nucleótido en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra sentido y el nucleótido en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra antisentido se ligan entre sí para formar un bucle. Con preferencia, la longitud del bucle es de 2 a 20 bases, con mayor preferencia de 6 a 12 bases. Por lo tanto, todo el ARN circular monocatenario se compone, con preferencia, de 42 a 102 bases.

Donde la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 5' de la hebra sentido se representa como A, la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados

en el extremo 3' de la hebra antisentido se representa como B, la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 3' de la hebra sentido se representa como C, y la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 5' de la hebra antisentido se representa como D, por ejemplo, si la longitud del bucle es de 20 bases, A tiene una longitud de 1 a 19 bases, B tiene una longitud de 19 a 1 bases, C tiene una longitud de 19 a 1 bases, y D tiene una longitud de 1 a 19 bases. Por lo tanto, el nucleótido en el extremo 5' de A y el nucleótido en el extremo 3' de B se ligan para formar un bucle de 20 bases, y el nucleótido en el extremo 3' de C y el nucleótido en el extremo 5' de D se ligan para formar un bucle de 20 bases.

Es preferible que las secuencias, que no pueden aparearse entre sí, tengan una diferencia de longitud entre A y B, y entre C y D, por ejemplo, de 1 base, 2 bases o 3 bases o, como alternativa, que las secuencias sean de la misma longitud. Por lo tanto, por ejemplo, donde el bucle tiene una longitud de 8 bases, es preferible que A tenga una longitud de 3 a 5 bases; que B tenga una longitud de 5 a 3 bases; que C tenga una longitud de 5 a 3 bases; y que D tenga una longitud de 3 a 5 bases. Donde el bucle tiene una longitud de 9 bases, es preferible que A tenga una longitud de 3 a 6 bases; que B tenga una longitud de 6 a 3 bases; que C tenga una longitud de 6 a 3 bases; y que D tenga una longitud de 3 a 6 bases. Donde el bucle tiene una longitud de 10 bases, es preferible que A tenga una longitud de 4 a 6 bases; que B tenga una longitud de 6 a 4 bases; que C tenga una longitud de 6 a 4 bases; y que D tenga una longitud de 4 a 6 bases.

Además, las secuencias de nucleótidos del bucle formado por A y B y el bucle formado por C y D pueden ser idénticas o diferentes.

El ARN circular monocatenario de la presente invención puede utilizarse para el método de interferencia de ARN.

La interferencia de ARN también se conoce como ARNi, y es un fenómeno donde una pequeña molécula de ARN que tiene una secuencia complementaria al ARN diana se enlaza al ARN diana, y con ello degrada el ARN diana o suprime la traducción del ARN diana.

La hebra antisentido del ARN con forma de mancuerna tiene una secuencia complementaria al ARN diana (por ejemplo, ARNm o su ARN precursor). Del mismo modo, las secuencias de nucleótidos con nucleótidos no-apareados incluyen, sin limitación, UUCAAGAGA y UGUGCUGUC (M. Miyagishi y colaboradores, *Oligonucleotides* 2003;

volumen 13, páginas 1 a 7).

Del mismo modo, el bucle en el ARN con forma de mancuerna puede modificarse químicamente. Por ejemplo, la estabilidad *in vivo* del ARN con forma de mancuerna puede mejorarse si se modifica con polietilenglicol cuyo peso molecular es de 2.000 a 5.000, aproximadamente. El bucle del ARN con forma de mancuerna se cliva con una enzima, tal como las Dicer, en las células que se habrán de eliminar. Por lo tanto, se considera que el polietilenglicol tiene escaso efecto cuando el tallo ejerce su efecto de interferencia de ARN como un ARNip o miARN (micro ARN).

Con el ARN en forma de mancuerna de la presente invención, la expresión del ARN diana en las células, donde se ha introducido el ARN con forma de mancuerna, con preferencia es 0,4 o menos, 24 horas después de introducir el ARN con forma de mancuerna en las células, en comparación con las células de control (sin que se introduzca el ARN con forma de mancuerna), donde el nivel de expresión del ARN diana se establece en 1.

Según la presente invención, las células son células eucariotas, con preferencia células animales y vegetales.

La expresión del ARN diana puede confirmarse, por ejemplo, transformando células con un gen reportero [por ejemplo, luciferasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, o gen de proteína fluorescente verde (GFP, *por su sigla en inglés*)], y medir la coloración o la fluorescencia de la proteína derivada del gen reportero para examinar el nivel de inhibición de la expresión de un ARN diana por parte del ARN con forma de mancuerna, donde el ARNm del gen reportero puede utilizarse como el ARN diana.

Más específicamente, el ARN con forma de mancuerna de la presente invención se caracteriza porque el 70% o más de éste se retiene sin degradarse después de 8 horas, en el suero humano. Por ejemplo, esto puede confirmarse si se incuba el ARN con forma de mancuerna en el suero humano y se mide el peso molecular mediante electroforesis u otra técnica similar, para evaluar si se degrada con el correr del tiempo.

El método para producir el ARN circular monocatenario con forma de mancuerna de la presente invención incluye sintetizar una hebra sentido y una hebra antisentido, donde ambas comprenden una secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 5' y en el

extremo 3', y simultáneamente se liga el nucleótido en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra sentido, con el nucleótido en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra antisentido, y viceversa, utilizando una ligasa.

La hebra sentido y la hebra antisentido pueden diseñarse de manera tal de suprimir la función de un gen diana, según la secuencia de nucleótidos del gen diana. Los diseños pueden confirmarse al producir varias hebras sentido y antisentido, y evaluar la eficacia de cada supresión. Por ejemplo, se aplica el diseño que usa un algoritmo para ARNip o similar (Referencias: J. A. Jaeger y colaboradores, *Methods in Enzymology* (1989) 183: 281-306; D. H. Mathews y colaboradores, *J. Mol. Biol.* (1999) 288: 911-940). Cuando se hace el diseño, es preferible que las hebras no supriman la expresión de genes fuera de un gen diana, los genes que tienen secuencias similares al gen diana (que se conoce como el efecto inespecífico). Con preferencia, las longitudes de las hebras sentido y antisentido se diseñan en el rango de, por ejemplo, 19 a 31 bases; con preferencia 21 a 25 bases; con mayor preferencia 22 a 24 bases; e incluso con mayor preferencia 23 bases.

El gen diana incluye, sin limitación, el gen *abl/bcr* para la leucemia, el gen VEGF para la degeneración macular relacionada con el envejecimiento y el gen HCV para la hepatitis.

Una secuencia que posteriormente forma un bucle, por ejemplo la secuencia UUCAAGAGA indicada previamente, se divide en dos fragmentos en una posición arbitraria para formar una secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados (donde la secuencia tiene 9 bases, y cuando se divide en dos fragmentos, como se describió, la diferencia de longitud preferentemente se encuentra en el orden de 1 a 3 bases). Se diseña una secuencia de manera que un fragmento se liga al extremo 3' de la hebra antisentido y el otro se liga al extremo 5' de la hebra sentido. Con el mismo método, se diseña otra secuencia de manera que un fragmento se liga al extremo 3' de la hebra sentido y el otro se liga al extremo 5' de la hebra antisentido. Los ácidos nucleicos monocatenarios que tienen estas dos secuencias diseñadas se sintetizan en forma separada. Al hacerlo, es preferible realizar la fosforilación del extremo 5' utilizando un reactivo de fosforilación química. Del mismo modo, es preferible diseñar una secuencia para formar un bucle, cuya longitud sea, por ejemplo, de 2 a 20 bases; y con preferencia de 6 a 12

bases.

