



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No.

04-23044

54. TITULO

COMPUESTOS DE LIPOSOMAS CON MICROESFERA DE GAS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K 49/22

71. SOLICITANTE

BRISTOL - MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY

DOMICILIO

PRINCETON, NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

RAMIRO CASTRO DUQUE

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

PETITORIO

AS: 93.369

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

04 023044 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 04023044 00000000

Folios: 106

Fecha (AMB): 2004-03-12 16:58:52

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención.		☐ Patente de Modelo de Utilidad.	
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: BRISTOL - MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY Dirección: P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos Lugar de Constitución: Estados Unidos Teléfono: Fax: E-mail:		IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: RAMIRO CASTRO DUQUE Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9 Teléfono: 380-2200 Fax: 380-2700 E-mail:		IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número <u>170.322 TP_1003</u>
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: Alan P. Carpenter, Jr., Gregory C. Slack Dirección: 73 Cranberry Hill Lane, Carlisle, MA 01741, US; 124 Wheeler Road, Hollis, NH 03049, Estados Unidos de América (Respectivamente) Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América (Respectivamente)		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US01/25685</u> Fecha <u>16-08-2001</u> Publicación Internacional No. <u>WO 03/015831 A1</u> Fecha <u>27-02-2003</u>			
6 Título (54): <u>COMPUESTOS DE LIPOSOMAS CON MICROESFERA DE GAS</u>			
7 Clasificación Internacional (51) <u>A61K 49/22</u>			
8 Prioridad SI ☐ NO ☐	(33) País de Origen _____	(32) Fecha _____	(31) Número de Solicitud _____
9 Comprobante de pago No. <u>04-4-135</u> Fecha <u>11-03-2004</u>			

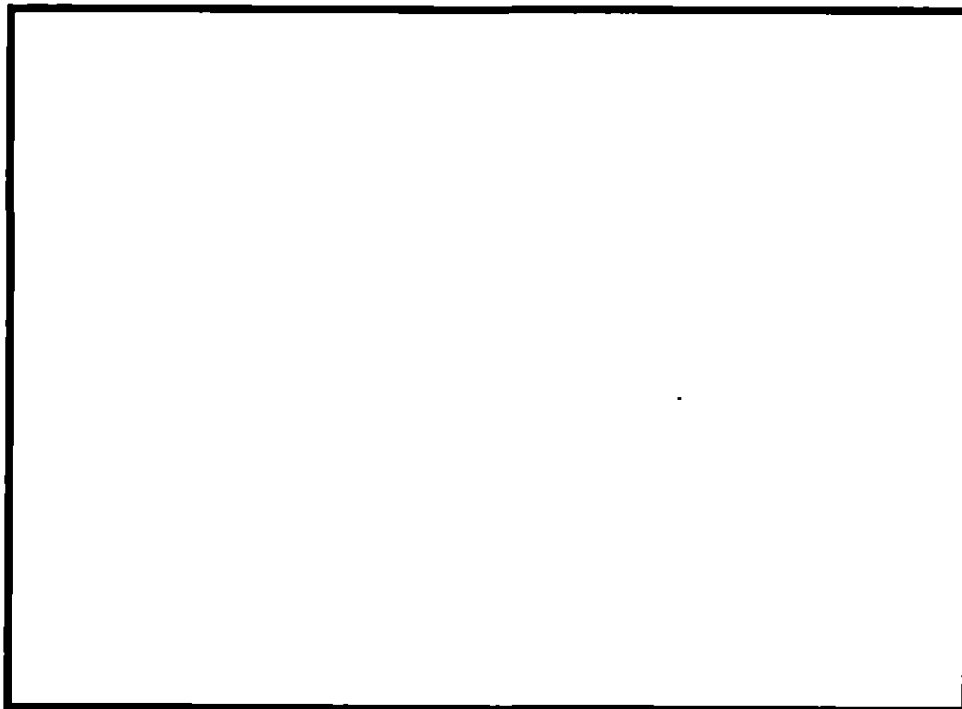
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$422.000
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso. Protocolo No. 19338
- ☐ 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 - Tarjeta de Propietarios

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: RAMIRO CASTRO DUQUE

FIRMA:

[Handwritten signature]

C.C. 170.322 de Bogotá T.P. 1003 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

3

HIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 04023044 00000000 Folios: 106
Fecha (HNB): 2004-02-12 16:54:32
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 4,133
FECHA : ENERO 20 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	21589772	20/01/2004	12,762,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
	TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

AS: 03369 (7)

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/015831 A1

(51) International Patent Classification⁷: A61K 49/22.
41/00

(21) International Application Number: PCT/US01/25685

(22) International Filing Date: 16 August 2001 (16.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(71) Applicant: BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA
COMPANY [US/US]: CHESTNUT RUN PLAZA, 974
CENTRE ROAD, WILMINGTON, DE 19805 (US).

(72) Inventors: CARPENTER, JR., Alan, P.: 73 Cranberry
Hill Lane, Carlisle, MA 01741 (US). SLACK, Gregory,
C.: 124 Wheeler Road, Hollis, NH 03049 (US).

(74) Agent: DOLAN, Peter, L.: Bristol-Myers Squibb Pharma
Company, Patent Department, P.O. Box 4000treet, Prince-
ton, NJ 08543-4000 (US).

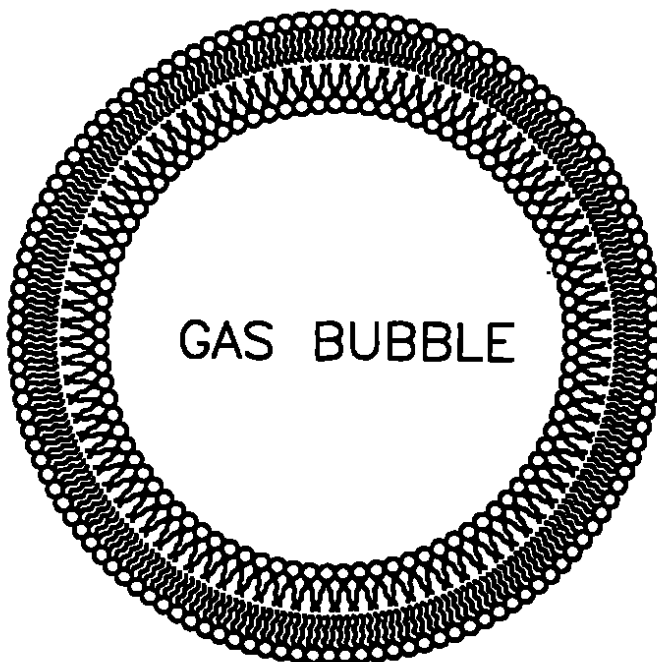
(81) Designated States (*national*): AL, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CQ, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: GAS MICROSPHERE LIPOSOME COMPOSITES



(57) Abstract: Formulations comprising a gas microsphere liposome composite suspended in a medium, wherein the gas micro-
sphere liposome composite comprises: a gas-filled microsphere; at least one of a lipid and a surfactant adsorbed onto the surface of
the gas-filled microsphere; and liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant are described. Methods of preparing the
same and using them in ultrasound imaging are also described. The present invention also comprises use of the same in treating heart
disease, inflammation, infection, cancer or thromboembolic disease in a patient

WO 03/015831 A1

45

GAS MICROSPHERE LIPOSOME COMPOSITES**FIELD OF THE INVENTION**

The present invention provides a formulation that includes a gas microsphere liposome composite (MSLC) suspended in a medium. The gas microsphere liposome composite includes a gas-filled microsphere; at least one of a lipid and a surfactant adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere; and liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant. The outer surface of the liquid-filled liposomes can incorporate a targeting ligand (i.e., diagnostic agent targeting moiety) for directed delivery of the MSLCs for selective imaging of receptors, enzymes, mRNA and other relevant biological targets. Additionally, the liquid-filled liposomes can include one or more drugs (e.g., therapeutic agents and/or diagnostic agents) in the internal volume of the liquid-filled liposomes. As such, the therapeutic agent or diagnostic agent can be selectively delivered to an organ or site of pathology for localized delivery. Accelerated drug release can be stimulated by the application of acoustic energy at the site of pathology where the targeted MSLCs bind, thereby providing locally high concentrations of therapeutic agent or diagnostic agent in a selective fashion.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Ultrasound imaging is useful for imaging structures in the body of a patient (e.g., mammal) so as to aid in diagnosis and therapy. During ultrasound imaging, an ultrasonic scanner can be used to generate and receive sound waves. The ultrasonic scanner is placed on the body surface overlying the area to be imaged, and the sound waves generated by the scanner are directed toward the area to be imaged. The scanner then detects sound waves reflected from the underlying area and translates the data into images. The acoustic

* 6

properties (e.g., density) of each structure in the body will typically depend upon the velocity of the transmissions and the density of the structure. Changes in acoustic properties will be most prominent at the interface between different substances (i.e., at the interface between solids, liquids and gases). Thus, when ultrasonic energy is directed at an area that includes interfaces between different substances, the different acoustic properties of the substances will cause different reflection characteristics. Because the quality of the resulting ultrasound image is enhanced by having an interface between different structures, it would be useful to increase the difference in acoustic properties between different structures and to enhance the quality of the image generated during ultrasound imaging.

One method that can affect the quality of ultrasound imaging is the introduction of contrast agents into the vasculature of the body to act as ultrasound contrast agents. When the contrast agents are injected into and perfuse the microvasculature, clearer images may be produced. The agents act as sound wave reflectors, effectively enhancing the interface between the vasculature and other structures.

Liquid and solid contrast agents containing entrapped gas are well known in the art. See, e.g., U.S. Patent No. 4,235,871; U.S. Patent No. 4,265,251; U.S. Patent No. 4,442,843; U.S. Patent No. 4,533,254; U.S. Patent No. 4,572,203; U.S. Patent No. 4,657,756; U.S. Patent No. 4,681,199; U.S. Patent No. 5,088,499; U.S. Patent No. 5,147,631; U.S. Patent No. 5,228,446; U.S. Patent No. 5,271,928; U.S. Patent No. 5,380,519; U.S. Patent No. 5,413,774; U.S. Patent No. 5,527,521; U.S. Patent No. 5,531,980; U.S. Patent No. 5,547,656; U.S. Patent No. 5,558,094; U.S. Patent No. 5,573,751; U.S. Patent No. 5,585,112; U.S. Patent No. 5,620,689; U.S. Patent No. 5,715,824; U.S. Patent No. 5,769,080; EP 0 122 624; EP 0 727 225; WO 96/40285; and WO 99/65467. The microbubbles provided by these contrast agents act as sound wave reflectors due to the acoustic differences between the gas microbubble and surrounding liquid.

Feinstein, U.S. Pat. No. 4,572,203, discloses "microbubbles" of about 6-20 microns in diameter, produced by sonication of certain viscous solutions, for use as ultrasound contrast agents. Feinstein also discloses solid or semi-solid metal-containing

7
2

microparticles, such as glass or graphite, not containing trapped air, small enough to pass through capillaries, as ultrasound contrast agents. Also disclosed are microspheres formed from an amino acid polymer matrix, such as albumin, with magnetic particles, such as magnetite (Fe_3O_4) embedded therein.

Tickner, U.S. Pat. No. 4,265,251, discloses the use of certain saccharide composition "microbubble" particles with a hollow gas-filled interior space as ultrasound enhancing agents.

Rasor et al., U.S. Pat. No. 4,442,843, U.S. Pat. No. 4,657,756, and U.S. Pat. No. 4,681,119, illustrate aggregates of microparticles (of 1-50 micron diameter) of a solid material, which are soluble in blood, containing gas in the voids between the particles, or with gas adsorbed on the surface of the particle, or containing gas as an integral part of the internal structure of the particle, for use in ultrasound imaging. The following solid materials are used: various saccharides, NaCl, sodium citrate, sodium acetate, sodium tartrate, CaCl_2 and AlCl_3 .

Hilman et al., EP0122624, contains microparticles that include a solid surface-active substance, including various organic lipophilic compounds, with enclosed air, for use as ultrasound contrast agents. Also disclosed is the combination of particles of the surface-active material and particles of a non-surface active material, such as sodium chloride, sodium citrate, sodium acetate, sodium tartrate, and various saccharides.

Glajch et al, U.S. Patent No. 5,147,631, discloses porous particles of an inorganic material that include an entrapped gas or liquid. The materials disclosed include monomeric or polymeric borates, monomeric or polymeric aluminas, monomeric or polymeric carbonates, monomeric or polymeric silicas, monomeric or polymeric phosphates; and pharmaceutically acceptable organic or inorganic cationic salts thereof.

Unger disclosed perfluorocarbon gas-filled microspheres (U.S. Patent No. 5,547,656 and U.S. Patent No. 5,527,521) for diagnostic imaging purposes and gas-filled and gaseous-precursor-filled liposome compositions, or methods for making or using these contrast agents (U.S. Patent No. 5,228,446, U.S. Patent No. 5,585,112, U.S. Patent No.

5,769,080 and U.S. Patent No. 5,715,824)) for general and diagnostic ultrasound imaging purposes.

Unger, U.S. Patent No. 5,088,499, discloses the preparation of gas filled liposomes and their use as ultrasound contrast agents. These include materials that contain gases, gaseous precursors, which can be activated by pH, temperature, or pressure, and other solid and liquid contrast agents.

In the case of the materials disclosed by Unger herein above, the liposomal membrane of the encapsulated gas bubble is described as the well-known unilamellar or multi-lamellar head-to-tail structure of amphiphilic lipid membranes such as phospholipids (see, Figure 1). As such, the Unger compositions are classical liposomes in which the liquid-filled interior is replaced by a gas.

Quay has disclosed methods of use of free gas microbubbles of low Q-factor (low diffusivity) as ultrasound contrast agents (U.S. Patent No. 5,573,751 and U.S. Patent No. 5,558,094). In these cases Quay discloses free gas microbubbles of various low diffusivity gases, without any disclosure of structure or composition of these microbubbles.

Schneider, U.S. Patent No. 5,271,928, U.S. Patent No. 5,380,519 and U.S. Patent No. 5,531,980, disclosed microbubble suspensions, which are hollow spheres or globules of finely divided gas and are stabilized by tensides or surfactants.

In the case of Schneider microbubble patents ('928, '519 and '980), the ultrasound contrast agent is disclosed as being composed of microbubbles devoid of a material boundary layer around the gas microbubble. According to Schneider, these microbubbles "are only bounded by an evanescent envelope"(U.S. Patent No. 5,531,980, column 1).

The Schneider microbubble disclosures described above ('928, '519 and '980) are directed to methods of making microbubble-based ultrasound contrast agents without reference to preferred composition/structure of the microbubbles themselves.

Schneider, U.S. Patent No. 5,413,774, discloses microvesicles having a liposomal material boundary layer, which further contain within the vesicle a low solubility gas, as the microsphere-based ultrasound contrast agents. However, no description of the

109

composition or structure of the microballoons is provided; rather, methods of making a contrast agent based on these microvesicles or microballoons is described utilizing selected low solubility gases.

The contrast agents described above are proposed for general ultrasound contrast imaging of the vasculature and especially for heart imaging.

The imaging of specific organs, systems, or other areas of the body, would be useful for diagnosing a variety of specific disease states. Examples of this include the specific imaging of tumors, blood clots, and areas of infection in a directed manner. Quay, et al., European Patent Application EP727225 illustrates the use of compositions including a cell adhesion molecule (CAM) ligand which is incorporated into a desired molecule to form a conjugate. The CAM is incorporated in a surfactant or albumin carrier and also comprises a chemical with sufficiently high vapor pressure to be a gas at body temperature.

Unger (WO 96/40285) describes targeted gas-containing liposomes which can be targeted to specific tissues in the body for diagnostic imaging or for delivery of bioactive agents. These targeted materials are comprised of a gas, lipid and targeting ligand.

All of these materials include a suspension or emulsion of gas microspheres (alternatively referred to as microbubbles) which are either: 1) free microbubbles (i.e., do not have a fixed material envelope at the microbubble surface) stabilized by surfactants in solution which cause a reduction in surface tension at the gas-liquid interface, or 2) true vesicles with a material boundary layer which stabilizes the gas microspheres as a suspension in the liquid medium. One of the practical difficulties with all of these materials is that gas microbubbles in the relevant, acoustically-active, size range of $\sim 0.5\mu\text{m}$ to $10\mu\text{m}$ in diameter, have a density different from that of the aqueous media in which they are suspended. Therefore, these microspheres have a natural tendency to rapidly separate out (i.e., the microbubble suspensions become heterogenous). This necessitates the rapid use of the contrast material after mixing before separation of the microspheres occurs.

In the case of gas microspheres used as platforms for drug delivery (see, Unger WO 96/40285 and Quay EP0727225), the materials incorporate the therapeutic moiety at the

10

surface of the gas microsphere through chemical or physical absorption on the boundary layer of lipid or polymer. The practical difficulty with these materials is that limited quantities of the therapeutic agent may be absorbed or bound to the surface material surrounding the gas microsphere.

Allen et al. (U.S. Pat No. 5,620,689) disclose a method of treating a neoplasm of B-cells or T-cells utilizing a liposome encapsulated chemotherapeutic agent with a biodirecting group on the surface of the liposome attached via a polyethylene glycol coating on the liposome. See et al., WO 99/65467, disclose a method of making drug filled liposomes of less than 200nm in diameter. These disclosures are representative of a large class of similar liposome drug delivery disclosures in the literature, all of which comprise liquid-filled liposomes alone without a gas microsphere component in the form of the MSLC compositions provided herein.

Notwithstanding the use of such contrast agents described above, the ultrasound image produced, for example, of the myocardial tissue, can be of relatively poor quality, highly variable and not quantifiable. The overall diagnostic results to date have been somewhat disappointing. As such, the need still exists for improved agents useful in ultrasound imaging which will enhance the quality of ultrasound images by improving the contrast between the vascular spaces and tissues in a body. Such contrast agents should have excellent and stable acoustic response properties when in dilute aqueous suspensions. Additionally, the contrast agents should exhibit minimal microsphere flotation and separation.

There has been, and continues to be, a need for ultrasound imaging agents which enhance the quality and clarity of ultrasound images by improving the delineation of vascular space and tissues in the human body. In addition, improvements in the control of drug delivery to the sites of pathology are needed for many drugs which exhibit high toxicity to normal tissues and a resultant poor therapeutic index.

X 11

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a formulation for contrast enhancement of ultrasound imaging and for ultrasound (i.e., acoustically) stimulated drug release. The formulation provides stable gas microsphere (i.e., finely divided gas bubbles) suspensions with excellent and stable acoustic response properties when in dilute aqueous suspensions. The formulation can deliver a higher level of active drug per gas-filled microsphere to a given tissue, relative to known formulations, thereby achieving the intended therapeutic benefit of high local concentrations of drug or gene in the region of pathology. The formulation has good ultrasound scattering properties, which causes a selective increase in the ultrasound backscatter signal within the vascular space. The increase in the ultrasound backscatter signal within the vascular space improves the contrast relative to the surrounding solid tissue. Additionally, the formulation exhibits minimal microsphere flotation and separation.

The present invention provides a formulation that includes a gas microsphere liposome composite (MSLC) suspended in a medium. The gas microsphere liposome composite includes a gas-filled microsphere; at least one of a lipid and a surfactant adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere; and liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant.

The present invention also provides a method of ultrasound imaging in a patient (e.g., mammal) in need of such ultrasound imaging. The method includes administering to the patient (e.g., mammal) an effective amount of a formulation of the present invention; allowing a sufficient period of time for the circulation of the gas-filled microsphere composite to reach the targeted area; and performing ultrasound imaging on the patient (e.g., mammal).

The present invention also provides a method of treating heart disease, inflammation, infection, cancer or thromboembolic disease in a patient (e.g., mammal) in need of such treatment. The method includes administering to the patient (e.g., mammal) an effective amount of a formulation of the present invention, wherein one or more of the liquid-filled liposomes independently includes a therapeutic agent; allowing a sufficient period of

12

time for the circulation of the gas microsphere composite to the targeted area; and applying ultrasound energy to the targeted area in the patient (e.g., mammal) sufficient to cause the therapeutic agent to be released from the microsphere liposome composite at the region of pathology.

The present invention also provides a method for preparing a formulation of the present invention. The method includes contacting a suspension of liposomes in a aqueous solution including at least one of a surfactant and a lipid; and mixing the suspension with a gas that has a solubility of less than about 1.0% (v/v) in water at 25°C and 1 atm, sufficient to provide the formulation.

The present invention also provides a method for preparing a formulation of the present invention. The method includes contacting a suspension of liposomes in a aqueous solution including at least one therapeutic agent and at least one surfactant or lipid; and mixing the aqueous liposome suspension with a gas that has a solubility of less than about 1.0% (v/v) in water at 25°C and 1 atm, sufficient to provide the formulation.

The present invention also provides a kit for the preparation of a formulation of the present invention. The kit includes a container that includes an aqueous solution, wherein the aqueous solution includes at least one of a surfactant and a lipid, and liquid-filled liposomes; and a means for introducing a gas that has a solubility of less than about 1.0% (v/v) in water at 25°C and 1 atm into the aqueous solution.

The present invention also provides the use of a formulation of the present invention for the manufacture of a medicament for treating heart disease, inflammation, infection, cancer or thromboembolic disease in a patient (e.g., mammal) in need of such treatment. The formulation includes a gas microsphere liposome composite suspended in a medium, wherein the gas microsphere liposome composite includes: a gas-filled microsphere; at least one of a lipid and a surfactant adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere; and liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant.

The present invention also provides the use of a formulation of the present invention for the manufacture of a medicament for ultrasound imaging in a patient (e.g.,

13

mammal) in need of such ultrasound imaging. The formulation includes a gas microsphere liposome composite suspended in a medium, wherein the gas microsphere liposome composite includes: a gas-filled microsphere; at least one of a lipid and a surfactant adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere; and liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant.

The present invention also provides the use of a formulation of the present invention for the manufacture of a medicament for diagnostic imaging in a patient (e.g., mammal) in need of such diagnostic imaging. The formulation includes a gas microsphere liposome composite suspended in a medium, wherein the gas microsphere liposome composite includes: a gas-filled microsphere; at least one of a lipid and a surfactant adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere; and liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1 illustrates a gas-filled liposome.

FIG. 2 illustrates a monolayer gas microsphere liposome composite (MSLC) of the present invention.

FIG. 3 illustrates a multilayer gas microsphere liposome composite (MSLC) of the present invention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Referring to Figures 2 and 3, the present invention provides a gas microsphere liposome composite (MSLC) (1) dispersed in an aqueous medium (2). The gas microsphere liposome composite (MSLC) (1) includes of a gas-filled microsphere (3) of a suitable inert gas (4). A lipid (5) and/or surfactant (6) is adsorbed on the surface (12) of the gas-filled microsphere (3). Liquid-filled liposomes (LFLs) (7) are attached to the lipid (5) and/or surfactant (6). The LFLs (7) can include a therapeutic agent (8) or diagnostic agent (9) in the liquid interior (10) of the LFLs (7). In addition, a targeting moiety (11) can be attached to the surface (13) of the LFLs (7).

14

As used herein, "gas microsphere liposome composite (MSLC)" (1) refers to a gas-filled microsphere (3) having at least one of a lipid (5) and a surfactant (6) adsorbed onto the outer surface (12) of the gas-filled microsphere (3) and also having liquid-filled liposomes (7) attached to the lipid (5) or surfactant (6).

As used herein, "surfactant" (6) refers to any material, ionic or non-ionic, which produces a reduction in interfacial tension in a solution. The term surfactant (6) includes both amphiphilic molecules less than about 1,000 molecular weight and polymers which are capable of reducing interfacial tension between a gas-filled microsphere (3) and the surrounding aqueous medium (2).

As used herein, "liquid filled liposome (LFL)" (7) refers to liposomes that contain a liquid interior (10) (i.e., a liquid in the internal volume). The liquid filled liposomes (7) can be unilamellar (14), bilamellar (15), or multilamellar (16). The liquid filled liposomes (7) are typically attached to the adsorbed liquid or surfactant (6) in a continuous fashion. Each of the liquid filled liposomes (7) can independently contain a therapeutic agent (8) or diagnostic agent (9) in the liquid interior (10) of the liquid filled liposome (7). Additionally, each of the liquid filled liposomes (7) can independently contain a high affinity, targeting moiety (11) attached to the surface (13) of the liquid filled liposome (7).

As used herein, "continuous" or "contiguous", with respect to the liquid-filled liposomes (7) attached to the lipid (5) or surfactant (6) coated gas-filled microsphere (3) surface, refers to a significant portion (e.g., at least about 50%) of the outer surface (12) of the gas-filled microsphere (3) being covered with liquid-filled liposomes (7).

As used herein, "targeting moiety", refers to a biocompatible organic molecule, biocompatible inorganic molecule, protein, peptide, peptidomimetic, polysaccharide or other molecule having a high affinity for a receptor, enzyme, mRNA or DNA. The biocompatible organic molecule, biocompatible inorganic molecule, protein, peptide, peptidomimetic, polysaccharide or other molecule is altered in its expression at a site of pathology *in-vivo* relative to the surrounding normal tissue. Additionally, this targeting moiety is principally bound or attached to the surface of the liquid-filled liposomes (7).

15
X

As used herein, "high affinity" refers to a binding affinity of less than about $1\mu\text{m}$ when expressed as the dissociation constant, K_d , for the interaction of a single targeting moiety and the biological target (e.g., receptor, enzyme, mRNA, or DNA).

As used herein, "patient" refers to one who is suffering from a given disease or disorder and is in need of treatment for the specified disease or disorder. Suitable patients include, e.g., animals. Suitable animals include, e.g., mammals. Suitable mammals include, e.g., humans.

As used herein, "treating" or "treatment" refers to the treatment of a disease or disorder in a patient and includes: (i) preventing the disease or disorder from occurring in a patient, in particular when such patient is predisposed to the disease or disorder but has not yet been diagnosed as having it; (ii) inhibiting the disease or disorder, i.e., arresting its development; and/or (iii) relieving the disease or disorder, i.e., causing the regression of the disease or disorder.

Gas-Filled Microsphere

As used herein, a "gas-filled microsphere" is a microbubble suspended in a medium wherein the microbubble has a nominal spherical shape above about the freezing point of the medium and below about the boiling point of the medium and above about 0 atm pressure and below about 5 atm pressure (e.g., standard temperature and pressure).

As illustrated in Figure 2 and Figure 3, the gas microsphere liposome composite (1) (MSLC) includes a gas-filled microsphere (3). The gas-filled microsphere (3) is typically acoustically active. The gas-filled microsphere (3) typically has a solubility of less than about 1.0% (v/v) in water at 25°C and 1 atm. Additionally, the gas-filled microsphere (3) typically has an average diameter of about $0.1\mu\text{m}$ to about $10\mu\text{m}$. Preferably, the gas-filled microsphere (3) will have an average diameter of about $0.5\mu\text{m}$ to about $10\mu\text{m}$.

The gas-filled microsphere (3) will typically include one or more suitable inert gases (4). Suitable inert gases (4) of the present invention are well known in the field of ultrasound contrast agents. Suitable inert gases (4) useful in the present invention are

17/16

disclosed, e.g., in Unger, et al., (U.S. Patent No. 5,547,656; U.S. Patent No. 5,527,521; U.S. Patent No. 5,228,446; U.S. Patent No. 5,585,112; U.S. Patent No. 5,769,080; and U.S. Patent No. 5,715,824), Quay, et al., (U.S. Patent No. 5,573,751 and U.S. Patent No. 5,558,094) and Schneider (U.S. Patent No. 5,271,928; U.S. Patent No. 5,380,519; and U.S. Patent No. 5,531,980). These may include both gases and gaseous precursors (i.e., liquids which undergo a transition to the gas phase under reduced pressure or elevated temperature). Preferred inert gases (4) are of low solubility in blood, are non-reactive, non-metabolizable and/or are non-toxic in patients (e.g., mammals). Suitable inert gases (4) useful in the present invention include, e.g., perfluorocarbon gases (e.g. (C₂-C₆) perfluorocarbons), perfluoroether gases, Nitrogen, and noble gases (e.g., Helium, Argon, and Neon).

Gas Microsphere Liposome Composite (MSLC)

The gas microsphere liposome composite (1) includes a gas-filled microsphere (3); at least one of a lipid (5) and a surfactant (6) adsorbed onto the outer surface (12) of the gas-filled microsphere (3); and liquid-filled liposomes (7) attached to the lipid (5) or surfactant (6). The gas microsphere liposome composite (1) (MSLC) will typically have a mean diameter of about 0.1 μm to about 10 μm . Preferably, the gas microsphere liposome composite (1) will have a mean diameter of about 0.2 μm to about 4 μm . The gas microsphere liposome composite (1) will typically have a density of about 0.90 to about 1.10 of the density of the medium (2). The gas microsphere liposome composite (1) (MSLC) can exist as an aggregate of two or more gas microsphere liposome composites (1). The aggregate will typically have a diameter of about 1 μm to about 100 μm .

Lipid and Surfactant

As illustrated in Figure 2 and Figure 3, the gas microsphere liposome composite (MSLC) (1) includes at least one of a lipid (5) and surfactant (6) adsorbed onto the outer surface (12) of the gas-filled microsphere (3). The lipid (5) or surfactant (6) can exist as a mono-molecular layer, a bi-molecular layer, or a multi-molecular layer on the outer surface

17
2
X

(12) of the gas-filled microsphere (3). The surfactant (6) rapidly adsorbs to the outer surface (12) of the gas-filled microspheres (3) and thereby reduces the surface tension of the low solubility inert gas (4) or gases. Additionally, the surfactant (6) acts as an interface to which the LFLs (7) may adhere.

The surfactant (6) can be any suitable non-ionic surfactant, cationic surfactant, or anionic surfactant. Suitable non-ionic surfactants include, e.g., polyethylene glycol, polypropylene glycol, polyvinylpyrrolidone, polyvinylalcohol, cellulose, gelatin, xanthan gum, pectin, and dextran. Suitable cationic surfactants include, e.g., tetraalkyl ammonium, tetraalkyl phosphonium, or suitable salts thereof. Suitable cationic surfactants include, e.g., tetrahexyl ammonium, tetradecyl ammonium, tetrabutyl ammonium, tetrahexyl phosphonium, tetradecyl phosphonium, tetrabutyl phosphonium, tetraphenyl phosphonium, and suitable salts thereof. Suitable anionic surfactants include, e.g., alkyl sulfonate, alkyl carboxylate, and suitable salts thereof. Suitable anionic surfactants include, e.g., dodecyl sulfate, palmityl sulfate, dodecyl carboxylate, palmityl carboxylate, and suitable salts thereof.

Suitable lipids (5) include, e.g., phospholipids, glycolipids, triglycerides and fatty acids. Suitable phospholipids include, e.g., dipalmitoylphosphatidyl choline chloride, dimyristoylphosphatidyl choline, dilauryoylphosphatidyl choline, and dioleoylphosphatidyl choline.

Liquid-Filled Liposomes (LFLs)

As illustrated in Figure 2 and Figure 3, the gas microsphere liposome composite (1) (MSLC) includes liquid-filled liposomes (7) (LFLs) attached to the lipid (5) or surfactant (6). The presence of liquid-filled liposomes (7) stabilizes the surfactant-encapsulated or lipid-encapsulated gas-filled microsphere (3). One or more of the liquid-filled liposomes (7) will typically include liquid from the medium of suspension (2) (i.e., medium (2)). Preferably, each of the liquid-filled liposomes (7) will typically include liquid from the medium of suspension (2). The presence of liquid from the medium of suspension (2) in the liquid interior (10) (e.g., the internal volume) of the liquid-filled liposomes (7)

18
X

provides for microsphere compositions that have densities which are close (e.g., within about 20%) to that of the medium of suspension (2), thereby minimizing microsphere flotation and/or separation.

The LFLs (7) can contain one or more drugs (e.g., therapeutic agents (8) and/or diagnostic agents (9)) in the liquid-filled internal volume. Because the LFLs (7) are attached to the surfactant-coated or lipid-coated gas-filled microsphere (3), the LFLs (7) can burst upon ultrasound stimulation of the internal gas thereby releasing the one or more drugs (e.g., therapeutic agents (8) and/or diagnostic agents (9)) in a diseased organ or tissue. The liquid-filled liposomes (7), however, have limited acoustic activity by themselves.

The LFLs (7) attach and stabilize the surfactant-encapsulated or lipid-encapsulated gas-filled microsphere (3). This provides for MSLCs (1) which have densities that are close (e.g., within about 20%) to that of the medium of suspension (2), thereby minimizing gas microsphere flotation and/or separation. This also provides for gas microsphere suspensions that are relatively uniform in size distribution (e.g., about 1 μm to about 5 μm) over a reasonable period of time after preparation (e.g., up to about 30 minutes).

The liquid-filled liposomes (7) typically occupy greater than about 50% of the microsphere surface area. The liquid-filled liposomes (7) are also typically attached to the adsorbed lipid (5) or surfactant (6) in an essentially continuous fashion. This orientation provides outstanding buoyancy properties for the MSLCs (1), which provides relatively stable suspensions with excellent and reproducible acoustic response properties when in dilute aqueous suspensions.

The size of the LFLs (7) is relatively important. The liquid-filled liposomes (7) should preferably have diameters that are less than about 10% of the diameter of the gas-filled microsphere (3) diameter. The range of greatest interest for most *in vivo* ultrasound imaging or drug delivery agents are MSLCs (1) that have an overall diameter between about 1 μm and about 5 μm , and are made from liquid-filled liposomes (7) of less than 100nm in diameter. Larger liquid-filled liposomes (7) (e.g., greater than about 0.2 μm in diameter) create MSLCs (1) of overall diameter which exceed the diameter of the capillary vessels in

19
28

the body. This would create a hazardous situation with respect to capillary plugging, as well as the consequent biological toxicity associated with blocking the microcirculation of blood to tissues. Therefore, it is highly preferred to utilize LFLs (7) of less than about 100nm in diameter to create MSLCs (1) of the proper dimensions for safe use in living patients (e.g., mammals). Each of the liquid-filled liposomes (7) typically have a diameter of about 10nm to about 200nm. Preferably, each of the liquid-filled liposomes (7) will have a diameter of about 20nm to about 100nm. In addition, each of the liquid-filled liposomes (7) will typically have a diameter that is less than about 10% of the diameter of the gas-filled microsphere (3).

As illustrated in Figure 2 and Figure 3, one or more of the LFLs (7) may include one or more suitable drugs (e.g., therapeutic agents (9) and/or diagnostic agents (9)) in the liquid-filled internal volume. Each of the liquid-filled liposomes (7) may independently include one or more drugs (e.g., therapeutic agents (8) and/or diagnostic agents (9)) in the liquid interior (10) of the liquid-filled liposomes (7). The LFLs (7), when attached to the surfactant-coated or lipid-coated gas-filled microsphere (3) surface, can be burst upon ultrasound stimulation and release the one or more therapeutic drugs (e.g., therapeutic agents (8)) in a diseased organ or tissue in a localized and concentrated fashion. High energy ultrasound is generally capable of causing the gas-filled microsphere (3) to expand and contract rapidly, which eventually leads to gas bubble rupture. The ultrasound energy captured by the gas-filled microsphere (3) will cause the MSLC (1) to fragment and rupture, in turn, releasing the one or more drugs (e.g., therapeutic agents (8)) contained in the interior of the LFLs (7) attached to the surface of the MSLC (1).

Suitable classes of therapeutic agents (8) include, e.g., anticoagulants, thrombolytics, antineoplastic agents, and anti-inflammatory agents. Suitable specific therapeutic agents (8) are disclosed, e.g., in (PCT/US99/13682), and include, e.g., doxorubicin, cyclophosphamide, adriamycin, methotrexate, gemcitabine, navelbine, cisplatin, tissue plasminogen activator, integrilin, roxifiban, methotrexate and enbrel. In a preferred embodiment of the present invention for ultrasound stimulated drug release, the MSLCs (1) include both high affinity targeting moieties (11) and therapeutic drugs (e.g., therapeutic

2/20

agents (8)) in the solution of the LFLs (7), in order to maximize the therapeutic index and the quantity of drug delivered per gas microbubble.

Suitable classes of diagnostic agents (9) include, e.g., X-ray contrast agents and MRI contrast agents. Suitable specific diagnostic agents (9) include, e.g., non-ionic iodinated X-ray contrast agents, ionic iodinated X-ray contrast agents, gadolinium containing MRI contrast agents, iron containing MRI contrast agents, and manganese containing MRI contrast agents.

The use of diagnostic agents (9) in the LFLs will allow both ultrasound image enhancement (e.g., back scatter) and X-ray or MRI image enhancement to be achieved with one MSLC composition.

For targeted delivery of one or more drugs (e.g., therapeutic agents (8) and/or diagnostic agents (9)) to a selected pathological condition, the LFLs (7) of the present invention can be derivatized with a high affinity, targeting moiety (11) that is covalently linked or adsorbed onto the surface (13) of the LFLs (7). As such, the liquid-filled liposomes (7) may typically have one or more suitable high affinity, targeting moieties (11) attached to the surface (13) of the liquid-filled liposomes (7). This provides LFLs (7) that are capable of providing ultrasound contrast enhancement to sites of pathology *in vivo*. This is accomplished by providing ligands on the LFLs (7) that have high affinity for receptors, enzymes, mRNA, or DNA which are overexpressed or altered in dysfunctional cells at sites of diseases. Alternatively, these targeting moieties (11) attached to the LFLs (7) can bind to normal tissue receptors for the selective imaging of normal tissues, in contrast to the absence of acoustic enhancement of the adjacent diseased tissue which lacks the receptor being targeted by the LFLs (7). One or more of the LFLs (7) may include, in the interior liquid medium (10), one or more suitable diagnostic agent (9) from the medium of suspension (2).

Suitable high affinity targeting moieties (11) which can be incorporated onto the surface (13) of the LFLs (7) for directing the MSLC (1) to specific sites of pathology have been disclosed previously. See, e.g., Unger (PCT/US96/09938), Allen (U.S. Patent No. 5,620,689) and Quay (EP 0727225), which provide many examples of the biological targeting

221

moieties that can be incorporated into surfactant (6) or lipid (5) components of directed ultrasound imaging agents or drug delivery compositions. Among these are tumor specific antibodies, receptor-specific peptides and peptidomimetics such as cell adhesion molecules and the like.

Suitable specific targeting moieties (11) include, e.g., 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoate; DPPE-PEG₃₄₀₀-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoate; 1-(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamino)- α,ω -dicarbonyl PEG₃₄₀₀-2-([7-(N-hydroxycarbamoyl)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]carbonylamino)-N-(3-aminopropyl)acetamide; and 1-(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamino)- α,ω -dicarbonyl PEG₃₄₀₀-[7-(N-hydroxycarbamoyl)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]-N-([4-(aminomethyl)phenyl]methyl)carboxamide.

The liquid-filled liposomes (7) used in the present invention are well known in the art. Among the preferred materials for making liposomes for use in the present invention are phospholipids which can be cationic, anionic or zwitterionic in nature, and may be used in admixtures. Many sources exist on the composition and preparation of liposomes. For example, see New (R.R.C. New, editor, Liposomes, a practical approach, Oxford University Press, Oxford, UK, 1990), Tyrrell ("New Aspects of Liposomes", D. A. Tyrrell, T. D. Heath, C. M. Colley & B. E. Ryman, Biochimica & Biophysica Acta, 457 (1976), 259-302), Schneider (US Patent No. 4,224,179), Woodle (MC Woodle and D. Papahadjopoulos, Methods in Enzymology 171, 193, 1989). In particular, Papahadjopoulos (US Patent No 4,235,871) has described methods for forming LFLs including therapeutic agents.

Control of MSLC Mean Size Distribution and Stability

The size and stability of the MSLCs can be controlled through several parameters, e.g., concentration of the lipid in solution; the diameter of the LFLs; the

2/28

molecular weight of the polymer surfactant, e.g., polyethylene glycol (PEG), included in the composition; and the concentration of the polymer used.

1. The concentration of the phospholipids in solution

Varying the lipid concentration will control the size distribution and stability of the liquid filled liposome and, this in turn, will adjust the size of the MSLC which is formed and stabilized in suspension. The mean size of the stabilized MSLCs in suspension is directly proportional to the concentration and size of the initial LFLs. Since the number and size of the LFLs is dependent on the amount of lipid (e.g., phospholipid) available, the initial lipid concentration will directly effect the number and size of the MSLC distribution which is stabilized in suspension.

2. The diameter of the LFL

Independent of the lipid (e.g., phospholipid) concentration, the size of the MSLCs in suspension can be varied by changing the LFL size through physical means. The LFL size can be varied by methods such as extrusion or ultrasonication, which are well-known in the science of liposomes (see, e.g., R.R.C. New, editor, Liposomes, a practical approach, Oxford University Press, Oxford, UK, 1990). As described previously, the variation of LFL size will result in varying MSLCs size distributions (i.e., smaller LFLs in the size range of less than about 100nm will produce smaller MSLCs in the range of less than about 10 μ m).

