



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

Division de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

EXPEDIENTE No

04-75074

TITULO Cuerpos de inclusion que transportan Glicerol-
fosfato aceptables para uso farmacéutico

CLASIFICACION INTERNACIONAL AGIK 31/683, 9/127

71 SOLICITANTE Vasogen Ireland Limited

DOMICILIO Clonsilla, Irlanda

74 APODERADO Dña Maria Rodriguez D' Aleman

22 BOGOTA, D C, ~~folio 29, 2004~~ ¹⁴ 04-08-03

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: VASOGEN IRELAND
LIMITED
Dirección: Shannón Airport House,
Sannon, Co. Clare, Irlanda
Nacionalidad o domicilio: Clare,
Irlanda
Lugar de constitución: Irlanda

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ **NIT:** ☒
C.E. ☐ **OTRO** ☐
Cual _____
NÚMERO _____

Teléfono: _____ **Fax:** _____
E. Mail: _____

3) REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: DILIA MARIA RODRIGUEZ
D'ALEMAN
Dirección: Carrera 11 N°. 93-43 Of.
404 Santafé de Bogotá D.C.

Teléfono: 6350835 **Fax:** 6350824
E. Mail:
clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ **NIT:** ☐
C.E. ☐ **OTRO** ☐
NÚMERO: 41.654.882
TP: 20824 CSJ

4) INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: 1. BOLTON, Anthony, E.; 2. MANDEL, Arkady
Dirección: 1. 7 Wyebnk Grove, Bakewell, Derbyshire DE 45 1
BJ, Gran Bretaña ; 2. 277 Hidden Trail, North York, Ontario M2R
3S7, Canadá
Nacionalidad o Domicilio: 1. Gran Bretaña; 2. Canadá

5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/CA03/00065 **Fecha:** Enero 21, 2003

Publicación Internacional No. WO 03/061667 A1 **Fecha:** Julio 31, 2003

6) Título (54) CUERPOS DE INCLUSION QUE TRANSPORTAN GLICEROL-FOSFATO
ACEPTABLES PARA USO FARMACÉUTICO

7) Clasificación Internacional: A61K 31/683, 9/127

8) PRIORIDAD SI ☒ NO ☐	33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	CANADA	ENERO 21, 2002	2,368,656
	ESTADOS UNIDOS	ENERO 22, 2002	10/051,381 modificado a 60/421.116
	ESTADOS UNIDOS	ENERO 28, 2002	60/361,427
	ESTADOS UNIDOS	MARZO 18, 2002	60/364,820
	ESTADOS UNIDOS	ABRIL 15, 2002	60/372,106
	ESTADOS UNIDOS	AGOSTO 2, 2002	60/400,857

9) Comprobante de pago N°. 04-69,219 Fecha: JULIO 27, 2004

2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 04675074 00000000 Folios. 161
Fecha (GMB): 2004-06-03 16:23.09
Trámite : 011 PCT-PATENT 129 FASE UNCT 411 PRESENTA
Superintendencia: 2000 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT 800176080-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 04 - 5º, 21º
FECHA JULIO 27 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PAGO	Vr PAGO
CLARKE MODET Y CA	COLOMBCONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	232º1107	27/07/2004	4 792,000 00

***** CONCEPTO *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50003-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL DE PATENTE DE IN	422,000 00
		TOTAL	9 422 000 00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

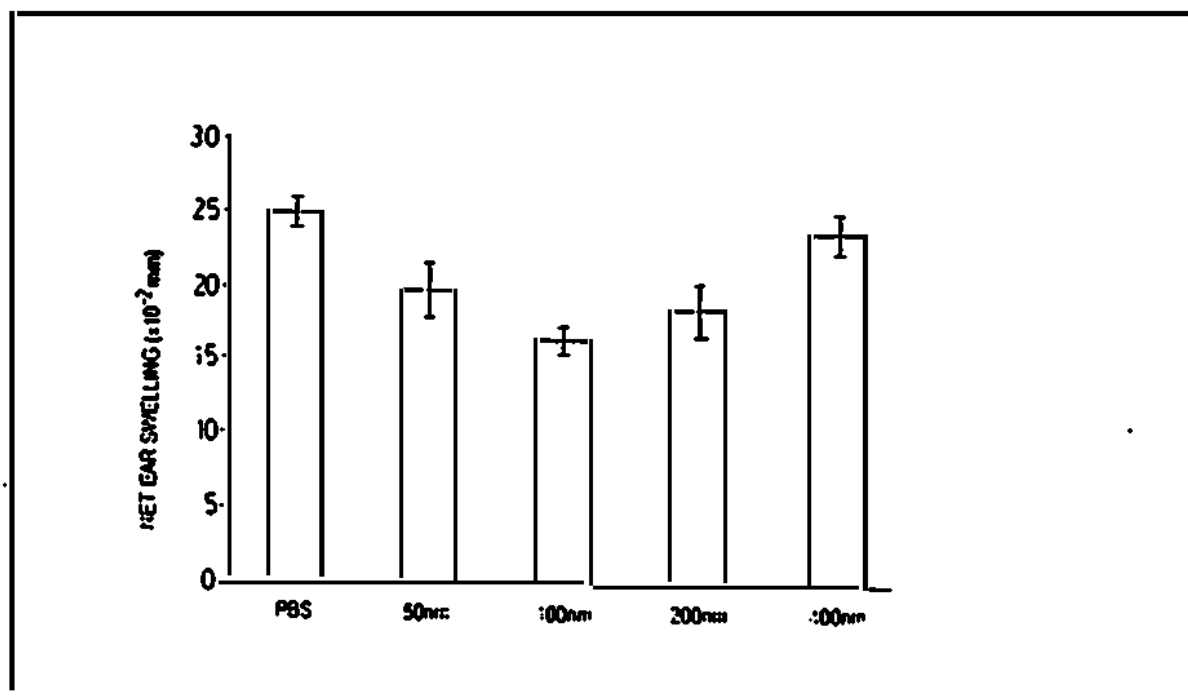
2064

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☒ Copia 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
- ☐ Ante final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros
 1. Notificación de la transmisión del examen preliminar
 2. Notificación de la transmisión de la prioridad
 3. Copia del requerimiento de modificación del número de prioridad 10/051.381 por 60/421.116 presentada ante la Oficina internacional de la WIPO

11) FIGURA CARACTERISTICA:



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA

C.C. 41 654 882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
31 July 2003 (31.07.2003)

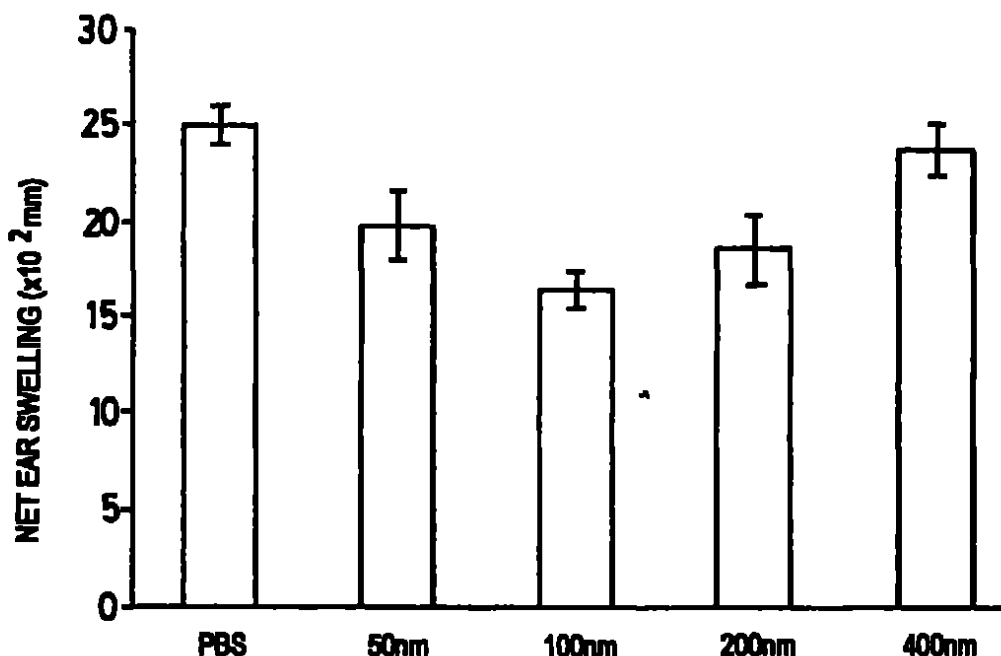
PCT

(10) International Publication Number
WO 03/061667 A1

- (51) International Patent Classification⁷ A61K 31/683 9/127
- (21) International Application Number⁷ PCT/CA03/00065
- (22) International Filing Date⁷ 21 January 2003 (21.01.2003)
- (25) Filing Language English
- (26) Publication Language⁷ English
- (30) Priority Data
- | | | |
|------------|------------------------------|----|
| 2,368,656 | 21 January 2002 (21.01.2002) | CA |
| 10/051,381 | 22 January 2002 (22.01.2002) | US |
| 60/351,427 | 28 January 2002 (28.01.2002) | US |
| 60/364,620 | 18 March 2002 (18.03.2002) | US |
| 60/372,106 | 15 April 2002 (15.04.2002) | US |
| 60/400,857 | 2 August 2002 (02.08.2002) | US |
- (71) Applicant (for all designated States except US) VASOGEN IRELAND LIMITED [IB/IB] Shannon Airport House, Shannon, Co. Clare (IE).
- (72) Inventors, and
- (75) Inventors/Applicants (for US only) BOLTON Anthony E. [GB/GB] 7 Wyebank Grove, Bakewell Derbyshire DE45 1BJ (GB) MANDEL, Arkady [CA/CA] 277 Hidden Trail North York, Ontario M2R 3S7 (CA).
- (74) Agent HIRONS, Robert, G., Ridout & Maybes LLP One Queen Street East, Suite 2400 Toronto, Ontario M5C 3B1 (CA)
- (81) Designated States (national) 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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) Designated States (regional) ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[Continued on next page]

(54) Title PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE PHOSPHATE-GLYCEROL CARRYING BODIES



(57) Abstract: This invention relates to three-dimensional synthetic and semi synthetic compositions having biological activity and to the uses thereof in the treatment and/or prophylaxis of various disorders in mammalian patients. More particularly it relates to preparations and uses of synthetic and semi-synthetic bodies, such as liposomes, which after introduction into the body of a patient, produce beneficial anti-inflammatory, organ protective and immune regulatory effects. The invention also relates to treatments and compositions for alleviating inflammatory and autoimmune diseases and their symptoms.

WO 03/061667 A1

WO 03/061667 A1

ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

Published

— *with international search report*

For two-letter codes and other abbreviations refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE PHOSPHATE-GLYCEROL
CARRYING BODIES

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

This invention relates to three-dimensional synthetic and semi-synthetic compositions having biological activity and to the uses thereof in the treatment and/or prophylaxis of various disorders in mammalian patients. More particularly it relates to preparations and uses of synthetic and semi-synthetic bodies which after introduction into the body of a patient, produce beneficial anti inflammatory organ protective and immune regulatory effects. The invention also relates to treatments and compositions for alleviating inflammatory and autoimmune diseases and their symptoms.

Background of the Invention

Professional antigen-presenting cells (APCs) including dendritic cells (DCs) and macrophages (Mph), actively capture and process antigens (Ags) clear cell debris, and remove infectious organisms and dying cells, including the residues from dying cells. During this process, APCs can stimulate the production of either inflammatory Th1 pro-inflammatory cytokines (IL-12, IL-1 INF- γ TNF- α , etc) or regulatory Th2/Th3 cytokines (such as IL-10 TGF- β , IL-4 etc) dominated responses depending on the nature of the antigen (Ag) or phagocytosed material and the level of APC maturation/activation.

APCs remove cellular debris, some of which is derived from cell membranes of the body some from bacterial and parasitic infections and commensal organisms such

7

as gut bacteria. While some of this cellular debris will initiate a pro-inflammatory response, some initiates a protective and anti-inflammatory response.

A normally functioning immune system is capable of distinguishing between the antigens of foreign invading organisms (non-self) and tissues or debris derived from self, mounting an immune response only against foreign antigens. When a patient's immune system fails to discriminate between self and non-self, autoimmune disorders arise.

Summary of the Invention

This invention is directed to the discovery that pharmaceutically acceptable bodies, such as liposomes, beads or similar particles, which comprise phosphate-glycerol groups, will, upon administration to a mammalian patient, cause an anti-inflammatory effect and therefore may be used to treat a number of diseases. These bodies may further comprise as a minor component an inactive constituent, and/or constituent which is active through a different mechanism.

In a preferred embodiment, the invention is directed to a composition of matter capable of producing an anti-inflammatory response *in vivo* in a mammal, said composition comprising pharmaceutically acceptable bodies of a size from about 20 nanometers (nm) to 500 micrometers (μm), comprising a plurality of phosphate-glycerol groups or groups convertible to such groups. Preferably, the bodies are essentially free of non-lipid pharmaceutically active entities. Preferably, the phosphate-glycerol groups constitute 60%–100% of the active groups on the bodies. Following administration to a mammal, the bodies, through the phosphate-glycerol groups, are believed to interact with the immune system. As a result, when so administered, an anti-inflammatory response is elicited.

In another embodiment, this invention is directed to a three-dimensional synthetic or semi-synthetic body, otherwise referred to herein as pharmaceutically acceptable bodies, having a size ranging from 20 nm to 500 μm , and having been modified to

comprise, as a major component, at least one anti-inflammatory promoting ligand wherein said ligand has phosphate-glycerol groups

In still another embodiment, this invention is directed to three-dimensional synthetic and semi-synthetic bodies otherwise referred to herein as pharmaceutically acceptable bodies, having sizes ranging from 20 nm to 500 μ m and having phosphate-glycerol groups on the surface thereof

In another aspect, the invention is directed to a method for treating a T-cell function-mediated disorder comprising administering to a mammalian patient an effective amount of pharmaceutically acceptable bodies carrying an effective number of phosphate-glycerol groups to inhibit and/or reduce the progression of the T-cell function-mediated disorder

This invention is further directed to a method for treating an inflammatory disorder comprising administering to a patient an effective amount of pharmaceutically acceptable bodies carrying an effective number of phosphate-glycerol groups to inhibit and/or reduce the progression of the inflammatory disorder

Yet another embodiment of this invention is a method for treating an endothelial function disorder comprising administering to a mammalian patient an effective amount of pharmaceutically acceptable bodies carrying an effective number of phosphate-glycerol groups to inhibit and/or reduce the progression of the endothelial function disorder

Another embodiment is a method for treating an immune disorder characterized by inappropriate cytokine expression comprising administering to a mammalian patient an effective amount of pharmaceutically acceptable bodies carrying an effective number of phosphate-glycerol groups to inhibit and/or reduce the progression of the immune disorder

This invention is further directed to a process for treating or prophylaxis of a mammalian cardiac disorder the presence of or the susceptibility to which is detectable by observing a prolonged QT-c interval on an electrocardiogram of the patient, which process comprises administering to a mammalian patient suffering therefrom or susceptible thereto a pharmaceutical composition comprising pharmaceutically acceptable biocompatible synthetic or semi-synthetic bodies, otherwise referred to herein as pharmaceutically acceptable bodies, and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein at least a portion of said bodies have a size in the range from about 20 nm to 500 μ m, and wherein the surfaces of said bodies have been modified to carry as a major component, at least one anti inflammatory promoting group, said group being a phosphate-glycerol

Another embodiment of the invention is a pharmaceutical composition, in unit dosage form, for administration to a mammalian patient, comprising pharmaceutically acceptable bodies and a pharmaceutically acceptable carrier wherein at least a portion of the bodies has a size in the range from about 20 nm to 500 μ m and wherein the surfaces of said bodies comprise phosphate glycerol groups or groups convertible to phosphate glycerol groups, said unit dosage comprising from about 500 to about 2.5×10^9 bodies

A further embodiment of this invention is a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable biocompatible synthetic or semi-synthetic bodies (otherwise referred to herein as pharmaceutically acceptable bodies) and a pharmaceutically acceptable carrier wherein at least a portion of said bodies has a size from about 20 nm to 500 μ m and wherein the surfaces of said bodies have been modified to comprise, as a major component, at least one anti inflammatory promoting group, wherein said group is phosphate-glycerol

A still further embodiment of this invention is a pharmaceutical composition comprising pharmaceutically acceptable biocompatible synthetic or semi-synthetic bodies (otherwise referred to herein as pharmaceutically acceptable bodies) and a

10

pharmaceutically acceptable carrier wherein at least a portion of said bodies has a size from about 20 nm to 500 μ m, and comprises cardiolipin

Optionally, the bodies described above may additionally comprise an inactive constituent surface group and/or a constituent surface group which is active through another mechanism e.g. phosphatidylserine (See, e.g. Fadok et al International Publication WO 01/66785).

In another embodiment, this invention is directed to lyophilized or freeze-dried pharmaceutically acceptable bodies carrying phosphate-glycerol groups or groups convertible to phosphate-glycerol groups, and kits comprising lyophilized or freeze dried bodies comprising phosphate-glycerol groups, or groups convertible to phosphate-glycerol groups and a pharmaceutically acceptable carrier

In another aspect, this invention is directed to a method for treating a T-cell function mediated disorder comprising administering to a mammalian patient suffering from or at risk of suffering from a T-cell function mediated disorder an effective amount of a composition comprising pharmaceutically acceptable bodies having a size from about 20 nm to about 500 μ m, comprising on the surface thereof a plurality of phosphate-glycerol groups or groups convertible to said phosphate glycerol groups such that upon administration, the progression of the T-cell function mediated disorder is inhibited and/or reduced.

Yet another embodiment of this invention is directed to a method for treating an endothelial function disorder comprising administering to a mammalian patient suffering from or at risk of suffering from an endothelial function disorder an effective amount of a composition comprising pharmaceutically acceptable bodies having a size of from about 20 nm to about 500 μ m, comprising on the surface thereof a plurality of phosphate-glycerol groups, or groups convertible to said phosphate-glycerol groups, such that upon administration, the progression of the endothelial function disorder is inhibited and/or reduced

11

Another embodiment of this invention is directed to a method for treating an immune disorder in a mammalian patient suffering from or at risk of suffering from an immune disorder comprising administering to said mammalian patient an effective amount of a composition comprising pharmaceutically acceptable bodies having a size of from about 20 nm to about 500 μ m, comprising on the surface thereof a plurality of phosphate-glycerol groups or groups convertible to said phosphate-glycerol groups, such that upon administration, the progression of the immune disorder is inhibited and/or reduced.

The present invention can also be viewed, from another aspect, as the use of a receptor on cells of the mammalian immune system, e.g. macrophages which specifically bind to the phosphate-glycerol group. The invention embraces bodies comprising ligands and groups that will bind to such receptor and consequently produce an anti-inflammatory response. Accordingly, the present invention can be defined as bodies comprising ligands or active groups thereof that compete with the binding or uptake of phosphate-glycerol expressing bodies as described herein by antigen-presenting cells. A person skilled in the art can readily determine whether a particular body is one which will so compete, by conducting simple test experiments. For example, the bodies can be tested with a readily available monocytic cell line such as U937 cells. In a first experiment, U937 cells are incubated with fluorescently labeled PG liposomes alone, and in other experiments the U937 cells are incubated in the presence of both fluorescently labeled PG liposomes and differing amounts of test compound. If the uptake of the fluorescently labeled PG liposomes in the other experiments is reduced in comparison with that of the first experiment, then the test compound is competing for the specific receptor and is a compound within the scope of the present invention.

Brief description of the drawings

FIG. 1 is a bar graph presentation of the results of Example 1 below: murine contact hypersensitivity (CHS: acute T-cell mediated inflammatory model) experiments using liposomes in accordance with a preferred embodiment of the invention in

comparison with other liposomes and controls

FIG 2 is a similar graphical presentation, showing the use of liposomes of various phosphatidylglycerol (PG) contents, in the murine CHS model, Example 2 below

FIG 3 is a similar graphical presentation of the results of Example 3 below where different concentrations of 75% PG liposomes were used in the murine CHS model.

FIG 4 is a similar graphical presentation of the results of Example 4 below where different concentrations of 100% PG liposomes were used in the murine CHS model

FIG 5 is a similar graphical presentation of the results of Example 5 below using liposomes of different sizes in the CHS model

FIG 6 is a similar graphical presentation of the results of Example 6 below using a murine model of delayed type hypersensitivity (DHS, chronic T-cell mediated inflammatory model)

FIG 7 is a similar graphical presentation of the results of Example 7 below cardiolipin liposomes in a DHS murine model

FIG 8 is a similar graphical presentation of the results of Example 8 below cardiolipin liposomes in a CHS murine model.

FIG 9 shows the change in the percentage of excitatory post synaptic potential (EPSP) slope in control and treated mice which is indicative of the effect on long term potentiation (LTP), Example 9

FIG 10 displays the data shown in FIG 9 in the format of a bar chart, Example 9 below

FIG 11 Shows the difference in the concentration of the anti inflammatory cytokine IL-4 in the hippocampus of control and treated animals Example 10 below

FIG 12 shows the difference in the concentration of the pro inflammatory cytokine IL 1 β in a single cell suspension of spleen cells of control and treated animals, Example 11 below

FIG 13 shows the difference in the concentration of TNF- α in the U937 monocyte cell line treated with varying concentration of 75% PG liposomes, Example 12 below

FIG 14 is a graphical presentation of the results of Example 13 below, endothelin 1 content in ears of mice treated according to a preferred embodiment of the invention versus control

FIG 15 is a graphical presentation of the results of Example 14 ICAM 1 positive cells from HUVEC cultures in the presence and absence of compositions of the preferred embodiment of the invention.

Description of preferred embodiments

According to the present invention pharmaceutically acceptable bodies carrying phosphate-glycerol groups on their surface are administered to patients Without being limited to any one theory it is believed that these bodies interact with the immune system of the patient with accompanying beneficial effects such as inhibition of pro-inflammatory cytokines *in vivo* and/or promotion of anti inflammatory cytokines The reacting cells may be immune cells such as professional or non professional antigen presenting cells endothelial cells, regulatory cells such as NK T cells and others

These pharmaceutically acceptable bodies include synthetic and semi synthetic

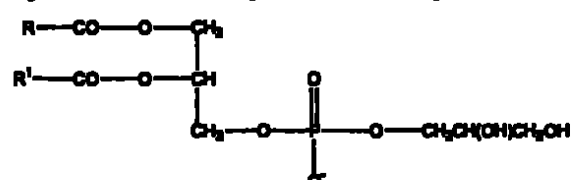
bodies having shapes which are typically but not exclusively spheroidal, cylindrical ellipsoidal including oblate and prolate spheroidal serpentine, reniform etc and sizes from about 20 nm to about 500 μ m in diameter, preferably measured along its longest axis, and comprising phosphate-glycerol groups on the surface thereof.

The pharmaceutically acceptable bodies have phosphate-glycerol groups of predetermined characteristics on the exterior surface. Without being limited to any one theory, it is believed that these groups are capable of interacting with the appropriate receptor(s) other than exclusively the PS receptor on antigen presenting cells *in vivo*. The structure of these groups may be synthetically altered and include all, part of or a modified version of the original phosphate-glycerol group. For example, the negatively charged oxygen of the phosphate group of the phosphate glycerol group may be converted to a phosphate ester group (e.g., L-OP(O)(OR')(OR'') where L is the remainder of the phosphate-glycerol group, R' is -CH₂CH(OH)CH₂OH and R'' is alkyl of from 1 to 4 carbon atoms or hydroxyl substituted alkyl of from 2 to 4 carbon atoms, and 1 to 3 hydroxyl groups provided that R'' is more readily hydrolyzed *in vivo* than the R' group, to a diphosphate group including diphosphate esters (e.g. L-OP(O)(OR')OP(O)(OR'')₂ wherein L and R' are as defined above and each R'' is independently hydrogen, alkyl of from 1 to 4 carbon atoms or a hydroxyl substituted alkyl of from 2 to 4 carbon atoms and 1 to 3 hydroxyl groups provided that the second phosphate group [P(O)(OR'')₂] is more readily hydrolyzed *in vivo* than the R' group or to a triphosphate group including triphosphate esters (e.g. L-OP(O)(OR')OP(O)(OR'')OP(O)(OR'')₂ wherein L and R are defined as above and each R'' is independently hydrogen, alkyl of from 1 to 4 carbon atoms or a hydroxyl substituted alkyl of from 2 to 4 carbon atoms and 1 to 3 hydroxyl groups provided that the second and third phosphate groups are more readily hydrolyzed *in vivo* than the R' group; and the like. Such synthetically altered phosphate glycerol groups are capable of expressing phosphate glycerol *in vivo* and, accordingly such altered groups are phosphate glycerol convertible groups.

Phosphatidylglycerol is a known compound. It can be produced, for example by

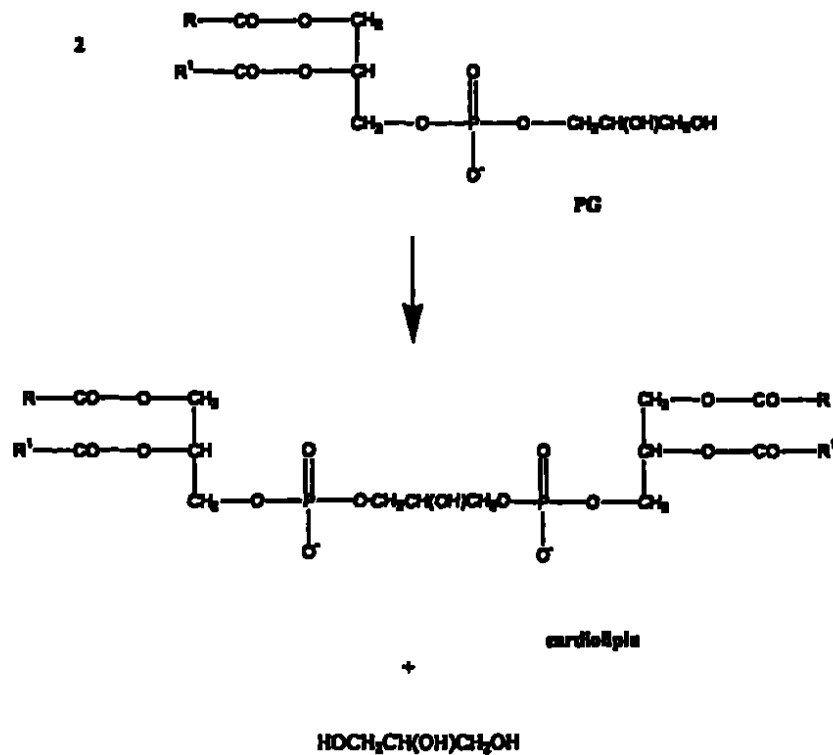
treating the naturally occurring dimeric form of phosphatidylglycerol cardiolipin with phospholipase D. It can also be prepared by enzymatic synthesis from phosphatidylcholine using phospholipase D – see, for example U S Patent 5 188,951 Tremblay, et al. Chemically it has a phosphate glycerol group and a pair of similar but different C₁₆-C₂₀ fatty acid chains

As used herein the term "PG" is intended to cover phospholipids carrying a phosphate-glycerol group with a wide range of at least one fatty acid chains provided that the resulting PG entity can participate as a structural component of a liposome. Preferably such PG compounds can be represented by the Formula I



where R and Rⁱ are independently selected from C₁ – C₂₄ hydrocarbon chains, saturated or unsaturated, straight chain or containing a limited amount of branching wherein at least one chain has from 10 to 24 carbon atoms. Essentially the lipid chains R and Rⁱ form the structural component of the liposomes rather than the active component. Accordingly, these can be varied to include two or one such lipid chains, the same or different, provided they fulfill the structural function. Preferably the lipid chains may be from about 10 to about 24 carbon atoms in length saturated mono-unsaturated or polyunsaturated, straight-chain or with a limited amount of branching. Laurate (C12) myristate (C14) palmitate (C16) stearate (C18), arachidate (C20), behenate (C22) and lignocerate (C24) are examples of useful saturated lipid chains for the PG for use in the present invention. Palmitoleate (C16), oleate (C18) are examples of suitable mono-unsaturated lipid chains. Linoleate (C18) linolenate (C18) and arachidonate (C20) are examples of suitable poly-unsaturated lipid chains for use in PG in the liposomes of the present invention. Phospholipids with a single such lipid chain, also useful in the present invention, are known as lysophospholipids. The present invention also extends to cover use of liposomes in which the active component is the dimeric form of PG namely cardiolipin but other dimers of Formula I are also suitable. Preferably such dimers

are not synthetically cross linked with a synthetic cross-linking agent, such as maleimide but rather are cross-linked by removal of a glycerol unit as described by Lehninger *Biochemistry* p 525 (1970) and depicted in the reaction below



where each R and R' are independently as defined above.

As noted above and again without being limited to any one theory the PG group and its dimer are believed to be a ligand since it is believed that it binds to a specific site on a protein or other molecule ("PG receptor") and, accordingly, this molecule of phosphatidylglycerol (and its dimeric form) is sometimes referred to herein as a "ligand" or a "binding group". Such binding is believed to take place through the phosphate-glycerol group $-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$, which is sometimes referred to herein as the "head group," "active group," or "binding group". In view of the above reference to "binding," "binding group" or "ligand" herein is not to infer any mechanism or mode of action. Nevertheless, it is believed that the above phosphate-glycerol groups are presented on the exterior surfaces of

17

the bodies of the present invention for interaction with components of the patient's immune system. This interaction, it should be noted, is not the same as the specific interaction of apoptotic cells with the phosphatidylserine receptor on antigen presenting cells.