Existen otros métodos para sintetizar los ácidos nucleicos, tal como el método de síntesis por transcripción *in vitro*, métodos que utilizan vectores de plásmidos o virales, y métodos que utilizan casetes de PCR. Si bien el método para sintetizar ácidos nucleicos no presenta limitaciones específicas, se prefiere un método de síntesis química en términos de alto grado de pureza, capacidad de producirse en grandes cantidades, seguridad para el uso *in vivo*, capacidad de modificación química y demás similares. Los ejemplos de métodos de síntesis incluyen, sin limitación, el método de H-fosfonato y el método de fosforamidita. A este fin, se pueden utilizar los sintetizadores automáticos de ácido nucleico que se comercializan en el mercado.

Los extremos de las secuencias de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en ambos extremos de la hebra sentido y de la hebra antisentido se ligan con una ligasa (por ejemplo, la ARN ligasa del fago T4 o ADN ligasa del fago T4) para formar dos bucles simultáneamente. Las condiciones de reacción incluyen, por ejemplo, la incubación en un polietilenglicol (PEG) que contiene solución amortiguadora, BSA o similar, durante 20 horas a baja temperatura. El ARN circular monocatenario con forma de mancuerna sintetizado puede recogerse y purificarse con métodos ordinarios (por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento y método PAGE).

Del mismo modo, el ARN circular monocatenario puede modificarse químicamente con polietilenglicol (PEG) o similar, donde la modificación química se realiza preferentemente en la región de bucle. Para el enlace, ambos extremos del PEG se modifican a fin de introducir un grupo funcional que reacciona con los grupos amino en bases, tal como un grupo formilo o un grupo éster N-hidroxisuccinimida.

Más adelante se describe el método de interferencia de ARN usando el ARN con forma de mancuerna producido con el método que se describe más adelante.

Según la presente invención, el ARN circular monocatenario de la presente invención puede introducirse en las células y desaparecer un ARN diana para inhibir la traducción del ARN diana en una proteína de manera sostenida, donde las células humanas o las células de animales no-humanos o vegetales pueden utilizarse a modo de las células.

89

Cuando el método de interferencia de ARN se realiza *in vitro*, el ARN con forma de mancuerna se introduce en las células mediante, por ejemplo, el método de electroporación, el método de microinyección, el método de lipofección o la transfección de fosfato de calcio.

Cuando el método de interferencia de ARN se realiza *in vivo*, primero, la muestra que contiene ARN con forma de mancuerna se somete a diálisis, ajuste del pH o similar, a fin de permitir que se adapte a un organismo viviente. Los métodos para introducir el ARN con forma de mancuerna en los organismos vegetales o animales incluyen, sin limitación, administración local, administración intravenosa y un método en el que se utiliza una pistola de genes. Cuando se aplica a seres humanos, no es preferible utilizar microorganismos y demás, por cuestiones de seguridad.

El ARN con forma de mancuerna introducido en las células se cliva con Dicer en las células para generar un ARN bicatenario (ARNip) que tiene un efecto de interferencia de ARN (Figura 1). Los extremos del ARNip pueden ser sin punta o salientes. El ARNip se convierte en monocatenario para formar un complejo de ARN-nucleasa (complejo silenciador inducido por ARN [RISC]), que reconoce un ARNm diana que tiene una secuencia complementaria al ARNip, y degrada el ARNm diana, con lo cual se suprime la expresión del gen diana correspondiente.

El ARN circular monocatenario de la presente invención puede utilizarse en cualquier planta o animal (por ejemplo, seres humanos, mascotas, mamíferos e incluso los animales domésticos), y sus células. Se prevén amplias aplicaciones en los campos de la medicina y la agricultura. Por ejemplo, el ARN circular monocatenario de la presente invención puede utilizarse para varios fines, incluso la elucidación de la función de una proteína o de un gen específico en vegetales y animales, o en un nivel de células vegetales o animales, utilizando por ejemplo métodos *knockout*.

Del mismo modo, la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende el ARN circular monocatenario a modo del ingrediente activo.

La cantidad de ARN circular monocatenario formulado en la composición farmacéutica puede ajustarse según la clase y el propósito de la composición. Por ejemplo, la cantidad de ARN incluye, sin limitación, 1 % en peso, 3 % en peso, 5 % en peso, 10 % en peso, 20 % en

peso, 30 % en peso, 40 % en peso, 50 % en peso, 60 % en peso, 70 % en peso, 80 % en peso, 90 % en peso o 100 % en peso, respecto de la cantidad total de la composición.

Los ejemplos de la composición farmacéutica de la presente invención incluyen preparaciones líquidas (tal como solución, suspensión, emulsión), preparaciones sólidas (tal como una preparación secada por congelamiento que se puede reconstituir antes del uso), preparaciones encapsuladas por liposomas (con preferencia, liposomas catiónicos). Además, la vía de administración preferida es la parenteral, que incluye, por ejemplo, administración local donde se aplica la preparación directamente en el sitio afectado; la administración pulmonar; la administración transmucosa, tal como la administración nasal; y la administración intravenosa.

La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir excipientes (solución salina, agua esterilizada, solución de Ringer y demás), agentes amortiguadores, agentes de la tonicidad, agentes estabilizantes y demás similares, según las formulaciones o las formas farmacéuticas.

Del mismo modo, la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar según el sexo, peso, edad, gravedad, síntomas u otros factores del paciente.

La composición farmacéutica de la presente invención se aplica, por ejemplo, al tratamiento de enfermedades tales como cáncer (por ejemplo, supresión de las funciones de los genes o proteínas, que se expresan específicamente en células cancerígenas).

En adelante, se describirá la invención con mayor grado de detalle específicamente en referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, cabe comprender que el alcance de la presente invención no se limita a los ejemplos específicos.

Ejemplos

Ejemplo 1: preparación de un ARN con forma de mancuerna

ARN fosforilados en el extremo 5' que funcionan como materia prima para ARN con forma de mancuerna se sintetizaron en un sintetizador de ADN (GeneWorld H8-SE) según el método de fosforamidita. Se utilizó TBDMS protegido (Proligo Corp.) para las amiditas de ARN y se utilizó el reactivo de fosforilación química (Glen Research Corp.) para la fosforilación del extremo 5'. Se realizó la desprotección con el método ordinario, seguido de

purificación con electroforesis en gel de poliacrilamida [PAGE]. Las secuencias del ARN sintetizado se muestran en la SEQ ID NO: 1 (hebra sentido, 28 mer), SEQ ID NO: 2 (hebra antisentido, 28 mer), SEQ ID NO: 3 (56 mer), y en la Figura 2. Igualmente, en las secuencias de ARN que se muestran en la Figura 2, las secuencias subrayadas son secuencias que componen la región de bucle de un ARN con forma de mancuerna.

