

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA ADMINISTRACIÓN DE UNA ENZIMA A LAS VÍAS RESPIRATORIAS DE UN SUJETO

2 Datos del Solicitante

Nombre: BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEMS

Dirección Electrónica: notificaciones@clarkemodet.com.co

Dirección: 201 W. 7th Street.

Domicilio/País de constitución: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - TEXAS - AUSTIN

Identificación:

- ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT
☐ PASAPORTE

Número: 516861770027-

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1. BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEMS	NN	516861770027

4 Datos del Inventor

Nombre:	Robert, O., III WILLIAMS	Dirección Electrónica:	notificaciones@clarkemodet.com.co
Dirección:	4514 W. Rapid Springs Cove	Domicilio/País de constitución:	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - TEXAS - AUSTIN
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE ☒ No Aplica Número: -			
5	Inventor(es)		
Apellidos - Nombres		Domicilio	
1.	WILLIAMS Robert, O., III	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	
2.	IDELL Steven	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	
6	Datos Inventor(es)		
	País de Residencia	Departamento/Estado	Ciudad
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	TEXAS	AUSTIN
			4514 W. Rapid Springs Cove
2.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	TEXAS	TYLER
			c/o UTHSC at Tyler, 11937
7	Datos del Representante Legal / Apoderado		
Nombre:	CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO	Dirección Electrónica:	notificaciones@clarkemodet.com.co
Dirección:	CARRERA 11 NO. 86-53, PISO 6	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - CUNDINAMARCA - BOGOTA D.C.

Identificación:			
☒ CEDULA DE CIUDADANIA		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA	
☐ EMPRESA EXTRANJERA		☐ NIT	
☐ PASAPORTE			
Número:		66783790-	
Presentación de Poder			
Año de Radicación			
Número de Radicación			
8	Datos Solicitud: PCT / WO		
Número Solicitud:		PCT/US2014/063784	Fecha Solicitud: 04/11/2014
Número Publicacion:		WO 2015/066664	Fecha Publicacion: 07/05/2015
9	Declaraciones de prioridad	☒ SI ☐ NO	
1.	(33) País de origen ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	Codigo del país US	(31) No. Solicitud 61/899,739
			(32) Fecha 04/11/2013
10	Reivindicaciones		
Número reivindicaciones:		55	Pago Reivindicaciones: Si
11	Reducción de tasas.		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
☐ Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
12	Documentos Anexos		
☒ Reivindicaciones ☒ Descripción ☒ Dibujos y/o Figuras ☒ Resumen			

- ☐ Certificado Depósito Material Biológico
- ☐ Uso de Conocimiento tradicional
- ☐ Listado de secuencias
- ☐ Artes finales 12 x 12 cm
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☒ Otros Anexos

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA ADMINISTRACIÓN DE UNA ENZIMA A LAS VÍAS RESPIRATORIAS DE UN SUJETO

5

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 61/899,739 presentada el 4 de noviembre de 2013, la cual se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

En líneas generales, la presente invención hace referencia al
15 campo de la biología molecular, el suministro de fármacos y la medicina. De forma más particular, hace referencia a composiciones y métodos para el suministro de composiciones de enzimas terapéuticas al sistema respiratorio de un sujeto.

20 2. Descripción de la técnica relacionada

Muchos pacientes con exposición a humo y quemaduras graves desarrollan una forma grave de lesión pulmonar aguda (LPA) denominada síndrome de alteración respiratoria aguda (SARA) asociado con una mortalidad de 30-40 %, hospitalización

prolongada y morbilidad a largo plazo. La LPA inducida por inhalación de humo (IH) (LPAIH) está caracterizada por una obstrucción grave de las vías respiratorias, cilindros fibrosos en las vías respiratorias y depósito alveolar de fibrina. Actualmente no existe un tratamiento eficaz y específico para la LPAIH.

Las lesiones por quemadura afectan a más de 1 millón de pacientes en Estados Unidos al año y la LPAIH afecta a miles de pacientes expuestos a humo en la práctica civil y militar al año (Enkhbaatar *et ál.*, 2004a). El LPAIH contribuye a más de 3000 muertes y 17.000 lesiones relacionadas con fuego en Estados Unidos al año y una tasa de mortalidad relacionada con fuego de 2-3/100.000 de población, que es una de las más elevadas en el mundo desarrollado [Comité de prevención de lesión y veneno (2000) *Pediatrics* 105:1355-1357]. El cuidado paliativo es menos que óptimo, prolongado y costoso. Los resultados implican morbilidad y mortalidad considerable. Si bien el cuidado paliativo actual incluye ventilación mecánica, la tasa de mortalidad del SARA, incluida la asociada con LPAIH, se acerca al 30-40 por ciento (Phua *et ál.*, 2009).

Estas consideraciones demandan el análisis de una terapia

nueva y posiblemente más eficaz. La LPAIH está asociada con una alteración respiratoria grave, hospitalización prolongada y, a menudo, el requisito de ventilación mecánica. Las complicaciones de la LPAIH a largo plazo incluyen reactividad
5 bronquial, fibrosis pulmonar acelerada y bronquiectasia. Entre todas las formas de LPA, la LPAIH tiene especial tendencia a recambio aberrante de fibrina que incluye cilindros de fibrina que se forman en las vías respiratorias amplias y fibrina en los alveolos (Enkhbaatar et ál., 2004a).
10 Los cilindros bronquiales interfieren con el intercambio de gases, a menudo requieren depuración broncoscópica y promueven la atelectasis. Si bien se utilizan N-acetilcisteína y heparina nebulizada en la práctica clínica, aun no se ha probado la eficacia de la heparina nebulizada en
15 pacientes con LPAIH en ningún ensayo clínico aleatorio o posiblemente controlado (Tuinman et ál., 2012) y tampoco se ha mostrado que la heparina sola mejore la LPAIH según nuestros estudios en ovejas (Enkhbaatar et ál., 2008a; Enkhbaatar et ál., 2008b). La heparina no elimina los
20 coágulos establecidos y la heparina nebulizada puede iniciar una coagulopatía sistémica en la LPAIH (O'Donnell, 2012).

COMPENDIO DE LA INVENCION

En la presente se brinda un método para preparar una solución

enzimática para administración en las vías respiratorias de un sujeto que incluye nebulizar la solución enzimática (p. ej., utilizando un nebulizador de malla vibradora). La enzima puede ser un activador de plasminógeno tisular, que incluye un activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA, por su sigla en inglés) y un activador de plasminógeno tisular (tPA, por su sigla en inglés). En algunas modalidades, el nebulizador de masa vibradora es un nebulizador profesional AERONEB® o un atomizador EZ Breathe.

10

Por lo tanto, en una primera modalidad, se brinda un método para preparar una solución enzimática para administración en las vías respiratorias de un sujeto que comprende nebulizar la solución enzimática para brindar una solución nebulizada.

15 En determinados aspectos, la enzima puede ser un activador de plasminógeno, como un activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA) o un activador de plasminógeno tisular (tPA). En determinados aspectos, la nebulización de la solución enzimática se puede realizar usando un nebulizador de malla vibradora. En algunos aspectos, la nebulización de la solución enzimática no comprende el uso de un nebulizador a chorro o un nebulizador ultrasónico. En determinados aspectos, la nebulización de una solución enzimática de las modalidades puede comprender brindar

suficiente energía de nebulización y/o tiempo para brindar una solución nebulizada con un tamaño de gota mediano de entre alrededor de 2,5 μm y 10 μm , 2,5 μm y 8 μm o 3,0 μm y 6 μm . En algunos aspectos, la nebulización de la solución
5 enzimática comprende obtener una composición enzimática liofilizada, reconstituir la composición enzimática liofilizada en una solución (p. ej., una solución acuosa) para brindar una solución enzimática y nebulizar la solución enzimática. Por lo tanto, en otra modalidad, se brinda una
10 solución enzimática nebulizada producida de acuerdo con los métodos de las modalidades.

En aun otra modalidad se brinda una composición que comprende una solución nebulizada de scuPA o tPA. En algunos aspectos,
15 la composición o la solución enzimática de las modalidades puede ser una solución acuosa. En determinados aspectos, la solución enzimática comprende una concentración de sal fisiológicamente aceptable y/o un agente amortiguador de pH. Por ejemplo, la solución enzimática puede ser una solución
20 salina estéril o solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por su sigla en inglés). En aspectos preferidos, la composición o la solución enzimática comprende scuPA.

En otra modalidad, se brinda un método que trata a un sujeto

que comprende administrar una solución enzimática nebulizada (p. ej., una solución enzimática de tPA y/o scuPA) en las vías respiratorias de un sujeto que lo necesita. Por ejemplo, el sujeto puede tener una infección o lesión pulmonar aguda.

5 En aun otros aspectos, el sujeto para tratamiento presenta lesión pulmonar aguda inducida por humo inhalado (LPAIH), lesión pulmonar inducida por productos químicos, bronquitis plástica, asma grave o síndrome de alteración respiratoria agudo (SARA). En esta modalidad, el activador de plasminógeno

10 se nebuliza usando un nebulizador, como un nebulizador de malla vibradora (p. ej., el nebulizador profesional AERONEB® o el atomizador EZ Breathe). El experto en la técnica comprende que cualquier tipo de atomizador, como un nebulizador, que suministre una dosis terapéutica y

15 farmacéuticamente aceptable de la enzima es adecuado para uso de acuerdo con las modalidades.

En aun otra modalidad, se brinda una composición que comprende un activador de plasminógeno y un perfluorocarbono

20 (p. ej., un «líquido de respiración»). En algunos aspectos, el activador de plasminógeno es scuPA y/o tPA. En algunos ejemplos, el perfluorocarbono puede comprender un grupo cicloalquilo. Por ejemplo, el perfluorocarbono puede ser perfluorodecalina y/o perfluoro-octilbromuro.

Otra modalidad adicional de la invención brinda un método para tratar un sujeto con una infección pulmonar o lesión pulmonar que comprende administrarle al sujeto una cantidad
5 terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un activador de plasminógeno y un perfluorocarbono. En algunos aspectos, el activador de plasminógeno es un scuPA o un tPA. En algunos aspectos, el perfluorocarbono puede ser perfluorodecalina y/o perfluoro-octilbromuro.

10

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes en virtud de la siguiente descripción detallada. No obstante, debería tenerse en cuenta que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si
15 bien indican modalidades preferidas de la invención, se brindan únicamente a modo ilustrativo, ya que diversos cambios y modificaciones comprendidos en el espíritu y alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica en virtud de la presente descripción detallada.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. La invención

puede comprenderse mejor en relación con uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de modalidades específicas que se incluye en la presente.

- 5 La figura 1 es una gráfica que muestra que el suministro intratraqueal de scuPA recombinante en ratones con LPA inducida por bleomicina aumenta la actividad de BAL uPA.

La figura 2 muestra que el tratamiento de una oveja con scuPA
10 nebulizado brindó actividad detectable de uPA asociada con el antígeno de uPA humano luego del tratamiento con scuPA (carril 3). También se hallaron el antígeno de uPA y la actividad en homogenados pulmonares (carril 4) del animal tratado con scuPA. Carril 1: estándar de uPA y carril 2:
15 actividad de uPA de referencia.

La figura 3 es un esquema que muestra los métodos para preparar diversas formulaciones diferentes de activador del plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA)
20 nebulizado.

La figura 4 es un esquema que muestra la actividad de las formulaciones de scuPA nebulizado preparadas de acuerdo con la figura 3.

La figura 5 es un esquema que muestra la actividad del activador de plasminógeno tisular (tPA) luego de mezclar se con perfluorodecalina (PFD) o perfluoro-octilbromuro (PFB).

5

DESCRIPCIÓN DE MODALIDADES ILUSTRATIVAS

I. La presente invención

En la presente se brinda un método para preparar una solución
10 enzimática para administración en las vías respiratorias de
un sujeto que comprende nebulizar la solución enzimática
utilizando un nebulizador, como un nebulizador de malla
vibradora. Es un hallazgo sorprendente de los estudios que se
detallan en la presente que la nebulización de enzimas, como
15 mediante el uso de un nebulizador de malla vibradora, produce
composiciones nebulizadas que mantienen niveles de actividad
enzimática considerables. En la presente también se brinda un
método para tratar infecciones y lesiones pulmonares, como
lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH)
20 en un sujeto administrándole al sujeto una cantidad
terapéuticamente eficaz de un activador de plasminógeno
nebulizado mediante una vía respiratoria. En algunos casos,
el activador de plasminógeno se nebuliza usando un
nebulizador de malla vibradora. En la presente también se

brinda una composición que comprende un activador de plasminógeno y un perfluorocarbono y un método para utilizar la composición de perfluorocarbono/activador de plasminógeno para tratar infección y lesión pulmonar (p. ej., LPAIH). En
5 algunas modalidades, una enzima para uso de acuerdo con las modalidades es una proenzima. En aspectos adicionales, la enzima es un activador de plasminógeno.