3. The molecular weight of surfactant used in the composition

The molecular weight of polymeric surfactant (ionic or non-ionic) in the preparation can be used to affect the mean diameter of the MSLCs formed. For example, a higher molecular weight of polyethylene glycol (PEG), either covalently bound to other components/lipids of the composition or added as free PEG in solution, can be used to stabilize larger sized gaseous microbubble-containing MSLCs once gas is introduced into the

23
2/2

system. For example, by varying the molecular weight of the PEG from 500 to 10,000, the MSLC diameter can be adjusted.

4. Concentration of the polymer

The size of the MSLC can be controlled by changing the concentration of the polymer surfactant in the liposomal suspension. An increase in polymer concentration in the composition typically results in an increase in the mean size and/or concentration of the MSLCs in suspension.

Preparation of Gas Microsphere Liposome Composites

The gas microsphere liposome composites (MSLCs) described herein can be prepared by mixing a gas of low aqueous solubility with an aqueous solution containing a surfactant and liquid-filled liposomes in suspension. This can be accomplished by mechanical mixing, ultrasonication or high velocity injection of the gas into the liquid containing the surfactant and LFLs.

To form the initial LFLs, phospholipids can be suspended in a bulk aqueous solution, which can further include a surface active material, as well as non-aqueous components, such as glycerol or propylene glycol, or suspending aids such as polysaccharides, proteins or synthetic polymers, provided such components are parenterally acceptable (i.e., non-toxic). Methods for preparing the LFLs used in the current invention for preparation of MSLCs have been described previously by Woodle (M.C. Woodle and D. Papahadjopoulos, Methods in Enzymology 171, 193, 1989).

If biotargeting of the MSLC is desired, then the LFLs can have a high affinity targeting moiety covalently bound or adsorbed to the surface of the liquid-filled liposome. The targeting moieties can be adsorbed to the surface of the MSLC or, more preferably, covalently attached to the LFL as a phospholipid ester or attached to a PEG component of the MSLC (see Allen U.S. Patent No. 5,620,689). In the case of MSLCs for ultrasound stimulated drug release, the LFLs can be prepared to include a therapeutic agent in the interior

1/24

liquid volume of the liposomes by preparing the liposomes in a surfactant-containing, aqueous medium including the drug, followed by mixing or sonicating the medium with a suitable inert gas.

The control of the LFL diameter in the size range of less than about 100nm is important for forming and stabilizing MSLCs of the desired size range (e.g., greater than about 0.5 μm and less than about 10 μm in diameter) for ultrasound imaging and ultrasound-stimulated drug release. Methods for controlling the size of LFLs have been described in the literature (see, e.g., R.R.C. New, editor, Liposomes, a practical approach, Oxford University Press, Oxford, UK, 1990, pp. 36-85). Microfluidization techniques for making LFLs of the desired size are particularly effective as described in Cook, et al., (U.S. Patent No. 4,533,254).

Proof of Structure

To demonstrate the existence of this novel structure (termed gas microsphere liposome composite (MSLC)), the liposome system described in Example 1 was prepared and analyzed using four techniques, Optical Microscopy, Transmission Electron Microscopy, Fluorescence Probing and Soft X-ray Microscopy. These techniques provide information on the macrostructure (greater than about 1 μm in size), microstructure (10 nm to ~1000nm), and the microenvironment of the chemical system (at the molecular level).

Optical Microscopy

Optical Microscopy allows the determination of the size and shape of an object in the micron range. Therefore, a MSLC composition with a diameter in the range of about 1 to about 10 μm is visible using a 1000X microscope, and will have a magnified size of about 1 to about 10 mm in diameter. Optical Microscopy was performed to show that the MSLCs are spherical in shape, and are present in the size range of about 1 to about 10 μm in diameter.

After preparation of the MSLC suspension (for example, as described in Example 1), about 0.5 mL is slowly withdrawn from the vial using a syringe (B-D 5 cc

625

syringe and precision guide 22 1/2 G needle; 0.70 mm x 40 mm). The sample was placed on a Hanging Drop slide (18 mm diameter; 0.5 mm deep) and covered with a cover slide. Then a drop of microscope oil was placed on the cover slide. The sample was examined with an Olympus BHA-P Microscope equipped with 10X eyepiece and Oil Immersion Achromatic 100X Objective, which gave an overall magnification of 1000X. The resulting picture showed spherical objects that range in size from less than 1 μm to greater than 10 μm . The gas filled MSLCs of greater than approximately 2 μm in diameter appear to be aggregates of the smaller-sized primary MSLC units.

Electron Microscopy

The presence of the LFLs on the surface of the MSLCs was demonstrated using transmission electron microscopy (TEM). Transmission electron microscopy uses an electron beam to illuminate a specimen. The electron beam is operated at high vacuum, and can magnify up to a 1,000,000X. Both the high vacuum and the electron beam can be damaging to the systems being studied. Therefore, in order for many samples to be examined, they must be thin, dry and usually contain a contrast stain.

One technique for examining liposome structures is negative staining. Negative staining enhances the image of a structure by surrounding or embedding the specimen in an electron dense material. The sample is examined under TEM using Phosphotungstic acid (PTA) as the stain, before mixing of the gas and aqueous system containing the surfactant-liposome mixture as well as after mixing to demonstrate formation of the MSLC.

For the surfactant-LFL system prior to mixing with the gas (the "unactivated" sample), six drops of the preactivated system were added to 1 ml of 0.3% PTA stain and shaken gently. The mixture was left to stand for 5 minutes undisturbed, and then one drop of the mixture was applied to the grid plate. The grid was air dried on a piece of filter paper for 30 minutes, before it was transferred to the grid carrying case for the TEM study.

H26
2

For the MSLC sample (after mixing with the gas) one drop was added to 1 mL of 0.3% PTA stain and mixed gently. Then a drop of the solution was applied to the grid. The excess solution was removed by wicking and air-drying.

TEM pictures show that the composition, prior to mixing with a perfluorocarbon gas, contains liposomes of about 50nm to about 100nm. The TEM pictures of the post-mixing MSLC suspension (after mixing with a perfluorocarbon gas) show MSLCs of about 300 nm to about 1000nm, which include a gas-filled microsphere void with a lipid or surfactant shell having liposome units of about 50nm to about 100nm along the surface.

Fluorescence Analysis

Fluorescent probe experiments were used to study the general chemical properties of a liposome system. A fluorescent probe is a fluorophore, typically pyrene, that localizes within a specific region of a liposome and responds to a photon of energy by producing a fluorescence emission. This emission can be used to determine the microenvironment (micropolarity) and localized concentration of the fluorophore in the system.

For this experiment, pyrene was injected into vials of control medium (solution without surfactant or liquid-filled liposomes), vials of surfactant and liquid-filled liposomes (prior to mixing with a perfluorocarbon gas) and into vials containing MSLCs in suspension (after high speed mixing of the composition with perfluoropropane) to compare the pyrene fluorescence spectra. The control medium that was used consisted of a mixture of 80% sodium chloride solution (9% NaCl), 10% propylene glycol and 10% glycerol. The MSLC suspension was prepared as described in Example 1.

The results of the study showed that the microenvironmental polarity of pyrene in the control medium was consistent with the pyrene being dissolved in a purely aqueous environment. The microenvironment polarity of the pyrene in the surfactant/liquid-filled liposome system (prior to gas mixing) was consistent with the pyrene being dissolved in the lipid membrane of the LFLs. Following high speed mechanical mixing of the

27

perfluorocarbon gas with the surfactant/liquid-filled liposome system the local concentration of the pyrene was shown to increase in a manner consistent with the presence of a liposome aggregate system as such as the MSLC structure observed in the TEM experiment.

Soft X-ray Microscopy

Soft X-rays are X-rays with an energy of about 100 to about 1000 eV. These energies are well matched to K shell absorption edges of low Z atoms like carbon and oxygen, or L shell edges of atoms like calcium. The wavelength of these X-rays is in the 1 to 10 nm range, whereas those of visible light are 350-700 nm. This makes very high resolution imaging possible. Soft X-ray microscopy provides high resolution while avoiding sample destruction: the X-rays have negligible effects on the sample.

MSLC suspensions were studied using this Soft X-ray microscopy technique. The sample was prepared between two silicon nitride membranes. The membranes have a thickness of 100nm and a size of 3mm x 3mm in a 9mm x 9mm silicon frame of 200 microns thickness. After mounting one membrane on each side of the wet cell, a syringe was used to put a very small droplet (less than about 5 μ L, but not a defined volume) of the MSLC material on one of the membranes. For these experiments there is no dilution or pretreatment of the sample. Next, the two parts of the wet cell were placed together and tightened with screws. The layer thickness of the sample between the two membranes was checked with a visible light microscope. If the layer thickness was not appropriate the screws were adjusted to obtain the right thickness. A small droplet of water was placed into the reservoir slot of the wet cell to prevent evaporation of the sample. The reservoir slot was sealed with a small piece of tape and then the wet cell was mounted in the microscope.

The results from the Soft X-ray microscopy showed that the system after high speed mixing with perfluoropropane gas contained MSLCs of about 300nm to about 500nm having liquid-filled liposome units of about 50nm to about 100nm along essentially the entire boundary surface.

The MSLCs can be used as general purpose ultrasound contrast agents for diagnostic ultrasound use. They can also be modified to contain biological targeting moieties bound or adsorbed to the liquid filled liposomes on the surface of the MSLC to provide selective localization of the MSLCs in the body. Biologically-targeted MSLCs are useful for targeted contrast ultrasound imaging of specific disease processes. In addition, these biologically-targeted MSLCs can be used for localized delivery of drugs, which are encapsulated within the liquid-filled liposomes and are released upon exposure of the MSLCs to ultrasound energy *in vivo*.

The formulation may be administered intravenously or intraperitoneally by infusion or injection. Solutions of the formulation can be prepared in water, optionally mixed with a nontoxic surfactant. Dispersions can also be prepared in aqueous solutions containing glycerol, liquid polyethylene glycols, or other suitable parenteral diluents.

The pharmaceutical dosage forms suitable for injection or infusion can include sterile aqueous solutions or dispersions or sterile powders comprising the formulation which are adapted for the extemporaneous preparation of sterile injectable or infusible solutions or dispersions, optionally encapsulated in liposomes. In all cases, the ultimate dosage form should be sterile, fluid and stable under the conditions of manufacture and storage. The liquid carrier or vehicle is a pharmaceutically acceptable diluent such as a mixture of water, ethanol, a polyol (for example, glycerol, propylene glycol, liquid polyethylene glycols), and the like. The proper fluidity can be maintained, for example, by the formation of liposomes, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions or by the use of surfactants. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, buffers or sodium chloride. Prolonged suspension of the injectable compositions can be brought about by the use of agents such as gelatin, cellulose, polyvinyl pyrrolidone or similar suspension aids.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the required ingredients enumerated above, followed by filter sterilization. When employing sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of

29
b
H

preparation are vacuum drying and the freeze drying techniques, which yield a powder of the active ingredient(s) plus any additional desired ingredient present in the previously sterile-filtered solutions.

The microsphere liposome composites (MSLCs) are injected into a patient or human as a suspension containing approximately 10^3 to 10^9 microsphere liposome composites in a principally aqueous medium. After allowing sufficient time for the MSLCs to circulate throughout the body, an ultrasound imaging machine (such as is routinely used in clinical practice) is used to image or (with higher energies or repeated insonation pulses) disrupt the MSLCs to release a therapeutic drug at the site of disease or in an organ of interest, e.g., the heart, or in tumors, or at sites of inflammation.

The ability of a formulation of the invention to act as a contrast imaging agent can be determined using pharmacological models which are well known in the field. For example, see Villanueva et al. (Villanueva, F.S., Glasheen, W.P., Sklenar, J., Kaul, S. Circulation, 88, 596-604 (1993)).

The ability of a formulation of the invention to act as a therapeutic agent can be determined using pharmacological models which are well known in the field. For example, see Unger (PCT/US961/09938) (WO96/40285).

The invention will now be illustrated by the following non-limiting Examples.

Preparation of General Purpose Diagnostic MSLC Contrast Agent

Example 1

A saline glycerol solution (100 ml) was prepared including glycerol (10 ml) and NaCl (680 ± 2 mg) in water (to a final volume of 100 ml). DPPC (dipalmitoyl phosphatidyl choline) (40.0 mg), MPEG500 DPPE (dipalmitoyl phosphatidyl ethanolamine) (30.0 mg), and DPPA (4.5 mg) were mixed with propylene glycol (10 ml) in a 100 ml volumetric flask, which was placed in a hot water bath (70°C) and sonicated for 15 minutes until the solution cleared. The saline/glycerol solution was then added to bring the mixture to final volume of 100 ml, and the suspension was mixed well. The suspension (1.6 ml) was

30
23

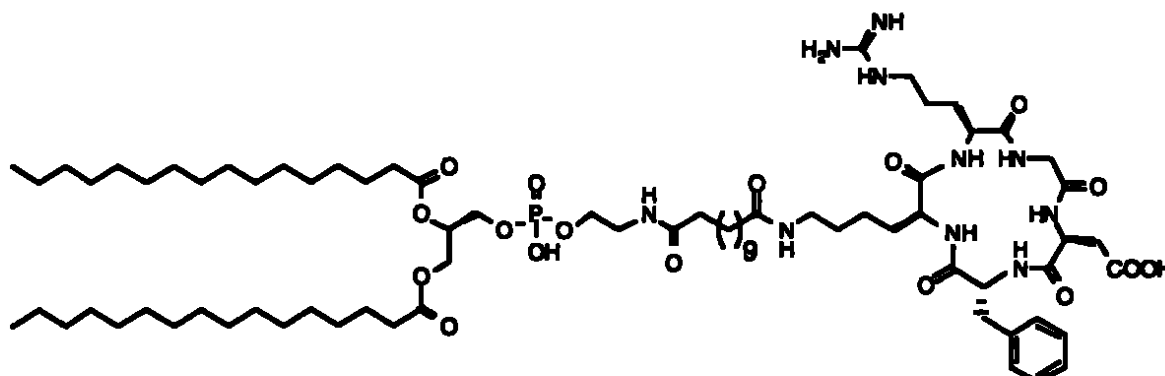
transferred into a 2 ml borosilicate glass vial. The headspace was purged with perfluoropropane gas, and the vial was stoppered and sealed. The stopper was West Gray V 50 lyo 13 mm, 4416/50 elastomeric formulation. The seal was a flip off aluminum seal. The vial containing the lipid suspension was shaken for 45 seconds using the IONOS Ionomix®. After shaking, the suspension became milky white.

Preparation of Biologically-Targeted Diagnostic MSLC Material

Examples 2 and 3 describe the synthesis of ultrasound contrast agents of the present invention comprising targeting moieties for tumor neovasculature that are $\alpha v \beta 3$ antagonists.

Example 2

Part A. Synthesis of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-Dodecanoate Conjugate



Disuccinimidyl dodecanoate (0.424 g, 1 mmol); 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE) (1.489 g, 1 mmol); and cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) TFA salt (0.831 g, 1 mmol) (see U.S. Serial No. 09/281,474 for synthesis of this cyclic peptide targeting moiety, which method is herein incorporated by reference) are dissolved in chloroform (25 ml) while stirring (5 min). Sodium carbonate (1 mmol) and sodium sulfate (1

31

mmol) are added and the solution is stirred at room temperature under nitrogen (18 h).

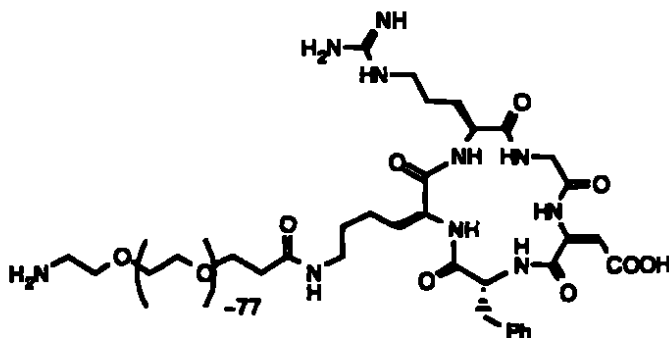
Chloroform is removed *in vacuo* and the title compound is purified from the crude product mixture by preparative HPLC or recrystallization.

Part B. Preparation of Contrast Agent Composition

The 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoate conjugate is mixed with three other lipids--1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphotidic acid; 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine; and N-(methoxypolyethylene glycol 5000 carbamoyl)-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine--in relative amounts of 2 : 4 : 54 : 40 by weight. An aqueous suspension containing this lipid mixture (1 mg/mL), sodium chloride (7 mg/mL), glycerin (0.1 mL/mL), and propylene glycol (0.1 mL/mL), at pH 6-7, is then prepared in a 2 cc glass vial. The air in the vial is evacuated and replaced with perfluoropropane, and the vial is sealed. The suspension is agitated in the sealed vial in a dental amalgamator for 30-45 sec. to form a milky white solution, which is suitable for use as an ultrasound contrast agent for imaging angiogenic vessels.

Example 3

Part A. Preparation of ω -amino-PEG₃₄₀₀-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys):

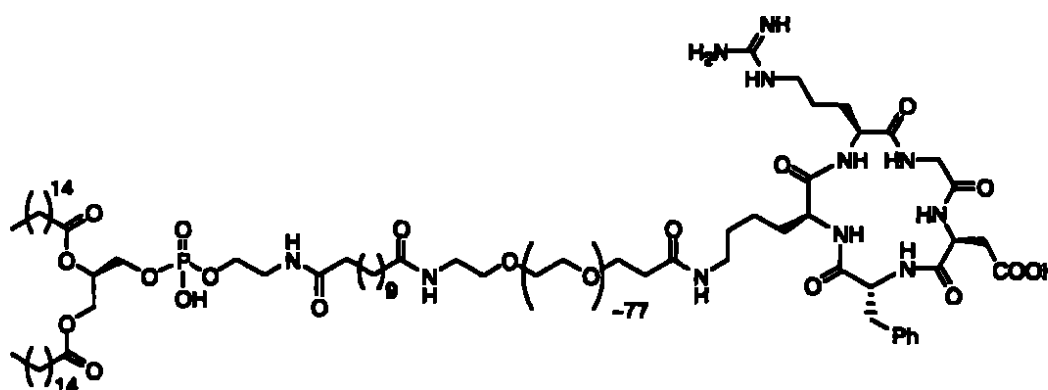


32 27

Triethylamine (3 mmol) is added to a solution of N-Boc-PEG₃₄₀₀-succinimidyl ester (1 mmol) and cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) (1 mmol) in dimethylformamide (DMF) (25 mL). The reaction mixture is stirred under nitrogen at room temperature overnight, and the solvent is removed *in vacuo*. The crude product is dissolved in trifluoroacetic acid/dichloromethane (1:1 vol/vol) and stirred for 4 h. The volatiles are removed and the title compound is isolated as the TFA salt via trituration in diethyl ether.

Part B. Preparation of DPPE-PEG₃₄₀₀-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-Dodecanoate

Conjugate:



Disuccinimidyl dodecanoate (1 mmol), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE) (1 mmol), and ω -amino-PEG₃₄₀₀-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) TFA salt (1 mmol) are dissolved in chloroform (25 ml) while stirring for 5 min. Sodium carbonate (1 mmol) and sodium sulfate (1 mmol) are added and the solution is stirred at room temperature under nitrogen for 18 h. DMF is removed *in vacuo* and the title compound is purified from the crude product mixture by either preparative HPLC or recrystallization.

Part C. Preparation of the Contrast Agent Composition:

The DPPE-PEG₃₄₀₀-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-Dodecanoate conjugate is mixed with three other lipids—1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphotidic acid; 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine; and N-(methoxypolyethylene glycol 5000 carbamoyl)-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine—in relative amounts of 1

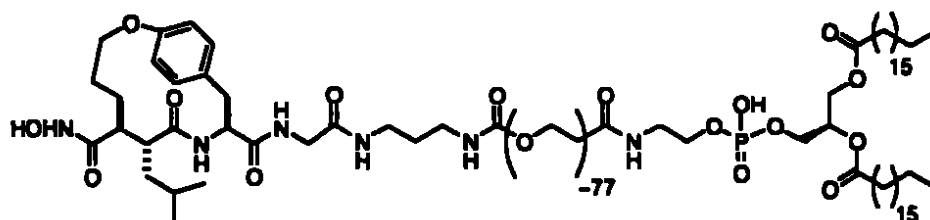
33 *[Handwritten signature]*

: 6 : 54 : 41 by weight. An aqueous suspension, containing this lipid mixture (1 mg/mL), sodium chloride (7 mg/mL), glycerin (0.1 mL/mL), and propylene glycol (0.1 mL/mL), at pH 6–7, is then prepared in a 2 cc glass vial. The air in the vial is evacuated and replaced with perfluoropropane, and the vial is sealed. The suspension is agitated in the sealed vial in a dental amalgamator for 30–45 sec. to form a milky white suspension, which is suitable for use as an ultrasound contrast agent.

The following examples, Examples 4 and 5, describe the synthesis of ultrasound contrast agents of the present invention comprised of targeting moieties for matrix metalloproteinase inhibitors. These materials are useful for targeting the MSLCs to the sites of extracellular matrix degradation, which are present in tumors, atherosclerotic plaques, and cardiac tissue degeneration in CHF (Congestive Heart Failure). These compositions are useful for localizing the acoustically active MSLCs to sites of disease for the selective ultrasound imaging of these pathologies. Alternatively, as described in Examples 8 and 9, compositions may be prepared with therapeutic agents in the interior of the LFLs attached to the MSLCs, which are useful for ultrasound stimulated drug release at a specific site of disease.

Example 4

Synthesis of 1-(1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamino)- α,ω -dicarbonylPEG₃₄₀₀-2-[7-(N-hydroxycarbamoyl)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]carbonylamino]-N-(3-aminopropyl)acetamide conjugate:



34 

To a solution of succinimidyl ester DSPE-PEG-NHS ester (Shearwater Polymers, Huntsville, Alabama) (1 mmol) in chloroform (25 ml) is added 2-([7-(N-hydroxycarbamoyl)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]carbonylamino)-N-(3-aminopropyl)acetamide TFA salt (1 mmol) (see U.S. Serial No. 60/182,627 for synthesis of this targeting moiety). Sodium carbonate (1 mmol) and sodium sulfate (1 mmol) are added and the solution stirred at room temperature under nitrogen for 18 h. The solvent is removed *in vacuo* and the title compound is purified from the crude product mixture by preparative HPLC.

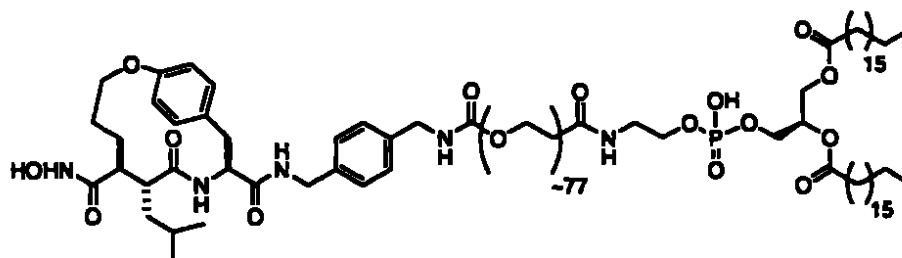
Preparation of Contrast Agent Composition:

The 1-(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamino)- α,ω -dicarbonylPEG3400-2-([7-(N-hydroxycarbamoyl)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]carbonylamino)-N-(3-aminopropyl)acetamide conjugate is mixed with three other phospholipids--1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphotidic acid; 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine; and N-(methoxypolyethylene glycol 5000 carbamoyl)-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine--in a ratio of 1 : 6 : 54 : 41 by weight. An aqueous suspension, containing this lipid mixture (1 mg/mL), sodium chloride (7 mg/mL), glycerin (0.1 mL/mL), and propylene glycol (0.1 mL/mL), at pH 6-7, is prepared in a 2 cc glass vial. The air in the vial is evacuated and replaced with perfluorobutane, and the vial is sealed. The suspension is agitated in the sealed vial in a dental amalgamator for 30-45 sec to form a milky white suspension of the MSLCs targeted to matrix metalloproteinases. The suspension is suitable for use as an ultrasound contrast agent.

35 70

Example 5

Synthesis of 1-(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamino)- α,ω -dicarbonylPEG3400-[7-(N-hydroxycarbamoyl)(3*S*,6*R*,7*S*)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]-N-([4-(aminomethyl)phenyl]methyl)carboxamide conjugate:



To a solution of succinimidyl ester DSPE-PEG-NHS ester (Shearwater Polymers, Huntsville, Alabama) (1 mmol) in chloroform (25 ml), is added [7-(N-hydroxycarbamoyl)(3*S*,6*R*,7*S*)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]-N-([4-(aminomethyl)phenyl]methyl)carboxamide TFA salt (1 mmol) (see U.S. Serial No. 60/182,627 for the synthesis of this MMP targeting moiety). Sodium carbonate (1 mmol) and sodium sulfate (1 mmol) are added and the solution is stirred at room temperature under nitrogen for 18 h. The solvent is removed *in vacuo* and the title compound is purified from the crude product mixture by preparative HPLC.

Preparation of Contrast Agent Composition:

1-(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamino)- α,ω -dicarbonylPEG3400-[7-(N-hydroxycarbamoyl)(3*S*,6*R*,7*S*)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]-N-([4-(aminomethyl)phenyl]methyl)carboxamide conjugate is mixed with three other phospholipids—1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphotidic acid; 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine; and N-(methoxypolyethylene glycol 5000 carbamoyl)-1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine—in relative amounts of 1 : 6 : 54 : 41 by weight. An

36

aqueous suspension (1.6 ml), containing this lipid mixture (1 mg/mL), sodium chloride (7 mg/mL), glycerin (0.1 mL/mL), and propylene glycol (0.1 mL/mL), at pH 6–7, is prepared in a 2 cc glass vial. The air in the vial is evacuated and replaced with perfluorobutane, and the vial is sealed. The suspension is agitated in the sealed vial in a dental amalgamator for 30–45 sec to form a milky white suspension of the MSLCs targeted to matrix metalloproteinases. The suspension is suitable for use as an ultrasound contrast agent.

Preparation of Biologically-Targeted Therapeutic MSLC Materials

Example 6

To the phospholipid contrast agent composition in Example 3 is added doxorubicin (100–200 mg/ml). One to two milliliters is transferred to a vial. The air in the vial is evacuated and replaced with perfluorobutane, and the vial is sealed. The vial is agitated in a dental amalgamator for 30–45 sec to form a milky white MSLC suspension for therapeutic use.

Example 7

To the phospholipid contrast agent composition in Example 4 is added cyclophosphamide (100–200 mg/ml). One to two milliliters is transferred to a vial. The air in the vial is evacuated and replaced with perfluorobutane, and the vial is sealed. The vial is agitated in a dental amalgamator for 30–45 sec to form a milky white MSLC suspension for therapeutic use.

Example 8

To the phospholipid contrast agent composition in Example 5 is added cyclophosphamide (100–200 mg/ml). One to two milliliters is transferred to a vial. The air in

3A
28
5

the vial is evacuated and replaced with perfluorobutane and the vial is sealed. The vial is agitated in a dental amalgamator for 30-45 sec to form a milky white MSLC suspension for ultrasonically-activated therapeutic use.

Example 9

To the phospholipid contrast agent composition in Example 5 is added tissue plasminogen activator (10-100 mg/ml). One to two milliliters is transferred to a vial. The air in the vial is evacuated and replaced with perfluorobutane and the vial is sealed. The vial is agitated in a dental amalgamator for 30-45 sec to form a milky white MSLC suspension for therapeutic use.

Example 10

Following injection into a living patient (e.g., mammal) and allowing sufficient time for the targeted MSLCs to localize at or near the site of disease, the diagnostic ultrasound scan may be acquired, or, in the case of therapeutic agent delivery, ultrasound energy of sufficient energy to disrupt the MSLCs and release the drug at the targeted site may be applied by either repeated pulsation or by application of very high power single pulses of ultrasound energy.

All publications, patents, and patent documents are incorporated by reference herein, as though individually incorporated by reference. The invention has been described with reference to various specific and preferred embodiments and techniques. However, it should be understood that many variations and modifications may be made while remaining within the spirit and scope of the invention.

38
72**CLAIMS**

What is claimed is:

1. A formulation comprising a gas microsphere liposome composite suspended in a medium, wherein the gas microsphere liposome composite comprises:
a gas-filled microsphere;
at least one of a lipid and a surfactant adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere; and
liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant.
2. The formulation of claim 1 wherein the gas of the gas-filled microsphere has a solubility of less than about 1.0% (v/v) in water at 25°C and 1 atm.
3. The formulation of claim 1 wherein the gas-filled microsphere has an average diameter of about 0.1 μ m to about 10 μ m.
4. The formulation of claim 1 wherein the gas-filled microsphere has an average diameter of about 0.5 μ m to about 10 μ m.
5. The formulation of claim 1 wherein the gas-filled microsphere comprises at least one inert gas.
6. The formulation of claim 5 wherein the inert gas is a noble gas.
7. The formulation of claim 5 wherein the inert gas is a perfluoroether gas.
8. The formulation of claim 5 wherein the inert gas is a perfluorocarbon gas.

39
P
X

9. The formulation of claim 1 wherein the gas-filled microsphere has a lipid adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere.
10. The formulation of claim 1 wherein the gas-filled microsphere has a surfactant adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere.
11. The formulation of claim 1 wherein the lipid or surfactant forms a mono-molecular layer on the surface of the gas-filled microsphere.
12. The formulation of claim 1 wherein the lipid or surfactant forms a bi-molecular liposomal layer or multi-molecular liposomal layer on the surface of the gas-filled microsphere.
13. The formulation of claim 1 wherein the surfactant is a non-ionic surfactant, cationic surfactant, or anionic surfactant.
14. The formulation of claim 13 wherein the non-ionic surfactant comprises polyethylene glycol, polypropylene glycol, polyvinylpyrrolidone, polyvinylalcohol, cellulose, gelatin, xanthan gum, pectin, or dextran.
15. The formulation of claim 13 wherein the cationic surfactant comprises a tetraalkyl ammonium, tetraalkyl phosphonium ion, or a suitable salt thereof.
16. The formulation of claim 15 wherein the cationic surfactant comprises a tetrahexyl ammonium, tetraoctyl ammonium, tetradecyl ammonium, tetrabutyl ammonium, tetrahexyl phosphonium, tetraoctyl phosphonium, tetrabutyl phosphonium, tetraphenyl phosphonium, or a suitable salt thereof.

40
X

17. The formulation of claim 13 wherein the anionic surfactant comprises an alkyl sulfonate, an alkyl carboxylate, or a suitable salt thereof.

18. The formulation of claim 17 wherein the anionic surfactant comprises dodecyl sulfate, palmityl sulfate, dodecyl carboxylate, palmityl carboxylate, or a suitable salt thereof.

19. The formulation of claim 1 wherein the lipid comprises a phospholipid, glycolipid, triglyceride or fatty acid.

20. The formulation of claim 19 wherein the phospholipid comprises dipalmitoylphosphatidyl choline, dimyristoylphosphatidyl choline, dilauryoylphosphatidyl choline, or dioleoylphosphatidyl choline.

21. The formulation of claim 1 wherein the liquid-filled liposomes are attached to the adsorbed lipid or surfactant in a continuous fashion.

22. The formulation of claim 1 wherein the liquid-filled liposomes occupy greater than about 50% of the outer surface of the gas-filled microsphere area.

23. The formulation of claim 1 wherein each of the liquid-filled liposomes independently has a diameter of about 10nm to about 200nm.

24. The formulation of claim 1 wherein each of the liquid-filled liposomes independently has a diameter of about 20nm to about 100nm.

2341

25. The formulation of claim 1 wherein each of the liquid-filled liposomes independently has a diameter that is less than about 10% of the diameter of the gas-filled microsphere.
26. The formulation of claim 1 wherein each of the liquid-filled liposomes independently comprises a therapeutic agent or diagnostic agent in the interior of the liquid-filled liposomes.
27. The formulation of claim 26 wherein the therapeutic agent is an anticoagulant, thrombolytic, antineoplastic agent, or anti-inflammatory agent.
28. The formulation of claim 26 wherein the therapeutic agent comprises doxorubicin, cyclophosphamide, adriamycin, methotrexate, gemcitabine, navelbine, cisplatin, tissue plasminogen activator, integrilin, roxifiban, methotrexate or enbrel.
29. The formulation of claim 26 wherein the diagnostic agent comprises an X-ray contrast agent or an MRI contrast agent.
30. The formulation of claim 1 wherein each of the liquid-filled liposomes independently has high affinity, targeting moieties attached to the surface of the liquid-filled liposomes.
31. The formulation of claim 30 wherein the high affinity targeting moiety attached to the surface of the gas microsphere liposome composite comprises:
- a ligand which binds to a receptor which is up-regulated in angiogenesis;
 - a ligand which binds to a receptor which is up-regulated in inflammation; or
 - a ligand which binds to a receptor which is up-regulated in atherosclerosis.

3742

32. The formulation of claim 30 wherein the high affinity targeting moiety attached to the surface of the gas microsphere liposome composite comprises:

a ligand which binds to the integrins $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ or GpIIb/IIIa;

a ligand which binds to a matrix metalloproteinase; or

a ligand which binds to the LTB₄ receptor.

33. The formulation of claim 30 wherein the high affinity targeting moiety attached to the surface of the gas microsphere liposome composite comprises:

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoate;

DPPE-PEG₃₄₀₀-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoate;

1-(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamino)- α,ω -dicarbonyl PEG₃₄₀₀-2-([7-(N-hydroxycarbamoyl)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]carbonylamino)-N-(3-aminopropyl)acetamide; or

1-(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamino)- α,ω -dicarbonyl PEG₃₄₀₀-[7-(N-hydroxycarbamoyl)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]-N-([4-(aminomethyl)phenyl]methyl)carboxamide.

34. The formulation of claim 1 wherein each of the liquid-filled liposomes independently comprises liquid from the medium of suspension.

35. The formulation of claim 1 wherein the gas microsphere liposome composite has a mean diameter of about 0.1 μ m to about 10 μ m.

36. The formulation of claim 1 wherein the gas microsphere liposome composite has a mean diameter of about 0.2 μ m to about 4 μ m.

43
X
X

37. The formulation of claim 1 wherein the gas microsphere liposome composite exists as an aggregate of two or more gas microsphere liposome composites.
38. The formulation of claim 37 wherein the aggregate has a diameter of about $1\mu\text{m}$ to about $100\mu\text{m}$.
39. The formulation of claim 1 wherein the gas microsphere liposome composite has a density of about 0.90 to about 1.10 of the density of the medium.
40. The formulation of claim 1 wherein the lipid or surfactant comprises a high affinity targeting moiety.
41. The formulation of claim 1 wherein the lipid or surfactant comprises a therapeutic agent.
42. The formulation of claim 41 wherein the therapeutic agent is doxorubicin, cyclophosphamide, adriamycin, methotrexate, gemcitabine, navelbine, cisplatin, tissue plasminogen activator, integrelin, roxifiban, methotrexate or enbrel.
43. The formulation of claim 1 wherein the medium comprises a diagnostic agent.
44. The formulation of claim 43 wherein the diagnostic agent is an X-ray or MRI contrast agent.
45. The formulation of claim 40 wherein the high affinity targeting moiety comprises:

44
 45
 46

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoate;

DPPE-PEG₄₀₀-cyclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoate;

1-(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamino)- α,ω -dicarbonyl PEG₄₀₀-2-([7-(N-hydroxycarbamoyl)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]carbonylamino)-N-(3-aminopropyl)acetamide; or

1-(1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamino)- α,ω -dicarbonyl PEG₄₀₀-[7-(N-hydroxycarbamoyl)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-methylpropyl)-11-oxa-5-oxobicyclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-yl]-N-([4-(aminomethyl)phenyl]methyl)carboxamide.

46. A method of ultrasound imaging in a patient in need of such ultrasound imaging comprising:

administering to the patient an effective amount of a formulation of any one of claims 1-45;

allowing a sufficient period of time for the circulation of the gas microsphere composite to reach the targeted area; and

performing ultrasound imaging on the patient.

47. The method of claim 46 wherein the patient is a human.

48. The method of claim 46 wherein the effective amount of the formulation comprises about 10^3 to about 10^{10} gas microsphere liposome composites.

49. The method of claim 46 wherein the sufficient period of time is about 5 minutes to about 2 hours.

50. The method of claim 46 wherein the sufficient period of time is about 5 to about 30 minutes.

51. A method of treating heart disease, inflammation, infection, cancer or thromboembolic disease in a patient in need of such treatment comprising:

administering to the patient an effective amount of a formulation of any one of claims 1-45, wherein one or more of the liquid-filled liposomes independently comprises a therapeutic agent;

allowing a sufficient period of time for the circulation of the gas microsphere composite to the targeted area; and

applying ultrasound energy to the region of pathology in the patient sufficient to cause the therapeutic agent to be released from the microsphere liposome composite at the region of pathology.

52. The method of claim 51 wherein the patient is a human.

53. The method of claim 51 wherein each of the liquid-filled liposomes independently comprises a therapeutic agent.

54. The method of claim 51 wherein the effective amount of the formulation comprises about 10^3 to about 10^{10} gas microsphere liposome composites.

55. A method for preparing a formulation of any one of claims 1-45 comprising:

contacting a suspension of liposomes in a aqueous solution comprising at least one lipid or one surfactant; and

mixing the suspension with a gas that has a solubility of less than about 1.0% (v/v) in water at 25°C and 1 atm sufficient to provide the formulation.

46
\$

56. The method of claim 55 wherein the mixing is accomplished by mechanical agitation.

57. The method of claim 55 wherein the mixing is accomplished by ultrasonification.

58. The method of claim 55 wherein the mixing is accomplished by high speed injection of the gas into the aqueous liposome suspension.

59. A method for preparing a formulation of any one of claims 1-45 comprising:
contacting a suspension of liposomes in a aqueous solution comprising at least one therapeutic agent and at least one surfactant; and
mixing the aqueous liposome suspension with a gas that has a solubility of less than about 1.0% (v/v) in water at 25°C and 1 atm sufficient to provide the formulation.

60. The method of claim 59 wherein the mixing is accomplished by mechanical agitation.

61. The method of claim 59 wherein the mixing is accomplished by ultrasonification.

62. The method of claim 59 wherein the mixing is accomplished by high speed injection of the gas into the aqueous liposome suspension.

63. A kit for the preparation of a formulation of any one of claims 1-45 comprising:
a container comprising an aqueous solution wherein the aqueous solution comprises at least one surfactant and liquid-filled liposomes; and

49
48
47

a means for introducing a gas that has a solubility of less than about 1.0% (v/v) in water at 25°C and 1 atm into the aqueous solution.

64. The kit of claim 63 wherein the container comprises a head space.

65. The kit of claim 63 wherein the head space comprises at least one inert gas having a solubility of less than about 1.0%(v/v) in water at 25°C and 1 atm pressure.

66. The kit of claim 63 wherein the inert gas is a perfluorocarbon gas.

67. The kit of claim 63 wherein the inert gas is a perfluoroether gas.

68. The kit of claim 63 wherein the inert gas is a noble gas.

69. A formulation comprising a gas microsphere liposome composite suspended in a medium, wherein the gas microsphere liposome composite comprises:

a gas-filled microsphere;

at least one of a lipid and a surfactant adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere; and

liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant;

for use in medical therapy or diagnosis.

70. The use of a formulation comprising a gas microsphere liposome composite suspended in a medium, wherein the gas microsphere liposome composite comprises:

a gas-filled microsphere;

at least one of a lipid and a surfactant adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere; and

liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant;

for the manufacture of a medicament for treating heart disease, inflammation, infection, cancer or thromboembolic disease in a patient in need of such treatment.

71. The use of a formulation comprising a gas microsphere liposome composite suspended in a medium, wherein the gas microsphere liposome composite comprises:

a gas-filled microsphere;

at least one of a lipid and a surfactant adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere; and

liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant;

for the manufacture of a medicament for diagnostic imaging in a patient in need of such diagnostic imaging.

72. The use of a formulation comprising a gas microsphere liposome composite suspended in a medium, wherein the gas microsphere liposome composite comprises:

a gas-filled microsphere;

at least one of a lipid and a surfactant adsorbed onto the surface of the gas-filled microsphere; and

liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant;

for the manufacture of a medicament for ultrasound imaging in a patient in need of such ultrasound imaging.