Posteriormente, la reacción enzimática se realizó en la mezcla de 2 μ M de ARN bicatenario; 2 unidades/ μ l de ARN ligasa del fago T4; 0,006% de BSA; 25% de PEG6000; 50 mM de Tris-HCl (a pH 7,5); 10 mM de $MgCl_2$; 10 mM de DTT y 1 mM de ATP en un volumen total de 25 μ l.

Más específicamente, primero, el ARN bicatenario con extremo 5' fosforilado se disolvió en 12,5 μ l de una solución amortiguadora (2 x solución amortiguadora) que contenía 100 mM de Tris-HCl (a pH 7,5); 20 mM de $MgCl_2$; 20 mM de DTT y 2 mM de ATP, en una concentración de 4 μ M. La solución se calentó a 65°C durante 5 minutos, y luego se enfrió lentamente a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron solución BSA, solución PEG6000 y ARN ligasa del fago T4 (Takara Bio Inc.), para formar la composición indicada previamente y el volumen de la reacción. Luego se incubó la solución a 11°C durante 20 horas. Se recogió el ARN por precipitación con etanol y se analizó mediante el sistema electroforético PAGE.

Las muestras en cada carril del análisis PAGE de la Figura 2 son las que se indican seguidamente.

Carril 1: mezcla de la hebra sentido de 28 bases y de la hebra antisentido de 28 bases (marcador)

Carril 2: ARN de 57 bases (marcador)

Carril 3: ARN con forma de mancuerna constituido a partir de la hebra sentido de 28 bases y la hebra antisentido de 28 bases.

Carril 4: ARN con forma de mancuerna constituido a partir de 56 bases (monocatenario)

Carril 5: hebra sentido de 28 bases con ARN ligasa (referencia)

Carril 6: hebra antisentido de 28 bases tratada con ARN ligasa (referencia)

El ARN con forma de mancuerna en el carril 4 se produjo según los siguientes pasos:

sintetizar una cadena simple que tenía 56 bases (SEQ ID NO: 3), formar una región de tallo y una región de bucle de horquilla, y ligar el primer nucleótido y el último nucleótido con ligasa del fago T4.

La banda rodeada por un círculo en el carril 3 representa el ARN con forma de mancuerna producido por el método de la presente invención, y el rendimiento fue de aproximadamente el 80%. El ARN con forma de mancuerna del carril 4 tuvo un rendimiento aproximado del 5% o menos.

Ejemplo 2: examen de la longitud del tallo del ARN con forma de mancuerna

Los ARN representados por las SEQ ID NOS: 4 a 13 se sintetizaron con el sintetizador de ADN al que se hizo referencia. Las SEQ ID NOS: 4 y 5 componen un ARN bicatenario que constituye 18 pares base (ARNip-1); las SEQ ID NOS: 6 y 7 componen un ARN con forma de mancuerna, cuyo tallo tiene una longitud de 19 bases (Db-19); las SEQ ID NOS: 8 y 9 componen un ARN con forma de mancuerna, cuyo tallo tiene una longitud de 23 bases (Db-23); las SEQ ID NOS: 10 y 11 componen un ARN con forma de mancuerna, cuyo tallo tiene una longitud de 27 bases (Db-27); y las SEQ ID NOS: 12 y 13 componen un ARN con forma de mancuerna, cuyo tallo tiene una longitud de 31 bases (Db-31) (Figura 3).

Se realizó una reacción enzimática en la composición de 2 μM de ARN bicatenario; 1 unidad/ μl de ARN ligasa del fago T4; 0,006% de BSA; 25% de PEG6000; 50 mM de Tris-HCl (a pH 7,5); 10 mM de MgCl_2 ; 10 mM de DTT y 1 mM de ATP en un volumen de reacción que iba de 1,5 a 2,5 ml.

Más específicamente, el ARN bicatenario con extremo 5' fosforilado se disolvió en una solución amortiguadora (2 x solución amortiguadora, la mitad de la solución de reacción final) que contenía 100 mM de Tris-HCl (a pH 7,5); 20 mM de MgCl_2 ; 20 mM de DTT y 2 mM de ATP, en una concentración de 4 μM . La solución se calentó a 65°C durante 5 minutos, y luego se enfrió lentamente a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron solución BSA, solución PEG6000 y ARN ligasa del fago T4 (Takara Bio Inc.), para formar la composición y el volumen de la reacción que se indicaron previamente. Luego se incubó la solución a 11°C durante 20 horas.

Se recogió el ARN mediante precipitación en alcohol a partir de la solución de reacción, y los productos ciclizados se aislaron con el empleo de electroforesis PAGE. Las bandas que contenían las dianas se visualizaron con el método de *shadowing* ultravioleta, se cortaron, se molieron en trozos pequeños y se extrajeron 3 veces con 4 ml de una solución amortiguadora para elusión (0,2 M de NaCl; 1 mM de EDTA (a pH 8)). El extracto se desaló con un cartucho Sep-Pak (se eluyó con 6 ml de acetonitrilo al 50% en agua), se condensó con un evaporador centrífugo, y luego se sometió a precipitación en alcohol en la presencia de acetato de amonio. Las dianas se cuantificaron a través de la medición de los espectros ultravioletas.

Se agregaron dos unidades de ColdShock-DICER (Takara Bio Inc.) a 2 µg de cada uno de los ARN con forma de mancuerna indicados previamente en una solución amortiguadora que contenía 20 mM de Tris-HCl (a pH 8,5); 150 mM de NaCl y 2,5 mM de MgCl₂ (volumen de reacción: 20 µl), y la solución resultante se incubó a 37°C. Después de transcurridas 1, 6 y 18 horas, se recolectaron 3 µl de la solución de reacción a modo de muestra. Cada mezcla se combinó con 2 µl de 120 mM de solución EDTA para terminar la reacción enzimática. Estas luego se analizaron mediante electroforesis PAGE en condiciones no-desnaturalizantes (10% PAGE, 1 x TBE) (después de la tinción con 1 x SYBR Green I, las muestras se representaron en imágenes y se cuantificaron en un analizador de imágenes Molecular Imager FX de BioRad).

La Figura 4 muestra la electroforesis PAGE de cada ARN con forma de mancuerna. Como control, se examinó con el mismo método una reacción de clivado utilizando el ARN bicatenario antes de darle la forma de mancuerna a la reacción a modo de sustrato. Como resultado, la reacción de clivado de Db-19 produjo aproximadamente un 5% después de una hora, y se confirmó la producción ARN bicatenarios de 20 bases de longitud. Los fragmentos del clivado de Db-10 en el rango de las 20 bases mantuvieron prácticamente el mismo nivel de concentración después de 6 y 18 horas. En contraste, casi el 100% del control que incluía la cadena lineal de 19 pares base se clivó después de 1 hora, y se observaron los ARN bicatenarios de 20 bases de longitud. Posteriormente, los ARN bicatenarios del producto se degradaron y desaparecieron con el correr del tiempo. Con Db-23, aproximadamente el 8% se clivó después de 1 hora, y se produjeron los ARN bicatenarios de 20 bases de longitud. Se confirmó que cuando aumenta la longitud del tallo, la velocidad de clivado después de 1 hora se incrementa al

10% y 20% en Db-27 y Db-31, respectivamente. Después de 18 horas, aproximadamente el 75% de Db-19 permaneció intacto, mientras que Db-31 desapareció por completo. A partir de estos resultados, se reveló que los ARN con forma de mancuerna con tallo más corto, son más estables contra una enzima.