En aun otras modalidades, una enzima para uso en la presente
10 es un activador de plasminógeno seleccionado de tPA y scuPA. Los términos «activador de plasminógeno tisular» y «tPA» se utilizan de forma intercambiable y hacen referencia en la presente a una serina proteasa (en algunas modalidades, EC 3.4.21.68) que puede estar implicada en la conversión de
15 plasminógeno a plasmina. Se debe comprender que los términos «activador de plasminógeno tisular» y «tPA» incluye formas recombinantes que incluyen, de modo no taxativo, altepasa, reteplasa, tenecteplasa y desmoteplasa. Los términos «activador de plasminógeno tisular» y «tPA» también incluyen
20 la forma de cadena simple (sc-tPA), la forma de cadena doble (ds-tPA) y mezclas de estas. En algunas modalidades, el tPA es un tPA humano o un tPA derivado de humano. Los términos «activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple» y «scuPA» se utilizan de forma intercambiable y hacen

referencia en la presente a una proenzima de una serina proteasa de uroquinasa (en algunas modalidades, EC 3.4.21.73) que puede estar implicada en la conversión de plasminógeno a plasmina. El «activador de plasminógeno de uroquinasa de

5 cadena simple» o «scuPA» se puede activar mediante escisión proteolítica entre Lys158 e Ile159, lo que produce dos cadenas enlazadas mediante un enlace disulfuro que forma la enzima de serina proteasa. El ejemplo 3 y la figura 4 a continuación describen la nebulización de scuPA usando un

10 nebulizador de malla vibradora y la actividad enzimática altamente sorprendente que se logra luego de la nebulización en comparación con métodos de nebulización de la técnica previa. En algunas modalidades, el nebulizador de masa vibradora es un nebulizador profesional AERONEB® o un

15 atomizador EZ Breathe.

El término «solución enzimática» hace referencia en la presente a cualquier formulación líquida con una enzima adecuada para nebulización. En algunas modalidades, la

20 solución enzimática contiene un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable como se define en la presente. La solución enzimática se administra a las vías respiratorias de un sujeto mediante inhalación o cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica. El término «vía

respiratoria» se refiere en la presente a cualquier parte del tracto respiratorio que incluye el tracto respiratorio superior, las vías respiratorias y los pulmones. El tracto respiratorio superior incluye la nariz y los conductos nasales, la boca y la garganta. Las vías respiratorias incluyen la laringe, la tráquea, los bronquios y los bronquiolos. Los pulmones incluyen los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares, los sacos alveolares y los alveolos.

10

En la presente también se brinda un método para tratar una lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH) en un sujeto que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un activador de plasminógeno nebulizado mediante una vía respiratoria, en el que el activador de plasminógeno se nebuliza usando un nebulizador de malla vibradora. En algunas modalidades, el activador de plasminógeno se selecciona de un tPA y un scuPA. En modalidades adicionales, el nebulizador de masa vibradora es un nebulizador profesional AERONEB® o un atomizador EZ Breathe.

20

Cabe señalar que «tratar LPAIH» indica retrasar, aliviar, mitigar o reducir parcial o completamente la intensidad de

uno o más síntomas relacionados de un trastorno o una afección como una LPAIH y/o aliviar, mitigar o impedir una o más causas de un trastorno o una afección, como una afección de LPAIH. Los tratamientos de acuerdo con la invención pueden aplicarse de manera preventiva, profiláctica, paliativa o correctiva. En algunos casos, los términos «tratar», «trata», «tratamiento» y variaciones gramaticales de estos incluyen reducir parcial o totalmente una afección o un síntoma asociado con una afección de LPAIH en comparación con un tratamiento previo del sujeto o en comparación con la incidencia de esta afección o este síntoma en una población general o de estudio. En algunas modalidades, una afección de LPAIH incluye uno o más de: menor oxigenación, obstrucción de las vías respiratorias (que incluye una obstrucción grave de las vías respiratorias), sedimentos o cilindros fibrinosos de las vías respiratorias y depósito de fibrina alveolar. Por consiguiente, el tratamiento de una afección de LPAIH incluye uno o más de mejora de la oxigenación, reducción de la obstrucción de las vías respiratorias, menos sedimentos o cilindros fibrinosos de las vías respiratorias y menor depósito de fibrina alveolar. En algunas modalidades, se trata una afección de LPAIH con una menor incidencia de sangrado.

En la presente también se brinda una composición que comprende un activador de plasminógeno y un perfluorocarbono (PFC). En algunas modalidades, el activador de plasminógeno en la composición se selecciona de un tPA y un scuPA. En 5 modalidades adicionales, el PFC en la composición se selecciona de perfluorodecalina, perfluoro-1,3-dimetilciclohexano, FC-75, perfluorooctano y perfluorooctilbromuro. En algunos aspectos, el PFC es o comprende un PFC con un grupo cicloalquilo, como perfluorodecalina, 10 perfluoro-1,3-dimetilciclohexano o FC-75. Cabe señalar que el activador de plasminógeno y el PFC puede encontrarse en cualquier relación o concentración. En algunas modalidades, la composición comprende un activador de plasminógeno a una concentración de aproximadamente 0,005-0,040 mg/mL de PFC.

15

También se brinda un método para tratar una lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH) en un sujeto que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un 20 activador de plasminógeno y un PFC. El ejemplo 4 y la figura 5 demuestra que un activador de plasminógeno, tPA, retuvo la actividad en una mezcla de perfluorocarbono. Asimismo, el PFC y el activador de plasminógeno en su conjunto fomentan el retiro de sedimentos en las vías respiratorias, así como la

depuración de fibrina alveolar y un mejor resultado. De forma específica, el PFC suministra de forma eficaz el activador de plasminógeno que promueve 1) disolución y desplazamiento de los cilindros en las vías respiratorias y 2) retiro de
5 sedimentos alveolares y en las vías respiratorias a la vez que se avala el intercambio gaseoso respiratorio. De forma mecánica, el PFC recluta de forma eficaz el volumen pulmonar. Dada la baja tensión en la superficie del líquido de PFC, el PFC distribuye el activador de plasminógeno en el pulmón,
10 posiblemente entre los cilindros y la pared de las vías respiratorias y, por lo tanto, se descomponen los cilindros a medida que se forman mientras que se enlentece la formación de nuevos cilindros. A medida que se volatiza el PFC del pulmón, el activador de plasminógeno permanece para disolver
15 adicionalmente cilindros en las vías respiratorias y fibrina alveolar. Luego de repetir la dosis con suspensiones de PFC, los volúmenes de pFC no solo depositan fármaco adicional sino que desplazan los cilindros y el sedimento alveolar. Dado que el PFC es incomprensible, este abre vías respiratorias
20 pequeñas dañadas y así ayuda en el reclutamiento. Si bien no se limitan a ningún mecanismo, el contacto con los PFC también puede proteger el epitelio subyacente mediante atenuación de la coagulación, que se inicia mediante un factor tisular en las vías respiratorias pequeñas y los

alveolos virtualmente en todas las formas de LPA. Con una succión en línea, el sedimento de menor densidad flota en un PFC relativamente más denso, lo que facilita el retiro de sedimentos y fragmentos de cilindros de fibrina en las vías respiratorias.

Por consiguiente, en algunas modalidades del método para administrar un activador de plasminógeno y composición de PFC, el activador de plasminógeno se selecciona de un tPA y un scuPA. En modalidades adicionales del método de administración de un activador de plasminógeno y una composición de PFC, el PFC en la composición se selecciona de perfluorodecalina y perfluoro-octilbromuro.

También cabe señalar que lo anterior hace referencia a modalidades preferidas de la presente invención y que se pueden realizar diversos cambios sin desviarse del alcance de la invención. La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no se deben interpretar de forma alguna como limitaciones impuestas en el alcance de esta. Por el contrario, debe comprenderse claramente que se puede recurrir a otras diversas modalidades, modificaciones y equivalentes de estas que, tras la lectura de la descripción de la presente, puedan presentarse al experto en la técnica,

sin apartarse del espíritu de la presente invención y/o el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones mencionadas en la presente se incorporan en su totalidad mediante esta
5 referencia para todos los fines. Las definiciones de términos que se utilizan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones son las que se indican a continuación.

II. Definiciones

10 Tal como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas en singular «un», «una» y «el/la» incluyen referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término «una célula» incluye múltiples células, incluidas mezclas de
15 estas.

El uso del término «o» en las reivindicaciones se emplea para hacer referencia a «y/o», a menos que se indique expresamente que hace referencia solamente a alternativas o que las
20 alternativas sean mutuamente excluyentes, si bien la descripción admite una definición que hace referencia solamente a alternativas y a «y/o». Tal como se utiliza en la presente, «otro» puede significar al menos un segundo o más.

En toda la solicitud, la expresión «alrededor de» se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se utiliza para determinar el valor o la variación que existe entre los
5 sujetos del estudio.

El término «administración» se refiere a una administración oral, tópica, intravenosa, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, intra-articular, parenteral,
10 intra-arteriolar, intradérmica, intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal, por inhalación o mediante un depósito implantado. El término «parenteral» incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular,
15 intrarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracranial. En algunas modalidades, la administración se produce mediante inhalación de una composición nebulizada.

20 El término «vía respiratoria» se refiere en la presente a cualquier parte del tracto respiratorio que incluye el tracto respiratorio superior, las vías respiratorias y los pulmones. El tracto respiratorio superior incluye la nariz y los conductos nasales, la boca y la garganta. Las vías

respiratorias incluyen la laringe, la tráquea, los bronquios y los bronquiolos. Los pulmones incluyen los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares, los sacos alveolares y los alveolos.

5

Una «composición» pretende hacer referencia a una combinación de agente activo y otro compuesto o composición, inerte (por ejemplo, un agente o una etiqueta detectable) o activo, como un adyuvante.

10

Tal como se usa en la presente, el término «comprende» significa que las composiciones y los métodos incluyen los elementos enumerados, pero no se excluyen otros. «Consiste esencialmente en», cuando se usa para definir composiciones y métodos, significa que excluye otros elementos de cualquier importancia esencial para la combinación. Por tanto, una composición que consiste esencialmente en los elementos definidos en la presente no excluiría contaminantes de traza del método de aislamiento y purificación y portadores farmacéuticamente aceptables, tales como fosfato salino amortiguado, conservantes y similares. «Consiste en» significa que se excluyen más que solo elementos de traza de otros ingredientes y etapas sustanciales del método para administración de las composiciones de esta invención. Las

15
20

modalidades definidas por cada uno de estos términos de transición se encuentran dentro del alcance de esta invención.

5 Un «control» es un sujeto o una muestra alternativa que se utiliza en un experimento con fines comparativos. Un control puede ser «positivo» o «negativo». «Mamífero», a los efectos del tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos seres humanos, animales
10 domésticos y de granja, primates no humanos y animales de zoológico, deporte o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.

El término «enzima» hace referencia en la presente a uno o
15 más polipéptidos que catalizan una reacción bioquímica específica o a una proenzima. El término «proenzima» hace referencia a una sustancia biológicamente activa que se metaboliza en una enzima. En una modalidad, la enzima es un activador de plasminógeno tisular (tPA). En otra u otras
20 modalidades, la enzima es una proenzima y es un activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA).

El término «fibrinolisisina» se refiere en la presente a cualquiera de las diversas enzimas proteolíticas que

promueven la disolución de coágulos sanguíneos. Una fibrinolisis incluye, de modo no taxativo, plasmina, activador de plasminógeno tisular (tPA, sc-tPA y dc-tPA), uroquinasa (uPA) y proenzimas de uroquinasa (scuPA).

5

El término «identidad» u «homología» se interpretará como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos al residuo de una secuencia correspondiente con la que se compara, luego de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para alcanzar una identidad porcentual máxima para toda la secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Ninguna de las inserciones o extensiones de extremo N o C se debe interpretar como una reducción de la identidad o la homología. En la técnica se conocen métodos y programas informáticos para alineación. La identidad de secuencia se puede medir usando un software de análisis de secuencia.

20 Los términos «lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo» y «LPAIH» se utilizan de forma intercambiable en la presente y hacen referencia a una forma de lesión pulmonar aguda (LPA) provocada por inhalación de humo. La LPA también se denomina «SARA leve». La LPA se puede definir hallando una

o más de las siguientes afecciones en un sujeto: 1) infiltrados pulmonares bilaterales en una radiografía torácica, 2) cuando se mide mediante cateterización coronaria derecha como se indica clínicamente, presión de cuña capilar pulmonaria < 18 mmHg (2,4 kPa) y 3) PaO_2/FiO_2 <300 mmHg (40 kPa). En algunas modalidades, el tratamiento de LPAIH incluye tratamiento de una o más de las siguientes afecciones: menor oxigenación, obstrucción de las vías respiratorias (que incluye una obstrucción grave de las vías respiratorias), sedimentos o cilindros fibrinosos de las vías respiratorias y depósito de fibrina alveolar.

