

Señores
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y C
Bogotá, D.C.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-106850- -00006-0000

Fecha: 2008-06-13 11:39:28 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 4

Re.: Código 011-379-444
Expediente No. 04-106.850
Fase Nacional de Solicitud
de Patente PCT ESPERION
LUV DEVELOPMENT, INC.

En relación con el expediente de la referencia y dando cumplimiento a la última providencia recaída sobre este asunto por medio del presente escrito me permito manifestarles lo siguiente:

1. Siguiendo precisas instrucciones de mi representada me adjunto sírvanse encontrar un nuevo capítulo reivindicatorio el cual ha sido revisado y corregido.
2. Teniendo en cuenta lo dispuesto por el Consejo de Estado en sentencia proferida dentro del Expediente No. 7684 el 22 de Octubre de 2004 y acogida por esa Superintendencia mediante memorando interno de fecha 22 de Diciembre de 2004 dirigido a los funcionarios de la Delegatura de Propiedad Industrial, no se hace necesario acompañar comprobante de pago por concepto de modificación de la solicitud por cuanto el nuevo pliego reivindicatorio se presenta a instancia de la Superintendencia en cumplimiento de lo ordenado por el artículo 45 de la Decisión 486.

De Usted Atentamente,


LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE
T.P. No 68.995 del C.S.J.

REIVINDICACIONES

1. Liposomas para la manufactura de un medicamento para prevenir, tratar o manejar una enfermedad o trastorno asociados con problemas de los lípidos, los cuales liposomas comprenden fosfolípidos y una capa acuosa, que tienen un diámetro promedio de entre 50 y 250 nm y que se formulan para ser usados en una sola dosis o en dosis divididas de entre 50 mg/kg y 300 mg/kg y conforme a un régimen de dosificación, en donde el mencionado régimen tiene un intervalo de dosificación de 4 a 10 días.
2. Los liposomas de la reivindicación 1, en donde éstos tienen un diámetro promedio de entre 50 y 150 nm, o de entre 50 y 200 nm, o de entre cerca de 100 y 200 nm, o entre cerca de 100 y 250 nm o entre cerca de 150 y 200 nm o entre cerca de 150 y 250 nm.
3. Los liposomas de las reivindicaciones 1 o 2, en donde éstos se administran en combinación con otras vesículas de fosfolípidos seleccionadas de entre el grupo compuesto por vesículas multilaminares, vesículas grandes unilaminares, vesículas pequeñas unilaminares, y mezclas de las mismas.
4. El fosfolípido de la reivindicación 3, en donde éste se selecciona de entre el grupo compuesto por la fosfatidilcolina del huevo, el fosfatidilglicerol del huevo, diestearylfosfatidilcolina, o diestearylfosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, lecitina, beta,gamma-dipalmitoil-alfa-lecitina, esfingomielina, fosfatidilserina, ácido diacyl-fosfatídico, fosfolípido ligado a glucolípido, cloruro de N-(2,3-di(9-(Z)-octadeceniloxy))-prop-1-il-N,N,N-trimetilamonio, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, cefalina, cardiolipina, cerebrósidos, dicetilfosfato, dioleoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilglicerol, dioleoilfosfatidilglicerol, palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina, di-estearoil-fosfatidilcolina, estearoil-palmitoil-fosfatidilcolina, di-palmitoil-fosfatidiletanolamina, di-estearoil-fosfatidiletanolamina, di-miristoil-fosfatidilserina, di-oleoil-fosfatidilcolina, oleoil-palmitoil fosfatidilcolina, y mezclas de los mismos.
5. El fosfolípido de la reivindicación 4, en donde éste es palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina.
6. Los liposomas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la enfermedad o padecimiento orgánico se selecciona de entre el grupo compuesto por aterosclerosis, fleboesclerosis o cualquier afección venosa en la cual se forman depósitos o placas que contienen colesterol u otro material dentro de la íntima o la media interna de las venas, síndromes coronarios agudos, angina incluidas angina estable, angina inestable, inflamación, inflamación vascular, inflamación cutánea, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad coronaria (EC), arritmias ventriculares, enfermedad vascular periférica, infarto de miocardio, comienzo de infarto de miocardio mortal, infarto de miocardio no mortal, isquemia, isquemia cardiovascular, ataques isquémicos transitorios, isquemia no relacionada con enfermedad cardiovascular, lesión por isquemia-reperusión,