Ejemplo 3: efecto de la interferencia de ARN del ARN con forma de mancuerna

El efecto de interferencia de ARN de los ARN con forma de mancuerna indicados previamente (Db-19, Db-23, Db-27 y Db-31) se evaluó mediante el experimento de inhibición de la expresión del gen reportero de luciferasa de luciérnaga pGL3.

Las células NIH 3T3 (banco de células Riken) se cultivaron en medio DMEM (GIBCO) que contenía 10% de FCS a 37°C en 5% de CO₂, y una alícuota de 100 µl del cultivo se inoculó a cada pocillo de una placa de 96 pocillos en una concentración de 1,6 x 10⁴ células/pocillo. La muestra se volvió a someter a cultivo a 37°C en 5% de CO₂ durante 39 horas para proporcionar una confluencia de aproximadamente el 70%. Luego se co-transfectaron las células con 2 clases de vectores de plásmidos (pGL3-control y pRL-TK (para estándar interno), que comercializa Promega Corp.) y cada clase de ARN, utilizando el reactivo para transfección GeneSilencer (Genlantis Inc.) según el protocolo que acompaña al reactivo de transfección. Las condiciones de concentración al momento de la transfección eran las siguientes:

0,2 µg de pGL3-Control / 0,02 µg de pRL-TK / 25 nM de ARN (volumen final: 100 µl)	
GeneSilencer	1 µl
medio DMEM	25 µl
solución diluida de ARNip	2,5 µl
medio DMEM	15 µl
ARN (5 pmol/µl)	0,5 µl
pGL3-Control (1 µg/µl)	0,2 µl
pRL-TK (0,1 µg/µl)	0,2 µl
	44,4 µl

Después de la transfección, el cultivo se incubó a 37°C en 5% de CO₂ durante 4 horas. Cien µl de medio DMEM que contenía 20% de suero se agregó posteriormente a cada pocillo.

Tras la incubación a 37°C durante 20 horas, las células se solubilizaron para cuantificar el nivel de expresión de luciferasa utilizando un sistema de ensayo reportero de luciferasa dual (Promega Corp.) conforme al protocolo adjunto (Condiciones: cantidad de reactivo = 30 µl; tiempo de demora = 2 segundos; tiempo de lectura = 10 segundos. Equipo: contador Wallac ARVO SX 1420 Multilabel).

Para la comparación, se evaluó un control (sólo solución amortiguadora) con el mismo método. La intensidad de fluorescencia de luciferasa de luciérnaga se corrigió para determinar la intensidad de fluorescencia de luciferasa de renilla como un estándar interno. Los resultados se presentan en la Figura 5. Después de 24 horas, entre los ARN con forma de mancuerna, Db-23 demostró el nivel de actividad más elevado y exhibió un efecto inhibitor bajo, de sólo 0,24. A partir de estos resultados, la longitud bicatenaria más preferida se estableció en 23 bases.

Ejemplo 4: sostenibilidad del efecto de interferencia de ARN

Se comparó la sostenibilidad del efecto de interferencia de ARN de Db-23 y ARNip-1.

Las células NIH 3T3 se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco [*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) de Gibco], suplementado con 10% de suero fetal de ternero (FCS de Invitro/Gibco) en una cámara humidificada con 5% de CO₂. Cuarenta horas antes de la transfección en una confluencia del 70%, aproximadamente, las células se sembraron en placas de 96 pocillos en una densidad de $1,6 \times 10^4$ células por pocillo (100 µl). La co-transfección de ARN y plásmidos reporteros se realizó con un equipo GeneSilencer (Gene Therapy Systems, Inc.), según lo descrito por el fabricante para las líneas celulares adherentes. Por pocillo, se aplicaron 16 ng/µl ó 1,6 ng/µl de pGL3-Control (Promega Corp.); 1,6 ng/µl de pRL-TK (Promega Corp.) y 25 nM de ARN formulados con el reactivo para transfección (100 µl). Después de 4 horas de incubación, se agregaron 100 µl de FCS al 20% en DMEM. Para una incubación prolongada de más de 3 días, el medio se reemplazó según fuese necesario. La expresión de la luciferasa se controló después de 24 horas, 72 horas y 120 horas con el sistema de ensayo reportero de luciferasa dual (Promega Corp.), según las instrucciones provistas, en el contador Wallac ARVO SX 1420 Multilabel (Perkin-Elmer, Inc.) (Figura 6). Como control, se utilizó una muestra sin ARN.

Tanto Db-23 como el ARNip mostraron un nivel casi equivalente de actividad de luciferasa después de 24 horas. Sin embargo, después de 120 horas, Db-23 mostró un efecto de supresión de la expresión génica más elevado. A partir de estos resultados, se muestran tanto el efecto de liberación lenta como el efecto de activación a largo plazo del ARN con forma de mancuerna.

Ejemplo 5: estabilidad del ARN con forma de mancuerna en suero humano

Se comparó la estabilidad de Db-23 y ARNip en suero humano.

Cuatro ml de ARNbc pre-recocido (ARNip-1; 20 mM) o ARN con forma de mancuerna (Db-23; 20 mM) en solución amortiguadora de recocido (100 mM de acetato de potasio; 30 mM de HEPES-KOH (a pH 7,4); 2 mM de acetato de magnesio) se mezclaron con 32 ml de PBS y 4 ml de suero humano normal (Chemicon International, Inc.); y se incubó a 37°C. Se tomó una alícuota de 5 ml después de 0,5; 1; 1,5; 3; 8 y 20 horas. La reacción se analizó con 15% de PAGE en condiciones no-desnaturalizantes; para la tinción se utilizó SYBR Green I y se visualizó con un equipo MolecularImager FX (BioRad Laboratories, Inc.).

Como resultado, hasta el 50% de ARNip se degradó después de 3 horas, mientras que un 80% o más de Db-23 aún permanecía después de transcurridas tres horas; y 70% o incluso más después de ocho horas. Por lo tanto, cabe esperar una elevada estabilidad de Db-23 *in vivo*.

Aplicabilidad industrial

La presente invención puede utilizarse como una molécula de ácido nucleico aplicable a organismos vivos y puede producir la molécula con un alto rendimiento

REIVINDICACIONES

1. Un ARN circular monocatenario que tiene un efecto de interferencia de ARN sostenido o de liberación lenta, caracterizado porque el ARN circular monocatenario comprende una secuencia de hebras sentido, una secuencia de hebras antisentido que es complementaria de la secuencia de hebras sentido, secuencias de dos bucles idénticas o diferentes entre la hebra sentido y la hebra antisentido, que conectan ambas hebras, donde la hebra sentido y la hebra antisentido se aparean para formar un tallo.

