



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 772**

51 Int. Cl.:  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 35/76** (2006.01)  
**A61K 47/16** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A61K 47/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05749035 .1**  
96 Fecha de presentación : **10.06.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1757312**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Composición liofilizada de envuelta viral inactivada con actividad de fusión de membrana.**

30 Prioridad: **14.06.2004 JP 2004-176105**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.04.2011**

73 Titular/es: **ISHIHARA SANGYO KAISHA, Ltd.**  
**3-15, Edobori 1-chome**  
**Nishi-ku, Osaka-shi, Osaka 550-0002, JP**

72 Inventor/es: **Ueda, Takafumi**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 357 772 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composición liofilizada de envuelta viral inactivada con actividad de fusión de membrana.

**CAMPO TÉCNICO**

5 La presente invención se refiere a una composición liofilizada usada para la introducción de ácido nucleico, proteína o fármacos en células y organismos vivos, a un proceso para su producción y a su uso.

**TÉCNICA ANTECEDENTE**

10 En los últimos años, se han desarrollado diversos sistemas de vectores virales y no virales (sintéticos) para introducir materias extrañas tales como genes en células u organismos vivos. En general, para el suministro intracelular de genes, los sistemas de vectores virales pueden introducir materias extrañas de forma más eficaz que los sistemas de vectores no virales. Sin embargo, los vectores virales pueden haber causado problemas debido a la expresión simultánea de genes esenciales del virus parental, expresión con pérdidas de genes virales, capacidad inmunógena y modificación de la estructura del genoma del huésped. Aunque los vectores no virales son menos citotóxicos e inmunógenos, los sistemas de vectores no virales tienen un problema ya que los vectores no virales no pueden introducir genes de forma tan eficaz como algunos vectores virales, debido a que, en sistemas de vectores no virales, las materias extrañas son captadas por las células por endocitosis.

15 Para superar este problema, se propuso un liposoma que tiene la actividad de fusión de membrana de virus Sendai (virus hemaglutinante de Japón: VHJ) llamado un vector híbrido, es decir un complejo VHJ-liposoma. La actividad de fusión de membrana del virus permite la transferencia de genes intracelulares al interior de células y organismos vivos. Esta técnica se usa frecuentemente en experimentos animales en todo el mundo (documento de patente 1 y documentos no de patente 1 y 2). El VHJ-liposoma se construye fusionando de forma preliminar VHJ inactivado por UV (envuelta de VHJ inactivada) con un liposoma cargado con una proteína, una sustancia química o un gen. Sin embargo, además de la preparación de la envuelta de VHJ inactivada, se requieren etapas engorrosas tales como la preparación del liposoma y el aislamiento del VHJ-liposoma después de la fusión.

20 Por lo tanto, se propuso la encapsulación directa de genes en una envuelta de VHJ inactivada (documento de patente 2). En este sistema, los genes a introducir en células se encapsulan en una envuelta de VHJ inactivada mediante congelación-descongelación o tratamiento con tensioactivo en presencia del gen, y la envuelta se pone en contacto con las células receptoras para introducir el gen a través de fusión de membrana. Este sistema de transferencia de genes relativamente sencillo usando la envuelta de VHJ inactivada producible en masa se ha usado para la introducción de materias extrañas en células en muchos estudios.

30 Por otro lado, aunque la envuelta de VHJ inactivada puede criopreservarse (-70°C) en suspensión sin perder su capacidad de transferir genes, no hay ningún informe sobre su almacenamiento mediante liofilización, presumiblemente debido a que la liofilización arruina la función o la estructura de la envuelta de VHJ inactivada que tiene actividad de fusión de membrana. Sin embargo, se ha demandado una composición liofilizada de la envuelta de VHJ inactivada que pueda almacenarse a temperaturas más altas con vistas al transporte y el almacenamiento.

35 Documento de Patente 1: Patente de Estados Unidos Nº 5.631.237

Documento de Patente 2: WO01/57204

Documento no de Patente 1: Dzau, V. J. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 93, 11421-11425 (1996)

Documento no de Patente 2: Kaneda, Y. et al. Molecular Medicine Today, 5, 298-303 (1999)

**DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION****40 PROBLEMAS QUE PRETENDE RESOLVER LA INVENCION**

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición liofilizada de una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana que pueda ser almacenada a temperaturas más altas sin perder la capacidad de introducir materias extrañas. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para introducir una materia extraña en una célula con alta eficacia.

**45 MANERAS DE RESOLVER LOS PROBLEMAS**

50 Los inventores de la presente invención realizaron exhaustivos estudios en busca de maneras de liofilizar la envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana y, como resultado, descubrieron que la adición de hidrolizados de proteínas y algunos aminoácidos ayuda a que la envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana conserve su capacidad de introducir materias extrañas. Además, también descubrieron que la disminución de sales es eficaz para conservar la capacidad de la envuelta viral inactivada de introducir materias extrañas en las células. La presente invención se ha realizado en base a estos descubrimientos. También descubrieron que estos tratamientos impiden de forma eficaz la pérdida de la actividad de fusión de membrana de la envuelta viral

inactivada. Además, consiguieron un nuevo método de introducción de materias extrañas usando una composición liofilizada de la envuelta viral inactivada resultante que tiene actividad de fusión de membrana.