Examples of "three-dimensional body portions" or pharmaceutically acceptable bodies" include biocompatible synthetic or semi-synthetic entities such as liposomes, solid beads, hollow beads, filled beads, particles, granules and microspheres of biocompatible materials, natural or synthetic, as commonly used in the pharmaceutical industry. The beads may be solid or hollow or filled with biocompatible material. The term "biocompatible" refers to substances which in the amount employed are either non-toxic or have acceptable toxicity profiles such that their use *in vivo* is acceptable. Likewise the term 'pharmaceutically acceptable' as used in relation to "pharmaceutically acceptable bodies" refers to bodies comprised of one or more materials which are pharmaceutically acceptable and suitable for delivery *in vivo*. Such bodies can include liposomes formed of lipids, one of which is PG. Alternatively, the pharmaceutically acceptable bodies can be solid beads, hollow beads, filled beads, particles, granules and microspheres of biocompatible materials, which comprise one or more biocompatible materials such as polyethylene glycol, poly(methylmethacrylate), polyvinylpyrrolidone, polystyrene and a wide range of other natural, semi-synthetic and synthetic materials with phosphate, glycerol groups attached thereto.

As noted above, analogues of phosphatidylglycerol with modified active groups, which also interact with PG receptors on the antigen presenting cells, through the same receptor pathway as PG or otherwise resulting in an anti-inflammatory reaction in the recipient body are contemplated within the scope of the term phosphatidylglycerol. This includes, without limitation, compounds in which one or more of the hydroxyl groups and/or the phosphate group is derivatized, or in the form of a salt. Many such compounds form free hydroxyl groups *in vivo* upon or subsequent to administration and, accordingly, comprise convertible PG groups.

Preferred compositions of matter are liposomes, which may be composed of a variety of lipids. Preferably however, none of the lipids are positively charged. In the case of liposomes, phosphatidyl glycerol PG may constitute the major portion or the entire portion of the liposome layer(s) or wall(s), oriented so that the phosphate-glycerol group portion thereof is presented exteriorly to act as the binding group and the lipid chain or chains form the structural wall.

Liposomes, or lipid vesicles, are sealed sacs, in the micron or sub-micron range, the walls (monolayer or multilayer) of which comprise suitable amphiphiles. They normally contain an aqueous medium although for the present invention the interior contents are unimportant, and generally inactive. Accordingly in a preferred embodiment, the liposomes, as well as other pharmaceutically acceptable bodies are essentially free of non lipid pharmaceutically active entities (e.g. <1%) and more preferably are free of non-lipid pharmaceutically acceptable entities. Such liposomes are prepared and treated so that the active groups are presented exteriorly on the liposomal body. The PG in the liposomes of the preferred embodiments of this invention thus serves as both a ligand and a structural component of the liposome itself.

Thus a preferred embodiment of this invention provides liposomal bodies which expose or can be treated or induced to expose, on their surfaces, one or more phosphate glycerol groups to act as binding groups. Phosphatidylglycerol is a preferred PG ligand and such lipids should comprise from 10% to 100% of the liposome, with the balance being an inactive constituent, e.g. phosphatidylcholine PC, or one which acts through a different mechanism, e.g. phosphatidylserine PS or mixtures of such. Inactive co-constituents such as PC are preferred.

At least 10% by weight of such liposome is composed of PG preferably at least 50% more preferably from 60 to 100% and most preferably from 70-90%, with the single most preferred embodiment being about 75% by weight of PG.

Mixtures of PG liposomes with inactive liposomes and/or with liposomes of phospholipids acting through a different mechanism can also be used, provided that the total amount of PG remains above the minimum of about 10% and preferably above 60% in the total mixture.

As regards to non liposomal bodies for use in the present invention, these as noted to include biocompatible solid or hollow beads of appropriate size. The biocompatible non liposomal synthetic or semi synthetic bodies may be selected from polyethylene glycol, poly(methylmethacrylate), polyvinylpyrrolidone, polystyrene and a wide range of other natural, semi-synthetic and synthetic materials, with phosphate, glycerol groups attached to the surfaces thereof. Such materials include biodegradable polymers such as disclosed by Dunn, et al. U.S. Patent 4,938,763 which is hereby incorporated by reference in its entirety.

Biodegradable polymers are disclosed in the art and include, for example, linear chain polymers such as polylactides, polyglycolides, polycaprolactones, polyanhydrides, polyamides, polyurethanes, polyesteramides, polyorthoesters, polydioxanones, polyacetals, polyketals, polycarbonates, polyorthocarbonates, polyphosphazenes, polyhydroxybutyrates, polyhydroxyvalerates, polyalkylene oxalates, polyalkylene succinates, poly(malic acid), poly(amino acids), polyvinylpyrrolidone, polyethylene glycol, polyhydroxycellulose, chitin, chitosan and copolymers, terpolymers and combinations thereof. Other biodegradable polymers include, for example, gelatin, collagen, etc.

Suitable substances for derivatization to attach the phospholipid(s) or portions thereof with groups or binding groups to three-dimensional bodies are commercially available e.g. from Polysciences Inc., 400 Valley Road, Warrington, PA 18976 or from Sigma Aldrich Fine Chemicals. Methods for their derivatization are known in the art. Specific preferred examples of such methods are disclosed in International Patent Application PCT/CA02/01398, Vasogen Ireland Limited, which is

incorporated herein by reference.

It is contemplated that the patient may be a mammal, including but not limited to humans and domestic animals such as cows, horses, pigs, dogs, cats and the like.

Phospholipids are amphiphilic molecules (i.e. amphiphiles), meaning that the compound comprises molecules having a polar water-soluble group attached to a water-insoluble hydrocarbon chain. The amphiphiles serving as the layers of the matrix have defined polar and apolar regions. The amphiphiles can include, in addition to PG in this invention, other naturally occurring lipids used alone with the phospholipid carrying the active group, or in a mixture with another. The amphiphiles serving as the layer(s) of the liposomes can be inert, structure conferring synthetic compounds such as polyoxyethylene alkylethers, polyoxyethylene alkylesters and saccharosulphonates.

Methods of preparing liposomes of the appropriate size are known in the art and do not form part of this invention. Reference may be made to various textbooks and literature articles on the subject, for example, the review article "Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms", by Yechezkel Barenholz and Dan J. A. Chrommelin, and literature cited therein, for example New R. C. "Liposomes: A Practical Approach" IRL Press at Oxford University Press (1990).

The diameter of the liposomes, as well as the other pharmaceutically acceptable bodies of the preferred embodiment of this invention is from about 20 nm to about 500 μ m, more preferably from about 20 nm to about 1000 nm, more preferably from about 50 nm to about 500 nm, and most preferably from about 80 nm to about 120 nm (preferably measured along its longest axis). In one embodiment, the diameter of the liposome is from 60nm to 500 μ m.

The pharmaceutically acceptable bodies may be suspended in a pharmaceutically acceptable carrier such as physiological sterile saline, sterile water, pyrogen free

water, isotonic saline and phosphate buffer solutions (e.g. sterile aqueous solutions comprising phosphate buffer), as well as other non toxic compatible substances used in pharmaceutical formulations, such as, for example adjuvants, buffers, preservatives, and the like. Preferably, the pharmaceutically acceptable bodies are constituted into a liquid suspension in a sterile biocompatible liquid such as buffered saline and administered to the patient by any appropriate route which exposes it to one or more components of the immune system such as intra-arterially intravenously or most preferably intramuscularly or subcutaneously

It is contemplated that the pharmaceutically acceptable bodies may be freeze-dried or lyophilized so that they may be later resuspended for administration. This invention is also directed to a kit of part comprising lyophilized or freeze-dried binding group-carrying bodies and a pharmaceutically acceptable carrier such as physiological sterile saline, sterile water, pyrogen free water, isotonic saline, and phosphate buffer solutions (e.g. sterile aqueous solutions comprising phosphate buffer) as well as other non toxic compatible substances used in pharmaceutical formulations, such as, for example, adjuvants, buffers, preservatives, and the like. Protectants for freeze drying, as known in the art, for example lactose or sucrose may also be included.

A preferred manner of administering the pharmaceutically acceptable bodies to the patient is a course of injections administered daily, several times per week, weekly or monthly to the patient, over a period ranging from a week to several months. The frequency and duration of the course of the administration is likely to vary from patient to patient, and according to the condition being treated, its severity and whether the treatment is intended as prophylactic, therapeutic or curative. Its design and optimization is well within the skill of the attending physician. Intramuscular injection, especially via the gluteal muscle, is most preferred. One particular injection schedule, in at least some of the indications of the invention, is an injection, via the gluteal muscle, of an appropriate amount of bodies on day 1, a further injection on day 2, a further injection on day 14, and then 'booster'.

22

injections at monthly intervals, if appropriate

It is postulated that, in many embodiments of the present invention, pharmaceutically acceptable bodies comprising the PG groups as binding groups on their surface are acting as modifiers of the patient's immune system in a manner similar to that of a vaccine. Accordingly they are used in quantities and by administration methods to provide a sufficient localized concentration of the bodies at the site of introduction. Quantities of such bodies appropriate for immune system modification may not be directly correlated with body size of a recipient and can, therefore, be clearly distinguished from drug dosages which are designed to provide therapeutic levels of active substances in a patient's bloodstream and tissues. Drug dosages are accordingly likely to be much larger than immune system modifying dosages.

The correlation between weights of liposomes and numbers of liposomes is derivable from the knowledge, accepted by persons skilled in the art of liposomal formulations, that a 100 nm diameter bilayer vesicle has 81,230 lipid molecules per vesicle, distributed approximately 50/50 between the layers (see Richard Harrigan - 1992 University of British Columbia PhD Thesis "Transmembrane pH gradients in liposomes (microform) drug vesicle interactions and proton flux", published by National Library of Canada Ottawa, Canada (1993), University Microfilms order no. UMI00406756, Canadiana no. 942042220 ISBN 0315796936). From this one can calculate, for example, that a dose of 5×10^8 vesicles of the order of the dose used in the specific *in vivo* examples below is equivalent to 4.06×10^{13} lipid molecules. Using Avogadro's number for the number of molecules of lipid in a gram molecule (mole) 6.023×10^{23} , one determines that this represents 6.74×10^{-11} moles which at a molecular weight of 729 for PG is approximately 3.83×10^{-8} gm, or 38.3 ng of PG for such dosage.

The quantities of the pharmaceutically acceptable bodies to be administered will vary depending on the nature of the mammalian disorder it is intended to treat and

on the identity and characteristics of the patient. Preferably the effective amount of pharmaceutically acceptable bodies is non-toxic to the patient, and is not so large as to overwhelm the immune system. When using intra-arterial, intravenous, subcutaneous or intramuscular administration of a sterile aqueous suspension of pharmaceutically acceptable bodies it is preferred to administer, for each dose, from about 0.1 to 50 ml of liquid, containing an amount of bodies generally equivalent to 10% to 1000% of the number of leukocytes normally found in an equivalent volume of whole blood. Preferably, the number of bodies administered per delivery to a human patient is in the range from about 500 to about 2.5×10^9 (<250 ng of bodies, in the case of liposomes, pro-rated for density differences for other embodiments of bodies), more preferably from about 1,000 to about 1,500,000,000 even more preferably 10,000 to about 50,000,000 and most preferably from about 200,000 to about 2,000,000.

Since the pharmaceutically acceptable bodies are acting, in the process of the invention, as immune system modifiers, in the nature of a vaccine, the number of such bodies administered to an injection site for each administration may be a more meaningful quantitation than the number or weight of bodies per unit of patient body weight. For the same reason, it is now contemplated that effective amounts or numbers of bodies for small animal use may not directly translate into effective amounts for larger mammals (i.e. greater than 5 kg) on a weight ratio basis.

The present invention is indicated for use in prophylaxis and/or treatment of a wide variety of mammalian disorders where T-cell function, inflammation, endothelial dysfunction and inappropriate cytokine expression are involved. A patient having or suspected of having such a disorder may be selected for treatment. 'Treatment' refers to a reduction of symptoms, such as, but not limited to, a decrease in the severity or number of symptoms of the particular disease or a limit on the further progression of symptoms.

With respect to T-cell function (T-cell mediated) disorders, these disorders include

21

any and all disorders mediated at least in part by T-cells and include for example, ulcers, wounds, and autoimmune disorders including, but not limited to diabetes, scleroderma, psoriasis and rheumatoid arthritis.

The invention is indicated for use with inflammatory allergic reactions, organ and cell transplantation reaction disorders, and microbial infections giving rise to inflammatory reactions. It is also indicated for use in prophylaxis against oxidative stress and/or ischemia reperfusion injury, ingestion of poisons, exposure to toxic chemicals, radiation damage, and exposure to airborne and water-borne irritant substances, etc. which cause damaging inflammation. It is also indicated for inflammatory allergic and T-cell mediated disorders of internal organs such as kidney, liver, heart, etc.

With respect to disorders involving inappropriate cytokine expression for which the present invention is indicated, these include any and all disorders involving inappropriate cytokine expression and include, for example, neurodegenerative diseases. Neurodegenerative diseases, including Down's syndrome, Alzheimer's disease and Parkinson's disease, are associated with increased levels of certain cytokines including interleukin-1 β (IL-1 β) (see Griffin WST et al (1989), Mogi M et al (1996)). It has also been shown that IL-1 β inhibits long term potentiation in the hippocampus (Murray, C. A. et al (1998)). Long term potentiation in the hippocampus is a form of synaptic plasticity and is generally considered to be an appropriate model for memory and learning (Bliss, T. V. P. et al (1993)). Thus, inappropriate cytokine expression in the brain is currently believed to be involved in the development and progression of neurodegenerative diseases and neuroinflammatory disorders.

Thus, the invention is indicated for the treatment and prophylaxis of a wide variety of mammalian neurodegenerative and other neurological disorders including Down's syndrome, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, senile dementia, depression, Huntington's disease, peripheral neuropathies, Guillain Barré syndrome, spinal cord

diseases, neuropathic joint diseases, chronic inflammatory demyelinating disease, neuropathies including mononeuropathy, polyneuropathy, symmetrical distal sensory neuropathy neuromuscular junction disorders myasthenias and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) Treatment and prophylaxis of these neurodegenerative diseases represents a particularly preferred embodiment of the invention, with treatment of Alzheimer's disease Parkinson's disease and ALS particularly preferred.

Regarding disorders involving endothelial dysfunction, the present invention is indicated for the treatment and prophylaxis of a wide variety of such mammalian disorders including, any and all disorders mediated at least in part by endothelial dysfunction and include, for example, cardiovascular diseases, such as atherosclerosis peripheral arterial or arterial occlusive disease, congestive heart failure, cerebrovascular disease (stroke) myocardial infarction, angina, hypertension, etc vasospastic disorders such as Raynaud's disease, cardiac syndrome X, migraine etc , and the damage resulting from ischemia (ischemic injury or ischemia reperfusion injury) In summary it can be substantially any disorder the pathology of which involves an inappropriately functioning endothelium

Further indications for the compositions and processes of the present invention include the treatment of patients to accelerate their rate of wound healing and ulcer healing, and treatment of patients prior to surgical operations, to accelerate their rate of recovery from surgery including their rate of healing of surgical wounds and incisions

In regard to "cardiac disorders," the present invention is indicated for the treatment and prophylaxis of a wide variety of such mammalian disorders including, any and all disorders relating to the heart and include, for example ventricular arrhythmias (ventricular tachycardia or fibrillation) and sudden death from heart disease Susceptibility of patients to cardiac disorders such as arrhythmias and sudden cardiac death is often indicated by prolonged QT-c intervals in the heart beat

rhythm Administration of compositions according to the preferred embodiments of the invention is believed to reduce QT-c intervals in mammalian patients, indicative of reduced susceptibility of to arrhythmia and sudden cardiac death

The invention is further described, for illustrative purposes, in the following non limiting examples.

EXAMPLES

In the examples below, the following abbreviations have the following meanings. If an abbreviation is not defined, it has its generally acceptable meaning

μ g	=	microgram
μ L	=	microliter
μ m	=	micrometer
μ M	=	micromolar
CHS	=	contact hypersensitivity
cm	=	centimeter
DMSO	=	dimethylsulfoxide
DNFB	=	2,4-dinitrofluorobenzene
DHS	=	delayed-type hypersensitivity
EtOH	=	ethanol
g	=	gram
hrs	=	hours
Hz	=	hertz
IM	=	intramuscular
IP	=	intraperitoneal
kg	=	kilogram
LPS	=	lipopolysaccharide
LTP	=	long term potentiation
mg	=	milligram
min	=	minutes

ml	=	milliliter
mM	=	millimolar
ms	=	millisecond
ng	=	nanogram
nm	=	nanometer
nM	=	nanomolar
PBS	=	phosphate-buffered saline
PCR	=	polymerase chain reaction
POPS	=	1 Palmitoyl 2-Oleoyl-sn-Glycerol-3 [phospho-L-serine] referred to herein as PS
POPG	=	1 Palmitoyl 2-Oleoyl-sn-Glycerol-3-[phospho-rac-(1 glycerol)] referred to herein as PG
POPC	=	1-Palmitoyl 2-Oleoyl-sn-Glycerol-3 phosphocholine, referred to herein as PC
RPM	=	revolutions per minute
S	=	second

Unless otherwise stated, the precise form of the lipids used in the experiments was POPS POPG and POPC as set out above

Example 1

Liposomes of 100 ± 20 nm in average diameter were prepared according to standard methods known in the art and had the following compositions

Group A 100% PS

Group B 100% PG

Group C – control, no liposomes

A stock suspension of each liposome composition containing 4.8×10^{14} liposomes per ml was diluted with PBS to give an injection suspension containing 6×10^6 particles per ml. The liposomal suspensions were injected into female BALB/c mice (Jackson Laboratories) aged 6–8 weeks and weighing 19–23 g, to determine the

28

effect on ear swelling in the murine contact hypersensitivity (CHS) model The CHS model tests for Th1 mediated inflammatory reactions

The animals were assigned to one of 3 groups, with 5 animals in each group Groups A and B received approximately 3×10^5 of the above-identified liposomes (i.e. 100% PC and 100% PG, respectively), in a volume of approximately 50 μ l Group C was a control group receiving no liposomes.

Protocol

The following experiments were performed

TABLE I

Group	Lipo- somes	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7 (24 hours)
A	100% PS	Injected then sensitized	Injected	Injected	Injected	Injected	Injected then challenged	Ear measured
B	100% PG	Injected then sensitized	Injected	Injected	Injected	Injected	Injected then challenged	Ear measured

On Days 1-6, mice of Groups A and B were injected with the respective liposomes preparations Approximately 300,000 liposomes were injected in 50 μ l volume via intramuscular (IM) injection, for a total administration over the test period of about 1 800 000 liposomes Mice of the control group (Group C) received no liposomes,

PG liposomes is substantially greater than that from 100% PS liposomes

Example 2

Liposomes of 100 ± 20 nm in average diameter were prepared according to standard methods known in the art and had the following compositions

Group A – 100% PG

Group B – 75% PG, 25% PC

Group C – 50% PG 50% PC

Group D – 25% PG 75% PC

Group E – PBS only

Group F – no injection

A stock suspension of each liposome containing 4.8×10^{14} liposomes per ml was diluted to give an injection suspension containing 1.2×10^8 liposomes per ml. The liposomal suspensions were used to inject into mice to determine the effect on ear swelling in the murine CHS model – a biological system useful for assaying Th1 mediated inflammatory reactions. For these experiments, female BALB/c mice (Jackson Laboratories) aged 6-8 weeks and weighing 19-23 g were used.

The animals were assigned to one of 6 groups (Groups A-F above) with 10 animals in each group. Control groups were also included that received no injections (Group F) or injections of PBS with no liposomes (Group E). Animals in Groups A-D were injected with 50 μ l of the above-identified liposome suspensions, each containing about 6×10^5 liposomes.

Protocol

The test involves sensitization (Sens) with a potentially inflammation-causing substance, injection of liposomes (Inj) in test animals or PBS in controls and

but were sensitized, challenged and tested in the same way as Groups A and B as described below

Sensitization

On Day 1, following liposome injection for that day mice were anaesthetized with 0.2 ml 5 mg/ml sodium pentobarbital via IP injection. The abdominal skin of the mouse was sprayed with 70% EtOH and a scalpel blade was used to remove about a one-inch diameter patch of hair from the abdomen. The shaved area was then painted with 25 μ l of 0.5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) in 4:1 acetone: olive oil using a pipette tip.

Challenge

Following liposome injection on day 6, mice were challenged with DNFB by painting 10 μ l of 0.2% DNFB on the dorsal surface of the right ear with a pipette tip and by painting 10 μ l of vehicle on the left ear with a pipette tip.

Results

On Day 7 24 hours after challenge each animal was anaesthetized with Halothane and ear thickness was measured using a Peacock spring loaded micrometer. Data was expressed as the difference between the treated right ear thickness and the thickness of the vehicle-treated left ear. The experiments were repeated three times on similar animals. Increase in ear swelling was used as a measure of CHS response. The significance of the data was determined by the two-tailed student's t test. A P value of <0.05 was considered significant.

The results are presented in FIG. 1 a bar graph showing the mean values from the three experiments of ear swelling reported in μ m.

FIG. 1 shows that a significant reduction in ear swelling was achieved by injection of liposomes according to the present invention. The reduction achieved with 100%

challenge (Chal) with the potentially inflammation-causing substance following measurement (Meas) to determine whether the injection of liposomes are effective against the development of inflammation by the challenge.

The following experiments were performed

Group	Lipo- somes	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7
A	100% PG	Sens & Inj	Inj	Inj	Inj	Inj	Chal & Inj	Meas
B	75% PG	Sens & Inj	Inj	Inj	Inj	Inj	Chal & Inj	Meas
C	50% PG	Sens & Inj	Inj	Inj	Inj	Inj	Chal & Inj	Meas
D	25% PG	Sens & Inj	Inj	Inj	Inj	Inj	Chal & Inj	Meas
E	None (PBS only)	Sens & Inj	Inj	Inj	Inj	Inj	Chal & Inj	Meas
F	none	Sens					Chal	Meas

On days 1-6 the mice were injected with the respective liposomes as indicated above. Liposomes were injected in 50µl volume via IM injection, i.e., 600 000 liposomes per injection, for a total administration over the test period of 3 600,000 liposomes. Mice of the control group received no liposomes but were sensitized, challenged and tested in the same way as the other groups of mice, as described below.

Sensitization (Sens)

On Day 1 following liposome injection for that day mice were anaesthetized with 0.2 ml 5 mg/ml sodium phenobarbital via IP injection. The abdominal skin of the

mouse was sprayed with 70% EtOH and a blade was used to remove about a one inch diameter of hair from the abdomen. The bare area was painted with 25 μ l of 0.5% 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) in 4:1 acetone:olive oil using a pipette tip.

Challenge (Chal)

On Day 6, following liposomes injection for that day, mice were challenged (Chal) with DNFB as follows: 10 μ l of 0.2% DNFB was painted on the dorsal surface of the right ear with a pipette tip and 10 μ l of vehicle was painted on the left ear with a pipette tip.

Results

On Day 7, 24 hours after challenge, each animal was anaesthetized with Halothane and ear thickness was measured (Meas) using a Peacock spring loaded micrometer. Increase in ear swelling was used as a measure of CHS response. Data was expressed as the difference in the treated right ear thickness minus the thickness of the vehicle treated left ear. The significance between the two groups is determined by a two-tailed student's t test. A P value of <0.05 is considered significant.

The results are presented graphically in FIG. 2, a bar graph showing ear swelling in μ m. The mean value from the respective experiments was used in compiling the graph.

FIG. 2 shows that a significant reduction in ear swelling with both 100 and 75% PG is achieved, showing that both these concentrations protect against the development of inflammation resulting from contact with the allergenic substance, DNFB. The 50% and the 25% PG liposomes also showed reductions as compared with both controls, but the differences did not reach statistical significance in this experiment.

Example 3

Liposomes of 100 ± 20 nm in average diameter were prepared according to standard methods known in the art and were composed of 75% PG 25% PC. A stock suspension containing 4.8×10^{14} liposomes per ml was used as before and diluted in PBS to give an injection suspension containing the following concentrations of liposomes

Group	Liposomes	Concentration (liposomes per mL)	Liposomes per injection	Animals in Group
A	75% PG, 25% PC	12×10^{11}	6×10^{10}	10
B	75% PG, 25% PC	12×10^9	6×10^8	10
C	75% PG 25% PC	12×10^8	6×10^7	16
D	75% PG 25% PC	12×10^7	6×10^6	16
E	75% PG 25% PC	12×10^6	6×10^5	16
F	none (PBS only)			16

BALB-c mice were divided into six groups (Groups A-F) including a control group receiving no liposomes but injected with 50 μ L of PBS (Group F). Mice were sensitized on the flank, injected with their selected liposomal dose, intramuscularly to the right leg muscle, on the same day as but after sensitisation (day 1) and on days 2, 3, 4 and 5. On day 6 they were both injected and challenged on the ear as described in Example 1. The thickness of the ear was measured as described 24 hours after the challenge.

The results (FIG 3) show a significant difference between the control group (Group F) and Group C (12×10^8 liposomes per ml) and between the control group and Group D (12×10^7 liposomes per ml) and between the control group and Group E (12×10^6 liposomes per ml). There was little difference between the control group and Groups A or B (12×10^{11} and 12×10^9 liposomes per ml respectively) suggesting that there is an optimum range of liposome concentrations above which the beneficial effects may be reduced. In other experiments, a decrease in effect was also observed as the concentration of the liposomes was decreased below 12×10^4 liposomes per ml.

Example 4

Liposomes of formulation 100% PG and 100 ± 20 nm in average size were prepared according to standard methods. Four groups (Groups A-D) of 10 mice were sensitised, injected and challenged in accordance with the procedure and schedule described in Example 3 with the following numbers of 100% PG liposomes delivered in a 50 μ l suspension:

Group A – 6×10^7

Group B – 6×10^6

Group C – 6×10^5

Group D – 6×10^4

The results, along with the PBS control from Example 4 are presented in similar bar graph form in FIG 4. A significant reduction in ear swelling, as compared with the control group is to be noted for each of the test groups, but with little difference between the various groups.

Example 5

Liposomes of composition 75% PG, 25% PC and of 50 100 200 or 400 nm in average diameter were prepared by standard methods. They were tested in the murine CHS model, as in Examples 3 and 4 using 6×10^5 liposomes in 50 μ l suspensions for each injection, and a sensitisation injection-challenge schedule and

procedure as in Example 3 The groups were as follows

Group A	50 nm liposomes
Group B	100 nm liposomes
Group C	200 nm liposomes
Group D	400 nm liposomes
Group E	no liposomes

The results are presented in FIG 5 The result from Group D using the 400 nm diameter liposomes is not significantly different from the control group (Group E), indicating a probable size range criticality in this model

Example 6

A stock suspension of 75% PG liposomes of 100±20 nm in average diameter containing 4.8×10^{14} liposomes per ml was diluted to give an injection suspension containing 6×10^5 liposomes per ml The liposomal suspensions were used to inject into mice, to determine the effect on ear swelling in the murine DHS model As in Example 1 female BALB/c mice (Jackson Laboratories) aged 6-8 weeks and weighing 19-23 g were used

The animals were assigned to one of 3 groups with 10 animals in each group. A control group (Group C) received only PBS injections Animals of Groups A and B were injected with 50 µl of a suspension containing 6×10^5 liposomes

Protocol

On days 13-18 the mice were injected with the 75% PG liposomes as indicated below Liposomes were injected in 50 µl volume via IM injection, i.e. 600,000 liposomes per injection for a total administration over the test period of 3,600,000 liposomes Sensitization and challenge took place as described in Example 2

DAY	TREATMENT
-----	-----------

1	Sensitized
6	Challenged
7	Measured
12	Challenged
13	Measured & Injected
14	Injected
15	Injected
16	Measured & Injected
17	Injected
18	Injected & Challenged
19	Measured

Results

The results are presented graphically in accompanying FIG 6 and show that 75% PG is effective in the DHS model on day 16 24 hours after the third injection following the second challenge

Example 7

Liposomes of composed of 100% cardiolipin (CL) and 100±20 nm in average diameter were prepared, by standard methods. These were used at a dosage of 6 x 10⁵ liposomes per 50 µl per injection in the murine DHS model described in Example 6. Data obtained from animals injected with CL liposomes (Group A, 10 animals) was compared to data obtained from animals receiving only PBS (Group B, 10 animals). The sensitisation, injection and challenge procedures were as described in Example 2. The ear thickness measurement results taken on day 19 24 hrs after the 6th injection, are presented in FIG 7. The results showed a significant reduction in ear swelling within the CL-injected test (Group A).

Example 8

Liposomes of 100 nm in average diameter, and comprising either 100% cardiolipin or 75% cardiolipin and 25% PC, were prepared by standard methods. Three groups (Groups A-C) of 10 mice were sensitized on day 1. A control group received injections of PBS on days 1, 2 and 6 (Group C). The other two groups received injections, of 6×10^5 100% cardiolipin liposomes (Group A) or of 6×10^5 75% cardiolipin liposomes (Group B) liposomes in 50 μ l per injection according to the same schedule. The mice were challenged on day 7, and the ear thickness measured, as described in the previous examples.