necesidad disminuida de revascularización, trastornos de la coagulación, trombocitopenia, trombosis venosa profunda, pancreatitis, esteatohepatitis no alcohólica, neuropatía diabética, retinopatía, neuropatía diabética dolorosa, claudicación, psoriasis, isquemia crítica de una extremidad, impotencia, hiperlipidemia, hiperlipoproteinemias, hipoalfalipoproteinemias, hipertrigliceridemia, cualquier problema de estenosis que conduzca a patología isquémica, diabetes incluidas tipo 1 y tipo 2, ictiosis, ACV, placas vulnerables, enfermedad de Alzheimer, ulceración de la extremidad inferior, isquemia coronaria grave, linfoma, cataratas, disfunción endotelial, xantomas, disfunción de órgano final, enfermedad vascular, enfermedad vascular como resultado de tabaquismo y diabetes, enfermedad arterial coronaria y carotídea, placas establecidas retrógradas y encogidas, placas inestables, debilidad de la íntima del vaso, inestabilidad de la íntima del vaso, lesión endotelial, daño endotelial como resultado de procedimientos quirúrgicos, morbilidad asociada con enfermedad vascular, ulceraciones del lumen arterial, reestenosis como resultado de angioplastia con balón, and subindicaciones de los anteriores.

7. Los liposomas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el tratamiento fortalece la íntima de la pared vascular, estimula el reflujo de colesterol extravascular para transportarlo al hígado, modula la respuesta inmunitaria, moviliza el colesterol de las placas ateroscleróticas, ayuda a la cicatrización de las heridas, modifica las membranas, células, tejidos, órganos, región extracelular o estructura corporal.
8. Los liposomas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 7 en donde éstos son adecuados para administrarlos en combinación con o se ligan de forma adjunta a un compuesto seleccionado de entre el grupo compuesto por péptidos, paraoxonasa, lipasa de las lipoproteínas, Apo A-I, miméticos de Apo-A-I, variantes de A-I y combinaciones de los mismos.
9. Los liposomas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 8 en donde éstos se administran en combinación con pequeñas moléculas o fármacos que efectúan los niveles de colesterol.
10. Los liposomas de la reivindicación 9, en donde la molécula pequeña es una estatina, HDL reconstituida, HDL pequeña, o una partícula sintética de lipoproteína que simula la HDL.
11. Los liposomas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 10, en donde éstos se administran en combinación con uno o más agentes cardiovasculares, agentes antidiabéticos u otras sustancias terapéuticas.
12. Los agentes cardiovasculares de la reivindicación 11, en donde éstos se seleccionan de entre el grupo compuesto por aspirina, betabloqueadores, bloqueadores del calcio, heparina incluida la heparina de bajo peso molecular, agentes hipoglucemiantes, nitratos, inhibidores de IIb/IIIa, inhibidores de la ACE, fibratos y secuestradores de ácidos biliares.
13. Los liposomas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 6 a 11, en donde éstos se administran en una dosis de cerca de 30 mg/kg una vez a la semana o en una dosis de cerca de 100 mg/kg una vez a la semana, o en una dosis de cerca de 150 mg/kg una vez a la semana, o en una dosis

90 88
4

de cerca de 200 mg/kg una vez a la semana, o en una dosis de cerca de 250 mg/kg una vez a la semana, o en una dosis de cerca de 300 mg/kg una vez a la semana

14. Los liposomas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 6 a 11 y 13, en donde éstos se administran una vez.
15. Los liposomas de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 6 a 11 y 13 a 14, en donde éstos se administran de dos veces a catorce veces de conformidad con un régimen de dosificación, en donde el mencionado régimen de dosificación tiene un intervalo de dosificación semanal.
16. Liposomas que tienen un diámetro promedio de entre 50 y 250 nm y que se formulan para usarse en una sola dosis o en dosis divididas de entre 50 y 300 mg/kg para bajar los niveles de colesterol en un sujeto que tiene necesidad de ello, a la vez que se reducen o evitan los efectos adversos asociados con la terapia con liposomas, conforme a un régimen de dosificación, en donde el mencionado régimen tiene un intervalo de dosificación de 4 días o más.

D₁

91 89



US006139871A

United States Patent [19]

Hope et al.

[11] Patent Number: 6,139,871
[45] Date of Patent: Oct. 31, 2000

[54] LIPOSOME COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF ATHEROSCLEROSIS

0470437 2/1992 European Pat. Off. .
WO 88.09345 12/1988 WIPO .
WO 91/17424 11/1991 WIPO .

[75] Inventors: Michael J. Hope; Wendi Rodriguez, both of Vancouver, Canada

[73] Assignee: The University of British Columbia, Vancouver, Canada

[21] Appl. No.: 09/175,553

[22] Filed: Oct. 20, 1998

Related U.S. Application Data

[63] Continuation of application No. 08/507,170, Jul. 26, 1995, abandoned, which is a continuation of application No. 08/206,415, Mar. 4, 1996, abandoned.