2. El ARN circular monocatenario según la reivindicación 1, donde la expresión de un ARN diana es 0,4 o menor 24 horas después de introducir el ARN circular monocatenario en células eucariotas, en comparación con las células de control, cuyo nivel de expresión del ARN diana se establece en 1.

3. El ARN circular monocatenario según la reivindicación 1 ó 2, donde el 70% o más de éste se retiene después de permanecer 8 horas en el suero humano.

4. Un método para producir el ARN circular monocatenario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende sintetizar una hebra sentido y una hebra antisentido, y ambas comprenden una secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 5' y en el extremo 3', y simultáneamente se liga el nucleótido en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra sentido, con el nucleótido en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra antisentido y viceversa, utilizando una ligasa,

donde la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 5' de la hebra sentido y la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 3' de la hebra antisentido se enlazan entre sí para formar un bucle, la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 3' de la hebra sentido y la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 5' de la hebra antisentido se enlazan entre sí para formar un bucle, y la hebra sentido y la hebra antisentido se aparean para formar un tallo.

5. El método según la reivindicación 4, que también comprende fosforilar cada extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra sentido y la

secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no-apareados en la hebra antisentido.

6. El método según la reivindicación 4 ó 5, donde las secuencias en bucle son idénticas o diferentes entre sí.

7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde la longitud del bucle es de 2 a 20 nucleótidos.

8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la longitud del tallo es de 19 a 31 nucleótidos.

9. Un método para suprimir la expresión de un gen que codifica una proteína *in vitro*, que comprende introducir el ARN circular monocatenario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a células derivadas de seres humanos, y desaparearear un ARN diana mediante el ARN circular monocatenario para inhibir la traducción del ARN diana en la proteína de manera sostenida.

10. Un método para suprimir la expresión de un gen que codifica una proteína, que comprende introducir el ARN circular monocatenario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a animales no humanos, plantas o células de éstos, y desaparearear un ARN diana mediante el ARN circular monocatenario para inhibir la traducción del ARN diana en la proteína de manera sostenida.

11. Una composición farmacéutica que comprende el ARN circular monocatenario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, a modo del ingrediente activo.

99

RESUMEN

La presente invención se refiere a un ARN circular monocatenario que tiene un efecto de interferencia de ARN sostenido o de liberación lenta, caracterizado porque el ARN circular monocatenario comprende una secuencia de hebras sentido, una secuencia de hebras antisentido que es complementaria de la secuencia de hebras sentido, secuencias de dos bucles idénticas o diferentes entre la hebra sentido y la hebra antisentido, que conectan ambas hebras, donde la hebra sentido y la hebra antisentido se aparean para formar un tallo.

Fig. 1

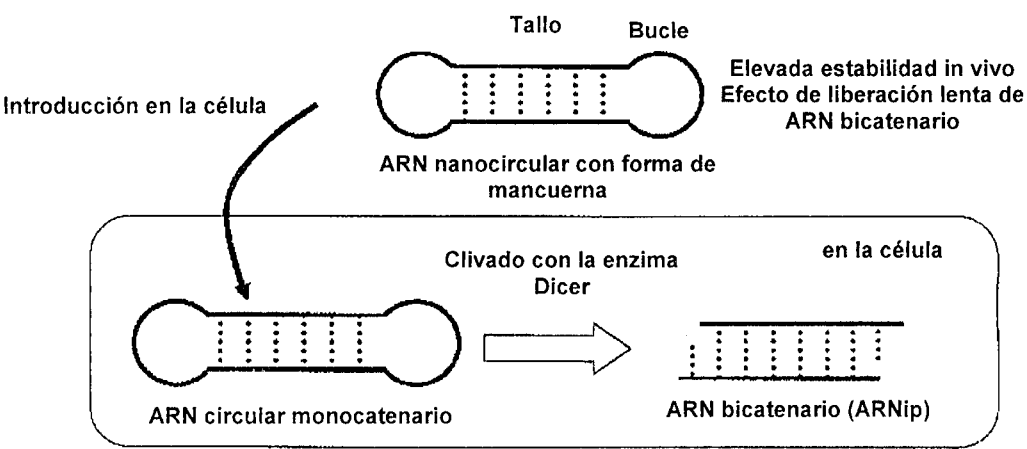
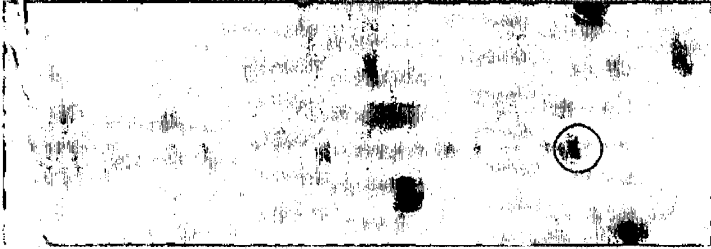


Fig. 2

Carril 1 2 3 4 5 6



56 bases

5' -p-GAG A CUU ACG CUG AGU ACU UCG A U A
U GAA UGC GAC UCA UGA AGC U A G A G
3' - AACU U C A

28 bases (superior: hebra sentido; inferior: hebra antisentido)

5' -p-GAG A CUU ACG CUG AGU ACU UCG A U UCAA -3'
U GAA UGC GAC UCA UGA AGC U A GAG -p- 5'

Fig. 3

ARNip-1

5' - GUG CGC UGC UGG UGC CAA CUU
UU CAC GCG ACG ACC ACG GUU G -3'

Db-19

$\begin{array}{cccccccccccccccc}
G & A & G & & & & & & & & U & C & A & & \\
A & & A & GUG & CGC & UGC & UGG & UGC & CAA & C & U & & & & A \\
A & & U & CAC & GCG & ACG & ACC & ACG & GUU & G & A & & & & \\
C & & U & & & & & & & & G & A & G & &
\end{array}$

Db-23

^G ^A ^G ^U ^C ^A
^A ^A ^{GUG} ^{CGC} ^{JGC} ^{UGG} ^{UGC} ^{CAA} ^{CCC} ^U ^U ^A
^A ^U ^U ^{CAC} ^{GCG} ^{ACG} ^{ACC} ^{ACG} ^{GUU} ^{GGG} ^A ^A ^G ^A ^G
^C ^U