24

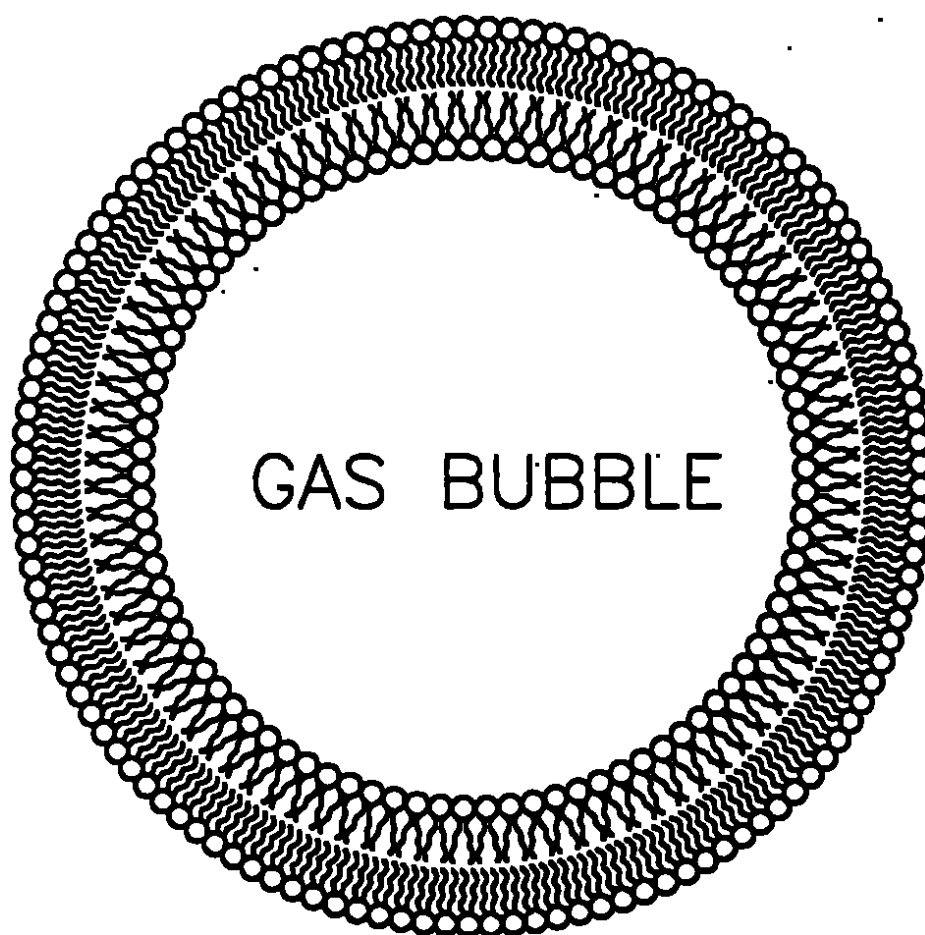


Figure 1

1750

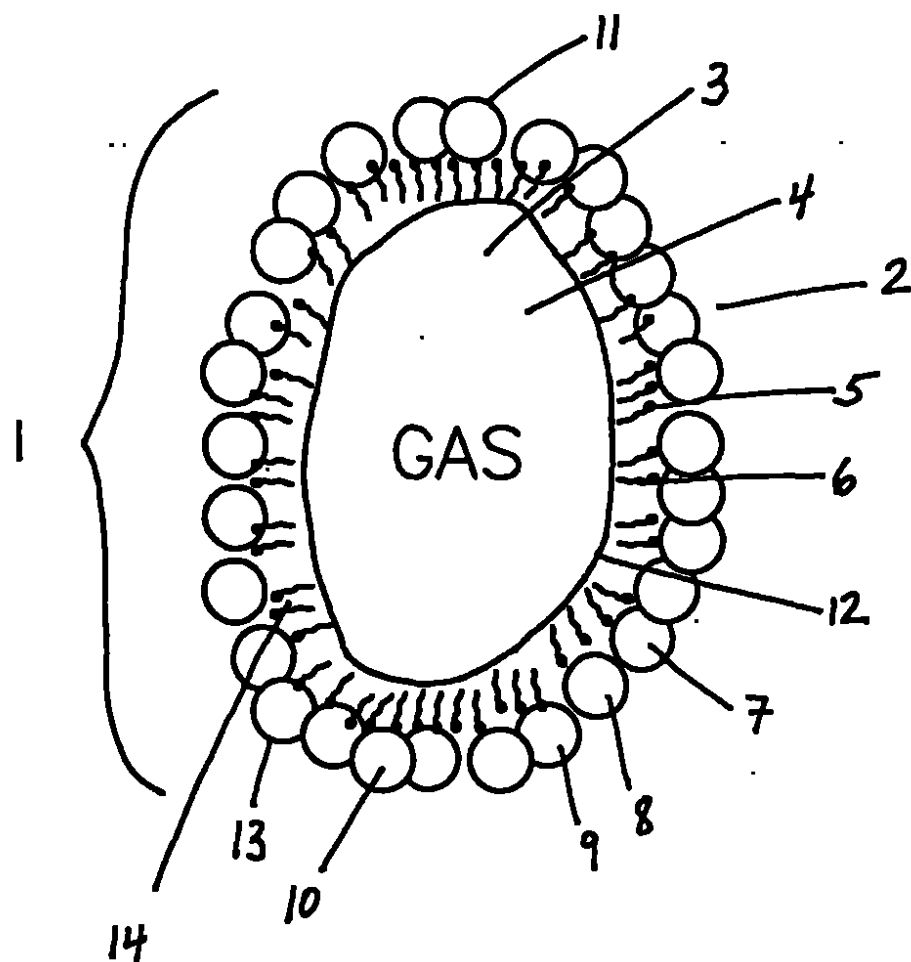


Figure 2

5

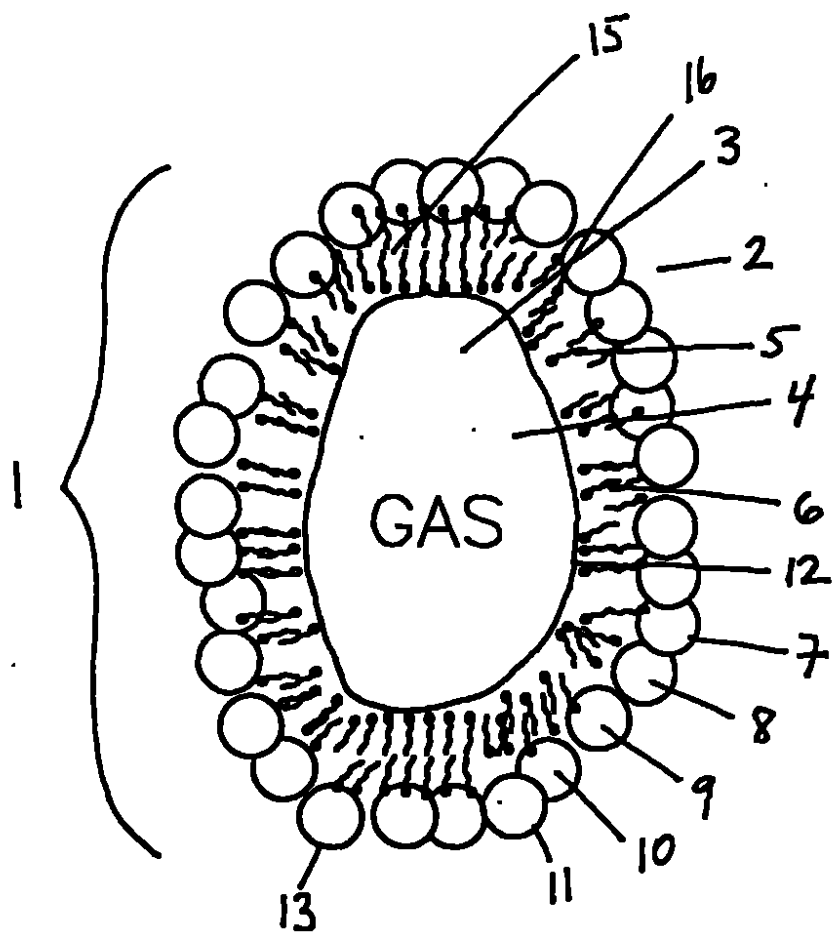


Figure 3.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha Internacional de Publicación
27 de febrero de 2003 (27.02.2003)

(10) Número Internacional de Publicación

PCT

WO 03/015831 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes²: A61K 48/22, 41/100

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US01/25885

(22) Fecha de Presentación Internacional:
16 de agosto de 2001 (16.08.2001)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(71) Solicitante: BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA
COMPANY [US/US]; CHESTNUT RUN PLAZA, 974
CENTRE ROAD, WILMINGTON, DE 19805 (US).

(72) Inventores: CARPENTER, JR., Alan, P.; 73 Cranberry
Hill Lane, Carlisle, MA 01741 (US). SLACK, Gregory,
C.; 124 Wheeler Road, Hollis, NH 03049 (US).

(74) Agente: DOLAN, Peter, L.; Bristol-Myers Squibb Pharma
Company, Patent Department, P.O. Box 4000 trest,
Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(81) Países destinatarios (nacional): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Países destinatarios (regional): Patente ARIPO
(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZW), Patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, CH,
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Publicado:
— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, remítase
a las "Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que
aparece al comienzo de cada edición regular del Boletín
Oficial PCT.

(54) Título: COMPUESTOS DE LIPOSOMAS CON MICROESFERA DE GAS



(57) Extracto: Se describen formulaciones que comprenden un compuesto de liposomas de microesfera de gas suspendido en un medio, en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende: una microesfera llena de gas; por lo menos uno de un lípido y un tensioactivo adsorbidos en la superficie de la microesfera llena de gas; y liposomas llenos de líquido unidos al lípido o tensioactivo. Igualmente se describen métodos de preparar los mismos y usarlos en ultrasonografía. La presente invención comprende además el uso de los mismos en tratar cardiopatía, inflamación, infección, cáncer o enfermedad tromboembólica en un paciente.

WO 03/015831 A1

COMPUESTOS DE LIPOSOMAS DE MICROESFERA DE GAS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención provee una formulación que comprende un compuesto de liposomas de microesfera de gas (MSLC) suspendido en un medio. El compuesto de liposomas de microesfera de gas incluye una microesfera llena de gas; por lo menos uno de un lípido y un tensioactivo adsorbidos en la superficie de la microesfera llena de gas; y liposomas llenos de líquido unidos al lípido o tensioactivo. La superficie exterior de los liposomas llenos de líquido puede incorporar un ligando de acceso (es decir, fracción de acceso del agente de diagnóstico) para entrega directa de los MSLCs, para diagnóstico selectivo por imágenes, de receptores, enzimas, ARN mensajero (mARN) y otros objetivos biológicos relevantes. Adicionalmente, los liposomas llenos de líquido pueden incluir uno o más medicamentos (por ejemplo, agentes terapéuticos y/o agentes de diagnóstico) en el volumen interno de los liposomas llenos de líquido. Como tales, el agente terapéutico o agente de diagnóstico puede administrarse selectivamente a un órgano o sitio de patología para entrega localizada. La liberación acelerada del medicamento puede estimularse mediante la aplicación de energía acústica al sitio de patología donde se unen los MSLCs "señal", proveyendo así concentraciones localmente altas de agente terapéutico o agente de diagnóstico en una forma selectiva.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La ultrasonografía es útil para reproducir imágenes de estructuras en el cuerpo de un paciente (por ejemplo, mamífero) con el fin de ayudar en el diagnóstico y terapia. Durante la ultrasonografía, puede usarse un escáner ultrasónico para generar y recibir ondas de sonido. El escáner ultrasónico se pone sobre la superficie del cuerpo que cubre el área a reproducir, y las ondas de sonido generadas por el escáner se dirigen hacia el

54
H

área a reproducir. El escáner detecta entonces las ondas de sonido reflejadas del área subyacente y traduce los datos en imágenes. Las propiedades acústicas (por ejemplo, densidad) de cada estructura en el cuerpo dependerán típicamente de la velocidad de las transmisiones y la densidad de la estructura. Los cambios en las propiedades acústicas serán muy prominentes en la superficie de contacto entre diferentes sustancias (es decir, en la superficie de contacto entre sólidos, líquidos y gases). Por consiguiente, cuando se dirige energía ultrasónica a un área que incluye superficies de contacto entre diferentes sustancias, las diferentes propiedades acústicas de las sustancias ocasionarán diferentes características de reflexión. Debido a que la calidad de la ultrasonografía resultante se intensifica creando una superficie de contacto entre diferentes estructuras, sería útil aumentar la diferencia en las propiedades acústicas entre diferentes estructuras e intensificar la calidad de la imagen generada durante la ultrasonografía.

Un método que puede afectar la calidad de la ultrasonografía es la introducción de agentes de contraste en el sistema vascular del cuerpo para que actúen como agentes de contraste ultrasónico. Cuando los agentes de contraste se inyectan en el sistema microvascular y lo perfunden, pueden producirse imágenes más claras. Los agentes actúan como reflectores de ondas de sonido, intensificando efectivamente la superficie de contacto entre el sistema vascular y otras estructuras.

Agentes de contraste líquidos y sólidos que contienen gas atrapado son bien conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 4,235,871; Patente de los Estados Unidos No. 4,265,251; Patente de los Estados Unidos No. 4,442,843; Patente de los Estados Unidos No. 4,533,254; Patente de los Estados Unidos No. 4,572,203; Patente de los Estados Unidos No. 4,657,756; Patente de los Estados Unidos No. 4,681,199; Patente de los Estados Unidos No. 5,088,499; Patente de los Estados Unidos No. 5,147,631; Patente de los Estados Unidos No. 5,228,446; Patente de los Estados Unidos No. 5,271,928; Patente de los Estados Unidos No. 5,380,519; Patente de los Estados Unidos No. 5,413,774; Patente de los Estados Unidos No. 5,527,521; Patente de los Estados Unidos No. 5,531,980;

4055

Patente de los Estados Unidos No. 5,547,656; Patente de los Estados Unidos No. 5,558,094; Patente de los Estados Unidos No. 5,573,751; Patente de los Estados Unidos No. 5,585,112; Patente de los Estados Unidos No. 5,620,689; Patente de los Estados Unidos No. 5,715,824; Patente de los Estados Unidos No. 5,769,080; EP 0 122 624; EP 0 727 225; WO 96/40285; y WO 99/65467. Los microburbujas proporcionadas por estos agentes de contraste actúan como reflectores de ondas de sonido debido a las diferencias acústicas entre la microburbuja de gas y el líquido circundante.

Feinstein, Patente de los Estados Unidos No. 4,572,203, divulga "microburbujas" de alrededor de 6-20 micrones en diámetro, producidas por sonicación de ciertas soluciones viscosas, para uso como agentes de contraste ultrasónico. Feinstein divulga igualmente micropartículas sólidas o semi-sólidas con contenido metálico, tal como vidrio o grafito, pero que no contienen aire atrapado, lo suficientemente pequeñas para atravesar los capilares, como agentes de contraste ultrasónico. También se divulgan microesferas formadas a partir de una matriz polimérica de aminoácido, tal como albúmina, con partículas magnéticas, tales como magnetita (Fe_3O_4) incrustadas en ella.

Tickner, Patente de los Estados Unidos No. 4,265,251, divulga el uso de ciertas partículas "microburbuja" de composición de sacárido con un espacio interior hueco lleno de gas, como agentes intensificadores ultrasónicos.

Rasor y colaboradores, Patente de los Estados Unidos No. 4,442,843, Patente de los Estados Unidos No. 4,657,756, y Patente de los Estados Unidos No. 4,681,119, ilustran agregados de micropartículas (de 1-50 micrones de diámetro) de un material sólido, que son solubles en sangre, y contienen gas en los vacíos entre los racimos, o con gas adsorbido en la superficie de la partícula, o que contienen gas como una parte integral de la estructura interna de la partícula, para uso en ultrasonografía. Se utilizan los siguientes materiales sólidos: varios sacáridos, NaCl, citrato de sodio, acetato de sodio, tartrato de sodio, CaCl_2 y AlCl_3 .

Hilman y colaboradores, EP0122624, contiene micropartículas

que comprenden una sustancia tensioactiva, incluidos varios compuestos lipófilos, con aire encapsulado, para uso como agentes de contraste ultrasónico. También se divulga la combinación de partículas del material tensioactivo y partículas de un material no tensioactivo, tal como cloruro de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, tartrato de sodio, y varios sacáridos.

Glajch y colaboradores, Patente de los Estados Unidos No. 5,147,631, divulga partículas porosas de un material inorgánico que comprenden un gas o líquido atrapado. Los materiales divulgados comprenden boratos monoméricos o poliméricos, alúminas monoméricas o poliméricas, carbonatos monoméricos o poliméricos, sílices monoméricos o poliméricos, fosfatos monoméricos o poliméricos; sales catiónicas orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Unger divulgó microesferas llenas de gas carbono perfluórico (Patente de los Estados Unidos No. 5,547,656 y Patente de los Estados Unidos No. 5,527,521) para fines de diagnóstico por imágenes y composiciones de liposomas llenos de precursor gaseoso y llenos de gas, o métodos para elaborar o usar estos agentes de contraste (Patente de los Estados Unidos No. 5,228,446, Patente de los Estados Unidos No. 5,585,112, Patente de los Estados Unidos No. 5,769,080 y Patente de los Estados Unidos No. 5,715,824)) para fines de ultrasonografía de diagnóstico y general.

Unger, Patente de los Estados Unidos No. 5,088,499, divulga la preparación de liposomas llenos de gas y su uso como agentes de contraste ultrasónico. Éstos comprenden materiales que contienen gases, precursores gaseosos, que pueden activarse por pH, temperatura, o presión, y otros agentes de contraste sólidos o líquidos.

En el caso de los materiales divulgados por Unger más arriba en el texto, la membrana liposomal de la burbuja de gas encapsulado se describe como la estructura bien conocida cabeza-a-cola unilaminar o multi-laminar de membranas lipídicas, anfifílicas, tales como fosfolípidos (véase, Figura 1). Como tales, las composiciones de Unger son liposomas clásicos en los cuales el interior lleno de líquido se reemplaza por un gas.

Quay ha divulgado métodos de uso de microburbujas de gas

libre de bajo factor Q (baja difusividad) como agentes de contraste ultrasónico (Patente de los Estados Unidos No. 5,573,751 y Patente de los Estados Unidos No. 5,558,094). En estos casos Quay divulga microburbujas, de gas libre, de varios gases de baja difusividad, sin ninguna divulgación de estructura o composición de estas microburbujas.

Schneider, Patente de los Estados Unidos No. 5,271,928, Patente de los Estados Unidos No. 5,380,519 y Patente de los Estados Unidos No. 5,531,980, divulgaron suspensiones de microburbujas, que son esferas o glóbulos huecos de gas finamente dividido y se estabilizan por surfactivos o tensioactivos.

En el caso de las patentes de microburbujas de Schneider ('928, '519 y '980), el agente de contraste ultrasónico se divulga como compuesto de microburbujas desprovistas de una capa límite de material alrededor de la microburbuja de gas. De acuerdo con Schneider, estas microburbujas "sólo están delimitadas por una cubierta evanescente" (Patente de los Estados Unidos No. 5,531,980, columna 1).

Las divulgaciones de microburbujas de Schneider descritas más arriba ('928, '519 y '980) se dirigen a métodos de elaborar agentes de contraste ultrasónico a base de microburbujas sin referencia a una composición/estructura preferida de las microburbujas mismas.

Schneider, Patente de los Estados Unidos No. 5,413,774, divulga microvesículas que poseen una capa límite de material liposomal, las cuales contienen, además, dentro de la vesícula, un gas de baja solubilidad, como agentes de contraste ultrasónico a base de microesferas. No obstante, no se proporciona una descripción de la composición o estructura de los microbalones: más bien, se describen métodos de elaborar un agente de contraste basado en estas microvesículas o microbalones utilizando gases seleccionados de baja solubilidad.

Los agentes de contraste descritos anteriormente se proponen para ultrasonografía general de contraste del sistema vascular y especialmente cardiografía.

La creación de imágenes de órganos específicos, sistemas, u

458

otras áreas del cuerpo, sería útil para diagnosticar una variedad de estados patológicos específicos. Ejemplos de ésta incluyen la creación específica de imágenes de tumores, coágulos de sangre, y áreas de infección en una forma dirigida. Quay, y colaboradores, Solicitud de Patente Europea EP727225 ilustra el uso de composiciones que comprenden un ligando de molécula de adhesión celular (CAM) que se incorpora en una molécula deseada para formar un conjugado. La CAM se incorpora en un tensioactivo o transportador de albúmina y comprende además un producto químico con presión de vapor suficientemente alta para ser una gas a la temperatura corporal.

Unger (WO 96/40285) describe liposomas "señal", que contienen gas, los cuales pueden dirigirse a tejidos específicos en el cuerpo para diagnóstico por imágenes o la administración de agentes bioactivos. Estos materiales "señal" se componen de un gas, lípido y ligando de acceso.

La totalidad de estos materiales incluye una suspensión o emulsión de microesferas de gas (alternativamente designadas como microburbujas) que son: 1) microburbujas libres (es decir, que no tienen una envoltura de material fijada en la superficie de la microburbuja) estabilizadas por tensioactivos en solución, que producen una reducción en la tensión superficial en la superficie de contacto gas-líquido, o 2) verdaderas vesículas con una capa limítrofe de material que estabiliza las microesferas de gas como una suspensión en el medio líquido. Una de las dificultades prácticas con todos estos materiales radica en que las microburbujas de gas en el rango de tamaño, relevante, acústicamente activo de $\sim 0.5\mu\text{m}$ a $10\mu\text{m}$ de diámetro, tienen una densidad diferente de la de los medios acuosos en los cuales están suspendidas. Por lo tanto, estas microesferas poseen una tendencia natural a separarse rápidamente (es decir, las suspensiones de microburbujas se vuelven heterógenas). Esto requiere el uso rápido del material de contraste luego del mezclado, antes de que ocurra la separación de las microesferas.

En el caso de las microesferas de gas usadas como plataformas para la administración del medicamento (véase, Unger WO 96/40285 y Quay EP0727225), los materiales incorporan la fracción terapéutica en la superficie

59
\$

de la microesfera de gas mediante la absorción química o física en la capa limítrofe del lípido o polímero. La dificultad práctica con estos materiales radica en que cantidades limitadas del agente terapéutico pueden absorberse o adherirse al material de la superficie, que circunda la microesfera de gas.

Allen y colaboradores (Patente de los Estados Unidos No. 5,620,689) divulgan un método de tratar un neoplasma de células B o células T utilizando un agente quimioterapéutico encapsulado en liposomas con un grupo biodireccional en la superficie del liposoma, unido mediante una cubierta de polietilén glicol sobre el liposoma. See y colaboradores, WO 99/65467, divulgan un método de elaborar liposomas llenos de medicamento, de menos de 200nm de diámetro. Estas divulgaciones son representativas de una extensa clase de divulgaciones similares de administración de medicamento en liposomas en la literatura, todas las cuales comprenden liposomas llenos de líquido solos, sin un componente de microesfera de en la forma de las composiciones MSLC provistas aquí.

Sin perjuicio del uso de tales agentes de contraste descritos anteriormente, la ultrasonografía producida, por ejemplo, del tejido del miocardio, puede ser de calidad relativamente baja, altamente variable y no cuantificable. Los resultados generales de diagnóstico hasta la fecha han sido en cierta medida decepcionantes. Como tales, subsiste la necesidad de agentes mejorados útiles en ultrasonografía que mejoren la calidad de las imágenes ultrasónicas intensificando el contraste entre los espacios vasculares y tejidos en un cuerpo. Tales agentes de contraste deben tener propiedades excelentes y estables de respuesta acústica, cuando se encuentran diluidos en suspensiones acuosas. Adicionalmente, los agentes de contraste deben exhibir flotación y separación mínimas de las microesferas.

Ha existido, y continúa existiendo, una necesidad de agentes de ultrasonografía que intensifiquen la calidad y la claridad de las imágenes ultrasónicas mejorando el delineamiento del espacio y tejidos

60
X

vasculares en el cuerpo humano. Además, se requieren mejoras en el control de la administración del medicamento a los sitios de patología para muchos medicamentos que exhiben alta toxicidad a los tejidos normales y un índice terapéutico pobre resultante.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención provee una formulación para la intensificación del contraste de ultrasonografía y para la liberación de medicamentos estimulada por ultrasonido (es decir, acústicamente). La formulación provee suspensiones estables de microesfera de gas (es decir, burbujas de gas finamente divididas) con propiedades excelentes y estables de respuesta acústica cuando están diluidas en suspensiones acuosas. La formulación puede entregar un nivel más alto de medicamento activo por microesfera llena de gas a un tejido dado, en relación con formulaciones conocidas, logrando así el beneficio terapéutico previsto de concentraciones locales elevadas de medicamento o gen en la región de patología. La formulación posee excelentes propiedades de dispersión ultrasónicas, lo cual produce un aumento selectivo en la señal de retrodispersión del ultrasonido en el espacio vascular. El aumento en la señal de retrodispersión del ultrasonido en el espacio vascular intensifica el contraste en relación con el tejido sólido circundante. Adicionalmente, la formulación exhibe flotación y separación mínimas de la microesfera.

La presente invención provee una formulación que incluye un compuesto de liposomas de microesfera de gas (MSLC) suspendido en un medio. El compuesto de liposomas de microesfera de gas incluye una microesfera llena de gas; por lo menos uno de un lípido y un tensioactivo adsorbidos en la superficie de la microesfera llena de gas; y liposomas llenos de líquido unidos al lípido o tensioactivo.

La presente invención provee además un método de ultrasonografía en un paciente (por ejemplo, mamífero) necesitado de

261
40

dicha ultrasonografía. El método incluye administrar al paciente (por ejemplo, mamífero) una cantidad efectiva de una formulación de la presente invención; dejar un período suficiente de tiempo para que la circulación del compuesto de la microesfera llena de gas llegue al área "señal"; y realizar la ultrasonografía en el paciente (por ejemplo, mamífero).

La presente invención provee asimismo un método de tratar cardiopatía, inflamación, infección, cáncer o enfermedad tromboembólica en un paciente (por ejemplo, mamífero) necesitado de dicho tratamiento. El método incluye administrar al paciente (por ejemplo, mamífero) una cantidad efectiva de una formulación de la presente invención, en donde uno o más de los liposomas llenos de líquido comprende independientemente un agente terapéutico; dejar un período suficiente de tiempo para que la circulación del compuesto de microesfera de gas llegue al área "señal"; y aplicar energía ultrasónica al área "señal" en el paciente (por ejemplo, mamífero), suficiente para hacer que el agente terapéutico sea liberado del compuesto de liposomas de microesfera en la región de patología.

La presente invención provee igualmente un método para preparar una formulación de la presente invención. El método incluye poner en contacto una suspensión de liposomas en una solución acuosa que comprende por lo menos uno de un tensioactivo y un lípido; y mezclar la suspensión con un gas que tiene una solubilidad de menos de alrededor de 1.0% (v/v) en agua a 25°C y 1 atm, suficiente para proveer la formulación.

La presente invención provee además un método para preparar una formulación de la presente invención. El método comprende poner en contacto una suspensión de liposomas en una solución acuosa que incluye por lo menos un agente terapéutico y por lo menos un tensioactivo o lípido; y mezclar la suspensión de liposomas acuosa con un gas que tiene una solubilidad de menos de alrededor de 1.0% (v/v) en agua a 25°C y 1 atm, suficiente para proveer la

62

formulación.

La presente invención provee también un botiquín para la preparación de una formulación de la presente invención. El botiquín incluye un envase que comprende una solución acuosa, en donde la solución acuosa incluye por lo menos uno de un tensioactivo y un lípido, y liposomas llenos de líquido; y un medio para introducir un gas que tiene una solubilidad de menos de alrededor de 1.0% (v/v) en agua a 25°C y 1 atm en la solución acuosa.

De igual modo, la presente invención provee el uso de una formulación de la presente invención para la manufactura de un medicamento para tratar cardiopatía, inflamación, infección, cáncer o enfermedad tromboembólica en un paciente (por ejemplo, mamífero) necesitado de dicho tratamiento. La formulación incluye un compuesto de liposomas de microesfera de gas suspendido en un medio, en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende: una microesfera llena de gas; por lo menos uno de un lípido y un tensioactivo adsorbidos en la superficie de la microesfera llena de gas; y liposomas llenos de líquido unidos al lípido o tensioactivo.

La presente invención provee además el uso de una formulación de la presente invención para la manufactura de un medicamento para ultrasonografía en un paciente (por ejemplo, mamífero) necesitado de dicha ultrasonografía. La formulación incluye un compuesto de liposomas de microesfera de gas suspendida en un medio, en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende: una microesfera llena de gas; por lo menos uno de un lípido y un tensioactivo adsorbidos en la superficie de la microesfera llena de gas; y liposomas llenos de líquido unidos al lípido o tensioactivo.

La presente invención provee igualmente el uso de una formulación de la presente invención para la manufactura de un medicamento para ultrasonografía en un paciente (por ejemplo, mamífero) necesitado de dicha ultrasonografía. La formulación incluye un compuesto de liposomas de microesfera de gas suspendido en un

63

medio, en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende: una microesfera llena de gas; por lo menos uno de un lípido y un tensioactivo adsorbidos en la superficie de la microesfera llena de gas; y liposomas llenos de líquido unidos al lípido o tensioactivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 ilustra un liposoma lleno de gas.

FIG. 2 ilustra un compuesto monocapa de liposomas de microesfera de gas (MSLC) de la presente invención.

FIG. 3 ilustra un compuesto monocapa de liposomas de microesfera de gas (MSLC) de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Con referencia a las Figuras 2 y 3, la presente invención provee un compuesto de liposomas de microesfera de gas (MSLC) (1) dispersado en un medio acuoso (2). El compuesto de liposomas de microesfera de gas (MSLC) (1) incluye una microesfera llena de gas (3) de un gas inerte apropiado (4). Un lípido (5) y/o tensioactivo (6) es adsorbido en la superficie (12) de la microesfera llena de gas (3). Los liposomas llenos de líquido (LFLs) (7) están unidos al lípido (5) y/o tensioactivo (6). Los LFLs (7) pueden incluir un agente terapéutico (8) o agente de diagnóstico (9) en el interior líquido (10) de los LFLs (7). Adicionalmente, una fracción de acceso (11) puede unirse a la superficie (13) de los LFLs (7).

Como se emplea aquí, "compuesto de liposomas de microesfera de gas (MSLC)" (1) se refiere a una microesfera llena de gas (3) que tiene por lo menos uno de un lípido (5) y un tensioactivo (6) adsorbido en la superficie exterior (12) de la microesfera llena de gas (3) y que tiene además liposomas llenos de líquido (7) unidos al lípido (5) o tensioactivo (6).

4/64

Tal como se emplea aquí, "tensioactivo" (6) se refiere a cualquier material, iónico o no iónico, que produce una reducción en la tensión interfacial en una solución. El término tensioactivo (6) incluye moléculas anfifílicas de menos de alrededor de 1,000 peso molecular y polímeros que son capaces de reducir la tensión interfacial entre una microesfera llena de gas (3) y el medio acuoso circundante (2).

Tal como se emplea aquí, "liposoma lleno de líquido (LFL)" (7) se refiere a liposomas que contienen un interior líquido (10) (es decir, un líquido en el volumen interno). Los liposomas llenos de líquido (7) pueden ser unilaminares (14), bilaminares (15), o multilaminares (16). Los liposomas llenos de líquido (7) se unen típicamente al líquido adsorbido o tensioactivo (6) en una forma continua. Cada uno de los liposomas llenos de líquido (7) puede contener independientemente un agente terapéutico (8) o agente de diagnóstico (9) en el interior líquido (10) del liposoma lleno de líquido (7). Adicionalmente, cada uno de los liposomas llenos de líquido (7) pueden contener independientemente una fracción de acceso de alta afinidad (11) unida a la superficie (13) del liposoma lleno de líquido (7).

Tal como se emplea aquí, "continuo" o "contiguo", con respecto a los liposomas llenos de líquido (7) unidos a la superficie de la microesfera llena de gas (3) recubierta de lípido (5) o tensioactivo (6), se refiere a una porción significativa (por ejemplo, por lo menos alrededor de 50%) de la superficie externa (12) de la microesfera llena de gas (3) estando cubierta con liposomas llenos de líquido (7).

Tal como se emplea aquí, "fracción de acceso", se refiere a una molécula orgánica biocompatible, molécula inorgánica biocompatible, proteína, péptido, peptidomimético, polisacárido u otra molécula que tiene alta afinidad para un receptor, enzima, mRNA o ADN. La molécula orgánica biocompatible, molécula inorgánica biocompatible, proteína, péptido, peptidomimético, polisacárido u otra molécula se altera en su expresión en un sitio de patología *in-vivo* relativo al tejido normal circundante. Adicionalmente, esta fracción de acceso está principalmente ligada o unida a la superficie de los liposomas llenos de líquido (7).

465

Tal como se emplea aquí, "alta afinidad" se refiere a una afinidad de unión de menos de alrededor de $1\mu\text{m}$, cuando se expresa como la constante de disociación, K_d , para la interacción de una sola fracción de acceso y la diana biológica (por ejemplo, receptor, enzima, mRNA, o ADN).

Tal como se emplea aquí, "paciente" se refiere a alguien que está sufriendo de una enfermedad o trastorno dado y necesitado de tratamiento para la enfermedad o trastorno dado. Pacientes adecuados incluyen, por ejemplo, animales. Animales adecuados incluyen, por ejemplo, mamíferos. Los mamíferos adecuados incluyen, por ejemplo, humanos.

Tal como se emplea aquí, "tratar" o "tratamiento" se refiere al tratamiento de una enfermedad o trastorno en un paciente e incluye: (i) evitar la ocurrencia de la enfermedad o trastorno en un paciente, en particular cuando dicho paciente tiene predisposición a la enfermedad o trastorno, pero cuyo diagnóstico aún no la registra; (ii) inhibir la enfermedad o trastorno, es decir, detener su desarrollo; y/o (iii) aliviar la enfermedad o trastorno, es decir, causar la regresión de la enfermedad o trastorno.

Microesfera llena de Gas

Tal como se emplea aquí, una "microesfera llena de gas" es una microburbuja suspendida en un medio en donde la microburbuja tiene una forma esférica nominal, por encima de aproximadamente el punto de congelamiento del medio y por debajo de aproximadamente el punto de ebullición del medio, y por encima de aproximadamente una presión de 0 atm y por debajo de aproximadamente una presión de 5 atm (por ejemplo, temperatura y presión estándar).

Como se ilustra en Figura 2 y Figura 3, el compuesto de liposomas de microesfera de gas (1) (MSLC) incluye una microesfera llena de gas (3). Típicamente, la microesfera llena de gas (3) es acústicamente activa. La microesfera llena de gas (3) tiene típicamente



una solubilidad de menos de alrededor de 1.0% (v/v) en agua a 25°C y 1 atm. Además, la microesfera llena de gas (3) tiene típicamente un diámetro promedio de alrededor de 0.1 μm a alrededor de 10 μm . Preferiblemente, la microesfera llena de gas (3) tendrá un diámetro promedio de alrededor de 0.5 μm a alrededor de 10 μm .

La microesfera llena de gas (3) incluirá típicamente uno o más gases inertes adecuados (4). Gases inertes adecuados (4) de la presente invención son bien conocidos en el campo de los agentes de contraste ultrasónico. Gases inertes adecuados (4) útiles en la presente invención se divulgan, por ejemplo, en Unger, y colaboradores, (Patente de los Estados Unidos No. 5.547.656; Patente de los Estados Unidos No. 5,527,521; Patente de los Estados Unidos No. 5.228,446; Patente de los Estados Unidos No. 5,585,112; Patente de los Estados Unidos No. 5,769.080; y Patente de los Estados Unidos No. 5,715.824), Quay, y colaboradores, (Patente de los Estados Unidos No. 5.573,751 y Patente de los Estados Unidos No. 5.558.094) y Schneider (Patente de los Estados Unidos No. 5.271,928; Patente de los Estados Unidos No. 5,380.519; y Patente de los Estados Unidos No. 5,531,980). Éstos pueden incluir gases y precursores gaseosos (es decir, líquidos que experimentan una transición a la fase gaseosa bajo presión reducida o temperatura elevada). Gases inertes preferidos (4) son de baja solubilidad en la sangre, son no reactivos, no metabolizables y/o son atóxicos en pacientes (por ejemplo, mamíferos). Gases inertes adecuados (4) útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, gases de carbono perfluórico (por ejemplo $\text{C}_2\text{-C}_6$ carbonos perfluóricos), gases de éter perfluórico, nitrógeno, y gases nobles (por ejemplo, helio, argón, y neón).

Compuesto de Liposomas de Microesfera de Gas (MSLC)

El compuesto de liposomas de microesfera de gas (1) incluye una microesfera llena de gas (3): por lo menos uno de un lípido (5) y un tensioactivo (6) adsorbido en la superficie externa (12) de la microesfera llena de gas (3); y liposomas llenos de líquido (7) unidos al lípido (5) o

67
6

tensioactivo (6). El compuesto de liposomas de microesfera de gas (1) (MSLC) tendrá típicamente un diámetro promedio de alrededor de 0.1 μm a alrededor de 10 μm . Preferiblemente, el compuesto de liposomas de microesfera de gas (1) tendrá un diámetro promedio de alrededor de 0.2 μm a alrededor de 4 μm . El compuesto de liposomas de microesfera de gas (1) tendrá típicamente una densidad de alrededor de 0.90 a alrededor de 1.10 de la densidad del medio (2). El compuesto de liposomas de microesfera de gas (1) (MSLC) puede existir como un agregado de dos o más compuestos de liposomas de microesfera de gas (1). El agregado tendrá típicamente un diámetro de alrededor de 1 μm a alrededor de 100 μm .

Lípido y Tensioactivo

Como se ilustra en Figura 2 y Figura 3, el compuesto de liposomas de microesfera de gas (MSLC) (1) incluye por lo menos uno de un lípido (5) y tensioactivo (6) adsorbido en la superficie exterior (12) de la microesfera llena de gas (3). El lípido (5) o tensioactivo (6) puede existir como una capa mono-molecular, una capa bi-molecular, o una capa multi-molecular en la superficie externa (12) de la microesfera llena de gas (3). El tensioactivo (6) se adsorbe rápidamente a la superficie exterior (12) de la microesfera llena de gas (3) y reduce así la tensión superficial del gas inerte de baja solubilidad (4) o gases. Adicionalmente, el tensioactivo (6) actúa como una superficie de contacto a la cual pueden adherirse los LFLs (7).

El tensioactivo (6) puede ser cualquier tensioactivo no iónico adecuado, tensioactivo catiónico, o tensioactivo aniónico. Tensioactivos no iónicos apropiados incluyen, por ejemplo, polietilen glicol, polipropilen glicol, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, celulosa, gelatina, goma xantana, pectina, y dextrina. Tensioactivos catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, tetraalquilamonio, tetraalquifosfonio, o sales apropiadas de los mismos. Tensioactivos catiónicos adecuados, por ejemplo, tetrahexilamonio, tetradecilamonio, tetrabutylamonio, tetrahexilfosfonio, tetradecilfosfonio, tetrabutylfosfonio, tetrafenilfosfonio, y sales adecuadas de los mismos. Tensioactivos aniónicos apropiados incluyen, por ejemplo, alquilsulfonato,

9/68

alquilcarboxilato, y sales apropiadas de los mismos. Tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, por ejemplo, dodecilsulfato, palmitilsulfato, dodecilcarboxilato, palmitilcarboxilato, y sales apropiadas de los mismos.

Lípidos adecuados (5) incluyen, por ejemplo, fosfolípidos, glicolípidos, triglicéridos y ácidos grasos. Fosfolípidos apropiados incluyen, por ejemplo, cloruro de dipalmitoilfosfatidil colina, dimiristoilfosfatidil colina, dilaurioilfosfatidil colina, y dioleoilfosfatidil colina.

Liposomas Llenos de Líquido (LFLs)

Como se ilustra en Figura 2 y Figura 3, el compuesto de liposomas de microesfera de gas (1) (MSLC) incluye liposomas llenos de líquido (7) (LFLs) unidos al lípido (5) o tensioactivo (6). La presencia de liposomas llenos de líquido (7) estabiliza la microesfera llena de gas (3) encapsulada en tensioactivo o encapsulada de lípido. Uno o más de los liposomas llenos de líquido (7) incluirá típicamente líquido del medio de suspensión (2) (es decir, medio (2)). Preferiblemente, cada uno de los liposomas llenos de líquido (7) incluirá típicamente líquido del medio de suspensión (2). La presencia de líquido del medio de suspensión (2) en el interior líquido (10) (por ejemplo, el volumen de intervalo) de los liposomas llenos de líquido (7) posibilita composiciones de microesfera que tienen densidades próximas (por ejemplo, en alrededor de 20%) a la del medio de suspensión (2), minimizando así la flotación y/o separación de la microesfera.

Los LFLs (7) pueden contener uno o más medicamentos (por ejemplo, agentes terapéuticos (8) y/o agentes de diagnóstico (9)) en el volumen interno lleno de líquido. Debido a que los LFLs (7) se unen a la microesfera llena de gas (3) recubierta de tensioactivo o recubierta de lípido, los LFLs (7) pueden explotar con la estimulación de ultrasonido del gas interno, liberando así el uno o más medicamentos (por ejemplo, agentes terapéuticos (8) y/o agentes de diagnóstico (9)) en un órgano enfermo o tejido. Los liposomas llenos de líquido (7), sin embargo, tienen actividad acústica limitada por sí mismos.