[51] Int. Cl.⁷ A61K 9/127; A61K 9/133
[52] U.S. Cl. 424/450; 428/402.2; 514/824
[58] Field of Search 424/450, 1.21, 424/9.321, 9.51, 417, 420, 94.3; 428/402.2; 514/824; 935/54

[56] References Cited

U.S. PATENT DOCUMENTS

4,186,183	1/1980	Steck et al. .	
4,217,344	8/1980	Vanlerberghe et al. .	
4,261,975	4/1981	Fullerton et al. .	
4,485,054	11/1984	Mezei et al. .	
4,774,085	9/1988	Fidler .	
4,812,314	3/1989	Barenholz	424/450
4,946,787	8/1990	Eppstein et al. .	
5,077,056	12/1991	Bally et al. .	
5,204,112	4/1993	Hope et al. .	
5,231,090	7/1993	Hsia	514/78
5,252,263	10/1993	Hope et al. .	
5,376,452	12/1994	Hope et al. .	
5,736,157	4/1998	Williams .	
5,746,223	5/1998	Williams .	
5,843,474	12/1998	Williams .	
5,858,400	1/1999	Williams .	

FOREIGN PATENT DOCUMENTS

0 461 559 A2 6/1991 European Pat. Off. .

OTHER PUBLICATIONS

Williams BBA 875, p. 189, 1986.
Williams Perspectives in Biology & Media 27, p. 417, 1984.
Liu BBA 1022, p. 348, (1990).
Adams, et al., "Modification of aortic atheroma and fatty liver in cholesterol-fed rabbits by intravenous injection of saturated and polyunsaturated lecithins," *J. Pathol Bacteriol* 94:777-87 (1967).
Altman, et al., "Phospholipids in experimental atherosclerosis," *Arzneim Forsch* 24:11-16 (1974).
Aviram, et al., "Intralipid infusion abolishes ability of human serum to cholesterol-load cultured macrophages," *Atherosclerosis* 9:67-75 (1989).
Aviram, et al., "Macrophage cholesterol removal by triglyceride-phospholipid emulsions," *Biochem Biophys Res Commun* 155:709-713 (1988).
Bally, et al., "Novel procedures for generating and loading liposomal systems," in: *Liposomes as drug carriers: recent trends and progress* (Gregoriadis G., ed.), pp. 841-853, John Wiley & Sons Ltd.: Chichester, England, 1988.
Bialecki, et al., "Cholesterol enrichment increases basal and agonist-stimulated calcium influx in rat vascular smooth muscle cells," *J. Clin Invest* 88:1894-1900 (1991).
Blaton, et al., "The human plasma lipids and lipoproteins under influence of EPL-therapy," in: *Phosphatidylcholine* (Peeters, H., ed.), pp. 125-132, Springer-Verlag: Berlin, 1976.

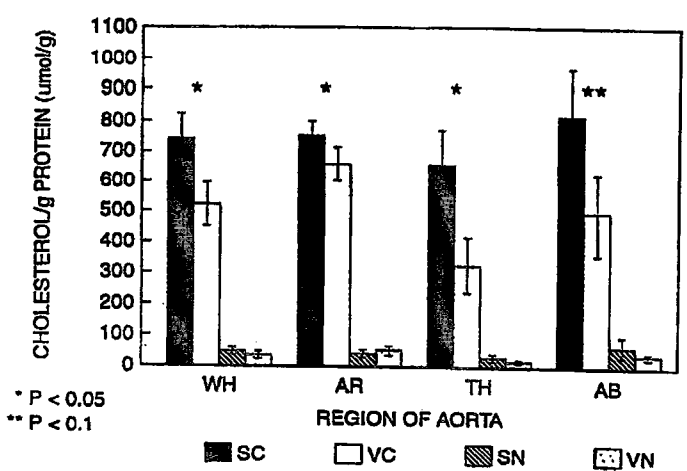
(List continued on next page.)

Primary Examiner—Gollamudi S. Kishore
Attorney, Agent, or Firm—Arnall Golden & Gregory, LLP

[57] ABSTRACT

The present invention provides compositions and methods for treating atherosclerosis. The compositions comprise unilamellar liposomes having an average diameter of 100-150 nanometers. Methods for treating atherosclerosis employing the compositions of the present invention are also provided.

6 Claims, 12 Drawing Sheets



1

LIPOSOME COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF ATHEROSCLEROSIS

This application is a continuation of Ser. No. 08/507,170 filed Jul. 26, 1995 now abandoned, which is a continuation of Ser. No. 08/206,415 filed Mar. 4, 1996 which is abandoned.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The present invention provides pharmaceutical compositions and methods useful for the treatment of atherosclerosis. More particularly, the compositions generally comprise liposomes having an average diameter of about 100–150 nanometers and a pharmaceutically acceptable carrier. The methods generally comprise administering such compositions.

Atherosclerosis is the leading cause of death in the United States. Atherosclerosis is the formation of plaques in arterial walls that can occlude the vessel lumen and obstruct blood flow through the vessel. Morbidity and mortality generally occur through end organ damage and organ dysfunction resulting from ischemia. The most common forms of ischemic end organ damage are myocardial infarction and cerebrovascular accidents. Disability or death often result from these vascular events. Even atherosclerosis-related ischemia that does not permanently injure myocardium is responsible for significant morbidity in the form of angina pectoris and congestive heart failure. Other organs, such as the kidneys, the intestines, and the spinal cord, may also be injured by atherosclerotic occlusions. Further, in diseases such as aortic aneurysms, atherosclerotic arteries may cause clinical symptoms independent of end organ dysfunction.