Db-27

G A G U C A
A AAA GUG CGC UGC UGG UCC CAA CCC UAU U A
A U UUU CAC GCG ACC ACC ACG GUU GGG AUA A A
C U G A G

Db-31

G A G U C A
A UC AAA GUG CGC UGC UGG UGC CAA CCC UAU UC U A N
U AG UUU CAC GCG ACG ACC ACG GUU GGG AUA AG A G A G

Fig. 4

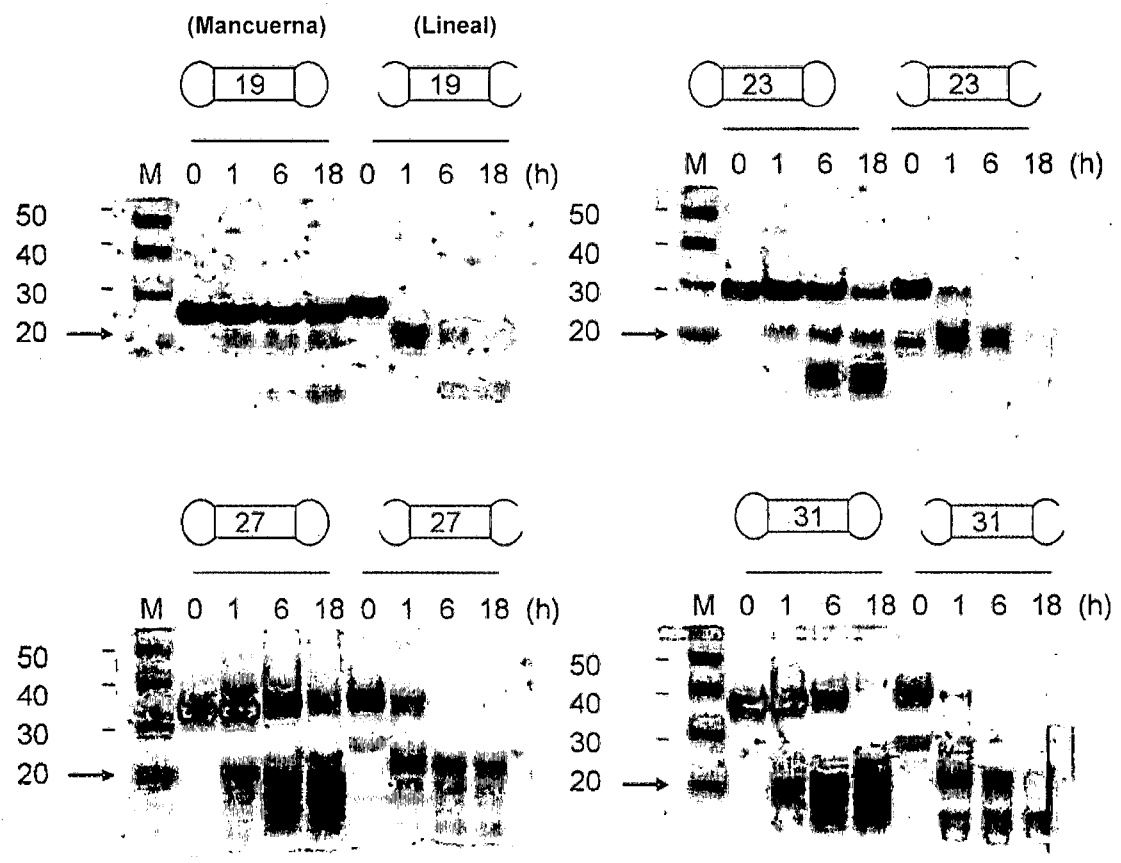
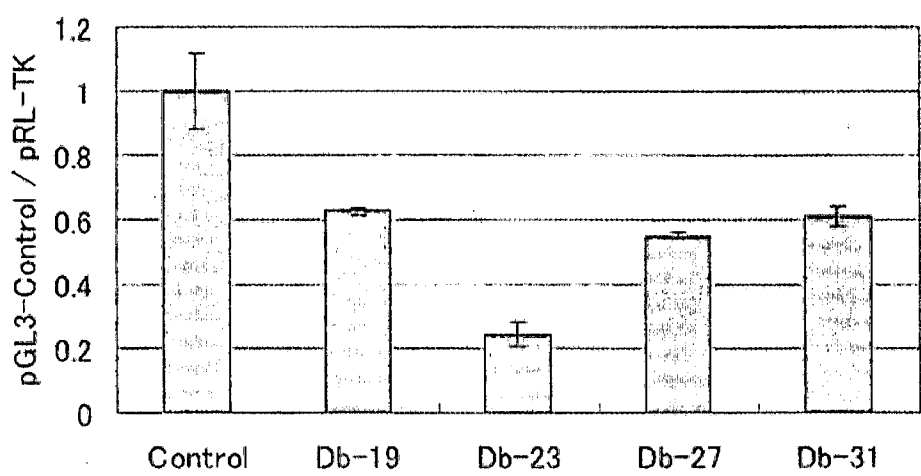


Fig. 5



105

Fig. 6

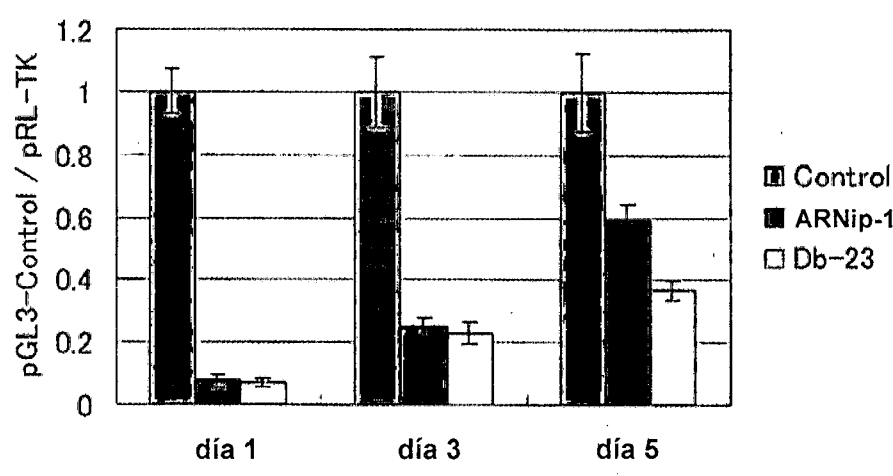
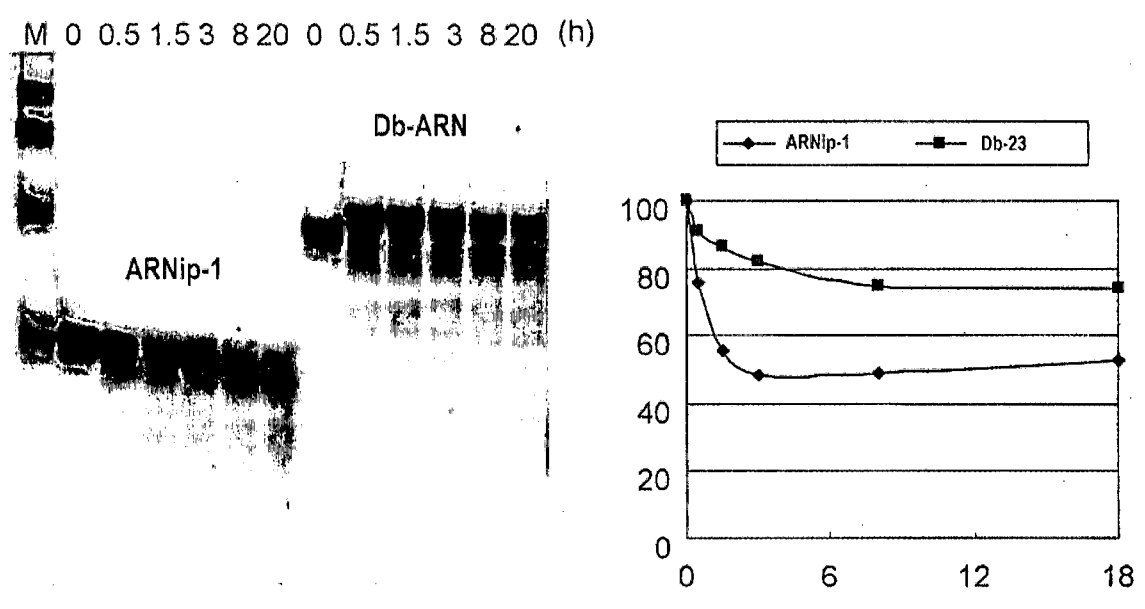


Fig. 7



(07)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> RIKEN

Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

Hayashi Kasei Co., Ltd.