Los LFLs (7) unen y estabilizan la microesfera llena de gas (3) encapsulada por el tensioactivo o por el lípido. Esto permite MSLCs (1) que tienen densidades próximas (por ejemplo, en alrededor de 20%) a la del medio de suspensión (2), minimizando así la flotación y/o separación de la microesfera de gas. Esto permite también suspensiones de microesfera de gas que son relativamente uniformes en distribución de tamaño (por ejemplo, alrededor de 1 μm a alrededor de 5 μm) durante un período razonable de tiempo después de la preparación (por ejemplo, hasta alrededor de 30 minutos).

Los liposomas llenos de líquido (7) ocupan típicamente más de alrededor del 50% del área superficial de la microesfera. En consecuencia, los liposomas llenos de líquido (7) están típicamente unidos al lípido absorbido (5) o tensioactivo (6) en una forma esencialmente continua. Esta orientación provee propiedades extraordinarias de flotación para los MSLCs (1), que proporciona suspensiones relativamente estables con propiedades de respuesta acústica excelentes y reproducibles, cuando se diluyen en suspensiones acuosas.

El tamaño de los LFLs (7) es relativamente importante. Los liposomas llenos de líquido (7) deben tener preferiblemente diámetros que son menos de alrededor de 10% del diámetro de la microesfera llena de gas (3). El rango de máximo interés para la mayoría de agentes de ultrasonografía *in vivo* o administración de medicamento lo constituyen MSLCs (1) que tienen un diámetro total entre alrededor de 1 μm y alrededor de 5 μm , y están hechos de liposomas llenos de líquido (7) de menos de 100nm de diámetro. Liposomas llenos de líquido (7) más grandes (por ejemplo, mayores de alrededor de 0.2 μm de diámetro) crean MSLCs (1) de diámetro total que exceden el diámetro de los vasos capilares en el cuerpo. Esto generaría una situación de riesgo con respecto al taponamiento capilar, así como a la toxicidad biológica consecuente, asociada con el bloqueo de la microcirculación de sangre a los tejidos. Por consiguiente, es altamente preferible utilizar LFLs (7) de menos de alrededor de 100nm de diámetro para crear MSLCs (1) de las

dimensiones apropiadas para uso seguro en pacientes vivos (por ejemplo, mamíferos). Cada uno de los liposomas llenos de líquido (7) tiene típicamente un diámetro de alrededor de 10nm a alrededor de 200nm. Preferiblemente, cada uno de los liposomas llenos de líquido (7) tendrá un diámetro de alrededor de 20nm a alrededor de 100nm. Adicionalmente, cada uno de los liposomas llenos de líquido (7) tendrá típicamente un diámetro que es menos de alrededor de 10% del diámetro de la microesfera llena de gas (3).

Como se ilustra en Figura 2 y Figura 3, uno o más de los LFLs (7) pueden incluir uno o más medicamentos adecuados (por ejemplo, agentes terapéuticos (9) y/o agentes de diagnóstico (9)) en el volumen interno lleno de líquido. Cada uno de los liposomas llenos de líquido (7) puede incluir independientemente uno o más medicamentos (por ejemplo, agentes terapéuticos (8) y/o agentes de diagnóstico (9)) en el interior líquido (10) de los liposomas llenos de líquido (7). Los LFLs (7), cuando se unen a la superficie de la microesfera llena de gas (3) cubierta de tensioactivo o cubierta de lípido, pueden hacerse explotar con la estimulación de ultrasonido y liberar el uno o más medicamentos terapéuticos (por ejemplo, agentes terapéuticos (8)) en un órgano enfermo o tejido en una forma localizada y concentrada. El ultrasonido de energía elevada es generalmente capaz de hacer que la microesfera llena de gas (3) se expanda y contraiga rápidamente, lo cual lleva eventualmente a la ruptura de la burbuja de gas. La energía ultrasónica capturada por la microesfera llena de gas (3) hará que el MSLC (1) se fragmente y rompa, a su vez, liberando el uno o más medicamentos (por ejemplo, agentes terapéuticos (8)) contenidos en el interior de los LFLs (7) unidos a la superficie del MSLC (1).

Clases apropiadas de agentes terapéuticos (8) comprenden, por ejemplo, anticoagulantes, trombolíticos, agentes antineoplásicos, y agentes anti-inflamatorios. Se divulgan agentes terapéuticos específicos adecuados (8), por ejemplo, en (PCT/US99/13682), e incluyen, por ejemplo, doxorubicina, ciclofosfamida, adriamicina,

metotrexato, gemcitabina, navelbina, cisplatino, activador de plasminógeno tisular, integrelina, roxifiban, metotrexato y enbrel. En una incorporación preferida de la presente invención para liberación de medicamento estimulada por ultrasonido, los MSLCs (1) incluyen tanto fracciones de acceso de alta afinidad (11) y medicamentos terapéuticos (por ejemplo, agentes terapéuticos (8)) en la solución de los LFLs (7), con el fin de maximizar el índice terapéutico y la cantidad de medicamento administrado por la microburbuja de gas.

Clases adecuadas de agentes de diagnósticos (9) incluyen, por ejemplo, agentes de contraste de rayos X y agentes de contraste MRI. Agentes de diagnóstico idóneos (9) incluyen, por ejemplo, agentes de contraste de rayos X no iónicos, yodados, agentes de contraste de rayos X iónicos, yodados, agentes de contraste MRI que contienen gadolinio, agentes de contraste MRI que contienen hierro, y agentes de contraste MRI que contienen manganeso.

El uso de agentes de diagnósticos (9) en los LFLs permitirán lograr la intensificación de la ultrasonografía (por ejemplo, retrodispersión) y los rayos X o la intensificación de la imagen MRI con una composición MSLC.

Para administración "señal" de uno o más medicamentos (por ejemplo, agentes terapéuticos (8) y/o agentes de diagnóstico (9)) a una condición patológica seleccionada, los LFLs (7) de la presente invención pueden derivarse con una fracción de acceso (11), de alta afinidad, que se enlaza covalentemente o se adsorbe sobre la superficie (13) de los LFLs (7). Como tales, los liposomas llenos de líquido (7) pueden tener típicamente una o más fracciones de acceso adecuadas (11), de alta afinidad, unidas a la superficie (13) de los liposomas llenos de líquido (7). Esto provee LFLs (7) que son capaces de proporcionar intensificación de contraste ultrasónico a sitios de patología *in vivo*. Esto se realiza proporcionando ligandos en los LFLs (7) que tienen alta afinidad para receptores, enzimas, mRNA, o ADN que se sobreexpresan o alteran en células disfuncionales en sitios de enfermedades.

Alternativamente, estas fracciones de acceso (11) unidas a los LFLs (7) pueden adherirse a receptores de tejido normal para el diagnóstico selectivo por imágenes de tejidos normales, en contraste con la ausencia de intensificación acústica del tejido enfermo adyacente que carece del receptor que se está tomando como objetivo por los LFLs (7). Uno o más de los LFLs (7) pueden incluir, en el medio líquido interior (10), uno o más agentes de diagnóstico apropiados (9) del medio de suspensión (2).

Anteriormente se han divulgado fracciones de acceso idóneas de alta afinidad (11), que pueden incorporarse en la superficie (13) de los LFLs (7) para dirigir el MSLC (1) a sitios específicos de patología. Véase, por ejemplo, Unger (PCT/US96/09938), Allen (Patente de los Estados Unidos No. 5,620,689) y Quay (EP 0727225), que aportan muchos ejemplos de las fracciones de acceso biológicas que pueden incorporarse en componentes tensioactivos (6) o lípidos (5) de agentes de ultrasonografía, dirigidos o composiciones de administración de medicamento. Entre éstos se encuentran anticuerpos específicos de tumores, péptidos específicos de receptor y peptidomiméticos tales como moléculas de adhesión celular, y similares.

Fracciones de acceso específicas adecuadas (11) incluyen, por ejemplo, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoato; DPPE-PEG₃₄₀₀-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoato; 1-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino)- α,ω -dicarbonil PEG₃₄₀₀-2-{[7-(N-hidroxycarbamoil)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo[10.2.2]hexadeca-1(15), 12(16), 13-trien-3-il]carbonilamino}-N-(3-aminopropil)acetamida; y 1-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino)- α,ω -dicarbonil PEG₃₄₀₀-[7-(N-hidroxycarbamoil)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo[10.2.2]hexadeca-1(15), 12(16), 13-trien-3-il]-N-{[4-(aminometil)fenil]metil}carboxamida.

Los liposomas llenos de líquido (7) usados en la presente

X 23

invención son bien conocidos en el arte. Entre los materiales preferidos para elaborar liposomas para uso en la presente invención se encuentran fosfolípidos que pueden ser catiónicos, aniónicos o iónicos dipolares en naturaleza, y pueden usarse en mezclas. Existen muchas fuentes sobre la composición y preparación de liposomas. Por ejemplo, véase New (R.R.C. New, editor, Liposomes, a practical approach, Oxford University Press, Oxford, UK, 1990), Tyrrell ("New Aspects of Liposomes", D. A. Tyrrell, T. D. Heath, C. M. Colley & B. E. Ryman, Biochimica & Biophysica Acta. 457 (1976), 259-302), Schneider (Patente de los Estados Unidos No. 4,224,179), Woodle (MC Woodle and D. Papahadjopoulos, Methods in Enzymology 171, 193, 1989). En particular, Papahadjopoulos (Patente de los Estados Unidos No 4,235,871) ha descrito métodos para formar LFLs que comprenden agentes terapéuticos.

Control de Distribución del Tamaño Medio y Estabilidad del MSLC

El tamaño y la estabilidad de los MSLCs puede controlarse a través de varios parámetros, por ejemplo, concentración del lípido en solución; el diámetro de los LFLs; el peso molecular del tensioactivo de polímero, por ejemplo, polietilen glicol (PEG), incluido en la composición; y la concentración del polímero usado.

1. La concentración de los fosfolípidos en solución

La variación de la concentración de lípido controlará la distribución del tamaño y la estabilidad del liposoma lleno de líquido y esto, a su vez, ajustará el tamaño del MSLC que se forma y estabiliza en suspensión. El tamaño medio de los MSLCs estabilizados en suspensión es directamente proporcional a la concentración y el tamaño de los LFLs iniciales. Puesto que el número y tamaño de los LFLs depende de la cantidad de lípido (por ejemplo, fosfolípido) disponible, la concentración de lípido inicial afectará directamente el número y el tamaño de la distribución del

174
PCT

MSLC que se estabiliza en suspensión.

2. El diámetro del LFL

Independiente de la concentración de lípido (por ejemplo, fosfolípido), el tamaño de los MSLCs en suspensión puede variarse modificando el tamaño del LFL por medios físicos. El tamaño del LFL puede variarse por métodos tales como extrusión o ultrasonificación, que son bien conocidos en la ciencias de los liposomas (véase, por ejemplo, R.R.C. New, editor, Liposomes, a practical approach, Oxford University Press, Oxford, UK, 1990). Como se describe anteriormente, la variación del tamaño del LFL resultará en la variación de las distribuciones del tamaño de los MSLCs (es decir, LFLs más pequeños en el rango de tamaño de menos de alrededor de 100nm producirán MSLCs más pequeños en el rango de menos de alrededor de 10µm).

3. El peso molecular del tensioactivo usado en la composición

El peso molecular del tensioactivo polimérico (iónico o no iónico) en la preparación puede usarse para afectar el diámetro promedio de los MSLCs formados. Por ejemplo, un peso molecular más alto de polietilén glicol (PEG), enlazado covalentemente a otros componentes/lípidos de la composición o añadidos como PEG libre en solución, puede usarse para estabilizar MSLCs de mayor tamaño, que contienen microburbuja gaseosa, una vez se introduce el gas en el sistema. Por ejemplo, variando el peso molecular del PEG de 500 a 10.000, puede ajustarse el diámetro del MSLC.

4. Concentración del polímero

El tamaño del MSLC puede controlarse variando la concentración del tensioactivo polímero en la suspensión liposomal. Un aumento en la concentración del polímero en la composición resulta típicamente en un incremento en el tamaño medio y/o concentración de los MSLCs en suspensión.

Preparación de Compuestos de liposomas de microesfera de gas

Los compuestos de liposomas de microesfera de gas (MSLCs) descritos aquí pueden prepararse mezclando un gas de baja solubilidad acuosa con una solución acuosa, que contenga un tensioactivo y liposomas llenos de líquido en suspensión. Esto puede lograrse por mezclado mecánico, ultrasonificación o inyección a alta velocidad del gas en el líquido que contiene el tensioactivo y los LFLs.

Para formar los LFLs iniciales, pueden suspenderse fosfolípidos en una solución acuosa espesa, la cual puede incluir además un material surfactivo, así como componentes no acuosos, tales como glicerol o propilen glicol, o coadyuvantes en suspensión tales como polisacáridos, proteínas o polímeros sintéticos, con la condición que dichos componentes sean parenteralmente aceptables (es decir, no tóxicos). Métodos para preparar los LFLs usados en la presente invención para preparación de MSLCs se han descrito previamente por Woodle (M.C. Woodle and D. Papahadjopoulos, Methods in Enzymology 171, 193, 1989).

Si se desea el biodirecccionamiento del MSLC, entonces los LFLs pueden tener la fracción de acceso, de alta afinidad, enlazada covalentemente o adsorbida a la superficie del liposoma lleno de líquido. Las fracciones de acceso pueden adsorberse a la superficie del MSLC o, más preferiblemente, unirse covalentemente al LFL como un éster fosfolípido o unirse a un componente PEG del MSLC (véase Allen Patente de los Estados Unidos No. 5,620,689). En el caso de MSLCs para liberación de medicamento estimulada por ultrasonido, los LFLs pueden prepararse para incluir un agente terapéutico en el volumen de líquido interior de los liposomas, preparando los liposomas en un medio acuoso, que contenga tensioactivo que incluya el medicamento, seguido por mezclado o sonicado del medio con un gas inerte apropiado.

El control del diámetro del LFL en el rango de tamaño de menos de alrededor de 100nm es importante para formar y estabilizar MSLCs del

76

rango de tamaño deseado (por ejemplo, mayor de alrededor de 0.5 μm y menos de alrededor de 10 μm de diámetro) para ultrasonografía y liberación de medicamento estimulada por ultrasonido. En la literatura se han descrito métodos para controlar el tamaño de los LFLs (véase, por ejemplo, R.R.C. New, editor, Liposomes, a practical approach, Oxford University Press, Oxford, UK, 1990, páginas 36-85). Son particularmente efectivas técnicas de microfluidización para elaborar LFLs del tamaño deseado como se describe en Cook, y colaboradores, (Patente de los Estados Unidos No. 4,533.254).

Prueba de Estructura

Para demostrar la existencia de esta novedosa estructura (designada como compuesto de liposomas de microesfera de gas (MSLC)), el sistema de liposomas descrito en Ejemplo 1 se preparó y analizó usando cuatro técnicas, Microscopía Óptica, Microscopía Electrónica de Transmisión, Sondeo de Fluorescencia y Microscopía de Rayos X Suaves. Estas técnicas proporcionan información sobre la macroestructura (mayor de alrededor de 1 μm en tamaño), microestructura (10 nm a $\sim 1000\text{nm}$), y el microambiente del sistema químico (al nivel molecular).

Microscopía Óptica

La Microscopía Óptica permite la determinación del tamaño y forma de un objeto en el rango de micrones. Por lo tanto, una composición MSLC con un diámetro en el rango de alrededor de 1 a alrededor de 10 μm es visible usando un microscopio 1000X, y tendrá un tamaño de aumento de alrededor de 1 a alrededor de 10 mm de diámetro. La Microscopía Óptica se realizó para mostrar que los MSLCs son esféricos en su forma, y están presentes en el rango de tamaño alrededor de 1 a alrededor de 10 μm de diámetro.

Después de la preparación de la suspensión MSLC (por ejemplo, como se describe en Ejemplo 1), alrededor de 0.5 mL se retiran lentamente de la ampolla usando una jeringa (jeringa B-D 5 cc y guía de

27
X

precisión 22 1/2 G aguja: 0.70 mm x 40 mm). La muestra se puso en un porta-objeto de Gota Oscilante (18 mm diámetro: 0.5 mm de profundidad) y cubierta con una cubreplaca. Luego se puso una gota de aceite para microscopio en la cubreplaca. La muestra se examinó con un Microscopio Olympus BHA-P, equipado con un ocular 10X y un Objetivo 100X Acromático de Inmersión en Aceite, que dio un aumento general de 1000X. La imagen resultante mostró objetos esféricos que variaban de tamaño desde menos de 1 μm a más de 10 μm . Los MSLCs llenos de gas de más de aproximadamente 2 μm de diámetro parecen ser agregados de unidades MSLC primarias de tamaño más pequeño.

Microscopía Electrónica

La presencia de los LFLs en la superficie de los MSLCs se demostró usando microscopía electrónica de transmisión (TEM). La microscopía electrónica de transmisión usa un rayo de electrones para iluminar un espécimen. El rayo de electrones se opera con alto vacío, y puede aumentar hasta 1,000,000X. Tanto el alto vacío como el rayo de electrones pueden ser nocivos a los sistemas que se están estudiando. Por consiguiente, con el fin de examinar muchas muestras, éstas tienen que ser delgadas, secas y contener usualmente un tinte de contraste.

Una técnica para examinar estructuras de liposomas es la tinción negativa. La tinción negativa intensifica la imagen de una estructura rodeando o incorporando el espécimen en un material denso de electrones. La muestra se examina bajo TEM usando ácido fosfotúngstico (PTA) como tinte, antes del mezclado del gas y el sistema acuoso que contiene la mezcla tensioactivo-liposoma, así como después del mezclado para demostrar la formación del MSLC.

Para el sistema tensioactivo-LFL antes de mezclar con el gas (la muestra "inactivada"), seis gotas del sistema pre-activado se agregan a 1 ml de 0.3% tinte PTA y se agitó suavemente. La mezcla se dejó reposar durante 5 minutos sin alteración, y luego se aplicó una gota de

28

la mezcla a la placa de la rejilla. La rejilla se secó con aire sobre un pedazo de papel de filtro durante 30 minutos, antes de pasarla a la caja portadora de la rejilla para el estudio TEM.

Para la muestra MSLC (luego de mezclar con el gas), se agregó una gota a 1 mL de 0.3% tinte PTA y se mezcló suavemente. Entonces se aplicó una gota de la solución a la rejilla. Se retiró el exceso de solución mediante absorción capilar y secamiento con aire.

Las imágenes TEM muestran que la composición, antes de mezclar con un gas carbono perfluórico, contiene liposomas de alrededor de 50nm a alrededor de 100nm. Las imágenes TEM de la suspensión MSLC post-mezclado (luego de mezclar con un gas carbono perfluórico) muestran MSLCs de alrededor de 300 nm a alrededor de 1000nm, que incluyen el espacio vacío de una microesfera lleno de gas, con una envoltura de lípido o tensioactivo que tiene unidades de liposomas de alrededor de 50nm a alrededor de 100nm a lo largo de la superficie.

Análisis de Fluorescencia

Se emplearon experimentos de sonda fluorescente para estudiar las propiedades químicas generales de un sistema de liposomas. Una sonda fluorescente es un fluoróforo, típicamente pireno, que se localiza en una región específica de un liposoma y responde a un fotón de energía produciendo una emisión de fluorescencia. Esta emisión puede usarse para determinar el microambiente (micropolaridad) y la concentración localizada del fluoróforo en el sistema.

Para este experimento, se inyectó pireno en ampollas de medio de control (solución sin tensioactivo o liposomas llenos de líquido), ampollas de tensioactivo y liposomas llenos de líquido (antes de mezclar con un gas de carbono perfluórico) y en ampollas que contenían MSLCs en suspensión (después del mezclado a alta velocidad de la composición con propano perfluórico) para comparar los espectros de fluorescencia del pireno. El medio de control que se usó consistía en una mezcla de 80% solución de cloruro de sodio (9% NaCl), 10% propilen glicol y 10% glicerol. La

suspensión MSLC se preparó como se describe en Ejemplo 1.

Los resultados del estudio mostraron que la polaridad microambiental del pireno en el medio de control era consistente con el pireno que se estaba disolviendo en un ambiente puramente acuoso. La polaridad microambiental del pireno en el sistema tensioactivo/liposoma lleno de líquido (antes del mezclado del gas) fue consistente con el pireno que se estaba disolviendo en la membrana de lípido de los LFLs. Luego del mezclado mecánico a alta velocidad del gas de carbono perfluórico con el sistema tensioactivo/liposoma lleno de líquido, se evidenció que la concentración local del pireno aumentó de una manera consistente con la presencia de un sistema agregado de liposoma, similar a la estructura MSLC observada en el experimento TEM.

Microscopía de Rayos X Suaves

Rayos X suaves son rayos X con una energía de alrededor de 100 a alrededor de 1000 eV. Estas energías se acoplan bien a los bordes de absorción de la envoltura K de átomos de Z bajo, como carbono y oxígeno, o bordes de la envoltura L de átomos como calcio. La longitud de onda de estos rayos X está en el rango de 1 a 10 nm, mientras que la de aquellos de luz visible es 350-700 nm. Esto hace posible una radiografía de muy alta resolución. La microscopía de rayos X suaves proporciona alta resolución a la vez que evita la destrucción de la muestra; los rayos X tienen efectos mínimos sobre la muestra.

Suspensiones MSLC se estudiaron usando esta técnica de microscopía de rayos X suaves. La muestra se preparó entre dos membranas de nitruro de silicona. Las membranas tienen un espesor de 100nm y un tamaño de 3mm x 3mm en un marco de silicona de 9mm x 9mm de 200 micrones de espesor. Luego de montar una membrana a cada lado de la celda húmeda, se utilizó una jeringa para poner una gotícula muy pequeña (menos de alrededor de 5 μ L, pero sin un volumen definido) del material MSLC en una de las membranas. Para

8/80

estos experimentos no hay dilución o pretratamiento de la muestra. A continuación, se unieron las dos partes de la celda húmeda y se apretaron con tornillos. El espesor de la capa de la muestra entre las dos membranas se verificó con un microscopio de luz visible. Si el espesor de la capa no era el apropiado, se ajustaban los tornillos para obtener el espesor correcto. Se puso una pequeña gotícula de agua en la ranura del reservorio de la celda húmeda para evitar la evaporación de la muestra. La ranura del reservorio se selló con un pedazo pequeño de cinta y luego se montó la celda húmeda en el microscopio.

Los resultados de la microscopía de rayos X mostraron que el sistema, luego del mezclado a alta velocidad con gas de propano perfluórico, contenía MSLCs de alrededor de 300nm a alrededor de 500nm con unidades de liposomas llenos de líquido de alrededor de 50nm a alrededor de 100nm, esencialmente a lo largo de toda la superficie limítrofe.

Los MSLCs pueden usarse como agentes de contraste ultrasónico de propósito múltiple para uso ultrasónico de diagnóstico. Pueden modificarse además para contener fracciones biológicas de acceso, enlazadas o absorbidas a los liposomas llenos de líquido en la superficie del MSLC, para proporcionar localización selectiva de los MSLCs en el cuerpo. Los MSLCs biológicamente tomados como objetivo son útiles para ultrasonografía de contraste "señal" de procesos patológicos específicos. Adicionalmente, estos MSLCs biológicamente tomados como objetivo pueden utilizarse para administración localizada de medicamentos, que se encapsulan dentro de los liposomas llenos de líquido y se liberan con la exposición de los MSLCs a energía ultrasónica *in vivo*.

La formulación puede administrarse intravenosa o intraperitonealmente por infusión o inyección. Las soluciones de la formulación pueden prepararse en agua, mezcladas en forma opcional con un tensioactivo atóxico. Las dispersiones pueden prepararse en soluciones acuosas que contengan glicerol, polietilen glicoles líquidos, u otros diluyentes parenterales apropiados.

Las presentaciones farmacéuticas aptas para inyección o infusión pueden incluir soluciones acuosas estériles o dispersiones o polvos estériles que comprenden la formulación, los cuales se adaptan para la preparación extemporánea de soluciones inyectables o infusionables estériles o dispersiones, opcionalmente encapsuladas en liposomas. En todos los casos, la presentación farmacéutica última debe ser estéril, fluida y estable bajo las condiciones de manufactura y almacenamiento. El transportador líquido o vehículo es un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como una mezcla de agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, polietilen glicoles líquidos), y similares. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por la formación de liposomas, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro de sodio. La suspensión prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso de agentes tales como gelatina, celulosa, polivinil pirrolidona o coadyuvantes de suspensión similares.

Soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los ingredientes requeridos ya enumerados, seguidos por esterilización de filtrado. Cuando se emplean polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secamiento por vacío y secamiento por congelamiento, que producen un polvo del ingrediente(s) activo(s) más cualquier ingrediente adicional deseado presente en las soluciones previamente estériles-filtradas.

Los compuestos de liposomas de microesfera (MSLCs) se inyectan a un paciente o humano como una suspensión que contiene aproximadamente 10^3 a 10^9 compuestos de liposomas de microesfera en un medio principalmente acuoso. Luego de dejar tiempo suficiente para que los MSLCs circulen por todo el cuerpo, se utiliza una máquina de ultrasonografía (tal como se emplea rutinariamente en la práctica clínica) para radiografiar o (con energías más elevadas o pulsos de insonación repetidos) romper los MSLCs para liberar un medicamento terapéutico

82
[Handwritten signature]

en el sitio de enfermedad o en un órgano de interés, por ejemplo, el corazón, o en tumores, o en sitios de inflamación.

La capacidad de una formulación de la invención para actuar como agente de contraste para la generación de imágenes puede determinarse usando modelos farmacológicos, que son bien conocidos en el campo. Por ejemplo, véase Villanueva y colaboradores (Villanueva, F.S., Glasheen, W.P., Sklenar, J., Kaul, S. Circulation, **88**, 596-604 (1993)).

La capacidad de una formulación de la invención para actuar como agente terapéutico puede determinarse usando modelos farmacológicos que son bien conocidos en el campo. Véase, por ejemplo, Unger (PCT/US961/09938) (WO96/40285).

La invención se ilustrará ahora por los siguientes Ejemplos no limitantes.

Preparación de Agente de Contraste MSLC para Diagnóstico de Propósito General

Ejemplo 1

Se preparó una solución salina de glicerol (100 ml) que incluía glicerol (10 ml) y NaCl (680 ± 2 mg) en agua (a un volumen final de 100 ml). DPPC (dipalmitoil fosfatidil colina) (40.0 mg), MPEG500 DPPE (dipalmitoil fosfatidil etanolamina) (30.0 mg), y DPPA (4.5 mg) se mezclaron con propilen glicol (10 ml) en un matraz aforado de 100 ml, el cual se puso en un baño de agua caliente (70°C) y se sonicó durante 15 minutos hasta que la solución se aclaró. A continuación se agregó la solución salina/glicerol para llevar la mezcla a un volumen final de 100 ml, y se mezcló bien la suspensión. La suspensión (1.6 ml) se transfirió a una ampolla de vidrio de borosilicato de 2 ml. El espacio de cabeza se purgó con gas propano perfluórico, y la ampolla se taponó y se selló. El tapón era West Gray V 50 lyo 13 mm, formulación elastomérica 4416/50. El sello era un sello de aluminio "flip

1/2/83

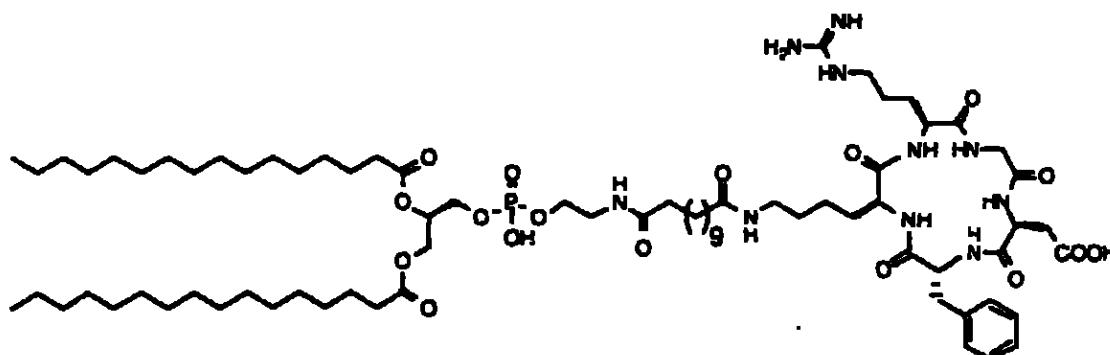
off". La ampolla que contenía la suspensión de lípido se agitó durante 45 segundos usando el IONOS Ionomix®. Luego de agitar, la suspensión se tornó de color blanco lechoso.

Preparación de Material MSLC para Diagnóstico Biológicamente Direccionado

Ejemplos 2 y 3 describen la síntesis agentes ultrasónicos de contraste de la presente invención, que comprenden fracciones de acceso para neovascularización tumoral, que son antagonistas $\alpha v \beta 3$.

Ejemplo 2

Parte A. Síntesis de 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-Dodecanoato Conjugado



Disuccinimidil dodecanoato (0.424 g, 1 mmol); 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) (1.489 g, 1 mmol); y sal ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) TFA (0.831 g, 1 mmol) (véase U.S. Serial No. 09/281,474 para la síntesis esta fracción de acceso peptídica cíclica, método que se incorpora aquí por referencia) se disuelven en cloroformo (25 ml) mientras se agita (5 min). Se agregan carbonato de sodio (1 mmol) y sulfato de sodio (1 mmol) y se agita la solución a temperatura ambiente bajo nitrógeno (18 h). Se retira cloroformo *in vacuo* y el compuesto del título se purifica de la mezcla de producto crudo por HPLC preparativa o recristalización.

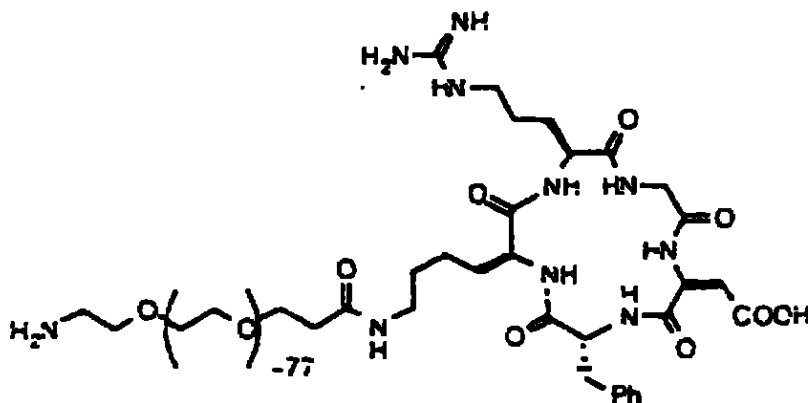
Parte B. Preparación de Composición de Agente de Contraste

144

El 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoato conjugado se mezcla con tres otros lípidos – ácido 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfotídico; 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina; y N-(metoxipolietilen glicol 5000 carbamoil)-1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina – en cantidades relativas de 2: 4: 54: 40 en peso. En una ampolla de vidrio de 2 cc se prepara una suspensión acuosa que contiene esta mezcla de lípido (1 mg/mL), cloruro de sodio (7 mg/mL), glicerina (0.1 mL/mL), y propilen glicol (0.1 mL/mL), a pH 6-7. El aire en la ampolla se evacúa y reemplaza con propano perfluórico, y la ampolla se sella. La suspensión se agita en la ampolla sellada en un amalgamador dental durante 30-45 segundos para formar una solución de color blanco lechoso, que es apta para uso como agente de contraste ultrasónico para radiografiar vasos angiogénicos.

Ejemplo 3

Parte A. Preparación de ω -amino-PEG₃₄₀₀-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys):

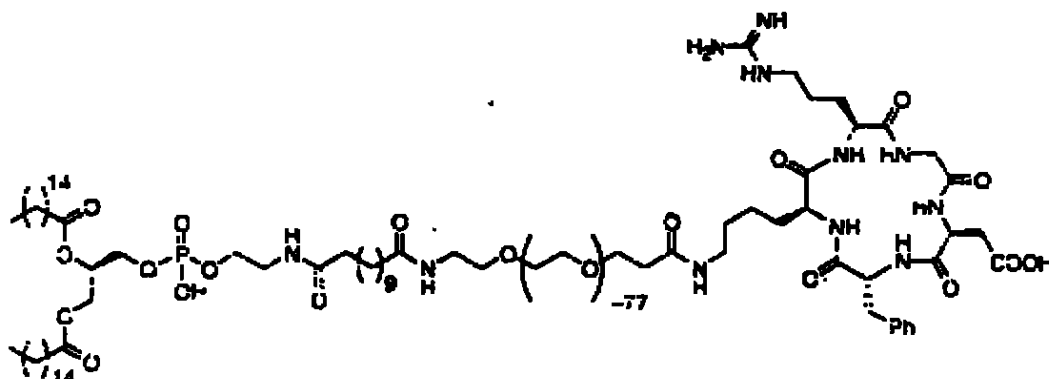


Se agrega trietilamina (3 mmol) a una solución de N-Boc-PEG₃₄₀₀-succinimidil éster (1 mmol) y ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) (1 mmol) en dimetilformamida (DMF) (25 mL). La mezcla de reacción se agita bajo nitrógeno a temperatura ambiente durante la noche, y el solvente se retira *in vacuo*. El producto crudo se disuelve en ácido trifluoroacético/diclorometano (1:1 vol/vol) y se agita durante 4 h. Los

45
2605

volátiles se retiran y el compuesto del título se aísla como la sal TFA mediante trituración con éter dietílico.

Parte B. Preparación de DPPE-PEG₃₄₀₀-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-Dodecanoato Conjugado:



Disuccinimidil dodecanoato (1 mmol), 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE) (1 mmol), y sal ω -amino-PEG₃₄₀₀-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) TFA (1 mmol) se disuelven en cloroformo (25 ml) mientras se agitan durante 5 min. Se agregan carbonato de sodio (1 mmol) y sulfato de sodio (1 mmol) y se agita la solución a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 18 horas. Se retira DMF *in vacuo* y el compuesto del título se purifica de la mezcla de producto crudo por HPLC preparativa o recristalización.

Parte C. Preparación de la Composición del Agente de Contraste:

El DPPE-PEG₃₄₀₀-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoato conjugado se mezcla con tres otros lípidos – ácido 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatídico; 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina; y N-(metoxipoli(etil)en glicol 5000 carbamoil)-1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina – en cantidades relativas de 1: 6: 54: 41 en peso. A continuación se prepara una suspensión acuosa, que contiene esta mezcla de lípido (1 mg/mL), cloruro de sodio (7 mg/mL), glicerina (0.1 mL/mL), y propilen glicol (0.1 mL/mL), a pH 6-7, en una ampolla de vidrio de 2 cc. El aire en la ampolla se evacúa

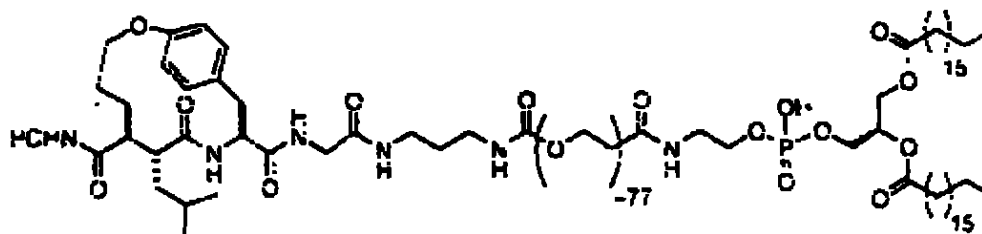
27/46

y reemplaza con propano perfluórico, y la ampolla se sella. La suspensión se agita en la ampolla sellada en un amalgamador dental durante 30-45 segundos para formar una suspensión de color blanco lechoso, que es apta para uso como un agente de contraste ultrasónico.

Los siguientes ejemplos, Ejemplos 4 y 5, describen la síntesis de agentes de contraste ultrasónico de la presente invención, compuestos de fracciones de acceso para inhibidores de metaloproteinasa de matriz. Estos materiales son útiles para apuntar los MSLCs a los sitios de degradación de matriz extracelular, que están presentes en tumores, placas ateroscleróticas, y degeneración de tejido cardíaco en CHF (Insuficiencia Cardíaca Congestiva). Estas composiciones son útiles para enviar los MSLCs acústicamente activos a los sitios de enfermedad para la ultrasonografía selectiva de estas patologías. Alternativamente, como se describe en Ejemplos 8 y 9, las composiciones pueden prepararse con agentes terapéuticos en el interior de los LFLs unidos a los MSLCs, que son útiles para liberación de medicamento estimulada por ultrasonido en un sitio específico de enfermedad.

Ejemplo 4

Síntesis de 1-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino)- α,ω -dicarbonilPEG₃₄₀₀-2-{[7-(N-hidroxicarbamoil)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo [10.2.2]hexadeca-1(15), 12(16), 13-trien-3-il]carbonilamino} -N-(3-aminopropil)acetamida conjugado:



A una solución de succinimidil éster DSPE-PEG-NHS éster

2782

(Shearwater Polimers, Huntsville, Alabama) (1 mmol) en cloroformo (25 ml) se agrega sal 2-{[7-(N-hidroxicarbamoil) (3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo[10.2.2]hexadeca-1(15), 12(16), 13-trien-3-il] carbonilamino}-N-(3-aminopropil)acetamida TFA (1 mmol) (véase U.S. Serial No. 60/182,627 para síntesis de esta fracción de acceso). Se agregan carbonato de sodio (1 mmol) y sulfato de sodio (1 mmol) y se agitó la solución a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 18 horas. El solvente se retira *in vacuo* y el compuesto del título se purifica de la mezcla de producto crudo por HPLC preparativa.

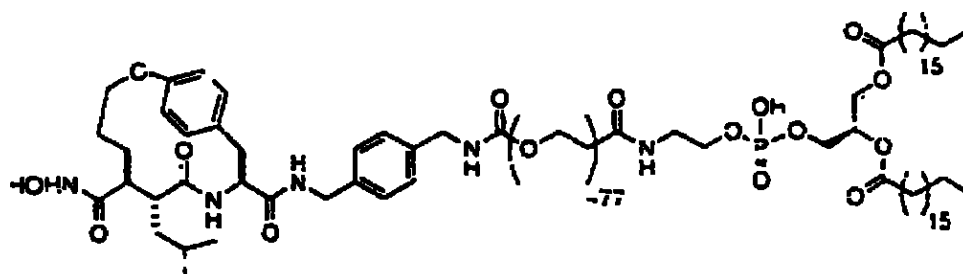
Preparación de Composición de Agente de Contraste:

El 1-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino)- α,ω -dicarbonilPEG₃₄₀₀-2-{[7-(N-hidroxicarbamoil)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-il]carbonilamino}-N-(3-aminopropil)acetamida conjugado se mezcla con otros tres fosfolípidos – ácido 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfotídico; 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina; y N-(metoxipolietilen glicol 5000 carbamoil)-1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina – en una relación de 1: 6: 54: 41 en peso. Se prepara en una ampolla de vidrio de 2 cc una suspensión acuosa, que contiene esta mezcla de lípido (1 mg/mL), cloruro de sodio (7 mg/mL), glicerina (0.1 mL/mL), y propilen glicol (0.1 mL/mL), a pH 6-7. El aire en la ampolla se evacúa y reemplaza con butano perfluórico, y la ampolla se sella. La suspensión se agita en la ampolla sellada en un amalgamador dental durante 30-45 segundos para formar una suspensión blanca lechosa de los MSLCs dirigidos a metaloproteinasas de matriz. La suspensión es apropiada para uso como agente de contraste ultrasónico.

Ejemplo 5

Síntesis de conjugado de 1-(1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino)- α,ω -dicarbonilPEG₃₄₀₀-[7-(N-hidroxicarbamoil) (3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo[10.2.2]hexadeca-

29/88

1(15),12(16),13-trien-3-il]-N- {[4-(aminometil)fenil]metil}carboxamida:

A una solución de succinimidil éster DSPE-PEG-NHS éster (Shearwater Polimers, Huntsville, Alabama) (1 mmol) en cloroformo (25 ml), se agrega sal [7-(N-hidroxycarbamoil)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo[10.2.2]hexadeca-1(15),12(16),13-trien-3-il]-N- {[4-(aminometil)fenil]metil}carboxamida TFA (1 mmol) (véase U.S. Serial No. 60/182,627 para la síntesis de esta fracción de acceso MMP). Se agregan carbonato de sodio (1 mmol) y sulfato de sodio (1 mmol) y la solución se agita a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 18 horas. El solvente se retira *in vacuo* y el compuesto del título se purifica de la mezcla de producto crudo por HPLC preparativa.

Preparación de Composición de Agente de Contraste:

1-(1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino)- α,ω dicarbonilPEG₃₄₀₀-[7-(N-hidroxycarbamoil)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo[10.2.2]hexadeca-1(15), 12(16), 13-trien-3-il]-N- {[4-(aminometil)fenil]metil}carboxamida conjugado se mezcla con tres otros fosfolípidos – ácido 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatídico; 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina; y N-(metoxipolietilen glicol 5000 carbamoil)-1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina – en cantidades relativas de 1: 6: 54: 41 en peso. Una suspensión acuosa (1.6 ml), que contiene esta mezcla de lípido (1 mg/mL), cloruro de sodio (7 mg/mL), glicerina (0.1 mL/mL), y propilen glicol (0.1 mL/mL), a pH 6-7, se prepara en una ampolla de vidrio de 2 cc. El aire en la ampolla se evacúa y reemplaza con butano

perfluórico, y la ampolla se sella. La suspensión se agita en la ampolla sellada en un amalgamador dental durante 30-45 segundos para formar una suspensión de color blanco lechoso de los MSLCs dirigidos a metaloproteinasas de matriz. La suspensión es útil para uso como agente de contraste ultrasónico.