Arteriosclerotic lesions are plaques that form by accumulation of cholesterol, cholesterol esters, and phospholipids and proliferation of smooth muscle cells in the intima of major arteries. Lipid contributes a major portion of the plaque volume (generally 30–65% dry weight). Small, *Arteriosclerosis*, 8:103–129 (1988). In fact, the risk of developing arteriosclerosis is directly related to the concentration of certain forms of plasma cholesterol.

Lipids, including cholesterol, are generally insoluble in aqueous plasma. Plasma lipids are carried by soluble lipoprotein complexes. These lipoprotein complexes consist of an inner core of non-polar lipids (cholesteryl esters and triglycerides) and an surface layer of hydrophilic proteins and polar lipids (phospholipids and non-esterified cholesterol). Different proteins are present in the surface coat of different lipoprotein complexes (lipoproteins). The different lipoproteins perform different functions in lipid metabolism.

Five classes of lipoproteins are known. Some lipoproteins carry triglycerides and cholesterol from the liver to peripheral tissues while others transport lipids to the liver. Cholesterol may be metabolized in the liver to bile salts that are excreted, thus lowering total body cholesterol. Two lipoproteins, low density lipoproteins (LDL) and high density lipoproteins (HDL), have a high degree of association with the development of atherosclerosis. LDL has a high cholesterol concentration, delivers lipids to cells of peripheral tissues, and is associated with a high risk of atherosclerosis. HDL also has a relatively high cholesterol concentration, but carries lipids to the liver for metabolism into bile salts and is associated with decreasing the risk of developing atherosclerosis.

Cholesterol metabolism and homeostasis is the result of a complex equilibrium between free sterol in the cell and in

2

plasma. Phillips et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 906:223–276 (1987). Delivery of cholesterol to cells occurs via the receptor-mediated LDL pathway and by passive exchange of sterol between plasma membranes and lipoproteins. Only tissues that produce steroid hormones and bile acids can metabolize cholesterol. In order to prevent accumulation of excess free sterol in remaining peripheral tissues there is a reverse transport of cholesterol from plasma membranes into HDL and lipoprotein-like particles. HDL transports excess cholesterol to the liver where it can either be processed into bile salts for excretion or incorporated into very low density lipoproteins (VLDL) to re-enter the lipoprotein pool.

The passive exchange of cholesterol between cells and lipoproteins occurs via the diffusion of sterol molecules across the aqueous space. Phillips et al., supra, and Schroeder et al., *Exp. Biol. Med.*, 196:235–252 (1991). Net cellular efflux occurs if the chemical potential of free cholesterol is lower in the plasma than in the cells so that sterol leaves the membrane following its activity gradient. Under these conditions, it has been shown that cholesterol-ester-loaded cells, which are morphologically characteristic of early atherosclerotic lesions, not only lose cholesterol, but promote ester hydrolysis, resulting in the reduction of intracellular deposits of this lipid. Small, *Arteriosclerosis*, 8:103–129 (1988). Moreover as mentioned above, there is epidemiological evidence that conditions which might be expected to enhance reverse cholesterol transport (low plasma cholesterol concentrations, or increased HDL concentrations) are correlated with reduced risk of premature atherosclerosis and may give rise to plaque regression.

Characteristically, plaques are associated with ulceration of the vessel intima. The lipid-containing plaques grow in the ulcerations projecting friable masses into the arterial lumen. The plaques may also injure and weaken the smooth muscle media of the vessel. As plaque formation progresses, more central regions of the plaques are shielded from the circulation. Extensive plaque formation also cause concentric constriction of the vessel at the plaque site.

Presently, the most effective treatment of atherosclerosis is prevention. There is evidence that the progression and accumulation of lipids in lesions can be halted when plasma LDL concentrations are kept to near normal levels. Reynolds, *Circulation*, 79:1146–1148 (1989). Current preventive management of atherosclerotic disease has focused on the use of drugs in conjunction with dietary restrictions to regulate plasma cholesterol levels. Moreover, antioxidant therapies which suppress the formation and uptake of modified LDL particles by the cells of the arterial wall are also proving beneficial. Chisolm, *Clin. Cardiol.*, 14:25–30 (1991). However, while hypocholesterolemic drugs induce favorable plasma cholesterol changes which appear to slow the progression of atherosclerosis, they do not generally induce conditions that promote the efflux and removal of atheroma cholesterol. Clearly, in order to achieve significant regression of atheroma and lessen lumen obstruction, these space occupying lipids must be mobilized. Present evidence suggests that processes which stimulate the efflux of extrahepatic cell cholesterol and transport it to the liver for excretion, reverse cholesterol transport (RCT), are important events in the prevention of atherosclerosis. Gwynne, *Clin. Cardiol.*, 14:17–24 (1991).