Concretamente, la presente invención proporciona:

- 5 1. Una composición liofilizada que comprende una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana, y al menos un estabilizante seleccionado entre el grupo constituido por un hidrolizado de proteína, leucina, y un polisacárido.
2. La composición liofilizada de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la envuelta viral inactivada es una envuelta viral inactivada de un virus de *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae* y *Flaviviridae*.
- 10 3. La composición liofilizada de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que el estabilizante es un hidrolizado de proteína y un polisacárido.
4. La composición liofilizada de acuerdo con una cualquiera de 1 a 3, que se prepara mediante un proceso que comprende una etapa (1) de mezclar una suspensión de la envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana y el estabilizante y una etapa (2) de liofilizar la mezcla obtenida en la etapa (1).
- 15 5. La composición liofilizada de acuerdo con 4, en la que la concentración de la envuelta viral inactivada en la mezcla obtenida en la etapa (1) es tal que la DO es de 0,1 a 7,0.
6. La composición liofilizada de acuerdo con 4 ó 5, en la que la concentración del hidrolizado de proteína, o leucina en la mezcla obtenida en la etapa (1) es del 0,1 al 2,5%.
7. La composición liofilizada de acuerdo con una cualquiera de 4 a 6, en la que la concentración del polisacárido en la mezcla obtenida en la etapa (1) es del 0,05 al 0,5%.
- 20 8. La composición liofilizada de acuerdo con una cualquiera de 4 a 7, en la que la concentración de sal en la mezcla obtenida en la etapa (1) es, como máximo, de 3 mM.
9. Un método de introducción de una materia extraña en una célula o un organismo vivo, que comprende:
  - (1) una etapa de rehidratar una composición liofilizada que contiene una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana con una mezcla que comprende la materia extraña y agua, y
  - 25 (2) una etapa de poner a la composición obtenida en la etapa (1) en contacto con la célula o el organismo vivo.
10. El método de introducción de una materia extraña de acuerdo con 9, en el que la composición liofilizada es la composición liofilizada como se define en una cualquiera de 1 a 8.
11. Un método de fusión celular que comprende:
  - 30 (a) etapa de rehidratar una composición liofilizada que contiene una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana; y
  - (b) etapa de mezclar la composición obtenida en la etapa (a) con una suspensión de células que se van a fusionar.
12. El método de fusión celular de acuerdo con 11, en el que la composición liofilizada es la composición liofilizada como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

### 35 EFECTOS DE LA INVENCION

Las envueltas virales inactivadas que tienen actividad de fusión de membrana descritas hasta la fecha tienen que almacenarse en un congelador (-20°C), preferiblemente en un congelador ultrafrío (-70°C o menos). Por ejemplo, la envuelta de VHJ inactivada puede perder sustancialmente su capacidad de introducir materias extrañas durante aproximadamente dos semanas de refrigeración, y por lo tanto, es apenas almacenable en un lugar sin equipo de congelación o congelación ultrafría y no puede soportar un largo periodo de transporte. La composición liofilizada de una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana de la presente invención es almacenable a temperatura ambiente (25°C o menos), fácil de manejar y está libre de restricciones sobre el lugar de uso o el transporte. Además, el método de introducción de una materia extraña de la presente invención mejora drásticamente la eficacia de transferencia, es más fácil y tiene aplicaciones generalizadas tales como análisis de alto rendimiento.

### 45 MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCION

En la presente invención, "inactivación", cuando se refiere a los virus, significa inactivación de genes, y un virus inactivado ya no puede replicar sus genes y tiene una pérdida de su potencia de proliferación e infectividad. La inactivación de virus se realiza mediante irradiación con UV, irradiación con rayos radiactivos o tratamiento con un agente alquilante, preferiblemente mediante irradiación con UV o tratamiento con un agente alquilante, en términos

específicos de acuerdo con el documento WO01/57204, en particular mediante el tratamiento con un agente alquilante. Una envuelta viral está constituida generalmente por pequeñas estructuras similares a espículas hechas de proteínas espícula codificadas por el gen viral y una bicapa lipídica obtenida del huésped y no tiene potencia de proliferación por sí misma. Las proteínas espícula que constituyen las pequeñas espículas contienen una proteína de fusión de membrana que funciona para otorgar la actividad de fusión de membrana. En la presente invención, “una envuelta viral inactivada” significa de forma exhaustiva un virus inactivado y/o su envuelta. En la presente invención, “una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana” significa una envuelta viral inactivada que tiene una proteína de fusión de membrana funcional que tiene actividad de fusión de membrana.

Los virus que tienen una envuelta que contiene una proteína de fusión de membrana incluyen virus superiores de *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae* y *Flaviviridae*. Estos virus utilizan su actividad de fusión de membrana para infectar a diversas células a través de la fusión con las membranas plasmáticas de las células. En la presente invención, puede usarse cualquier virus que muestre dicha propiedad. Por lo tanto, se prefiere usar un virus de *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae* o *Flaviviridae*, preferiblemente un virus de *Paramyxoviridae*, de forma particularmente preferible VHJ (virus Sendai).

El cultivo de los virus mencionados anteriormente se describe en el documento “Protocols for Virus Experiments: 1995 publicado por Medical View Co., Ltd.” Por ejemplo, puede hacerse proliferar al virus Sendai de la familia *Paramyxoviridae* en huevos de gallina fertilizados o mediante infección persistente en cultivos de tejido o de células de mamífero (que contienen un hidrolizado tal como tripsina).

Para la preparación de la envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana, están disponibles ultracentrifugado, aislamiento mediante cromatografía en columna, reconstitución y similares. El aislamiento se realiza preferiblemente mediante cromatografía iónica, específicamente como se describe en el Ejemplo 1 (1) y los Ejemplos 7 (1) a (5) del documento WO03/014338.

En el caso del aislamiento mediante cromatografía iónica, la envuelta viral inactivada se eluye con una solución tampón de cromatografía iónica, y a continuación se concentra, por ejemplo, mediante diálisis por medio de un módulo de filtro de flujo tangencial (FFT) repetidamente para dar una suspensión de la envuelta viral inactivada que tendrá una concentración que corresponde a una DO (turbidez a 558 nm, a menos que se indique otra cosa) de 0,1 a 7,0, preferiblemente de 0,25 a 5,0, de forma particularmente preferible de 0,3 a 2,5, después de mezclarla con un estabilizante en la etapa posterior. La concentración final de sales tales como el agente tamponante y NaCl en la mezcla de la suspensión de la envuelta viral inactivada con el estabilizante se ajusta a, como máximo, 3 mM, preferiblemente como máximo 1 mM, de forma particularmente preferible como máximo 0,3 mM.