Preparación de Materiales MSLC Terapéuticos Biológicamente Orientados

Ejemplo 6

A la composición de agente de contraste fosfolípido en Ejemplo 3 se agrega doxorubicina (100-200 mg/ml). Uno a dos milímetros se transfieren a una ampolla. El aire en la ampolla se evacúa y reemplaza con butano perfluórico, y la ampolla se sella. La ampolla se agita en un amalgamador dental durante 30-45 segundos para formar una suspensión MSLC de color blanco lechoso para uso terapéutico.

Ejemplo 7

A la composición de agente de contraste fosfolípido en Ejemplo 4 se agrega ciclofosfamida (100-200 mg/ml). Uno a dos milímetros se transfieren a una ampolla. El aire en la ampolla se evacúa y reemplaza con butano perfluórico, y la ampolla se sella. La ampolla se agita en un amalgamador dental durante 30-45 segundos para formar una suspensión MSLC de color blanco lechoso para uso terapéutico.

Ejemplo 8

A la composición de agente de contraste fosfolípido en Ejemplo 5 se agrega ciclofosfamida (100-200 mg/ml). Uno a dos milímetros se transfieren a una ampolla. El aire en la ampolla se evacúa y reemplaza con butano perfluórico y la ampolla se sella. La ampolla se agita en un amalgamador dental durante 30-45 segundos para formar una suspensión MSLC de color blanco lechoso para uso terapéutico activado por ultrasonido.

90
16**Ejemplo 9**

A la composición de agente de contraste fosfolípido en Ejemplo 5 se agrega activador de plasminógeno tisular (10-100 mg/ml). Uno a dos milímetros se transfieren a una ampolla. El aire en la ampolla se evacúa y reemplaza con butano perfluórico y la ampolla se sella. La ampolla se agita en un amalgamador dental durante 30-45 segundos para formar una suspensión MSLC de color blanco lechoso para uso terapéutico.

Ejemplo 10

Luego de la inyección a un paciente vivo (por ejemplo, mamífero) y dejar tiempo suficiente para que los MSLCs tomados como blanco de acción se localicen en el sitio de enfermedad o cerca de él, puede adquirirse la ultrasonografía para diagnóstico, o, en el caso de la administración de agente terapéutico, energía ultrasónica de energía suficiente para romper los MSLCs y liberar el medicamento en el sitio de destino puede aplicarse por pulsación repetida o por aplicación de pulsos aislados de energía de alto poder de energía ultrasónica.

Todas las publicaciones, patentes, y documentos de patente se incorporan aquí por referencia, como si se incorporaran individualmente por referencia. La invención se ha descrito con referencia a varias incorporaciones y técnicas específicas y preferidas. No obstante, debe entenderse que pueden hacerse muchas variaciones y modificaciones permaneciendo simultáneamente dentro del espíritu y ámbito de la invención.

429

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Una formulación que comprende a compuesto de liposomas de microesfera de gas suspendida en un medio, en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende:
 - una microesfera llena de gas;
 - por lo menos uno de un lípido y un tensioactivo adsorbidos en la superficie de la microesfera llena de gas; y
 - liposomas llenos de líquido unidos al lípido o tensioactivo.
2. La formulación de la reivindicación 1 en donde el gas de la microesfera llena de gas tiene una solubilidad de menos de alrededor de 1.0% (v/v) en agua a 25°C y 1 atm.
3. La formulación de la reivindicación 1 en donde la microesfera llena de gas tiene un diámetro promedio de alrededor de 0.1µm a alrededor de 10µm.
4. La formulación de la reivindicación 1 en donde la microesfera llena de gas tiene un diámetro promedio de alrededor de 0.5µm a alrededor de 10µm.
5. La formulación de la reivindicación 1 en donde la microesfera llena de gas comprende por lo menos un gas inerte.
6. La formulación de la reivindicación 5 en donde el gas inerte es un gas noble.
7. La formulación de la reivindicación 5 en donde el gas inerte es un gas éter perfluórico.
8. La formulación de la reivindicación 5 en donde el gas inerte es un gas carbono perfluórico.

4392

9. La formulación de la reivindicación 1 en donde la microesfera llena de gas tiene un lípido adsorbido en la superficie de la microesfera llena de gas.
10. La formulación de la reivindicación 1 en donde la microesfera llena de gas tiene un tensioactivo adsorbido en la superficie de la microesfera llena de gas.
11. La formulación de la reivindicación 1 en donde el lípido o tensioactivo forma una capa mono-molecular en la superficie de la microesfera llena de gas.
12. La formulación de la reivindicación 1 en donde el lípido o tensioactivo forma una capa liposomal bi-molecular o capa liposomal multi-molecular en la superficie de la microesfera llena de gas.
13. La formulación de la reivindicación 1 en donde el tensioactivo es un tensioactivo no iónico, un tensioactivo catiónico, o un tensioactivo aniónico.
14. La formulación de la reivindicación 13 en donde el tensioactivo no iónico comprende polietilen glicol, polipropilen glicol, polivinilpirolidona, alcohol polivinílico, celulosa, gelatina, goma xantana, pectina, o dextrina.
15. La formulación de la reivindicación 13 en donde el tensioactivo catiónico comprende un tetraalquilamonio, un ión tetraalquilfosfonio, o una sal apropiada de los mismos.
16. La formulación de la reivindicación 15 en donde el tensioactivo catiónico comprende un tetrahexilamonio, tetraoctilamonio, tetradecilamonio, tetrabutilamonio, tetrahexilfosfonio, tetraoctilfosfonio, tetrabutilfosfonio, tetrafenilfosfonio, o una sal apropiada de los mismos.

9/1/93

17. La formulación de la reivindicación 13 en donde el tensioactivo aniónico comprende un alquilsulfonato, un alquilcarboxilato, o una sal apropiada de los mismos.

18. La formulación de la reivindicación 17 en donde el tensioactivo aniónico comprende dodecilsulfato, palmitilsulfato, dodecilcarboxilato, palmitilcarboxilato, o una sal apropiada de los mismos.

19. La formulación de la reivindicación 1 en donde el lípido comprende un fosfolípido, glicolípido, triglicérido o ácido graso.

20. La formulación de la reivindicación 19 en donde el fosfolípido comprende dipalmitoilfosfatidil colina, dimiristoilfosfatidil colina, dilaurioilfosfatidil colina, o dioleoilfosfatidil colina.

21. La formulación de la reivindicación 1 en donde los liposomas llenos de líquido están unidos al lípido adsorbido o tensioactivo en una forma continua.

22. La formulación de la reivindicación 1 en donde los liposomas llenos de líquido ocupan más de alrededor de 50% de la superficie exterior del área de la microesfera llena de gas.

23. La formulación de la reivindicación 1 en donde cada uno de los liposomas llenos de líquido independientemente tiene un diámetro de alrededor de 10nm a alrededor de 200nm.

24. La formulación de la reivindicación 1 en donde cada uno de los liposomas llenos de líquido tiene independientemente un diámetro de alrededor de 20nm a alrededor de 100nm.

25. La formulación de la reivindicación 1 en donde cada uno de los liposomas llenos de líquido tiene independientemente un diámetro que es

42 94

menos de alrededor de 10% del diámetro de la microesfera llena de gas.

26. La formulación de la reivindicación 1 en donde cada uno de los liposomas llenos de líquido independientemente comprende un agente terapéutico o agente de diagnóstico en el interior de los liposomas llenos de líquido.

27. La formulación de la reivindicación 26 en donde el agente terapéutico es un agente anticoagulante, trombolítico, antineoplásico, o agente anti-inflamatorio.

28. La formulación de la reivindicación 26 en donde el agente terapéutico comprende doxorubicina, ciclofosfamida, adriamicina, metotrexato, gemcitabina, navelbina, cisplatino, activador de plasminógeno tisular, integrelina, roxifiban, metotrexato o enbrel.

29. La formulación de la reivindicación 26 en donde el agente de diagnóstico comprende un agente de contraste de rayos X o un agente de contraste MRI.

30. La formulación de la reivindicación 1 en donde cada uno de los liposomas llenos de líquido tiene independientemente fracciones de acceso, de alta afinidad, unidas a la superficie de los liposomas llenos de líquido.

31. La formulación de la reivindicación 30 en donde la fracción de acceso, de alta afinidad, unida a la superficie del compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende:

un ligando que se une a un receptor que se regula ascendentemente en angiogenesis;

un ligando que se une a un receptor que se regula ascendentemente en inflamación; o un ligando que se une a un receptor que se

4695

regula ascendentemente en aterosclerosis.

32. La formulación de la reivindicación 30 en donde la fracción de acceso, de alta afinidad, unida a la superficie del compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende:

un ligando que se une a los integrones $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ ó GpIIb/IIIa; un ligando que se une a una matriz metaloproteínasa; o

un ligando que se une al receptor LTB₄.

33. La formulación de la reivindicación 30 en donde la fracción de acceso, de alta afinidad, unida a la superficie del compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende:

1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoato;

DPPE-PEG₃₄₀₀-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoato;

1-(1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino)- α,ω -dicarbonil PEG₃₄₀₀-2-{[7-(N-hidroxicarbamoil)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo[10.2.2]hexadeca-1(15), 12(16), 13-trien-3-il]carbonilamino}-N-(3-aminopropil)acetamida; ó

1-(1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino)- α,ω -dicarbonil PEG₃₄₀₀-[7-(N-hidroxicarbamoil)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo[10.2.2]hexadeca-1(15), 12(16), 13-trien-3-il]-N-{[4-(aminometil)fenil]metil}carboxamida.

34. La formulación de la reivindicación 1 en donde cada uno de los liposomas llenos de líquido comprende independientemente líquido del medio de suspensión.

35. La formulación de la reivindicación 1 en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas tiene un diámetro medio de alrededor de 0.1 μm a alrededor de 10 μm .

36. La formulación de la reivindicación 1 en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas tiene un diámetro medio de alrededor de 0.2 μ m a alrededor de 4 μ m.

37. La formulación de la reivindicación 1 en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas existe como un agregado de dos o más compuestos de liposomas de microesfera de gas.

38. La formulación de la reivindicación 37 en donde el agregado tiene un diámetro de alrededor de 1 μ m a alrededor de 100 μ m.

39. La formulación de la reivindicación 1 en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas tiene una densidad de alrededor de 0.90 a alrededor de 1.10 de la densidad del medio.

40. La formulación de la reivindicación 1 en donde el lípido o tensioactivo comprende una fracción de acceso, de alta afinidad.

41. La formulación de la reivindicación 1 en donde el lípido o tensioactivo comprende un agente terapéutico.

42. La formulación de la reivindicación 41 en donde el agente terapéutico es doxorubicina, ciclofosfamida, adriamicina, metotrexato, gemcitabina, navelbina, cisplatino, activador de plasminógeno tisular, integrelina, roxifiban, metotrexato o enbrel.

43. La formulación de la reivindicación 1 en donde el medio comprende un agente de diagnóstico.

44. La formulación de la reivindicación 43 en donde el agente de diagnóstico es un agente de contraste de rayos X o un agente de

97
R

contraste MRI.

45. La formulación de la reivindicación 40 en donde la fracción de acceso, de alta afinidad comprende:

1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoato;

DPPE-PEG₃₄₀₀-ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)-dodecanoato;

1-(1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino)- α,ω -dicarbonil PEG₃₄₀₀-2-{[7-(N-hidroxicarbamoil)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo[10.2.2]hexadeca-1(15), 12(16), 13-trien-3-il]carbonilamino}-N-(3-aminopropil)acetamida; o

1-(1,2-Dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamino)- α,ω -dicarbonil PEG₃₄₀₀-[7-(N-hidroxicarbamoil)(3S,6R,7S)-4-aza-6-(2-metilpropil)-11-oxa-5-oxobiciclo[10.2.2]hexadeca-1(15), 12(16), 13-trien-3-il]-N-{[4-(aminometil)fenil]metil} carboxamida.

46. Un método de ultrasonografía en un paciente necesitado de dicha ultrasonografía que comprende:

administrar al paciente una cantidad efectiva de una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-45;

dejar un período suficiente de tiempo para que la circulación del compuesto de microesfera de gas alcance el área tomada como blanco de acción; y

realizar ultrasonografía en el paciente.

47. El método de la reivindicación 46 en donde el paciente es un humano.

48. El método de la reivindicación 46 en donde la cantidad efectiva de la formulación comprende alrededor de 10^3 a alrededor de 10^{10} compuestos de liposomas de microesfera de gas.

49. El método de la reivindicación 46 en donde el período suficiente de

49/98

tiempo es alrededor de 5 minutos a alrededor de 2 horas.

50. El método de la reivindicación 46 en donde el período suficiente de tiempo es alrededor de 5 a alrededor de 30 minutos.

51. Un método de tratar cardiopatía, inflamación, infección, cáncer o enfermedad tromboembólica en un paciente necesitado de dicho tratamiento que comprende:

administrar al paciente una cantidad efectiva de una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-45, en donde uno o más de los liposomas llenos de líquido comprende independientemente un agente terapéutico;

dejar un período suficiente de tiempo para la circulación del compuesto de microesfera de gas al área tomada como blanco de acción;
y

aplicar energía ultrasónica a la región de patología en el paciente suficiente para hacer que el agente terapéutico se libere del compuesto de liposomas de microesfera en la región de patología.

52. El método de la reivindicación 51 en donde el paciente es un humano.

53. El método de la reivindicación 51 en donde cada uno de los liposomas llenos de líquido comprende independientemente un agente terapéutico.

54. El método de la reivindicación 51 en donde la cantidad efectiva de la formulación comprende alrededor de 10^3 a alrededor de 10^{10} compuestos de liposomas de microesfera de gas.

55. Un método para preparar una formulación una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 45 que comprende:

99
88
77

poner en contacto una suspensión de liposomas en una solución acuosa que comprende por lo menos un lípido o un tensioactivo; y

mezclar la suspensión con un gas que tiene una solubilidad de menos de alrededor de 1.0% (v/v) en agua a 25 °C y 1 atm suficiente para proveer la formulación.

56. El método de la reivindicación 55 en donde el mezclado se realiza por agitación mecánica.

57. El método de la reivindicación 55 en donde el mezclado se realiza por ultrasonificación.

58. El método de la reivindicación 55 en donde el mezclado se realiza por inyección a alta velocidad del gas en la solución de liposomas acuosa.

59. Un método para preparar una formulación una cualquiera de las reivindicaciones 1-45 que comprende:

poner en contacto una suspensión de liposomas en una solución acuosa que comprende por lo menos un agente terapéutico y por lo menos un tensioactivo; y

mezclar la suspensión de liposomas acuosa con un gas que tiene una solubilidad de menos de alrededor de 1.0% (v/v) en agua a 25°C y 1 atm suficiente para proveer la formulación.

60. El método de la reivindicación 59 en donde el mezclado se realiza por agitación mecánica.

61. El método de la reivindicación 59 en donde el mezclado se realiza por ultrasonificación.

62. El método de la reivindicación 59 en donde el mezclado se realiza por inyección a alta velocidad del gas en la suspensión de liposomas acuosa.

107/100

63. Un botiquín para la preparación de una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-45 que comprende:

un envase que comprende una solución acuosa en donde la solución acuosa comprende por lo menos un tensioactivo y liposomas llenos de líquido; y

un medio para introducir un gas que tiene una solubilidad de menos de alrededor de 1.0% (v/v) en agua a 25°C y 1 atm en la solución acuosa.

64. El botiquín de la reivindicación 63 en donde el envase comprende un espacio de cabeza.

65. El botiquín de la reivindicación 63 en donde el espacio de cabeza comprende por lo menos un gas inerte que tiene una solubilidad de menos de alrededor de 1.0% (v/v) en agua a 25°C y 1 atm de presión.

66. El botiquín de la reivindicación 63 en donde el gas inerte es un gas carbono perfluórico.

67. El botiquín de la reivindicación 63 en donde el gas inerte es un gas éter perfluórico.

68. El botiquín de la reivindicación 63 en donde el gas inerte es un gas noble.

69. Una formulación que comprende un compuesto de liposomas de microesfera de gas suspendido en un medio, en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende:

una microesfera llena de gas;

por lo menos uno de un lípido y un tensioactivo adsorbidos en la superficie de la microesfera llena de gas; y

101
201
7

**liposomas llenos de líquido unidos al lípido o tensioactivo;
para uso e terapia médica o diagnóstico.**

70. El uso de una formulación que comprende una compuesto de liposomas de microesfera de gas suspendido en un medio, en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende:

una microesfera llena de gas;

por lo menos uno de un lípido y un tensioactivo adsorbidos en la superficie de la microesfera llena de gas; y

liposomas llenos de líquido unidos al lípido o tensioactivo;

para la manufactura de un medicamento para tratar cardiopatía, inflamación, infección, cáncer o enfermedad tromboembólica en un paciente necesitado de dicho tratamiento.

71. El uso de una formulación que comprende un compuesto de liposomas de microesfera de gas suspendido en un medio, en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende:

un microesfera llena de gas;

por lo menos uno de un lípido y un tensioactivo adsorbidos en la superficie de la microesfera llena de gas; y

liposomas llenos de líquido unidos a el lípido o tensioactivo;

para la manufactura de un medicamento para ultrasonografía de diagnóstico en un paciente necesitado de dicho ultrasonografía de diagnóstico.

72. El uso de una formulación que comprende un compuesto de liposomas de microesfera de gas suspendida en un medio, en donde el compuesto de liposomas de microesfera de gas comprende:

una microesfera llena de gas;

por lo menos uno de un lípido y un tensioactivo adsorbidos en la superficie de la microesfera llena de gas; y

102
M
P
X

liposomas llenos de líquido unidos al lípido o tensioactivo;
para la manufactura de un medicamento para ultrasonografía en
un paciente necesitado de dicha ultrasonografía.

103

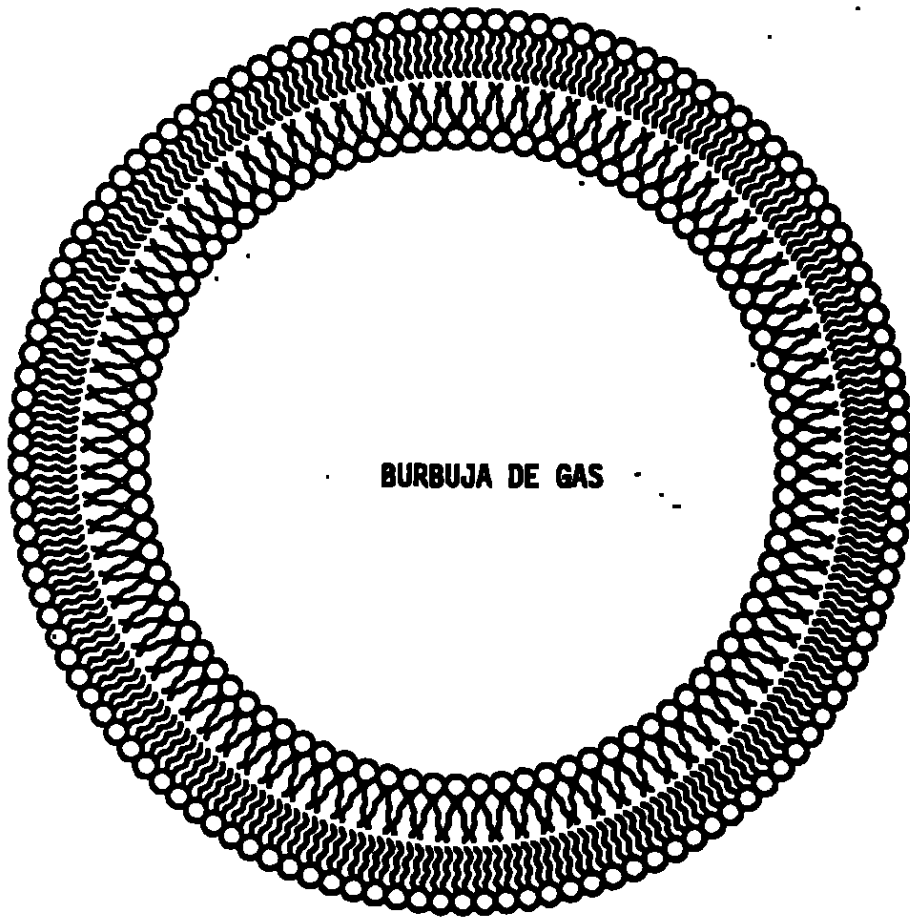


FIGURA 1

104
104

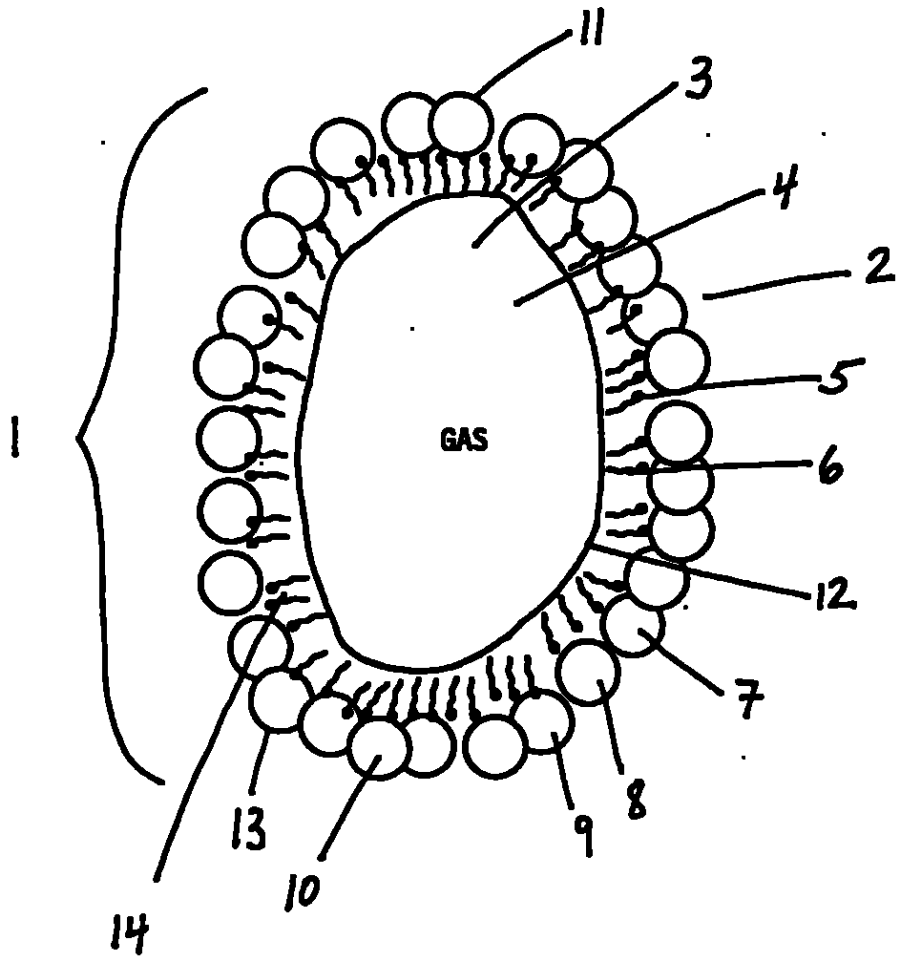


FIGURA 2

~~105~~

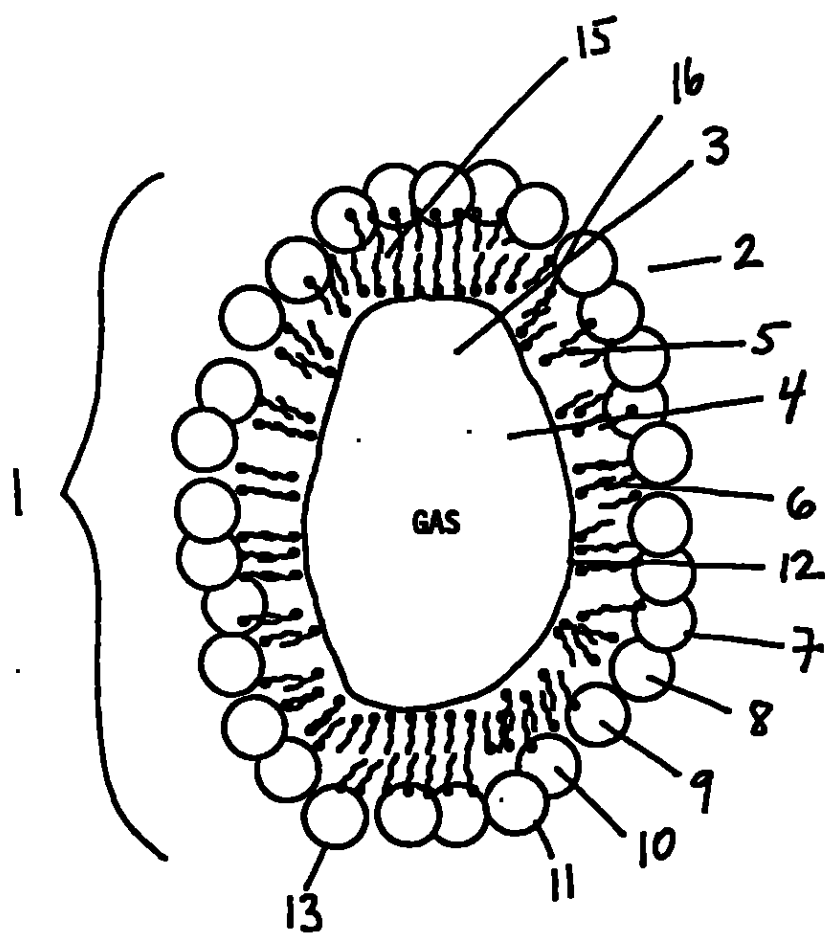


FIGURA 3

PATENT COOPERATION TREATY

106 15. 93069
WY
K

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

RECEIVED BMS PATENT LAW		PCT
To: FERGUSON, Blair G. BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY Patent Department P.O. Box 4000 Princeton, NJ 08543-4000 ETATS-UNIS D'AMERIQUE		JUN 02 2003 NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (PCT Rule 71.1)
Docketed Item Due Date Attorney		Date of mailing (day/month/year) 28.05.2003

Applicant's or agent's file reference PH7103PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
--	-------------------------------

International application No. PCT/US01/25685	International filing date (day/month/year) 16/08/2001	Priority date (day/month/year) 16/08/2001
---	--	--

Applicant BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY
--

- The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the International preliminary examination report and its annexes, if any, established on the International application.
- A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
- Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
- REMINDER**
 The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

 Where a translation of the International application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the International preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

 For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

 For the purpose of deciding whether the claimed invention is patentable or not, the elected Offices may apply criteria additional to or different from the criteria on which the International preliminary examination report is based (see Articles 27(5), 33(5)). Additional criteria may include e.g. exemptions from patentability and the requirements of enabling disclosure and of clarity and support of claims.

Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80339 Munich Tel. +49 89 2369-0 Tlx 523655 epmu d Fax +49 89 2369-4465	Authorized officer Senkal, H Tel. +49 89 2369-6071	
---	--	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PH710SPCT		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA416)	
International application No. PCT/US01/28885	International filing date (day/month/year) 16/08/2001	Priority date (day/month/year) 16/08/2001	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K48/22			
Applicant BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY			
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of sheets.			
3. This report contains indications relating to the following items: - I ☒ Basis of the report - II ☐ Priority - III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability - IV ☐ Lack of unity of invention - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement - VI ☐ Certain documents cited - VII ☐ Certain defects in the international application - VIII ☐ Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 07/09/2003		Date of completion of this report 28.09.2003	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80885 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Fax 523656 apmu d Fax +49 89 2369 - 4465		Authorized officer Toulacia, C Telephone No. +49 89 2369 6636 	

Form PCT/IPEA408 (cover sheet) (January 1994)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

108 \$
International application No. PCT/US01/2685

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17):*)

Description, pages:

1-33 as originally filed

Claims, No.:

1-72 as originally filed

Drawings, sheets:

1/3-3/3 as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/US01/25685**

☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(e)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

II. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
☒ claims Nos. 46-54 with respect to industrial applicability.

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 46-54 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
see separate sheet
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the said claims Nos. .

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N) Yes: Claims 1-72

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

110
International application No. PCT/US01/25885

	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-72
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-45, 65-72
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

JUN. 5. 2003 1:51PM BUS ENE 1113

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/US01/25685

III

Claims 46-54 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

V

For the assessment of the present claims 46-54 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Claims 1-72

- (N) A formulation comprising a gas microsphere liposome composite suspended in a medium, wherein the gas microsphere liposome composite comprises:
I) a gas-filled microsphere, II) at least one lipid or surfactant adsorbed onto the surface of the gas filled microsphere, and III) liquid-filled liposomes attached to the lipid or surfactant, is not disclosed in the documents cited in the search report. The same applies I) to the method of ultrasound imaging by administering said formulation (claim 46), II) to the method for preparing said formulation (claims 55 and 59) III) to the kit for the preparation of said formulation (claim 63) and IV) to the use of said formulation for the manufacture of a medicament according to claims 70-72.
- (IS) The object of the present application is to provide an ultrasound imaging agent which are stable and generate ultra sound images of enhanced quality and clarity by delineating of vascular space and tissues, and enable an improved control of drug delivery to the targeted tissue (description; page 6, last paragraph). Said object has been achieved according to claim 1, by attaching liquid-filled liposomes to the lipid or surfactant being adsorbed onto the surface of the gas filled microsphere (page 14, paragraph 3 and 4; pages 19-25; examples).

112 M

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/US01/25685

This is not suggested by document WO 99/39738 (D1), which represent the nearest prior art. Document D1 discloses a formulation for delivery of a biologically active substance to a selected target, comprising an aqueous suspension of liposomes filled with said active substance, characterized in that said formulation further comprises an effective amount of gas- or air-filled microspheres (D1; claim 4).

However, the gas-filled microspheres are simply admixed to liposome vesicles, whereby they will statistically distance from each other (D1; page 10, lines 4-7). Liquid-filled liposomes being attached to the lipid or surfactant which is adsorbed onto the surface of the gas filled microsphere, are not suggested.

(IA) The industrial applicability of claims 1-45 and 55-72 is given.

TRATADO SOBRE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

113

X

Remitente:

OFICINA ENCARGADA DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

A:

FERGUSON, Blair Q.
BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY
Patent Department
P.O. Box 4000
Princeton, NJ 08543-4000

PCT

COMUNICACIÓN SOBRE EL ENVÍO DEL
INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR
INTERNACIONAL

(Regla 71.1 PCT)

Fecha de envío
(Día/Mes/Año)

28.05.2003

No. de Expediente del Solicitante o Apoderado

PH7103PCT

COMUNICACIÓN IMPORTANTE

No. de Solicitud Internacional

PCT/US01/25685

Fecha Internacional de Presentación
(día/mes/año)

16/08/2001

Fecha de Prioridad
(día/mes/año)

16/08/2001

Solicitante

BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY

1. Se comunica al solicitante que la oficina encargada del examen preliminar internacional le envía con el presente el informe de examen preliminar internacional, elaborado para la solicitud internacional, en caso dado con los anexos correspondientes.
2. Una copia del informe, en caso dado con los anexos correspondientes se hace llegar a la Oficina Internacional para su envío posterior a todas las oficinas seleccionadas.
3. A solicitud de una oficina seleccionada, la Oficina Internacional preparará una traducción del informe (pero no de los anexos) al inglés y la remitirá a esta oficina.

4. RECORDATORIO

Para ingresar en la fase nacional el solicitante, dentro de los 30 meses a partir de la fecha de prioridad (o en algunas oficinas incluso después), tiene que realizar ante cada oficina seleccionada ciertos actos (entrega de traducciones y desembolso de honorarios nacionales) (Artículo 39 (1)) (véase también la información remitida por la Oficina Internacional en el Formulario PCT/IB/301).

Si se tiene que enviar a una oficina seleccionada una traducción de la solicitud internacional, entonces esta traducción tiene que incluir traducciones de todos los anexos al informe de examen preliminar internacional. Es obligación del solicitante elaborar dichas traducciones y hacerlas llegar directamente a las oficinas seleccionadas respectivas.

Mayores detalles en cuanto a los plazos normativos y los requisitos de las oficinas seleccionadas se desprenden del Volumen II de la guía PCT para solicitantes.

Para efectos de decidir si la invención reivindicada es patentable o no, las Oficinas seleccionadas pueden aplicar criterios adicionales a, o diferentes de, los criterios en los cuales se basa el informe de examen preliminar internacional (véase Artículos 27 (5), 33 (5)). Los criterios adicionales pueden incluir, por ejemplo, exención de patentabilidad y los requerimientos si se permite la divulgación y de claridad y soporte de las reivindicaciones.

Nombre y dirección postal de la Oficina Encargada del
Examen Preliminar Internacional (IPEA)



Oficina Europea de Patentes
D-80298 Munich
Tel.: +49 89 2399 - 0 Tx.: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Empleado Autorizado

Senkel, H

Tel.: +49 89 2399 - 8071



TRATADO SOBRE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(Artículo 36 y Regla 70 PCT)

114

No. de Expediente del Solicitante o Apoderado PH7103PCT	PROCEDIMIENTO POSTERIOR Véase comunicación sobre el envío del informe de examen preliminar internacional (Formulario PCT/IPEA/416)	
No. Solicitud Internacional PCT/US01/25685	Fecha Internacional de Presentación (día/mes/año) 16/08/2001	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 16/08/2001
Clasificación Internacional de Patente (IPC) o Clasificación Nacional e IPC A61K49/22		
Solicitante BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY		

1. Este informe de examen preliminar internacional fue elaborado por la Oficina Encargada del Examen Preliminar Internacional y se envía al solicitante según Artículo 36.

2. Este INFORME comprende un total de **6** hojas, incluye esta portada

☐ Además se adjuntan ANEXOS al informe; en este caso se trata de hojas con descripciones, reivindicaciones y/o dibujos, que se modificaron y que sirven de base para este informe, y/o hojas con correcciones efectuadas por esta oficina (véase Regla 70.16 y Sección 607 de las instrucciones bajo el PCT).

Estos anexos comprenden en total de hojas.

3. Este informe contiene datos con respecto a los siguientes puntos:

I ☒ Base del Informe

II ☐ Prioridad

III ☒ Sin elaboración de un dictamen sobre novedad, actividad inventiva y posibilidad de aplicación industrial

IV ☐ Falta de unidad de la invención

V ☒ Comprobación justificada según Artículo 35(2) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la posibilidad de aplicación industrial; documentos y explicaciones sustentando esta comprobación

VI ☐ Ciertos documentos enumerados

VII ☐ Ciertas deficiencias del registro internacional

VIII ☐ Ciertas observaciones relacionadas con la solicitud internacional

Fecha de presentación de la petición 07/03/2003	Fecha de la conclusión de este informe 28.05.2003
Nombre y dirección postal de la Oficina Encargada del Examen Preliminar Internacional (IPEA)  Oficina Europea de Patentes D-60298 Munich Tel.: +49 89 2399 - 0 Tx.: 523856 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4485	Empleado Autorizado Toulactis, C  Teléfono No. +49 89 2399 - 8408

115
~~116~~

I. Base del Informe

1. Con respecto a los elementos de la solicitud internacional (*hojas intercambiables que se han suministrado a la oficina receptora en respuesta a una invitación bajo Artículo 14 se tienen en este informe por "presentadas originalmente" y no se anexan a este informe puesto que no contienen correcciones (Reglas 70.16 y 70.17))*):

Descripción, páginas:

1-33 versión original

Reivindicaciones, No.:

1-72 versión original

Dibujos, hojas:

1/3-3/3 versión original

2. En lo concerniente al idioma: Todos los elementos indicados más arriba estuvieron a disposición de la oficina o le fueron enviados en el idioma en el cual se radicó la solicitud internacional, salvo indicación en contrario consignada bajo este punto.

Estos elementos estuvieron a disposición de esta oficina o le fueron enviados en el idioma siguiente: en este caso se trata de:

- ☐ el idioma de la traducción enviada para efectos de la búsqueda internacional (según la regla 23.1 (b)).
- ☐ el idioma de publicación de la solicitud internacional (según la regla 48.3 (b)).
- ☐ el idioma de la traducción enviada para los efectos del examen preliminar internacional (según la regla 55.2 y/o 55.3).

3. En lo que concierne a la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos, divulgada en la solicitud Internacional, el examen preliminar internacional se llevó a cabo sobre la base del listado de secuencias:

- ☐ contenido en la solicitud internacional, por escrito.
- ☐ presentado con la solicitud internacional, en formato de lectura por computador.
- ☐ remitido posteriormente a la oficina, por escrito.
- ☐ remitido posteriormente a la oficina, en formato de lectura por computador.
- ☐ se ha rendido la declaración, según la cual el listado de secuencias por escrito y suministrado posteriormente no va más allá de la divulgación hecha en la solicitud en el momento en que se radicó.
- ☐ se ha rendido la declaración, según la cual las informaciones registradas en formato de lectura por computador corresponden al listado de secuencias, presentados por escrito.

4. Las modificaciones han acarreado la anulación:

- ☐ de la descripción, páginas:
- ☐ de las reivindicaciones, Nos.:

**INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR
INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No. PCT/US01/25685

☐ de los dibujos, hojas:

5. ☐ El presente informe se preparó sin tener en cuenta (algunas de) las modificaciones, ya que éstas, por las razones aducidas, en concepto de la oficina van más allá del contenido de divulgación en la versión presentada originalmente (Regla 70.2 (c))

(Hojas intercambiables que incluyan modificaciones de esta índole deben indicarse en el punto 1 y anexarse al presente informe.)

6. Observaciones adicionales, si son necesarias:

III. Sin elaboración de un dictamen sobre novedad, actividad inventiva y posibilidad de aplicación industrial

1. Los interrogantes en cuanto a si la invención reivindicada parece ser novedosa, implicar una actividad inventiva (no ser obvia), o tener posibilidad de aplicación industrial no se han examinado con respecto a:

- ☐ la solicitud internacional en su totalidad,
☒ reivindicaciones, Nos. 46-54 con respecto a la posibilidad de aplicación industrial.

porque:

- ☒ la aplicación internacional citada, o las reivindicaciones citadas Nos. 46-54 con posibilidad de aplicación industrial se refieren al asunto en cuestión que no requieren un examen preliminar internacional (*especificar*):
véase hoja separada
- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indicar elementos particulares más adelante*) o las reivindicaciones citadas Nos. son tan ambiguas que no pudo formarse un concepto significativo (*especificar*):
- ☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones citadas Nos. están tan inadecuadamente fundamentadas por la descripción que no pudo formarse un concepto significativo.
- ☐ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para las citadas reivindicaciones Nos.
2. No puede llevarse a cabo un examen preliminar internacional significativo debido a que el listado de secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos no cumple la norma contemplada en Anexo C de las Instrucciones Administrativas:
- ☐ la forma escrita no se ha suministrado o no cumple la norma.
- ☐ el formato de lectura en computador no se ha suministrado o no cumple la norma.

V. Declaración motivada bajo Artículo 35(2) en cuanto a la novedad, la actividad inventiva y la posibilidad de aplicación industrial; documentos y explicaciones que sustentan esta declaración

1. DECLARACIÓN

Novedad (N)

Sí: Reivindicaciones 1-72

**INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR
INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No. PCT/US01/25685

117
117

	No: Reivindicaciones
Actividad Inventiva (IS)	Si: Reivindicaciones 1-72
	No: Reivindicaciones
Posibilidad de Aplicación Industrial (IA)	Si: Reivindicaciones 1-45, 55-72
	No: Reivindicaciones

2. Documentos y explicaciones
Véase hoja separada

119-118

- III** Las reivindicaciones 46-54 se refieren al asunto que esta Autoridad considera que está cubierto por las normativas de la Regla 67.1(iv) PCT. En consecuencia, no se formulará un concepto con respecto a la posibilidad de aplicación industrial del asunto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT).
- V** Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 46-54 sobre la cuestión de si son aplicables industrialmente, no existen criterios unificados en los Estados Firmantes del PCT. En consecuencia, la patentabilidad puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable el asunto de reivindicaciones al uso de un compuesto en tratamiento médico, pero puede permitir, no obstante, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la manufactura de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Reivindicaciones 1-72

- (N)** Una formulación que comprende un compuesto de liposomas de microesfera de gas suspendido en un medio, en donde el compuesto de liposomas de microesfera comprende: i) una microesfera llena de gas, ii) por lo menos un lípido o tensioactivo adsorbido en la superficie de la microesfera llena de gas, y iii) liposomas llenos de líquido unidos al lípido o tensioactivo, no se divulga en los documentos citados en el informe de búsqueda. Lo mismo se aplica i) al método de ultrasonografía administrando dicha formulación (reivindicación 46), ii) al método para preparar dicha formulación (reivindicaciones 55 y 59) iii) al botiquín para la preparación de dicha formulación (reivindicación 63) y iv) a los usos de dicha formulación para la manufactura de un medicamento de acuerdo con las reivindicaciones 70-72.
- (IS)** El objeto de la presente solicitud es proveer un agente de ultrasonografía que es estable y generar ultrasonografías de calidad y claridad intensificadas delineando un espacio vascular y tejidos, y permitir un mejor control de administración de medicamento al tejido tomado como blanco de acción (descripción; página 6, último párrafo). Dicho objeto se ha conseguido de acuerdo con la reivindicación 1, uniendo liposomas llenos de líquido al lípido o tensioactivo que se adsorben a la superficie de la microesfera llena de gas (página 14, párrafo 3 y 4; páginas 19-25; ejemplos).