Current therapeutic modalities of arteriosclerosis are generally divided into surgical and medical management. Surgical therapy may entail vascular graft procedures to bypass regions of occlusion (e.g., coronary artery bypass grafting), removal of occluding plaques from the arterial wall (e.g., carotid endarterectomy), or percutaneously cracking the

plaques (e.g., balloon angioplasty). Surgical therapies carry significant risk and only treat isolated lesions. Atherosclerotic plaques downstream from the treated lesion may continue to obstruct blood flow. Surgical therapies also do not limit the progression of atherosclerosis and are associated with the late complication of restenosis.

Medical therapy is directed to reducing other risk factors related to vascular disease (e.g., smoking, diabetes, and hypertension) and lowering forms of serum cholesterol that are associated with the development of atherosclerosis as described above. While medical therapies may slow the progression of plaque formation, plaque regression is relatively rare. Therefore, symptomatic atherosclerosis often requires both surgical and medical treatment.

Paradoxically, intravenous infusion of phospholipids and liposomes has been shown to produce regression of atherosclerotic plaques although serum lipid levels are transiently elevated. Williams et al., *Perspect. Biol. Med.*, 27:417-431 (1984). In some instances, however, cholesterol associated with development and progression of atherosclerosis may increase following liposome administration.

Previous studies investigating phospholipid-induced mobilization of cholesterol in vivo have employed multilamellar or sonicated liposome vesicles. Liposome size is a key characteristic in clearance kinetics and is one of several reasons why sonicated vesicles have been expected to represent the bilayer structure best suited to enhance reverse cholesterol transport. Sonication reduces multilamellar vesicles (MLV) to 'limit size' vesicles. These systems exhibit the minimum radius of curvature that can be adopted by the bilayer configuration without disruption. For example, the minimum size egg phosphatidylcholine liposome that can be generated is typically about 30-nm diameter, often classified as a small unilamellar vesicle (SUV). For a given liposome composition, it is generally assumed that the smaller the particle diameter the greater the circulation half-life (Gregoriadis and Senior, *Life Sci.*, 113:183-192 (1986)). Consequently, it was expected that SUV composed of phosphatidylcholine would circulate longer than larger liposomes, and therefore mobilize more cholesterol. Furthermore, packing constraints experienced by phospholipids in SUV, (due to the acute radius of curvature) gives rise to an instability that can result in fusion, Hope et al., *Chem. Phys. Lipids*, 40:89-107 (1986), as well as an increased tendency to assimilate with lipoproteins. See, e.g., Scherphof et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 542:296-307 (1978) and Krupp et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 72:1251-1258 (1976). Therefore, it was expected that SUV would produce a greater number of HDL-like particles, thus promoting efflux of sterol from peripheral tissues. Supporting this expectation, liposomes having diameters of 50-80 nm have been reported to optimize sterol mobilization and plaque regression. European Patent Publication No. 0461559A2.

What is needed in the art is a medical treatment for atherosclerosis that not only will slow progression of lesions, but also predictably cause regression and shrinkage of established plaques. Such a treatment should provide the optimal rate of cholesterol removal (and, hence shrinkage) from plaques. Quite surprisingly, the present invention fulfills these and other related needs.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides pharmaceutical compositions consisting essentially of unilamellar liposomes having an average diameter of about 100-150 nanometers, which

liposomes are not bound to a drug; and a pharmaceutically acceptable carrier. These liposomes optimize cholesterol efflux from atherosclerotic plaques. The liposomes may be bound to an apoprotein, typically apoprotein A1 or A2. The liposomes often contain at least one phospholipid, such as phosphatidylcholine or phosphatidylglycerol. Liposomes having diameters of about 125 nm are preferred.

Also provided are methods for treating atherosclerosis employing the pharmaceutical compositions of the present invention. The compositions are administered to animals having atherosclerosis. Often, the compositions will be serially administered over a period of time. Generally, the compositions will be administered parenterally, usually intravenously. The methods may be employed therapeutically or prophylactically. The methods of the present invention are also useful for treatment of hypoalphalipoproteinemia and hyperlipidemias.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIGS. 1A and 1B demonstrate cholesterol mobilization by a homogeneous population of large unilamellar vesicles with a mean diameter of 125 nm.

FIGS. 2A and 2B demonstrate plasma cholesterol distribution in normal and liposome-treated animals.

FIG. 3 illustrates liposome cholesterol accumulation over a 24-h time-course in vivo.

FIGS. 4A and 4B illustrate cholesterol mobilization by liposomes.

FIG. 5 illustrates a comparison of the rate of cholesterol accumulation by unilamellar and oligolamellar liposomes.

FIGS. 6A and 6B demonstrate the cholesterol mobilizing ability of liposomes having different compositions.