FIG. 8 shows the mean measurements in each group. Both groups receiving CL liposomes showed a statistically significant suppression of CHS compared to the control group.

Example 9

To study the cellular and molecular mechanisms underlying cognitive function, the Long-Term Potentiation (LTP) animal model is used. LTP is a form of synaptic plasticity that occurs in the hippocampal formation, which has been proposed as a biological substrate for learning and memory (Bliss *et al.* Nature 361 31-39 (1990)). LTP in rats is monitored electrophysiologically by methods well known to those in the art. The animals are then sacrificed to investigate biochemical changes in hippocampal tissues. Comparing the results of electrophysiological data with biochemical hippocampal changes is useful for determining how the cellular events that underlie LTP may be altered in animals suffering from diseases or disorders associated with neuroinflammation such as aging, stress, Alzheimer's disease, and bacterial infection.

Systemic administration of lipopolysaccharide (LPS), a cell wall component of Gram-negative bacteria, provokes an activation of the immune system by inducing an increase in pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β . As noted above, one

example of a neuronal deficit induced by LPS and IL-1 β is the impairment of LTP in the hippocampus. An indicator of LTP is the mean slope of the population excitatory post-synaptic potential (epsp). Upon tetanic stimulation, the epsp slope (%) increases sharply indicating increased synaptic activity. LPS induced inhibition of LTP reduces the increase in slope, and/or causes the epsp slope to revert more rapidly to base line, indicating that the increased synaptic activity is short lived. Accordingly measurements of the epsp slope (%) at timed intervals after tetanic stimulation can be used to reflect memory and the loss thereof following an inflammatory stimulus as well as inflammation in the hippocampus of the brain.

Liposomes of 100 $\pm$ 20 nm in average diameter were prepared as according to standard methods known in the art and were composed of 75% PG and 25% PC. A stock suspension of the liposomes containing about 2.9×10^{14} liposomes per ml was diluted with PBS to give an injection suspension containing about 1.2×10^7 liposomes per ml. This was then used to inject into rats, to determine the effect on LPS induced impairment of LTP. For these experiments male Wistar rats (BioResources Unit, Trinity College, Dublin) weighing approximately 300 g, were used.

The animals were assigned to one of four groups, 8 animals in each group to be treated as follows:

Group A	saline + control
Group B	saline + PG
Group C	LPS + control
Group D	LPS + PG

150 μ l of each above-identified preparation was injected via IM injection on days 1, 13, and 14. Groups B and D received a total of 5,400,000 liposomes (1,800,000 liposomes per injection). The LTP procedure and tissue preparation procedure were carried out on day 0.

LTP Procedure

Rats were anaesthetized by IP injection of urethane (1.5 g/kg). Rats received either LPS (100 µg/kg) or saline intraperitoneally. Three hours later a bipolar stimulating electrode and a unipolar recording electrode were placed in the perforant path and in the dorsal cell body region of the dentate gyrus respectively. Test shocks of 0.033 Hz were given and responses recorded for 10 min before and 45 min after high frequency stimulation (3 trains of stimuli delivered at 30 s intervals, 250 Hz for 200 ms).

Rats were killed by decapitation. The hippocampus, the tetanized and untetanized dentate gyrus, the cortex and entorhinal cortex were dissected on ice, sectioned and frozen in 1 ml of Krebs solution (composition of Krebs in mM: NaCl 136, KCl 2.54, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 7H₂O 1.18, NaHCO₃ 16, glucose 10, CaCl₂ 1.13) containing 10% DMSO.

Results

The results are shown in FIG. 9. The graph shows the difference in the excitatory post-synaptic potential (epsp) recorded in cell bodies of the granule cells. The data presented are means of seven to eight observations in each treatment group and are expressed as mean percentage change in epsp slope every 30 s normalized with respect to the mean value in the 5 minutes immediately prior to tetanic stimulation. FIG. 9 shows that the LPS induced inhibition of LTP in perforant path-granule cell synapses was overcome by pre-treatment with the PG liposomes. The filled triangles represent Group A (saline + control), the open triangles represent Group B (saline + PG), the filled squares represent Group C (LPS + control) and the open squares represent Group D (LPS + PG).

FIG. 10 shows that analysis of the mean values 40–45 minutes post tetanic stimulation indicate that the population epsp slope was decreased in the control LPS group (open bars) and that the PG liposomes (hashed bars) significantly reversed this effect (*p < 0.01). As an index of memory and learning functionality, the

improvement in sustainability of LTP demonstrated in this Example indicates suitability of the treatment for dementias e.g. Alzheimer's disease and memory impairment.

Example 10

IL-4 is one of a number of cytokines secreted by the Th2 subclass of lymphocytes and is known for its anti-inflammatory effects. FIG 11 shows that the IL-4 concentration in the hippocampus was significantly increased in the LPS group that had been pre-treated with the PG liposomes (* $p < 0.05$). Open bars represent control group (Group B) and hashed bars represent the PG treated group (Group F). IL-4 was measured by ELISA and expressed as pg of IL-4 per mg of total protein. This upregulation of the anti-inflammatory cytokine IL-4 in the brain is indicative of the use of the process and composition of preferred embodiments of the present invention in treating a wide range of neuroinflammatory disorders including Parkinson's disease, ALS, chronic inflammatory demyelinating disease, CIPD and Guillain Barré syndrome.

Example 11

IL-1 β is one of a number of cytokines secreted by the Th1 subclass of lymphocytes and is known for its proinflammatory effects. Spleens from animals treated as described in Example 9, groups C and D thereof, were extracted and spleen cells collected. They were prepared as follows:

FIG 12 shows that the IL-1 β concentration in spleen cells was significantly reduced in the LPS group that had been pre-treated with the PG liposomes (* $p < 0.05$). IL-1 β was measured by ELISA and expressed as picograms of IL-1 β per mg of total protein. This indicates a systemic inflammatory effect of the process and compositions of preferred embodiments of the present invention.

Example 12

U937 is a monocytic leukemia cell line that can be differentiated into macrophages.

41

by administration of phorbol esters. Treatment with lipopolysaccharide (LPS), a component of the cell wall of Gram negative bacteria stimulates an inflammatory response in U937 cells, with the upregulation of expression of a number of inflammatory molecules including TNF α . This model provides an experimental system for the assessment of anti-inflammatory therapies. The macrophages can be grown in culture medium in the presence of a suspected anti-inflammatory composition, and the expression of TNF α can be measured.

Liposomes of 100 ± 20 nm in average diameter were prepared according to standard methods known in the art and had a composition of 75% phosphatidylglycerol (PG), 25% phosphatidylcholine (PC). The stock concentration of liposome was about 40 mM lipid and was diluted to the following final concentrations in the assay:

100 μ M phosphatidylglycerol (PG)

40 μ M PG

10 μ M PG

4.0 μ M PG

1 μ M PG

The U937 cells were cultured by growing in RPMI medium (GIBCO BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin and grown at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. 5×10^5 cells were seeded into wells of 6-well plates and caused to differentiate into macrophages by treatment with 150 nM phorbol myristate acetate (PMA) for 2-3 days. The cell medium was then replaced with complete medium after the U937 cells had differentiated into macrophages. The cells were then incubated for an additional 24 hrs to minimize pleiotropic effects due to PMA treatment.

The cells were then incubated with either

Group A Phosphate buffered saline (PBS) – as a negative control

Group B 10 ng/ml LPS – as a positive control

Group C 10 ng/ml LPS + 100 μ M PG

Group D	10 ng/ml LPS + 40 μ M PG
Group E	10 ng/ml LPS + 10 μ M PG
Group F	10 ng/ml LPS + 4.0 μ M PG, or
Group G	10 ng/ml LPS + 1 μ M PG

The cells were incubated as described above at 37°C in 5% CO₂. After 18 hrs, the supernatants from each treatment were collected and assayed for TNF- α using a standard Quantikine Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit (R&D systems, Minneapolis USA).

Results

FIG 13 shows the amount of secreted TNF- α in PG per ml. The results demonstrates that U937-differentiated macrophage cells express very low levels of TNF- α under normal conditions. However, once exposed to LPS, they secrete large amounts of TNF- α into the surrounding medium which is indicative of cellular stress occurring. Incubation of the cells with PG liposomes inhibits the secretion of TNF- α in a dose-dependent manner with the highest concentration of 100 μ M resulting in a 98% decrease, and even the lowest concentration of 1 μ M causing a 58% decrease in TNF- α expression.

Example 13

To determine the effect of the PG liposomes of the preferred embodiment of the present invention on endothelial function, the endothelin-1 (ET 1) content in the ears of mice which had been subjected to the CHS studies as described in Example 3 was determined. Endothelin 1 is a potent vasoconstrictive agent, has inotropic and mitogenic actions, modulates salt and water homeostasis and plays an important role in the maintenance of vascular tone and blood pressure. Various lines of evidence indicate that endogenous ET 1 may contribute to the pathophysiology of conditions associated with sustained vasoconstriction such as heart failure. In heart failure, elevated levels of circulating ET 1 and big ET 1 are observed (Giannesi D, Del Ry

S. Vitale RL. "The role of endothelins and their receptors in heart failure "
***Pharmacol Res* 2001 Feb 43 2 111-26)** Thus ET 1 is a marker of endothelial function and increased production of ET 1 in tissue is indicative of impaired endothelial function.

In order to determine ET 1 expression mouse ears (right challenged ear) were harvested 24 hrs after challenge in CHS experiments Ears were obtained from mice injected intramuscularly with PBS for 6 days (Group A) and mice injected intramuscularly with 75% PG/25% PC liposomes (600 000 liposomes/injection Group B) Ears were stored in RNAlater at -20°C until RNA extraction RNA was extracted and cDNA was generated using reverse transcriptase (RT) along with ET 1-specific primers as an internal control PCR was also performed using β -actin-specific primers PCR products were resolved on a 1.5% agarose gel and the DNA bands were quantitated by densitometry analysis. The ratio of ET-1/ β -actin was calculated

461

PCR Preparation

PCR Mix (ET 1)

5µl PCR Buffer (10x)
1.5µl MgCl₂ (50mM)
1µl dNTP (10mM)
0.5µl Primer 1 (25uM)
0.5µl Primer 2 (25uM)
0.25µl TAQ
2.5µl cDNA
38µl Water

50µl Total

PCR Mix (β-Actin)

5µl PCR Buffer (10x)
1.5µl MgCl₂ (50mM)
1µl dNTP (10mM)
1µl Primer 1 (10uM)
1µl Primer 2 (10uM)
0.25µl TAQ
2.5µl cDNA
37.75µl Water

50µl Total

Primers (as previously described – see for example Yang, L, Husain M, and Stewart, D J “Conditional cardiac overexpression of endothelin-1 in transgenic mice”, FASEB J 15(5) A1138 – A1138 Part 2, MAR8 2001

ET 1(r) 5 -CAG CAC TTC TTG TCT TTT TGG-3
ET 1(f) 5'-CCA AGG AGC TCC AGA AAC AG-3

β -Actin(F) 5 -GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA 3
 β -Actin(r) 5 -CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'

PCR Settings

94°C – 5minutes

94°C – 30s }
60°C – 30s } 30 cycles
72°C – 60s }

72°C – 10 minutes

4°C Soak

After 6-daily injections of the 75% PG liposomes, the level of ET-1 was decreased by 36% relative to control mice receiving PBS during the same injection regimen. The results are shown graphically on FIG 14. This decrease indicates a beneficial effect resulting from the injection of the liposomes of the preferred embodiment of the invention on endothelial function in a mammalian patient, through Th1 mediated inflammation reduction.

Example 14

Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM 1) is a cell surface molecule expressed by several cell types, including leukocytes and endothelial cells. It is involved in the adhesion of monocytes to endothelial cells and plays a role in inflammatory processes and in the T-cell mediated host defense system. ICAM 1 expression probably contributes to the clinical manifestations of a variety of diseases, predominantly by interfering with normal immune function. Among these are malignancies (e.g. melanoma and lymphomas), many inflammatory disorders (e.g. asthma and autoimmune disorders), atherosclerosis, ischemia, certain neurological disorders, and allogeneic organ transplantation (Van de Stolpe A, van der Saag PT, "Intercellular adhesion molecule-1" *J Mol. Med.* (1996) 74 1 13-33).

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) are a primary cell line of endothelial cells that are isolated from umbilical vein cords as follows

T75 flasks were prepared by coating with 0.2% gelatin (5-7 ml/flask) for a minimum of 15/20 minutes or overnight. The excess was then removed. The cord was sprayed with 70% ethanol prior to procedure and any placenta still remaining attached to the cord was cut away. The cord was then cut to an approximate length of 5-6 inches. The cord has two arteries which are thick walled and one vein that is bigger and thin walled. The vein was located and the serrated edge of a stopper placed into it. Approximately 20cm of string was then used to tie the cord onto the stopper.

The cord was then washed through with phosphate buffered saline (PBS) a number of times until the PBS ran clear. Following this 15-20mls of Collagenase solution was placed into the cord, it was wrapped in tinfoil and incubated for 15 minutes at 37°C. After incubation the tied end of the cord was cut and the collagenase drained into a 50ml tube. Collagenase was then passed through the cord again, the cord was massaged to loosen the endothelial cells and then PBS was passed through the cord.

47

and collected into the same tube containing the collagenase solution. This was then centrifuged at 1600RPMs, the supernatant removed and the pellet resuspended in 10-12 ml of M199 complete medium. Finally the medium containing the cells was added to the gelatinized flasks.

Liposomes of 100 ± 20 nm in average diameter were prepared according to standard methods known in the art and had a composition of 75% phosphatidylglycerol (PG) 25% phosphatidylcholine (PC). The stock concentration of liposome was 40 mM lipid and was diluted to 100 μ M in the assay.

HUVECs split into a number of tissue culture flasks allowed to adhere to the surface of the flask and then treated as follows:

- Group A: PBS – as a negative control
- Group B: 500 ng/ml LPS – as a positive control
- Group C: 500 ng/ml LPS + 100 μ M PG
- Group D: 500 ng/ml LPS + 100 μ M PC

The cells were incubated at 37°C 5% CO₂. After 18 hrs the supernatants from each treatment were collected and assayed for ET-1 using a standard ELISA kit (obtained from Assay Designs) and the cells harvested for analyzing ICAM-1 as follows.

The cells were first washed with PBS and then incubated with a cell dissociation buffer at 37°C for 25-30 min. The cells were then washed by centrifugation and incubated with an anti-CD54 (ICAM-1) antibody for 30 minutes. A secondary FITC antibody was then added and incubated with the cells as before. Finally they were resuspended in 1 ml of PBS and analyzed for fluorescence on a flow cytometer.

Results

The results are presented on FIG. 15 – a graphical presentation of the percentage of cells staining positive for ICAM-1 in the respective cultures. It is to be noted that the numbers of cells staining positive in the PG liposome-containing culture is

reduced to negative control level and is much lower than the positive control level

Example 15

Microglial cells (brain macrophages) were cultured, and their output of TNF- α an inflammatory cytokine was measured. The cells were stimulated with the immunoglobulin (IgG) of patients suffering from ALS, and the TNF- α output increased about 800-fold as a result. When the same cells were grown in the presence of both the ALS IgG and PG liposomes, output of TNF- α decreased by about 75% indicating the potential of the preferred embodiments of the present invention in the treatment of ALS. The results are presented in FIG. 16

49

What is claimed is

- 1 A composition of matter capable of producing an anti inflammatory response *in vivo* in a mammal, said composition comprising pharmaceutically acceptable bodies of a size from about 20 nanometers (nm) to 500 micrometers (μ m) comprising a plurality of phosphate glycerol groups or groups convertible to phosphate-glycerol groups.
- 2 The composition according to claim 1 wherein the bodies are liposomes
- 3 The composition according to Claim 2 wherein said composition is essentially free of non lipid pharmaceutically acceptable entities
- 4 The composition according to Claim 2 wherein said composition is free of non-lipid pharmaceutically acceptable entities
- 5 The composition according to Claim 2 Claim 3 or Claim 4 wherein the liposomes comprise from about 60 to 100% of phosphatidylglycerol (PG)
- 6 The composition according to Claim 5 wherein the liposomes comprise from about 70% - 90% of phosphatidylglycerol
- 7 The composition according to Claim 5 or Claim 6, wherein the remainder of the liposome comprises phosphatidylcholine.
- 8 The composition according to any of claims 2 – 7 wherein the liposomes have a size from about 50 – 500 nanometers
- 9 The composition according to claim 8 wherein the liposomes have a size from about 80 – 120 nanometers

- 10 For use in the manufacture of a medicament for the treatment of a T-cell function mediated disorder, a composition comprising pharmaceutically acceptable biocompatible bodies having a size in the range of from about 20 nm to 500 μ m and having expressed or expressible on the surface a plurality of PG head groups
- 11 For use as claimed in claim 10 wherein the PG head groups are expressed on the surface of the bodies and are head groups of PG ligands
- 12 For use as claimed in claim 10 or claim 11 wherein the bodies are liposomes.
- 13 For use as claimed in claim 12 wherein the liposomes are constituted by 50% - 100% by weight of phosphatidylglycerol
- 14 For use as claimed in claim 13 wherein the liposomes are constituted by 65% - 90% by weight of phosphatidylglycerol
- 15 For use as claimed in claim 11 claim 12 or claim 13 wherein the liposomes have a diameter of from about 20 nanometers to about 1000 nanometers
- 16 For use as claimed in any of claims 10 - 15, a unit dosage of said composition comprising from about 50 to about 2.5×10^9 bodies.
- 17 For use as claimed in claim 16 a unit dosage of said composition comprising from about 10 000 to about 50 000 000 bodies
- 18 For use in the manufacture of a medicament for the treatment of an inflammatory disorder a composition comprising pharmaceutically acceptable biocompatible bodies having a size in the range of from about 20

nm to 500 μ m and having expressed or expressible on the surface a plurality of PG head groups.

- 19 For use as claimed in claim 18 wherein the PG head groups are expressed on the surface of the bodies and are head groups of PG ligands
- 20 For use as claimed in claim 18 or claim 19, wherein the bodies are liposomes.
- 21 For use as claimed in claim 20, wherein the liposomes are constituted are constituted by 50% - 100% by weight of phosphatidylglycerol
- 22 For use as claimed in claim 21 wherein the liposomes are constituted by 65% -90% by weight of phosphatidylglycerol
- 23 For use as claimed in claim 20 claim 21 or claim 22 wherein the liposomes have a diameter of from about 20 nanometers to about 1000 nanometers.
- 24 For use as claimed in any of claims 20 - 23, a unit dosage of said composition comprising from about 50 to about 2.5×10^9 bodies
- 25 For use in the manufacture of a medicament for the treatment of an endothelial function disorder a composition comprising pharmaceutically acceptable biocompatible bodies having a size in the range of from about 20 nm to 500 μ m and having expressed or expressible on the surface a plurality of PG head groups
- 26 For use as claimed in claim 25 wherein the PG head groups are expressed on the surface of the bodies and are head groups of PG ligands
- 27 For use as claimed in claim 25 or claim 26 wherein the bodies are liposomes

- 28 For use as claimed in claim 27 wherein the liposomes are constituted are constituted by 50% - 100% by weight of phosphatidylglycerol
- 29 For use as claimed in claim 28 wherein the liposomes are constituted by 65% -90% by weight of phosphatidylglycerol
- 30 For use as claimed in claim 27 claim 28 or claim 29 wherein the liposomes have a diameter of from about 20 nanometers to about 1000 nanometers.
- 31 For use as claimed in any of claims 27 - 30, a unit dosage of said composition comprising from about 50 to about 2.5×10^9 bodies.
- 32 For use as claimed in claim 31 a unit dosage of said composition comprising from about 10 000 to about 50 000 000 bodies
- 33 For use as claimed in claim 32 a unit dosage of said composition comprising from about 10 000 to about 50 000 000 bodies.
- 34 For use in the manufacture of a medicament for the treatment of an immune disorder characterized by inappropriate cytokine expression, a composition comprising pharmaceutically acceptable biocompatible bodies having a size in the range of from about 20 nm to 500 μ m and having expressed or expressible on the surface a plurality of PG head groups
- 35 For use as claimed in claim 34 wherein the PG head groups are expressed on the surface of the bodies and are head groups of PG ligands
- 36 For use as claimed in claim 34 or claim 35 wherein the bodies are liposomes

- 37 For use as claimed in claim 36, wherein the liposomes are constituted are constituted by 50% - 100% by weight of phosphatidylglycerol
- 38 For use as claimed in claim 37 wherein the liposomes are constituted by 65% -90% by weight of phosphatidylglycerol
- 39 For use as claimed in claim 36 claim 37 or claim 38 wherein the liposomes have a diameter of from about 20 nanometers to about 1000 nanometers
- 40 For use as claimed in any of claims 36 - 39 a unit dosage of said composition comprising from about 50 to about 2.5×10^9 bodies.
- 41 For use as claimed in claim 40 a unit dosage of said composition comprising from about 10 000 to about 50 000 000 bodies.
- 42 For use as claimed in claim 41 a unit dosage of said composition comprising from about 10,000 to about 50,000,000 bodies
- 43 For use as claimed in any of claims 34 – 42 wherein the disorder is a neurological disorder
- 44 A pharmaceutical composition in unit-dosage form for administration to a mammalian patient, comprising pharmaceutically acceptable bodies and a pharmaceutically acceptable carrier wherein at least a portion of the bodies has a size in the range from about 20 nm to 500 μ m and wherein the surfaces of said bodies comprise phosphate-glycerol groups or groups convertible to phosphate-glycerol groups said unit dosage comprising from about 500 to about 2.5×10^9 bodies
- 45 The pharmaceutical composition of Claim 44 wherein the bodies are liposomes

- 46 The pharmaceutical composition of Claim 45 wherein the composition is essentially free of non-lipid pharmaceutically acceptable entities.
- 47 The pharmaceutical composition of Claim 45 wherein the composition is free of non lipid pharmaceutically acceptable entities
- 48 The pharmaceutical composition of Claim 45 Claim 46 or Claim 47 wherein the liposome comprises phosphate-glycerol groups comprise from about 60 to 100% of phosphatidylglycerol, PG
- 49 The pharmaceutical composition of Claim 48 wherein the liposome comprises from 70 – 90% PG
- 50 The pharmaceutical composition of Claim 48 or claim 49 wherein any remainder of the liposome is phosphatidylcholine
- 51 The pharmaceutical composition of claim 44 wherein said bodies comprise surface groups which specifically bind to receptors on cells of the mammalian immune system specific for the binding of phosphate-glycerol groups