120119

Esto no se sugiere por el documento WO 99/39738 (D1), que representa el arte previo más próximo. Documento D1 divulga una formulación para administración de una sustancia biológicamente activa a una diana seleccionada, que comprende una suspensión acuosa de liposomas llenos de dicha sustancia activa, caracterizada porque dicha formulación comprende además una cantidad efectiva de microesferas llenas de gas o aire (D1; reivindicación 4).

No obstante, las microesferas llenas de gas se mezclan simplemente a vesículas de liposoma, por lo cual se distanciarán estadísticamente entre sí (D1; página 10, renglones 4-7). No se sugieren los liposomas llenos de líquido que se unen al lípido o tensioactivo que se adsorbe en la superficie de la microesfera llena de gas.

- (IA) La posibilidad de aplicación industrial de las reivindicaciones 1 - 45 y 55 - 72 está dada.

RECEIVED

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US01/025685

SEMIDAC/SMVCL

MAR 31 2003

From the INTERNATIONAL BUREAU

BMS-6-1-17

Woodcock Washburn Kurtz
Mackiewicz & Norris LLP

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

To:

DOLAN, Peter, L.
Bristol-Myers Squibb Pharma Company
Patent Department
P.O. Box 1000treet
Princeton, NJ 08543-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUERECEIVED
MAR 31 2003DOCKET DEPT.
WWW/KMN

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

RECEIVED
BMS PATENT LAW

MAR 14 2003

Date of mailing(day/month/year) 27 February 2003 (27.02.03)		Docketed Item	
Applicant's or agent's file reference PH7103PCT		Due Date	
Attorney		IMPORTANT NOTICE	
International application No. PCT/US01/025685	International filing date(day/month/year) 16 August 2001 (16.08.01)	Priority date(day/month/year)	
Applicant BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

KP, KR

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EA, EC, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OA, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 27 February 2003 (27.02.03) under No. WO 03/015831.

4. **TIME LIMITS for filing a demand for international preliminary examination and for entry into the national phase**

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

For filing a demand for international preliminary examination, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Judith Zahra
Facsimile No.(41-22) 740.14.35	Telephone No.(41-22) 338.91.11

Form PCT/IB/308 (April 2002)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/US 01/25685A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K49/22 A61K41/00

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)

IPC 7 A61K

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 50040 A (IMARX PHARMACEUTICAL CORP) 12 November 1998 (1998-11-12) claims	
A	US 5 620 689 A (ALLEN THERESA M ET AL) 15 April 1997 (1997-04-15) cited in the application claims 1,2	
A	WO 95 07072 A (WEITSCHIES WERNER ;HAUFF PETER (DE); SCHERING AG (DE); FRITZSCH TH) 16 March 1995 (1995-03-16) claims	1-72
Y	WO 94 28873 A (RAMASWAMI VARADARAJAN ;WU GUANLI (US); FRITZ THOMAS A (US); MATSUN) 22 December 1994 (1994-12-22) claims	1-72
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in 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 document 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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 May 2002

Date of mailing of the international search report

27/05/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5810 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Berte, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inventor's Application No
PCT/US 01/25685

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARCHI-ARTZNER, VALERIE ET AL: "Selective adhesion of endothelial cells to artificial membranes with a synthetic RGD-lipopeptide" CHEMISTRY--A EUROPEAN JOURNAL (2001), 7(5), 1095-1101 , XP001076849 abstract	1-72
X	WO 99 39738 A (BRACCO RESEARCH SA) 12 August 1999 (1999-08-12) claims	1-72

Continuation of Box I.1

Although claims 51-54 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 46-50 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In national Application No

PCT/US 01/25685

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9850040	A	12-11-1998	US 6090800 A	18-07-2000
			AU 6185398 A	20-10-1998
			AU 6971998 A	27-11-1998
			AU 6974798 A	27-11-1998
			EP 1037673 A1	27-09-2000
			WO 9842383 A1	01-10-1998
			WO 9850040 A1	12-11-1998
			WO 9850041 A1	12-11-1998
			US 6028066 A	22-02-2000
			US 6120751 A	19-09-2000
US 5620689	A	15-04-1997	US 5527528 A	18-06-1996
			US 5213804 A	25-05-1993
			US 5013556 A	07-05-1991
			AU 6527294 A	24-10-1994
			WO 9422429 A1	13-10-1994
			US 2001051183 A1	13-12-2001
			US 5843473 A	01-12-1998
			US 5356633 A	18-10-1994
			AT 115401 T	15-12-1994
			AT 122229 T	15-05-1995
			AU 642679 B2	28-10-1993
			AU 6637490 A	16-05-1991
			AU 654120 B2	27-10-1994
			AU 6898291 A	16-05-1991
			CA 2067133 A1	21-04-1991
			CA 2067178 A1	21-04-1991
			DE 69015207 D1	26-01-1995
			DE 69015207 T2	04-05-1995
			DE 69019366 D1	14-06-1995
			DE 69019366 T2	05-10-1995
			DK 496835 T3	17-07-1995
			EP 0496813 A1	05-08-1992
			EP 0496835 A1	05-08-1992
			ES 2071976 T3	01-07-1995
			FI 921763 A	21-04-1992
			FI 921764 A	21-04-1992
			GR 3017060 T3	30-11-1995
			HK 14097 A	14-02-1997
			IL 96069 A	08-12-1995
			IL 96070 A	30-03-1995
			JP 2889549 B2	10-05-1999
			JP 10001431 A	06-01-1998
			JP 5501264 T	11-03-1993
			JP 2667051 B2	22-10-1997
			JP 5505173 T	05-08-1993
			JP 2001181214 A	03-07-2001
			KR 134982 B1	22-04-1998
			LU 88854 A9	11-03-1997
			NO 921213 A	04-06-1992
			NO 304637 B1	25-01-1999
			WO 9105545 A1	02-05-1991
			WO 9105546 A1	02-05-1991
			US 5225212 A	06-07-1993
WO 9507072	A	16-03-1995	DE 4330958 A1	16-03-1995
			DE 4416818 A1	16-11-1995
			AT 197124 T	15-11-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Application No
 PCT/US 01/25685

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9507072	A		AU 7655194 A	27-03-1995
			AU 7729998 A	10-09-1998
			CA 2171303 A1	16-03-1995
			DE 59409568 D1	30-11-2000
			DK 717617 T3	05-02-2001
			WO 9507072 A2	16-03-1995
			EP 0717617 A1	26-06-1996
			ES 2152990 T3	16-02-2001
			HU 74509 A2	28-01-1997
			JP 9502191 T	04-03-1997
			NO 960973 A	08-03-1996
			PT 717617 T	30-04-2001
			US 6284280 B1	04-09-2001
			US 6068857 A	30-05-2000
WO 9428873	A	22-12-1994	US 5580575 A	03-12-1996
			AU 696056 B2	27-08-1998
			AU 6953794 A	03-01-1995
			AU 684088 B2	04-12-1997
			AU 7094894 A	03-01-1995
			AU 8840698 A	04-02-1999
			CA 2164843 A1	22-12-1994
			CA 2164846 A1	22-12-1994
			CN 1125393 A	26-06-1996
			CN 1125394 A	26-06-1996
			EP 0802788 A1	29-10-1997
			EP 0707471 A1	24-04-1996
			JP 9501410 T	10-02-1997
			JP 8511523 T	03-12-1996
			WO 9428873 A1	22-12-1994
			WO 9428874 A1	22-12-1994
			US 5542935 A	06-08-1996
			US 6315981 B1	13-11-2001
			US 5773024 A	30-06-1998
			US 5733572 A	31-03-1998
			US 5922304 A	13-07-1999
			US 5705187 A	06-01-1998
			US 5770222 A	23-06-1998
			US 6088613 A	11-07-2000
			US 5656211 A	12-08-1997
			US 6146657 A	14-11-2000
			US 6039557 A	21-03-2000
WO 9939738	A	12-08-1999	AU 1980999 A	23-08-1999
			CA 2319433 A1	12-08-1999
			EP 1056473 A1	06-12-2000
			WO 9939738 A1	12-08-1999
			JP 2002502829 T	29-01-2002
			US 6258378 B1	10-07-2001
			ZA 9900987 A	06-08-1999

TRANSMITTAL LETTER TO THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE

Date	16 August 2001
International Application No.	
Attorney Docket No.	PH7103PCT

I. Certification under 37 CFR 1.10 (If applicable)

EP511105898US
Express Mail mailing number

16 August 2001 (16.08.01)
Date of Deposit

I hereby certify that the application/correspondence attached hereto is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above and is addressed to Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

<i>Ellen M. Godfrey</i>
Signature of person mailing correspondence

ELLEN M. GODFREY
Typed or printed name of person mailing correspondence

II. New International Application

TITLE	GAS MICROSPHERE LIPOSOME COMPOSITES FOR ULTRASOUND IMAGING AND ULTRASOUND STIMULATED DRUG RELEASE
-------	---

Earliest priority date (Day/Month/Year)
--

SCREENING DISCLOSURE INFORMATION: In order to assist in screening the accompanying international application for purposes of determining whether a license for foreign transmittal should and could be granted and for other purposes, the following information is supplied. (Note: check as many boxes as apply):

- A. ☐ The invention disclosed was not made in the United States.
- B. ☒ There is no prior U.S. application relating to this invention.
- C. ☐ The following prior U.S. application(s) contain subject matter which is related to the invention disclosed in the attached international application. (NOTE: priority to these applications may or may not be claimed on form PCT/RO/101 (Request) and this listing does not constitute a claim for priority).

application no.		filed on	
application no.		filed on	

- D. ☐ The present international application ☐ is identical ☐ contains less subject matter than that found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C.
- E. ☐ The present international application ☐ contains additional subject matter not found in the prior U.S. application(s) identified in paragraph C. above. The additional subject matter is found on pages and ☐ DOES NOT ALTER ☐ MIGHT BE CONSIDERED TO ALTER the general nature of the invention in a manner which would require the U.S. application to have been made available for inspection by the appropriate defense agencies under 35 U.S.C. 181 and 37 CFR 5.1. See 37 CFR 5.15

III. ☐ A Response to an Invitation from the RO/US. The following document(s) is (are) enclosed:

- A. ☐ A Request for An Extension of Time to File a Response
- B. ☐ A Power of Attorney (General or Regular)
- C. ☐ Replacement pages:

pages		of the request (PCT/RO/101)	pages		of the figures
pages		of the description	pages		of the abstract
pages		of the claims			

- D. ☐ Submission of Priority Documents

Priority document		Priority document	
-------------------	--	-------------------	--

- E. ☐ Fees as specified on attached Fee Calculation sheet form PCT/RO/101 annex

IV. ☐ A Request for Rectification under PCT 91 ☐ A Petition ☐ A Sequence Listing Diskette

V. ☐ Other (please specify):

The person signing this form is the:	☐ Applicant	BLAIR Q. FERGUSON
	☒ Attorney/Agent (Reg. No.) 34,329	Typed name of signer
	☐ Common Representative	Signature

PCT REQUEST

1/4

Original (for SUBMISSION) - printed on 16.08.2001 03:09:36 PM

PH7103PCT

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form - PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.03.2001)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	PH7103PCT
I	Title of invention	GAS MICROSPHERE LIPOSOME COMPOSITES FOR ULTRASOUND IMAGING AND ULTRASOUND STIMULATED DRUG RELEASE
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States
II-4	Name	DUPONT PHARMACEUTICALS COMPANY
II-5	Address:	CHESTNUT RUN PLAZA 974 CENTRE ROAD WILMINGTON, DE 19805 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	302-992-4528
II-9	Facsimile No.	302-773-0164
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	inventor only
III-1-4	Name (LAST, First)	CARPENTER, JR., Alan, P.
III-1-5	Address:	73 Cranberry Hill Lane Carlisle, MA 01741 United States of America

PCT REQUEST

2/4

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.08.2001 03:09:36 PM

PH7103PCT

III-2	Applicant and/or Inventor	
III-2-1	This person is:	inventor only
III-2-4	Name (LAST, First)	SLACK, Gregory, C.
III-2-5	Address:	124 Wheeler Road Hollis, NH 03049 United States of America
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	DOLAN, Peter, L.
IV-1-2	Address:	DUPONT PHARMACEUTICALS COMPANY Legal Patent Records Center 1007 Market Street Wilmington, DE 19898 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	302-992-4528
IV-1-4	Facsimile No.	302-773-0164
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AP: GH GM KE LS MW ME SD SL SE TZ UG ZW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT EP: AT BE CH LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BE CA CH LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DE EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX ME NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TE UA UG UZ VN YU ZA ZW

PCT REQUEST

3/4

PH7103PCT

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.08.2001 03:09:36 PM

V-5	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE	
VI	Priority claim	NONE	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	-
IX-2	Description	33	-
IX-3	Claims	11	-
IX-4	Abstract	1	EEABST00.TXT
IX-5	Drawings	3	-
IX-7	TOTAL	52	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-11	Copy of general power of attorney	✓	-
IX-17	PCT-EASY diskette	-	Diskette
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	

128
128

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 16.08.2001 03:09:36 PM

PH7103PCT

X-1	Signature of applicant, agent or common representative	
X-1-1	Name	DUPONT PHARMACEUTICALS COMPANY
X-1-2	Name of signatory	DOLAN, Peter, L.
X-1-3	Capacity	Senior Patent Agent

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--



Bristol-Myers Squibb Company
Chestnut Run Plaza 974 Centre Road Wilmington, DE 19805 302 992-5000

129 (3)
1351

ATTORNEY DOCKET NO.: PH-7103

IN THE UNITED STATES RECEIVING OFFICE (US/RO)

International Application No.: PCT/US01/25685
International Filing Date: 16 August 2001
Applicant: DuPont Pharmaceuticals Company

Box PCT
Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Attention: RO/US

REQUEST FOR ENTRY OF CHANGE OF NAME OF ASSIGNEE

The above-identified International Application was filed in the name of DuPont Pharmaceuticals Company on the date indicated above. As of October 1, 2001, the name of the Assignee in this application was changed from DuPont Pharmaceuticals Company to Bristol-Myers Squibb Pharma Company. The new mailing address is Patent Department, P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000.

Applicant hereby respectfully requests that entry of this name change to the permanent record of the subject International Application be made.

BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY

Peter L. Dolan
Agent for Applicant
Registration No. 46,307
Phone: 302/992-4528
Date: October 16, 2001

**UNITED STATES
PATENT AND
TRADEMARK OFFICE**

FEBRUARY 19, 2002

PTAS
BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY
PETER L. DOLAN
PATENT DEPARTMENT
P.O. BOX 4000
PRINCETON, NJ 08543-4000

Under Secretary of Commerce For Intellectual Property and
Director of the United States Patent and Trademark Office
Washington, DC 20231
www.uspto.gov



**UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT**

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, ASSIGNMENT DIVISION, BOX ASSIGNMENTS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C. 20231.

RECORDATION DATE: 12/27/2001

REEL/FRAME: 012396/0973
NUMBER OF PAGES: 2

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS)

ASSIGNOR:
CARPENTER, ALAN P. JR.

DOC DATE: 08/25/2001

ASSIGNOR:
SLACK, GREGORY C.

DOC DATE: 08/28/2001

ASSIGNEE:
BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA
COMPANY (FORMERLY D/B/A DUPONT
PHARMACEUTICALS COMPANY)
P.O. BOX 4000
PATENT DEPARTMENT
PRINCETON, NEW JERSEY 08543-4000

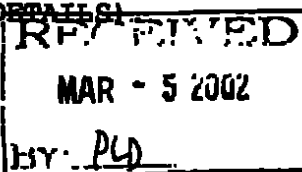
SERIAL NUMBER: 09931317
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 08/16/2001
ISSUE DATE:

**RECEIVED
BMS PATENT LAW**

FEB 26 2002

Docketed Item _____
Due Date _____
Attorney PLD



*Ed 1-
Imaging*
DOCKETED: 5/4/22
Due Date: _____
No Action Required: dmh

012396/0973 PAGE 2

SHAREILL COLES, EXAMINER
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

122631

12-31-2001

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office

12.27.01

134

To the Honorable Commissioner of Pat



101931425

ied original documents or copy thereof

pe:

1. Submission Type:

- ☒ New
☐ Resubmission (Non-Recordation)
Document ID# _____
☐ Correction of PTO Error
Reel # _____ Frame # _____
☐ Corrective Document
Reel # _____ Frame # _____

Data Element in Question :

- ☒ Assignment ☐ Security Agreement
☐ License ☐ Change of Name
☐ Merger ☐ Other _____

US. GOVERNMENT

(For Use ONLY by U.S. Government Agencies)

- ☐ Departmental File ☐ Secret File

Total No. of pages of conveyance document including attachments

4. Name of conveying party(ies):

1. Alan P. Carpenter Jr.
2. Gregory C. Slack

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☐ No

Execution Date: Inventors 1: 08/25/01 2: 08/28/2001

5. Name and address of receiving party(ies):

Bristol-Myers Squibb Pharma Company
(formerly D/B/A DuPont Pharmaceuticals Company)
Patent Department
P.O. Box 4000
Princeton, NJ 08543-4000

Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No

6. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is: _____

A. Patent Application No.(s): 09/931,317
Docket No.: PH-7103

B. Patent No.(s): DEC 2 2001

Additional numbers attached: ☐ Yes ☒ No

7. Correspondent Name & Address:

PETER L. DOLAN
BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY
PATENT DEPARTMENT
P.O. BOX 4000
PRINCETON, NJ 08543-4000

8. Total number of applications and patents involved: 1

9. Total fee (37 CFR 3.41)..... \$40.00

- ☐ Enclosed (Check No.: _____)
☒ Authorized to be charged to deposit account

10. Deposit account number: 023850
(Attach duplicate copy of this page if paying by deposit account)

DO NOT USE THIS SPACE

12/31/2001 AMNE31 00000032 023850 09931317

Fee \$40.00 CH

11. Statement and signature.

To the best of my knowledge and belief, the foregoing information is true and correct and any attached copy is a true copy of the original document.

Ellen M. Godfrey, Legal Secretary

Signature

Date

Ellen M. Godfrey

11-21-2001

Total number of pages comprising cover sheet: 1

133
TENT APPLICATION ASSIGNMENT

We, the undersigned

ALAN P. CARPENTER, JR. AND GREGORY C. SLACK

Hereby declare that

We are the true and first inventors of an invention entitled **GAS MICROSPHERE LIPOSOME COMPOSITES FOR ULTRASOUND IMAGING AND ULTRASOUND STIMULATED DRUG RELEASE** (and which is identified as Case Number PH-7103) and which is disclosed in an application for Letters Patent in the United States of America.

For valuable consideration, the receipt and adequacy of which is hereby acknowledged and in fulfillment of our pre-existing obligation of assignment, we hereby:

I. Sell, assign, and transfer unto DuPont Pharmaceuticals Company, a General Partnership organized and existing under the laws of the State of Delaware in the United States of America and having its principal place of business at Chestnut Run Plaza, 974 Centre Road, Wilmington, Delaware 19805, hereinafter referred to as the assignee, (A) the sole and entire right, and interest in and to: (1) the aforesaid application for Letters Patent, (2) any priority rights derived from the aforesaid application for Letters Patent by virtue of intellectual property for any and all member countries of the aforesaid International Convention or other treaty or understanding, (3) any and all of our inventions, whether joint or sole, disclosed in the aforesaid application for Letters Patent, (4) any and all applications for Letters Patent for any such inventions in any country whatsoever, (5) any and all patents for any such inventions in any country whatsoever; and (B) the sole right to (1) file such applications in its name or ours, (2) file such applications under the aforesaid International Convention or other treaty or understanding, (3) have said patents granted in its name or ours, and (4) enforce said patents and to sue for and recover profits and damages for any and all infringements thereof whether past or future; and

II. Agree, whenever requested, to communicate to said assignee, its successors, assigns, and legal representatives, any facts known to us respecting said rights, to testify in any legal proceeding respecting said rights, to execute all applications, papers or instruments necessary or required by said assignee, its successors, assigns and legal representatives, to carry into effect any of the provisions of this instrument, and generally to do everything possible to aid said assignee, its successors, assigns, and legal representatives to obtain and enforce proper patent protection for said inventions in any and all countries.

We further authorize our attorney/patent agent to insert below* the application number and filing date of the aforesaid United States application now identified as Case Number. After the same shall have been made known to him/her by the United States Patent Office.

Date: August 25, 2001
Alan P. Carpenter, Jr. (L.S.)
Alan P. Carpenter, Jr.

Date: August 28, 2001
Gregory C. Slack (L.S.)
Gregory C. Slack

*The application referred to above (Case No. PH-7103) was filed in the United States Patent Office on August 16, 2001, and was given Application No. 09/931,317.

This insertion made by me this 21 day of Nov. 2001

Peter L. Dolan
Peter L. Dolan/AGENT FOR APPLICANTS

134
15
17

APRIL 22, 2002

PTAS

Chief Financial Officer and Chief Administrative Officer
Washington, DC 20231
www.uspto.govDENISE BIERLEIN
EXPERIMENTAL STATION
ROUTE 141 & HENRY CLAY ROAD
WILMINGTON, DE 19880-0353

101995156A

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, ASSIGNMENT DIVISION, BOX ASSIGNMENTS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C. 20231.

RECORDATION DATE: 02/11/2002

REEL/FRAME: 012607/0038
NUMBER OF PAGES: 17

BRIEF: CHANGE OF NAME (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:

DUPONT PHARMACEUTICALS COMPANY

DOC DATE: 10/01/2001

ASSIGNEE:

BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA
COMPANY

P.O. BOX 4000

PATENT DEPARTMENT

PRINCETON, NEW JERSEY 08543-4000

SERIAL NUMBER: 07192690
PATENT NUMBER:FILING DATE: 05/11/1988
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 07251963
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/29/1988
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 07547414
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/29/1990
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 07315837
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/27/1989
ISSUE DATE:

135
75

012607/0038 PAGE 2

SERIAL NUMBER: 07545302
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 06/27/1990
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 07657919
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 02/20/1991
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 06452197
PATENT NUMBER: 4652555

FILING DATE: 12/22/1982
ISSUE DATE: 03/24/1987

SERIAL NUMBER: 06842958
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 03/24/1986
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 06885733
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 07/21/1986
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 08348029
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 12/01/1994
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 09113905
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 07/10/1998
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 09034444
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 03/04/1998
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 08399808
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 03/07/1995
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 09940910
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 08/28/2001
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 08091103
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 07/13/1993
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 08473407
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 06/07/1995
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 09969256
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 10/02/2001
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 08909124
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 08/11/1997
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 09305561
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 05/05/1999
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 09525619
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 03/14/2000
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 09930782
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 08/16/2001
ISSUE DATE:

SERIAL NUMBER: 09713002
PATENT NUMBER:

FILING DATE: 11/17/2000
ISSUE DATE:

012607/0038 PAGE 3

SERIAL NUMBER: 09919065
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/31/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09492708
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/27/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09801137
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/07/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09630824
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/02/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09924381
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/08/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09333160
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/14/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09912837
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/25/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09975813
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/12/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09789673
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/21/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09122126
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/24/1998
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09634786
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/09/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09634287
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/09/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09634286
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/09/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09393782
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/10/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09134484
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/14/1998
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09828751
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/09/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09657518
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/07/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09919564
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/31/2001
ISSUE DATE:

137X36

132137

012607/0038 PAGE 4

SERIAL NUMBER: 09329421
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/10/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09237061
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/26/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09416431
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/12/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09610819
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/06/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09339997
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/25/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09250507
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/16/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09833302
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/12/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09416584
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/12/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09794825
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/27/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09481980
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/12/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09994493
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/26/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09869769
PATENT NUMBER:FILING DATE:
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09506360
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/17/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09905417
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/13/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09490949
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/24/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09728695
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/01/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09625291
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/25/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09624686
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/25/2000
ISSUE DATE:

137/138

012607/0038 PAGE 5

SERIAL NUMBER: 09543291
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/05/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09312066
PATENT NUMBER: 6365987FILING DATE: 05/13/1999
ISSUE DATE: 04/02/2002SERIAL NUMBER: 09481981
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/12/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09594954
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/15/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09491796
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/26/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09905321
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/13/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09611854
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/07/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09801467
PATENT NUMBER:FILING DATE:
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09454868
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/03/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09519188
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/06/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 10003972
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/02/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09573789
PATENT NUMBER:FILING DATE: 05/17/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09465286
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/17/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09598821
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/21/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09981833
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/18/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09634784
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/09/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09527335
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/17/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09898279
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/03/2001
ISSUE DATE:

134
134

012607/0038 PAGE 6

SERIAL NUMBER: 09505788
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/17/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09540056
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/31/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09626286
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/25/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09990138
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/21/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09615465
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/13/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60327816
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/09/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60329636
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/17/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60335962
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/02/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60336994
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/04/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60336972
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/04/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60337051
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/04/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09415503
PATENT NUMBER: 6352990FILING DATE: 10/08/1999
ISSUE DATE: 03/05/2002SERIAL NUMBER: 09995159
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/27/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60333651
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/27/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60331829
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/20/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09805645
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/14/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09661008
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/13/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09691249
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/18/2000
ISSUE DATE:

140
/4/

012607/0038 PAGE 7

SERIAL NUMBER: 09906963
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/16/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09684718
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/07/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09686523
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/11/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09687602
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/13/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09687192
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/13/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09704306
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/02/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09704305
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/02/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09686382
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/11/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 10005938
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/03/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09466442
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/17/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09597400
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/21/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09463948
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/17/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09469835
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/22/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09738666
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/15/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09465287
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/17/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09728653
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/01/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09788227
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/16/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09909731
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/20/2001
ISSUE DATE:

141
X
X
X

012607/0038 PAGE 8

SERIAL NUMBER: 09808832
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/15/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60252062
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/20/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09811116
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/16/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60255539
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/14/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09811233
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/16/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09795410
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/28/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09540030
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/31/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09824996
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/03/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09824868
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/03/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09817957
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/27/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09823820
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/31/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09845867
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/30/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09825211
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/03/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09824945
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/03/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09871840
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/01/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09878579
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/11/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09832455
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/11/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09595250
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/15/2000
ISSUE DATE:

142
37

012607/0036 PAGE 9

SERIAL NUMBER: 09594008
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/15/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09885550
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/20/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09887936
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/22/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09887850
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/22/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60246124
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/06/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09892319
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/27/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09899629
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/05/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09895138
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/29/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09896939
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/29/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09611853
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/07/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09898326
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/03/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09902845
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/11/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09901937
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/10/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09905097
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/13/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60284856
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/19/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09908995
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/19/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09908430
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/18/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60219794
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/19/2000
ISSUE DATE:

174/143

012607/0038 PAGE 10

SERIAL NUMBER: 09908126
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/18/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60219399
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/19/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09908431
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/18/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09908825
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/19/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09912950
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/25/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09960040
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/21/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09954379
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/17/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09684739
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/07/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60242557
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/23/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60246107
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/06/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60313552
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/20/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60246125
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/06/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60246108
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/06/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60254116
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/08/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 10000820
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/30/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60251213
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/01/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60255290
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/13/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60256855
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/20/2000
ISSUE DATE:

144

012607/0038 PAGE 11

SERIAL NUMBER: 60256904
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/20/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60256740
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/20/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60256745
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/20/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60256765
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/20/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60256821
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/20/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60265437
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/31/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09563175
PATENT NUMBER:FILING DATE: 05/02/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09569766
PATENT NUMBER:FILING DATE: 05/12/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60260952
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/11/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60260957
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/11/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60269243
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/16/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60255168
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/13/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60275331
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/13/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60275403
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/13/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60278173
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/23/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60278165
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/23/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60279214
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/28/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60279217
PATENT NUMBER:FILING DATE:
ISSUE DATE:

145
146

012607/0038 PAGE 12

SERIAL NUMBER: 60275898
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/15/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60272441
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/01/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60272434
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/01/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60282438
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/09/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60270188
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/21/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60284818
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/19/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60285638
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/20/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60244092
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/27/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60292665
PATENT NUMBER:FILING DATE: 05/22/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60293571
PATENT NUMBER:FILING DATE: 05/25/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60303519
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/06/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60304084
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/10/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60304921
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/12/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60306999
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/20/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60305067
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/13/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60284614
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/18/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60290706
PATENT NUMBER:FILING DATE: 05/14/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60284615
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/18/2001
ISSUE DATE:

177X 46

012607/0038 PAGE 13

SERIAL NUMBER: 60311466
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/11/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60313052
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/17/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60315575
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/29/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60317529
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/06/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60318285
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/10/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09219083
PATENT NUMBER: 6077438FILING DATE: 12/22/1998
ISSUE DATE: 06/20/2000SERIAL NUMBER: 09415541
PATENT NUMBER: 6210571FILING DATE: 10/08/1999
ISSUE DATE: 04/03/2001SERIAL NUMBER: 08959495
PATENT NUMBER: 6245937FILING DATE: 10/28/1997
ISSUE DATE: 06/12/2001SERIAL NUMBER: 08281195
PATENT NUMBER: 5807683FILING DATE: 07/26/1994
ISSUE DATE: 09/15/1998SERIAL NUMBER: 09102600
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/22/1998
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09116435
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/15/1998
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09272996
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/18/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09185450
PATENT NUMBER: 6066848FILING DATE: 11/03/1998
ISSUE DATE: 05/23/2000SERIAL NUMBER: 60260719
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/10/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60318707
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/13/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60322630
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/17/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60313549
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/20/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60324165
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/21/2001
ISSUE DATE:

147
72

012607/0038 PAGE 14

SERIAL NUMBER: 60323042
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/18/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60323166
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/18/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60324874
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/26/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 08040336
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/30/1993
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09417678
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/14/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09704304
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/02/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 08943659
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/03/1997
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09285400
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/02/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09458110
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/08/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09285280
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/02/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09191672
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/13/1998
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09591444
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/09/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09281474
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/30/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09599295
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/21/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09621569
PATENT NUMBER:FILING DATE: 07/21/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09534893
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/24/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09466588
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/17/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09599890
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/21/2000
ISSUE DATE:

147/148

012607/0038 PAGE 15

SERIAL NUMBER: 09281209
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/30/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09465300
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/17/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09599364
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/21/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09948807
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/07/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09947783
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/07/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09948390
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/07/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09660377
PATENT NUMBER:FILING DATE: 09/12/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09281050
PATENT NUMBER:FILING DATE: 03/30/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09466582
PATENT NUMBER:FILING DATE: 12/17/1999
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09599365
PATENT NUMBER:FILING DATE: 06/21/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 07430893
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/31/1989
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09783249
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/14/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09783248
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/14/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09826449
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/05/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09826549
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/05/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09859261
PATENT NUMBER:FILING DATE: 05/17/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09931317
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/16/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 10002359
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/02/2001
ISSUE DATE:

149
55

012607/0038 PAGE 16

SERIAL NUMBER: 60245554
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/03/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60243370
PATENT NUMBER:FILING DATE: 10/26/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60248299
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/14/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 09995388
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/27/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60253324
PATENT NUMBER:FILING DATE: 11/27/2000
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60260500
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/09/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60260615
PATENT NUMBER:FILING DATE: 01/09/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60265919
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/02/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60271389
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/26/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60270954
PATENT NUMBER:FILING DATE: 02/23/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60281057
PATENT NUMBER:FILING DATE: 04/03/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60310859
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/08/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 60310761
PATENT NUMBER:FILING DATE: 08/08/2001
ISSUE DATE:SERIAL NUMBER: 06336764
PATENT NUMBER: 4355041FILING DATE: 01/04/1982
ISSUE DATE: 10/19/1982SERIAL NUMBER: 06349201
PATENT NUMBER: 4548946FILING DATE: 02/22/1982
ISSUE DATE: 10/22/1985SERIAL NUMBER: 06567411
PATENT NUMBER: 4461773FILING DATE: 01/05/1984
ISSUE DATE: 07/24/1984SERIAL NUMBER: 06570450
PATENT NUMBER: 4590205FILING DATE: 01/17/1984
ISSUE DATE: 05/20/1986SERIAL NUMBER: 07102428
PATENT NUMBER: 4820282FILING DATE: 09/29/1987
ISSUE DATE: 04/11/1989

150
17

012607/003B PAGE 17

SERIAL NUMBER: 06678680
PATENT NUMBER: 4749712FILING DATE: 12/05/1984
ISSUE DATE: 06/07/1988SERIAL NUMBER: 06733464
PATENT NUMBER: 4668685FILING DATE: 05/14/1985
ISSUE DATE: 05/26/1987SERIAL NUMBER: 06803191
PATENT NUMBER: 4705799FILING DATE: 12/02/1985
ISSUE DATE: 11/10/1987SERIAL NUMBER: 06741762
PATENT NUMBER: 4626539FILING DATE: 06/10/1985
ISSUE DATE: 12/02/1986SERIAL NUMBER: 06730064
PATENT NUMBER: 4673565FILING DATE: 05/03/1985
ISSUE DATE: 06/16/1987SERIAL NUMBER: 06700654
PATENT NUMBER: 4569937FILING DATE: 02/11/1985
ISSUE DATE: 02/11/1986SERIAL NUMBER: 06692412
PATENT NUMBER: 4639454FILING DATE: 01/17/1985
ISSUE DATE: 01/27/1987SERIAL NUMBER: 06839912
PATENT NUMBER: 4833164FILING DATE: 03/19/1986
ISSUE DATE: 05/23/1989SERIAL NUMBER: 07324533
PATENT NUMBER: 4906636FILING DATE: 03/16/1989
ISSUE DATE: 03/06/1990SERIAL NUMBER: 07324534
PATENT NUMBER: 4985435FILING DATE: 03/16/1989
ISSUE DATE: 01/15/1991SERIAL NUMBER: 07327717
PATENT NUMBER: 4985442FILING DATE: 03/23/1989
ISSUE DATE: 01/15/1991SERIAL NUMBER: 07445776
PATENT NUMBER: 5026759FILING DATE: 12/04/1989
ISSUE DATE: 06/25/1991SERIAL NUMBER: 07391406
PATENT NUMBER: 4990617FILING DATE: 07/27/1989
ISSUE DATE: 02/05/1991SERIAL NUMBER: 07060203
PATENT NUMBER: 4889862FILING DATE: 06/10/1987
ISSUE DATE: 12/26/1989SERIAL NUMBER: 06863045
PATENT NUMBER: 4673679FILING DATE: 05/14/1986
ISSUE DATE: 06/16/1987SERIAL NUMBER: 06944953
PATENT NUMBER: 4760083FILING DATE: 01/05/1987
ISSUE DATE: 07/26/1988SERIAL NUMBER: 07129150
PATENT NUMBER: 4876259FILING DATE: 12/07/1987
ISSUE DATE: 10/24/1989SERIAL NUMBER: 07234382
PATENT NUMBER: 5173489FILING DATE: 08/23/1988
ISSUE DATE: 12/22/1992

151
K

012607/0038 PAGE 18

SERIAL NUMBER: 07953274
PATENT NUMBER: 5300642FILING DATE: 09/30/1992
ISSUE DATE: 04/05/1994SERIAL NUMBER: 07953273
PATENT NUMBER: 5434264FILING DATE: 09/30/1992
ISSUE DATE: 07/18/1995SERIAL NUMBER: 07106358
PATENT NUMBER: 4801600FILING DATE: 10/09/1987
ISSUE DATE: 01/31/1989SERIAL NUMBER: 07233828
PATENT NUMBER: 4921869FILING DATE: 08/19/1988
ISSUE DATE: 05/01/1990SERIAL NUMBER: 07497211
PATENT NUMBER: 4985429FILING DATE: 03/15/1990
ISSUE DATE: 01/15/1991SERIAL NUMBER: 07497212
PATENT NUMBER: 5032605FILING DATE: 03/15/1990
ISSUE DATE: 07/16/1991SERIAL NUMBER: 07497213
PATENT NUMBER: 4965268FILING DATE: 03/15/1990
ISSUE DATE: 10/23/1990SERIAL NUMBER: 07497214
PATENT NUMBER: 5036093FILING DATE: 03/15/1990
ISSUE DATE: 07/30/1991SERIAL NUMBER: 07497215
PATENT NUMBER: 5036092FILING DATE: 03/15/1990
ISSUE DATE: 07/30/1991SERIAL NUMBER: 07497216
PATENT NUMBER: 5039690FILING DATE: 03/15/1990
ISSUE DATE: 08/13/1991SERIAL NUMBER: 07071028
PATENT NUMBER: 4876269FILING DATE: 07/16/1987
ISSUE DATE: 10/24/1989SERIAL NUMBER: 07362681
PATENT NUMBER: 4929627FILING DATE: 06/07/1989
ISSUE DATE: 05/29/1990SERIAL NUMBER: 07455882
PATENT NUMBER: 5010085FILING DATE: 12/21/1989
ISSUE DATE: 04/23/1991SERIAL NUMBER: 07455887
PATENT NUMBER: 5043350FILING DATE: 12/21/1989
ISSUE DATE: 08/27/1991SERIAL NUMBER: 07134261
PATENT NUMBER: 4952232FILING DATE: 12/17/1987
ISSUE DATE: 08/28/1990SERIAL NUMBER: 07423243
PATENT NUMBER: 4980367FILING DATE: 10/18/1989
ISSUE DATE: 12/25/1990SERIAL NUMBER: 07423256
PATENT NUMBER: 4965281FILING DATE: 10/18/1989
ISSUE DATE: 10/23/1990SERIAL NUMBER: 07423250
PATENT NUMBER: 4965280FILING DATE: 10/18/1989
ISSUE DATE: 10/23/1990

52
37

012607/0038 PAGE 19

SERIAL NUMBER: 07602341
PATENT NUMBER: 5084465FILING DATE: 10/23/1990
ISSUE DATE: 01/28/1992SERIAL NUMBER: 07376457
PATENT NUMBER: 4977173FILING DATE: 07/07/1989
ISSUE DATE: 12/11/1990SERIAL NUMBER: 07230448
PATENT NUMBER: 4859693FILING DATE: 08/10/1988
ISSUE DATE: 08/22/1989SERIAL NUMBER: 07398999
PATENT NUMBER: 5019650FILING DATE: 08/28/1989
ISSUE DATE: 05/28/1991SERIAL NUMBER: 07398996
PATENT NUMBER: 5086063FILING DATE: 08/28/1989
ISSUE DATE: 02/04/1992SERIAL NUMBER: 07244170
PATENT NUMBER: 4900744FILING DATE: 09/14/1988
ISSUE DATE: 02/13/1990SERIAL NUMBER: 07225809
PATENT NUMBER: 4948801FILING DATE: 07/29/1988
ISSUE DATE: 08/14/1990SERIAL NUMBER: 07558129
PATENT NUMBER: 5130316FILING DATE: 07/25/1990
ISSUE DATE: 07/14/1992SERIAL NUMBER: 07558131
PATENT NUMBER: 5043443FILING DATE: 07/24/1990
ISSUE DATE: 08/27/1991SERIAL NUMBER: 07929452
PATENT NUMBER: 5254577FILING DATE: 08/14/1992
ISSUE DATE: 10/19/1993SERIAL NUMBER: 07279193
PATENT NUMBER: 5015651FILING DATE: 12/06/1988
ISSUE DATE: 05/14/1991SERIAL NUMBER: 07498938
PATENT NUMBER: 5081127FILING DATE: 03/26/1990
ISSUE DATE: 01/14/1992SERIAL NUMBER: 07498939
PATENT NUMBER: 5043349FILING DATE: 03/26/1990
ISSUE DATE: 08/27/1991SERIAL NUMBER: 07666593
PATENT NUMBER: 5093346FILING DATE: 03/08/1991
ISSUE DATE: 03/03/1992SERIAL NUMBER: 07711968
PATENT NUMBER: 5189048FILING DATE: 07/10/1991
ISSUE DATE: 02/23/1993SERIAL NUMBER: 07925534
PATENT NUMBER: 5315013FILING DATE: 08/05/1992
ISSUE DATE: 05/24/1994SERIAL NUMBER: 07836323
PATENT NUMBER: 5428041FILING DATE: 03/04/1992
ISSUE DATE: 06/27/1995SERIAL NUMBER: 07293522
PATENT NUMBER: 5093351FILING DATE: 01/05/1989
ISSUE DATE: 03/03/1992