Los términos «nebulización», «nebulizado» y otras variaciones gramaticales hacen referencia en la presente al proceso de convertir un líquido en pequeñas gotas de aerosol. En algunas modalidades, las gotas de aerosol tienen un diámetro mediano de aproximadamente 2-10 μm . En algunas modalidades, las gotas de aerosol tienen un diámetro mediano de aproximadamente 2-4 μm .

Los términos «perfluorocarbono» y «PFC» se utilizan de forma intercambiable y hacen referencia en la presente a un compuesto de organoflúor que contiene predominantemente carbono y flúor. Cabe señalar que el término

«perfluorocarbono» implica la inclusión de moléculas altamente fluoradas que contienen moléculas además de carbono y flúor y se denominan comúnmente como fluorocarbonos. Los ejemplos de perfluorocarbonos incluyen, de modo no taxativo, perfluorodecalina, perfluoro-octilbromuro, FC 77, PF 5060 y Rimar 101. Los PFC que se utilizan de acuerdo con la presente invención comparten propiedades fisicoquímicas similares con respecto a la densidad, la tensión en la superficie y la solubilidad del gas, pero pueden diferir con respecto a la radioopacidad y la viscosidad quinemática, lo que podría tener impacto en la visualización y la movilidad de los cilindros en las vías respiratorias durante la limpieza de sedimentos. Cada perfluorocarbono mencionado incluye todos los isómeros relevantes como estereoisómeros, enantiómeros y diastereómeros.

El término «activador de plasminógeno» se refiere a un polipéptido de serina proteasa que convierte plasminógeno en plasmina e incluye, de modo no taxativo, tPA, uPA (formas activas o de cadena doble) y una proenzima scuPA como se define en la presente.

Una «composición farmacéutica» pretende incluir la combinación de un agente activo con un portador, inerte o

activo, lo que hace que la composición sea adecuada para uso en diagnóstico o terapia in vitro, in vivo o ex vivo.

Tal como se utiliza en la presente, el término «portador farmacéuticamente aceptable» o «excipiente» comprende cualquiera de los portadores farmacéuticamente estándar como solución salina amortiguada con fosfato, solución salina (incluida solución salina estéril), agua y emulsiones, como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, en las que «aceite» representa la fase inmiscible en agua de la emulsión que es farmacéuticamente aceptable y diversos tipos de agentes humectantes. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Se pueden encontrar ejemplos de portadores, estabilizantes y adyuvantes en Martin, REMINGTON'S PHARM. SCI., 15^a Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975)).

Tal como se usa en la presente, el término «sales farmacéuticamente aceptables» se refiere a cualquier sal de adición básica o ácida cuyos contraiones no sean tóxicos para el sujeto al que se le administra en dosis farmacéuticas de las sales. El experto en la técnica conoce ejemplos específicos de sales farmacéuticamente aceptables.

Los términos «cantidad farmacéuticamente eficaz», «cantidad terapéuticamente eficaz» o «dosis terapéuticamente eficaz» se refieren a la cantidad de un compuesto, como una composición de ACPD, que provoca la respuesta biológica o médica de un
5 tejido, sistema, animal o ser humano que procura el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro profesional médico.

El término «polipéptido» se utiliza en su sentido más amplio
10 para hacer referencia a un compuesto de dos o más subunidades de aminoácido, análogos de aminoácidos o peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar enlazadas mediante enlaces peptídicos. En otra modalidad, la subunidad puede estar enlazada mediante otros enlaces, p. ej., éster, éter, etc.
15 Tal como se utiliza en la presente, el término «aminoácido» hace referencia a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluidos glicina y tanto el isómero óptico D como L y análogos de aminoácido y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina comúnmente un
20 oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido se denomina comúnmente un polipéptido o una proteína.

Un polinucleótido o una región polinucleotídica (o un

polipéptido o una región polipeptídica) tiene un porcentaje determinado (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %) de «identidad de secuencia» u «homología» con otra secuencia, lo que significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases

5 (o aminoácidos) es iguales en la comparación de ambas secuencias. La alineación y el porcentaje de homología o identidad de secuencia se pueden determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los descritos en CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M.

10 Ausubel et ál., eds., 1987) Suplemento 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1. Preferentemente, se utilizan parámetros predefinidos para la alineación. Un programa de alineación preferido es BLAST, utilizando parámetros predefinidos. En particular, los programas preferidos son BLASTN y BLASTP,

15 utilizando los siguientes parámetros predefinidos: Código genético=estándar; filtro=ninguno; cadena=ambas; corte=60; expectativa=10; Matriz=BLOSUM62; Descripciones=50 secuencias; clasificación mediante=VALOR ELEVADO; Bases de datos=no redundantes, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS

20 traducciones+SwissProteína+SPactualización+PIR.

Los términos «prevenir», «prevención» y variaciones gramaticales de estos, tal como se usan en la presente, se refieren a un método para retrasar o evitar parcial o

completamente la aparición o la recurrencia de una afección o un trastorno y/o uno o más de sus síntomas concomitantes, o evitar que un sujeto padezca o vuelva a padecer una afección o un trastorno, o reducir el riesgo de que padezca o vuelva a padecer una afección o un trastorno o uno o más de sus síntomas concomitantes.

El término «sujeto» como se define en la presente incluye animales, tales como mamíferos, que incluyen, de modo no taxativo, primates (p. ej., seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y similares. En modalidades preferidas, el sujeto es un ser humano.

Los términos «cantidad farmacéuticamente eficaz», «cantidad terapéuticamente eficaz» o «dosis terapéuticamente eficaz» se refieren a la cantidad de un compuesto, como una composición de tPA y/o scuPA, que provoca la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o ser humano que procura el investigador, veterinario, doctor en medicina u otro profesional médico.

Los términos «activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple» y «scuPA» se utilizan de forma intercambiable

y hacen referencia en la presente a una proenzima de un polipéptido de serina proteasa de uroquinasa (en algunas modalidades, EC 3.4.21.73) que puede estar implicada en la conversión de plasminógeno a plasmina o a una proenzima como se describe en la patente estadounidense n.º 7,332,469, que se incorpora a la presente mediante esta referencia. El «activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple» o «scuPA» se puede activar mediante escisión proteolítica entre Lys158 e Ile159, lo que produce dos cadenas enlazadas mediante un enlace disulfuro que forma la enzima de serina proteasa. Se debe comprender que los homólogos de scuPA también se incluyen en la presente invención. El término «homólogo de scuPA» se refiere en la presente a homólogos, ortólogos y parálogos de la proenzima del polipéptido de serina proteasa de uroquinasa identificada como EC 3.4.21.73 y otras secuencias con más de 70 % de homología con la proenzima del polipéptido de serina proteasa de uroquinasa identificada como EC 3.4.21.73 o una proenzima como se describe en la patente estadounidense n.º 7,332,469.

20

Un «sujeto», «individuo» o «paciente» se utiliza de manera intercambiable en la presente y se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, de modo no taxativo, murinos,

simios, humanos, animales de granja, animales para el deporte y mascotas.

El término «cantidad terapéuticamente eficaz» incluye la
5 cantidad de compuesto, como una composición de tPA y/o scuPA
que, al administrarse, es suficiente para prevenir el
desarrollo, o aliviar en cierta medida, uno o más de los
síntomas de una anomalía de LPAIH que se está tratando. La
cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del
10 compuesto, como una composición de tPA y/o scuPA, el
trastorno o las afecciones y su gravedad, la vía de
administración, el tiempo de administración, la velocidad de
excreción, la combinación de fármacos, el criterio del médico
tratante, la forma de dosificación y la edad, el peso, la
15 salud general, el sexo y/o la dieta del sujeto que se deba
tratar.

Los términos «activador de plasminógeno tisular» y «tPA» se
utilizan de forma intercambiable y hacen referencia en la
20 presente a una serina proteasa (en algunas modalidades, EC
3.4.21.68) que puede estar implicada en la conversión de
plasminógeno a plasmina. Se debe comprender que los términos
«activador de plasminógeno tisular» y «tPA» incluye formas
recombinantes que incluyen, de modo no taxativo, altepasa,

reteplasa, tenecteplasa y desmoteplasa. Los términos «activador de plasminógeno tisular» y «tPA» también incluyen la forma de cadena simple (sc-tPA), la forma de cadena doble (ds-tPA) y mezclas de estas. En algunas modalidades, el tPA
5 es un tPA humano o un tPA derivado de humano. También se debe comprender que los homólogos de tPA también se incluyen en la presente invención. El término «homólogo de tPA» se refiere a homólogos, ortólogos y parálogos del polipéptido activador del plasminógeno tisular identificado como EC 3.4.21.68 y
10 otras secuencias con más de un 70 % de homología con el polipéptido activador del plasminógeno tisular identificado como EC 3.4.21.68. En algunas modalidades, el tPA es una forma de cadena simple como la forma ALTEPASETTM.

15 Los términos «tratar» y «tratamiento», así como sus variaciones gramaticales como se incluyen en la presente, incluyen retrasar, aliviar, mitigar o reducir parcial o completamente la intensidad de uno o más síntomas relacionados de un trastorno o una afección como una LPAIH
20 y/o aliviar, mitigar o impedir una o más causas de un trastorno o una afección, como una afección de LPAIH. Los tratamientos de acuerdo con la invención pueden aplicarse de manera preventiva, profiláctica, paliativa o correctiva. En algunos casos, los términos «tratar», «trata», «tratamiento»

y variaciones gramaticales de estos incluyen reducir parcial o totalmente una afección o un síntoma asociado con una afección de LPAIH en comparación con un tratamiento previo del sujeto o en comparación con la incidencia de esta afección o este síntoma en una población general o de estudio. En algunas modalidades, una afección de LPAIH incluye uno o más de: menor oxigenación, obstrucción de las vías respiratorias (que incluye una obstrucción grave de las vías respiratorias), sedimentos o cilindros fibrinosos de las vías respiratorias y depósito de fibrina alveolar. En algunas modalidades, se trata una afección de LPAIH con una menor incidencia de sangrado.

El término «nebulizador de malla vibradora» se refiere en la presente a cualquier nebulizador que funcione según el principio general de utilizar una placa o malla vibradora con múltiples aberturas (una placa con aberturas) para generar un aerosol de baja velocidad y partículas finas. Algunos nebulizadores pueden incluir una membrana/malla con entre 1000 y 7000 orificios y dicha malla/membrana vibra sobre un depósito de líquido (remitirse, p. ej., a la publicación de patente estadounidense n.º 20090134235 y Waldrep y Dhand 2008, cada uno de los cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia). En algunas modalidades, el

nebulizador de masa vibradora es un nebulizador profesional AERONEB®, Omron MICROAIR®, Pari EFLOW® o un atomizador EZ Breathe. En algunos aspectos, un nebulizador de malla vibradora tiene una frecuencia de vibración de entre
5 alrededor de 50-250 kHz, 75-200 kHz 100-150 kHz o alrededor de 120 kHz. Estos dispositivos tienen una eficacia elevada en el suministro de aerosol en el pulmón y el volumen de líquido restante en estos dispositivos es mínimo, lo que representa una ventaja para compuestos potentes y costosos como los
10 activadores de plasminógeno.

III. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar modalidades preferidas de la invención. Los expertos en la
15 técnica deben observar que las técnicas descritas en los ejemplos a continuación representan técnicas que el inventor descubrió que funcionan de forma correcta en la práctica de la invención y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos de ponerla en práctica. No
20 obstante, los expertos en la técnica, en función de la presente descripción, deben observar que se pueden realizar diversos cambios en las modalidades específicas descritas y seguir obteniendo un resultado igual o similar sin alejarse del espíritu y alcance de la invención.

Ejemplo 1 - El suministro intratraqueal de scuPA recombinante en ratones con LPA inducida por bleomicina aumenta la actividad de BAL uPA

5

Se indujo LPA en ratones C57/B6 con 2,5 U/kg de bleomicina en el día 0 (n=10 animales/grupo). Los ratones se trataron diariamente con 25.000 U, 167 µg/ratón de scuPA humano recombinante mediante un microaspersor (100 µl). En el día 7, se obtuvo BAL 4 horas después de la última administración con microaspersor de scuPA. Se midió la actividad de uPA usando el sustrato amidolítico S-2444 (de forma directa + luego de la incubación con 1 mU/ml de plasmina durante 5 horas). Los resultados se muestran en la figura 1. El aumento de actividad de uPA luego del tratamiento con plasmina sugirió que parte del scuPA nebulizado permanecía intacto en los fluidos del revestimiento alveolar y se mantuvo disponible para la activación mediante plasmina *in vivo*. No se produjo sangrado pulmonar o sistémico. Estos datos confirman los de un informe previo que muestra que el scuPA nebulizado aumenta la actividad fibrinolítica del lavado en LP inducida por traumatismo y se tolera bien (Munster *et ál.*, 2002). Los hallazgos también muestran que se generó actividad fibrinolítica duradera de scuPA (un aumento sustancial 4

horas después de la atomización) en los pulmones en la LPA.