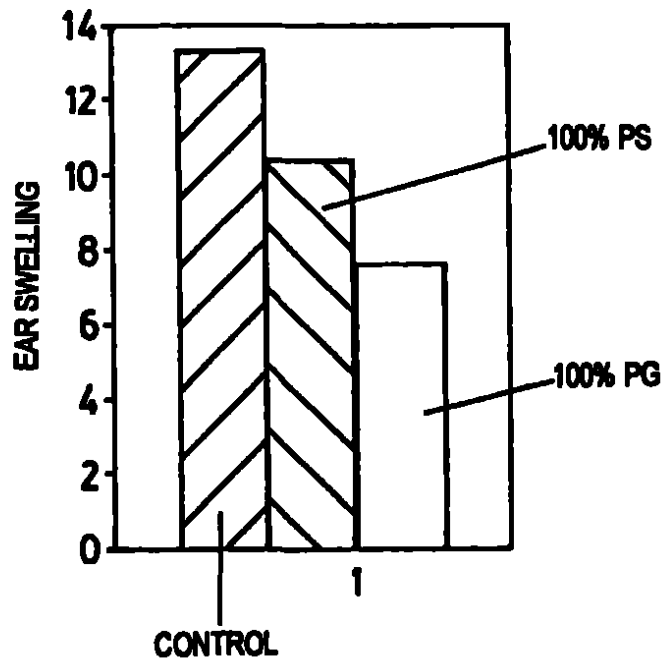


FIG. 1

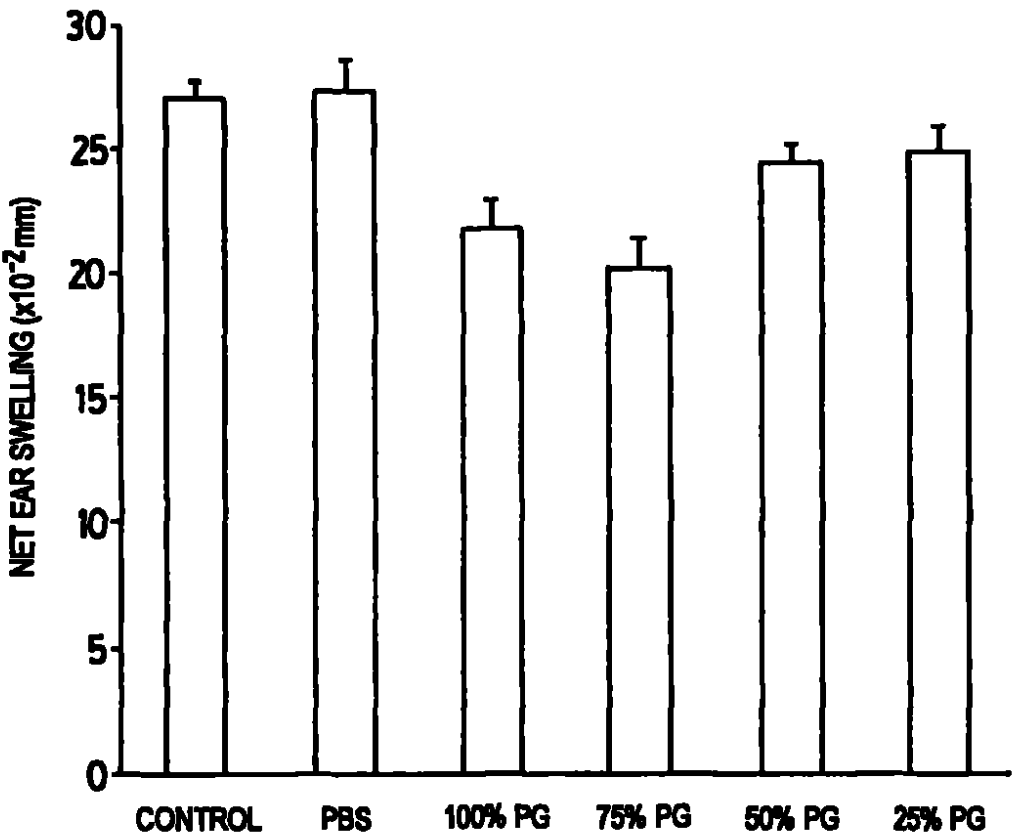


FIG. 2

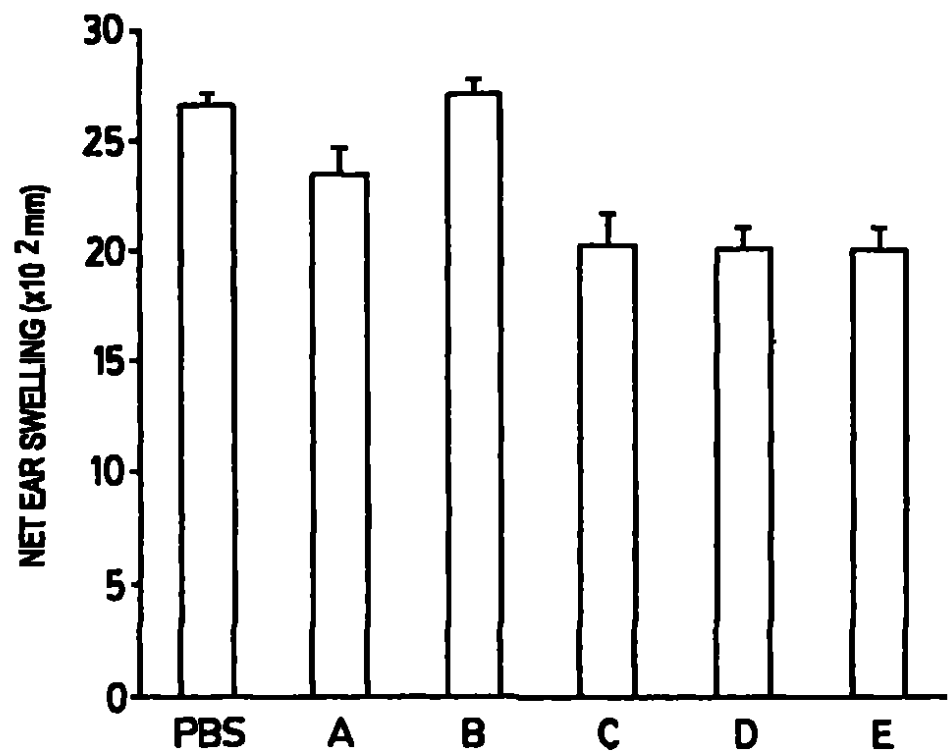
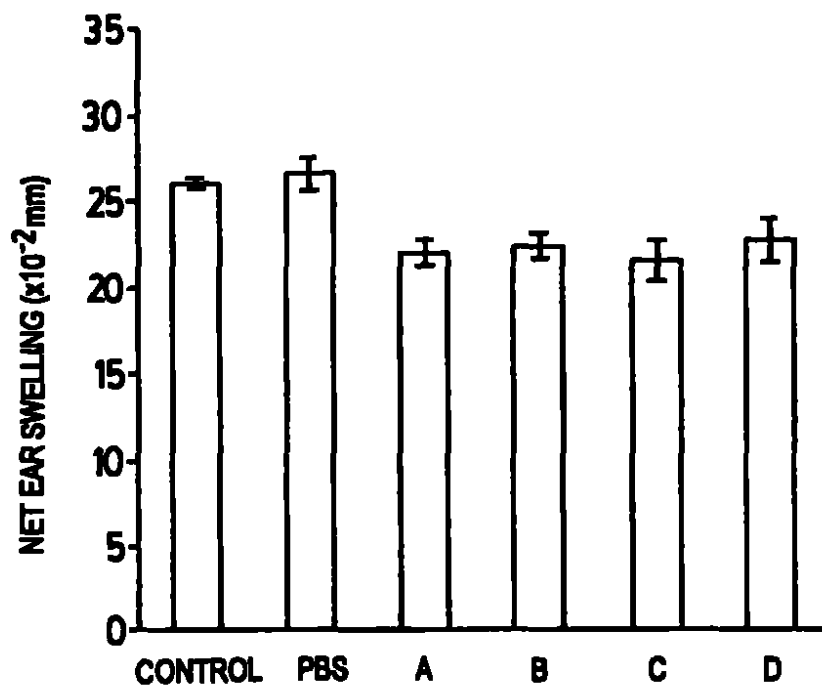
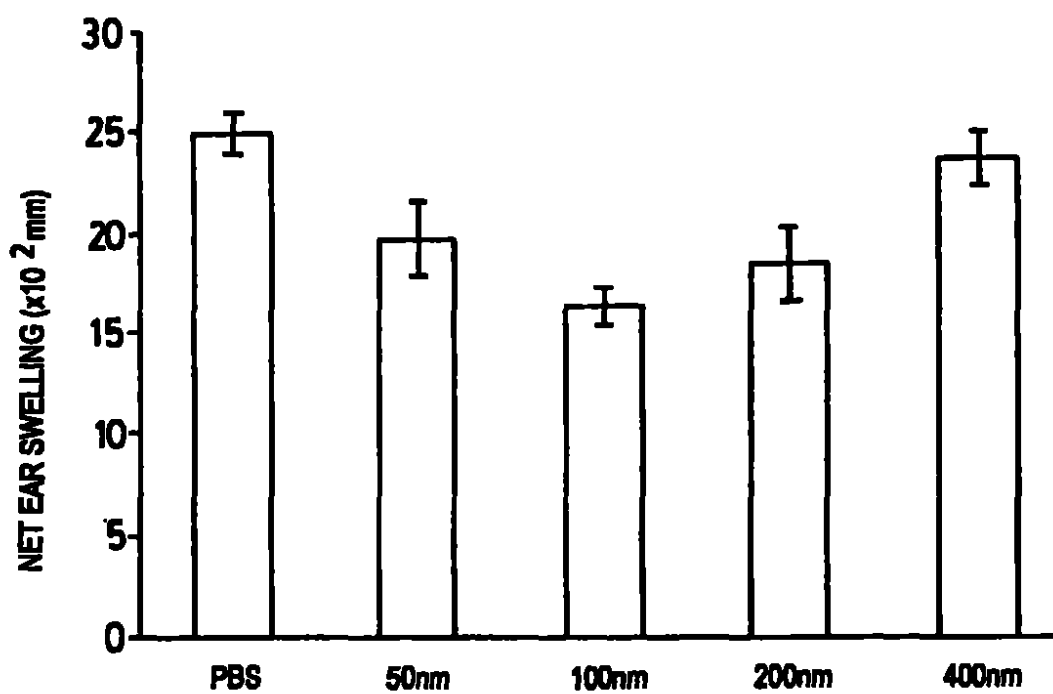
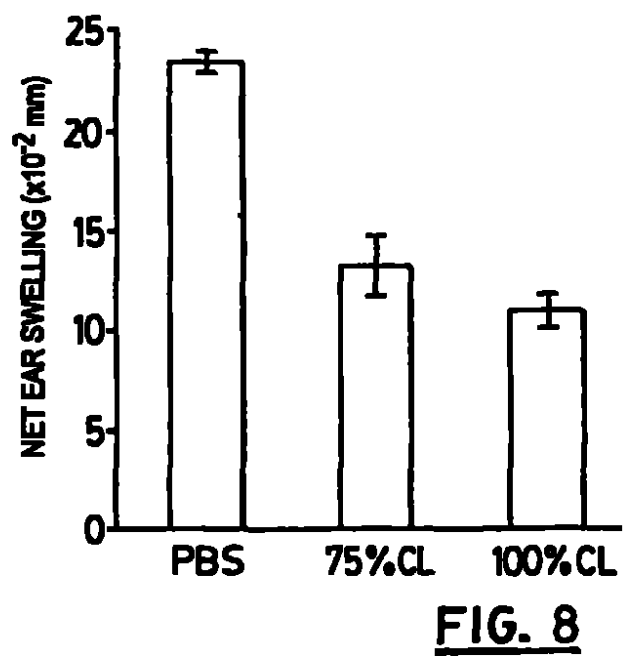
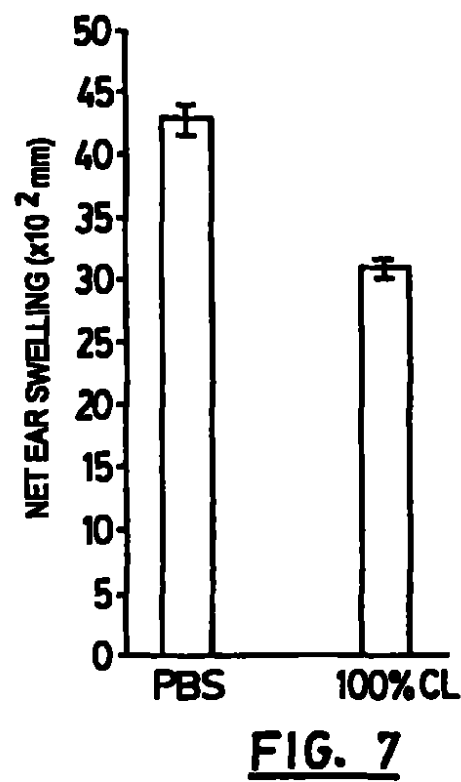
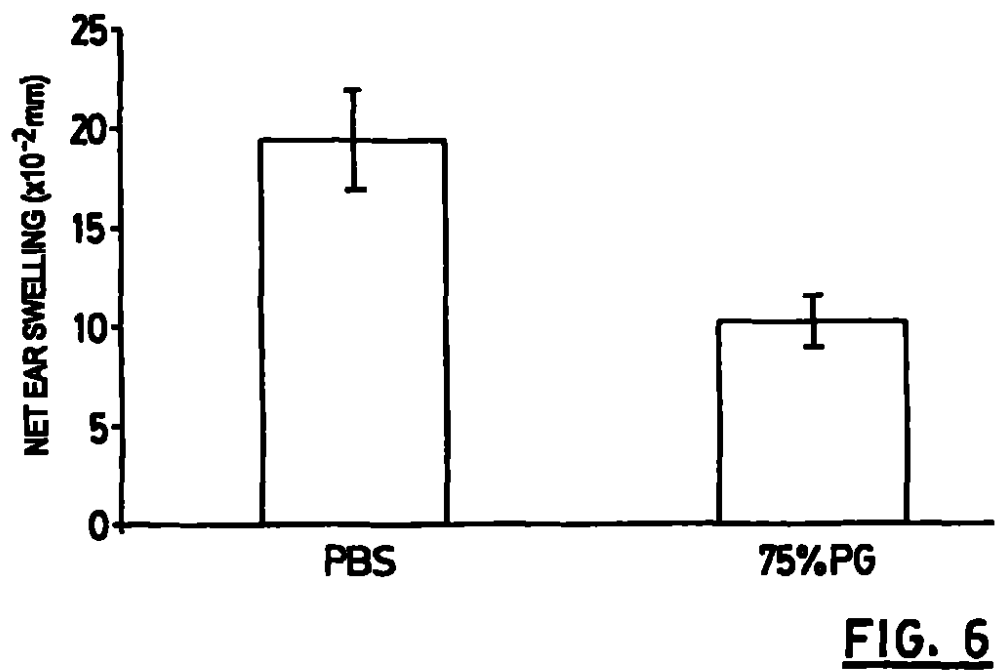


FIG 3

4/12

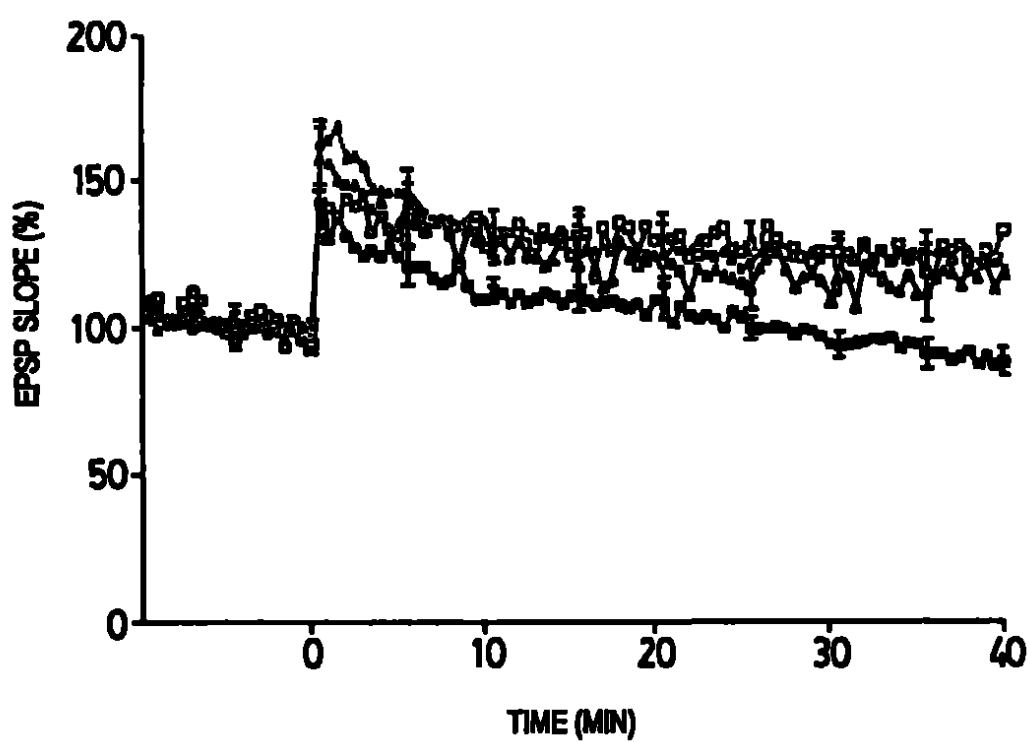
FIG 4FIG 5

5/12



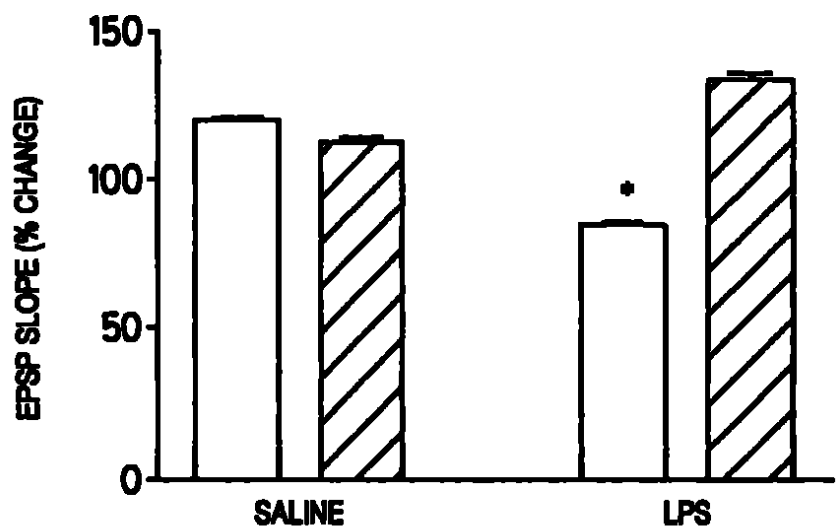
6/12

LTP (EPSP SLOPE) IN PERFORANT PATH-GRANULE CELL SYNAPSES -
EFFECT OF PG

FIG. 9

7/12

LTP (EPSP SLOPE) IN PERFORANT PATH-GRANULE CELL SYNAPSES -
40-45 MIN POST HFS



DATA EXPRESSED AS MEANS WITH STANDARD
ERRORS *p<0.01 STUDENT'S T TEST

FIG. 10

8/12

IL-4 CONCENTRATION IN HIPPOCAMPUS

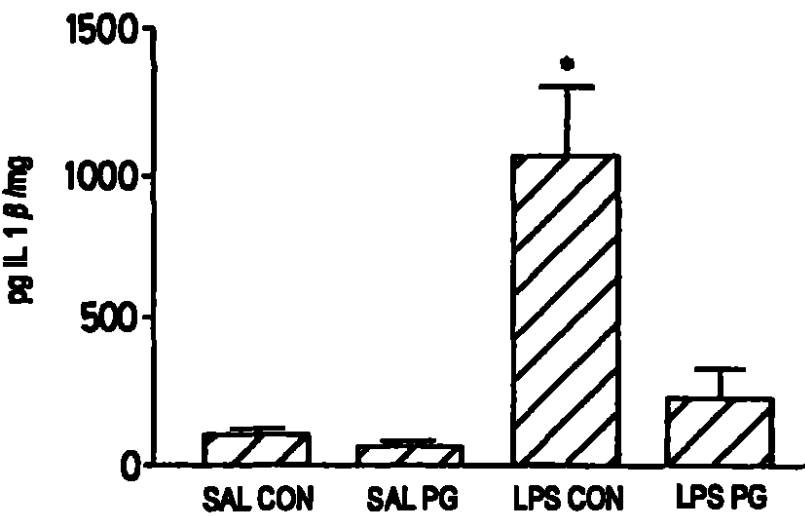


DATA EXPRESSED AS MEANS WITH STANDARD
ERRORS *p<0.05 STUDENT'S T TEST

FIG. 11

9/12

IL 1 β CONCENTRATION IN SINGLE CELL SUSPENSION



VALUES ARE EXPRESSED AS THE MEAN WITH STANDARD
ERROR * $p < 0.05$ STUDENT'S T TEST

FIG. 12

10/12

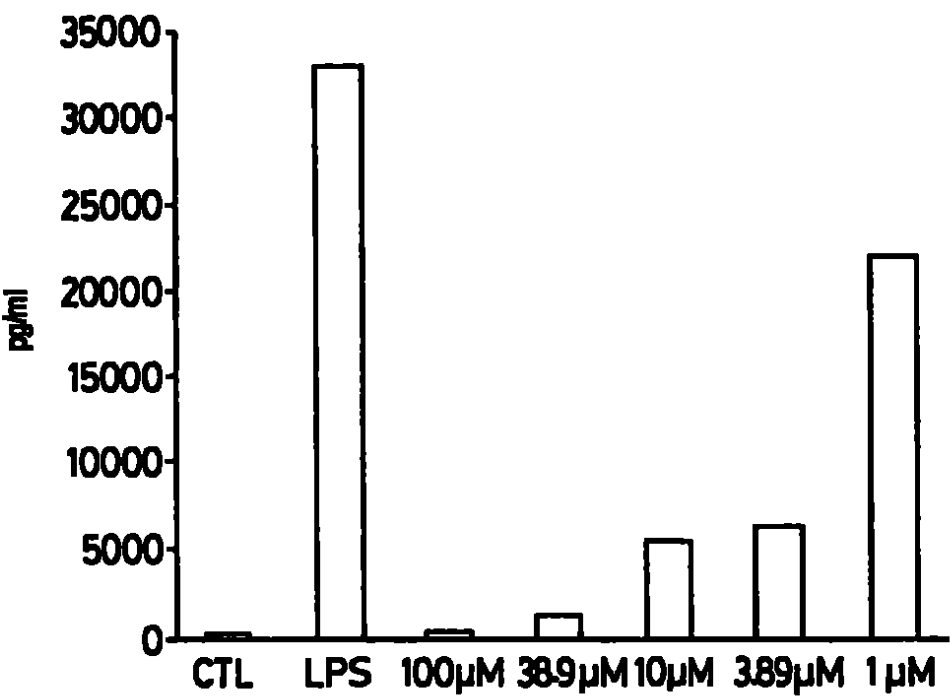


FIG. 13

11/12

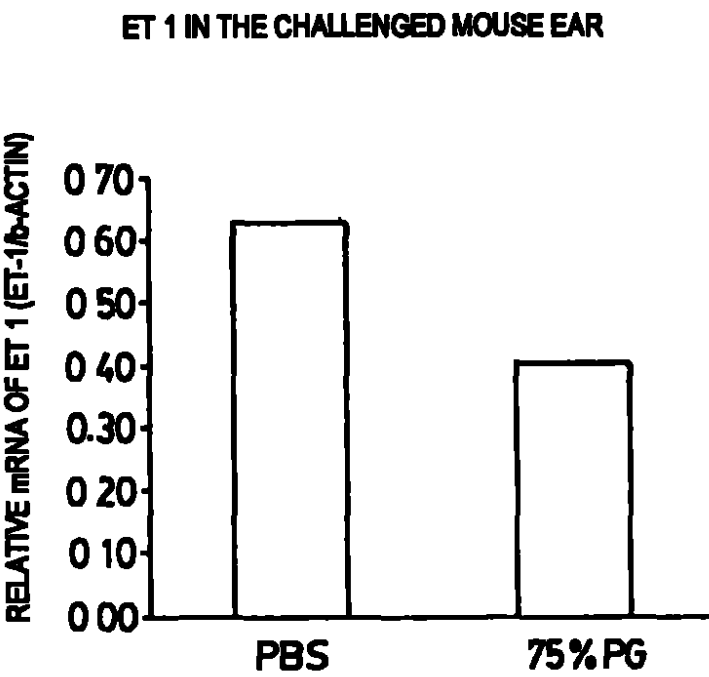


FIG. 14

12/12

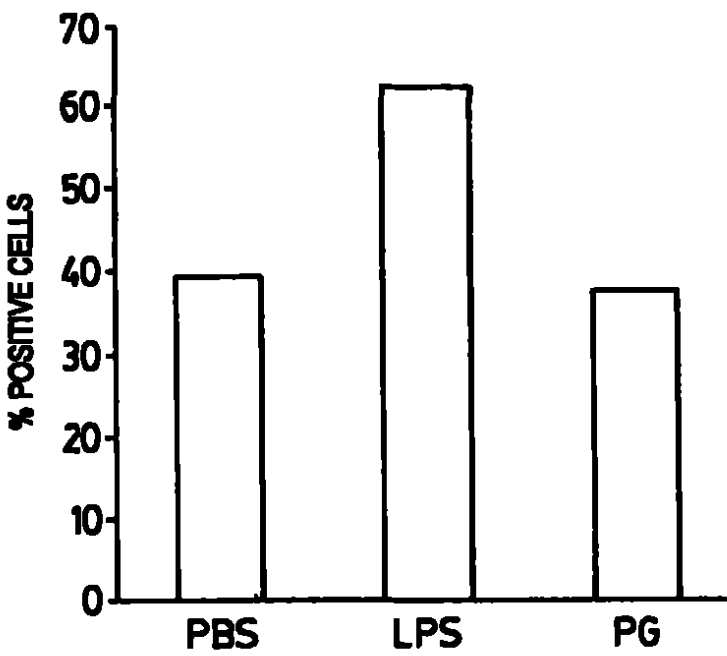


FIG. 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/CA 03/00065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/683 A61K9/127

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, WPI Data PAJ ENBASE, MEDLINE BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 90 11781 A (ALCON LAB INC) 18 October 1990 (1990-10-18) page 5, paragraph 4 page 7, paragraph 1 examples 2,3	1-51
X	WO 95 23592 A (UNIV BRITISH COLUMBIA) 8 September 1995 (1995-09-08) page 6, line 5-25 page 11, line 21-29 page 12 line 3-6 claims 1,4-6	1-9, 25-33, 44-51
X	US 5 262 405 A (GIROD-VAQUEZ SOPHIE ET AL) 16 November 1993 (1993-11-16) column 5, line 2-16, claims 1,3 -/--	1-9, 44-51

☒ 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.
- & document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 April 2003

Date of mailing of the international search report

19/05/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Vermeulen S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/CA 03/00065

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAMMEL MICHAL ET AL "Mechanism of the interaction of beta2-glycoprotein I with negatively charged phospholipid membranes 27 November 2001 (2001-11-27) , BIOCHEMISTRY, VOL 40, NR 47, PAGE(S) 14173-14181 XP002237429 ISSN 0006-2960 page 14173, paragraph 1 abstract -----	1-51

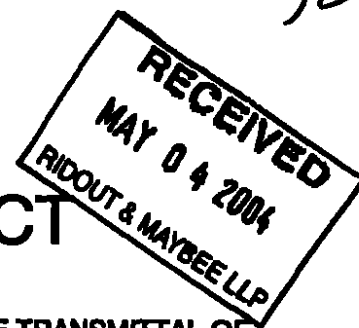
INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/CA 03/00065

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9011781	A	18-10-1990	AU 633078 B2	21-01-1993
			AU 5429790 A	05-11-1990
			CA 2013770 A1	04-10-1990
			EP 0465588 A1	15-01-1992
			JP 4505319 T	17-09-1992
			WO 9011781 A1	18-10-1990
			ZA 9002593 A	30-01-1991
WO 9523592	A	08-09-1995	AU 1751795 A	18-09-1995
			WO 9523592 A1	08-09-1995
			US 6312719 B1	06-11-2001
			US 2002110587 A1	15-08-2002
			US 2002110588 A1	15-08-2002
US 5262405	A	16-11-1993	FR 2658418 A1	23-08-1991
			AT 129155 T	15-11-1995
			CA 2036629 A1	21-08-1991
			DE 69113848 D1	23-11-1995
			DE 69113848 T2	25-04-1996
			DK 450991 T3	04-03-1996
			EP 0450991 A2	09-10-1991
			JP 4211014 A	03-08-1992

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY



PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

To

Hiron Robert G
RIDOUT & MAYBEE LLP
One Queen Street East, Suite 2400
Toronto Ontario M5C 3B1
CANADA

Date of mailing
(day/month/year)

30 04 2004

Applicant's or agent's file reference
28312-0177

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/CA 03/00065

International filing date (day/month/year)
21 01.2003

Priority date (day/month/year)
21 01.2002

Applicant
VASOGEN IRELAND LIMITED et al

- 1 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
- 2 A copy of the report and its annexes if any is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices
- 3 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

4 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

The applicant's attention is drawn to Article 33(5) which provides that the criteria of novelty inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether in that State the claimed inventions is patentable or not (see also Article 27(5)) Such additional criteria may relate for example to exemptions from patentability requirements for enabling disclosure clarity and support for the claims

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel +49 89 2399 0 Tlx 523856 epmu d
Fax +49 89 2399 4485

Authorized Officer

Ruz Fernandez, J
Tel. +49 89 2399-7980



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (PCT Article 36 and Rule 70)

71

Applicant's or agent's file reference 29312-0177	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEAA/16)	
International application No. PCT/CA 03/00065	International filing date (day/month/year) 21 01 2003	Priority date (day/month/year) 21 01 2002
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC A61K31/883		
Applicant VASOGEN IRELAND LIMITED et al		

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 607 of the Administrative Instructions under the PCT) These annexes consist of a total of 6 sheets.
3. This report contains indications relating to the following items. I ☒ Basis of the opinion 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 Rule 66 2(a)(i) 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 19 08 2003	Date of completion of this report 30 04 2004
Name and mailing address of the international preliminary examining authority  European Patent Office D-80298 Munich Tel +49 89 2399 0 Tlx 523656 epmu d Fax +49 89 2399 4485	Authorized Officer Vermeulen S Telephone No +49 89 2399-7520 

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No PCT/CA 03/00085

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

1-43 as originally filed

Claims, Numbers

1-41 filed with telefax on 08.04.2004

Drawings, Figures

1 15 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
- ☐ the drawings sheets

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No **PCT/CA 03/00065**

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(c))

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

see separate sheet

6. Additional observations if necessary

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 24 28-41
	No.	Claims	25
Inventive step (IS)	Yes	Claims	1 24,28-41
	No	Claims	25
Industrial applicability (IA)	Yes	Claims	1 41
	No	Claims	none

2 Citations and explanations

see separate sheet

34

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No PCT/CA03/00065

Re Item I

Basic of the report

The amended claim 41 filed with the telefax dated 08/04/2004 introduces subject-matter which extends beyond the content of the application as filed, contrary to Article 34(2)(b) PCT

According to the application as originally filed (cf page 14) the total amount of phosphatidyl glycerol in the mixture (of liposomes) should be at least 10%. There is however no support in the original application for the amount of PG liposomes to be 10%, since the claimed PG liposomes are not composed of 100% PG

Re Item V

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

- 1 Reference is made to the following documents
D1 WO 90 11781
D2 WO 95 23592
D3 US 5 282 405
- 2 The present application is based on the observation that pharmaceutically acceptable bodies having a size of 20 nm to 500µm which comprise phosphate-glycerol (PG) groups e.g. liposomes comprising phosphatidylglycerol, will upon administration to a mammal cause an anti-inflammatory effect. Accordingly, it was an object of the present application to provide a composition comprising phosphate-glycerol groups capable of producing an anti-inflammatory response in vivo and suitable for use in the treatment of a number of diseases. Said anti-inflammatory effect is achieved at very low dose amounts of the PG bearing bodies such as defined in claim 1. Claims 10 and 30 are related to the medical use of the bodies and claim 33 defines a phosphatidylglycerol liposome composition.
- 3 The subject matter of independent claims 1, 10, 30 and 33 is considered to be novel (Art 33(2) PCT) and to involve an inventive step (Art. 33(3) PCT) over the state of art disclosed in D1 D3.

- 3 1 D1 (cf page 5 paragraph page 7 paragraph 1) discloses a liposome composition comprising phosphatidylglycerol and phosphatidylcholine the liposomes having a diameter from 20-200 nm The liposome composition is used for topical delivery of therapeutic agents to wounds, cuts and abrasions, especially on the cornea or ocular surface of the eye The dosage amount of liposomes used (cf D1 example 1 and 2) is much higher than the dosage defined in claim 1 and the amount of phosphatidylglycerol comprised in the liposomes (up to 30%) is lower than the amounts defined in claim 33 (50-90%)
- 3 2 D2 (page 6, lines 5-25 page 11, lines 21 29 , page 12, lines 3-6 , example 1 claims 1,4,5 6) discloses drug free liposomes having a size of 100-150 nm and comprising cholesterol, phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol The liposomes are used in the treatment of atherosclerosis D2 does not give any indication on the amount of phosphatidylglycerol to be included in the liposomes Furthermore the used liposome dose amount is much higher (cf page 15) than the dosage disclosed in claim 1 because the mechanism of action is different.
- 3 3 D3 (column 4 line 54 column 5 line 16 claims 1 3) discloses a method of improving bronchial mucus transport by inhalation or instillation of liposomes composed of phosphatidylcholine phosphatidylglycerol and/or phosphatidic acid The mechanism of action in D3 is different and the document does not give any indication concerning the dosage of liposomes to be used neither the amount of phosphatidylglycerol to be included in the liposomes
- 3.4 None of the prior art documents D1, D2 and D3 discloses the medical use defined in the present claims 10 and 30 D2 indeed discloses the treatment of atherosclerosis with liposomes comprising phosphatidylglycerol but the mechanism of action is different and based on phospholipid induced cholesterol mobilization Hence the suggested dose amount is much higher than the one defined in claim 30 On reading D2 the man skilled in the art would accordingly not be intended to use the very low dose amount defined in claim 30 for the manufacture of a medicament suitable in the treatment of atherosclerosis
- 4 Claims 2 9, 11-24, 26 29, 31, 32, 34-41 are dependent on claims 1 10 30 or 33 and as such also meet the requirements of the PCT with respect to novelty and inventive step
- 5 The subject-matter of independent claim 25 is not considered novel and inventive in view

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No PCT/CA03/00065

- ~ of the state of the art disclosed in document D2 Said document discloses the use of drug-free liposomes of size from 100-150 nm and comprising phosphatidylglycerol in the treatment of atherosclerosis which is an endothelial dysfunction disorder

77

SUBSTITUTE CLAIMS

- 1 A pharmaceutical composition, in unit dosage form, for administration to a mammalian patient, comprising pharmaceutically acceptable bodies and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein at least a portion of the bodies has a size in the range of from about 20 nm to 500 μ m, and wherein the surfaces of said bodies comprise phosphate-glycerol groups or groups convertible to phosphate-glycerol groups, said unit dosage comprising from about 500 to about 2.5×10^9 bodies
2. The pharmaceutical composition of claim 1 wherein the bodies are liposomes
- 3 The pharmaceutical composition of claim 1 or claim 2 wherein the composition is essentially free of non-lipid pharmaceutically active entities.
- 4 The pharmaceutical composition of claim 3 wherein the composition is free of the nonlipid pharmaceutically active entities
- 5 The pharmaceutical composition of any of claims 2-4 wherein the liposomes comprise from about 60 to 100% of phosphatidylglycerol the phosphate-glycerol head groups thereof being presented on the exterior surfaces of the liposomes
- 6 The pharmaceutical composition of claim 5 wherein the liposomes comprise from 70-90 percent phosphatidylglycerol
- 7 The pharmaceutical composition of claim 5 or claim 6 wherein any remainder of the liposome is phosphatidylcholine

AMENDED SHEET

14 Use as claimed in any of claims 10 -13, of a composition as defined therein, wherein the bodies are liposomes.

15 Use as claimed in claim 14 of a composition as defined therein wherein the liposomes are constituted by 50%-100% by weight of phosphatidylglycerol

16. Use as claimed in claim 14 or claim 15, of a composition as defined therein wherein the liposomes are constituted by 65%-90% by weight of phosphatidylglycerol

17 Use as claimed in any of claims 12-16 of a composition as defined therein wherein the liposomes have a diameter of from about 20 nm to about 1000 nm

18 Use as claimed in any of claims 10-17, of a unit dosage form of said composition comprising from about 500 to about 2.5×10^8 bodies

19 Use as claimed in claim 18 of a unit dosage form of said composition comprising from about 10,000 to about 50 million bodies

20 Use as claimed in any of claims 10 -19, wherein the disorder is a T-cell function mediated disorder selected from ulcers and autoimmune disorders.