FIGS. 7A, 7B, and 7C illustrate the cholesterol content of erythrocytes in mice treated with liposomes and untreated mice.

FIGS. 8A and 8B illustrate plasma cholesterol concentration changes in rabbits treated with liposomes and untreated rabbits.

FIG. 9 illustrates plasma phospholipid concentration changes in rabbits treated with liposomes and untreated rabbits.

FIG. 10 demonstrates the quantity of cholesterol mobilized by liposomes during treatment of rabbits.

FIGS. 11A and 11B illustrate clearance profiles of liposomes injected into rabbits.

FIG. 12 demonstrates the cholesterol:phospholipid ratio of lipoproteins following liposome injection.

FIGS. 13A, 13B, and 13C illustrate aortic cholesterol content in liposome and saline treated rabbits.

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

The present invention provides pharmaceutical compositions consisting essentially of unilamellar liposomes having an average diameter of about 100-150 nanometers, which liposomes are not bound to a drug; and a pharmaceutically acceptable carrier. Also provided are methods for treating atherosclerosis using the compositions of the present invention.

As used herein, "drug" is meant to indicate a synthetic compound suitable for therapeutic use without associated bound carriers, adjuvants, activators, or co-factors. "Drug" does not include apoproteins, lecithin-cholesterol acyltransferase, or albumin.

5

"Liposome", "vesicle" and "liposome vesicle" will be understood to indicate structures having lipid-containing membranes enclosing an aqueous interior. The structures may have or one more lipid membranes unless otherwise indicated, although generally the liposomes will have only one membrane. Such single layered liposomes are referred to herein as "unilamellar".

Arterial atherosclerotic lesions have been shown to regress when treated with liposome infusions. In some instances, however, LDL cholesterol has been observed to increase following liposome administration. Prior to the present invention, the cause of this paradox has not been understood.

The present invention is based, in part, on the discovery that liposome size plays a critical role in the metabolism of cholesterol removed from atherosclerotic plaques by the liposomes. Contrary to previous descriptions of liposome therapy, liposomes having a diameter of greater than 100 nanometers are more effective for removing cholesterol from atherosclerotic plaques than smaller liposomes.

The superior action of liposomes greater than 100 nanometers in diameter may be explained by the micro-anatomy of the liver. When circulating in the liver, large liposomes (as used herein, liposomes greater than 100 nm in diameter) may be cleared by the Kupffer cells that line the sinusoidal openings. The Kupffer cells transfer cholesterol to hepatocytes for excretion in the bile or re-utilization. Small liposomes (as used herein, liposomes smaller than 100 nm) may directly access hepatocytes without prior processing by the Kupffer cells. Because these small liposomes are infused in relatively large doses, hepatocytes may be acutely exposed to a relatively high concentration of small liposomes and their accumulated cholesterol.

The pharmaceutical compositions of the present invention generally consist essentially of unilamellar liposomes having an average diameter of about 100–150 nanometers, which liposomes are not bound to a drug; and a pharmaceutically acceptable carrier. In some instances multilamellar liposomes may also be employed in the compositions of the present invention, either exclusively or in addition to unilamellar liposomes. The liposomes will have an average diameter of about 100–150 nanometers, typically about 125–140 nanometers. In some embodiments, liposomes having an average diameter larger than 150 nanometers, either uni- or multilamellar, may also be present in the compositions of the present invention.

Persons of skill will appreciate that the liposomes in the compositions of the present invention may be synthesized by a variety of methods, such as described in, e.g., U.S. Pat. No. 4,186,183; U.S. Pat. No. 4,217,344; U.S. Pat. No. 4,261,975; U.S. Pat. No. 4,485,054; U.S. Pat. No. 4,774,085; U.S. Pat. No. 4,946,787; PCT Publication No. WO 91/17424, Deamer and Bangham, *Biochim. Biophys. Acta*, 443:629–634 (1976); Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348–3352 (1979); Hope et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 812:55–65 (1985); Mayer et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 858:161–168 (1986); and Williams et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85:242–246 (1988), each of which is incorporated herein by reference. Suitable methods include, e.g., sonication, extrusion, high pressure/homogenization, microfluidization, detergent dialysis, calcium-induced fusion of small liposome vesicles, and ether-infusion methods, all well known in the art.

Generally, the liposomes are most conveniently generated by sonication and extrusion procedures. Briefly, a chloroform solution of lipid is vortexed and the solvent removed

6

under a steady stream of N₂. The sample is dried under a high vacuum. The resulting dry lipid film is rehydrated in 150 mM NaCl and 20 mM [4-(2-hydroxyethyl)]-piperazine-ethanesulfonic acid (Hepes, pH 7.4). This generally produces multilamellar liposomal vesicles. Unilamellar vesicles are prepared by sonication or extrusion.