Ejemplo 2 - El scuPA nebulizado lisa los cilindros de las vías respiratorias y se puede detectar en BAL de ovejas con LPAIH

Se trató una oveja con scuPA nebulizado (2 mg/tratamiento iniciado 4 horas luego de la inducción de LPAIH y continuado cada 4 horas x 48 horas. La carga de cilindros en las vías respiratorias (valor de obstrucción de 12) cayó dentro del rango de ovejas tratadas con tPA nebulizado a 4 mg q 4 horas (v. 20,7 en ovejas tratadas con vehículo con LPAIH) (Enkhbaatar et ál., 2004b). Como se muestra en la figura 2, el BAL (lavado broncoalveolar, por su sigla en inglés) de las ovejas no presentó actividad de uPA de referencia detectable mediante el análisis fluorimétrico (carril 2), pero tuvo actividad de uPA detectable asociada con el antígeno de uPA humano luego del tratamiento con scuPA (carril 3) y el antígeno de uPA y la actividad también se presentaron en homogenados pulmonares (carril 4) del animal tratado con scuPA. Carril 1: estándar de uPA.

Ejemplo 3 - El scuPA nebulizado lisa los cilindros de las vías respiratorias y se puede detectar en BAL de ovejas con

LPAIH

Los estudios también se realizaron en soluciones de scuPA con 1 mg/mL de scuPA disuelto en solución salina amortiguada fisiológica o solución salina normal y luego se nebulizaron usando dos tipos de nebulizadores de malla vibradora, el atomizador EZ Breathe y el nebulizador AeroNeb Pro. El scuPA se disolvió fácilmente en ambos portadores líquidos. Se confirmó que la actividad del scuPA antes y después de la nebulización no se vio afectada por las condiciones de nebulización (p. ej., formación de solución, cizallamiento y temperatura del proceso de nebulización en el nebulizador). Asimismo, se confirmó que el tamaño mediano de partícula geométrica para las soluciones de scuPA fue de 3-4 micrones con una distribución de tamaño estrecha y aceptable. Los materiales, métodos y resultados se brindan a continuación y se incluye un esquema del procedimiento en la figura 3.

Preparación de solución salina amortiguada con fosfato y solución salina estéril:

20

La solución salina amortiguada con fosfato (DPBS, Lote 14190-250, Gibco) se adquirió de Biostore at UT-Austin. Las composiciones de PBS se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

5	Componentes	Peso molecular	Concentración (mg/l)	mM
	Sales inorgánicas			
	Cloruro de potasio (KCl)	75	200	2,67
10	Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	136	200	1,47
	Cloruro de sodio (NaCl)	58	8.000	137,93
15	Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄ - 7H ₂ O)	268	2.160	8,06

El pH de la PBS fue de 7,3±0,1 La solución salina estéril se adquirió de B.Braun Medical Inc (Lote J1H573). Ambas preparaciones se almacenaron a temperatura ambiente y se evitó el calor excesivo.

Introducciones de dispositivo:

Se utilizaron el nebulizador EZ Breathe y el nebulizador AeroNeb pro para el análisis. El sistema de nebulizador profesional Aeroneb® (malla vibradora, Aerogen, Galway) era un dispositivo médico portátil para múltiples usos del
5 paciente. Se pretende que Aeroneb® atomice las medicaciones prescritas por el médico para inhalación aprobadas para uso con un nebulizador de fin generalizado. El atomizador EZ Breathe (malla vibradora, Nephron Pharmaceuticals Corporation, EUA) es un dispositivo previsto para atomizar
10 una medicación líquida en forma de aerosol en el aire que respira una persona. Estos dispositivos se pueden utilizar en pacientes con y sin ventilación mecánica u otra asistencia respiratoria de presión positiva.

15 *Preparación de soluciones de scu-PA:*

Cada uno de los ocho frascos con 3,5 mg/mL de scu-PA se obtuvieron y almacenaron a -80 °C. Para hacer dos tipos de soluciones de scu-PA, las soluciones se prepararon de la
20 siguiente forma:

A. Los frascos de scu-PA se mantuvieron a temperatura ambiente (20 °C-25 °C) hasta derretirse en la solución. Se transfirieron dos mL de la solución del frasco a un nuevo

frasco de 10 mL usando una jeringa de 6 mL.

- B.** Usando una jeringa de 6 mL con una aguja de calibre 21 unida, se inyectaron 3 mL de solución salina amortiguada con fosfato estéril (o solución salina estéril) in un frasco. El contenido se agitó de forma manual hasta que toda la solución de scu-PA estaba uniforme. Esta solución luego se diluyó con solución salina amortiguada con fosfato estéril (o solución salina estéril) hasta una concentración final de 1 mg/mL.
- 10 *Análisis de distribución de tamaño de partícula (PSD, por su sigla en inglés) geométrica:*

Ambos nebulizadores se cargaron con los dos tipos de 5 mL de scu-PA a una concentración de 1 mg/mL como muestras y solución salina pura y PBS pura como controles vacíos, por separado (8 muestras en total). La distribución de tamaño de partícula (PSD) geométrica se determinó usando un Malvern Spraytec. Se realizó un procedimiento de nebulización estándar 5 veces, cada prueba duró 5 segundos. Todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente, con presión barométrica y humedad.

Muestras recolectadas del nebulizador para estudio adicional:

Luego de 10 segundos, comenzó el procedimiento nebulizado y se realizó hasta que la generación de aerosol era estable, luego de lo cual se recolectaron muestras de 500 µL del producto nebulizado scu-PA (4 muestras en total) y luego se
 5 congelaron en el refrigerador a -80 °C. Se prepararon seis muestras como se ilustra en la Tabla 2.

Tabla 2

10		Con solución salina amortiguada con fosfato estéril	Con solución salina estéril
15	Antes de la nebulización	1 (1)	1 (2)
	Luego de la nebulización		
	Nebulizador atomizador EZ Breathe	1 (3)	1 (5)
20	Nebulizador AeroNeb pro	1 (4)	1 (6)
	Total: 6		

Resultados:

La tabla 3 muestra información sobre la distribución de tamaño de partícula (PSD) geométrica (n=5) de las muestras y la figura 4 muestra la actividad de cada muestra luego de la nebulización.

Tabla 3

Nombre del nebulizador	Muestra	Solvente	X(50 %)	X(10 %)	X(90 %)
			µm	µm	µm
Aeroneb Pro	PBS	PBS	3,14	0,87	7,74
	salina	salina	3,25	0,92	8,66
	scu-PA	PBS	3,83	0,96	11,40
	scu-PA	salina	3,60	0,91	11,48
Atomizador					
EZ Breathe	PBS	PBS	5,29	1,13	11,54
	salina	salina	4,91	1,04	9,53
	scu-PA	PBS	4,79	1,16	11,17
	scu-PA	salina	4,80	1,28	11,24

Según estos resultados, las soluciones de scuPA se optimizaron para la nebulización centrándose en identificar el mejor nebulizador. Otros parámetros que se estudiaron para la administración con nebulizador incluyen confirmación del efecto de parámetros de procesamiento (p. ej., composición de solución óptima para actividad de scuPA, propiedades aerodinámicas incluida separación de partículas finas, diámetro aerodinámico mediano de la masa y dosis total emitida, efectos de la temperatura en la actividad de scuPA durante la nebulización (p. ej., uso de diferentes tipos de mecanismos de nebulizador) y los efectos del cizallamiento (p. ej., presión de atomización, vibraciones ultrasónicas, tamaño de malla) del líquido en la actividad de scuPA.

Ejemplo 4 - La suspensión de tPA en PFC es estable y conserva la actividad de tPA

La figura 5 muestra que la suspensión de tPA en PFC es estable y que se conserva la actividad de tPA. Para estos estudios, las suspensiones de tPA/PFC (18 mL de la suspensión de tPA-PFC realizada a 0,22 mg/mL) se inyectaron a través del tubo endotraqueal (7 mm de tubo endotraqueal para adulto) durante el tiempo de retención de 50 minutos a 37 °C usando una jeringa de 10 mL y una aguja de calibre 21. Se observó

que el tPA se humedeció de forma correcta y se desaglomeró en el PFC. Otros parámetros que se estudian para administración de tPA incluyen confirmar el efecto de parámetros de procesamiento (p. ej., reducción de tamaño de partícula del tPA, viscosidad del PFC y suspensión de tPA-PFC resultante, contenido de sólidos de la suspensión de tPA-PFC y su efecto en la administración durante la broncoscopia en la actividad de tPA). Luego se utiliza el mismo enfoque para analizar las formulaciones de las intervenciones de scuPA-PFC.

10

El PFC y las fibrinolisinias en su conjunto fomentan el retiro de sedimentos en las vías respiratorias, así como la depuración de fibrina alveolar y un mejor resultado. De forma específica, el PFC suministra de forma eficaz las fibrinolisinias que promueven 1) disolución y desplazamiento de los cilindros en las vías respiratorias y 2) retiro de sedimentos alveolares y en las vías respiratorias a la vez que se avala el intercambio gaseoso respiratorio. De forma mecánica, el PFC recluta de forma eficaz el volumen pulmonar.

20 Dada la baja tensión en la superficie del líquido de PFC, el PFC distribuye la fibrinolisinina en el pulmón, posiblemente entre cilindros y la pared de las vías respiratorias y, por lo tanto, se descomponen los cilindros a medida que se forman mientras que se enlentece la formación de nuevos cilindros. A

medida que se volatiza el PFC del pulmón, la fibrinolisisina permanece para disolver adicionalmente cilindros en las vías respiratorias y fibrina alveolar. Luego de repetir la dosis con suspensiones de PFC, los volúmenes de pFC no solo
5 depositan fármaco adicional sino que desplazan los cilindros y el sedimento alveolar. Dado que el PFC es incomprensible, este abre vías respiratorias pequeñas dañadas y así ayuda en el reclutamiento. El contacto con los PFC también puede proteger el epitelio subyacente mediante atenuación de la
10 coagulación, que se inicia mediante un factor tisular en las vías respiratorias pequeñas y los alveolos virtualmente en todas las formas de LPA. Con una succión en línea, el sedimento de menor densidad flota en un PFC relativamente más denso, lo que facilita el retiro de sedimentos y fragmentos
15 de cilindros de fibrina en las vías respiratorias.

* * *

Todos los métodos descritos y reivindicados en la presente se
20 pueden realizar y llevar a la práctica sin experimentación indebida en virtud de la presente descripción. Si bien las composiciones y los métodos de la presente invención se describieron en términos de modalidades preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden

aplicar variaciones en los métodos y las etapas o la
secuencia de etapas de los métodos descritos en la presente
sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la
invención. De forma más específica, resultará evidente que se
5 pueden sustituir los agentes descritos en la presente con
determinados agentes tanto química como fisiológicamente
relacionados y obtener los mismos resultados o resultados
similares. Se considera que todas dichas modificaciones y
sustitutos similares evidentes para los expertos en la
10 técnica quedan comprendidos por el espíritu, alcance y
concepto de la invención, tal como se define en las
reivindicaciones adjuntas.

15

20

REFERENCIAS

Las referencias que figuran a continuación se incorporan específicamente a la presente mediante esta referencia en la
 5 medida en que proporcionan ejemplos de procedimientos u otros detalles complementarios a los establecidos en la presente.

- Comité de prevención de lesión y veneno (2000) *Pediatrics* 105:1355-1357
- 10 Enkhbaatar y Traber (2004) *Clin.Sci.(Lond)*. 107:137-143
- Enkhbaatar et ál. (2004) *Shock*. 22:70-75
- Enkhbaatar et ál. (2008). *Clin.Sci.(Lond)*. 114:321-329
- Enkhbaatar, Herndon y Traber (2008) *J Burn Care Res*. 30:159-162
- 15 O'Donnell (2012). *J.Pharm.Pract.* 25:22-29
- Munster et ál. (2002) *Blood Coagul. Fibrinolysis* 13:591-601
- Phua et ál. (2009) *Am J Respir Crit Care Med*. 179:220-227
- Tuinman et ál. (2012). *Crit Care* 16:R70
- Waldrep y Dhand, (2008) *Current Drug Delivery*, 5(2):114-119
- 20 Publicación de patente estadounidense n.º 20090134235

REIVINDICACIONES**SE REIVINDICA LO SIGUIENTE:**

- 5 1. Un método para preparar una solución enzimática para administración en las vías respiratorias de un sujeto que comprende nebulizar la solución enzimática para brindar una solución nebulizada.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la enzima es un activador de plasminógeno.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno de uroquinasa
- 15 de cadena simple (scuPA) o un activador de plasminógeno tisular (tPA).
4. El método de la reivindicación 2, en el que el activador de plasminógeno es un scuPA.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en el que la nebulización de la solución enzimática se realiza utilizando un nebulizador de malla vibradora.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el nebulizador de masa vibradora es un nebulizador profesional AERONEB® o un atomizador EZ Breathe.