21 Use as claimed in claim 20, wherein the disorder is an autoimmune disorder selected from scleroderma, psoriasis and rheumatoid arthritis

22. Use as claimed in any of claims 10-19, wherein the disorder is an inflammatory allergic reaction

AMENDED SHEET

80

23. Use as claimed in claim 22 wherein the disorder is contact hypersensitivity

24 Use as claimed in claim 23 wherein the disorder is delayed hypersensitivity

25 Use of a composition comprising pharmaceutically acceptable biocompatible bodies of size from about 20 nm to about 500 micrometers, and having active groups on the bodies consisting essentially of phosphate-glycerol groups or groups convertible to phosphate-glycerol groups said composition being essentially free of pharmaceutically active, non-lipid entities, in the manufacture of a medicament for the treatment or prophylaxis of an endothelial dysfunction disorder selected from peripheral arterial occlusive disease, congestive heart failure, ventricular arrhythmia, sudden cardiac death, stroke, myocardial infarction, angina hypertension, vasoospastic disorder, ischemic injury and ischemia reperfusion injury

26 Use as claimed in any of claims 10-19, for the manufacture of a medicament for the treatment or prophylaxis of a disorder involving inappropriate cytokine expression.

27 Use as claimed in claim 26, wherein the disorder is a neurodegenerative disease

28 Use as claimed in claim 27, wherein the neurodegenerative disease is selected from Down's syndrome, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, senile dementia depression Huntington's disease, peripheral neuropathies, Guillaine Barr syndrome, spinal cord

AMENDED SHEET

24

diseases, neuropathic joint diseases chronic inflammatory demyelinating disease, mononeuropathy, polyneuropathy symmetrical distal sensory neuropathy, neuromuscular junction disorders, myasthenias and amyotrophic lateral sclerosis [ALS].

29. Use as claimed in claim 28, wherein the neurodegenerative disease is Alzheimer's disease, Parkinson's disease or ALS

30 Use of a unit dosage of a composition comprising pharmaceutically acceptable biocompatible bodies of size from about 20 nm to about 500

micrometers, in an amount of from about 500 to about 2.5×10^8 bodies; said bodies having active groups on the surface thereof comprising phosphate- glycerol groups or groups convertible to phosphate-glycerol groups, said composition being essentially free of pharmaceutically active non-lipid entities in the manufacture of a medicament for the treatment or prophylaxis of atherosclerosis

31 Use as claimed in claim 30 wherein the bodies are phosphatidylglycerol-containing liposomes.

32. Use as claimed in claim 31 wherein the liposomes are composed of from 50 -90% of phosphatidylglycerol

33 A composition of matter capable of producing an anti-inflammatory response *in vivo* in a mammal, said composition comprising pharmaceutically acceptable liposomes of size from about 20 nm to about 500 micrometers, the liposomes comprising from 50-90 percent by weight of phosphatidylglycerol with the phosphate-glycerol active groups thereof presented exteriorly, the liposomes being essentially free of nonlipid pharmaceutically active entities

AMENDED SHEET

82

34 The composition according to claim 33, wherein the liposomes comprise at least 60 weight percent phosphatidylglycerol

35 The composition according to claim 34, wherein the liposomes comprise for about 70-90 percent of phosphatidylglycerol

36 The composition according to any of claims 33-35, wherein the remainder of the liposome comprises an inactive co-constituent

37 The composition according to claim 36 wherein the inactive co-constituent is phosphatidylcholine

38. The composition according to any of claims 33-37, wherein said composition is free of nonlipid pharmaceutically active entities.

39 The composition according to any of the preceding claims, wherein the liposomes have a size of from about 50-500 nanometers

40 The composition according to claim 39 wherein the liposomes have a size from about 80-200 nanometers

41 The composition according to any of claims 33-40 comprising a mixture of said phosphatidylglycerol containing liposomes with inactive liposomes and/or liposomes of phospholipids acting through a different mechanism, the PG liposomes constituting at least 10% of the total mixture.

1
AMENDED SHEET

REVINDICACIONES

- 1 Una composición farmacéutica en forma de unidad de dosificación para la administración a un paciente mamífero que comprende cuerpos de inclusión farmacéuticamente aceptable y un cargador farmacéuticamente aceptable donde al menos una porción de los cuerpos tienen un tamaño ubicado dentro del rango comprendido entre 20 nanómetros (nm) y 500 micrómetros (μm) aproximadamente y donde la superficie de dichos cuerpos comprende grupos glicerol-fosfato o grupos que se pueden convertir a su vez en grupos glicerol-fosfato dicha unidad de dosificación comprende entre 500 y 2.5×10^9 cuerpos
- 2 La composición farmacéutica acorde con la reivindicación 1 donde los cuerpos de inclusión son liposomas
- 3 La composición farmacéutica acorde con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 donde dicha composición farmacéutica se encuentra esencialmente libre de entidades no lipídicas farmacéuticamente activas
- 4 La composición farmacéutica acorde con la reivindicación 3 donde dicha composición farmacéutica está libre de entidades no lipídicas farmacéuticamente activas

- 5 La composición farmacéutica acorde con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 donde los liposomas comprenden entre 60 y 100% aproximadamente de fosfatidilglicerol (PG) cuyas cabezas de grupos glicerol-fosfato están presentadas sobre la superficie exterior del liposoma
- 6 La composición farmacéutica acorde con la reivindicación 5 donde los liposomas comprenden entre un 70% - 90% aproximadamente de fosfatidilglicerol
- 7 La composición farmacéutica acorde con la reivindicación 5 ó 6 CARACTERIZADA PORQUE el resto del liposoma comprende fosfatidilcolina
- 8 La composición farmacéutica acorde con la reivindicación 1 donde dichos cuerpos comprenden grupos de superficie que se unen específicamente a los receptores de las células del sistema inmune mamífero específicos para la unión de grupos glicerol-fosfato
- 9 La composición farmacéutica acorde con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la unidad de dosis comprende de aproximadamente 10 000 a aproximadamente 50 000 000 de cuerpos

- 10** **Uso de una composición que comprenden cuerpos biocompatibles farmacéuticamente aceptables que tienen un tamaño en el rango de aproximadamente 20nm a 500 micrometros y que sobre su superficie tienen expresados o expresables una pluralidad de grupos activos glicerol-fosfato activos estando dicha composición libre de entidades no lipídicas farmacéuticamente activas, en la producción de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un desorden seleccionado entre un trastorno mediado por el funcionamiento de células T un trastorno inflamatorio y un trastorno inmune caracterizado por expresión inadecuada de citoquina**
- 11** **Uso de acuerdo con la reivindicación 10 de la composición aquí definida donde los grupos glicerol fosfato se encuentran expresados sobre la superficie de los cuerpos**
- 12** **Uso de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11 de la composición aquí definida donde los grupos glicerol fosfato activos constituyen entre 60 y 100% de los grupos activos sobre los cuerpos**
- 13** **Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 de la composición aquí definida donde los grupos glicerol fosfato son grupos cabeza de ligandos PG**

- 14 **Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 de la composición aquí definida donde los cuerpos son liposomas**
- 15 **Uso de acuerdo con la reivindicación 14 de la composición aquí definida, donde los liposomas están constituidos entre 50 y 100% de su peso por fosfatidilglicerol (PG)**
- 16 **Uso de acuerdo con la reivindicación 14 o la reivindicación 15 de la composición aquí definida donde los liposomas están constituidos entre 65 y 90% de su peso por fosfatidilglicerol (PG)**
- 17 **Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 de la composición aquí definida donde los liposomas tienen un diámetro entre aproximadamente 20nm a aproximadamente 1000nm**
- 18 **Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17 de una forma de unidad de dosificación de dicha composición que comprende entre aproximadamente 500 y aproximadamente 2.5×10^9 cuerpos**
- 19 **Uso de acuerdo con la reivindicación 18 de una forma de unidad de dosificación de dicha composición que comprende entre aproximadamente 10 000 y aproximadamente 50 millones de cuerpos**

- 20 **Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19
CARACTERIZADO PORQUE el desorden es un trastorno mediado por
el funcionamiento de células T, seleccionado entre úlceras y desórdenes
autoinmunes**
- 21 **Uso de acuerdo con la reivindicación 20 donde el desorden es un
trastorno autoinmune seleccionado entre escleroderma, psoriasis y
artritis reumatoidea**
- 22 **Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19 donde el
desorden es una reacción alérgica e inflamatoria**
- 23 **Uso de acuerdo con la reivindicación 22 donde el desorden es una
hipersensibilidad por contacto**
- 24 **Uso de acuerdo con la reivindicación 23 donde el desorden es una
hipersensibilidad retardada**
- 25 **Uso de una composición que comprende cuerpos biocompatibles
farmacéuticamente aceptables que tienen un tamaño en el rango de
aproximadamente 20nm a 500 micrometros y que tienen grupos activos
sobre los cuerpos que consistan esencialmente en grupos glicerol-
fosfato activos o grupos que se pueden convertir a su vez en grupos**

glicerol-fosfato estando dicha composición libre de entidades no lipídicas farmacéuticamente activas en la producción de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un trastorno por disfunción endotelial seleccionado a partir de enfermedad oclusiva arterial periférica insuficiencia cardíaca congestiva arritmia ventricular muerte súbita por una enfermedad cardíaca derrame infarto del miocardio angina hipertensión desorden vasoplasticos lesión isquémica lesión por reperfusión isquémica

- 26 Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 19 para la producción de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un desorden que involucra la expresión inadecuada de citoquina

- 27 Uso de acuerdo con la reivindicación 26 donde el desorden es una enfermedad neuro-degenerativa

- 28 Uso de acuerdo con la reivindicación 27, donde la enfermedad neuro-degenerativa es seleccionada a partir de síndrome de Down, mal de Alzheimer mal de Parkinson demencia senil depresión, enfermedad de Huntington neuropatías periféricas síndrome de Guillain Barr enfermedades de la médula espinal enfermedades neuropáticas de las articulaciones enfermedad desmielinizante inflamatoria crónica neuropatías incluyendo mononeuropatía, polineuropatía neuropatía

sensorial simétrica distal trastornos de la unión neuromuscular miastenias y esclerosis amiotrófica lateral (ALS)

- 29 Uso de acuerdo con la reivindicación 28 donde la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Alzheimer mal de Parkinson o esclerosis amiotrófica lateral (ALS)
- 30 Uso de una forma de unidad de dosificación de una composición que comprende cuerpos biocompatibles de un tamaño entre aproximadamente 20nm u aproximadamente 500 en una cantidad entre aproximadamente 500 y aproximadamente 2.5×10^9 cuerpos, dichos cuerpos tienen grupos activos sobre su superficie, que comprenden grupos glicerol-fosfato activos o grupos que se pueden convertir a su vez en grupos glicerol-fosfato estando dicha composición libre de entidades no lipídicas farmacéuticamente activas en la producción de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de arteriosclerosis
- 31 Uso de acuerdo con la reivindicación 30 donde los cuerpos son liposomas que contienen fosfatidilglicerol
- 32 Uso de acuerdo con la reivindicación 31, donde los liposomas están compuestos de entre 50 y 90% de fosfatidilglicerol (PG)

- 33** Una composición de una sustancia capaz de producir una respuesta anti-Inflamatoria in vivo en un mamífero donde dicha composición comprende liposomas farmacéuticamente aceptables que tienen un tamaño en el rango entre 20 nm y 500 micrometros los liposomas comprenden de 50 a 90% en peso de fosfatidilglicerol con grupos fosfato glicerol activos presentados exteriormente los liposomas estando esencialmente libres de entidades no lipídicas farmacéuticamente activas
- 34** La composición de la reivindicación 33 donde los liposomas comprenden al menos 60% en peso de fosfatidilglicerol
- 35** La composición de la reivindicación 34 donde los liposomas comprenden al menos entre 70 y 90% en peso de fosfatidilglicerol
- 36** La composición de acuerdo con las reivindicaciones 33 a 35 donde el resto del liposoma comprende un co-constituyente inactivo
- 37** La composición de la reivindicación 36 donde el constituyente inactivo es fosfatidilcolina

- 38** La composición de acuerdo con las reivindicaciones 33 a 37 donde la composición está libre de entidades no lipídicas farmacéuticamente activa
- 39** La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde los liposomas tienen un tamaño en el rango entre 50 nm y 500 nm
- 40** La composición de acuerdo con las reivindicación 39 donde los liposomas tienen un tamaño en el rango entre 80 nm y 20 nm
- 41** La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 33 a 40 que comprende una mezcla de liposomas que contiene fosfatidilglicerol con liposomas inactivos y/o liposomas de fosfolípidos activos a través de diferentes mecanismos, los liposomas PG constituyen al menos 10% del total de la mezcla

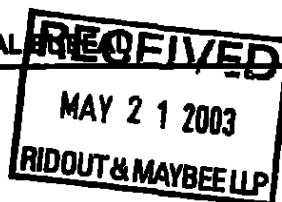
PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU OF PATENT COOPERATION

To:

HIRONS Robert, G
Ridout & Maybee LLP
One Queen Street East
Suite 2400
Toronto Ontario M5C 3B1
Canada

Date of mailing (day/month/year) 06 May 2003 (06 05 03)	
Applicant's or agent's file reference 29312-0177	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/CA03/00065	International filing date (day/month/year) 21 January 2003 (21 01 03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 21 January 2002 (21 01 02)
Applicant VASOGEN IRELAND LIMITED et al	

- 1 The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR" in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17 1(a) or (b).
- 2 This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- 3 An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17 1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17 1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity upon entry into the national phase to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- 4 The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau as provided by Rule 17 1(a) or (b) respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17 1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity upon entry into the national phase to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
21 Janu 2002 (21 01 02)	2,368,856 -	CA	10 Febr 2003 (10 02 03)
22 Janu 2002 (22 01 02)	10/051,381	US	01 May 2003 (01 05 03)
28 Janu 2002 (28 01 02)	60/351,427 -	US	01 May 2003 (01 05 03)
18 Marc 2002 (18 03 02)	60/364,620 -	US	01 May 2003 (01 05 03)
15 April 2002 (15 04 02)	60/372,108 -	US	01 May 2003 (01 05 03)
02 Augu 2002 (02 08 02)	60/400,857 -	US	01 May 2003 (01 05 03)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.88.96	Authorized officer Léonard MULLER (Fax 338-8995) Telephone No. (41-22) 338 8817
--	---

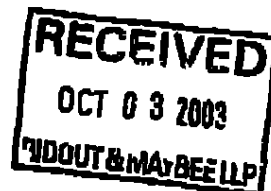
PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

Corrected Version / Version Corrigée
PCTNOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47 1(c) first sentence)

To:

HIRONS Robert, G.
Ridout & Maybee LLP
One Queen Street East
Suite 2400
Toronto, Ontario M5C 3B1
CANADA

Date of mailing (day/month/year) 31 July 2003 (31.07.03)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 29312-0177			
International application No. PCT/CA03/00085	International filing date (day/month/year) 21 January 2003 (21.01.03)	Priority date (day/month/year) 21 January 2002 (21.01.02)	
Applicant VASOGEN IRELAND LIMITED			

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:

AZ, BY, CH, CO, DE, DZ, GH, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, RU, TM, US

In accordance with Rule 47 1(c), third sentence, these 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, BA, BB, BG, BR, BZ, CA, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EA, EG, EE, EP, ES, FI, GB, GD, GE, GM, GR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

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

3. Enclosed with this notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 31 July 2003 (31.07.03) under No. 03/061687.

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, 19933 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 (30, 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 IA, 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



PATENT COOPERATION TREATY

PCT/CA03/00085

96/94

From the INTERNATIONAL BUREAU

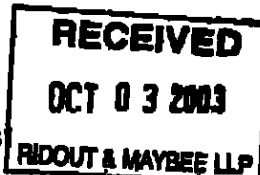
PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

To:

HIRONS Robert, G
Ridout & Maybee LLP
One Queen Street East
Suite 2400
Toronto Ontario M5C 3B
Canada



Date of mailing (day/month/year) 25 September 2003 (25.09.03)		IMPORTANT INFORMATION	
Applicant's or agent's file reference 28312-0177			
International application No. PCT/CA03/00085	International filing date (day/month/year) 21 January 2003 (21.01.03)	Priority date (day/month/year) 21 January 2002 (21.01.02)	
Applicant VASOGEN IRELAND LIMITED et al			

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP AT BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES FI,FR,GB,GR,HU IE,IT LU MC,NL,PT,SE,SI
SK,TR
National BG,CA,CN DE GB IL,JP KP,KR,MN,NO,PL,RO RU,SK,US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election, the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

AP GH GM,KE LS MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW
EA AM,AZ,BY,KG KZ,MD,RU,TJ,TM
OA BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN TD TG
National AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB BR,BY,BZ,CH,CO,CR,CU,CZ,DK,DM,DZ,EC,
EE,ES,FI,GD GE,GH GM HR,HU ID,IN,IS,KE,KG KZ,LG,LK,LR,LS LT,LU,LV MA,MD,
MG,MK,MW,MX,MZ,NZ,OM,PH,PT,SC,SD,SE,SG,SL,TJ TM TN TR TT,TZ,UA,UG,UZ,VC,
VN YU,ZA,ZM,ZW

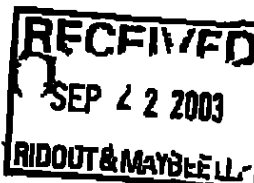
3. The applicant is reminded that he must enter the national phase before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 38(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 38(2)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purpose of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer MIKI KOBAYASHI (Fax 338-8995)
Facsimile No. (41-22) 338.38.86	Telephone No. (41-22) 338 8401

PATENT COOPERATION TREATY



PCT

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Hixons, Robert G
RIDOUT & MAYBEE LLP
One Queen Street East, Suite 2400
Toronto, Ontario M5C 3B1
CANADA

NOTIFICATION OF RECEIPT
OF DEMAND BY COMPETENT INTERNATIONAL
PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY(PCT Rules 59.3(a) and 61.1(b), first sentence
and Administrative Instructions, Section 601(a))Date of mailing
(day/month/year)

18-08-2003

Applicant's or agent's file reference

29312-0177

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/CA 03/ 00063

International filing date (day/month/year)

21/01/2003

Priority date (day/month/year)

21/01/2002

Applicant:

VASOGEN IRELAND LIMITED et al

- 1 The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority considers the following date as the date of receipt of the demand for international preliminary examination of the international application:

19/08/2003

- 2 This date of receipt is

- ☐ the actual date of receipt of the demand by this Authority (Rule 61.1(b)).
☒ the actual date of receipt of the demand on behalf of this Authority (Rule 59.3(c)).
☐ the date on which this Authority has, in response to the invitation to correct defects in the demand (Form PCT/IPBA/404), received the required corrections.

- 3 ☐ ATTENTION: That date of receipt is AFTER the expiration of 19 months from the priority date. Consequently, the election(s) made in the demand does (do) not have the effect of postponing the entry into the national phase until 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)). Therefore, the acts for entry into the national phase must be performed within 20 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 22). For details, see the PCT Applicant's Guide, Volume II

- ☐ (If applicable) This notification confirms the information given by telephone, facsimile transmission or in person on:

- 4 Only where paragraph 3 applies, a copy of this notification has been sent to the International Bureau.

Name and mailing address of the IPRA/

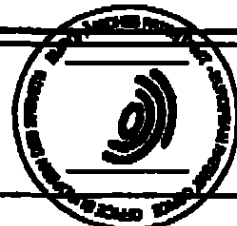


European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523636 opmn d
Fax: (+49-89) 2399-4463

Authorized officer

HOUEY R G J

Tel. (+49-89) 2399-7204



CUERPOS DE INCLUSIÓN QUE TRANSPORTAN GLICEROL FOSFAT
ACEPTABLES PARA USO FARMACÉUTICO

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

Esta invención se relaciona con composiciones sintéticas y semi-sintéticas tridimensionales que presentan actividad biológica y con usos de las mismas en el tratamiento y/o la profilaxis de diversos trastornos en pacientes mamíferos. Más particularmente se relaciona con preparaciones y usos de cuerpos de inclusión sintéticos y semi-sintéticos que después de su introducción en el cuerpo de un paciente produce efectos benéficos anti-inflamatorios, protectores de órganos e inmunoreguladores. La invención también se relaciona con tratamientos y composiciones para aliviar enfermedades inflamatorias y autoinmunes y los síntomas de las mismas.

Antecedentes de la invención

Las células presentadoras de antígenos (APC) profesionales inclusive células dendríticas (DC) y macrófagos (Mph) capturan y procesan de forma activa los antígenos (Ags), eliminan los desechos celulares y los organismos infecciosos y las células moribundas incluyendo los residuos de las células moribundas. Durante este proceso las APC pueden estimular la producción de respuestas dominadas ya sea por citoquinas pro inflamatorias Th1 inflamatorias (IL-12, IL-1, INF- γ , TNF- α , etc) o por citoquinas Th2/Th3 reguladoras (tal como IL-10, TGF β , IL-4, etc) dependiendo de la naturaleza del antígeno (Ag) o del material fagocitado y del nivel de maduración/activación de las APC.

Las APC eliminan los desechos celulares algunos de los cuales derivan

de las membranas de las células del cuerpo algunos de infecciones bacterianas y parasitarias y de organismos comensales tal como las bacterias intestinales. En tanto parte de estos desechos celulares iniciarán una respuesta pro-inflamatoria, parte iniciará una respuesta protectora y anti inflamatoria.

Un sistema inmunológico que funciona normalmente puede distinguir entre los antígenos de organismos invasores extraños (no propios) y tejidos o desechos derivados de material propio, montando una respuesta inmune solamente por aquellos antígenos que son extraños. Cuando el sistema inmunológico de un paciente no puede discriminar entre materiales propios y no propios, surgen los trastornos autoinmunes.

Resumen de la invención

Esta invención está dirigida al descubrimiento que los cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico tal como liposomas, perlas o partículas similares que comprenden grupos glicerol-fosfato, causarán después de su administración a un paciente mamífero un efecto anti-inflamatorio y por ello se pueden usar en el tratamiento de numerosas enfermedades. Estos cuerpos de inclusión pueden comprender además como componente menor un constituyente inactivo y/o un constituyente que sea activo pero a través de un mecanismo diferente.

En una realización preferida, la invención está dirigida a una composición de un material capaz de producir una respuesta anti-inflamatoria *in vivo* en un mamífero, donde dicha composición comprende cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico de un tamaño que comprende entre 20 nanómetros (nm) y 500 micrómetros (μm) aproximadamente, que comprende una pluralidad de grupos glicerol-fosfato o grupos que se puedan

convertir a su vez en dichos grupos. Preferentemente los cuerpos de inclusión están esencialmente libres de entidades no lipídicas farmacéuticamente activas. Preferentemente los grupos de glicerol-fosfato constituyen un 60% - 100% de los grupos activos sobre los cuerpos de inclusión. Después de su administración a un mamífero se considera que los cuerpos de inclusión interactúan a través de los grupos glicerol-fosfato con el sistema inmune. Como resultado de ello, cuando se administran de esta manera se genera una respuesta anti-inflamatoria.

En otra realización, esta invención está dirigida a un cuerpo sintético o semi-sintético tridimensional denominado aquí cuerpo de inclusión aceptable para uso farmacéutico que es de un tamaño que varía en un rango entre 20 nm y 500 μ m y que ha sido modificado para comprender como componente principal al menos un ligando promotor de respuestas anti inflamatorias donde dicho ligando posee grupos glicerol-fosfato.

En aún otra realización, esta invención está dirigida a cuerpos de inclusión sintéticos y semi-sintéticos tridimensionales denominados también cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico en este documento que tienen tamaños que varían en un rango entre 20 nm y 500 μ m y que poseen grupos glicerol-fosfato sobre la superficie de los mismos.

En otro aspecto, la invención está dirigida a un método para el tratamiento de un trastorno mediado por el funcionamiento de las células T que comprende la administración a un paciente mamífero de una cantidad eficaz de cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico que transportan una cantidad eficaz de grupos glicerol-fosfato para inhibir y/o reducir el avance del trastorno mediado por el funcionamiento de células T.