Sonication is generally performed with a tip sonifier, such as a Branson tip sonifier, in an ice bath. Typically, the suspension is subjected to several sonication cycles. Extrusion may be carried out by biomembrane extruders, such as the Lipex Biomembrane Extruder. Defined pore size in the extrusion filters may generate unilamellar liposomal vesicles of specific sizes. The liposomes may also be formed by extrusion through an asymmetric ceramic filter, such as a Ceraflow Microfilter, commercially available from the Norton Company, Worcester Mass.

The size of the liposomal vesicles may be determined by quasi-electric light scattering (QELS) as described in Bloomfield, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 10:421–450 (1981), incorporated herein by reference. Average liposome diameter may be reduced by sonication of formed liposomes. Intermittent sonication cycles may be alternated with QELS assessment to guide efficient liposome synthesis.

The liposomes may be composed of a variety of lipids. Generally, the liposomes will be composed of at least one phospholipid, typically egg phosphatidylcholine, egg phosphatidylglycerol, distearoylphosphatidylcholine, or distearoylphosphatidylglycerol. Many embodiments of the present invention will include more than one phospholipid.

Other phospholipids suitable for formation of liposomes comprising the compositions of the present invention include, e.g., phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, lecithin, β , γ -dipalmitoyl- α -lecithin, sphingomyelin, phosphatidylserine, phosphatidic acid, N-(2,3-di(9-(Z)-octadecenyl)-prop-1-yl-N,N,N-trimethylammonium chloride, phosphatidylethanolamine, lysolecithin, lysophosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, cephalin, cardiolipin, cerebrosides, dicetylphosphate, dioleoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylglycerol, dioleoylphosphatidylglycerol, palmitoyl-oleoylphosphatidylcholine, di-stearoyl-phosphatidylcholine, stearoyl-palmitoyl-phosphatidylcholine, di-palmitoyl-phosphatidylethanolamine, di-stearoyl-phosphatidylethanolamine, di-myristoyl-phosphatidylserine, di-oleylphosphatidylcholine, and the like. Non-phosphorus containing lipids may also be used in the liposomes of the compositions of the present invention. These include, e.g., stearylamine, docetylamine, acetyl palmitate, fatty acid amides, and the like. Additional lipids suitable for use in the liposomes of the present invention are well known to persons of skill in the art and are cited in a variety of well known sources, e.g., *McCutcheon's Detergents and Emulsifiers* and *McCutcheon's Functional Materials*, Allured Publishing Co., Ridgewood, N.J., both of which are incorporated herein by reference.

Generally, it is desirable that the liposomes be composed of lipids that are liquid-crystalline at 37° C., often at 35° C., and even 32° C. Liposomes in the liquid-crystalline state typically accept cholesterol more efficiently than liposomes in the gel state. As patients typically have a core temperature of about 37° C., liposomes composed of lipids that are liquid-crystalline at 37° C. are generally in a liquid-crystalline state during treatment and, therefore, optimize removal of cholesterol from plaques.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado
LUIS FELIPE CASTILLO GIBSONE

ASUNTO	Radicación	04-106850
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	16147
	Folios	9

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (fase nacional)	☒	Cap. I	☐ Cap. II ☒
No. Sol. Internacional	PCT/US03/10339		
Fecha de Presentación Internal.	Abril 04 de 2003		

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

- 1.1. Descripción: Folios: 04 a 37 como se radicó inicialmente
- 1.2. Reivindicaciones: Folios: 38 a 43 como se radicó inicialmente
Folios: 86 a 88 modificadas
- 1.3. Prioridad: US No. 60/370,409 del 05 de Abril de 2002
- 1.4 Respuesta del solicitante: Folios: 85 a 88

2. Objeto de la invención

- Título de la solicitud: "COMPOSICIONES Y METODOS PARA LA DOSIFICACION DE CIERTAS LIPOSOMAS DE CIERTOS TAMAÑOS PARA TRATAR O PREVENIR ENFERMEDADES"

El objeto de la solicitud de la presente invención consiste en:

- Reivindicaciones de la 1 a la 16: Liposomas para la manufactura de un medicamento

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de brindar liposomas y métodos para usar dichos liposomas para prevenir, tratar o manejar una variedad de enfermedades y/o condiciones corporales.

Para solucionar este problema técnico la solicitud en estudio presenta Liposomas para la manufactura de un medicamento.

El objeto de la invención definido anteriormente se clasifico de acuerdo con la IPC: A61K 9/127

3. Respuesta a los argumentos del solicitante

- El solicitante pasa un nuevo capítulo reivindicatorio, y esta oficina lo acepta.

4. De la solicitud de Patente

4.1 Título

El título de la presente solicitud debería ser más específico; de acuerdo a lo que se quiere proteger en el capítulo reivindicatorio. Entonces se solicita hacer la corrección pertinente.

4.2 Descripción (artículo 28 D. 486)

Esta Oficina se permite señalar que dentro de la descripción se encontró falta de sustento debido a que:

- No hay resultados ni información que permita evidenciar que lo reivindicado, presente ventajas y/o un salto tecnológico apreciable, con respecto al estado de la técnica.