5 7. El método de la reivindicación 5, en el que dicha nebulización de la solución enzimática no comprende el uso de un nebulizador a chorro o un nebulizador ultrasónico.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la solución
10 enzimática es una solución acuosa.

9. El método de la reivindicación 8, en el que la solución enzimática comprende una concentración de sal fisiológicamente aceptable.

15

10. El método de la reivindicación 8, en el que la solución enzimática comprende un agente amortiguador de pH.

11. El método de la reivindicación 8, en el que la solución
20 enzimática es una solución salina amortiguada con fosfato (PBS).

12. El método de la reivindicación 8, en el que la solución enzimática comprende scuPA.

13. El método de la reivindicación 1, en el que la solución enzimática comprende:

- (i) obtener una composición enzimática liofilizada,
- 5 (ii) reconstituir la composición enzimática liofilizada en una solución acuosa para brindar una solución enzimática, y
- (iii) nebulizar la solución enzimática.

10 14. El método de la reivindicación 1, en el que la nebulización de la solución enzimática comprende brindar suficiente energía de nebulización y/o tiempo para brindar una solución nebulizada con un tamaño de gota mediano de entre alrededor de 2,5 μm y 10 μm .

15 15. El método de la reivindicación 14, en el que la nebulización de la solución enzimática comprende brindar suficiente energía de nebulización y/o tiempo para brindar una solución nebulizada con un tamaño de gota mediano de
20 entre alrededor de 2,5 μm y 8 μm .

16. El método de la reivindicación 15, en el que la nebulización de la solución enzimática comprende brindar suficiente energía de nebulización y/o tiempo para brindar

una solución nebulizada con un tamaño de gota mediano de entre alrededor de 3,0 μm y 6 μm .

17. Una solución enzimática nebulizada producida a través
5 del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones
1 a 16.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16,
que comprende además administrarle la solución nebulizada a
10 las vías respiratorias de un sujeto que lo necesita.

19. El método de la reivindicación 18, en el que el sujeto
tiene una infección o lesión pulmonar aguda.

15 20. El método de la reivindicación 19, que comprende además
administrarle la solución nebulizada a las vías respiratorias
de un sujeto con una lesión pulmonar inducida por productos
químicos.

20 21. El método de la reivindicación 19, que comprende además
administrarle la solución nebulizada a las vías respiratorias
de un sujeto con bronquitis plástica, asma o síndrome de
alteración respiratoria aguda (SARA).

22. El método de la reivindicación 19, que comprende además administrarle la solución nebulizada a un sujeto con lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH).

5 23. Un método para tratar una lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH) en un sujeto que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un activador de plasminógeno nebulizado mediante una vía respiratoria, en el que el activador de plasminógeno se
10 nebuliza usando un nebulizador de malla vibradora.

24. El método de la reivindicación 23, en el que el activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA) o un activador de
15 plasminógeno tisular (tPA).

25. El método de la reivindicación 23, en el que el activador de plasminógeno es un scuPA.

20 26. Una composición que comprende una solución nebulizada de activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA) o un activador de plasminógeno tisular (tPA).

27. La composición de la reivindicación 26, en la que la

solución es una solución acuosa.

28. La composición de la reivindicación 27, en la que la
solución comprende una concentración de sal fisiológicamente
5 aceptable.

29. La composición de la reivindicación 27, en la que la
solución comprende un agente amortiguador de pH.

10 30. La composición de la reivindicación 29, en la que la
solución es una solución salina amortiguada con fosfato
(PBS).

31. La composición de la reivindicación 26, que comprende
15 scuPA.

32. La composición de la reivindicación 26, en la que la
solución nebulizada tiene un tamaño de partícula mediano de
entre alrededor de 2,5 μm y alrededor de 10 μm .

20

33. La composición de la reivindicación 26, en la que la
solución nebulizada tiene un tamaño de partícula mediano de
entre alrededor de 2,5 μm y alrededor de 8 μm .

34. La composición de la reivindicación 26, en la que la solución nebulizada tiene un tamaño de partícula mediano de entre alrededor de 3,0 μm y alrededor de 6 μm .

5 35. Una composición para uso en el tratamiento de infección pulmonar o lesión pulmonar aguda, donde dicha composición comprende una solución nebulizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-34.

10 36. La composición de la reivindicación 35 para uso en el tratamiento de lesión pulmonar inducida por productos químicos, bronquitis plástica, asma, síndrome de alteración respiratoria aguda (SARA) o lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH).

15

37. Una composición para uso en el tratamiento de lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH), donde dicha composición comprende una solución nebulizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-34.

20

38. Una composición que comprende un activador de plasminógeno y un perfluorocarbono.

39. La composición de la reivindicación 38, en la que el

activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA) o un activador de plasminógeno tisular (tPA).

5 40. La composición de la reivindicación 38, en la que el activador de plasminógeno es un scuPA.

41. La composición de la reivindicación 38, en la que el perfluorocarbono comprende un grupo cicloalquilo.

10

42. La composición de la reivindicación 38, en la que el perfluorocarbono se selecciona de perfluorodecalina y perfluoro-octilbromuro.

15 43. La composición de la reivindicación 38 en la que el perfluorocarbono comprende perfluorodecalina.

44. Una composición para uso en el tratamiento de infección o lesión pulmonar aguda, donde dicha composición comprende
20 una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38-43.

45. La composición de la reivindicación 44 para uso en el tratamiento de lesión pulmonar inducida por productos

químicos, bronquitis plástica, asma, síndrome de alteración respiratoria aguda (SARA) o lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH).

5 46. Una composición para uso en el tratamiento de lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH), donde dicha composición comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38-43.

10 47. Un método para tratar a un sujeto con una infección pulmonar o lesión pulmonar, que comprende administrarle una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38-43 a las vías respiratorias del sujeto.

15

48. El método de la reivindicación 47, en el que el sujeto tiene lesión pulmonar inducida por productos químicos.

49. El método de la reivindicación 48, en el que el sujeto
20 padece bronquitis plástica, síndrome de alteración respiratoria aguda (SARA) o lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH).

50. Un método para tratar a un sujeto con lesión pulmonar

aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH) que comprende administrarle una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38-43 a las vías respiratorias del sujeto.

5

51. Un método para tratar una lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH) en un sujeto que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un activador de plasminógeno
10 y un perfluorocarbono.

52. El método de la reivindicación 51, en el que el activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA) o un activador de
15 plasminógeno tisular (tPA).

53. El método de la reivindicación 51, en el que el activador de plasminógeno es un scuPA.

20 54. El método de la reivindicación 51, en el que el perfluorocarbono se selecciona de perfluorodecalina y perfluoro-octilbromuro.

55. El método de la reivindicación 54 en el que el

perfluorocarbono comprende perfluorodecalina.

5

10

15

20

25

30

RESUMEN

Métodos y composiciones para administración de enzimas a las
5 vías respiratorias de un sujeto. En algunos aspectos, se
brinda la composición nebulizada de enzimas, como activadores
de plasminógenos. En aun otros aspectos, se brindan
composiciones de perfluorocarbono que comprenden enzimas,
como activadores de plasminógenos. Las composiciones, en
10 algunos aspectos, pueden utilizarse para el tratamiento de
infecciones pulmonares o lesión pulmonar aguda, como lesión
pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH).

15

20

25

REIVINDICACIONES**SE REIVINDICA LO SIGUIENTE:**

- 5 1. Un método para preparar una solución enzimática para administración en las vías respiratorias de un sujeto que comprende nebulizar la solución enzimática para brindar una solución nebulizada.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la enzima es un activador de plasminógeno.
3. El método de la reivindicación 2, en el que el activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno de uroquinasa
- 15 de cadena simple (scuPA) o un activador de plasminógeno tisular (tPA).
4. El método de la reivindicación 2, en el que el activador de plasminógeno es un scuPA.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, en el que la nebulización de la solución enzimática se realiza utilizando un nebulizador de malla vibradora.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el nebulizador de masa vibradora es un nebulizador profesional AERONEB® o un atomizador EZ Breathe.

5 7. El método de la reivindicación 5, en el que dicha nebulización de la solución enzimática no comprende el uso de un nebulizador a chorro o un nebulizador ultrasónico.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la solución
10 enzimática es una solución acuosa.

9. El método de la reivindicación 8, en el que la solución enzimática comprende una concentración de sal fisiológicamente aceptable.

15

10. El método de la reivindicación 8, en el que la solución enzimática comprende un agente amortiguador de pH.

11. El método de la reivindicación 8, en el que la solución
20 enzimática es una solución salina amortiguada con fosfato (PBS).

12. El método de la reivindicación 8, en el que la solución enzimática comprende scuPA.

13. El método de la reivindicación 1, en el que la solución enzimática comprende:

- (i) obtener una composición enzimática liofilizada,
- 5 (ii) reconstituir la composición enzimática liofilizada en una solución acuosa para brindar una solución enzimática, y
- (iii) nebulizar la solución enzimática.

10 14. El método de la reivindicación 1, en el que la nebulización de la solución enzimática comprende brindar suficiente energía de nebulización y/o tiempo para brindar una solución nebulizada con un tamaño de gota mediano de entre alrededor de 2,5 μm y 10 μm .

15 15. El método de la reivindicación 14, en el que la nebulización de la solución enzimática comprende brindar suficiente energía de nebulización y/o tiempo para brindar una solución nebulizada con un tamaño de gota mediano de
20 entre alrededor de 2,5 μm y 8 μm .

16. El método de la reivindicación 15, en el que la nebulización de la solución enzimática comprende brindar suficiente energía de nebulización y/o tiempo para brindar

una solución nebulizada con un tamaño de gota mediano de entre alrededor de 3,0 μm y 6 μm .

17. Una solución enzimática nebulizada producida a través
5 del método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16,
que comprende además administrarle la solución nebulizada a
10 las vías respiratorias de un sujeto que lo necesita.

19. El método de la reivindicación 18, en el que el sujeto
tiene una infección o lesión pulmonar aguda.

15 20. El método de la reivindicación 19, que comprende además
administrarle la solución nebulizada a las vías respiratorias
de un sujeto con una lesión pulmonar inducida por productos
químicos.

20 21. El método de la reivindicación 19, que comprende además
administrarle la solución nebulizada a las vías respiratorias
de un sujeto con bronquitis plástica, asma o síndrome de
alteración respiratoria aguda (SARA).

22. El método de la reivindicación 19, que comprende además administrarle la solución nebulizada a un sujeto con lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH).

5 23. Un método para tratar una lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH) en un sujeto que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un activador de plasminógeno nebulizado mediante una vía respiratoria, en el que el activador de plasminógeno se
10 nebuliza usando un nebulizador de malla vibradora.

24. El método de la reivindicación 23, en el que el activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA) o un activador de
15 plasminógeno tisular (tPA).

25. El método de la reivindicación 23, en el que el activador de plasminógeno es un scuPA.

20 26. Una composición que comprende una solución nebulizada de activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA) o un activador de plasminógeno tisular (tPA).

27. La composición de la reivindicación 26, en la que la

solución es una solución acuosa.

28. La composición de la reivindicación 27, en la que la
solución comprende una concentración de sal fisiológicamente
5 aceptable.

29. La composición de la reivindicación 27, en la que la
solución comprende un agente amortiguador de pH.

10 30. La composición de la reivindicación 29, en la que la
solución es una solución salina amortiguada con fosfato
(PBS).

31. La composición de la reivindicación 26, que comprende
15 scuPA.

32. La composición de la reivindicación 26, en la que la
solución nebulizada tiene un tamaño de partícula mediano de
entre alrededor de 2,5 μm y alrededor de 10 μm .

20

33. La composición de la reivindicación 26, en la que la
solución nebulizada tiene un tamaño de partícula mediano de
entre alrededor de 2,5 μm y alrededor de 8 μm .

34. La composición de la reivindicación 26, en la que la solución nebulizada tiene un tamaño de partícula mediano de entre alrededor de 3,0 μm y alrededor de 6 μm .

5 35. Una composición para uso en el tratamiento de infección pulmonar o lesión pulmonar aguda, donde dicha composición comprende una solución nebulizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-34.

10 36. La composición de la reivindicación 35 para uso en el tratamiento de lesión pulmonar inducida por productos químicos, bronquitis plástica, asma, síndrome de alteración respiratoria aguda (SARA) o lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH).