Esta invención está dirigida además a un método para el tratamiento de un trastorno inflamatorio que comprende la administración a un paciente de una cantidad eficaz de cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico que transportan una cantidad eficaz de grupos glicerol-fosfato para inhibir y/o reducir el avance de dicho trastorno inflamatorio

Aún otra realización de esta invención es un método para el tratamiento de un trastorno de la función endócrina que comprende la administración a un paciente mamífero de una cantidad eficaz de cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico que transportan una cantidad eficaz de grupos glicerol-fosfato para inhibir y/o reducir el avance de dicho trastorno de la función endócrina

Otra realización es un método para el tratamiento de un trastorno inmunológico caracterizado por una expresión inapropiada de citoquinas que comprende la administración a un paciente mamífero de una cantidad eficaz de cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico que transportan una cantidad eficaz de grupos glicerol fosfato para inhibir y/o reducir el avance de dicho trastorno inmunológico

Esta invención está dirigida además a un proceso para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno cardíaco en mamíferos cuya presencia o susceptibilidad a la misma es detectable mediante observación de un intervalo prolongado de QT-c en el electrocardiograma del paciente donde dicho proceso comprende la administración a un paciente mamífero que padece del mismo o que es susceptible al mismo de una composición farmacéutica que comprende cuerpos de inclusión sintéticos o semi-sintéticos biocompatibles aceptable para uso farmacéutico también denominados cuerpos de inclusión

aceptables para uso farmacéutico en este documento y un vehículo aceptable para uso farmacéutico donde al menos una porción de dichos cuerpos de inclusión tiene un tamaño que se encuentra en el rango entre 20 nm y 500 μ m aproximadamente y donde las superficies de dichos cuerpos de inclusión han sido modificadas para transportar como componente principal al menos un grupo promotor de respuestas anti-inflamatorias donde dicho grupo es glicerol fosfato

Otra realización de la invención es una composición farmacéutica en una forma de dosificación unitaria para su administración a un paciente mamífero que comprende cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico y un vehículo aceptable para uso farmacéutico donde al menos una porción de los cuerpos de inclusión tienen un tamaño en el rango entre 20 nm y 500 μ m aproximadamente y donde la superficie de dichos cuerpos de inclusión comprenden grupos glicerol-fosfato o grupos que se pueden convertir a su vez en grupos glicerol-fosfato donde dicha dosificación unitaria comprende entre 500 y 2.5×10^9 cuerpos de inclusión aproximadamente

Una realización adicional de esta invención es una composición farmacéutica que comprende cuerpos de inclusión sintéticos o semi-sintéticos biocompatibles aceptable para uso farmacéutico (también denominados cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico en este documento) y un vehículo aceptable para uso farmacéutico donde al menos una porción de dichos cuerpos de inclusión tiene un tamaño entre 20 nm y 500 μ m aproximadamente y donde las superficies de dichos cuerpos de inclusión han sido modificadas para comprender como componente principal al menos un grupo promotor de respuestas anti-inflamatorias donde dicho grupo es glicerol

fosfato

Aún otra realización de esta invención es una composición farmacéutica que comprende cuerpos de inclusión sintéticos o semi-sintéticos biocompatibles aceptables para uso farmacéutico (también denominados cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico en este documento) y un vehículo aceptable para uso farmacéutico donde al menos una porción de dichos cuerpos de inclusión tienen entre 20 nm y 500 μ m aproximadamente y comprende cardiolipina

Opcionalmente los cuerpos de inclusión descritos previamente pueden comprender además un constituyente que es un grupo tensioactivo inactivo y/o un constituyente que es un grupo tensioactivo que es activo mediante otro mecanismo por ejemplo fosfatidilserina (Véase por ejemplo Fadok et al Publicación Internacional WO 01/66785)

En otra realización esta invención está dirigida a cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico liofilizados o secados por congelamiento que transportan grupos glicerol-fosfato o grupos que se pueden convertir a su vez en grupos glicerol-fosfato y conjuntos de elementos [kits] que comprenden cuerpos de inclusión liofilizados o secados por congelamiento que comprenden grupos glicerol fosfato o grupos que se pueden convertir a su vez en grupos glicerol-fosfato y un vehículo aceptable para uso farmacéutico

En otro aspecto esta invención está dirigida a un método para el tratamiento de un trastorno mediado por el funcionamiento de células T que comprende la administración a un paciente mamífero que padece o que tiene riesgo de padecer un trastorno mediado por el funcionamiento de células T una cantidad eficaz de una composición que comprende cuerpos de inclusión

aceptables para uso farmacéutico que son de un tamaño entre 20 nm aproximadamente y 500 μ m aproximadamente que comprenden sobre la superficie de los mismos una pluralidad de grupos glicerol-fosfato o grupos que se pueden convertir en dichos grupos glicerol fosfato de modo que después de su administración se inhibe y/o reduce el avance de dicho trastorno mediado por el funcionamiento de células T

Aún otra realización de esta invención está dirigida a un método para el tratamiento de un trastorno de la función endócrina que comprende la administración a un paciente mamífero que padece o que tiene riesgo de padecer un trastorno de la función endócrina de una cantidad eficaz de una composición que comprende cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico que son de un tamaño entre 20 nm aproximadamente y 500 μ m aproximadamente que comprenden sobre la superficie de los mismos una pluralidad de grupos glicerol-fosfato o grupos que se pueden convertir a su vez en dichos grupos glicerol-fosfato de manera que luego de su administración se inhibe y/o reduce el avance de dicho trastorno de la función endócrina

Otra realización de esta invención está dirigida a un método para el tratamiento de un trastorno inmunológico en un paciente mamífero que padece o que tiene riesgo de padecer un trastorno inmunológico que comprende la administración a dicho paciente mamífero de una cantidad eficaz de una composición que comprende cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico que son de un tamaño entre 20 nm aproximadamente y 500 μ m aproximadamente que comprenden sobre la superficie de los mismos una pluralidad de grupos glicerol fosfato o grupos que se pueden convertir a su vez en dichos grupos glicerol fosfato de modo tal que luego de su administración

se inhibe y/o reduce el avance de dicho trastorno inmunológico

✓ Descripción breve de las figuras

La FIG 1 es una presentación como gráfico de barras de los resultados del Ejemplo 1 descrito más adelante de experimentos de hipersensibilidad de contacto en murinos (CHS modelo inflamatorio agudo mediado por células T) usando liposomas de acuerdo con una realización preferida de la invención en comparación con otros liposomas y controles

La FIG 2 es una presentación gráfica similar que muestra el uso de liposomas de diversos contenidos de fosfatidilglicerol (PG) en el modelo CHS de murinos más adelante en el Ejemplo 2

La FIG 3 es una presentación gráfica similar de los resultados del Ejemplo 3 que se describe más adelante en el cual se usaron concentraciones diferentes de liposomas PG 75% en el modelo CHS de murinos

La FIG 4 es una presentación gráfica similar de los resultados del Ejemplo 4 descrito más adelante en el cual se usaron concentraciones diferentes de liposomas PG 100% en el modelo CHS de murinos

La FIG 5 es una presentación gráfica similar de los resultados del Ejemplo 5 descrito más adelante usando liposomas de diferentes tamaños en el modelo CHS

La FIG 6 es una presentación gráfica similar de los resultados del Ejemplo 6 descrito más adelante usando un modelo en murinos de hipersensibilidad de tipo tardía (DHS modelo inflamatorio crónico mediado por células T)

La FIG 7 es una presentación gráfica similar de los resultados del Ejemplo 7 descrito más adelante con liposomas de cardiolipina en un modelo

DHS de munnos

La FIG 8 es una presentación gráfica similar de los resultados del Ejemplo 8 descrito más adelante con liposomas de cardiolipina en el modelo CHS de munnos

La FIG 9 muestra el cambio porcentual en la pendiente del potencial post-sináptico excitatorio (EPSP) en ratones control y tratados que es indicativo del efecto de la potenciación a largo plazo (LTP) véase el Ejemplo 9

La FIG 10 muestra los datos que se mostraron en la FIG 9 en el formato un gráfico de barras véase el Ejemplo 9 descrito más adelante

La FIG 11 muestra la diferencia en la concentración de la citoquina IL-4 anti-inflamatoria en el hipocampo de animales control y tratados véase el Ejemplo 10 descrito más adelante

La FIG 12 muestra la diferencia en la concentración de la citoquina IL-1 β pro-inflamatoria en una suspensión de células individuales de esplenocitos de animales control y tratados véase el Ejemplo 11 descrito más adelante

La FIG 13 muestra la diferencia en la concentración de TNF- α en la línea de células monocíticas U937 tratada con concentraciones variables de liposomas PG 75% véase el Ejemplo 12 descrito más adelante

La FIG 14 es una presentación gráfica de los resultados del Ejemplo 13 descrito más adelante del contenido de endotelina-1 en orejas de ratones tratados de acuerdo con una realización preferida de la invención versus el control

La FIG 15 es una presentación gráfica de los resultados del Ejemplo 14 de células positivas para ICAM-1 de cultivos de HUVEC en presencia y ausencia de las composiciones de la realización preferida de la invención

Descripción de las realizaciones preferidas

De acuerdo con la presente invención se administran a pacientes cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico que transportan grupos glicerol-fosfato sobre la superficie de los mismos. Sin tener en cuenta una teoría particular se cree que estos cuerpos de inclusión interactúan con el sistema inmune del paciente obteniéndose con ello efectos benéficos tal como inhibición de las citoquinas pro-inflamatorias *in vivo* y/o promoción de citoquinas anti-inflamatorias. Las células que reaccionan pueden ser células inmunes tal como células presentadoras de antígenos profesionales o no profesionales, células endoteliales, células reguladoras tal como células NK-T y otras.

Estos cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico incluyen cuerpos de inclusión sintéticos y semi-sintéticos cuyos contornos son típicamente pero no exclusivamente esféricos, cilíndricos, elipsoides incluyendo esféricos achatados y alargados, serpenteados, reniformes, etc. y tamaños entre 20 nm aproximadamente y 500 μ m aproximadamente de diámetro preferentemente medido por el eje mayor y que comprenden grupos glicerol-fosfato sobre la superficie de los mismos.

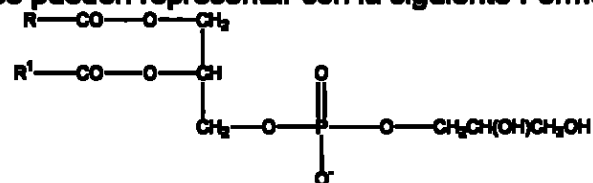
Los cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico poseen grupos glicerol fosfato de características predeterminadas sobre la superficie exterior. Sin tener en cuenta una teoría particular se cree que estos grupos tienen la capacidad de interactuar con el o los receptores apropiados distintos del receptor PS exclusivamente sobre las células presentadoras de antígenos *in vivo*. La estructura de estos grupos puede ser alterada por síntesis y puede incluir todo, parte o una versión modificada del grupo glicerol-fosfato original.

Por ejemplo el oxígeno con carga negativa del grupo fosfato dentro del grupo glicerol-fosfato se puede convertir en un grupo éster fosfato (por ejemplo $L-OP(O)(O)(O)$) donde L es el resto del grupo glicerol-fosfato R' es $-CH_2CH(OH)CH_2OH$ y R es alquilo con 1 a 4 átomos de carbono o alquilo con 2 a 4 átomos de carbono sustituido con hidroxilo y 1 a 3 grupos hidroxilo siempre que R sea más fácil de hidrolizar *in vivo* que el grupo R en un grupo difosfato incluyendo ésteres difosfato (por ejemplo $L-OP(O)(O)OP(O)(O)_2$ donde L y R es como se definió previamente y cada R es independientemente hidrógeno alquilo con 1 a 4 átomos de carbono o un alquilo de 2 a 4 átomos de carbono sustituido con hidroxilo y 1 a 3 grupos hidroxilo siempre que el segundo grupo fosfato $[-P(O)(O)_2]$ sea más fácilmente hidrolizable *in vivo* que el grupo R o en un grupo trifosfato incluyendo ésteres trifosfato (por ejemplo $L-OP(O)(O)OP(O)(O)OP(O)(O)_2$ donde L y R son como se definieron previamente y cada R es independientemente hidrógeno alquilo de 1 a 4 átomos de carbono o un alquilo de 2 a 4 átomos de carbono sustituido con hidroxilo y 1 a 3 grupos hidroxilo siempre que el segundo y tercer grupo fosfato sea más fácilmente hidrolizable *in vivo* que el grupo R y semejantes Dichos grupos glicerol-fosfato alterados por síntesis pueden expresar glicerol-fosfato *in vivo* y por consiguiente dichos grupos alterados son grupos que se pueden convertir en glicerol-fosfato

El fosfatidilglicerol es un compuesto conocido Se puede producir por ejemplo mediante tratamiento de una forma diméica natural de fosfatidilglicerol cardiolipina con fosfolipasa D También se puede preparar por síntesis enzimática a partir de fosfatidicolina usando fosfolipasa D véase por ejemplo la Patente de EE UU N° 5 188 951 Tremblay et al Desde un punto de vista

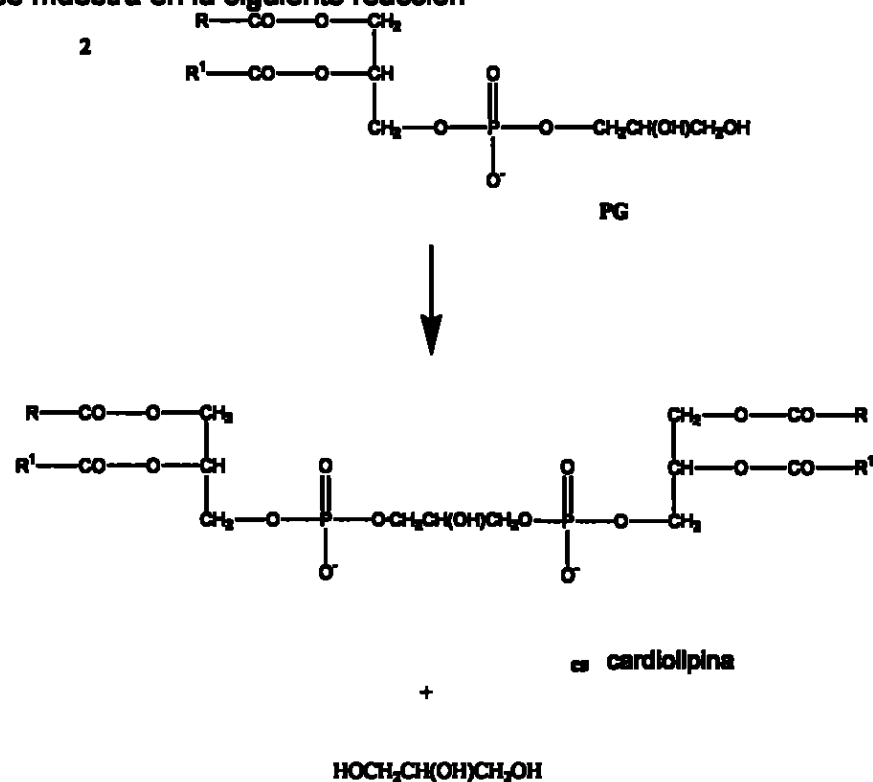
químico posee un grupo glicerol-fosfato y un par de cadenas de ácidos grasos de C₁₈-C₂₀ similares pero diferentes

Tal como se usa aquí el término PG pretende abarcar los fosfolípidos que transportan un grupo glicerol-fosfato con un amplio rango de al menos una cadena de ácido graso siempre que la entidad PG resultante pueda participar como un componente estructural de un liposoma. Preferentemente dichos compuestos PG se pueden representar con la siguiente Fórmula I



donde R y R' se seleccionan independientemente entre cadenas hidrocarbonadas de C₁-C₂₄ saturadas o insaturadas de cadena lineal o que contienen una cantidad limitada de ramificaciones donde al menos una cadena tiene entre 10 y 24 átomos de carbono. Esencialmente las cadenas de lípidos R y R' forman el componente estructural de los liposomas en lugar del componente activo. Por consiguiente se pueden variar para que incluyan dos o una de dichas cadenas de lípidos ya sean iguales o diferentes siempre que cumplan con dicha función estructural. Preferentemente las cadenas de lípidos pueden ser de 10 a 24 átomos de carbono de longitud aproximadamente saturados monoinsaturados o poliinsaturados de cadena lineal o con una cantidad limitada de ramificaciones. Como ejemplos de cadenas de lípidos saturados que son de utilidad se puede mencionar laurato (C12) miristato (C14) palmitato (C16) estearato (C18) araquidato (C20) behenato (C22) y lignocerato (C24) para la PG en la presente invención. El palmitoleato (C16) y oleato (C18) son ejemplos de cadenas de lípidos monoinsaturados adecuadas

El linoleato (C18) linolenato (C18) y anquidonato (C20) son ejemplos de cadenas de lípidos poliinsaturados adecuados para su uso en PG en los liposomas de la presente invención. Los fosfolípidos con una sola de dichas cadenas de lípidos que también son de utilidad en la presente invención se conocen como lisofosfolípidos. La presente invención también abarca el uso de liposomas en los cuales el componente activo es la forma dimerica de PG, es decir cardiolipina, pero también hay otros dímeros de la Fórmula I que son adecuados. Preferentemente dichos dímeros no están entrecruzados sintéticamente con un agente de entrecruzamiento de síntesis tal como maleimida sino que en realidad están entrecruzados por eliminación de una unidad de glicerol como describió Lehninger *Biochemistry* pág 525 (1970) y como se muestra en la siguiente reacción:



donde cada R y R¹ son independientemente como se definieron previamente

Como se indicó previamente y nuevamente sin tener en cuenta una teoría particular se cree que el grupo PG y su dímero constituyen un ligando dado que se considera que se une a un sitio específico sobre una proteína u otra molécula ("receptor de PG") y por consiguiente esta molécula de fosfatidilglicerol (y su forma dimérica) a menudo se denomina ligando o grupo de unión en este documento. Se cree que dicha unión tiene lugar por medio del grupo glicerol-fosfato $-O-P(=O)(OH)-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH$ que a veces se denomina grupo principal "grupo activo" o grupo de unión en este documento. En vista de lo mencionado anteriormente la referencia que se hace aquí a unión "grupo de unión" o ligando no debe interferir con ningún mecanismo o modo de acción. No obstante se considera que los grupos mencionados de glicerol fosfato son presentados sobre las superficies externas de los cuerpos de inclusión de la presente invención para su interacción con los componentes del sistema inmune del paciente. Cabe destacar que esta interacción no es la misma que la interacción específica de las células apoptóticas con el receptor de fosfatidilserina sobre las células presentadoras de antígenos.

Los ejemplos de "porciones tridimensionales de los cuerpos de inclusión o cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico" incluyen las entidades sintéticas o semi-sintéticas biocompatibles tal como liposomas, perlas sólidas, perlas huecas, perlas rellenas, partículas, gránulos y microesferas de materiales biocompatibles naturales o sintéticos que se utilizan habitualmente en la industria farmacéutica. Las perlas pueden ser

sólidas o huecas o pueden estar rellenas de un material biocompatible. El término biocompatible se refiere a sustancias que en la cantidad empleada no son tóxicas o presentan perfiles de toxicidad aceptables de modo que su uso *in vivo* sea aceptable. Asimismo, el término aceptable para uso farmacéutico utilizado con relación a los cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico se refiere a cuerpos de inclusión compuestos de uno o varios materiales que son aceptables para uso farmacéutico y adecuados para una distribución *in vivo*. Dichos cuerpos de inclusión pueden incluir los liposomas formados por lípidos, uno de los cuales es PG. Como alternativa, los cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico pueden ser perlas sólidas, perlas huecas, perlas rellenas, partículas, gránulos y microesferas de materiales biocompatibles que comprenden uno o varios materiales biocompatibles tal como polietilenglicol, poli(metilmetacrilato), polivinilpirrolidona, poliestireno y un amplio rango de otros materiales naturales, semi-sintéticos y sintéticos con grupos glicerol-fosfato unidos a los mismos.

Como se indicó previamente, los análogos de fosfatidilglicerol con grupos activos modificados que también interactúan con los receptores de PG sobre las células presentadoras de antígenos a través de la misma vía receptora que PG o que de otra manera dan como resultado una reacción anti-inflamatoria en el cuerpo receptor están contemplados dentro del alcance del término fosfatidilglicerol. Estos incluyen, por ejemplo, compuestos en los cuales se han derivatizado uno o varios de los grupos hidroxilo y/o el grupo fosfato o que se encuentran en la forma de una sal. Muchos de dichos compuestos forman grupos hidroxilo libres *in vivo* en el momento o después de su administración y por lo tanto comprenden grupos convertibles en PG.

Las composiciones prefendas de material son liposomas que pueden consistir de diversos lípidos. Sin embargo se prefiere que ninguno de los lípidos sean de carga positiva. En el caso de liposomas el PG fosfatidil glicerol puede constituir la porción principal o toda la porción de la o las capas o paredes que conforman el liposoma orientado de manera tal que la porción del grupo glicerol-fosfato del mismo se muestra hacia el exterior con el fin de actuar como grupo de unión y la o las cadenas de lípidos conforman la pared estructural.

Los liposomas o vesículas de lípidos son sacos sellados en el rango de micrones o submicrones cuyas paredes (de una sola capa o de múltiples capas) comprenden anfilios adecuados. Habitualmente contienen un medio acuoso aunque para la presente invención el contenido interior no es importante y en general es inactivo. Por consiguiente en una realización prefenda los liposomas así como otros cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico están esencialmente libres de entidades no lipídicas farmacéuticamente activas (por ejemplo <1%) y más preferentemente están libres de entidades no lipídicas aceptables para uso farmacéutico. Dichos liposomas se preparan y tratan de manera tal que los grupos activos se presentan hacia el exterior sobre el cuerpo del liposoma. El PG en los liposomas de las realizaciones prefendas de esta invención sirven entonces como ligando y como componente estructural del propio liposoma.

Así una realización preferida de esta invención provee cuerpos de inclusión liposomales que exponen o que pueden ser tratados o inducidos para exponer sobre las superficies de los mismos uno o varios grupos de glicerol-fosfato que actuarán como grupos de unión. El fosfatidilglicerol es un ligando

PG prefendo y dichos lípidos deberían comprender un 10% - 100% del liposoma siendo el equilibrio un constituyente inactivo por ejemplo fosfatidilcolina PC o un constituyente que actúa a través de un mecanismo diferente por ejemplo fosfatidilserina PS o mezclas de los mismos. Se prefieren los co-constituyentes inactivos tal como PC.

Al menos un 10% en peso de dicho liposoma está compuesto de PG preferentemente al menos un 50% más preferentemente un 60-100% y con mayor preferencia un 70-90% siendo la realización más preferida de aproximadamente un 75% en peso de PG.

También se pueden usar mezclas de liposomas PG con liposomas inactivas y/o con liposomas de fosfolípidos que actúan a través de un mecanismo diferente siempre que la cantidad total de PG sea superior a un valor mínimo de aproximadamente un 10% y con preferencia superior a un 60% en la mezcla total.

Con respecto a los cuerpos de inclusión no liposomales que se pueden utilizar en la presente invención pueden incluir perlas biocompatibles sólidas o huecas del tamaño apropiado. Los cuerpos de inclusión sintéticos o semi-sintéticos biocompatibles no liposomales se pueden seleccionar entre polietilenglicol, poli(metilmetakrilato), polivinilpirrolidona, poliestireno y un amplio rango de otros materiales naturales, semi-sintéticos y sintéticos con los grupos glicerol-fosfato unidos a las superficies de los mismos. Dichos materiales incluyen polímeros biodegradables tal como los que fueron descritos por Dunn et al. Patente de EE UU N° 4 938 763 cuyo contenido se incorpora por completo en este documento a modo de referencia.

Los polímeros biodegradables están descritos en el arte e incluyen por

ejemplo polímeros de cadena lineal tal como poliláctidos poliglicólicos policaprolactonas polianhídridos poliamidas poliuretanos poliesteramidas poliortoésteres polidioxanonas poliacetales policetales policarbonatos poliortocarbonatos polifosfazenos polihidroxbutratos polihidroxxvaleratos oxalatos de polialquileno succinatos de polialquileno ácido poli(málico) ácidos poli(amino) polivinilpirrolidona polietilenglicol polihidroxxcelulosa quitina quitosan y copolímeros terpolímeros y combinaciones de los mismos Otros polímeros biodegradables incluyen por ejemplo gelatina colágeno etc.

Las sustancias adecuadas para la derivatización para unir el o los fosfolípidos o porciones de los mismos con grupos o grupos de unión a los cuerpos de inclusión tridimensionales se encuentran disponibles comercialmente por ejemplo de Polisciencias Inc 400 Valley Road Warrington PA 18976 o de Sigma Aldrich Fine Chemicals Los métodos para su derivatización son conocidos en el arte Los ejemplos específicos preferidos de dichos métodos se describen en la Solicitud de Patente Internacional PCT/CA02/01398 Vasogen Ireland Limited cuyo contenido se incorpora en este documento a modo de referencia

Se contempla que el paciente puede ser un mamífero incluyendo por ejemplo seres humanos y animales domésticos tal como vacas caballos cerdos perros gatos y semejantes

Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas (es decir son anfifilos) lo que significa que el compuesto comprende moléculas que poseen un grupo polar soluble en agua unido a una cadena hidrocarbonada insoluble en agua Los anfifilos que constituyen las capas de la matriz tienen regiones polares y apolares definidas Los anfifilos pueden incluir además de PG en esta

invención otros lípidos naturales usados solos con el fosfolípido que transportan al grupo activo o en mezclas con otros. Los anfífilos que constituyen la o las capas de los liposomas pueden ser compuestos sintéticos que confieren estructura inertes tal como alquiléteres de polioxietileno alquilésteres de polioxietileno y diésteres de sacarosa.

Los métodos para preparar liposomas del tamaño apropiado son conocidos en el arte y no forman parte de esta invención. Se pueden consultar numerosos libros de texto y artículos en la literatura sobre este tema por ejemplo la revisión *Liposomes as Pharmaceutical Dosage Forms* de Yechezkel Barenholz y Daan J. A. Chrommelin y la literatura citada en la misma por ejemplo *New R. C. Liposomes: A Practical Approach* IRL Press de Oxford University Press (1990).

El diámetro de los liposomas así como de los demás cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico de la realización preferida de esta invención comprende entre 20 nm aproximadamente y 500 μ m aproximadamente más preferentemente entre 20 nm aproximadamente y 1000 nm aproximadamente con preferencia entre 50 nm aproximadamente y 500 nm aproximadamente y con mayor preferencia entre 80 nm aproximadamente y 120 nm aproximadamente (preferentemente se mide por el eje mayor). En una realización el diámetro del liposoma comprende entre 60 nm y 500 μ m.

Los cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico se pueden suspender en un vehículo aceptable para uso farmacéutico tal como solución salina estéril fisiológica, agua estéril, agua libre de pirógenos, solución salina isotónica y soluciones amortiguadoras de fosfato (por ejemplo soluciones acuosas estériles que comprenden solución amortiguadora de fosfato) así

como otras sustancias compatibles no tóxicas usadas en las formulaciones farmacéuticas tal como por ejemplo adyuvantes soluciones amortiguadoras conservantes y semejantes Preferentemente los cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico están conformados en una suspensión líquida en un líquido biocompatible estéril tal como solución amortiguadora salina y se administran al paciente por cualquier ruta apropiada que lo exponga a uno o varios componentes del sistema inmune tal como por vía intra-arterial intravenosa o más preferentemente intramuscular o subcutánea

Se contempla que los cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico se pueden secar por congelamiento o liofilizar para que puedan ser resuspendidas posteriormente para su administración Esta invención también está dirigida a un conjunto de elementos que comprende cuerpos de inclusión que transportan grupos de unión liofilizados o secados por congelamiento y un vehículo aceptable para uso farmacéutico tal como solución salina estéril fisiológica agua estéril agua libre de pirógenos solución salina isotónica y soluciones amortiguadoras de fosfato (por ejemplo soluciones acuosas estériles que comprenden solución amortiguadora de fosfato) así como otras sustancias no tóxicas compatibles usadas en las formulaciones farmacéuticas tal como por ejemplo adyuvantes soluciones amortiguadoras conservantes y semejantes También se pueden incluir protectores para el secado por congelamiento conocidos en el arte por ejemplo lactosa o sacarosa

Una manera preferida de administrar los cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico al paciente es una serie de inyecciones administrados diariamente varias veces por semana semanalmente o mensualmente al

paciente sobre un período que varía en un rango entre una semana a varios meses. La frecuencia y duración del desarrollo de la administración varía de un paciente a otro y según la afección en tratamiento su severidad y si el tratamiento será profiláctico terapéutico o curativo. El diseño y la optimización de los mismos son habilidades propias del profesional a cargo. Se prefiere la inyección intramuscular en especial la vía del músculo glúteo. Un programa particular de inyecciones en al menos algunas de las indicaciones de la invención comprende la inyección en el músculo glúteo de una cantidad apropiada de cuerpos de inclusión el día 1 otra inyección el día 2 otra inyección el día 14 y luego inyecciones de refuerzo a intervalos mensuales si fuera apropiado.

Se postula que en muchas realizaciones de la presente invención los cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico que comprenden grupos PG como grupos de unión sobre la superficie de los mismos están actuando como modificadores del sistema inmune del paciente de manera similar a la de una vacuna. Por consiguiente se utilizan en las cantidades y los métodos de administración suficientes como para proveer una concentración localizada de los cuerpos de inclusión en el sitio de la introducción. Las cantidades de dichos cuerpos de inclusión que son apropiadas para una modificación del sistema inmune posiblemente no se correlacionen directamente con el tamaño corporal del receptor y por ello se pueden distinguir claramente de las dosificaciones de fármacos que están diseñados para proveer niveles terapéuticos de sustancias activas en el torrente sanguíneo y los tejidos del paciente. Entonces las dosificaciones de fármacos serán probablemente mucho mayores que las dosificaciones que modifican el sistema

inmune

La correlación entre el peso de los liposomas y la cantidad de liposomas deriva del hecho aceptado por los especialistas en el arte de formulaciones liposomales una vesícula de dos capas de 100 nm de diámetro contiene 81 230 moléculas de lípido por vesícula distribuidas aproximadamente 50 50 entre las dos capas (véase Richard Hamgan – 1992 Universidad de British Columbia Tesis PhD “Transmembrane pH gradients in liposomes (microform) drug-vesicle interactions and proton flux” publicado por National Library of Canada Ottawa Canadá (1993) N° Orden de University Microfilms UMI00406756 N° Canadiana 942042220 ISBN 0315796936) A partir de esto es posible calcular por ejemplo que una dosis de 5×10^8 vesículas en el orden de la dosis usada en los ejemplos específicos *in vivo* más adelante en este documento es equivalente a 4.06×10^{13} moléculas de lípido Usando el número de Avogadro para la cantidad de moléculas de lípido en una molécula gramo (mol) 6.023×10^{23} se puede determinar que esto representa 6.74×10^{-11} moles que con un peso molecular de 729 para PG equivale aproximadamente a 3.83×10^{-8} g o 38.3 ng de PG para dicha dosificación

La cantidad de cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico que será administrada varía según la naturaleza del trastorno de mamífero que se pretende tratar y según la identidad y las características del paciente Preferentemente la cantidad eficaz de cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico no debe ser tóxica para el paciente y no debe ser tan grande como para superar al sistema inmune Cuando se utiliza una administración intra-arterial intravenosa subcutánea o intramuscular de una suspensión acuosa estéril de cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico se

prefiere administra para cada dosis entre 0.1-50 ml aproximadamente de líquido que contiene una cantidad de cuerpos de inclusión equivalentes en general a 10% - 1000% de la cantidad de leucocitos habitualmente presentes en un volumen equivalente de sangre completa. Preferentemente la cantidad de cuerpos de inclusión administrada por vez a un paciente humano se encuentra en el rango entre aproximadamente 500 y aproximadamente 2.5×10^9 (<250 ng de cuerpos de inclusión en el caso de liposomas promateada para las diferencias de densidad en otras realizaciones de cuerpos de inclusión) más preferentemente entre aproximadamente 1 000 y aproximadamente 1 500 000 000 con preferencia entre 10 000 y 100 000 000 aproximadamente y con mayor preferencia entre aproximadamente 200 000 y aproximadamente 2 000 000.

Dado que los cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico actúan en el proceso de la invención como modificadores del sistema inmune en la naturaleza de una vacuna, la cantidad de dichos cuerpos de inclusión administrada en el sitio de inyección para cada administración puede constituir una cuantificación más significativa que la cantidad o el peso de cuerpos de inclusión por unidad de peso corporal del paciente. Por el mismo motivo, ahora se considera que las cantidades eficaces o la cantidad de cuerpos de inclusión para animales pequeños no se traducen directamente en cantidades eficaces para mamíferos más grandes (es decir más de 5 kg) sobre una base de relación de pesos.