4.3 Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

- Las Reivindicaciones de la 1 a la 16: en éstas, el solicitante debe aclarar la materia a proteger, puesto que las reivindicaciones no son claras ni concisas; ya que no definen inequívocamente la materia a proteger.

- Las Reivindicaciones de la 6 a la 11 y de la 13 a la 16: no se pueden definir los liposomas a través de sus usos y/o métodos de tratamiento; por tanto no son claras ni concisas ya que no definen de manera inequívoca la materia a proteger. De igual forma en la reivindicación 6 la traducción no está completa ya que en la última línea de la misma aparece la palabra "and", lo cual no corresponde al idioma español.
- Las Reivindicaciones de la 3 a la 5 y de la 8 a la 12: esta asociación de liposomas con otras vesículas de fosfolípidos, con fármacos que afectan los niveles de colesterol, con agentes cardiovasculares, entre otros; no se encuentran sustentadas en ninguna parte del capítulo descriptivo, y además, en el mismo no se encuentran composiciones que tengan alguna de las posibles combinaciones.

Por lo anteriormente expuesto, es preciso requerir al interesado para que señale el verdadero alcance de su invención.

5. Determinación del Estado de la Técnica

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:

- Fecha de presentación de la solicitud prioritaria: Abril 05 de 2002

Teniendo en cuenta la fecha indicada se consultaron las bases de datos y los archivos con que cuenta la entidad con fecha de publicación anterior y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud; aclarando, que esta búsqueda se realizó únicamente para aquellas partes que parecen ser claras y/o concisas:

Nº	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	US 6,139,871	LIPOSOME COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE TREATMENT OF ATHEROSCLEROSIS	Octubre 31 de 2000

6. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

6.1 Nivel inventivo (artículo 18 D486)

El Nivel Inventivo se evaluó por comparación entre lo solicitado y lo encontrado en el estado de la técnica.

- Reivindicaciones 1: Liposomas para la manufactura de un medicamento

CARACTERISTICAS ESENCIALES DE LA SOLICITUD COLOMBIANA No. 04-106850	D1: US 6,139,871
Liposomas para la manufactura de un medicamento, que comprende: - Fosfolípidos - Una capa acuosa - Con un diámetro promedio de entre 50 y 250 nm	Composiciones que comprenden liposomas, y que comprenden: - Fosfolípidos - Una capa acuosa - Con un diámetro promedio de entre 100 y 150 nm Resumen, Columnas: 1 (líneas 10 a 15), 4 (líneas 56 a 62), 5 (líneas 35 a 46), 6 (líneas 25 a 30 y 59 a 67), del Documento

Liposomas para la manufactura de un medicamento:

Comparando las características esenciales de la solicitud, las cuales corresponden a Liposomas para la manufactura de un medicamento, que comprende fosfolípidos y una capa acuosa y que presenta un diámetro promedio de entre 50 y 250 nm; el documento del estado de la técnica más cercano es D1, ya que divulga composiciones que comprenden liposomas y se usan para métodos de tratamiento como es la arterosclerosis.

La única diferencia con D1 de la presente solicitud es que en ésta, el diámetro promedio de los lípidos esta entre 50 y 250 nm, mientras que en D1 el diámetro promedio de los lípidos esta entre 100 y 150 nm. Pero esto NO parece conceder un efecto técnico inesperado ya que en la descripción (folios del 32 al 34) en el detalle de las realizaciones preferidas los diámetros promedios se encuentran entre por ejemplo, 100 a 140 nm y en los ejemplos (folios del 35 al 37) no se hace ninguna referencia al diámetro promedio. Por tanto no se encuentra evidencia con respecto al estado de la técnica que permita reconocer la ventaja inesperada de los liposomas para la manufactura del medicamento propuesta en la invención.

Puesto que el Problema Técnico Objetivo fundamental de la Invención es brindar liposomas y métodos para usar dichos liposomas para prevenir, tratar o manejar una variedad de enfermedades y/o condiciones corporales; la invención presenta una alternativa a los compuestos del estado de la técnica en (D1), por falta de evidencia que le confieran nivel inventivo.

Así que, el problema técnico planteado en la solicitud, sería solucionado fácilmente por el experto en la materia conociendo la composición y comportamiento de los liposomas para su manufactura en diferentes formulaciones y las enseñanzas de D1, con el fin de obtener un medicamento alternativo, a los del estado de la técnica. Por lo todo lo anterior, los Liposomas para la manufactura de un medicamento carecen de Nivel Inventivo.

7. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

Nº	Documento Nº	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	US 6,139,871	De la 1 a la 16	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la resolución reglamentaria No. 00210 del 15 de enero de 2001, advirtiéndole que contra él no procede recurso alguno en la vía gubernativa.



ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha
19 DIC. 2008

CONCEPTO TÉCNICO No. 2517

EXAMINADOR TÉCNICO
Código No. 202080