15

37. Una composición para uso en el tratamiento de lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH), donde dicha composición comprende una solución nebulizada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26-34.

20

38. Una composición que comprende un activador de plasminógeno y un perfluorocarbono.

39. La composición de la reivindicación 38, en la que el

activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA) o un activador de plasminógeno tisular (tPA).

5 40. La composición de la reivindicación 38, en la que el activador de plasminógeno es un scuPA.

41. La composición de la reivindicación 38, en la que el perfluorocarbono comprende un grupo cicloalquilo.

10

42. La composición de la reivindicación 38, en la que el perfluorocarbono se selecciona de perfluorodecalina y perfluoro-octilbromuro.

15 43. La composición de la reivindicación 38 en la que el perfluorocarbono comprende perfluorodecalina.

44. Una composición para uso en el tratamiento de infección o lesión pulmonar aguda, donde dicha composición comprende
20 una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38-43.

45. La composición de la reivindicación 44 para uso en el tratamiento de lesión pulmonar inducida por productos

químicos, bronquitis plástica, asma, síndrome de alteración respiratoria aguda (SARA) o lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH).

5 46. Una composición para uso en el tratamiento de lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH), donde dicha composición comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38-43.

10 47. Un método para tratar a un sujeto con una infección pulmonar o lesión pulmonar, que comprende administrarle una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38-43 a las vías respiratorias del sujeto.

15

48. El método de la reivindicación 47, en el que el sujeto tiene lesión pulmonar inducida por productos químicos.

49. El método de la reivindicación 48, en el que el sujeto
20 padece bronquitis plástica, síndrome de alteración respiratoria aguda (SARA) o lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH).

50. Un método para tratar a un sujeto con lesión pulmonar

aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH) que comprende administrarle una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 38-43 a las vías respiratorias del sujeto.

5

51. Un método para tratar una lesión pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH) en un sujeto que comprende administrarle al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende un activador de plasminógeno
10 y un perfluorocarbono.

52. El método de la reivindicación 51, en el que el activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno de uroquinasa de cadena simple (scuPA) o un activador de
15 plasminógeno tisular (tPA).

53. El método de la reivindicación 51, en el que el activador de plasminógeno es un scuPA.

20 54. El método de la reivindicación 51, en el que el perfluorocarbono se selecciona de perfluorodecalina y perfluoro-octilbromuro.

55. El método de la reivindicación 54 en el que el

perfluorocarbono comprende perfluorodecalina.

5

10

15

20

25

30

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To: MARSHALL P. BYRD
PARKER HIGHLANDER PLLC
1120 S. CAPITAL OF TEXAS HIGHWAY
BUILDING ONE, SUITE 200
AUSTIN, TX 78746

MAR 16 2015

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Attorney _____

Docket No. _____

Action Req'd _____

Date of mailing
(day/month/year)

13 MAR 2015

Applicant's or agent's file reference

UTFB.P1038WO

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US 14/63784

International filing date
(day/month/year)

04 November 2014 (04.11.2014)

Applicant BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

How? Directly to the International Bureau of WIPO preferably through ePCT or on paper to, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 338 82 70

For more detailed instructions, see *PCT Applicant's Guide*, International Phase, paragraphs 9.004 – 9.011.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to any protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with any request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

The applicant may **submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority** to the International Bureau. These comments will be made available to the public after international publication. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established.

Shortly after the expiration of **18 months from the priority date**, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau before the completion of the technical preparations for international publication (Rules 90bis.1 and 90bis.3).

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for **entry into the national phase** before those designated Offices. In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months. For details about the applicable time limits, Office by Office, see www.wipo.int/pct/en/texts/time_limits.html and the *PCT Applicant's Guide*, National Chapters.

Within **19 months from the priority date**, the applicant may request that a **supplementary international search** be carried out by a different International Searching Authority that offers this service (Rule 45bis.1). The procedure for requesting supplementary international search is described in the *PCT Applicant's Guide*, International Phase, paragraphs 8.006-8.032.

Name and mailing address of the ISA/
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

Telephone No. PCT OSP: 571-272-7774

CB

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference UTFB.P1038WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 14/63784	International filing date (<i>day/month/year</i>) 04 November 2014 (04.11.2014)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 04 November 2013 (04.11.2013)
Applicant BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed.

☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

4. With regard to the **title**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 4

☐ as suggested by the applicant.

☒ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/63784

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
see supplemental box ...

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-22

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/63784

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 9/12 (2015.01)

CPC - A61K 9/008; A61K 9/0073;; A61K 9/12

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(8)-A61K 9/12 (2015.01)Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC-A61K 9/008; A61K 9/0073;; A61K 9/12
USPC-424/45; 128/200.23Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Google Patents, Google Scholar (without Patents)
Keywords: administration enzyme airway nebulizing enzyme solution ISALI (inhalational smoke induced acute lung injury) SCUPA (single chain urokinase plasminogen activator) PBS (phosphate buffered saline) buffering nebulizer acute lung injury chemical-induced

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 2003/0113271 A1 (Katyama et al.) 19 June 2003 (19.06.2003) Abstract, para [0013], para [0072], para [0074, para [0015], para [0076], para [0153], para [0182] and entire doc.	1-3,5, 7-11,13-22 ----- 4,6,12
Y	US 2003/0219368 A1 (Idell) 27 November 2003 (27.11.2003) Abstract, para [0014]	4,12
Y	US 2005/0036951 A1 (Henderson) 17 February 2005 (17.02.2005) Abstract, para [0464]	6
Y	US 5,531,219 A (Rosenberg) 02 July 1996 (02.07.1996) Abstract, col 4 ln 45-65	1-22
A	US 4,790,305 A (Zoltan et al.) 13 December 1988 (13.12.1988) Abstract, Fig 1	1-22
A	US 2013/0039847 A1 (Gessler et al.) 14 February 2013 (14.02.2013) Abstract	1-22
A	US 2010/0183620 A1 (Bhawe et al.) 22 July 2010 (22.07.2010) Abstract	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 February 2015 (23.02.2015)

Date of mailing of the international search report

13 MAR 2015

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 14/63784

continuation of BOX III ...

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-22 directed to a method of preparing an enzyme solution for administration to a subject's airway comprising nebulizing the enzyme solution to provide a nebulized solution

Group II: Claims 23-25 and 47-55, directed to a method of treating inhalational smoke induced acute lung injury (ISALI) in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a nebulized plasminogen activator via an airway

Group III: Claims 26-46, directed to a composition comprising a nebulized solution of single chain urokinase plasminogen activator (scuPA) or a tissue plasminogen activator (Tpa)

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features:

The special technical feature of Group I is a method of preparing an enzyme solution for administration to a subject's airway comprising nebulizing the enzyme solution to provide a nebulized solution, not required by group II-III

The special technical feature of Group II is a method of treating inhalational smoke induced acute lung injury (ISALI) in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a nebulized plasminogen activator via an airway, not required by groups I and III

Common technical features:

Groups I- III share the technical feature of a composition comprising a nebulized solution.

Groups I and II share the technical feature of administering to the subject a therapeutically effective amount of a nebulized solution.

Groups II and III share the technical feature of nebulized solution comprising plasminogen activator

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is being anticipated by US 2003/0113271 A1 to Katyama et al.(hereinafter Katyama). Katyama discloses a plasminogen activator (para [0002], plasminogen activator) that comprises a therapeutically effective amount (para [0014], effective amount of the composition) in a nebulized form (para [0013], aerosolization can be performed using any suitable device, representative devices include a jet nebulizer) to be delivered to a subject (para [0014], pulmonary delivery of a biologically active protein to a subject).

Groups I-III, therefore, lack unity under PCT Rule 13.2, because they do not share a same or corresponding special technical feature providing a contribution over the prior art.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: MARSHALL P. BYRD
PARKER HIGHLANDER PLLC
1120 S. CAPITAL OF TEXAS HIGHWAY
BUILDING ONE, SUITE 200
AUSTIN, TX 78746

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year)

13 MAR 2015

Applicant's or agent's file reference
UTFB.P1038WO

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US 14/63784

International filing date (day/month/year)

04 November 2014 (04.11.2014)

Priority date (day/month/year)

04 November 2013 (04.11.2013)

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

IPC(8) - A61K 9/12 (2015.01)

CPC - A61K 9/008; A61K 9/0073;; A61K 9/12

Applicant BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

24 February 2015 (24.02.2015)

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 14/63784

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 14/63784

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees.
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee.
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid.
 - ☒ not paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

☐ complied with.

☒ not complied with for the following reasons:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-22 directed to a method of preparing an enzyme solution for administration to a subject's airway comprising nebulizing the enzyme solution to provide a nebulized solution

Group II: Claims 23-25 and 47-55, directed to a method of treating inhalational smoke induced acute lung injury (ISALI) in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a nebulized plasminogen activator via an airway

Group III: Claims 26-46, directed to a composition comprising a nebulized solution of single chain urokinase plasminogen activator (scuPA) or a tissue plasminogen activator (Tpa)

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features:

The special technical feature of Group I is a method of preparing an enzyme solution for administration to a subject's airway comprising nebulizing the enzyme solution to provide a nebulized solution, not required by group II-III

The special technical feature of Group II is a method of treating inhalational smoke induced acute lung injury (ISALI) in a subject comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of a nebulized plasminogen activator via an airway, not required by groups I and III

Common technical features:

Groups I- III share the technical feature of a composition comprising a nebulized solution.

Groups I and II share the technical feature of administering to the subject a therapeutically effective amount of a nebulized solution.

Groups II and III share the technical feature of nebulized solution comprising plasminogen activator

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is being anticipated by US 2003/0113271 A1 to Katyama et al. (hereinafter Katyama). Katyama discloses a plasminogen activator (para [0002], plasminogen activator) that comprises a therapeutically effective amount (para [0014], effective amount of the composition) in a nebulized form (para [0013], aerosolization can be performed using any suitable device, representative devices include a jet nebulizer) to be delivered to a subject (para [0014], pulmonary delivery of a biologically active protein to a subject).

Groups I-III, therefore, lack unity under PCT Rule 13.2, because they do not share a same or corresponding special technical feature providing a contribution over the prior art.

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

☐ all parts.

☒ the parts relating to claims Nos. 1-22

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 14/63784

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	4-7,12	YES
	Claims	1-3,8-11,13-22	NO
Inventive step (IS)	Claims	none	YES
	Claims	1-22	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-22	YES
	Claims	none	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-3, 8-11,13-22 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2003/0113271 A1 to Katyama et al.(hereinafter Katyama).

Regarding claim 1, Katyama discloses a method of preparing an enzyme solution (para [0074], representative therapeutic proteins include enzymes) for administration to a subjects airway (para [0072], pulmonary delivery) comprising nebulizing the enzyme solution to provide nebulized solutions (para [0057], formulations can be aerosolized).

Regarding claim 2, Katyama discloses a method of claim 1 as discussed. Katyama further discloses wherein the enzyme is a plasminogen activator (para [0076], therapeutic protein comprises a plasminogen activator).

Regarding claim 3, Katyama discloses a method of claim 2 as discussed. Katyama further discloses wherein the plasminogen activator is a single chain urokinase plasminogen activator or a tissue plasminogen activator (para [0076], such as a tissue-type plasminogen activator (tPA) or a urokinase plasminogen activator (uPA)).

Regarding claim 8, Katyama discloses a method of claim 1 as discussed. Katyama further discloses wherein the enzyme solution is an aqueous solution (para [0089], Suitable formulations for administration to a subject include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions).

Regarding claim 9, Katyama discloses a method of claim 8 as discussed. Katyama further discloses wherein the enzyme solution comprises a physiologically acceptable salt concentration (para [0089], render the formulation isotonic with the bodily fluids of the intended recipient (e.g., sugars, salts, and polyalcohols)).

Regarding claim 10, Katyama discloses a method of claim 8 as discussed. Katyama further discloses wherein the enzyme solution comprises a pH buffering agent (para [0090], formulations according to the invention are buffered).

Regarding claim 11, Katyama discloses a method of claim 8 as discussed. Katyama further discloses wherein the solution is phosphate buffered saline (para [0090], Such buffers include citric acid buffers and phosphate buffers).

Regarding claim 13, Katyama discloses a method of claim 1 as discussed. Katyama further discloses obtaining a lyophilized enzyme composition, reconstituting the lyophilized enzyme composition in an aqueous solution (para [0089], stored in a frozen or freeze-dried (lyophilized) condition requiring only the addition of sterile liquid carrier immediately prior to use) nebulizing the enzyme solution (para [0170], sample was nebulized using a jet nebulizer).

Regarding claim 14, Katyama discloses a method of claim 1 as discussed. Katyama further discloses wherein nebulizing the enzyme produces a droplet size between 2.5 and 10 microns (para [0061], comprises droplets having a diameter of about 1 .m to about 5 .m).