La presente invención está indicada para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de una amplia variedad de trastornos en mamíferos en los cuales están comprometidos el funcionamiento de células T, la inflamación, la

disfunción endotelial y la expresión inapropiada de citoquinas. Los pacientes que padecen o sospechados de padecer dichos trastornos pueden ser seleccionados para el tratamiento. El término "tratamiento" se refiere a una reducción de los síntomas tal como por ejemplo una disminución en la severidad o en la cantidad de síntomas de la enfermedad particular o una limitación del avance progresivo de los síntomas.

Con respecto a los trastornos debidos a la función de las células T (mediados por células T) estos trastornos incluyen cualquier y todos los trastornos mediados al menos en parte por células T e incluyen por ejemplo úlceras, heridas y trastornos autoinmunitarios incluyendo por ejemplo diabetes, escleroderma, psoriasis y artritis reumatoidea.

La invención está indicada para su uso con reacciones alérgicas, inflamatorias, trastornos por reacciones en transplantes de órganos y células e infecciones microbianas que originan reacciones inflamatorias. También está indicado para su uso en la profilaxis contra el estrés oxidativo y/o las lesiones de reperfusión isquémica, ingesta de venenos, exposición a sustancias químicas tóxicas, lesiones por radiación y exposición a sustancias irritantes transportadas por aire y por agua, etc., causantes de una inflamación perjudicial. También está indicado para los trastornos inflamatorios alérgicos y mediados por células T de órganos internos tal como riñón, hígado, corazón, etc.

Con respecto a los trastornos que involucran una expresión inapropiada de citoquinas para la cual está indicada la presente invención, incluyen cualquier y todos los trastornos que comprenden una expresión inapropiada de citoquinas e incluyen por ejemplo enfermedades neurodegenerativas. Las

enfermedades neurodegenerativas incluyendo el síndrome de Down el mal de Alzheimer y el mal de Parkinson están asociadas con niveles incrementados de ciertas citoquinas incluyendo la interleuquina-1 β (IL-1 β) (véase Griffin WST et al (1989) Mogi M et al (1996)) También se ha demostrado que la IL-1 β inhibe la potenciación a largo plazo en el hipocampo (Murray C A. et al (1998)) La potenciación a largo plazo en el hipocampo es una forma de plasticidad sináptica y se considera en general que es un modelo apropiado para la memoria y el aprendizaje (Bliss TVP et al (1993)) Entonces actualmente se cree que una expresión inapropiada de citoquinas en el cerebro está comprometida en el desarrollo y el avance de las enfermedades neurodegenerativas y los trastornos neuroinflamatorios

Por consiguiente la invención está indicado para el tratamiento y la profilaxis de una amplia variedad de trastornos neurodegenerativos y otros trastornos neurológicos en mamíferos incluyendo síndrome de Down mal de Alzheimer mal de Parkinson demencia senil depresión enfermedad de Huntington neuropatías periféricas síndrome de Guillain Barr enfermedades de la médula espinal enfermedades neuropáticas de las articulaciones enfermedad desmielinizante inflamatoria crónica neuropatías incluyendo mononeuropatía polineuropatía neuropatía sensorial simétrica distal trastornos de la unión neuromuscular miastenias y esclerosis amiotrófica lateral (ALS) El tratamiento y la profilaxis de estas enfermedades neurodegenerativas representan una realización particularmente preferida de la invención siendo especialmente preferido el tratamiento del mal de Alzheimer mal de Parkinson y ALS

Con respecto a los trastornos que comprenden una disfunción endotelial

la presente invención está indicada para el tratamiento y la profilaxis de una amplia variedad de dichos trastornos en mamíferos incluyendo cualquiera y todos los trastornos mediados al menos en parte por una disfunción endotelial e incluyen por ejemplo enfermedades cardiovasculares tal como aterosclerosis enfermedad oclusiva arterial periférica o arterial insuficiencia cardíaca congestiva enfermedad cerebrovascular (apoplejía) infarto de miocardio angina hipertensión etc trastornos vasoespásticos tal como enfermedad de Raynaud síndrome cardíaco X migraña etc y las lesiones que se producen como resultado de una isquemia (lesión isquémica o lesión por reperfusión-isquemia) En resumen puede ser prácticamente cualquier trastorno cuya patología comprenda el funcionamiento inapropiado del endotelio

Otras indicaciones para las composiciones y los procesos de la presente invención incluyen el tratamiento de pacientes para acelerar la velocidad de cicatrización de heridas y úlceras y el tratamiento de pacientes antes de una intervención quirúrgica con el fin de acelerar la velocidad de recuperación de la cirugía inclusive la velocidad de cicatrización de las lesiones e incisiones quirúrgicas

Con respecto a los trastornos cardíacos la presente invención está indicada para el tratamiento y la profilaxis de una amplia variedad de dichos trastornos en mamíferos incluyendo cualquiera y todos los trastornos relacionados con el corazón e incluyen por ejemplo arritmias ventriculares (taquicardia o fibrilación ventricular) y muerte súbita por una enfermedad del corazón La susceptibilidad de los pacientes a los trastornos cardíacos tal como arritmias y muerte súbita cardíaca a menudo está indicada por intervalos

QT-c prolongados en el ritmo de latidos del corazón. Se considera que la administración de las composiciones acordes con las realizaciones preferidas de la invención reduce los intervalos QT-c en pacientes mamíferos lo cual sería indicativo de una susceptibilidad reducida a arritmias y muerte cardíaca súbita.

La invención se describirá a continuación a efectos ilustrativos en los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

En los ejemplos que se describirán más adelante las siguientes abreviaturas tienen el significado que se detalla a continuación. Si no está definida una abreviatura tiene el significado aceptado en general.

μg	=	microgramo
μl	=	microlitro
μm	=	micrómetro
μM	=	micromolar
CHS	=	hipersensibilidad de contacto
Cm	=	centímetro
DMSO	=	dimetilsulfóxido
DNFB	=	2,4-dinitrofluorobenceno
DHS	=	hipersensibilidad de tipo tardía
EtOH	=	etanol
G	=	gramo
Hs	=	horas
Hz	=	hertz
IM	=	intramuscular

123 #

IP	=	intraperitoneal
Kg	=	kilogramo
LPS	=	lipopolisacárido
LTP	=	potenciación a largo plazo
Mg	=	miligramo
Min	=	minutos
ml	=	mililitro
MM	=	milimolar
Ms	=	milisegundo
Ng	=	nanogramo
Nm	=	nanómetro
NM	=	nanomolar
PBS	=	solución amortiguadora fosfato salina
PCR	=	reacción en cadena de la polimerasa
POPS	=	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-[fosfo-L-serina] denominado PS en este documento
POPG	=	1-palmitoil 2-oleoil-sn-glicero-3-[fosfo-rac-(1- glicerol))]] denominado PG en este documento
POPC	=	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina denominado PC en este documento
RPM	=	revoluciones por minuto
S	=	segundo

A menos que se indique lo contrario la forma precisa de los lípidos usados en los experimentos era POPS POPG y POPC como se definió previamente

124 #5

Ejemplo 1

Se prepararon liposomas con un diámetro promedio de 100 ± 20 nm de acuerdo con los métodos estándar conocidos en el arte y la composición de los mismos era

- Grupo A - PS 100%
- Grupo B - PG 100%
- Grupo C - control sin liposomas

Se diluyó una suspensión madre de cada composición de liposomas que contenía 4.8×10^{14} liposomas por ml con PBS para obtener una suspensión inyectable que contenía 6×10^6 partículas por ml. Las suspensiones liposomales se inyectaron en ratones hembra BALB/c (Jackson Laboratones) de 6-8 semanas y con un peso de 19-23 g con el fin de determinar el efecto sobre la hinchazón de oreja en el modelo de hipersensibilidad de contacto (CHS) en murinos. Se utilizaron las pruebas para el modelo CHS para las reacciones inflamatorias mediadas por Th1.

Los animales fueron asignados a 3 grupos con 5 animales en cada uno. Los grupos A y B recibieron aproximadamente 3×10^5 de los liposomas identificados previamente (es decir, PC 100% y PG 100% respectivamente) en un volumen de 50 µl aproximadamente. El grupo C era un grupo control que no recibió liposomas.

Protocolo

Se llevaron a cabo los siguientes experimentos

TABLA I

Grupo	Liposomas	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7 (24 horas)
A	100% PS	Inyectado luego	Inyectado	Inyectado	Inyectado	Inyectado	Inyectado luego	Medición en oreja

125
H8

		sensibilizado					estimulado	
B	PG 100%	Inyectado luego sensibilizado	Inyectado	Inyectado	Inyectado	Inyectado	Inyectado luego estimulado	Medición en oreja

Los días 1-6 los ratones de los grupos A y B recibieron inyecciones de las respectivas preparaciones de liposomas. Se inyectaron aproximadamente 300 000 liposomas en un volumen de 50 µl por inyección intramuscular (IM) con una administración total durante todo el período de prueba de aproximadamente 1 800 000 liposomas. A los ratones del grupo control (grupo C) no se les administraron liposomas pero fueron sensibilizados, estimulados y evaluados de la misma manera que los grupos A y B como se describirá a continuación.

Sensibilización

El día 1 después de la inyección de liposomas correspondiente a ese día los ratones fueron anestesiados con 0.2 ml de pentobarbital sódico 5 mg/ml mediante inyección IP. Se rocía la piel del abdomen de los ratones con EtOH 70% y luego se utilizó una hoja de escalpelo para eliminar aproximadamente un parche de una pulgada de diámetro de pelo del abdomen. El área rasurada se pintó luego con 25 µl de 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) 0.5% en una mezcla 4:1 de acetona:aceite de oliva usando una punta de pipeta.

Estímulo

El día 6 después de la inyección de liposomas los ratones fueron estimulados con DNFB esparciendo 10 µl de DNFB 0.2% sobre la superficie dorsal de la oreja derecha con una punta de pipeta y esparciendo 10 µl de vehículo sobre la oreja izquierda con una punta de pipeta.

Resultados

126 117

El día 7 24 horas después del estímulo cada animal fue anestesiado con halotano y se midió el espesor de la oreja usando un micrómetro accionado por resorte Peacock. Los datos obtenidos se expresaron como la diferencia entre la espesor de la oreja derecha tratada y el espesor de la oreja izquierda tratada con vehículo. Los experimentos se repitieron tres veces con animales de características similares. El incremento de hinchazón de oreja se usó como una medida de la respuesta CHS. El grado de significación de los datos se determinó con la prueba de t de Student de dos colas. Se consideró significativo un valor $P < 0.05$.

Los resultados se muestran en la FIG 1 que es un gráfico de barras que muestra los valores medios de los tres experimentos de hinchazón de oreja expresados en μm .

En la FIG 1 se muestra que se logró una reducción significativa en la hinchazón de oreja con la inyección de los liposomas acordes con la presente invención. La reducción lograda con los liposomas con PG 100% es sustancialmente mayor que la obtenida con los liposomas con PS 100%.

Ejemplo 2

Se prepararon liposomas con un diámetro promedio de 100 ± 20 nm de acuerdo con los métodos estándar conocidos en el arte y de las siguientes composiciones:

- Grupo A – PG 100%
- Grupo B – PG 75% PC 25%
- Grupo C – PG 50% PC 50%
- Grupo D – PG 25% PC 75%
- Grupo E – PBS sólo

Grupo F – ninguna inyección

Se diluyó una suspensión madre de cada composición de liposomas que contenía 4.8×10^{14} liposomas por ml para obtener una suspensión inyectable que contenía 12×10^8 liposomas por ml. Las suspensiones liposomales se inyectaron en ratones para determinar el efecto sobre la hinchazón de oreja en el modelo CHS de murinos, un sistema biológico que es de utilidad para evaluar reacciones inflamatorias mediadas por Th1. Para estos experimentos se usaron ratones hembra BALB/c (Jackson Laboratorios) de 6-8 semanas y con un peso de 19-23 g.

Los animales fueron asignados a 6 grupos (los grupos A-F indicados previamente) con 10 animales en cada grupo. También se incluyeron grupos control que no recibieron inyecciones (grupo F) o inyecciones de PBS sin liposomas (grupo E). Los animales de los grupos A-D recibieron inyecciones de 50 µl de las suspensiones de liposomas identificadas previamente, cada una de las cuales contenía 6×10^8 liposomas aproximadamente.

Protocolo

La prueba comprende una sensibilización (Sens) con una sustancia potencialmente causante de inflamación, inyección de liposomas (Iny) en los animales de prueba o PBS en los controles, y estímulo (Est) con dicha sustancia potencialmente causante de inflamación después de medición (Med) para determinar si la inyección de liposomas era eficaz contra el desarrollo de inflamación ocasionado por el estímulo.

Se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

Grupo	Liposomas	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
A	PG 100%	Sens e Iny	Iny	Iny	Iny	Iny	Est e Iny	Med
B	PG 75%	Sens e	Iny	Iny	Iny	Iny	Est e	Med

123 4

		Iny					Iny	
C	PG 50%	Sens e Iny	Iny	Iny	Iny	Iny	Est e Iny	Med
D	PG 25%	Sens e Iny	Iny	Iny	Iny	Iny	Est e Iny	Med
E	Ninguno (PBS sólo)	Sens e Iny	Iny	Iny	Iny	Iny	Est e Iny	Med
F	Ninguno	Sens					Est	Med

Los días 1-6 los ratones recibieron inyecciones con los respectivos liposomas indicados previamente. Los liposomas fueron inyectados en un volumen de 50 µl por inyección IM, es decir 600 000 liposomas por inyección para una administración total sobre todo el período de prueba de 3 600 000 liposomas. Los ratones del grupo control no recibieron liposomas pero fueron sensibilizados, estimulados y evaluados de la misma manera que los demás grupos de ratones, como se describirá a continuación.

Sensibilización (Sens)

El día 1 después de la inyección de liposomas correspondiente a ese día, los ratones fueron anestesiados con 0.2 ml de fenobarbital sódico 5 mg/ml mediante inyección IP. La piel del abdomen de los ratones fue rociada con EtOH 70% y se usó una hoja de bisturí para eliminar el pelo de un parche de aproximadamente una pulgada de diámetro del abdomen. Sobre el área descubierta se esparcieron 25 µl de 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) 0.5% en una mezcla 4:1 de acetona:aceite de oliva usando una punta de pipeta.

Estímulo (Est)

El día 6 después de la inyección de liposomas correspondiente a ese día, los ratones fueron estimulados (Est) con DNFB de la siguiente manera: se esparcieron 10 µl de DNFB 0.2% sobre la superficie dorsal de la oreja derecha con una punta de pipeta y se esparcieron 10 µl de vehículo sobre la oreja izquierda con una punta de pipeta.

Resultados

El día 7 24 horas después del estímulo cada animal fue anestesiado con Halotano y luego se midió (Med) el espesor de la oreja usando un micrómetro accionado por resorte Peacock. El incremento de la hinchazón de oreja se usó como una medida de la respuesta CHS. Los datos se expresaron como la diferencia en el espesor de la oreja derecha tratada menos el espesor de la oreja izquierda tratada con vehículo. El grado de significación entre los dos grupos se determinó con la prueba t de Student de dos colas. Se consideró significativo un valor $P < 0.05$.

Los resultados se muestran gráficamente en la FIG. 2 un gráfico de barras que muestra la hinchazón de oreja en μm . Se usó el valor medio de los experimentos respectivos para representar el gráfico.

En la FIG. 2 se muestra que se logró una reducción significativa en la hinchazón de oreja con PG 100% y 75%, lo cual demuestra que ambas concentraciones ofrecían protección contra el desarrollo de inflamación como resultado del contacto con la sustancia alergénica DNFB. Los liposomas con PG 50% y 25% también produjeron reducciones en comparación con ambos controles, pero las diferencias no alcanzaron un grado de significación estadístico en este experimento.

Ejemplo 3

Se prepararon liposomas con un diámetro promedio de 100 ± 20 nm de acuerdo con los métodos estándar conocidos en el arte y estaban compuestos de PG 75% PC 25%. Se usó una suspensión madre que contenía 4.8×10^{14} liposomas por ml igual que antes y se diluyó en PBS para obtener una suspensión inyectable que contenía las siguientes concentraciones de

liposomas

Grupo	Liposomas	Concentración (liposomas por ml)	Liposomas por inyección	Animales en el grupo
A	PG 75%, PC 25%	12×10^{11}	6×10^{10}	10
B	PG 75%, PC 25%	12×10^9	6×10^8	10
C	PG 75%, PC 25%	12×10^8	6×10^7	16
D	PG 75%, PC 25%	12×10^7	6×10^6	16
E	PG 75%, PC 25%	12×10^6	6×10^5	16
F	Ninguno (PBS sólo)			16

Se agruparon ratones BALB-c en seis grupos (grupos A-F) incluyendo un grupo control que no recibió liposomas pero sí una inyección con 50 ml de PBS (grupo F) Los ratones fueron sensibilizados en el flanco se les inyectó la dosis de liposomas seleccionada por vía intramuscular en el músculo de la pata derecha el mismo día aunque después de la sensibilización (día 1) y los días 2 3 4 y 5 El día 6 recibieron inyecciones y estímulos sobre la oreja como se describió en el Ejemplo 1 El espesor de la oreja se midió como ya se describió 24 horas después de aplicar el estímulo

Los resultados (FIG 3) muestran una diferencia significativa entre el grupo control (grupo F) y el grupo C (12×10^8 liposomas por ml) y entre el grupo control y el grupo D (12×10^7 liposomas por ml) y entre el grupo control y el grupo E (12×10^6 liposomas por ml) Se observó poca diferencia entre el grupo control y los grupos A o B (12×10^{11} y 12×10^9 liposomas por ml respectivamente) lo cual sugiere que existe un rango óptimo de concentración de liposomas por encima del cual puede haber una reducción en los efectos

benéficos En otros experimentos también se observó una disminución en el efecto debido a que la concentración de los liposomas se disminuyó por debajo de un valor de 12×10^4 liposomas por ml

Ejemplo 4

Se prepararon liposomas de la formulación PG 100% y con un tamaño promedio de 100 ± 20 nm de acuerdo con los métodos estándar Se sensibilizaron inyectaron y estimularon cuatro grupos (grupos A-D) de 10 ratones de acuerdo con el procedimiento y el programa descritos en el Ejemplo 3 con las siguientes cantidades de liposomas de PG 100% administrados en una suspensión de 50 μ l

Grupo A – 6×10^7

Grupo B – 6×10^6

Grupo C – 6×10^5

Grupo D – 6×10^4

Los resultados junto con el control PBS del Ejemplo 4 se muestran en la FIG 4 en la forma de un gráfico de barras similar Cabe destacar una reducción significativa en la hinchazón de oreja en comparación con el grupo control para cada uno de los grupos de prueba pero con poca diferencia entre los distintos grupos

Ejemplo 5

Se prepararon liposomas con una composición de PG 75% PC 25% y con un diámetro promedio de 50 100 200 o 400 nm utilizando los métodos estándar Fueron evaluados en el modelo CHS de murinos como en los Ejemplos 3 y 4 usando 6×10^5 liposomas en suspensiones de 50 μ l para cada inyección y el programa y procedimiento de sensibilización-inyección-estímulo

como en el Ejemplo 3 Los grupos utilizados fueron

- Grupo A - Liposomas de 50 nm
- Grupo B - Liposomas de 100 nm
- Grupo C - Liposomas de 200 nm
- Grupo D - Liposomas de 400 nm
- Grupo E - Sin liposomas

Los resultados se muestran en la FIG 5 El resultado con el grupo D usando liposomas de 400 nm de diámetro no es significativamente diferente del grupo control (grupo E) lo cual es indicativo de un rango crítico probable de tamaño para este modelo

Ejemplo 6

Se diluyó una suspensión madre de liposomas de PG 75% con un diámetro promedio de 100 ± 20 nm que contenía 4.8×10^{14} liposomas por ml para obtener una suspensión inyectable que contenía 6×10^8 liposomas por ml Las suspensiones liposomales se usaron para inyecciones en ratones con el fin de determinar el efecto sobre la hinchazón de oreja en el modelo DHS en munos Al igual que en el Ejemplo 1 se usaron ratones hembra BALB/c (Jackson Laboratones) de 6-8 semanas y con un peso de 19-23 g

Los animales fueron asignados a 3 grupos con 10 animales en cada uno El grupo control (grupo C) recibió inyecciones con PBS solamente Los animales de los grupos A y B recibieron inyecciones con 50 μ l de una suspensión que contenía 6×10^8 liposomas

Protocolo

Los días 13-18 los ratones recibieron inyecciones con los liposomas de PG 75% como se indicará más adelante Los liposomas fueron inyectados en

133 +

un volumen de 50 µl por inyección IM es decir 600 000 liposomas por inyección para una administración total sobre todo el período de prueba de 3 600 000 liposomas Los procedimientos de sensibilización y estímulo tuvieron lugar como se describió en el Ejemplo 2

DÍA	TRATAMIENTO
1	Sensibilizados
6	Estimulados
7	Medidos
12	Estimulados
13	Medidos e inyectados
14	Inyectados
15	Inyectados
16	Medidos e inyectados
17	Inyectados
18	Inyectados y estimulados
19	Medidos

Resultados

Los resultados se muestran gráficamente en la FIG 6 adjunta y muestran que el PG 75% es eficaz en el modelo DHS el día 16 24 horas después de la tercera inyección después del segundo estímulo

Ejemplo 7

Se prepararon liposomas compuestos de cardiolipina 100% (CL) y con un diámetro promedio de 100 ± 20 nm utilizando métodos estándar Se utilizaron a una dosificación de 6 x 10⁵ liposomas por cada 50 µl por inyección en el modelo DHS de munnos como se describió en el Ejemplo 6 Se

compararon los datos obtenidos con los animales inyectados con liposomas CL (grupo A, 10 animales) con los datos obtenidos con los animales que solamente recibieron PBS (grupo B 10 animales) Los procedimientos de sensibilización inyección y estímulo fueron como se describió en el Ejemplo 2 Los resultados de la medición del espesor de la oreja efectuada el día 19 24 hs después de la 6ª inyección se muestran en la FIG 7 Los resultados muestran una reducción significativa en la hinchazón de oreja en el grupo de prueba inyectado con CL (Grupo A)

Ejemplo 8

Se prepararon liposomas de 100 nm de diámetro promedio y que comprendían ya sea cardiolipina 100% o cardiolipina 75% y PC 25% mediante métodos estándar Se sensibilizaron tres grupos (grupos A-C) de 10 ratones el día 1 El grupo control recibió inyecciones de PBS los días 1 2 y 6 (grupo C) Los otros dos grupos recibieron inyecciones de 6×10^5 liposomas de cardiolipina 100% (grupo A) o de 6×10^5 liposomas de cardiolipina 75% (grupo B) todos los liposomas en 50 μ l por inyección de acuerdo con el mismo programa Los ratones fueron estimulados el día 7 y se midió el espesor de la oreja como se describió en los ejemplos anteriores

En la FIG 8 se muestran las mediciones medias de cada grupo Ambos grupos que recibieron liposomas CL muestran una supresión estadísticamente significativa de CHS en comparación con el grupo control

Ejemplo 9

Con el fin de estudiar los mecanismos celulares y moleculares responsables de la función cognitiva se utilizó el modelo de potenciación a largo plazo (LTP) en animales La LTP es una forma de la plasticidad sináptica

13 ✓

que tiene lugar en el hipocampo que ha sido propuesto como el sustrato biológico para el aprendizaje y la memoria (Bliss et al Nature 361 31-39 (1990)) En ratas la LTP se puede monitorear electrofisiológicamente mediante métodos bien conocidos por los especialistas en el arte Los animales son sacrificados después con el fin de investigar los cambios bioquímicos en los tejidos del hipocampo La comparación de los resultados de los datos electrofisiológicos con los cambios bioquímicos en el hipocampo es de utilidad para determinar la manera en que se pueden alterar los sucesos celulares responsables de la LTP en los animales que padecen enfermedades o trastornos asociados con una neuroinflamación tal como envejecimiento estrés mal de Alzheimer y una infección bacteriana

La administración sistémica de lipopolisacáridos (LPS) un componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas provoca activación del sistema inmune porque induce un incremento de las citoquinas pro-inflamatorias tal como IL-1 β Como se indicó previamente un ejemplo de un déficit neuronal inducido por LPS y IL 1 β es el deterioro de la LTP en el hipocampo Un indicador de la LTP es la pendiente promedio del conjunto de potenciales excitatorios post-sinápticos (epsp) Con la estimulación tetánica la pendiente epsp (%) aumenta marcadamente lo cual es indicativo de una mayor actividad sináptica La inhibición de la LTP inducida por LPS reduce el incremento de la pendiente y/o hace que la pendiente epsp se revierta más rápidamente hacia la línea basal lo cual indica que la mayor actividad sináptica es breve Por consiguiente se pueden usar las mediciones de la pendiente epsp (%) a intervalos de tiempo determinados después de un estímulo tetánico para reflejar la memoria y la pérdida de la misma después de un estímulo

Inflamatoro así como la inflamación en el hipocampo del cerebro

Se prepararon liposomas con un diámetro promedio de 100 ± 20 nm de acuerdo con los métodos estándar conocidos en el arte y estaban compuestos de PG 75% y PC 25%. Se diluyó una suspensión madre de los liposomas que contenían aproximadamente 2.9×10^{14} liposomas por ml con PBS para obtener una suspensión inyectable que contenía aproximadamente 1.2×10^7 liposomas por ml. Esta suspensión se utilizó después para inyectar en ratas con el fin de determinar el efecto sobre el desarrollo de la LTP inducida por LPS. Para estos experimentos se utilizaron ratas macho Wistar (BioResources Unit, Trinity College Dublin) que pesaban unos 300 g aproximadamente.

Los animales fueron asignados a cuatro grupos de 8 animales en cada grupo que fueron tratados de la siguiente manera:

Grupo A	salina + control
Grupo B	- salina + PG
Grupo C	- LPS + control
Grupo D	LPS + PG

Se inyectaron 150 μ l de cada una de las preparaciones identificadas previamente mediante inyección IM los días 1, 13 y 14. Los grupos B y D recibieron un total de 5 400 000 liposomas (1 800 000 liposomas por inyección). El procedimiento de LTP y el procedimiento de preparación de tejidos se llevaron a cabo el día 0.

Procedimiento de LTP

Las ratas fueron anestesiadas por inyección IP de uretano (1.5 g/kg). Las ratas recibieron LPS (100 μ g/kg) o salina por vía intraperitoneal. Tres horas después se les colocó un electrodo estimulador bipolar y un electrodo de

registro unipolar en la vía perforante y en la región del cuerpo celular dorsal del giro dentado respectivamente. Se aplicaron pulsos de prueba de 0.033 Hz y las respuestas se registraron durante 10 min antes y 45 min después de una estimulación de frecuencia alta (3 tandas de estímulos aplicados a intervalos de 30 seg 250 Hz para 200 ms).

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Se disecaron las siguientes piezas: el hipocampo, el giro dentado tetanizado y no tetanizado, la corteza y la corteza entorhinal sobre hielo. Luego fueron seccionadas y congeladas en 1 ml de solución de Krebs (composición de Krebs: mM NaCl 136, KCl 2.54, KH_2PO_4 1.18, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.18, NaHCO_3 16, glucosa 10, CaCl_2 1.13) que contenía DMSO 10%.

Resultados

Los resultados se muestran en la FIG. 9. El gráfico muestra la diferencia en el potencial excitatorio post-sináptico (epsp) en los cuerpos celulares de las células granulosas. Los datos son la media de siete a ocho observaciones para cada grupo de tratamiento y se expresan como el cambio porcentual medio en la pendiente epsp cada 30 s normalizada con respecto al valor medio de los 5 minutos inmediatamente previos a la estimulación tetánica. En la FIG. 9 se muestra que la inhibición de la LTP inducida por LPS en las sinapsis de las células granulosas de la vía perforante era superada por el pre-tratamiento con los liposomas PG. Los triángulos negros representan al grupo A (salina + control), los triángulos abiertos representan al grupo B (salina + PG), los cuadrados negros representan al grupo C (LPS + control) y los cuadrados abiertos representan al grupo D (LPS + PG).

En la FIG. 10 se muestra que el análisis de los valores medios 40-45

minutos después del estímulo post-tetánico indica que el conjunto de la pendiente epsp había disminuido en el grupo control-LPS (barras abiertas) y que los liposomas PG (barras a rayas) habían revertido significativamente este efecto ($*p<0.01$). Como un índice de la funcionalidad de la memoria y el aprendizaje, la mejora en la capacidad para mantener la LTP demostrada con este Ejemplo indica que el tratamiento es adecuado para demencias, por ejemplo el mal de Alzheimer y para el trastorno de la memoria.

Ejemplo 10

La IL-4 es una de las numerosas citoquinas que son secretadas por la subclase Th2 de linfocitos y es conocida por sus efectos anti-inflamatorios. En la FIG. 11 se muestra que la concentración de IL-4 en el hipocampo había aumentado significativamente en el grupo LPS que había sido tratado previamente con los liposomas PG ($*p<0.05$). Las barras abiertas representan el grupo control (grupo E) y las barras a rayas representan al grupo tratado con PG (grupo F). La IL-4 se midió con un ELISA y se expresa como PG de IL-4 por mg de proteína total.