<120> ARN circular monocatenario y método para producirlo

<130> PH-3542PCT-PK/TH/TW/AR

<150> JP 2007-125045

<151> 9 de mayo de 2007

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 28

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 1

gagacuuacg cugaguacuu cgauucaa

<210> 2
<211> 28
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 2
gagaucgaag uacucagcgu aaguucaa 28

<210> 3
<211> 56
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 3
gagacuuacg cugaguacuu cgauucaaga gaucgaagua cucagcguaa guucaa
56

<210> 4
<211> 21
<212> ARN
<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 4

gugcgugcu ggugccaacu u

21

<210> 5

<211> 21

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 5

guuggcacca gcagcgcacu u

21

<210> 6

<211> 28

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 6

gagagugcgc ugcuggugcc aacuucaa 28

- <210> 7
- <211> 28
- <212> ARN
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Sintético

<400> 7
gagaguuggc accagcagcg cacuucaa 28

- <210> 8
- <211> 32
- <212> ARN
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Sintético

<400> 8
gagaagugcg cugcuggugc caaccuuuc aa 32

- <210> 9
- <211> 32

111

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 9

gagaagggug ggcaccagca gcgcacuuuc aa

32

<210> 10

<211> 36

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 10

gagaaaagug cgcugcuggu gccaacccua uuucaa

36

<210> 11

<211> 36

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 11
 gagaauaggg uuggcaccag cagcgcacuu uuucaa 36

<210> 12
 <211> 40
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 12
 gagaucaaag ugcgugcug gugccaaccc uauucucaa 40

<210> 13
 <211> 40
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 13
 gagagaauag gguuggcacc agcagcgcac uuugauucaa 40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/058990

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i,
A61K31/7105(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/00, A01H1/00, A01K67/027, A61K31/7105, A61K48/00, A61P35/00,
A61P43/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	JP 2005-517423 A (Sirna Therapeutics, Inc.), 16 June, 2005 (16.06.05), Par. Nos. [0052], [0141]; Fig. 6 & WO 2003/070197 A2 & WO 2003/070750 A2 & WO 2003/070881 A2	1-3, 9-11/4-8
X/A	JP 2005-517427 A (Sirna Therapeutics, Inc.), 16 June, 2005 (16.06.05), Par. Nos. [0066], [0155]; Fig. 6 & WO 2003/070750 A2 & WO 2003/070197 A2 & WO 2003/070881 A2	1-3, 9-11/4-8
X/A	JP 2005-517430 A (Sirna Therapeutics, Inc.), 16 June, 2005 (16.06.05), Par. Nos. [0048], [0137]; Fig. 6 & WO 2003/070881 A2 & WO 2003/070197 A2 & WO 2003/070750 A2	1-3, 9-11/4-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 June, 2008 (03.06.08)Date of mailing of the international search report
17 June, 2008 (17.06.08)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2008/058990

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/014810 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 17 February, 2005 (17.02.05), Figs. 1, 6, 7 (Family: none)	1-11
P,X	ABE N., et al., Dumbbell-Shaped Nanocircular RNAs for RNA Interference., J. Am. Chem. Soc., 12 December, 2007 (12.12.07), (15 November, 2007 (15.11.07) on line), vol. 129, no. 49, p. 15108 - 15109	1-11
P,X	Nahoko ABE et al., "Dumbbell-Shaped Nanocircular RNA o Mochiita RNA Kanshoho", CSJ: The Chemical Society of Japan Taikai Koen Yokoshu, 12 March, 2008 (12.03.08), Vol. 88th, page 825 (3 A4-49)	1-11
P,X	Mitsuru HARADA et al., "Kagaku Shushoku shita Dumbbell-Shaped Nanocircular RNA o Mochiita RNA Kanshoho no Kento", CSJ: The Chemical Society of Japan Taikai Koen Yokoshu, 12 March, 2008 (12.03.08), Vol. 88th, page 825 (3 A4-50)	1-11

115

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 5 8 9 9 0	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00, A01H1/00, A01K67/027, A61K31/7105, A61K48/00, A61P35/00, A61P43/00, C12N15/09			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
X/A	JP 2005-517423 A (サーナ・セラピューティクス・インコーポレイテッド) 2005.06.16, 【0052】, 【0141】, 図 6 & WO 2003/070197 A2 & WO 2003/070750 A2 & WO 2003/070881 A2		1-3, 9-11/4-8
X/A	JP 2005-517427 A (サーナ・セラピューティクス・インコーポレイテッド) 2005.06.16, 【0066】, 【0155】, 図 6 & WO 2003/070750 A2 & WO 2003/070197 A2 & WO 2003/070881 A2		1-3, 9-11/4-8
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 0 3 . 0 6 . 2 0 0 8		国際調査報告の発送日 1 7 . 0 6 . 2 0 0 8	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官 (権限のある職員) 中野 あい 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	4 B 3 7 5 8

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2008/058990
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	JP 2005-517430 A (サーナ・セラピューティクス・インコーポレイテッド) 2005.06.16, 【0048】 , 【0137】 , 図 6 & WO 2003/070881 A2 & WO 2003/070197 A2 & WO 2003/070750 A2	1-3, 9-11/4-8
A	WO 2005/014810 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2005.02.17, 図 1,6,7 (ファミリーなし)	1-11
PX	ABE N., et al., Dumbbell-Shaped Nanocircular RNAs for RNA Interference., J. Am. Chem. Soc., 2007.12.12(2007.11.15 on line), vol. 129, no. 49, p. 15108 - 15109	1-11
PX	阿部奈保子 他, ダンベル型ナノサークルRNAを用いたRNA干渉法, 日本化学会大会講演予稿集, 2008.03.12, vol. 88th, p. 825 (3A4-49)	1-11
PX	原田充 他, 化学修飾したダンベル型ナノサークルRNAを用いたRNA干渉法の検討, 日本化学会大会講演予稿集, 2008.03.12, vol. 88th, p. 825 (3A4-50)	1-11

PC Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: C12N 015/000	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) RIKEN, OTSUKA PHARMACEUTICAL, CO., LTD. y HAYASHI KASEI CO., LTD.	
(30) Prioridad	(31) Prioridad 2007-125045	(32) Fecha 09/05/2007	(33) País JP
		(72) Inventor(es) HIROSHI ABE Y OTROS	
		(74) Apoderado: OSCAR CORREA	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 09/12/2009		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 20/11/2008	
Fecha de presentación de la solicitud: 09/05/2008		N° publicación: WO 2008/140126 A1	
No. de solicitud PCT/JP2008/058990			
(54) Titulo: ARN CIRCULAR MONOCATENARIO Y MÉTODO PARA PRODUCIRLO			

Reivindicación(es):

1. Un ARN circular monocatenario que tiene un efecto de interferencia de ARN sostenido o de liberación lenta, caracterizado porque el ARN circular monocatenario comprende una secuencia de hebras sentido, una secuencia de hebras antisentido que es complementaria de la secuencia de hebras sentido, secuencias de dos bucles idénticas o diferentes entre la hebra sentido y la hebra antisentido, que conectan ambas hebras, donde la hebra sentido y la hebra antisentido se aparean para formar un tallo.