Cuando la envuelta viral inactivada se prepara mediante ultracentrifugado o reconstitución, la concentración de sal final se ajusta a, como máximo, 3 mM, preferiblemente como máximo 1 mM, de forma particularmente preferible como máximo 0,3 mM.

En la presente invención, el hidrolizado de proteína que se usará como estabilizante puede ser polipeptona, bactopectona, bactotriptono o un hidrolizado ácido de caseína, preferiblemente polipeptona, bactopectona o un hidrolizado ácido de caseína, de forma particularmente preferible polipeptona o bactopectona. El aminoácido que se usará como estabilizante puede ser L-leucina. Para disolver el hidrolizado de proteína o leucina, se usa un disolvente tal como agua destilada, agua UF o una solución tampón, preferiblemente agua destilada o agua UF. El hidrolizado de proteína o leucina se añade a una concentración del 0,1% al 2,5%, preferiblemente del 0,2% al 1,5% a una suspensión de la envuelta viral inactivada antes de la liofilización.

En la presente invención, el polisacárido que se utilizará como estabilizante puede ser, por ejemplo, metilcelulosa,  $\beta$ -glucano, pectina, agarosa, dextrina o dextrano, preferiblemente metilcelulosa. Para disolver el polisacárido, se usa un disolvente tal como agua destilada, agua UF o una solución tampón, preferiblemente agua destilada o agua UF. El polisacárido se añade a una concentración del 0,05% al 0,5%, preferiblemente del 0,1% al 0,2% a la suspensión de la envuelta viral inactivada antes de la liofilización. La adición de un polisacárido hace a la composición liofilizada resultante más fácil de manejar suprimiendo la pulverización. Un efecto anti-pulverización similar puede conseguirse mediante adición de trehalosa.

Pueden usarse uno o más estabilizantes seleccionados entre el grupo constituido por hidrolizados de proteína, aminoácidos y polisacáridos en solitario o en combinación de dos o más. Se prefiere el uso combinado de un hidrolizado de proteína con un polisacárido o el uso combinado de un aminoácido con un polisacárido. Se prefiere particularmente el uso combinado de un hidrolizado de proteína con un polisacárido, específicamente el uso combinado de polipeptona o bactopectona y metilcelulosa.

La composición liofilizada de la presente invención se prepara, por ejemplo, añadiendo un hidrolizado de proteína, un aminoácido o un polisacárido a una concentración predeterminada, y opcionalmente añadiendo un agente de ajuste del pH conocido, un agente de isotonicidad conocido, un estabilizante conocido o un conservante conocido, a la envuelta viral que tiene actividad de fusión de membrana preparada como se ha descrito anteriormente. El hidrolizado de proteína, el aminoácido o el polisacárido puede disolverse en los disolventes acuosos mencionados anteriormente respectivamente añadidos antes a concentraciones predeterminadas a la envuelta viral que tiene actividad de fusión de

membrana. La mezcla resultante se liofiliza mediante métodos ordinarios. Para la liofilización, puede usarse un método conocido tal como liofilización en placas, liofilización por aspersion o liofilización en viales en condiciones usadas de forma ordinaria.

5 La composición liofilizada de una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana abarca lo siguiente.

(A) Una composición liofilizada para introducir una materia extraña, que comprende una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana, y al menos un estabilizante seleccionado entre el grupo constituido por un hidrolizado de proteína, leucina y un polisacárido, que se prepara mediante un proceso que comprende una etapa (1) de mezclar una suspensión de la envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana y el estabilizante; y

una etapa (2) de liofilizar la mezcla obtenida en la etapa (1);

(B) La composición liofilizada de acuerdo con (A), en la que la concentración de la envuelta viral inactivada en la mezcla obtenida en la etapa (A)(1) corresponde a una DO (Densidad Óptica) de 0,1 a 7,0, y la concentración del hidrolizado de proteína en la mezcla obtenida en la etapa (A)(1) es del 0,1% al 2,5%;

(C) La composición liofilizada de acuerdo con (A), en la que la concentración de la envuelta viral inactivada en la mezcla obtenida en la etapa (A)(1) corresponde a una DO de 0,1 a 7,0, y la concentración del polisacárido en la mezcla obtenida en la etapa (A)(1) es del 0,05 al 0,5%;

(D) La composición liofilizada de acuerdo con (A), en la que la concentración de la envuelta viral inactivada en la mezcla obtenida en la etapa (A)(1) corresponde a una DO de 0,1 a 7,0, la concentración del hidrolizado de proteína en la mezcla obtenida en la etapa (A)(1) es del 0,1% al 2,5%, y la concentración del polisacárido en la mezcla obtenida en la etapa (A)(1) es del 0,05 al 0,5%; y

(E) La composición liofilizada de acuerdo con una cualquiera de (A) a (D), en la que la concentración de sal en la mezcla obtenida en la etapa (1) es de, como máximo, 3 mM.

25 La composición liofilizada de la presente invención puede usarse para preparar un vector de transferencia cargando una materia extraña en una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana. El vector de transferencia para introducir una materia extraña se añade o se administra a células o un organismo vivo para introducir la materia extraña. Se descubrió que la rehidratación está disponible como nuevo método de preparación del vector para introducir una materia extraña.