Esta sensibilización de la citoquina anti-inflamatoria IL-4 en el cerebro es indicativo del uso del proceso y de la composición de las realizaciones preferidas de la presente invención en el tratamiento de un amplio rango de trastornos neuroinflamatorios, incluyendo mal de Parkinson, ALS, enfermedad desmielinizante inflamatoria crónica, CIPD y síndrome de Guillain Barré.

Ejemplo 11

La IL-1 β es una de las numerosas citoquinas secretadas por la subclase de linfocitos Th1 y es conocida por sus efectos proinflamatorios. Se extrajeron los bazo de animales tratados como se describió en el Ejemplo 9. Los grupos

C y D del mismo y se recolectaron los esplenocitos. Luego se prepararon de la siguiente manera:

En la FIG 12 se muestra que la concentración de IL-1 β en los esplenocitos era reducida significativamente en el grupo LPS que había sido pretratado con los liposomas PG (*p<0.05). La IL-1 β se midió con un ELISA y se expresó como picogramos de IL-1 β por mg de proteína total. Esto es indicativo de un efecto inflamatorio sistémico del proceso y de las composiciones de las realizaciones preferidas de la presente invención.

Ejemplo 12

La línea U937 es una línea celular de leucemia monocítica que se puede diferenciar en macrófagos con la administración de ésteres de forbol. El tratamiento con lipopolisacáridos (LPS), un componente de la pared celular de bacterias Gram negativas, estimula una respuesta inflamatoria en las células U937 con subsiguiente sensibilización de la expresión de numerosas moléculas inflamatorias incluyendo TNF α . Este modelo provee un sistema experimental para evaluar las terapias anti-inflamatorias. Los macrófagos se pueden cultivar en un medio de cultivo en presencia de una composición sospechada de ser anti-inflamatoria y luego se puede medir la expresión de TNF α .

Se prepararon liposomas con un diámetro promedio de 100 ± 20 nm de acuerdo con los métodos estándar conocidos en el arte y tenían una composición de fosfatidilglicerol 75% (PG), fosfatidilcolina 25% (PC). La concentración de la composición madre de liposomas era de aproximadamente 40 mM de lípidos y se diluyó hasta obtener las siguientes concentraciones finales en el ensayo.

140 H0

fosfatidilglicerol (PG) 100 μM

PG 40 μM

PG 10 μM

PG 4 0 μM

PG 1 μM

Las células U937 se cultivaron mediante crecimiento en medio RPMI (GIBCO BRL) suplementado con suero fetal bovino (FBS) 10% y penicilina/estreptomicina 1% y luego se cultivaron a 37 °C en una atmósfera que contenía CO₂ 5%. Se sembraron 5 x 10⁵ células en las cavidades de placas de 6 cavidades y fueron diferenciadas en macrófagos mediante tratamiento con acetato minstato de forbol (PMA) 150 nM durante 2 3 días. Después se sustituyó el medio celular por medio completo una vez que las células U937 se habían diferenciado en macrófagos. Las células se cultivaron luego durante otras 24 hs con el fin de minimizar los efectos pleotrópicos debidos al tratamiento con PMA.

A continuación las células fueron sometidas a incubación de la siguiente manera

- Grupo A Solución amortiguadora de fosfato salina (PBS) como control negativo
- Grupo B LPS 10 ng/ml como control positivo
- Grupo C LPS 10 ng/ml + PG 100 μM
- Grupo D LPS 10 ng/ml + PG 40 μM
- Grupo E LPS 10 ng/ml + PG 10 μM
- Grupo F LPS 10 ng/ml + PG 4 0 μM
- Grupo G LPS 10 ng/ml + PG 1 μM

Las células se incubaron como se describió previamente a 37 °C en CO₂ 5%. Después de 18 hs se recolectaron los sobrenadantes de cada tratamiento y fueron evaluados por su contenido de TNF- α usando el conjunto de elementos del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas estándar (ELISA) Quantikine (R&D systems Minneapolis EE UU)

Resultados

En la FIG 13 se muestra la cantidad de TNF- α secretada en PG por ml. Los resultados demuestran que las células U937 diferenciadas en macrófagos expresan niveles muy bajos de TNF- α bajo condiciones normales. Sin embargo, una vez que eran expuestas a LPS secretaban grandes cantidades de TNF- α hacia el medio circundante, lo cual es indicativo de estrés celular. La incubación de las células con liposomas PG inhibe la secreción de TNF- α de una manera dependiente de la dosis, donde la concentración más alta de 100 μ M dio como resultado una disminución del 98% y aún la concentración más baja de 1 μ M causó una disminución del 58% en la expresión de TNF- α .

Ejemplo 13

Con el fin de determinar el efecto de los liposomas PG de la realización preferida de la presente invención sobre la función endotelial, se determinó el contenido de endotelina 1 (ET-1) en las orejas de ratones sometidos a los estudios CHS como se describió en el Ejemplo 3. La endotelina-1 es un poderoso agente vasoconstrictor que presenta acciones inotrópicas y mitogénicas, modula la homeostasis de sales y agua y cumple una función importante en el mantenimiento del tono vascular y la presión sanguínea. Varias líneas de evidencia indican que la ET-1 endógena puede contribuir en la fisiopatología de las afecciones asociadas con una vasoconstricción sostenida.

tal como una insuficiencia cardíaca. En la insuficiencia cardíaca se observan niveles elevados de ET-1 y big ET-1 [proendotelina] en circulación (Giannesi D, Del Ry S, Vitale RL. "The role of endothelins and their receptors in heart failure" *Pharmacol Res* 2001 Feb 43; 2: 111-26). Por consiguiente, la ET-1 es un marcador de la función endotelial y un incremento en la producción de ET-1 en los tejidos es indicativo de una función endotelial deteriorada.

Con el fin de determinar la expresión de ET-1, se recolectaron orejas de ratón (oreja derecha estimulada) 24 hs después del estímulo en los experimentos CHS. Se obtuvieron orejas de los ratones inyectados por vía intramuscular con PBS durante 6 días (grupo A) y de los ratones inyectados por vía intramuscular con liposomas de PG 75%/PC 25% (600 000 liposomas/inyección, grupo B). Las orejas se guardaron en RNAlater a -20°C hasta la extracción del ARN. Se extrajo el ARN y se generó ADNc usando la transcriptasa inversa (RT) junto con cebadores específicos para ET-1 como control interno. La PCR también se realizó usando cebadores específicos de β -actina. Los productos de la PCR se resolvieron sobre un gel de agarosa 1.5% y las bandas de ADN fueron cuantificadas mediante análisis densitométrico. Se calculó la relación de ET-1/ β -actina.

Preparación de la PCR

Mezcla para PCR (ET-1)

5 μl de solución amortiguadora para PCR (10 x)

1.5 μl de MgCl_2 (50 mM)

1 μl de dNTP (10 mM)

0.5 μl de Cebador 1 (25 μM)

Mezcla para PCR (β -actina)

5 μl de solución amortiguadora para PCR (10 x)

1.5 μl de MgCl_2 (50 mM)

1 μl de dNTP (10 mM)

1 μl de Cebador 1 (10 μM)

143 ~~147~~

0.5 µl de Cebador 2 (25 µM)	1 µl de Cebador 2 (10 µM)
0.25 µl de TAQ	0.25 µl de TAQ
2.5 µl de ADNc	2.5 µl de ADNc
38 µl de agua	37.75 µl de agua
50 µl en total	50 µl en total

Cebadores

ET-1(r) 5'-CAG CAC TTC TTG TCT TTT TGG-3
ET 1(f) 5'-CCA AGG AGC TCC AGA AAC AG-3
β-Actina(f) 5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA-3
β-Actina(r) 5'-CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3

Ajustes de la PCR

94°C 5 minutos
94 °C 30 seg
60 °C 30 seg

Este ciclo se repitió por 30 ciclos

72 °C 60 seg
72 °C 10 minutos
4 °C Embebimiento

Después de 6 inyecciones diarias de los liposomas PG 75% el nivel de ET-1 había disminuido en un 36% con relación a los ratones control que habían recibido PBS durante el mismo régimen de inyecciones. Los resultados se muestran gráficamente en la FIG. 14. Esta disminución indica un efecto benéfico que es el resultado de la inyección de los liposomas de la realización preferida de la invención sobre la función endotelial en un paciente mamífero a través de una reducción en la inflamación mediada por Th1.

Ejemplo 14

La molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) es una molécula de la superficie celular que es expresada por diversos tipos celulares incluyendo leucocitos y células endoteliales. Está comprometida en la adhesión de los monocitos a las células endoteliales y cumple una función en los procesos inflamatorios y en el sistema de defensa del huésped mediada por células T. La expresión de ICAM-1 probablemente contribuya en las manifestaciones clínicas de diversas enfermedades predominantemente porque interfiere con la función inmune normal. Entre ellas se pueden mencionar las formas malignas (por ejemplo melanoma y linfomas) muchos trastornos inflamatorios (por ejemplo asma y trastornos autoinmunitarios) aterosclerosis isquemia algunos trastornos neurológicos y trasplante de órganos alogénicos (Van de Stolpe A, van der Saag PT. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* (1996) 74: 13-33).

Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) constituyen una línea celular primaria de células endoteliales que se aíslan de la vena del cordón umbilical de la siguiente manera:

Se prepararon frascos T75 por recubrimiento con gelatina 0.2% (5-7 ml/frasco) por un mínimo de 15/20 minutos o durante la noche. Después se eliminó el exceso. El cordón umbilical se roció con etanol 70% antes del procedimiento y se recortó toda porción de placenta que aún permanecía unida al cordón. A continuación el cordón se cortó hasta una longitud de aproximadamente 5-6 pulgadas. El cordón tiene dos arterias que son de pared gruesa y una vena que es más grande y de pared delgada. Se localizó la vena y luego se introdujo el borde aserrado de un tapón en la misma. Luego se

utilizaron aproximadamente 20 cm de hilo para atar el cordón sobre el tapón

A continuación el cordón se lavó varias veces con solución amortiguadora de fosfato salina (PBS) hasta que el PBS salía traslúcido. A continuación se introdujeron 15-20 ml de solución de colagenasa en el cordón se envolvió en papel metalizado y se incubó todo durante 15 minutos a 37 °C. Después de la incubación se recortó el extremo atado del cordón y se drenó la colagenasa en un tubo de 50 ml. Después la colagenasa se volvió a pasar a través del cordón se manipuleo al cordón con el fin de desprender las células endoteliales y luego se pasó PBS por el cordón y se recolectó en el mismo tubo que contenía la solución de colagenasa. Esta solución se centrifugó a 1600 RPM se retiró el sobrenadante y el pellet se volvió a suspender en 10-12 ml de medio completo M199. Finalmente el medio que contenía las células se introdujo en los frascos gelatinizados.

Se prepararon liposomas con un diámetro promedio de 100 ± 20 nm de acuerdo con los métodos estándar conocidos en el arte y con una composición de fosfatidilglicerol (PG) 75% fosfatidilcolina (PC) 25%. La concentración de la composición madre de liposomas era de 40 mM de lípidos y se diluyó hasta 100 μ M en el ensayo.

Las HUVEC se separaron en varios frascos para cultivo de tejidos se dejó que se adhirieran a la superficie de los frascos y luego se trataron de la siguiente manera:

Grupo A	PBS como control negativo
Grupo B	LPS 500 ng/ml como control positivo
Grupo C	LPS 500 ng/ml + PG 100 μ M
Grupo D	LPS 500 ng/ml + PC 100 μ M

Las células se incubaron a 37 °C CO₂ 5% Después de 18 hs se recolectaron los sobrenadantes de cada tratamiento y se evaluó el contenido de ET-1 usando un conjunto de elementos estándar para ELISA (obtenido de Assay Designs) y las células se cosecharon para analizar la ICAM-1 de la siguiente manera

Las células se lavaron primero con PBS y luego se incubaron con una solución amortiguadora de disociación de células a 37 °C durante 25-30 min A continuación las células se lavaron por centrifugación y se incubaron con un anticuerpo anti-CD54 (ICAM-1) durante 30 minutos Luego se agregó un anticuerpo secundario FITC y se incubó con las células igual que antes Finalmente las células se resuspendieron en 1 ml de PBS y se analizó el contenido de fluorescencia con un citómetro de flujo

Resultados

Los resultados se muestran en la FIG 15 una representación gráfica del porcentaje de células de coloración positiva para ICAM-1 en los respectivos cultivos Cabe destacar que la cantidad de células de coloración positiva en el cultivo que contiene liposomas PG se había reducido al nivel del control negativo y era mucho menor que el nivel del control positivo

Ejemplo 15

Se cultivaron células microgliales (macrófagos de cerebro) y se midió la secreción de TNF- α una citoquina inflamatoria Las células fueron estimuladas con la inmunoglobulina (IgG) de pacientes que padecían ALS y como resultado de ello la secreción de TNF- α aumentó aproximadamente en 800 veces Cuando las mismas células eran cultivadas en presencia de IgG ALS y de liposomas PG la secreción de TNF- α disminuyó aproximadamente en un 75%

**Indicativo del potencial de las realizaciones preferidas de la presente invención
en el tratamiento de ALS Los resultados se muestran en la FIG 16**

REIVINDICACIONES

- 1 Una composición de material capaz de producir una respuesta anti-inflamatoria *in vivo* en un mamífero CARACTERIZADA PORQUE comprende cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico de un tamaño que comprende entre 20 nanómetros (nm) y 500 micrómetros (µm) aproximadamente que comprenden una pluralidad de grupos glicerol-fosfato o grupos que se pueden convertir a su vez en grupos glicerol-fosfato
- 2 La composición acorde con la cláusula 1 CARACTERIZADA PORQUE los cuerpos de inclusión son liposomas
- 3 La composición acorde con la cláusula 2 CARACTERIZADA PORQUE dicha composición está esencialmente libre de entidades no lipídicas aceptables para uso farmacéutico
- 4 La composición acorde con la cláusula 2 CARACTERIZADA PORQUE dicha composición está libre de entidades no lipídicas aceptables para uso farmacéutico
- 5 La composición acorde con la cláusula 2 3 ó 4 CARACTERIZADA PORQUE los liposomas comprenden entre 60 y 100% aproximadamente de fosfatidilglicerol (PG)
- 6 La composición acorde con la cláusula 5 CARACTERIZADA PORQUE los liposomas comprenden entre un 70% - 90% aproximadamente de fosfatidilglicerol
- 7 La composición acorde con la cláusula 5 ó 6 CARACTERIZADA PORQUE el resto del liposoma comprende fosfatidilcolina
- 8 La composición acorde con cualquiera de las cláusulas 2-7 CARACTERIZADA PORQUE los liposomas tienen un tamaño entre 50-500

nanómetros aproximadamente

9 La composición acorde con la cláusula 8 CARACTERIZADA PORQUE los liposomas tienen un tamaño entre 80–120 nanómetros aproximadamente

10 Un método de tratamiento de un trastorno mediado por el funcionamiento de células T CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración a un paciente mamífero de una cantidad eficaz de cuerpos de inclusión que transportan una cantidad eficaz de grupos glicerol-fosfato para inhibir y/o reducir el avance de dicho trastorno mediado por el funcionamiento de células T

11 Un método para el tratamiento de un trastorno inflamatorio CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración a un paciente de una cantidad eficaz de cuerpos de inclusión que transportan una cantidad eficaz de grupos glicerol-fosfato para inhibir y/o reducir el avance de dicho trastorno inflamatorio

12 Un método para el tratamiento de un trastorno de la función endocrina CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración a un paciente mamífero de una cantidad eficaz de cuerpos de inclusión que transportan una cantidad eficaz de grupos glicerol-fosfato para inhibir y/o reducir el avance de dicho trastorno de la función endocrina

13 Un método para el tratamiento de un trastorno inmunológico caracterizado por la expresión inapropiada de citoquinas CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración a un paciente mamífero de una cantidad eficaz de cuerpos de inclusión que transportan una cantidad eficaz de grupos glicerol-fosfato para inhibir y/o reducir el avance de dicho trastorno de la función endocrina

150

14 Un método para el tratamiento o la profilaxis de un trastorno cardíaco en mamíferos cuya presencia o susceptibilidad a la misma es detectable por observación de un intervalo QT-c prolongado en el electrocardiograma del paciente CARACTERIZADO PORQUE comprende la administración a un paciente mamífero que padece o que es susceptible de padecer un trastorno cardíaco de mamíferos de una composición farmacéutica que comprende cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico y un vehículo aceptable para uso farmacéutico donde la superficie de dichos cuerpos de inclusión transportan como componente principal grupos glicerol-fosfato

15 El método acorde con cualquiera de las cláusulas 10-14 CARACTERIZADO PORQUE los grupos glicerol-fosfato comprenden entre un 60 y 100% aproximadamente de grupos sobre dichos cuerpos de inclusión

16 El método acorde con la cláusula 15 CARACTERIZADO PORQUE los grupos glicerol fosfato comprenden un 70-90% aproximadamente de los grupos sobre dichos cuerpos de inclusión

17 El método de cualquiera de las cláusulas 10-16 CARACTERIZADO PORQUE los cuerpos de inclusión están esencialmente libres de entidades no lipídicas aceptables para uso farmacéutico

18 El método de cualquiera de las cláusulas 10-17 CARACTERIZADO PORQUE los cuerpos de inclusión están libres de entidades no lipídicas aceptables para uso farmacéutico

19 El método de cualquiera de las cláusulas 10-18 CARACTERIZADO PORQUE los grupos restantes comprenden fosfatidilcolina

20 Una composición farmacéutica en forma de dosificación unitaria para administrar a un paciente mamífero CARACTERIZADA PORQUE comprende

cuerpos de inclusión aceptables para uso farmacéutico y un vehículo aceptable para uso farmacéutico donde al menos una porción de los cuerpos de inclusión tienen un tamaño en el rango entre 20 nm y 500 μ m aproximadamente y donde las superficies de dichos cuerpos de inclusión comprenden grupos glicerol-fosfato o grupos que se pueden convertir a su vez en grupos glicerol-fosfato donde dicha dosificación unitaria comprende entre aproximadamente 500 y aproximadamente 2.5×10^9 cuerpos de inclusión

21 La composición farmacéutica de la cláusula 20 CARACTERIZADA PORQUE los cuerpos de inclusión son liposomas

22 La composición farmacéutica de la cláusula 21 CARACTERIZADA PORQUE la composición está esencialmente libre de entidades no lipídicas aceptables para uso farmacéutico

23 La composición farmacéutica de la cláusula 21 CARACTERIZADA PORQUE la composición está libre de entidades no lipídicas aceptables para uso farmacéutico

24 La composición farmacéutica de la cláusula 21 22 ó 23 CARACTERIZADA PORQUE los liposomas comprenden grupos glicerol-fosfato que comprenden entre un 60 y 100% aproximadamente de fosfatidilglicerol PG

25 La composición farmacéutica de la cláusula 24 CARACTERIZADA PORQUE los liposomas comprenden un 70–90% de PG

26 La composición farmacéutica de la cláusula 25 CARACTERIZADA PORQUE el resto del liposoma es fosfatidilcolina

27 El uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno inflamatorio un trastorno inmunológico un trastorno mediado por

células T un trastorno de la función endocrina un trastorno neurodegenerativo o un trastorno neuroinflamatorio en un paciente mamífero CARACTERIZADO PORQUE es para la composición farmacéutica reivindicada en cualquiera de las cláusulas 20–26

153

CUERPOS DE INCLUSIÓN QUE TRANSPORTAN GLICEROL-FOSFATO ACEPTABLES PARA USO FARMACÉUTICO

RESUMEN

Composiciones sintéticas y semi-sintéticas tridimensionales que presentan actividad biológica y usos de las mismas en el tratamiento y/o la profilaxis de numerosos trastornos en pacientes mamíferos. Más particularmente se relaciona con preparaciones y usos de cuerpos de inclusión sintéticos y semi-sintéticos tal como liposomas que después de su introducción en el cuerpo de un paciente produce efectos benéficos anti-inflamatorios, protector de órganos e inmunoreguladores. La invención también se relaciona con tratamientos y composiciones para aliviar enfermedades inflamatorias y autoinmunes y los síntomas de los mismos.

154

TEXTO DE LAS FIGURAS

INGLÉS	ESPAÑOL
FIGURA 1	
Ear swelling	Hinchazón de la oreja
FIGURA 2	
Net Ear Swelling (x10 ⁻² mm)	Hinchazón neta de la oreja (x10 ⁻² mm)
FIGURA 3	
Net Ear Swelling (x10 ⁻² mm)	Hinchazón neta de la oreja (x10 ⁻² mm)
FIGURA 4	
Net Ear Swelling (x10 ⁻² mm)	Hinchazón neta de la oreja (x10 ⁻² mm)
FIGURA 5	
Net Ear Swelling (x10 ⁻² mm)	Hinchazón neta de la oreja (x10 ⁻² mm)
FIGURA 6	
Net Ear Swelling (x10 ⁻² mm)	Hinchazón neta de la oreja (x10 ⁻² mm)
FIGURA 7	
Net Ear Swelling (x10 ⁻² mm)	Hinchazón neta de la oreja (x10 ⁻² mm)
FIGURA 8	
Net Ear Swelling (x10 ⁻² mm)	Hinchazón neta de la oreja (x10 ⁻² mm)
FIGURA 9	
LTP (EPSP slope) in perforant path granule cell synapses – effect of PG	LTP (pendiente EPSP) en las sinapsis de células granulosas-vía perforante – efecto de PG
Epsp Slope (%)	Pendiente Epsp (%)
Time (min)	Tiempo (min)

155
155

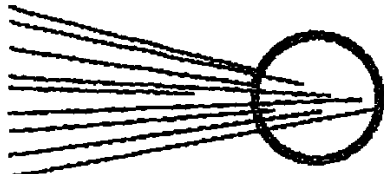
FIGURA 10	
LTP (EPSP slope) in perforant path-granule cell synapses – 40-45 min post HFS	LTP (pendiente EPSP) en las sinapsis de células granulosas-vía perforante 40-45 min después de HFS
Epsp Slope (% change)	Pendiente Epsp (cambio %)
Saline	Salina
Data expressed as means with standar errors	Datos expresados como la media con errores estándar
*p<0 05 Student's t-test	*p<0,05 según la prueba t de Student
FIGURA 11	
IL-4 concentration in Hippocampus	Concentración de IL-4 en el hipocampo
Saline	Salina
Data expressed as means with standar errors	Datos expresados como la media con errores estándar
*p<0 05 Student's t-test	*p<0,05 según la prueba t de Student
FIGURA 12	
IL-1β concentration in single cell suspension	Concentración de IL-1β en una suspensión de células individuales
Values are expressed as the mean with standar error	Los valores están expresados como la media con el error estándar
*p<0 05 Student's t-test	*p<0,05 según la prueba t de Student
FIGURA 14	
ET 1 in the Challenged Mouse Ear	ET-1 en la oreja de ratón estimulada
Relative RNAm of ET 1 (ET 1/β-Actn)	ARNm relativo de ET-1 (ET 1/β-actna)

156
+56

FIGURA 15	
% Positive Cells	% de células positivas

P-564

ST 15
Rec'd 22/04



RIDOUT & MAYBEE LLP

Barristers & Solicitors
Technology Law

Patent & Trade Mark Agents
Intellectual Property Law

Roland H. Joachim
Direct Dial (416) 865-3507
E-mail rjoachim@ridoutmaybee.com

July 21 2004

BY FACSIMILE AND MAIL
011 41 22 336 8995

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
Switzerland

22 JUL 2004 17:08

Dear Sir

Re WIPO International Patent Application No PCT/CA03/00065
Applicant: Vasogen Ireland Limited
Title PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE PHOSPHATE GLYCEROL
CARRYING BODIES
Our File 29312-0177

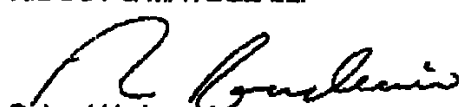
The International Bureau is requested to note that U S Patent Application No 10/061 381 filed January 22, 2002, from which this international application claims priority has been converted to Provisional Application No 60/421 116

Enclosed in this regard is a copy of a "Decision Granting Request to Convert to Provisional" issued by the U S Patent and Trademark Office on February 4 2003 informing the applicant's U S patent attorneys of the provisional application number. Also enclosed is an updated filing receipt dated February 4, 2003 confirming the provisional application number and the filing date of January 22 2002.

It will be noted from the enclosed correspondence that Provisional Application No 60/421 116 was not assigned to the priority application until after this international application was filed.

Favourable consideration of this application is respectfully requested.

Yours very truly
RIDOUT & MAYBEE LLP


Roland H. Joachim
RHJ mp
End

cc European Patent Office (by fax and mail)

One Queen St. East
Suite 2400 Toronto
Canada, M5C 3B1

Telephone 416 863 1482
Facsimile 416 362 0823
Email ndb@ridoutmaybee.com

Also in Ottawa and
Montreal



Commissioner for Patents
Washington, DC 20591

APPLICATION NUMBER	FILING/RECEIPT DATE	FIRST NAMED APPLICANT	ATTY DOCKET NO.
10/051 381	01/22/2002	Anthony B. Bolton	033136 249

Gerald F. Swiss
BURNS DOANE SWECKER & MATHIS LLP
P O Box 1404
Alexandria VA 22313-1404

CONFIRMATION NO



*OC000000008468978

Date Mailed 02/04/2003

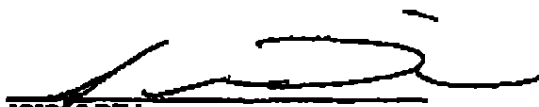
DECISION GRANTING REQUEST TO CONVERT TO PROVISIONAL

This is a decision on the request under 37 CFR 1.53(c)(2) received in the U.S. Patent and Trademark Office on 05/13/2002 to convert the above-identified application to a provisional application under 35 U.S.C. 111(b) and 37 CFR 1.53(c).

The request is granted.

The application will be processed in the Office of Initial Patent Examination (OIPE) as a provisional application under 35 U.S.C. 111(b) and 37 CFR 1.53(c) including the assignment of a new provisional application number.

The provisional application number is 60/421,116. The filing receipt for the provisional application number will be mailed to the applicant by OIPE in due course.


JOHN S. DILL
Office of Initial Patent Examination
(703) 308-0910

PART 1 ATTORNEY/APPLICANT COPY

160

The applicant has been granted a license under 35 U S C 184 if the phrase "IF REQUIRED FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" followed by a date appears on this form. Such licenses are issued in all applications where the conditions for issuance of a license have been met, regardless of whether or not a license may be required as set forth in 37 CFR 5.15. The scope and limitations of this license are set forth in 37 CFR 5.15(a) unless an earlier license has been issued under 37 CFR 5.15(b). The license is subject to revocation upon written notification. The date indicated is the effective date of the license unless an earlier license of similar scope has been granted under 37 CFR 5.13 or 5.14.

This license is to be retained by the licensee and may be used at any time on or after the effective date thereof unless it is revoked. This license is automatically transferred to any related applications(s), filed under 37 CFR 1.53(d). This license is not retroactive.

The grant of a license does not in any way lessen the responsibility of a licensee for the security of the subject matter as imposed by any Government contract or the provisions of existing laws relating to espionage and the national security or the export of technical data. Licensees should apprise themselves of current regulations especially with respect to certain countries, of other agencies particularly the Office of Defense Trade Controls, Department of State (with respect to Arms, Munitions and Implements of War (22 CFR 121-128)), the Office of Export Administration, Department of Commerce (15 CFR 370.10 (j)), the Office of Foreign Assets Control, Department of Treasury (31 CFR Parts 500+) and the Department of Energy.

NOT GRANTED

No license under 35 U S C 184 has been granted at this time. If the phrase "IF REQUIRED FOREIGN FILING LICENSE GRANTED" DOES NOT appear on this form, Applicant may still petition for a license under 37 CFR 5.12 if a license is desired before the expiration of 6 months from the filing date of the application. If 6 months has elapsed from the filing date of this application and the licensee has not received any indication of a secrecy order under 35 U S C 181, the licensee may foreign file the application pursuant to 37 CFR 5.15(b).



FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Ryni
Technologies S.A.
Sede: Calle 100 No. 100-100, San José, Costa Rica

61

Expediente No		No de Unidades	No de Follo
Item			
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA	✓	✓
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA	✓	✓
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS.		
Observaciones: <i>Set Final</i>			

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
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 o 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

Fecha

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 04073074 00000000

Folios: 161

Fecha (MM): 2004-08-03 16:23:03

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

163
554

2020

Bogotá D C

Doctor(a)
DILIA MARÍA RODRIGUEZ
Apoderado
VASOGEN IRELAND LIMITED

Oficio N° 000011

ASUNTO

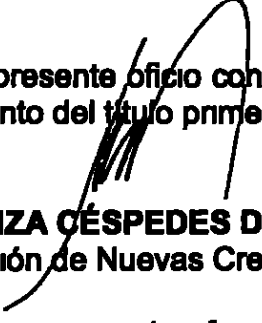
Radicación N°	04-75074
Solicitud internacional	PCT/IB03/00534
Fecha inicio fase nacional	2004-08-21
Trámite	011
Evento	379
Actuación	430
Folios	001

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 Unica de la Superintendencia de Industria y Comercio se le comunica que

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art 26-k) Decisión 486)
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante cuando éste fuere una persona jurídica

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 Unica N° 10 de 2001


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

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha

202063 15 de Julio 2004