Regarding claim 15, Katyama discloses a method of claim 14 as discussed. Katyama further discloses median droplet size between about 2.5 and 8 microns (para [0061], comprises droplets having a diameter of about 1 .m to about 5 .m).

Regarding claim 16, Katyama discloses a method of claim 15 as discussed. Katyama further discloses median droplet size between about 3.0 and 6 microns (para [0061], comprises droplets having a diameter of about 1 .m to about 5 .m).

Regarding claim 17, Katyama further discloses a nebulized enzyme solution (para [0074], A formulation of the invention comprises a therapeutic protein useful for the treatment or prophylaxis of a pulmonary disease or disorder. Representative therapeutic proteins include enzymes and antibodies. A protein used to prepare a formulation suitable for aerosolization).

continued in supplemental page ...

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 14/63784

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The claims employ many trademarks (e.g., see claims 6) which are indefinite insofar as these terms are being used to describe products rather than the source of those products. For example, the term AERONEB is being used to describe a vibrating mesh nebulizer. This constitutes an improper use of a trademark. The product should be used instead (i.e., vibrating mesh nebulizer).

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 14/63784

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
continued from Box V(2)...

Regarding claim 18, Katyama further discloses wherein further comprising administering the nebulized solution to the airway of a subject in need thereof (para [0182], effectively to distribute instillate solution in the lungs).

Regarding claim 19, Katyama discloses a method of claim 18 as discussed. Katyama further discloses wherein the subject has an acute lung injury or infection (para [0153], Interleukin-1 Induced Acute Lung Injury).

Regarding claim 20, Katyama discloses a method of claim 19 as discussed. Katyama further discloses wherein the subject having a chemical induced lung injury (para [0153], Interleukin-1 Induced Acute Lung Injury).

Regarding claim 21, Katyama discloses a method of claim 19 as discussed. Katyama further discloses wherein the subject having plastic bronchitis, asthma or ARDS (para 0113]. In another embodiment of the invention, a surfactant formulation for the treatment of ARDS).

Regarding claim 22, Katyama discloses a method of claim 19 as discussed. Katyama further discloses wherein the subject has acute smoke induced lung injury (para [0015], subject can display a lung disease or disorder, for example an inflammatory disease or disorder (e.g., acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, asthma, bronchitis, or cystic fibrosis), an embolism, or cancer).

Claims 5 and 7 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Katyama.

Regarding claim 5, Katyama discloses a method of claim 1 as discussed. Katyama further discloses wherein the nebulizer can be any form of aerosolization (para [0013], Representative devices include a jet nebulizer, an ultrasonic nebulizer, a metered dose inhaler, and an aerosolization device based on forced passage through a nozzle). Although Katyama does not specifically disclose a vibrating mesh nebulizer; it would have been obvious to a person having ordinary skill in the art to know that vibrating mesh nebulizers can also be used.

Regarding claim 7, Katyama discloses a method of claim 5 as discussed. Katyama further discloses wherein said nebulizing does not comprise use of a jet nebulizer or an ultrasonic nebulizer (para [0013], Representative devices include a metered dose inhaler, and an aerosolization device based on forced passage through a nozzle). Although Katyama does not specifically exclude a jet or ultrasonic nebulizer, it would have been obvious to a person having ordinary skill in the art to know that particular embodiments can be excluded depending on required use.

Claims 4 and 12 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Katyama in view of 2003/0219386 A1 (Idell).

Regarding claim 4, Katyama discloses a method of claim 2 as discussed. Katyama discloses a uPA (para [0076], uPA) but not specifically single chain uPA. However, Idell discloses a method of preventing scarring in a subject (abstract) that uses single chain uPA (para [0014], pharmaceutical composition comprising scuPA). As both Katyama and Idell utilize plasminogen activators for pulmonary diseases; it would have been obvious to a person having ordinary skill in the art to know that the uPA of Katyama can be the single chain uPA discloses by Idell as both teach methods of treating pulmonary diseases.

Regarding claim 12, Katyama discloses a method of claim 8 as discussed. Katyama further discloses wherein the enzyme solution comprises uPA (para [0076], uPA) but not specifically single chain uPA. However, Idell discloses a method of preventing scarring in a subject (abstract) that uses single chain uPA (para [0014], pharmaceutical composition comprising scuPA). As both Katyama and Idell utilize plasminogen activators for pulmonary diseases; it would have been obvious to a person having ordinary skill in the art to know that the uPA of Katyama can be the single chain uPA discloses by Idell as both teach methods of treating pulmonary diseases.

Claim 6 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Katyama in view of 2005/0036951 A1 (Henderson).

Regarding claim 6, Katyama discloses a method of claim 5 as discussed. Katyama does not disclose a particular nebulizer. However, Henderson discloses a method of treating lung disease (abstract), that uses a AERONEB nebulizer (para [0464], an Aeroneb Pro nebulizer was used). As both Katyama and Henderson disclose methods of treating lung diseases with nebulized solutions; it would have been obvious to a person having ordinary skill in the art to know that a Aeroneb nebulizer can be used.

Claims 1-22 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the invention can be made or used in industry.

SEARCH HISTORY

Application Number	PCT/US 14/63784
Search Conducted By	VT
Search Approved By	SV

US/IPC Classifications Searched	IPC(8)- A61K 9/12 (2015.01) CPC-A61K 9/008; A61K 9/0073;; A61K 9/12 USPC-424/45; 128/200.23
Date Conducted	23 February 2015 (23.02.2015)

Documentation Searched	PatBase, Google Patents, Google Scholar (without Patents)
Search Terms Used	administration enzyme airway nebulizing enzyme solution ISALI (inhalational smoke induced acute lung injury) SCUPA (single chain urokinase plasminogen activator) PBS (phosphate buffered saline) buffering nebulizer acute lung injury chemical-induced
Date Conducted	23 February 2015 (23.02.2015)

Electronic Database Searched	PatBase
Files Searched	Full-text: AU BE BR CA CH CN DE DK EP ES FI FR GB IN JP KR SE TH TW US WO Bibliographic: (Europe) AT BA BE BG CH CS CY CZ DD DK EE ES FI GE GR HR HU IE IS IT LT LU LV MC MD MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR UA YU (Asia) EA GC HK ID IL IN KZ MN MY PH RU SG SU TH TJ TW UZ VN (North America) CA CR CU DO GT HN MX NI PA SV TT (South America) AR BR CL CO EC PE UY (Australasia) AU NZ (Africa) AP DZ EG KE MA MW OA ZA ZM ZW
Date Conducted	23 February 2015 (23.02.2015)
Search Logic:	
Classification and keyword search:	
Search 1:	pd<20131104 and IC=A61K9/12 (Results 7165)
Search 2:	pd<20131104 and CPC=(A61K9/008 OR A61K9/0073 OR A61K9/12) (Results 2107)
Search 3:	pd<20131104 and UC=(424/45 OR 128/200.23) (Results 3521)
Search 4:	1 OR 2 OR 3 (Results 9926)
Search 5:	4 AND FT=(pLASMINOGEN W3 ACTIVATOR) (Results 216)
Search 6:	5 AND FT=(UROKINASE AND TISSUE) (Results 107)
Search 7:	6 AND FT=(NEBULIZER OR AEROSOL) (Results 80)
Search 8:	7 AND FT=(PHOSPHATE W3 BUFFER) (Results 30)
Search 9:	4 AND FT=(NEBULIZER OR AEROSOL) (Results 6319)
Search 10:	9 AND FT=(UROKINASE AND PLASMINOGEN AND LUNG) (Results 79)
Search 11:	10 AND FT=(ENZYME AND SOLUTION AND BUFFER AND AQUEOUS AND pH AND LYOPHILIZED) (Results 29)
Search 12:	4 AND FT=(PROTEIN AND ENZYME AND BUFFER AND NEBULIZER AND AEROSOL AND SIZE AND SOLUTION AND SALT AND PHOSPHATE AND BUFFER AND PLASMINOGEN AND ACTIVATOR AND VIBRATING AND MESH) (Results 1)
Search 13:	4 AND FT=(ACUTE W3 LUNG) AND (SMOKE W3 INHALATION) AND (LUNG W3 DISEASE) (Results 21)
Search 14:	13 AND FT=(PLASMINOGEN) (Results 3)

Search 15: 4 AND FT=(PLASMINOGEN W3 ACTIVATOR) AND (SINGLE AND CHAIN AND UROKINASE) (Results 72)

Search 16: 15 AND FT=(NEBULIZER AND AEROSOL) (Results 29)

Search 17: 4 AND FT=(isali AND ards AND (ACUTE W3 LUNG)) (Results 0)

Search 18: 4 AND FT=(ISALI AND ARDS) (Results 0)

Search 19: 4 AND FT=ARDS (Results 244)

Search 20: 19 AND FT=PLASMINOGEN W3 ACTIVATOR (Results 30)

Search 21: PD<20131104 AND FT=PLASMINOGEN W3 ACTIVATOR (Results 22049)

Search 22: PD<20131104 AND FT=(PLASMINOGEN W3 ACTIVATOR) (Results 22049)

Search 23: 22 AND FT=(UROKINASE AND TISSUE) (Results 9963)

Search 24: 23 AND FT=(SINLGE AND CHAIN AND UROKINASE AND PLASMINOGEN AND ACTIVATOR) (Results 2)

Search 25: 23 AND FT=(SINGLE AND CHAIN AND UROKINASE AND PLASMINOGEN AND ACTIVATOR) (Results 7238)

Search 26: 25 AND FT=(SINGLE W3 CHAIN) W3 UROKINASE (Results 582)

Search 27: 26 AND FT=NEBULIZER AND AEROSOL (Results 212)

Search 28: 27 AND FT=LUNG W3 DISEASE (Results 194)

Search 29: 28 AND FT=(AERONEB) (Results 0)

Search 30: 22 AND FT=AERONEB (Results 13)

Search 31: 22 AND FT=(SCUPA AND TPA) (Results 183)

Search 32: 31 AND FT=NEBULIZER AND AEROSOL (Results 11)

Search 33: 22 AND FT=ISALI AND ARDS (Results 0)

Search 34: 22 AND FT=ARDS (Results 1175)

Search 35: 34 AND FT=UROKINASE (Results 606)

Search 36: 35 AND FT=(SINGLE W3 CHAIN) W3 UROKINASE (Results 217)

Search 37: 36 AND FT=NEBULIZER AND AEROSOL (Results 197)

Search 38: 37 AND FT=BUFFER AND SALINE AND SOLUTION AND ENZYME (Results 196)

Search 39: 38 AND FT=LYOPHILIZED (Results 196)

Search 40: 39 AND FT=(SCUPA) (Results 2)

Electronic Database Searched	Google Patents
Files Searched	
Date Conducted	23 February 2015 (23.02.2015)
Search Logic:	
enzyme nebulizer plasminogen activator delivery About 272,000 results enzyme nebulizer "plasminogen activator" delivery About 88,000 results enzyme nebulizer "plasminogen activator" delivery saline About 81,000 results enzyme nebulizer "plasminogen activator" delivery saline inhalation About 79,400 results activator" delivery saline inhalation single-chain urokinase plasminogen activator About 29,600 results enzyme nebulizer "plasminogen activator" delivery saline inhalation "single-chain urokinase plasminogen activator" 2 results enzyme nebulizer delivery "single chain urokinase" 44 results enzyme nebulizer delivery "single chain urokinase" "smoke inhalation" 44 results ARDS ISALI 19 results ARDS ISALI plasminogen 6 results delivery enzyme nebulizer "plasminogen activator" About 86,700 results delivery enzyme nebulizer "plasminogen activator" "single chain urokinase" 42 results inventor:"williams" "plasminogen activator" About 1,210 results	

ininventor:"williams" "plasminogen activator" urokinase
About 674 results

ininventor:"williams" "plasminogen activator" "single chain urokinase"
8 results

ininventor:"idell" "plasminogen activator" "single chain urokinase"
4 results

AERONEB enzyme nebulizer
About 577 results

AERONEB enzyme nebulizer urokinase
11 results

Electronic Database Searched	Google Scholar (without Patents)
Files Searched	
Date Conducted	23 February 2015 (23.02.2015)
Search Logic:	
enzyme nebulized plasminogen activator About 2,990 results enzyme nebulizer plasminogen activator saline About 2,440 results ISALI lung About 552 results nebulizer enzyme isali 6 results plasminogen activator nebulizer About 3,680 results plasminogen activator nebulizer scupa 16 results ARDS ISALI About 135 results ARDS ISALI tPA 2 results scUPA tPA About 647 results scUPA tPA nebulizer 10 results enzyme nebulizer plasminogen activator About 3,080 results enzyme nebulizer plasminogen activator Ards About 1,760 results scUPA About 962 results	

scUPA nebulizer
About 321 results

scUPA nebulizer plasminogen
16 results

scUPA nebulizer plasminogen urokinase
4 results

urokinase plasminogen activator enzyme nebulizer
About 404 results

urokinase "plasminogen activator" enzyme nebulizer
About 364 results

urokinase "plasminogen activator" enzyme nebulizer -jet -ultrasonic
About 273 results

urokinase "plasminogen activator" enzyme nebulizer (-jet AND -ultrasonic)
About 34 results

administration enzyme airway nebulizing enzyme solution buffering nebulizer acute lung injury
chemical-induced
18 results

administration enzyme airway nebulizing plasminogen enzyme solution buffering nebulizer
acute lung injury chemical induced
About 432 results

administration enzyme airway nebulizing "plasminogen activator" enzyme solution buffering
nebulizer acute lung injury chemical induced
About 416 results

administration enzyme airway nebulizing "plasminogen activator" enzyme solution buffering
nebulizer acute lung injury chemical-induced
2 results

enzyme nebulizer "plasminogen activator" inhalation enzyme solution saline
About 876 results

enzyme nebulizer "plasminogen activator" inhalation enzyme solution saline phosphate buffer
About 376 results

enzyme nebulizer "plasminogen activator" inhalation enzyme solution saline phosphate buffer
burn
About 92 results

enzyme nebulizer "plasminogen activator" inhalation enzyme solution saline phosphate buffer
burn PA
About 86 results

enzyme nebulizer "plasminogen activator" lyophilised inhalation enzyme solution saline
phosphate buffer burn PA
4 results