30 La rehidratación no usa tensioactivo alguno de los que son convencionalmente necesarios, y una composición liofilizada que contiene una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana se rehidrata, por ejemplo, mezclándola con una solución o suspensión acuosa de una materia extraña. La materia extraña puede introducirse añadiendo o administrando la composición liofilizada rehidratada inmediatamente después de la rehidratación, preferiblemente después de 0 a 10 minutos de incubación a de 0°C a 25°C. En el caso de un gran número de muestras, la incubación puede prolongarse durante otro par de horas. Las concentraciones y la proporción de mezclado pueden seleccionarse arbitrariamente sin restricción particular alguna. La concentración de la envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana corresponde a una DO de 0,05 a 5,0, preferiblemente una DO de 0,05 a 2,0, de forma particularmente preferible una DO de 1,0 a 2,0. Por ejemplo, cuando la materia extraña es ADN, su concentración es de 0,02 a 40 g/μl, preferiblemente de 0,2 a 10 g/μl. La envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana después del envejecimiento porta la materia extraña y sirve como vector para introducir la materia extraña. Este método es bastante diferente del método de liofilización que comprende congelación y descongelación repetitiva.

45 Es posible preparar un vector para introducir una materia extraña de la composición liofilizada de la presente invención mediante un método convencional usando tensioactivos. En el método del tensioactivo, la composición liofilizada se rehidrata con PBS (-) (solución salina tamponada con fosfato) o un medio de transferencia de genes que contiene la materia extraña a introducir para preparar una suspensión que contiene la envuelta viral inactivada a una concentración que corresponde a una DO de 0,1 a 1,0, y a continuación la suspensión se mezcla con una solución o suspensión acuosa de la materia extraña a introducir. A la mezcla resultante, se le añade un tensioactivo tal como Triton X-100 a una concentración del 0,001% al 0,5%, preferiblemente del 0,05% al 0,3%, y se deja reposar a la mezcla resultante durante de varios segundos a varias horas, preferiblemente de 3 a 10 minutos, a una temperatura baja, preferiblemente a de 0°C a 25°C, de forma particularmente preferible a de 0°C a 4°C. A continuación, el tensioactivo se retira mediante centrifugado para obtener un vector para introducir una materia extraña.

55 En la presente invención, la materia extraña a introducir en las células o un organismo vivo es habitualmente un fármaco o un gen, aunque no existen restricciones particulares. Los ejemplos específicos incluyen antibióticos, fármacos quimioterapéuticos, fármacos antialérgicos, fármacos cardiovasculares, fármacos anti-inflamatorios, fármacos antirreumáticos, hormonas, vitaminas, fármacos antineoplásicos, medios de ribo-contraste, medios de contraste de resonancia magnética, proteínas y ácidos nucleicos biológicamente activos. Específicamente, cuando se usa un ácido nucleico, éste puede seleccionarse entre un ácido nucleico que codifica una proteína de interés que puede expresar la proteína de interés en células, una ribozima, un nucleótido antisentido, un ADN que expresa un ARN que induce una

interferencia de ARN, un ARN interferente pequeño, un gen suicida y un gen inductor de apoptosis y similares. Es posible construir un vector para introducir materias extrañas que porte una de estas materias extrañas o dos o más de ellas. Como materia extraña, es preferible un ácido nucleico, particularmente un ácido nucleico que codifica una proteína de interés que puede expresar la proteína de interés en células.

5 Cuando se usa sulfato de protamina para la introducción de una materia extraña tal como un ácido nucleico en células o un organismo vivo, la mezcla del ácido nucleico y la envuelta viral inactivada se diluye con PBS(-) o un medio de transferencia de genes a una concentración de ácido nucleico de, como máximo, 0,1 g/μl después de la incubación, para impedir que el ácido nucleico co-precipite con el sulfato de protamina añadido más tarde. La solución resultante se añade a células cultivadas directamente o después de la adición de sulfato de protamina. El sulfato de protamina se  
10 añade a una concentración de 1 μg/ml a 100 μg/ml, preferiblemente de 10 μg/ml a 50 μg/ml. Cuando no se usa sulfato de protamina, la operación anterior no es necesaria.

En la presente invención, las células como diana para la introducción de la materia extraña son células eucariotas, especialmente células animales, y pueden ser células adherentes o células en suspensión. Esto es aplicable a una amplia variedad de líneas celulares incluyendo células diana generalmente difíciles tales como células de cultivo  
15 primario, células madre, fibroblastos y macrófagos. El vector para introducir materias extrañas se añade a un cultivo de estas células y se pone en contacto con ellas. El vector para introducir materias extrañas de la presente invención puede administrarse *in vivo* o de forma sistémica, concretamente a través de una vía apropiada para la enfermedad a tratar, el órgano diana o similares, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía subcutánea o por vía intramuscular, o directamente a una región afectada por la enfermedad tal como el riñón, el hígado, el pulmón, el  
20 cerebro o el nervio. La administración directa a regiones afectadas por la enfermedad permite una terapia específica de órganos. En condiciones de cultivo celular ordinarias o condiciones de alimentación, la materia extraña se introduce en células cierto tiempo después de la adición o administración del vector. Ésta puede administrarse *ex vivo* mediante cualquier método ordinario recogiendo células de mamífero (tales como linfocitos o células madre hematopoyéticas) y sensibilizándolas con el vector para introducir materias extrañas de la presente invención y a continuación devolviendo  
25 las células al cuerpo del mamífero.

Las células como diana de la fusión celular son células animales, preferiblemente células de mamífero, tales como inmunocitos, células de médula ósea, células dendríticas, células sanguíneas, células madre embrionarias, células madre tisulares, células neuronales, células gliales, células de pituitaria, hepatocitos, células pancreáticas, células renales, cardiomiocitos, células musculares, osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células endoteliales vasculares, fibroblastos o células cancerosas tales como células de mieloma, células HeLa, células CHO y células COS. La fusión  
30 celular de estas células puede realizarse entre diferentes tipos de células, por ejemplo, inmunocitos y células cancerosas. Además, la composición liofilizada de la presente invención puede usarse para la sustitución o fusión nuclear entre micronúcleos y las células diana.