54153

012607/0038 PAGE 20

SERIAL NUMBER: 07469854
PATENT NUMBER: 5049570FILING DATE: 01/23/1990
ISSUE DATE: 09/17/1991SERIAL NUMBER: 07335122
PATENT NUMBER: 5109125FILING DATE: 04/07/1989
ISSUE DATE: 04/28/1992SERIAL NUMBER: 07549820
PATENT NUMBER: 5166148FILING DATE: 07/09/1990
ISSUE DATE: 11/24/1992SERIAL NUMBER: 07968933
PATENT NUMBER: 5314887FILING DATE: 10/30/1992
ISSUE DATE: 05/24/1994SERIAL NUMBER: 07362284
PATENT NUMBER: 4965066FILING DATE: 06/06/1989
ISSUE DATE: 10/23/1990SERIAL NUMBER: 08367481
PATENT NUMBER: 5696119FILING DATE: 12/28/1994
ISSUE DATE: 12/09/1997SERIAL NUMBER: 07805044
PATENT NUMBER: 5206249FILING DATE: 12/11/1991
ISSUE DATE: 04/27/1993SERIAL NUMBER: 08025633
PATENT NUMBER: 5329048FILING DATE: 02/16/1993
ISSUE DATE: 07/12/1994SERIAL NUMBER: 08249773
PATENT NUMBER: 5461176FILING DATE: 05/26/1994
ISSUE DATE: 10/24/1995SERIAL NUMBER: 07549821
PATENT NUMBER: 5166147FILING DATE: 07/09/1990
ISSUE DATE: 11/24/1992SERIAL NUMBER: 07979679
PATENT NUMBER: 5432188FILING DATE: 11/20/1992
ISSUE DATE: 07/11/1995SERIAL NUMBER: 08401599
PATENT NUMBER: 5580871FILING DATE: 03/09/1995
ISSUE DATE: 12/03/1996SERIAL NUMBER: 08047883
PATENT NUMBER: 5354867FILING DATE: 04/15/1993
ISSUE DATE: 10/11/1994SERIAL NUMBER: 07900540
PATENT NUMBER: 5254546FILING DATE: 06/18/1992
ISSUE DATE: 10/19/1993SERIAL NUMBER: 07796097
PATENT NUMBER: 5173494FILING DATE: 11/21/1991
ISSUE DATE: 12/22/1992SERIAL NUMBER: 07464433
PATENT NUMBER: 5087628FILING DATE: 01/12/1990
ISSUE DATE: 02/11/1992SERIAL NUMBER: 07659444
PATENT NUMBER: 5180729FILING DATE: 02/22/1991
ISSUE DATE: 01/19/1993SERIAL NUMBER: 07797599
PATENT NUMBER: 5179113FILING DATE: 11/25/1991
ISSUE DATE: 01/12/1993

154

012607/0038 PAGE 21

SERIAL NUMBER: 07952216
PATENT NUMBER: 5171745FILING DATE: 07/13/1990
ISSUE DATE: 12/15/1992SERIAL NUMBER: 07652034
PATENT NUMBER: 5704297FILING DATE: 02/06/1991
ISSUE DATE: 01/06/1998SERIAL NUMBER: 07770461
PATENT NUMBER: 5175002FILING DATE: 10/02/1991
ISSUE DATE: 12/29/1992SERIAL NUMBER: 07892146
PATENT NUMBER: 5275821FILING DATE: 06/05/1992
ISSUE DATE: 01/04/1994SERIAL NUMBER: 07889896
PATENT NUMBER: 5358946FILING DATE: 05/29/1992
ISSUE DATE: 10/25/1994SERIAL NUMBER: 07906022
PATENT NUMBER: 5192784FILING DATE: 06/26/1992
ISSUE DATE: 03/09/1993SERIAL NUMBER: 08124523
PATENT NUMBER: 5414004FILING DATE: 09/20/1993
ISSUE DATE: 05/09/1995SERIAL NUMBER: 08392648
PATENT NUMBER: 5532247FILING DATE: 02/23/1995
ISSUE DATE: 07/02/1996SERIAL NUMBER: 07889892
PATENT NUMBER: 5478830FILING DATE: 05/29/1992
ISSUE DATE: 12/26/1995SERIAL NUMBER: 07747022
PATENT NUMBER: 5260325FILING DATE: 08/19/1991
ISSUE DATE: 11/09/1993SERIAL NUMBER: 07659443
PATENT NUMBER: 5162341FILING DATE: 02/22/1991
ISSUE DATE: 11/10/1992SERIAL NUMBER: 08296998
PATENT NUMBER: 5491149FILING DATE: 08/26/1994
ISSUE DATE: 02/13/1996SERIAL NUMBER: 07820523
PATENT NUMBER: 5290764FILING DATE: 01/14/1992
ISSUE DATE: 03/01/1994SERIAL NUMBER: 08219596
PATENT NUMBER: 5488110FILING DATE: 03/29/1994
ISSUE DATE: 01/30/1996SERIAL NUMBER: 07820013
PATENT NUMBER: 5254536FILING DATE: 01/10/1992
ISSUE DATE: 10/19/1993SERIAL NUMBER: 08461611
PATENT NUMBER: 5635477FILING DATE: 06/05/1995
ISSUE DATE: 06/03/1997SERIAL NUMBER: 07827429
PATENT NUMBER: 5185447FILING DATE: 01/29/1992
ISSUE DATE: 02/09/1993SERIAL NUMBER: 07821571
PATENT NUMBER: 5272269FILING DATE: 01/16/1992
ISSUE DATE: 12/21/1993

18155

012607/0038 PAGE 22

SERIAL NUMBER: 08117211
PATENT NUMBER: 5424430FILING DATE: 09/10/1993
ISSUE DATE: 06/13/1995SERIAL NUMBER: 08312488
PATENT NUMBER: 5532249FILING DATE: 09/26/1994
ISSUE DATE: 07/02/1996SERIAL NUMBER: 08620643
PATENT NUMBER: 5698559FILING DATE: 03/25/1996
ISSUE DATE: 12/16/1997SERIAL NUMBER: 08392017
PATENT NUMBER: 5519132FILING DATE: 02/21/1995
ISSUE DATE: 05/21/1996SERIAL NUMBER: 07515132
PATENT NUMBER: 5026635FILING DATE: 04/26/1990
ISSUE DATE: 06/25/1991SERIAL NUMBER: 07324027
PATENT NUMBER: 5562905FILING DATE: 03/20/1989
ISSUE DATE: 10/08/1996SERIAL NUMBER: 07317177
PATENT NUMBER: 5153310FILING DATE: 02/28/1989
ISSUE DATE: 10/06/1992SERIAL NUMBER: 07311513
PATENT NUMBER: 4983515FILING DATE: 02/16/1989
ISSUE DATE: 01/08/1991SERIAL NUMBER: 06320773
PATENT NUMBER: 4582855FILING DATE: 11/12/1981
ISSUE DATE: 04/15/1986SERIAL NUMBER: 06401752
PATENT NUMBER: 4466965FILING DATE: 07/26/1982
ISSUE DATE: 08/21/1984SERIAL NUMBER: 06460616
PATENT NUMBER: 4850981FILING DATE: 01/24/1983
ISSUE DATE: 07/25/1989SERIAL NUMBER: 06793879
PATENT NUMBER: D297570FILING DATE: 11/01/1985
ISSUE DATE: 09/06/1988SERIAL NUMBER: 06813732
PATENT NUMBER: 4755527FILING DATE: 12/27/1985
ISSUE DATE: 07/05/1988SERIAL NUMBER: 06784435
PATENT NUMBER: 4798824FILING DATE: 10/03/1985
ISSUE DATE: 01/17/1989SERIAL NUMBER: 06909140
PATENT NUMBER: 4709042FILING DATE: 09/19/1986
ISSUE DATE: 11/24/1987SERIAL NUMBER: 07356948
PATENT NUMBER: 4925860FILING DATE: 05/25/1989
ISSUE DATE: 05/15/1990SERIAL NUMBER: 06468040
PATENT NUMBER: 4485109FILING DATE: 02/25/1983
ISSUE DATE: 11/27/1984SERIAL NUMBER: 06558362
PATENT NUMBER: 4499082FILING DATE: 12/05/1983
ISSUE DATE: 02/12/1985

156

012607/0038 PAGE 23

SERIAL NUMBER: 07178368
PATENT NUMBER: 5187157FILING DATE: 04/06/1988
ISSUE DATE: 02/16/1993SERIAL NUMBER: 07848296
PATENT NUMBER: 5242904FILING DATE: 03/09/1992
ISSUE DATE: 09/07/1993SERIAL NUMBER: 07852023
PATENT NUMBER: 5250720FILING DATE: 03/09/1992
ISSUE DATE: 10/05/1993SERIAL NUMBER: 07714042
PATENT NUMBER: 5294720FILING DATE: 05/31/1991
ISSUE DATE: 03/15/1994SERIAL NUMBER: 08167659
PATENT NUMBER: 5430155FILING DATE: 12/17/1993
ISSUE DATE: 07/04/1995SERIAL NUMBER: 07507693
PATENT NUMBER: 5470967FILING DATE: 04/10/1990
ISSUE DATE: 11/28/1995SERIAL NUMBER: 08381876
PATENT NUMBER: 5633344FILING DATE: 02/17/1995
ISSUE DATE: 05/27/1997SERIAL NUMBER: 08202395
PATENT NUMBER: 5556619FILING DATE: 02/24/1994
ISSUE DATE: 09/17/1996SERIAL NUMBER: 08604212
PATENT NUMBER: 5726284FILING DATE: 05/22/1996
ISSUE DATE: 03/10/1998SERIAL NUMBER: 08746259
PATENT NUMBER: 5667774FILING DATE: 11/07/1996
ISSUE DATE: 09/16/1997SERIAL NUMBER: 08962873
PATENT NUMBER: 5874522FILING DATE: 11/03/1997
ISSUE DATE: 02/23/1999SERIAL NUMBER: 08364338
PATENT NUMBER: 5563127FILING DATE: 12/27/1994
ISSUE DATE: 10/08/1996SERIAL NUMBER: 08690220
PATENT NUMBER: 5698538FILING DATE: 07/26/1996
ISSUE DATE: 12/16/1997SERIAL NUMBER: 08770546
PATENT NUMBER: 5811422FILING DATE: 11/23/1996
ISSUE DATE: 09/22/1998SERIAL NUMBER: 08329039
PATENT NUMBER: 5658885FILING DATE: 10/25/1994
ISSUE DATE: 08/19/1997SERIAL NUMBER: 07913963
PATENT NUMBER: 5326770FILING DATE: 07/17/1992
ISSUE DATE: 07/05/1994SERIAL NUMBER: 08216881
PATENT NUMBER: 5594001FILING DATE: 03/28/1994
ISSUE DATE: 01/14/1997SERIAL NUMBER: 08664631
PATENT NUMBER: 5990132FILING DATE: 06/17/1996
ISSUE DATE: 11/23/1999

152157

012607/0038 PAGE 24

SERIAL NUMBER: 07881033
PATENT NUMBER: 5364875FILING DATE: 05/11/1992
ISSUE DATE: 11/15/1994SERIAL NUMBER: 07921051
PATENT NUMBER: 5321023FILING DATE: 07/29/1992
ISSUE DATE: 06/14/1994SERIAL NUMBER: 08036378
PATENT NUMBER: 5384410FILING DATE: 03/24/1993
ISSUE DATE: 01/24/1995SERIAL NUMBER: 07918836
PATENT NUMBER: 5380755FILING DATE: 07/24/1992
ISSUE DATE: 01/10/1995SERIAL NUMBER: 08016553
PATENT NUMBER: 5376664FILING DATE: 02/11/1993
ISSUE DATE: 12/27/1994SERIAL NUMBER: 08040771
PATENT NUMBER: 5411977FILING DATE: 03/31/1993
ISSUE DATE: 05/02/1995SERIAL NUMBER: 08338977
PATENT NUMBER: 5773411FILING DATE: 11/14/1994
ISSUE DATE: 06/30/1998SERIAL NUMBER: 08820424
PATENT NUMBER: 5849693FILING DATE: 03/12/1997
ISSUE DATE: 12/15/1998SERIAL NUMBER: 08268610
PATENT NUMBER: 5637780FILING DATE: 06/30/1994
ISSUE DATE: 06/10/1997SERIAL NUMBER: 08777645
PATENT NUMBER: 5877312FILING DATE: 12/31/1996
ISSUE DATE: 03/02/1999SERIAL NUMBER: 08040324
PATENT NUMBER: 5663333FILING DATE: 03/30/1993
ISSUE DATE: 09/02/1997SERIAL NUMBER: 08862560
PATENT NUMBER: 5877170FILING DATE: 05/23/1997
ISSUE DATE: 03/02/1999SERIAL NUMBER: 08142635
PATENT NUMBER: 5393886FILING DATE: 10/25/1993
ISSUE DATE: 02/28/1995SERIAL NUMBER: 08370933
PATENT NUMBER: 5618944FILING DATE: 01/10/1995
ISSUE DATE: 04/08/1997SERIAL NUMBER: 08216723
PATENT NUMBER: 5491152FILING DATE: 03/23/1994
ISSUE DATE: 02/13/1996SERIAL NUMBER: 08016555
PATENT NUMBER: 5359070FILING DATE: 02/11/1993
ISSUE DATE: 10/25/1994SERIAL NUMBER: 08371624
PATENT NUMBER: 5817749FILING DATE: 01/12/1995
ISSUE DATE: 10/06/1998SERIAL NUMBER: 08070826
PATENT NUMBER: 5308851FILING DATE: 06/03/1993
ISSUE DATE: 05/03/1994

158
158

012607/0038 PAGE 25

SERIAL NUMBER: 08157860
PATENT NUMBER: 5523302FILING DATE: 11/24/1993
ISSUE DATE: 06/04/1996SERIAL NUMBER: 08612597
PATENT NUMBER: 5739163FILING DATE: 03/08/1996
ISSUE DATE: 04/14/1998SERIAL NUMBER: 08906349
PATENT NUMBER: 6107301FILING DATE: 08/05/1997
ISSUE DATE: 08/22/2000SERIAL NUMBER: 08360248
PATENT NUMBER: 5519143FILING DATE: 09/19/1994
ISSUE DATE: 05/21/1996SERIAL NUMBER: 08208243
PATENT NUMBER: 5559110FILING DATE: 03/09/1994
ISSUE DATE: 09/24/1996SERIAL NUMBER: 08904881
PATENT NUMBER: 6060462FILING DATE: 08/01/1997
ISSUE DATE: 05/09/2000SERIAL NUMBER: 08139444
PATENT NUMBER: 5462964FILING DATE: 10/20/1993
ISSUE DATE: 10/31/1995SERIAL NUMBER: 08307441
PATENT NUMBER: 5510495FILING DATE: 09/19/1994
ISSUE DATE: 04/23/1996SERIAL NUMBER: 08701112
PATENT NUMBER: 5763469FILING DATE: 08/21/1996
ISSUE DATE: 06/09/1998SERIAL NUMBER: 08216724
PATENT NUMBER: 5583147FILING DATE: 03/23/1994
ISSUE DATE: 12/10/1996SERIAL NUMBER: 08110603
PATENT NUMBER: 5616578FILING DATE: 08/26/1993
ISSUE DATE: 04/01/1997SERIAL NUMBER: 08455436
PATENT NUMBER: 5849736FILING DATE: 05/31/1995
ISSUE DATE: 12/15/1998SERIAL NUMBER: 08978295
PATENT NUMBER: 6114328FILING DATE: 11/25/1997
ISSUE DATE: 09/05/2000SERIAL NUMBER: 08230562
PATENT NUMBER: 5508400FILING DATE: 04/20/1994
ISSUE DATE: 04/16/1996SERIAL NUMBER: 08542747
PATENT NUMBER: 5958962FILING DATE: 10/13/1995
ISSUE DATE: 09/28/1999SERIAL NUMBER: 09357748
PATENT NUMBER: 6071918FILING DATE: 07/21/1999
ISSUE DATE: 06/06/2000SERIAL NUMBER: 08181117
PATENT NUMBER: 5543517FILING DATE: 01/13/1994
ISSUE DATE: 08/06/1996SERIAL NUMBER: 08269320
PATENT NUMBER: 5530124FILING DATE: 06/30/1994
ISSUE DATE: 06/25/1996

160139

012607/0038 PAGE 26

SERIAL NUMBER: 08114712
PATENT NUMBER: 5428040FILING DATE: 08/31/1993
ISSUE DATE: 06/27/1995SERIAL NUMBER: 08411251
PATENT NUMBER: 5639759FILING DATE: 03/27/1995
ISSUE DATE: 06/17/1997SERIAL NUMBER: 08820222
PATENT NUMBER: 5874441FILING DATE: 03/18/1997
ISSUE DATE: 02/23/1999SERIAL NUMBER: 09195366
PATENT NUMBER: 6110910FILING DATE: 11/18/1998
ISSUE DATE: 08/29/2000SERIAL NUMBER: 08217911
PATENT NUMBER: 5523408FILING DATE: 03/25/1994
ISSUE DATE: 06/04/1996SERIAL NUMBER: 08510933
PATENT NUMBER: 5578609FILING DATE: 08/03/1995
ISSUE DATE: 11/26/1996SERIAL NUMBER: 08409573
PATENT NUMBER: 5639739FILING DATE: 03/24/1995
ISSUE DATE: 06/17/1997SERIAL NUMBER: 08304614
PATENT NUMBER: 5446056FILING DATE: 09/12/1994
ISSUE DATE: 08/29/1995SERIAL NUMBER: 08268702
PATENT NUMBER: 5466797FILING DATE: 06/30/1994
ISSUE DATE: 11/14/1995SERIAL NUMBER: 08557254
PATENT NUMBER: 5710286FILING DATE: 11/14/1995
ISSUE DATE: 01/20/1998SERIAL NUMBER: 09006538
PATENT NUMBER: 6054597FILING DATE: 01/13/1998
ISSUE DATE: 04/25/2000SERIAL NUMBER: 08343159
PATENT NUMBER: 5563158FILING DATE: 11/22/1994
ISSUE DATE: 10/08/1996SERIAL NUMBER: 08694043
PATENT NUMBER: 5691329FILING DATE: 08/08/1996
ISSUE DATE: 11/25/1997SERIAL NUMBER: 08389603
PATENT NUMBER: 5641782FILING DATE: 02/16/1995
ISSUE DATE: 06/24/1997SERIAL NUMBER: 08268609
PATENT NUMBER: 5559252FILING DATE: 06/30/1994
ISSUE DATE: 09/24/1996SERIAL NUMBER: 08666032
PATENT NUMBER: 5880295FILING DATE: 06/19/1996
ISSUE DATE: 03/09/1999SERIAL NUMBER: 08314991
PATENT NUMBER: 5593994FILING DATE: 09/29/1994
ISSUE DATE: 01/14/1997SERIAL NUMBER: 08753029
PATENT NUMBER: 5932586FILING DATE: 11/19/1996
ISSUE DATE: 08/03/1999

160

012607/0038 PAGE 27

SERIAL NUMBER: 08469409
PATENT NUMBER: 5532356FILING DATE: 06/06/1995
ISSUE DATE: 07/02/1996SERIAL NUMBER: 08901344
PATENT NUMBER: 6056958FILING DATE: 07/28/1997
ISSUE DATE: 05/02/2000SERIAL NUMBER: 08481683
PATENT NUMBER: 5532357FILING DATE: 06/07/1995
ISSUE DATE: 07/02/1996SERIAL NUMBER: 08678211
PATENT NUMBER: 5686631FILING DATE: 07/11/1996
ISSUE DATE: 11/11/1997SERIAL NUMBER: 08950018
PATENT NUMBER: 5856525FILING DATE: 10/14/1997
ISSUE DATE: 01/05/1999SERIAL NUMBER: 08613554
PATENT NUMBER: 5683999FILING DATE: 03/11/1996
ISSUE DATE: 11/04/1997SERIAL NUMBER: 08632863
PATENT NUMBER: 5703092FILING DATE: 04/16/1996
ISSUE DATE: 12/30/1997SERIAL NUMBER: 08632973
PATENT NUMBER: 5691381FILING DATE: 04/16/1996
ISSUE DATE: 11/25/1997SERIAL NUMBER: 08409303
PATENT NUMBER: 5731439FILING DATE: 03/24/1995
ISSUE DATE: 03/24/1998SERIAL NUMBER: 08384289
PATENT NUMBER: 5750528FILING DATE: 02/01/1995
ISSUE DATE: 05/12/1998SERIAL NUMBER: 09283373
PATENT NUMBER: 6107294FILING DATE: 03/31/1999
ISSUE DATE: 08/22/2000SERIAL NUMBER: 08647132
PATENT NUMBER: 5710159FILING DATE: 05/09/1996
ISSUE DATE: 01/20/1998SERIAL NUMBER: 08816706
PATENT NUMBER: 6326368FILING DATE: 03/13/1997
ISSUE DATE: 12/04/2001SERIAL NUMBER: 08643438
PATENT NUMBER: 5668159FILING DATE: 05/08/1996
ISSUE DATE: 09/16/1997SERIAL NUMBER: 09133146
PATENT NUMBER: 6004955FILING DATE: 08/12/1998
ISSUE DATE: 12/21/1999SERIAL NUMBER: 09344250
PATENT NUMBER: 6147210FILING DATE: 06/25/1999
ISSUE DATE: 11/14/2000SERIAL NUMBER: 08768908
PATENT NUMBER: 5939418FILING DATE: 12/17/1996
ISSUE DATE: 08/17/1999SERIAL NUMBER: 09110550
PATENT NUMBER: 5998614FILING DATE: 07/06/1998
ISSUE DATE: 12/07/1999

161
72

012607/0038 PAGE 28

SERIAL NUMBER: 08922488
PATENT NUMBER: 5811441FILING DATE: 09/03/1997
ISSUE DATE: 09/22/1998SERIAL NUMBER: 08922996
PATENT NUMBER: 5932749FILING DATE: 03/21/1997
ISSUE DATE: 08/03/1999SERIAL NUMBER: 08856223
PATENT NUMBER: 6281352FILING DATE: 05/14/1997
ISSUE DATE: 08/28/2001SERIAL NUMBER: 09200059
PATENT NUMBER: 6153628FILING DATE: 11/25/1998
ISSUE DATE: 11/28/2000SERIAL NUMBER: 08888380
PATENT NUMBER: 5973185FILING DATE: 07/07/1997
ISSUE DATE: 10/26/1999SERIAL NUMBER: 08838246
PATENT NUMBER: 5925635FILING DATE: 04/16/1997
ISSUE DATE: 07/20/1999SERIAL NUMBER: 08801220
PATENT NUMBER: 5942544FILING DATE: 02/19/1997
ISSUE DATE: 08/24/1999SERIAL NUMBER: 08823029
PATENT NUMBER: 6107300FILING DATE: 03/21/1997
ISSUE DATE: 08/22/2000SERIAL NUMBER: 09109395
PATENT NUMBER: 6103737FILING DATE: 07/02/1998
ISSUE DATE: 08/15/2000SERIAL NUMBER: 08861249
PATENT NUMBER: 5888811FILING DATE: 05/21/1997
ISSUE DATE: 03/30/1999SERIAL NUMBER: 08770538
PATENT NUMBER: 5760028FILING DATE: 12/20/1996
ISSUE DATE: 06/02/1998SERIAL NUMBER: 08857349
PATENT NUMBER: 6083948FILING DATE: 05/16/1997
ISSUE DATE: 07/04/2000SERIAL NUMBER: 09344916
PATENT NUMBER: 6239143FILING DATE: 06/25/1999
ISSUE DATE: 05/29/2001SERIAL NUMBER: 08838838
PATENT NUMBER: 5932726FILING DATE: 04/11/1997
ISSUE DATE: 08/03/1999SERIAL NUMBER: 08888718
PATENT NUMBER: 6057342FILING DATE: 07/07/1997
ISSUE DATE: 05/02/2000SERIAL NUMBER: 08916736
PATENT NUMBER: 5886191FILING DATE: 08/18/1997
ISSUE DATE: 03/23/1999SERIAL NUMBER: 09176037
PATENT NUMBER: 6043257FILING DATE: 10/21/1998
ISSUE DATE: 03/28/2000SERIAL NUMBER: 08816580
PATENT NUMBER: 5760029FILING DATE: 03/13/1997
ISSUE DATE: 06/02/1998

162

012607/0038 PAGE 29

SERIAL NUMBER: 08877829
PATENT NUMBER: 6185453FILING DATE: 06/18/1997
ISSUE DATE: 02/06/2001SERIAL NUMBER: 09052350
PATENT NUMBER: 5985867FILING DATE: 03/30/1998
ISSUE DATE: 11/16/1999SERIAL NUMBER: 08822257
PATENT NUMBER: 6124300FILING DATE: 03/20/1997
ISSUE DATE: 09/26/2000SERIAL NUMBER: 09518354
PATENT NUMBER: 6258809FILING DATE: 03/03/2000
ISSUE DATE: 07/10/2001SERIAL NUMBER: 08990471
PATENT NUMBER: 6028237FILING DATE: 12/15/1997
ISSUE DATE: 02/22/2000SERIAL NUMBER: 09047555
PATENT NUMBER: 6022977FILING DATE: 03/25/1998
ISSUE DATE: 02/08/2000SERIAL NUMBER: 08899242
PATENT NUMBER: 6124289FILING DATE: 07/23/1997
ISSUE DATE: 09/26/2000SERIAL NUMBER: 09015002
PATENT NUMBER: 6191131FILING DATE: 01/28/1998
ISSUE DATE: 02/20/2001SERIAL NUMBER: 09014734
PATENT NUMBER: 6313124FILING DATE: 01/28/1998
ISSUE DATE: 11/06/2001SERIAL NUMBER: 09014999
PATENT NUMBER: 6136809FILING DATE: 01/28/1998
ISSUE DATE: 10/24/2000SERIAL NUMBER: 09015001
PATENT NUMBER: 6060478FILING DATE: 01/28/1998
ISSUE DATE: 05/09/2000SERIAL NUMBER: 08929935
PATENT NUMBER: 6159980FILING DATE: 09/15/1997
ISSUE DATE: 12/12/2000SERIAL NUMBER: 09375048
PATENT NUMBER: 6218391FILING DATE: 08/16/1999
ISSUE DATE: 04/17/2001SERIAL NUMBER: 08996378
PATENT NUMBER: 6187797FILING DATE: 12/22/1997
ISSUE DATE: 02/13/2001SERIAL NUMBER: 08980016
PATENT NUMBER: 6130231FILING DATE: 11/26/1997
ISSUE DATE: 10/10/2000SERIAL NUMBER: 08942031
PATENT NUMBER: 5874430FILING DATE: 10/01/1997
ISSUE DATE: 02/23/1999SERIAL NUMBER: 09627213
PATENT NUMBER: 6303780FILING DATE: 07/27/2000
ISSUE DATE: 10/16/2001SERIAL NUMBER: 09176491
PATENT NUMBER: 6140499FILING DATE: 10/21/1998
ISSUE DATE: 10/31/2000

164/163

012607/0038 PAGE 30

SERIAL NUMBER: 09131953
PATENT NUMBER: 6214847FILING DATE: 08/11/1998
ISSUE DATE: 04/10/2001SERIAL NUMBER: 08995834
PATENT NUMBER: 6020357FILING DATE: 12/22/1997
ISSUE DATE: 02/01/2000SERIAL NUMBER: 08966491
PATENT NUMBER: 5932570FILING DATE: 11/07/1997
ISSUE DATE: 08/03/1999SERIAL NUMBER: 08966426
PATENT NUMBER: 6218386FILING DATE: 11/07/1997
ISSUE DATE: 04/17/2001SERIAL NUMBER: 09286902
PATENT NUMBER: 6238695FILING DATE: 04/06/1999
ISSUE DATE: 05/29/2001SERIAL NUMBER: 09094944
PATENT NUMBER: 6306886FILING DATE: 06/15/1998
ISSUE DATE: 10/23/2001SERIAL NUMBER: 09053287
PATENT NUMBER: 6027695FILING DATE: 04/01/1998
ISSUE DATE: 02/22/2000SERIAL NUMBER: 09166507
PATENT NUMBER: 6218534FILING DATE: 10/05/1998
ISSUE DATE: 04/17/2001SERIAL NUMBER: 09056820
PATENT NUMBER: 6124302FILING DATE: 04/08/1998
ISSUE DATE: 09/26/2000SERIAL NUMBER: 09379143
PATENT NUMBER: 6294671FILING DATE: 08/20/1999
ISSUE DATE: 09/25/2001SERIAL NUMBER: 09122127
PATENT NUMBER: 6326162FILING DATE: 07/24/1998
ISSUE DATE: 12/04/2001SERIAL NUMBER: 09145231
PATENT NUMBER: 6245769FILING DATE: 09/01/1998
ISSUE DATE: 06/12/2001SERIAL NUMBER: 09138460
PATENT NUMBER: 6174912FILING DATE: 08/21/1998
ISSUE DATE: 01/16/2001SERIAL NUMBER: 09049305
PATENT NUMBER: 6214834FILING DATE: 03/27/1998
ISSUE DATE: 04/10/2001SERIAL NUMBER: 09055480
PATENT NUMBER: 5925789FILING DATE: 04/06/1998
ISSUE DATE: 07/20/1999SERIAL NUMBER: 09248567
PATENT NUMBER: 6040480FILING DATE: 02/11/1999
ISSUE DATE: 03/21/2000SERIAL NUMBER: 09045057
PATENT NUMBER: 5912348FILING DATE: 03/19/1998
ISSUE DATE: 06/15/1999SERIAL NUMBER: 09109877
PATENT NUMBER: 6143743FILING DATE: 07/02/1998
ISSUE DATE: 11/07/2000

164

012607/0038 PAGE 31

SERIAL NUMBER: 09166722
PATENT NUMBER: 5962693FILING DATE: 10/05/1998
ISSUE DATE: 10/05/1999SERIAL NUMBER: 09346409
PATENT NUMBER: 6245914FILING DATE: 07/01/1999
ISSUE DATE: 06/12/2001SERIAL NUMBER: 09099752
PATENT NUMBER: 5998424FILING DATE: 06/18/1998
ISSUE DATE: 12/07/1999SERIAL NUMBER: 09165747
PATENT NUMBER: 6057336FILING DATE: 10/02/1998
ISSUE DATE: 05/02/2000SERIAL NUMBER: 09340740
PATENT NUMBER: 6235957FILING DATE: 06/28/1999
ISSUE DATE: 05/22/2001SERIAL NUMBER: 09228261
PATENT NUMBER: 6136833FILING DATE: 01/11/1999
ISSUE DATE: 10/24/2000SERIAL NUMBER: 09145101
PATENT NUMBER: 6140320FILING DATE: 09/01/1998
ISSUE DATE: 10/31/2000SERIAL NUMBER: 09329674
PATENT NUMBER: 6307044FILING DATE: 06/10/1999
ISSUE DATE: 10/23/2001SERIAL NUMBER: 09349906
PATENT NUMBER: 6262081FILING DATE: 07/08/1999
ISSUE DATE: 07/17/2001SERIAL NUMBER: 09126582
PATENT NUMBER: 6049019FILING DATE: 07/30/1998
ISSUE DATE: 04/11/2000SERIAL NUMBER: 09481812
PATENT NUMBER: 6297410FILING DATE: 01/12/2000
ISSUE DATE: 10/02/2001SERIAL NUMBER: 09410481
PATENT NUMBER: 6286297FILING DATE: 09/30/1999
ISSUE DATE: 09/11/2001SERIAL NUMBER: 09385271
PATENT NUMBER: 6194569FILING DATE: 08/30/1999
ISSUE DATE: 02/27/2001SERIAL NUMBER: 09282508
PATENT NUMBER: 6107508FILING DATE: 03/31/1999
ISSUE DATE: 08/22/2000SERIAL NUMBER: 09442598
PATENT NUMBER: 6175009FILING DATE: 11/18/1999
ISSUE DATE: 01/16/2001SERIAL NUMBER: 09340950
PATENT NUMBER: 6265400FILING DATE: 06/28/1999
ISSUE DATE: 07/24/2001SERIAL NUMBER: 09250508
PATENT NUMBER: 6235733FILING DATE: 02/16/1999
ISSUE DATE: 05/22/2001SERIAL NUMBER: 09217336
PATENT NUMBER: 6271237FILING DATE: 12/21/1998
ISSUE DATE: 08/07/2001

012607/0038 PAGE 32

SERIAL NUMBER: 09277586
PATENT NUMBER: 6127375FILING DATE: 03/26/1999
ISSUE DATE: 10/03/2000SERIAL NUMBER: 09342778
PATENT NUMBER: 6204262FILING DATE: 06/29/1999
ISSUE DATE: 03/20/2001SERIAL NUMBER: 09442024
PATENT NUMBER: 6319937FILING DATE: 11/17/1999
ISSUE DATE: 11/20/2001SERIAL NUMBER: 09342083
PATENT NUMBER: 6090821FILING DATE: 06/29/1999
ISSUE DATE: 07/18/2000SERIAL NUMBER: 09393025
PATENT NUMBER: 6265406FILING DATE: 06/13/2000
ISSUE DATE: 07/24/2001SERIAL NUMBER: 09276960
PATENT NUMBER: 6191159FILING DATE: 03/26/1999
ISSUE DATE: 02/20/2001SERIAL NUMBER: 09311168
PATENT NUMBER: 6268379FILING DATE: 05/13/1999
ISSUE DATE: 07/31/2001SERIAL NUMBER: 09333161
PATENT NUMBER: 6124463FILING DATE: 06/14/1999
ISSUE DATE: 09/26/2000SERIAL NUMBER: 09442682
PATENT NUMBER: 6303609FILING DATE: 11/18/1999
ISSUE DATE: 10/16/2001SERIAL NUMBER: 09442605
PATENT NUMBER: 6225317FILING DATE: 11/18/1999
ISSUE DATE: 05/01/2001SERIAL NUMBER: 09438901
PATENT NUMBER: 6331408FILING DATE: 11/12/1999
ISSUE DATE: 12/18/2001SERIAL NUMBER: 09465949
PATENT NUMBER: 6331545FILING DATE: 12/17/1999
ISSUE DATE: 12/18/2001SERIAL NUMBER: 09473870
PATENT NUMBER: 6271380FILING DATE: 12/28/1999
ISSUE DATE: 08/07/2001SERIAL NUMBER: 09527331
PATENT NUMBER: 6214851FILING DATE: 03/17/2000
ISSUE DATE: 04/10/2001SERIAL NUMBER: 09277936
PATENT NUMBER: 6251364FILING DATE: 03/29/1999
ISSUE DATE: 06/26/2001SERIAL NUMBER: 09585171
PATENT NUMBER: 6313110FILING DATE: 06/01/2000
ISSUE DATE: 11/06/2001SERIAL NUMBER: 09692023
PATENT NUMBER: 6291504FILING DATE: 10/19/2000
ISSUE DATE: 09/18/2001SERIAL NUMBER: 09685127
PATENT NUMBER: 6329527FILING DATE: 10/10/2000
ISSUE DATE: 12/11/2001

187/166

012607/0038 PAGE 33

SERIAL NUMBER: 09465288
PATENT NUMBER: 6331541FILING DATE: 12/17/1999
ISSUE DATE: 12/18/2001SERIAL NUMBER: 09523046
PATENT NUMBER: 6187918FILING DATE: 03/10/2000
ISSUE DATE: 02/13/2001SERIAL NUMBER: 09165505
PATENT NUMBER: 6107313FILING DATE: 10/02/1998
ISSUE DATE: 08/22/2000SERIAL NUMBER: 08483143
PATENT NUMBER: 5767238FILING DATE: 06/07/1995
ISSUE DATE: 06/16/1998SERIAL NUMBER: 07693476
PATENT NUMBER: 5147631FILING DATE: 04/30/1991
ISSUE DATE: 09/15/1992SERIAL NUMBER: 07804315
PATENT NUMBER: 5336482FILING DATE: 12/05/1991
ISSUE DATE: 08/09/1994SERIAL NUMBER: 08218861
PATENT NUMBER: 5879657FILING DATE: 03/28/1994
ISSUE DATE: 03/09/1999SERIAL NUMBER: 08999400
PATENT NUMBER: 6022523FILING DATE: 12/29/1997
ISSUE DATE: 02/08/2000SERIAL NUMBER: 07999705
PATENT NUMBER: 5688485FILING DATE: 12/31/1992
ISSUE DATE: 11/18/1997SERIAL NUMBER: 08023396
PATENT NUMBER: 5604112FILING DATE: 02/26/1993
ISSUE DATE: 02/18/1997SERIAL NUMBER: 08098442
PATENT NUMBER: 5420321FILING DATE: 08/03/1993
ISSUE DATE: 05/30/1995SERIAL NUMBER: 08391756
PATENT NUMBER: 5693324FILING DATE: 02/21/1995
ISSUE DATE: 12/02/1997SERIAL NUMBER: 08167685
PATENT NUMBER: 5397902FILING DATE: 12/15/1993
ISSUE DATE: 03/14/1995SERIAL NUMBER: 08415908
PATENT NUMBER: 5744120FILING DATE: 04/03/1995
ISSUE DATE: 04/28/1998SERIAL NUMBER: 09013320
PATENT NUMBER: 6010679FILING DATE: 01/26/1998
ISSUE DATE: 01/04/2000SERIAL NUMBER: 08476296
PATENT NUMBER: 5750088FILING DATE: 06/07/1995
ISSUE DATE: 05/12/1998SERIAL NUMBER: 08956313
PATENT NUMBER: 6015904FILING DATE: 10/23/1997
ISSUE DATE: 01/18/2000SERIAL NUMBER: 08808699
PATENT NUMBER: 5879659FILING DATE: 02/28/1997
ISSUE DATE: 03/09/1999

167
167

012607/0038 PAGE 34

SERIAL NUMBER: 08785399
PATENT NUMBER: 5961952FILING DATE: 01/23/1997
ISSUE DATE: 10/05/1999SERIAL NUMBER: 08940825
PATENT NUMBER: 5886970FILING DATE: 10/01/1997
ISSUE DATE: 03/30/1999SERIAL NUMBER: 09356178
PATENT NUMBER: 6254852FILING DATE: 07/16/1999
ISSUE DATE: 07/03/2001SERIAL NUMBER: 09164730
PATENT NUMBER: 6254552FILING DATE: 10/01/1998
ISSUE DATE: 07/03/2001SERIAL NUMBER: 09400383
PATENT NUMBER: 6261231FILING DATE: 09/21/1999
ISSUE DATE: 07/17/2001SERIAL NUMBER: 09281207
PATENT NUMBER: 6322770FILING DATE: 03/30/1999
ISSUE DATE: 11/27/2001SERIAL NUMBER: 06311770
PATENT NUMBER: 4451450FILING DATE: 10/15/1981
ISSUE DATE: 05/29/1984SERIAL NUMBER: 06414608
PATENT NUMBER: 4497790FILING DATE: 09/03/1982
ISSUE DATE: 02/05/1985SERIAL NUMBER: 06485217
PATENT NUMBER: 4526776FILING DATE: 04/15/1983
ISSUE DATE: 07/02/1985SERIAL NUMBER: 06539733
PATENT NUMBER: 4732864FILING DATE: 10/06/1983
ISSUE DATE: 03/22/1988SERIAL NUMBER: 06880349
PATENT NUMBER: 4894445FILING DATE: 06/25/1986
ISSUE DATE: 01/16/1990SERIAL NUMBER: 07670458
PATENT NUMBER: 5324824FILING DATE: 03/12/1991
ISSUE DATE: 06/28/1994SERIAL NUMBER: 07056003
PATENT NUMBER: 4988827FILING DATE: 06/01/1987
ISSUE DATE: 01/29/1991SERIAL NUMBER: 07143561
PATENT NUMBER: 5279811FILING DATE: 01/26/1988
ISSUE DATE: 01/18/1994SERIAL NUMBER: 08139894
PATENT NUMBER: 5431900FILING DATE: 10/20/1993
ISSUE DATE: 07/11/1995SERIAL NUMBER: 07095924
PATENT NUMBER: 4885100FILING DATE: 09/11/1987
ISSUE DATE: 12/05/1989SERIAL NUMBER: 07397528
PATENT NUMBER: 5028699FILING DATE: 08/23/1989
ISSUE DATE: 07/02/1991SERIAL NUMBER: 07397529
PATENT NUMBER: 5008418FILING DATE: 08/23/1989
ISSUE DATE: 04/16/1991

012607/0038 PAGE 35

SERIAL NUMBER: 07596273
PATENT NUMBER: 5109160

FILING DATE: 10/12/1990
ISSUE DATE: 04/28/1992

169/60

SIDLEY AYN, PARALEGAL
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

02-27-2002

Form PTO-1050
(Rev. 03/01)
OMB No. 0651-0027 (exp. 5/31/2002)
Tab settings



101995156

U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
U.S. Patent and Trademark Office

To the Honorable Commissioner of Patents and Trademarks: Please record the attached original documents or copy thereof.