2. El ARN circular monocatenario según la reivindicación 1, donde la expresión de un ARN diana es 0,4 o menor 24 horas después de introducir el ARN circular monocatenario en células eucariotas, en comparación con las células de control, cuyo nivel de expresión del ARN diana se establece en 1.

3. El ARN circular monocatenario según la reivindicación 1 ó 2, donde el 70% o más de éste se retiene después de permanecer 8 horas en el suero humano.

4. Un método para producir el ARN circular monocatenario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende sintetizar una hebra sentido y una hebra antisentido, y ambas comprenden una secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 5' y en el extremo 3', y simultáneamente se liga el nucleótido en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra sentido, con el nucleótido en el extremo 3' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra antisentido y viceversa, utilizando una ligasa,

donde la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 5' de la hebra sentido y la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 3' de la hebra antisentido se enlazan entre sí para formar un bucle, la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 3' de la hebra sentido y la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en el extremo 5' de la hebra antisentido se enlazan entre sí para formar un bucle, y la hebra sentido y la hebra antisentido se aparean para formar un tallo.

5. El método según la reivindicación 4, que también comprende fosforilar cada extremo 5' de la secuencia de nucleótidos con nucleótidos no-apareados en la hebra sentido y la secuencia de nucleótidos con los nucleótidos no-

apareados en la hebra antisentido.

6. El método según la reivindicación 4 ó 5, donde las secuencias en bucle son idénticas o diferentes entre sí.

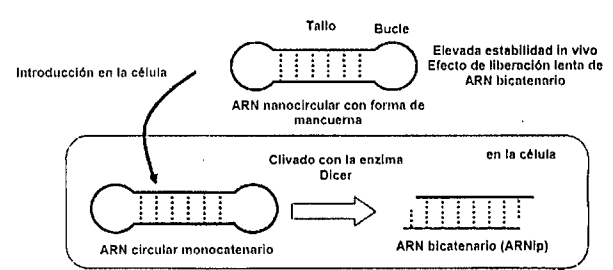
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde la longitud del bucle es de 2 a 20 nucleótidos.

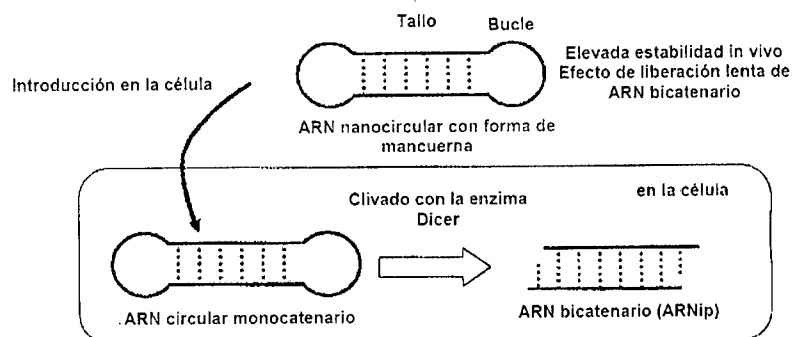
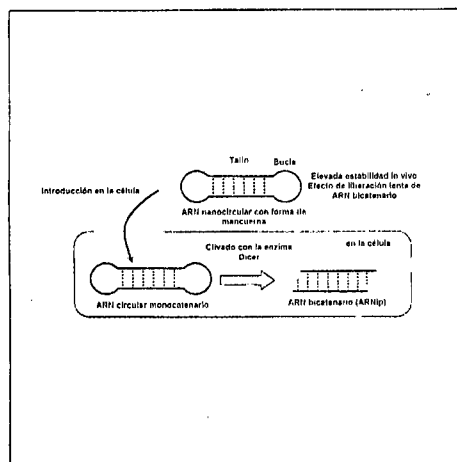
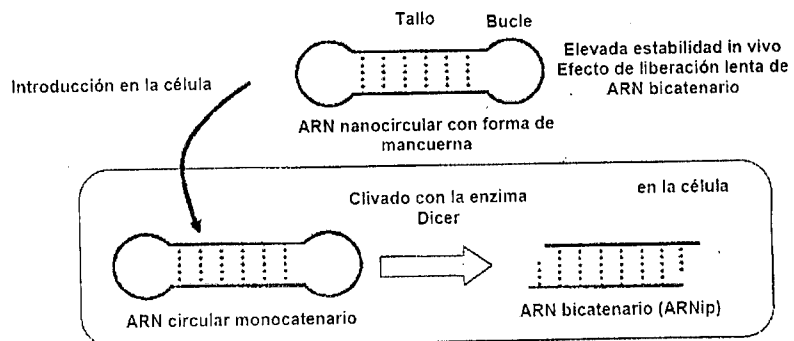
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la longitud del tallo es de 19 a 31 nucleótidos.

9. Un método para suprimir la expresión de un gen que codifica una proteína *in vitro*, que comprende introducir el ARN circular monocatenario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a células derivadas de seres humanos, y desaparecer un ARN diana mediante el ARN circular monocatenario para inhibir la traducción del ARN diana en la proteína de manera sostenida.

10. Un método para suprimir la expresión de un gen que codifica una proteína, que comprende introducir el ARN circular monocatenario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a animales no humanos, plantas o células de éstos, y desaparecer un ARN diana mediante el ARN circular monocatenario para inhibir la traducción del ARN diana en la proteína de manera sostenida.

11. Una composición farmacéutica que comprende el ARN circular monocatenario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, a modo del ingrediente activo.





SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 84,006
FECHA : NOVIEMBRE 9 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-140877- -00000-0000

Fecha: 2009-12-09 17:03:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 119

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	19808073	09/11/2009	26,465,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

0010: 17281-841-001-8



No. 09-140877- -00000-0000

Fecha: 2009-12-09 17:03:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 119

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	LISTA DE CHEQUEO ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES
---	--

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☒ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	



Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA BARBOSA OSCAR
Apoderado(a) y/o Representante de
RIKEN
OTSUKA PHARMACEUTICAL CO. , LTD.
HAYASHI KASEI., LTD

REFERENCIA	Radicación No.	9 140877
	Solicitud internacional	PCT/JP2008/058990
	Fecha inicio fase nacional	09/12/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	408

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

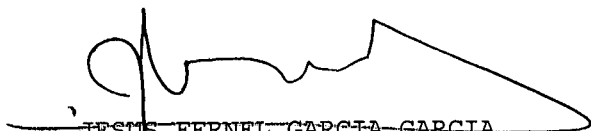
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...



Radicación No.: 9 140877



JESUS FERNEL GARCIA GARCIA
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 15 ENE. 2010
adpall