En la presente invención, cuando las células diana se fusionan, la densidad celular es de  $1 \times 10^4$  células/ml a  $1 \times 10^{10}$  células/ml, preferiblemente de  $1 \times 10^6$  células/ml a  $1 \times 10^8$  células/ml, y la concentración de Ca es de 0,1 a 10 mM, preferiblemente de 1 a 5 mM.

A continuación, la presente invención se describirá en referencia a Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos específicos son simples realizaciones que ilustran y no definen ni restringen en absoluto el alcance de la invención descrito en la presente solicitud. Debe entenderse que la presente invención abarca diversas realizaciones basadas en el concepto  
40 descrito en la solicitud.

## EJEMPLOS

### (EJEMPLO 1)

120 μl de una envuelta de VHJ inactivada, GenomOne (marca registrada, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.) (DO: 0,25, cantidad: 6000 Unidades de Hemaglutinación) se colocaron en viales y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30  
45 minutos, y los sobrenadantes se retiraron. Los precipitados resultantes se lavaron suspendiéndolos en 40 μl de agua destilada, centrifugando las suspensiones de nuevo a 10.000 rpm durante 30 minutos y retirando los sobrenadantes. Los precipitados se suspendieron en 60 μl de una solución de polipeptona al 0,2% en agua destilada (Muestra 1, y en lo sucesivo en este documento se realizarán referencias similares), una solución de manitol al 0,2% en agua destilada (Muestra 2), una solución de metilcelulosa al 0,2% en agua destilada (Muestra 3) o una solución de trehalosa al 0,2% en  
50 agua destilada (Muestra 4), y las suspensiones se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido.

Las Muestras congeladas 1 a 4 se liofilizaron en un vacío de, como máximo, 0,1 mm de Hg a una temperatura de la trampa de, como máximo, -70°C durante 5 horas en un desecador de vacío con control de la temperatura empapándolo en un baño refrigerador ajustado a -15°C. Se realizó un secado secundario durante otra hora a una temperatura más alta del baño de refrigeración de 4°C. Se introdujo nitrógeno líquido en la cámara de vacío para romper el vacío, y a  
55 continuación, los viales se sellaron. De este modo, se obtuvieron muestras de composiciones liofilizadas.

Las muestras liofilizadas en ausencia de metilcelulosa o trehalosa formaron nubes, probablemente de forma electrostática, después de sellar o abrir los viales, y debían ser manejadas cuidadosamente. La adición de metilcelulosa

o trehalosa suprimió dicha pulverización.

(EJEMPLO 2)

5 A partir de porciones de 120 µl de GenomOne (marca registrada, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.) (DO: 0,25, cantidad: 6000 Unidades de Hemaglutinación), se prepararon precipitados de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los precipitados se suspendieron en 60 µl de una solución de polipeptona al 0,5% en agua destilada (Muestra 5, y en lo sucesivo en este documento se realizarán referencias similares), una solución de polipeptona al 0,5% y metilcelulosa al 0,1% en agua destilada (Muestra 6), una solución de polipeptona al 1,0% y metilcelulosa al 0,1% en agua destilada (Muestra 7), una solución de polipeptona al 1,5% y metilcelulosa al 0,1% en agua destilada (Muestra 8) o una solución de polipeptona al 2,5% y metilcelulosa al 0,1% en agua destilada (Muestra 9), y las suspensiones se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido.

10

A partir de la etapa posterior, se siguió el Ejemplo 1 para obtener las Muestras 5 a 9 de composiciones liofilizadas.

(EJEMPLO 3)

15 A partir de porciones de 120 µl de GenomOne (marca registrada, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd.) (DO: 0,25, cantidad: 6000 Unidades de Hemaglutinación), se prepararon precipitados de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los precipitados se suspendieron en 60 µl de una solución de polipeptona al 1,0% en agua destilada (Muestra 10, y en lo sucesivo en este documento se realizarán referencias similares), una solución de bactopectona al 1,0% en agua destilada (Muestra 11), una solución de bactotripton a al 1,0% en agua destilada (Muestra 12), un hidrolizado ácido de caseína al 1,0% en agua destilada (Muestra 13), una solución de L-leucina al 0,3% en agua destilada (Muestra 14), una solución de β-alanina al 1,0% en agua destilada (Muestra 15), un monoclóhidrato de L-arginina al 0,3% en agua destilada (Muestra 16) o una solución de ácido L-aspártico al 1,0% en agua destilada (Muestra 17), conteniendo cada una metilcelulosa al 0,1%, y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. A partir de la etapa posterior, se siguió el Ejemplo 1 para obtener las Muestras 10-17 de composiciones liofilizadas.

20

(EJEMPLO 4) (Preparación de pCMV-GL3)

25 El ADN plasmídico del vector pGL3-CONTROL VECTOR (Promega Co.) que codifica una proteína luciferasa de luciérnaga modificada se escindió con Hind III y Xba I y se sometió a electroforesis (agarosa al 1%), y el fragmento que contenía luciferasa se aisló por medio del sistema de extracción Gel-M Extraction System (VIOGENE Inc.). Análogamente, el vector PcDNA 3.1(+) que contenía el promotor de CMV (Invitrogene Co.) se escindió, y se aisló un fragmento que contenía la región del promotor de CMV. Los dos fragmentos se ligaron por medio del kit DNA Ligation Kit (TaKaRa Bio Inc.) y se transformaron en E. coli (DH5α) (45°C, 45 minutos). Se seleccionaron las células resistentes a ampicilina que contenían el ADN plasmídico de pCMV-GL3 que expresaban luciferasa bajo el control del promotor del CMV.