1. Name of conveying party(ies):

DuPont Pharmaceuticals Company

2-11-02

2. Name and address of receiving party(ies)

Name: Bristol-Myers Squibb Pharma Company

Internal Address: Patent Department

Additional name(s) of conveying party(ies) attached? ☐ Yes ☒ No

3. Nature of conveyance:

☐ Assignment☐ Merger☐ Security Agreement☒ Change of Name☐ Other

Street Address: P.O. Box 4000

City: Princeton State: NJ Zip: 08543-4000

Execution Date: 10/01/2001

Additional name(s) & address(es) attached? ☐ Yes ☒ No

4. Application number(s) or patent number(s):

If this document is being filed together with a new application, the execution date of the application is:

A. Patent Application No.(s)

See Schedule B attached

B. Patent No.(s)

See Schedule A attached

Additional numbers attached? ☒ Yes ☐ No

5. Name and address of party to whom correspondence concerning document should be mailed:

Name: Denise Blarlein

Internal Address: E353/133F

Experimental Station

Street Address: Route 141 & Henry Clay Road

City: Wilmington State: DE Zip: 19880-0353

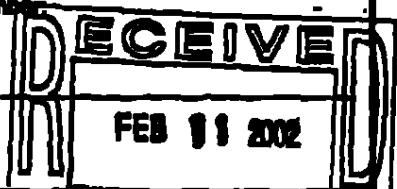
6. Total number of applications and patents involved: 514

7. Total fee (37 CFR 3.41).....\$ 24,580.00

☐ Enclosed☒ Authorized to be charged to deposit account

8. Deposit account number:

023850



DO NOT USE THIS SPACE

9. Signature.

Denise M. Blarlein

Name of Person Signing

Lorne M. Buelin

Signature

January 8, 2002

Date

Total number of pages including cover sheet, attachments, and documents: 171

Documents to be recorded with required cover sheet information for
Commissioner of Patents & Trademarks, Box Assignments
Washington, D.C. 20591

2/1/2002 10:00:00 00000000 00000000 00000000
FEB 11 2002 10:00:00

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER	GRANT DATE	GRANT NUMBER
BP6186	1/4/1982	06/336764	10/19/1982	4358041
BP6200	2/22/1982	06/349201	10/22/1985	4348946
BP6212	1/5/1984	06/367411	7/24/1984	4461773
BP6225	1/17/1984	06/570450	5/20/1986	4590205
BP6225	2/10/1984	06/577630	4/11/1989	4820827
BP6240	12/8/1984	06/678680	6/7/1988	4748712
BP6243	5/14/1985	06/733464	5/26/1987	4468688
BP6244	12/2/1988	06/803191	11/10/1987	4705799
BP6260	6/10/1988	06/741762	12/2/1986	4626329
BP6267	5/3/1988	06/730064	6/16/1987	4473568
BP6284	2/11/1988	06/700454	2/11/1986	4549937
BP6290	1/17/1988	06/692412	1/27/1987	4639484
BP6291	3/19/1986	06/839912	5/23/1989	4838164
BP6291	3/16/1989	07/324833	3/6/1990	4904636
BP6291	3/16/1989	07/324834	1/15/1991	4988435
BP6291	3/23/1989	07/327717	1/15/1991	4988442
BP6291	12/5/1989	07/445776	6/25/1991	5024789
BP6295	7/27/1989	07/391406	2/5/1991	4990617
BP6300	6/10/1987	07/060203	12/26/1989	4889862
BP6302	5/14/1986	06/863048	6/16/1987	4672679
BP6303	1/9/1987	07/944853	7/26/1988	4760083
BP6303	12/7/1987	07/129150	10/24/1989	4876285
BP6303	8/23/1988	07/234382	12/22/1992	5173489
BP6303	9/30/1992	07/953274	4/8/1994	5300642
BP6303	9/30/1992	07/953273	7/18/1995	5434264
BP6321	10/9/1987	07/106358	1/31/1989	4801600
BP6321	8/19/1988	07/233828	5/1/1990	4921869
BP6321	3/18/1990	07/497211	1/15/1991	4985429
BP6321	3/15/1990	07/497212	7/16/1991	5032605
BP6321	3/15/1990	07/497213	10/23/1990	4965268
BP6321	3/15/1990	07/497214	7/30/1991	5036093
BP6321	3/15/1990	07/497215	7/30/1991	5036092
BP6321	3/15/1990	07/497216	8/13/1991	5039690
BP6322	7/16/1987	07/071028	10/24/1989	4876269
BP6322	6/7/1989	07/362681	5/29/1990	4929627
BP6322	12/21/1989	07/458882	4/23/1991	5010085
BP6322	12/21/1989	07/458887	8/27/1991	5049150
BP6324	12/17/1987	07/134261	8/28/1990	4982232
BP6324	10/18/1989	07/423243	12/25/1990	4980367
BP6324	10/18/1989	07/423256	10/23/1990	4965281
BP6324	10/18/1989	07/423250	10/23/1990	4965280
BP6324	10/23/1990	07/602341	1/28/1992	5084465

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER	GRANT DATE	GRANT NUMBER
BP6330	7/7/1989	07/376457	12/11/1990	4977173
BP6332	8/10/1988	07/230448	8/22/1989	4859693
BP6333	8/28/1989	07/398999	5/28/1991	5019650
BP6333	8/28/1989	07/398996	2/4/1992	5086063
BP6339	9/14/1988	07/244170	2/13/1990	4900744
BP6358	7/29/1988	07/225809	8/14/1990	4948501
BP6358	7/24/1990	07/858129	7/14/1992	5130316
BP6358	7/24/1990	07/858131	8/27/1991	5043443
BP6358	8/14/1992	07/929452	10/19/1993	5254977
BP6360	12/6/1988	07/279193	5/14/1991	5015651
BP6360	3/26/1990	07/498938	1/14/1992	5081127
BP6360	3/26/1990	07/498939	8/27/1991	5043349
BP6360	3/8/1991	07/666893	3/2/1992	5093346
BP6360	6/7/1991	07/711968	2/23/1993	5189048
BP6360	8/5/1992	07/925834	5/24/1994	5319013
BP6374	3/4/1992	07/836323	6/27/1995	5428041
BP6389	1/5/1989	07/293522	2/2/1992	5093351
BP6400	1/23/1990	07/469854	9/17/1991	5049870
BP6407	4/7/1989	07/335122	4/28/1992	5108125
BP6408	7/9/1990	07/549820	11/24/1992	5166148
BP6408	10/30/1992	07/968933	5/24/1994	5314857
BP6414	6/6/1989	07/362284	10/23/1990	4968066
BP6426	12/28/1994	08/367481	12/9/1997	5696119
BP6427	12/11/1991	07/808044	4/27/1993	5206249
BP6427	2/16/1993	08/025633	7/12/1994	5329048
BP6427	5/26/1994	08/249772	10/24/1995	5461176
BP6429	7/9/1990	07/549821	11/24/1992	5166147
BP6429	11/20/1992	07/979679	7/11/1995	5432188
BP6429	3/9/1995	08/401599	12/3/1996	5580871
BP6432	4/15/1993	08/047853	10/11/1994	5354867
BP6433	6/18/1992	07/900540	10/19/1993	5254546
BP6440	11/21/1991	07/796097	12/22/1992	5173494
BP6444	1/12/1990	07/464433	2/11/1992	5087628
BP6450	2/22/1991	07/659444	1/19/1993	5180729
BP6458	11/25/1991	07/797399	1/12/1993	5179113
BP6459	7/13/1990	07/552216	12/15/1992	5171745
BP6462	2/6/1991	07/652034	1/6/1993	5704397
BP6463	10/2/1991	07/770461	12/29/1992	5175002
BP6463	6/5/1992	07/892146	1/4/1994	5273821
BP6470	8/29/1992	07/889896	10/25/1994	5358546
BP6481	6/26/1993	07/906022	3/9/1995	5192784
BP6493	9/30/1993	08/124523	5/9/1995	5414004

172

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER	GRANT DATE	GRANT NUMBER
BP6493	2/23/1995	08/392648	7/2/1996	5532247
BP6494	5/29/1992	07/889892	12/26/1995	5478830
BP6511	8/19/1991	07/747022	11/9/1993	5260325
BP6516	2/22/1991	07/659443	11/10/1992	5162341
BP6518	8/26/1994	08/296998	2/13/1996	5491149
BP6524	1/14/1992	07/820523	3/1/1994	5290764
BP6534	3/29/1994	08/219596	1/30/1996	5488110
BP6542	1/10/1992	07/820013	10/19/1993	5254536
BP6543	6/5/1993	08/461611	6/3/1997	5635477
BP6546	1/29/1992	07/827429	2/9/1993	5185447
BP6550	1/16/1992	07/821871	12/21/1993	5272269
BP6550	9/10/1993	08/117211	6/13/1995	5434430
BP6551	9/26/1994	08/312488	7/2/1996	5532249
BP6551	3/25/1996	08/620643	12/16/1997	5698559
BP6561	2/20/1995	08/392017	5/21/1996	5519132
BT0015	4/26/1990	07/518132	6/25/1991	5026635
BT0016	3/20/1989	07/324027	10/8/1996	5562905
BT0023	2/28/1989	07/317177	10/6/1992	5153310
BT0030	2/16/1989	07/311513	1/8/1991	4983813
CC0016	11/12/1981	06/320773	4/15/1986	4582835
CC0140	7/26/1982	06/401752	8/21/1984	4466965
CC0277	1/24/1983	07/440616	7/25/1989	4850981
CC0665	11/1/1985	06/793879	9/6/1988	0297570
CC0697	12/27/1985	07/812722	7/5/1988	4785527
CC0700	10/3/1985	06/784435	1/17/1989	4798824
CC0727	9/19/1986	06/908140	11/24/1987	4709042
CC0731	5/25/1989	07/356948	5/15/1990	4925860
CR8088	2/25/1983	06/468040	11/27/1984	4485109
CR8217	12/8/1983	06/558362	2/12/1985	4499082
CR8507	4/6/1988	07/178368	2/16/1993	5187157
CR8507	3/9/1992	07/848296	9/7/1993	5242904
CR8507	2/9/1992	07/852023	10/5/1993	5250720
CR8822	5/31/1991	07/774042	3/15/1994	5294720
CR8822	12/17/1993	08/167659	7/4/1995	5430155
CR8850	4/10/1990	07/807693	11/28/1995	5470967
CR9063	2/17/1995	08/381876	5/27/1997	5633344
CR9063	2/24/1994	08/202398	9/17/1996	5556619
CR9063	5/22/1996	08/604212	3/10/1998	5726284
CR9063	11/7/1996	08/746258	9/16/1997	5667774
CR9063	11/3/1997	08/962873	2/23/1999	5874522
DM6528	12/27/1994	08/364338	10/8/1996	5563127
DM6528	7/26/1996	08/690220	12/16/1997	5698538

Schedule A

ROCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER	GRANT DATE	GRANT NUMBER
DM6566	11/22/1996	08/770546	9/22/1998	5811422
DM6567	10/25/1994	08/329039	8/19/1997	5638885
DM6573	7/17/1992	07/913963	7/5/1994	5326770
DM6574	3/28/1994	08/216881	1/14/1997	5804001
DM6574	6/17/1996	08/664631	11/23/1999	5990132
DM6581	5/11/1992	07/881033	11/15/1994	5364878
DM6583	7/29/1992	07/921051	6/14/1994	5321023
DM6585	3/24/1998	08/036378	1/24/1999	5384410
DM6595	7/24/1992	07/918836	1/10/1995	5380785
DM6597	2/11/1993	08/016553	12/27/1994	5376664
DM6602	3/31/1993	08/040771	5/2/1995	5411977
DM6607	11/14/1994	08/338577	6/30/1998	5773411
DM6607	3/12/1997	08/820424	12/15/1998	5649693
DM6627	6/30/1994	08/268610	6/10/1997	5637780
DM6627	12/31/1996	08/777645	3/2/1999	5677312
DM6631	3/30/1993	08/040334	9/2/1997	5463333
DM6631	5/23/1997	08/862560	3/2/1999	5877170
DM6634	10/25/1993	08/142638	2/28/1995	5393886
DM6634	1/10/1995	08/370933	4/8/1997	5618944
DM6639	3/23/1994	08/216723	2/13/1996	5491152
DM6645	2/11/1993	08/016355	10/25/1994	5359070
DM6650	1/12/1995	08/371624	10/6/1998	5817749
DM6655	6/3/1993	08/070826	5/3/1994	5308831
DM6659	11/24/1993	08/157860	6/4/1996	5823302
DM6659	3/8/1996	08/612897	4/14/1998	5739163
DM6660	8/5/1997	08/906349	8/22/2000	6107301
DM6661	9/19/1994	08/360248	5/21/1996	5519143
DM6663	3/9/1994	08/208243	9/24/1996	5559110
DM6666	8/1/1997	08/904881	5/9/2000	6060462
DM6668	10/20/1993	08/139444	10/31/1998	5462964
DM6673	9/19/1994	08/307441	4/23/1996	5510495
DM6675	8/21/1996	08/701112	6/9/1998	5763469
DM6678	3/23/1994	08/216724	12/10/1996	5583147
DM6681	8/26/1993	08/110603	4/1/1997	5616578
DM6685	5/21/1998	08/485436	12/15/1998	5849736
DM6685	11/27/1997	08/978295	9/5/2000	6114328
DM6686	4/20/1994	08/230562	4/16/1996	5808400
DM6688	10/13/1995	08/842747	9/28/1999	5958962
DM6688	7/21/1999	09/357748	6/6/2000	6071918
DM6690	1/13/1994	08/181117	8/6/1996	5843817
DM6698	6/30/1994	08/269320	6/25/1996	5530124
DM6705	8/31/1993	08/114712	6/27/1995	5428040

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER	GRANT DATE	GRANT NUMBER
DM6705	3/27/1995	08/411251	6/17/1997	5639759
DM6705	3/18/1997	08/820232	2/23/1999	5874441
DM6705	11/18/1998	09/195366	8/29/2000	6110910
DM6721	3/25/1994	08/217911	6/4/1996	5523408
DM6721	8/3/1995	08/810933	11/26/1996	5578609
DM6723	3/24/1995	08/409573	6/17/1997	5619739
DM6726	9/12/1994	08/304614	8/29/1995	5446086
DM6727	6/30/1994	08/268702	11/14/1995	5466797
DM6727	11/14/1998	08/557254	1/20/1998	5710286
DM6727	1/13/1998	09/006538	4/25/2000	6054597
DM6733	11/23/1994	08/343159	10/8/1996	5563158
DM6733	8/8/1996	08/694043	11/23/1997	5691329
DM6735	2/16/1995	08/389603	6/24/1997	5641782
DM6739	6/30/1994	08/268609	9/24/1996	5559282
DM6739	6/19/1996	08/666032	3/9/1999	5880298
DM6742	9/29/1994	08/314991	1/14/1997	5593994
DM6742	11/19/1996	08/783029	8/2/1999	5932586
DM6751	6/6/1995	08/469409	7/2/1996	5532356
DM6756	7/28/1997	08/901344	5/2/2000	6036988
DM6766	6/7/1995	08/481683	7/2/1996	5532387
DM6769	7/11/1996	08/678211	11/11/1997	5686631
DM6769	10/14/1997	08/9930018	1/5/1999	5856525
DM6770	3/11/1996	08/613834	11/4/1997	5683999
DM6771	4/16/1996	08/632863	12/30/1997	5709092
DM6772	4/16/1996	08/632973	11/25/1997	5691381
DM6778	3/24/1995	08/409303	3/24/1998	5731439
DM6779	2/1/1995	08/384289	5/12/1998	5790528
DM6784	3/31/1999	09/283373	8/22/2000	6107294
DM6787	5/9/1996	08/647132	1/20/1998	5710189
DM6790	3/13/1997	08/816706	12/4/2001	6326368
DM6795	5/8/1996	08/643438	9/16/1997	5648159
DM6798	8/12/1998	09/133146	12/21/1999	6004985
DM6799	6/25/1999	09/344250	11/14/2000	6147210
DM6802	12/17/1996	08/768908	8/17/1999	5939418
DM6804	7/6/1998	09/110950	12/7/1999	5998614
DM6805	9/3/1997	08/922488	9/22/1998	5811441
DM6807	3/21/1997	08/822996	8/3/1999	5932749
DM6808	5/14/1997	08/856223	8/28/2001	6281352
DM6817	11/23/1998	09/200089	11/28/2000	6133628
DM6819	7/7/1997	08/888380	10/26/1999	5973185
DM6820	4/16/1997	08/838246	7/20/1999	5925635
DM6821	2/19/1997	08/801220	8/24/1999	5942544

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER	GRANT DATE	GRANT NUMBER
DM6823	3/21/1997	08/823029	8/22/2000	6107300
DM6825	7/2/1998	09/109395	8/15/2000	6103757
DM6826	5/21/1997	08/861248	3/30/1999	5888811
DM6827	12/20/1996	08/770538	6/2/1998	5760028
DM6830	5/16/1997	08/857349	7/4/2000	6083948
DM6834	6/28/1999	09/344916	5/29/2001	6239143
DM6837	4/11/1997	08/838838	8/3/1999	5932726
DM6840	7/7/1997	08/888718	8/2/2000	6057342
DM6841	8/18/1997	08/916736	3/23/1999	5886191
DM6841	10/21/1998	09/176037	3/28/2000	6043257
DM6848	3/13/1997	08/816580	6/2/1998	5760029
DM6846	6/18/1997	08/877829	2/6/2001	6185453
DM6849	3/30/1998	09/092390	11/16/1999	5988867
DM6850	8/31/1999	08/823257	9/26/2000	6124300
DM6850	3/3/2000	09/518384	7/10/2001	6258809
DM6855	12/15/1997	08/990471	2/22/2000	6028237
DM6863	3/25/1998	09/047355	2/8/2000	6022977
DM6864	7/23/1997	08/899242	9/26/2000	6124289
DM6864	1/28/1998	09/018002	2/20/2001	6191131
DM6864	1/28/1998	09/014734	11/6/2001	6313124
DM6864	1/28/1998	09/014939	10/24/2000	6136809
DM6864	1/28/1998	09/015001	5/9/2000	6060478
DM6865	9/18/1997	08/929935	12/12/2000	6159980
DM6865	8/16/1999	09/378048	4/17/2001	6218391
DM6869	12/22/1997	08/996378	2/13/2001	6187797
DM6871	11/26/1997	08/980016	10/10/2000	6130231
DM6874	10/1/1997	08/942031	2/23/1999	5874430
DM6874	7/27/2000	09/627213	10/16/2001	6303780
DM6874	10/21/1998	09/176491	10/31/2000	6140499
DM6878	8/11/1998	09/131953	4/10/2001	6214847
DM6879	12/22/1997	08/999834	2/1/2000	6020357
DM6880	11/7/1997	08/966491	8/3/1999	5932570
DM6881	11/7/1997	08/966426	4/17/2001	6218386
DM6884	4/6/1999	09/286902	5/29/2001	6238495
DM6891	6/15/1998	09/094944	10/23/2001	6304886
DM6894	4/1/1998	09/083287	2/22/2000	6027695
DM6899	10/5/1998	09/166807	4/17/2001	6218534
DM6902	4/8/1998	09/086820	9/26/2000	6124302
DM6906	8/20/1999	09/379143	9/28/2001	6294671
DM6907	7/24/1998	09/122127	12/4/2001	6326182
DM6908	9/1/1998	09/145231	6/12/2001	6245769
DM6911	8/21/1998	09/138460	1/16/2001	6174912

Schedule A

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER	GRANT DATE	GRANT NUMBER
DM6912	3/27/1998	09/049305	4/10/2001	6214834
DM6913	4/6/1998	09/055480	7/20/1999	5925789
DM6913	2/11/1999	09/248567	3/21/2000	6040480
DM6914	3/20/1998	09/045057	6/15/1999	5912348
DM6920	7/2/1998	09/109577	11/7/2000	6143743
DM6921	10/5/1998	09/166722	10/5/1999	5962693
DM6921	7/1/1999	09/346409	6/12/2001	6245914
DM6922	6/18/1998	09/099782	12/7/1999	5998424
DM6929	10/2/1998	09/165747	5/3/2000	6057336
DM6931	6/28/1999	09/340740	5/22/2001	6239987
DM6932	1/11/1999	09/228261	10/24/2000	6136833
DM6934	9/1/1998	09/145101	10/31/2000	6140320
DM6939	6/10/1999	09/329674	10/23/2001	6307044
DM6943	7/8/1999	09/349906	7/17/2001	6262081
DM6944	7/30/1998	09/126582	4/11/2000	6049019
DM6944	1/12/2000	09/481812	10/2/2001	6297430
DM6953	9/30/1999	09/410481	9/11/2001	6288297
DM6955	8/30/1999	09/385271	2/27/2001	6194869
DM6964	3/31/1999	09/282508	8/22/2000	6107908
DM6965	11/18/1999	09/442598	1/16/2001	6175009
DM6966	6/28/1999	09/340930	7/24/2001	6265400
DM6971	2/16/1999	09/280808	5/22/2001	6235733
DM6974	12/21/1998	09/217136	8/7/2001	6271357
DM6980	3/26/1999	09/277886	10/1/2000	6127378
DM6981	6/29/1999	09/242778	3/20/2001	6204262
DM6988	11/17/1999	09/442084	11/20/2001	6319937
DM6990	6/29/1999	09/342083	7/18/2000	6090821
DM6990	6/13/2000	09/593025	7/24/2001	6265406
DM6991	3/26/1999	09/276960	2/20/2001	6191159
DM7000	5/13/1999	09/311168	7/31/2001	6268379
DM7001	6/14/1999	09/333161	9/26/2000	6124463
DM7020	11/18/1999	09/442682	10/16/2001	6303609
DM7026	11/18/1999	09/442605	5/1/2001	6225317
PH7048	11/12/1999	09/438901	12/18/2001	6331408
PH7054	12/17/1999	09/468949	12/18/2001	6332345
PH7062	12/28/1999	09/473870	8/7/2001	6271380
PH7068	3/17/2000	09/527331	4/10/2001	6214851
PH7083	9/22/2000	09/277936	6/26/2001	6251364
PH7117	6/1/2000	09/588171	11/6/2001	6313110
PH7137	10/19/2000	09/692023	9/18/2001	6291504
PH7044	10/10/2000	09/688127	12/11/2001	6329327
PH7153	12/17/1999	09/468288	12/18/2001	6331541

Schedule A

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER	GRANT DATE	GRANT NUMBER
PH7168	3/10/2000	09/823046	2/13/2001	6187918
PH7274	10/2/1998	09/169508	8/22/2000	6107919
PH7342	6/7/1995	08/483143	6/16/1998	5767238
BP6498	4/30/1991	07/693476	9/15/1992	5147631
BP6857	12/5/1991	07/804315	8/9/1994	5336482
DM6591	3/28/1994	08/218841	3/9/1999	5879457
DM6591	12/29/1997	08/999400	2/8/2000	6022523
DM6622	12/31/1992	07/999708	11/18/1997	5688488
DM6626	2/26/1993	08/022396	2/18/1997	5604112
DM6638	8/3/1993	08/098442	5/30/1998	5420321
DM6638	2/21/1998	08/391756	12/2/1997	5693324
DM6674	12/18/1993	08/167688	3/14/1995	5397902
DM6753	4/3/1995	08/419908	4/28/1998	5744120
DM6753	1/26/1998	09/013320	1/4/2000	6010679
DM6761	6/7/1998	08/476296	8/12/1998	5780088
DM6761	10/23/1997	08/956313	1/18/2000	6015904
DM6762	2/28/1997	08/808499	3/9/1999	5879689
DM6774	1/23/1997	08/785399	10/8/1999	5961952
DM6886	10/1/1997	08/940828	3/30/1999	5888970
DM6896	7/16/1999	09/356178	7/3/2001	6254852
DM6949	10/1/1998	09/164730	7/3/2001	6254852
DM6960	9/21/1999	09/400383	7/17/2001	6261251
DM6999	3/30/1999	09/281207	11/27/2001	6322770
NN0032	10/18/1981	06/311770	5/29/1984	4481490
NN0041	9/3/1982	06/434608	2/3/1985	4497790
NN0042	4/18/1983	06/485217	7/2/1988	4526776
NN0110	10/6/1983	06/539738	3/22/1988	4732864
NN0169	6/28/1984	06/880349	1/16/1990	4894445
NN0169	3/12/1991	07/670458	6/28/1994	5324824
NN0181	6/1/1987	07/056003	1/29/1991	4988827
NN0195	1/26/1988	07/143561	1/18/1994	5279811
NN0195	10/20/1993	08/139894	7/11/1995	5431900
NN0196	9/10/1987	07/095924	12/5/1989	4885100
NN0196	6/22/1989	07/397528	7/2/1991	5028499
NN0196	8/23/1989	07/387829	4/16/1991	5008418
NN0252	10/12/1990	07/896273	4/28/1992	5109160

Schedule B

177-178

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER
BP6138	5/11/1988	07/192690
BP6384	9/29/1988	07/251963
BP6384	6/29/1990	07/547414
BP6399	2/27/1989	07/315837
BP6433	6/27/1990	07/545302
BP6449	2/20/1991	07/687919
CC0633	12/22/1982	06/452197
CC0711	3/24/1986	06/842988
CC0728	7/21/1986	06/885733
CC0739	3/13/1989	Unknown
DM6528	12/1/1994	08/348029
DM6546	7/10/1998	09/113908
DM6574	3/4/1998	09/034444
DM6608	3/7/1995	08/399808
DM6660	8/28/2001	09/940910
DM6683	7/13/1993	08/091103
DM6693	6/7/1995	08/473407
DM6780	10/2/2001	09/969236
DM6798	8/11/1997	08/909124
DM6820	5/8/1999	09/802561
DM6823	3/14/2000	09/925619
DM6864	8/15/2001	09/930782
DM6869	11/17/2000	09/713002
DM6874	7/31/2001	09/919065
DM6879	1/27/2000	09/492708
DM6899	3/7/2001	09/801137
DM6902	8/2/2000	09/630824
DM6904	8/8/2001	09/924381
DM6908	8/14/1999	09/233160
DM6906	7/23/2001	09/812837
DM6907	10/12/2001	09/978818
DM6908	2/21/2001	09/789473
DM6909	7/24/1998	09/122126
DM6909	8/9/2000	09/634786
DM6909	8/9/2000	09/634287
DM6909	8/9/2000	09/634286
DM6920	11/7/2001	Not Received Yet
DM6920	11/7/2001	Not Received Yet
DM6922	9/10/1999	09/393782
DM6923	8/14/1998	09/134484
DM6927	4/9/2001	09/828751
DM6934	9/7/2000	09/657918
DM6934	9/7/2000	09/657918
DM6939	7/21/2001	09/919864
DM6947	6/10/1999	09/329421
DM6986	1/26/1999	09/237061
DM6982	10/12/1999	09/416431
DM6964	7/6/2000	09/610819
DM6968	6/23/1999	09/339997
DM6972	2/16/1999	09/280307
DM6972	11/12/2001	Not Received Yet

179
180
181

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER
DM6974	4/12/2001	09/833302
DM6976	10/12/1999	09/416584
DM6976	2/27/2001	09/794825
DM6978	1/12/2000	09/481980
DM6984	11/26/2001	09/994493
DM6984	6/29/2001	09/869769
DM6987	2/3/2000	09/506360
DM6988	7/13/2001	09/905417
DM6990	1/24/2000	09/490949
DM6991	12/1/2000	09/728698
DM6994	7/25/2000	09/625291
DM6994	7/25/2000	09/624686
DM6995	4/5/2000	09/543291
DM6996	5/13/1999	09/312066
DM7011	1/12/2000	09/481981
DM7014	6/15/2000	09/594984
DM7019	1/26/2000	09/461796
DM7020	7/13/2001	09/905321
DM7021	7/7/2000	09/611854
DM7026	3/8/2001	09/801467
DM7029	12/3/1999	09/484868
PH7038	3/6/2000	09/519188
PH7042	11/2/2001	10/003972
PH7048	5/17/2000	09/573789
PH7050	12/17/1999	09/465286
PH7050	6/21/2000	09/598821
PH7084	10/18/2001	09/981833
PH7082	8/9/2000	09/634784
PH7069	3/17/2000	09/527333
PH7075	7/2/2001	09/898279
PH7076	2/17/2000	09/805788
PH7078	12/4/2001	Not Received Yet
PH7081	3/31/2000	09/540084
PH7087	7/25/2000	09/626284
PH7094	11/21/2001	09/990138
PH7096	7/13/2000	09/615463
PH7280	10/9/2001	60/327814
PH7283	10/17/2001	60/329634
PH7279	11/2/2001	60/335962
PH7298	12/4/2001	60/336994
PH7404	12/4/2001	60/336972
PH7395	12/3/2001	60/337081
PH7345	10/8/1999	09/418903
PH7348	11/27/2001	09/998189
PH7361	11/27/2001	60/333681
PH7390	11/20/2001	60/331829
PH7088	3/14/2001	09/805448
PH7088	9/13/2000	09/661008
PH7104	10/18/2000	09/691249
PH7137	7/16/2001	09/906963
PH7131	10/7/2000	09/684718

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER
PH7049	10/11/2000	09/686523
PH7098	10/13/2000	09/687602
PH7112	10/13/2000	09/687192
PH7092	11/2/2000	09/704906
PH7142	11/2/2000	09/704906
PH7055	10/11/2000	09/686582
PH7044	12/3/2001	10/008938
PH7152	12/17/1999	09/446442
PH7182	6/21/2000	09/597400
PH7180	12/17/1999	09/445948
PH7080	12/22/1999	09/445935
PH7110	12/15/2000	09/738444
PH7181	12/17/1999	09/446587
PH7118	12/1/2000	09/728683
PH7177	2/16/2001	09/788227
PH7068	7/20/2001	09/909731
PH7134	3/19/2001	09/808832
PH7141	11/20/2000	60/252062
PH7141	3/16/2001	09/811116
PH7121	12/14/2000	60/258539
PH7121	3/16/2001	09/811233
PH7120	2/28/2001	09/795410
PH7162	3/21/2000	09/540030
PH7161	4/8/2001	09/824996
PH7111	4/5/2001	09/824868
PH7130	3/27/2001	09/817957
PH7086	3/31/2001	09/823820
DM7009	4/30/2001	09/848867
PH7165	4/3/2001	09/828211
PH7184	4/3/2001	09/824945
PH7187	6/1/2001	09/871840
PH7080	6/11/2001	09/878579
PH7164	4/11/2001	09/832425
PH7217	6/15/2000	09/595250
PH7218	6/18/2000	09/594008
PH7167	6/20/2001	09/885580
PH7077	6/22/2001	09/887924
PH7172	6/22/2001	09/887850
DM7013	11/6/2000	60/246124
DM7013	6/27/2001	09/892319
PH7176	7/8/2001	09/893429
PH7193	6/29/2001	09/895138
PH7232	6/29/2001	09/896899
PH7109	7/7/2000	09/611853
DM7004	7/3/2001	09/898326
PH7222	7/11/2001	09/902845
PH7106	7/10/2001	09/901957
PH7129	7/13/2001	09/905097
PH7166	4/19/2001	60/284836
PH7166	7/19/2001	09/908956
PH7220	7/18/2001	09/908430

182/181

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER
PH7221	7/19/2000	60/219794
PH7221	7/18/2001	09/908126
PH7216	7/19/2000	60/219399
PH7216	7/18/2001	09/908481
PH7100	7/19/2001	09/908828
PH7113	7/28/2001	09/912950
PH7115	9/21/2001	09/960040
PH7143	9/17/2001	09/954379
PH7271	10/7/2000	09/684789
PH7148	10/28/2000	60/243587
CL1884	10/27/2000	60/244092
PH7140	10/29/2001	Not Received Yet
PH7140	11/6/2000	60/246167
PH7140	8/25/2001	60/313552
PH7181	11/6/2000	60/246129
PH7209	11/6/2000	60/246108
PH7262	12/7/2001	Not Received Yet
PH7262	12/8/2000	60/254116
PH7264	11/30/2001	10/000820
PH7264	12/1/2000	60/251213
PH7225	12/13/2001	Not Received Yet
PH7225	12/13/2000	60/255290
PH7268	12/20/2000	60/256853
PH7269	12/20/2000	60/256904
PH7257	12/20/2000	60/256740
PH7263	12/20/2000	60/256745
PH7258	12/20/2000	60/256765
PH7306	12/20/2000	60/256821
PH7171	1/31/2001	60/265437
PH7274	3/2/2000	09/563175
PH7265	3/12/2000	09/569766
PH7211	1/11/2001	60/260982
PH7210	1/11/2001	60/260957
PH7239	1/10/2001	60/260719
DM6977	2/16/2001	60/269243
PH7203	12/12/2001	Not Received Yet
PH7203	12/13/2000	60/258168
PH7266	3/13/2001	60/275831
PH7267	3/13/2001	60/275403
PH7307	3/23/2001	60/276173
PH7308	3/23/2001	60/276165
PH7146	3/28/2001	60/279214
PH7147	3/28/2001	60/279217
PH7303	3/15/2001	60/276898
PH7178	3/1/2001	60/272441
PH7198	3/1/2001	60/272434
PH7242	4/9/2001	60/282438
PH7133	2/21/2001	60/270188
PH7323	4/19/2001	60/284818
PH7349	4/20/2001	60/285638
PH7286	10/27/2000	60/244092

182 182

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER
PH7244	8/22/2001	60/292445
PH7350	5/25/2001	60/293571
PH7363	7/6/2001	60/303519
PH7364	7/10/2001	60/304084
PH7308	7/12/2001	60/304921
PH7391	7/20/2001	60/304999
PH7245	7/13/2001	60/305067
PH7347	4/18/2001	60/284614
PH7179	3/14/2001	60/290706
PH7294	4/18/2001	60/284615
PH7259	8/11/2001	60/311466
PH7278	8/17/2001	60/313052
PH7105	8/29/2001	60/318575
PH7393	9/6/2001	60/317529
PH7417	9/10/2001	60/318288
PH7378	8/23/2001	Not Received Yet
PH7351	12/22/1998	09/219083
PH7381	10/8/1998	09/415341
PH7344	10/28/1997	08/989488
PH7343	7/26/1994	08/281193
PH7340	6/22/1996	09/102600
PH7339	7/15/1998	08/116438
PH7338	3/18/1999	09/272996
PH7337	11/3/1998	09/188490
PH7329	9/13/2001	60/260719
PH7329	9/13/2001	60/318707
PH7400	9/17/2001	60/322630
PH7332	8/20/2001	60/313849
PH7398	9/21/2001	60/324125
PH7036	9/18/2001	60/323042
PH7180	1/18/2001	60/323166
PH7394	9/26/2001	60/324874
DM6891	3/30/1993	08/040336
DM6891	10/14/1999	09/417678
DM6848	11/2/2000	09/704304
DM6877	10/3/1997	08/943639
DM6898	4/2/1999	09/285400
DM6897	12/8/1999	08/488110
DM6918	4/2/1999	09/288280
DM6945	11/13/1998	09/191672
DM6948	6/9/2000	08/591444
DM6988	3/10/1999	09/281474
DM6988	6/21/2000	09/899298
DM6961	7/21/2000	09/621569
DM6983	3/24/2000	09/524893
DM6999	12/17/1999	09/466568
DM6999	6/21/2000	08/899890
DM7003	1/30/1999	09/281809
DM7003	12/17/1999	09/466568
DM7003	6/21/2000	08/899890
DM7003	9/7/2001	08/948807

DOCKET NUMBER	FILING DATE	FILING NUMBER
DM7003	9/7/2001	09/947783
DM7003	9/7/2001	09/948390
DM7007	9/12/2000	09/660977
DM7012	3/30/1999	09/281050
DM7012	12/17/1999	09/466582
DM7012	6/21/2000	09/599368
NNQ172	10/31/1989	07/430893
PH7108	2/14/2001	09/783249
PH7064	2/14/2001	09/783248
DM6981	4/8/2001	09/826449
PH7082	4/8/2001	09/826449
PH7218	9/17/2001	09/889261
PH7103	8/16/2001	09/931317
PH7202	11/2/2001	10/002359
PH7202	11/3/2000	60/245884
PH7188	11/6/2001	Not Received Yet
PH7188	11/7/2000	60/246370
DM7008	11/14/2001	Not Received Yet
DM7008	11/14/2000	60/248299
PH7201	11/27/2001	09/995388
PH7201	11/27/2000	60/283324
PH7079	1/9/2001	60/260800
PH7124	1/9/2001	60/260615
PH7123	2/1/2001	60/265919
PH7277	2/26/2001	60/271869
PH7194	2/23/2001	60/270984
PH7071	4/3/2001	60/261057
PH7286	8/8/2001	60/310889
PH7283	8/8/2001	60/310761

184/103

PATENT

184

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**CHANGE OF NAME IN RECORDED ASSIGNMENTS****1. Particulars of assignments**

A list of the patent applications and patents for which the change of name in the recorded assignment is requested is set forth in Schedule A (granted patents) and Schedule B (pending patent applications) attached hereto.

2. Old name of assignee

The old name of the assignee shown on the above-referenced assignments is DuPont Pharmaceuticals Company.

3. New name and address of assignee

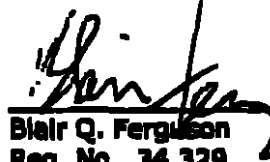
The new name of the assignee is Bristol-Myers Squibb Pharma Company located at the following address: Patent Department, P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000.

4. Proof of change of name

Proof of change of name is established by the attached certificate of name change from the following authority: Supplemental Certificate - New Castle County, Delaware

5. Payment of fee

Please refer to the RECORDATION FORM COVER SHEET, to which this paper is attached.


Blair Q. Ferguson
Reg. No. 34,329
Counsel, Intellectual Property
Experimental Station, E353/133C
Route 141 and Henry Clay Road
Wilmington, DE 19880-0353
Phone: 302/695-3902

NEW CASTLE COUNTY
REGISTRATION OF TRADE NAMES
PARTNERSHIPS & ASSOCIATIONS

6 Del C. ch. 31

TRADE NAME: Bristol-Myers Squibb Pharma Company (Original File No. 28757.0)Business Address: 203 Longmeadow Drive, Wilmington, DE 19810

Telephone Number: _____

Title of Person, Firm or Association: Bristol-Myers Squibb Pharma Company

Names and addresses of all owners, members, or partners comprising the firm:

LAST NAME	FIRST NAME	ADDRESS
<u>E.R. Squibb & Sons, L.L.C.</u>		<u>345 Park Ave., New York, NY 10154</u>
<u>Bristol-Myers Squibb Pharma Holding Company, LLC</u>		<u>345 Park Ave., New York, NY 10154</u>

Date of ^{change} formation: October 2, 2001

Nature of ^{change} business: Title of partnership has changed from "DuPont Pharmaceutical Company" to "Bristol-Myers Squibb Pharma Company".
 partners have changed from E.I. du Pont de Nemours and Company, Inc. to E.R. Squibb & Sons, L.L.C. and Bristol-Myers Squibb Pharma, Inc. to E.R. Squibb & Sons, L.L.C. and Bristol-Myers Squibb Pharma Holding Company, LLC.

I, Sharon Agnew, the subscriber, a Notary Public of the State of Delaware, personally appeared Landra Leung, Secretary of Bristol-Myers Squibb Pharma Company, a principal in the business described in the foregoing certificate, who, having first been sworn by me according to law did depose and say as follows:

1. He/She is a principal in the business described in the foregoing certificate.
2. That the foregoing information provided in the foregoing certificate is true, correct, and complete.

Sharon Agnew
 Affiant

SWORN AND SUBSCRIBED this 2nd day of October, 2001.

Malreen A. Noon
 NOTARY PUBLIC

REV: 2/98

CERTIFIED AS A TRUE COPY.

ATTEST: SHARON AGNEW

PROTHONOTARY

Sharon Agnew

MALREEN A. NOON
 Notary Public, State of New York
 No. 0110422000
 Qualified in Queens County
 Commission Expires December 31, 2002

186
187

RAD: 04-23044

MANTENIMIENTO DE PROTOCOLOS	
Numero : 19358	
Fecha : 07/05/1999	
Conferido: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY	
Pais : US ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	
Ciudad : 82 PRINCETON, NEW JERSEY	
Represent: S Sustituir : S Desistir : S	
No. Radicacion : 99 28346 Clase: 0 Secv: 0 Seac: 0	

scncia	Codigo Ctr Nombre
1	340 A CASTRO DUQUE RAMIRO
2	3002 GOMEZ MEJIA HECTOR
Encontrados (1/1) registro(s)	

187
188

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de 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 ()

- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma Responsable:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 04023044 00000000

Folios: 106

Fecha:

Fecha (MM): 2004-03-12 16:50:52

Tramite : 011 PCT-PATENT 279 FASE INCI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2620 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



180
180

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
RAMIRO CASTRO DUQUE
Apoderado
BRISTOL-MYERS SQUIBB PHARMA COMPANY

Oficio N° 04936

ASUNTO:	Radicación N°	04-23044
	Solicitud internacional	PCT/US2001/25685
	Fecha inicio fase nacional	16/03/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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:

☐ 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. (Art. 26-k) Decisión 486).86, Circular única 5.2.9).

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 N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

17 de Mayo 2004

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.