30

Las células seleccionadas se incubaron en medio LB (que contenía ampicilina), y el cultivo celular se purificó por medio del kit EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAGEN Inc.). El producto de purificación se disolvió en tampón TE para dar una solución de pCMV-GL3/TE.

35

(EJEMPLO 5) (Transferencia de genes convencional)

40 Cada una de las Muestras 1 a 17 de composiciones liofilizadas obtenidas en los Ejemplos 1 a 3 se dispersó en 120 µl de un tampón (PBS(-)), y se dispensaron 20 µl de cada dispersión en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 10.000 durante 5 minutos. Los sobrenadantes se retiraron, y los precipitados se suspendieron en 5 µl de PBS(-). Después de la adición de 5 µl de 4 µg/µl de pGL3/TE y 1 µl de Triton X-100/PBS(-) al 2%, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 durante 5 minutos. Los sobrenadantes se retiraron, y los precipitados se suspendieron en 15 µl de PBS(-). Después de la adición de 2,5 µl de 10 mg/ml de sulfato de protamina/PBS(-), las suspensiones se añadieron a un cultivo de células HeLa S3 (placa de 24 pocillos, 6x10<sup>4</sup> células/placa, 0,5 ml de DMEM, FCS al 10%), y el cultivo celular se incubó a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 horas.

40

45 Después incubación, el medio de cultivo se retiró, y se añadieron 100 µl de PBS(-). Se añadieron 100 µl de Solución de Sustrato Liofilizada de un kit de ensayo de luciferasa LucLite (Perkin Elmer Inc.) para lisar las células, y las actividades de luciferasa (intensidades de fluorescencia) se midieron por medio del lector de fluorescencia/luminiscencia/absorbancia multi-función GENios (TECAN). Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 1.

45

50 (EJEMPLO 6) (Preparación de composiciones liofilizadas de una envuelta de virus VHJ inactivada que tiene actividad de fusión de membrana)

Para la preparación de una envuelta de virus VHJ inactivada que se usará, se siguieron los procedimientos en el Ejemplo 1(1) y el Ejemplo 7(1) a (4) del documento WO03/014338 hasta que se obtuvo la suspensión de la envuelta de VHJ inactivada después del intercambio de tampón. En pocas palabras, se hizo proliferar a VHJ en huevos de gallina fertilizados, se inactivó mediante tratamiento con β-propiolactona, a continuación se pretrataron (filtración), se

50

5 concentraron y se sometieron a cromatografía en columna (Q Sepharose FF) para recoger 10 l de una fracción de columna que contenía la envuelta de VHJ inactivada. La fracción de columna se concentró a 100 ml a través de un módulo de filtro de flujo tangencial (FFT). Se combinaron 100 ml del concentrado con 100 ml de un tampón (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM) y se concentraron adicionalmente a 100 ml. Esta operación (intercambio de tampón) se realizó dos veces.

10 La suspensión de la envuelta de VHJ inactivada obtenida después del intercambio de tampón se diluyó con agua esterilizada a 500 ml y se concentró a 100 ml a través del módulo de FFT. La dilución con agua esterilizada y la concentración con FFT se repitieron cinco veces para obtener 60 ml de un concentrado. Al concentrado, se le añadieron 25 ml de una solución acuosa esterilizada que contenía polipeptona al 4,0% y metilcelulosa al 0,4%. La concentración de la suspensión de envuelta de VHJ inactivada resultante que contenía estabilizantes correspondía a una DO de 0,6. Después de la concentración, la concentración de tampón se había reducido a 0,03 mM o menos. La suspensión se dispersó en alícuotas de 65 µl en tubos con tapón de rosca de 1,5 ml y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. La suspensión de envuelta de VHJ inactivada congelada se liofilizó en un vacío de, como máximo, 0,1 mm de Hg a una temperatura de la trampa de, como máximo, -70°C durante 15 horas en una cámara de vacío ajustada a -15°C. Se realizó un secado secundario durante otra hora a una mayor temperatura de la cámara de vacío de 4°C. Se introdujo nitrógeno líquido en la cámara de vacío para romper el vacío, y los tubos se sellaron.

#### (EJEMPLO 7) Transferencia de genes mediante rehidratación

20 La composición liofilizada de la envuelta de VHJ inactivada (producto liofilizado) obtenida en el Ejemplo 6 se dispersó en 30 µl de solución a 4 µg/µl de pCMV-GL3/TE, 120 µl de solución a 1 µg/µl de pGL3/TE o 480 µl de solución a 0,25 µg/µl de pGL3/TE preparada de acuerdo con el Ejemplo 4 y que se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. Se añadieron 450 µl o 360 µl de un tampón (PBS(-)) a un volumen total de 480 µl, y se añadieron los 15 µl de 10 mg/ml de sulfato de protamina/PBS(-). Las soluciones resultantes se inocularon en alícuotas de 40 µl en un cultivo de células CHO-K1 (Células de ovario de hámster chino, ATCC N° CCL-61, adquiridas de Daiinippon Pharmaceutical Co., Ltd.) en una placa de 24 pocillos (2,5x10<sup>4</sup> células/pocillo, F12 de Ham + FCS al 10% 0,5 ml/pocillo, incubadas a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante una noche) y se incubaron a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 horas.

El medio de cultivo se retiró, y se añadieron 125 µl de PBS(+). Las células se lisaron con 125 µl Solución de Sustrato de un kit de ensayo de luciferasa LucLite (Perkin Elmer Inc.). Las actividades de luciferasa (intensidades de fluorescencia) en 50 µl de los lisados celulares se midieron por medio de un contador MICROPLATE SCINTILLATION & LUMINESCENCE COUNTER, Topcount (PACKARD).

30 Para comparar, se realizó un experimento con un vector de envuelta de VHJ inactivada preparado mediante un método convencional usando un tensioactivo. 40 µl de una suspensión de envuelta de VHJ inactivada (denominada como un producto convencional) de acuerdo con el Ejemplo 1(1) y el Ejemplo 7(1) a (5) del documento WO03/013348 (equivalente en cantidad a 1/3 de la envuelta de VHJ inactivada en el producto liofilizado obtenido en el Ejemplo 6) se colocaron en un microtubos de 1,5 ml y se centrifugaron a 10.000 durante 5 minutos.

35 El sobrenadante se retiró, y el precipitado se suspendió con 10 µl de PBS(-). Después de la adición de 10 µl de 4 µg/µl de pCMV-GL3/TE y 2 µl de Triton X-100/PBS(-) al 2%, la suspensión se centrifugó a 10.000 durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró, y el precipitado se suspendió con 30 µl de PBS(-), y a continuación se mezcló con 5 µl de 10 mg/ml de sulfato de protamina/PBS(-). Se inocularon 8 µl de la suspensión resultante en un cultivo de células CHO-K1 y se incubaron durante 24 horas. A continuación, la actividad de luciferasa se midió como se ha descrito anteriormente.

40 Los resultados se muestran en la Tabla 2 (promedios por triplicado). Las composiciones liofilizadas de la presente invención (denominadas como productos liofilizados en la Tabla 2) dispersadas en una solución de un gen extraño, transferían el gen extraño aproximadamente con 10 veces más eficacia que la envuelta de VHJ inactivada tratada con tensioactivo que encapsula al gen extraño preparada mediante un método convencional (denominada como producto convencional en la Tabla 2).

45 (EJEMPLO 8) (Preparación de una composición liofilizada de una envuelta de VHJ inactivada que tiene actividad de fusión de membrana)

50 Para la preparación de una envuelta de virus VHJ inactivada que se usará, se siguieron los procedimientos en el Ejemplo 1(1) y el Ejemplo 7(1) a (4) del documento WO03/014338 hasta que se obtuvo la suspensión de envuelta de VHJ inactivada después del intercambio de tampón. En pocas palabras, se hizo proliferar a VHJ en huevos de gallina fertilizados, se inactivaron mediante tratamiento con β-propiolactona, y a continuación se pretrataron (filtración), se concentraron y se sometieron a cromatografía en columna (Q Sepharose FF) para recoger 5 l de una fracción de columna que contenía la envuelta de VHJ inactivada. La fracción de columna se concentró a 200 ml a través de un módulo de filtro de flujo tangencial (FFT). 200 ml del concentrado se combinaron con 200 ml de un tampón (Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM) y se concentraron adicionalmente a 200 ml. Esta operación (intercambio de tampón) se realizó dos veces, y la suspensión resultante se filtró usando un filtro MILLIPAK 200 (0,45 µm, Millipore Co.).

55 La suspensión de envuelta de VHJ inactivada obtenida después del intercambio de tampón se diluyó con agua esterilizada a 600 ml y se concentró a 200 ml a través del módulo de FFT. La dilución con agua esterilizada y la

concentración con FFT se repitieron ocho veces para obtener 100 ml de un concentrado. Al concentrado, se le añadieron 26 ml de una solución acuosa esterilizada que contenía polipeptona al 5,0% y metilcelulosa al 0,5%. La concentración de la suspensión de envuelta de VHJ inactivada resultante que contenía estabilizantes correspondía a una DO de 0,6. Después de la concentración, la concentración de tampón se había reducido a 0,03 mM o menos. La suspensión se dispersó en alícuotas de 210 µl en tubos con tapón de rosca de 1,5 ml y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. La suspensión de envuelta de VHJ inactivada congelada se liofilizó en un vacío de, como máximo, 0,1 mm de Hg a una temperatura de la trampa de, como máximo, -70°C durante 15 horas en una cámara de vacío ajustada a -5°C. Se realizó un secado secundario durante otra hora a una mayor temperatura de la cámara de vacío de 5°C. Se introdujo nitrógeno líquido en la cámara de vacío para romper el vacío, y los tubos se sellaron.

#### 10 (EJEMPLO 9) (Ensayo de fusión celular)

Se ensayaron las actividades de fusión celular de una suspensión de envuelta de VHJ inactivada preparada a partir de la composición liofilizada de la presente invención obtenida de acuerdo con el Ejemplo 8 y, como ejemplo comparativo, una envuelta de VHJ inactivada crioconservada obtenida de acuerdo con el Ejemplo 1 del documento WO03/013348. Las actividades de fusión celular se ensayaron de acuerdo con el documento de K. Hiraoka et al. (The Journal of Immunology, vol. 173, págs. 4297-4307). Concretamente, una línea celular de riñón de cría de hámster sirio BHK-21 (adquirida de Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) teñida con un kit de tinción fluorescente PKH26 (SIGMA-Aldrich Inc., N° PKH-26-GL, fluorescencia roja) o PKH67 (SIGMA-Aldrich Inc., N° PKH-67-GL, fluorescencia verde) se suspendió en un tampón de fusión celular (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 137 mM, KCl 5,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM) a 8x10<sup>6</sup> células/ml. 25 µl de las suspensiones de células teñidas con ambos tintes se mezclaron en un microtubos de 2 ml. La mezcla resultante se mezcló con 3 µl de suspensiones de envuelta de VHJ inactivada a concentraciones dadas (DO 560 nm) en un tampón (PBS(-)), se le dejó reposar en hielo durante 5 minutos y se incubó en un termostato a 37°C durante 15 minutos (volteando una vez a intervalos de 5 minutos) para inducir la fusión celular. Posteriormente, se añadieron 300 µl de tampón PBS(+) enfriado con hielo que contenía BSA al 1%, y se midió la proporción de células doble positivas que emitían fluorescencia tanto roja como verde por medio de un citómetro de flujo (FACSCalibur<sup>TM</sup>, Becton Dickinson). Para la medición del fondo, se realizó un ensayo similar usando un grupo de control tratado de la misma manera excepto que se añadió un tampón (PBS(-)) en lugar de la suspensión de envuelta inactivada, y los valores medidos se corrigieron para los grupos respectivos. La eficacia de fusión se calculó a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{Eficacia de fusión (\%)} = \frac{(\text{el número de células doble positivas en un grupo tratado}) / (\text{el número total de células en un grupo tratado}) \times 100 - (\text{el número de células doble positivas en el grupo de control}) / (\text{el número total de células en el grupo de control}) \times 100}{100}$$

Los resultados se muestran en la Tabla 3 (los valores medidos con dos lotes se promediaron tanto para la composición liofilizada de la presente invención como para el ejemplo comparativo). La composición liofilizada de la presente invención mostraba una mayor eficacia de fusión que el ejemplo comparativo.

[Tabla 1]

Muestra	Estabilizante		Actividad luciferasa (TOP COUNT)
	Hidrolizado de proteína o aminoácido	Sacárido	
1	polipeptona al 0,2%	-	10568
2	-	manitol al 0,2%	1337
3	-	metilcelulosa al 0,2%	5421
4	-	trehalosa al 0,2%	3762
5	polipeptona al 0,5%	-	8629
6	polipeptona al 0,5%	metilcelulosa al 0,1%	9820
7	polipeptona al 0,1%	metilcelulosa al 0,1%	15248
8	polipeptona al 1,5%	metilcelulosa al 0,1%	6065
9	polipeptona al 2,5%	metilcelulosa al 0,1%	4562
10	polipeptona al 1,0%	metilcelulosa al 0,1%	9810
11	bactopeptona al 1,0%	metilcelulosa al 0,1%	11075
12	bactotriptona al 1,0%	metilcelulosa al 0,1%	4529
13	hidrolizado ácido de caseína al 1,0%	metilcelulosa al 0,1%	8254
14	L-leucina al 0,3%	metilcelulosa al 0,1%	6620
15	β-alanina al 1,0%	metilcelulosa al 0,1%	1819
16	monoclorhidrato de L-arginina al 0,3%	metilcelulosa al 0,1%	8086
17	ácido L-aspártico al 1,0%	metilcelulosa al 0,1%	2049

[Tabla 2]

Envuelta de VHJ usada en el ensayo de transferencia de genes	En el momento del contacto con el ADN			ADN ( $\mu\text{g}$ ) introducido en células cultivadas por pocillo	Actividad de luciferasa (Intensidad de fluorescencia: TOP COUNT)	Desviación típica
	Concentración de envuelta de VHJ inactivada (DO)	Concentración de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Volumen de la mezcla ( $\mu\text{l}$ )			
Producto liofilizado	1,3	4	30	9,69	132733	9488
Producto liofilizado	0,325	1	120	9,69	94584	11288
Producto liofilizado	0,082	0,25	480	9,69	83233	3978
Producto convencional	0,59	1,8	22	9,14	11365	12704

[Tabla 3]

	Eficacia de fusión		
	Concentración (DO) de suspensión de envuelta de VHJ inactivada		
	0,20	0,10	0,05
La composición de la presente invención	10,1%	15,4%	13,2%
Ejemplo Comparativo	9,0%	2,7%	3,2%

## 5 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La composición liofilizada de una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana de la presente invención es almacenable a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$  o menos), fácil de manejar y está libre de restricciones sobre el lugar de uso o el transporte. Además, el método de introducción de una materia extraña de la presente invención mejora drásticamente la eficacia de transferencia, es más fácil y tiene aplicaciones generalizadas tales como análisis de alto rendimiento.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para preparar una composición liofilizada que comprende una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana, y al menos un estabilizante seleccionado entre el grupo constituido por un hidrolizado de proteína, leucina y un polisacárido, que comprende
- 5 (1) una etapa de mezclar una suspensión de la envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana y el estabilizante y
- (2) una etapa de liofilizar la mezcla obtenida en la etapa (1), en la que
- (a) la concentración del hidrolizado de proteína, o leucina en la mezcla obtenida en la etapa (1) es del 0,1 al 2,5% y
- 10 (b) la concentración del polisacárido en la mezcla obtenida en la etapa (1) es del 0,05 al 0,5%.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la envuelta viral inactivada es una envuelta viral inactivada de un virus de *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae* o *Flaviviridae*.
3. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el estabilizante es un hidrolizado de proteína y un polisacárido.
- 15 4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de la envuelta viral inactivada en la mezcla obtenida en la etapa (1) corresponde a una DO de 0,1 a 7,0.
5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la concentración de sal en la mezcla obtenida en la etapa (1) es de, como máximo, 3 mM.
6. Una composición liofilizada preparada de acuerdo con el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 7. Un método de introducción de una materia extraña en una célula o un organismo vivo, que comprende:
- (a) una etapa de rehidratar una composición liofilizada, como se define en la reivindicación 6, que contiene una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana con una mezcla que comprende la materia extraña y agua, y
- (b) una etapa de poner a la composición obtenida en la etapa (a) en contacto con la célula o el organismo vivo.
- 25 8. Un método de fusión celular, que comprende:
- (i) etapa de rehidratar una composición liofilizada, como se define en la reivindicación 6, que contiene una envuelta viral inactivada que tiene actividad de fusión de membrana; y
- (ii) etapa de mezclar la composición obtenida en la etapa (i) con una suspensión de células a fusionar.