- (51) **International Patent Classification:**
A61K 38/49 (2006.01) *A61K 9/12* (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/US2014/063784
- (22) **International Filing Date:**
4 November 2014 (04.11.2014)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
61/899,739 4 November 2013 (04.11.2013) US
- (71) **Applicant:** BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM [US/US]; 201 W. 7th Street, Austin, TX 78701 (US).
- (72) **Inventors:** WILLIAMS, Robert, O., III; 4514 W. Rapid Springs Cove, Austin, TX 78746 (US). IDELL, Steven; c/o UTHSC at Tyler, 11937 US 271, Tyler, TX 75708 (US).
- (74) **Agent:** BYRD, Marshall, P.; Parker Highlander PLLC, 1120 S. Capital of Texas Highway, Building One, Suite 200, Austin, TX 78746 (US).

- (81) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

(54) **Title:** COMPOSITIONS AND METHODS FOR ADMINISTRATION OF AN ENZYME TO A SUBJECT'S AIRWAY

(57) **Abstract:** Methods and composition for delivery of enzymes to a subject's airway. In some aspects, nebulized composition of enzymes, such as plasminogen activators are provided. In further aspects perfluorocarbon compositions comprising enzymes, such as plasminogen activators are provided. Compositions may, in some aspects, be used for the treatment of lung infections or acute lung injury, such as inhalational smoke induced acute lung injury (ISALI).



WO 2015/066664 A2

ASSIGNMENT

For good and valuable consideration, the receipt, sufficiency and adequacy of which are hereby acknowledged, we, **ROBERT O. WILLIAMS III** of Austin, Texas, and **STEVEN IDELL** of Tyler, Texas, hereby sell, assign and transfer to the **BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM**, a Texas institution of higher learning, having a place of business at 201 West 7th Street, Austin, TX 78701, and its successors and assigns (collectively hereinafter “the Assignee”), the entire right, title, and interest throughout the world in the inventions and improvements that are subject of an application for United States Patent, titled “**Compositions and Methods for Administration of an Enzyme to a Subject’s Airway**,” filed November 4, 2013, and assigned U.S. Patent Application No. 61/899,739, this assignment including said application, and all divisional, continuing, substitute, renewal, reissue and all other applications for patent which have been or shall be filed in the United States and all foreign countries on any such inventions or improvements; all original and reissued patents which have been or shall be issued in the United States and all foreign countries on such inventions or improvements; and specifically including the right to file foreign applications under the provisions of any convention or treaty and claim priority based on such application in the United States; and we authorize and request the issuing authority to issue any and all United States and foreign patents granted on such inventions or improvements to the Assignee; and we warrant and covenant that no assignment, grant, mortgage, license or other agreement affecting the rights and property herein conveyed has been or will be made to others by the undersigned, and that the full right to convey the same herein expresses is possessed by the undersigned.

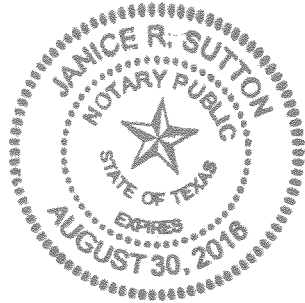
Date: 2/17/14

Robert O. Williams III
ROBERT O. WILLIAMS III

STATE OF Texas)
COUNTY OF Travis) SS.

On February 17, 20 14, before me, the undersigned, a notary public for the State of Texas, there personally appeared **ROBERT O. WILLIAMS III**, personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his/her authorized capacity and that by his/her signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he/she acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.



Janice R. Sutton
Notary Public

Date: 2-4-14

STEVEN IDELL

STATE OF TEXAS)
COUNTY OF Smith) SS.

On February 4, 2014, before me, the undersigned, a notary public for the State of TEXAS, there personally appeared **STEVEN IDELL**, personally known to me (or proved to me on the basis of satisfactory evidence) to be the person whose name is subscribed to this Assignment, who acknowledged having executed the same in his/her authorized capacity and that by his/her signature on this Assignment, the person or the entity upon behalf of which he/she acted, executed this Assignment.

WITNESS my hand and official seal.

Brigitte M. Tolson
Notary Public



Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 de 1995 del Ministerio de Justicia, del documento correspondiente a un documento de cesión otorgado a **BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM**, domiciliada en Austin, Texas, Estados Unidos de América.

Expediente de abogado No. 10046-057PV1

Referencia del cliente No. 6390 WIL

CESIÓN

Por una contraprestación onerosa, el recibo, suficiencia e idoneidad de la cual son reconocidos por medio del presente, nosotros **ROBERT O. WILLIAMS III** de Austin, Texas y **STEVEN IDELL** de Tyler, Texas, por medio del presente transfieren a **BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM**, una institución de educación superior de Texas, con sede de negocios en 201 West 7th Street, Austin, Texas 78701, y sus sucesores y asignatarios (colectivamente denominados de ahora en adelante como "el Cesionario"), la totalidad del derecho, título e interés a lo largo del mundo en relación con las invenciones y mejoras que son el objeto de una solicitud para Patente de los Estados Unidos, titulada "**Composiciones y Métodos para Administración de una Enzima a las Vías Respiratorias de un Sujeto**" presentada el 4 de noviembre de 2013 y a la cual se le asignó la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con número 61/899.739, esta cesión incluye dicha solicitud, y todas las divisiones, continuaciones, sustituciones, renovaciones, reexpediciones y todas las demás solicitudes para patente que hayan sido o que puedan ser presentada en los Estados Unidos y todos los países extranjeros sobre cualquiera de dichas

invenciones o mejoras; todas las patentes originales y reexpediciones de las mismas hayan sido o que puedan ser presentada en los Estados Unidos y todos los países extranjeros sobre cualquiera de dichas invenciones o mejoras; y específicamente incluyendo el derecho de presentar solicitudes extranjeras bajo las disposiciones de cualquier convención o tratado y reivindicar prioridad con base en dichas solicitud en los Estados Unidos; y autorizamos y le solicitamos a la autoridad emisora expedir cualquiera y todas las patentes de los Estados Unidos y extranjeras otorgadas sobre dichas invenciones o mejoras al Cesionario; y nosotros garantizamos y nos comprometemos a que ninguna cesión, otorgamiento, hipoteca, licencia y otro acuerdo que afecte los derechos y la propiedad que están siendo traspasados por medio del presente ha sido ni será hecho a otros por parte de los suscritos, y que la totalidad del derecho de traspasar los mismos expresado en el presente es de posesión de los suscritos.

Cesión Página 1 de 3

Expediente de abogado No. 10046-057PV1

Referencia del cliente No. 6390 WIL

Fecha: 2/17/14

Firmado por firma ilegible

Robert O. Williams III

Estado de Texas

Condado de Travis

El 17 de febrero de 2014, ante mí, el suscrito, un notario público para el Estado de Texas, personalmente compareció **Robert O. Williams III**, quien me probó

con base en evidencia satisfactoria, ser la persona cuyo nombre se encuentra suscrito en el instrumento adjunto y reconoció que él/ella/ellos ejecutó el mismo en su capacidad autorizada, y que a través de su firma en el instrumento la persona o la entidad a cuyo nombre la persona actuó, ejecutó el instrumento.

En testimonio mi firma y sello oficial.

Firmado por firma ilegible

Firma del Notario Público

Sello: Janice R. Sutton, Notario Público, Estado de Texas, vence el 30 de agosto de 2016

Cesión Página 2 de 3

Expediente de abogado No. 10046-057PV1

Referencia del cliente No. 6390 WIL

Fecha: 2/4/14

Firmado por firma ilegible

Steven Idell

Estado de Texas

Condado de Smith

El 4 de febrero de 2014, ante mí, el suscrito, un notario público para el Estado de Texas, personalmente compareció **Steven Idell**, quien me probó con base en evidencia satisfactoria, ser la persona cuyo nombre se encuentra suscrito en el instrumento adjunto y reconoció que él/ella/ellos ejecutó el mismo en su

capacidad autorizada, y que a través de su firma en el instrumento la persona o la entidad a cuyo nombre la persona actuó, ejecutó el instrumento.

En testimonio mi firma y sello oficial.

Firmado por firma ilegible

Firma del Notario Público

Sello: Brigitte M. Tolson, Notario Público, Estado de Texas, mi comisión vence el 24 de noviembre de 2016

Cesión Página 3 de 3

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 · Fax: (57 1) 6350824 · Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

POWER OF ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

I (we), the undersigned

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

legal representative(s) of

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

una Institución organizada y existente de acuerdo con las leyes del Estado de Texas, Estados Unidos de América

an Institution existing under the laws of State of Texas, United States of America

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en 201 West 7th Street, Austin, TX 78701, Estados Unidos de América

and in present execution of its business activity, domiciled at 201 West 7th Street, Austin, TX 78701, United States of America

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de **CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO**, con Cédula de Ciudadanía No. 66.783.790 de Palmira Valle, y tp. 141563 con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en nombre del (de la) otorgante le (la) represente ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos: **PCT/US2014/063784, solicitud para: COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA ADMINISTRACIÓN DE UNA ENZIMA A LAS VÍAS RESPIRATORIAS DE UN SUJETO**

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to **CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO**, identification card No. 66.783.790 of Palmira Valle, and tp. 141563 residing in Bogotá Colombia, to act in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following: **PCT/US2014/063784, application for: COMPOSITIONS AND METHODS FOR ADMINISTRATION OF AN ENZYME TO A SUBJECT'S AIRWAY**

1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.

2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.

3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.

4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelados y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella)

5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.

6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.

7) Ratificar o no la agencia oficiosa.

8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.

2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.

3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.

4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.

5) To register domain names before the competent entity.

6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.

7) To ratify or not the officious agency.

8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Dado y firmado en
a los días de

Granted and signed at
on this day of May of 2016

Firma / Signature

RESUMEN

Métodos y composiciones para administración de enzimas a las
5 vías respiratorias de un sujeto. En algunos aspectos, se
brinda la composición nebulizada de enzimas, como activadores
de plasminógenos. En aun otros aspectos, se brindan
composiciones de perfluorocarbono que comprenden enzimas,
como activadores de plasminógenos. Las composiciones, en
10 algunos aspectos, pueden utilizarse para el tratamiento de
infecciones pulmonares o lesión pulmonar aguda, como lesión
pulmonar aguda inducida por inhalación de humo (LPAIH).

15

20

25

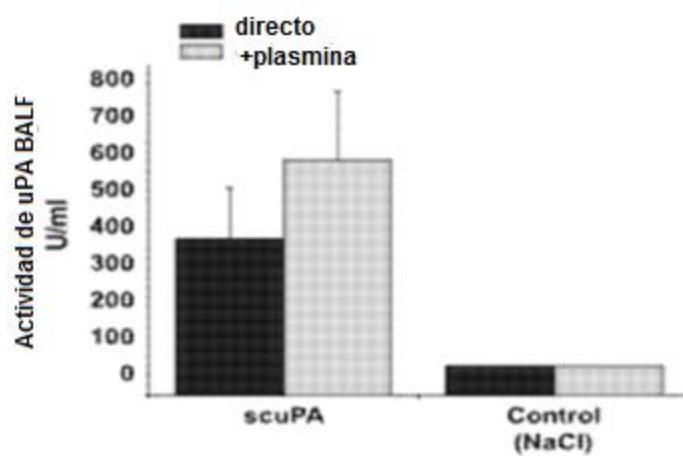


FIG. 1

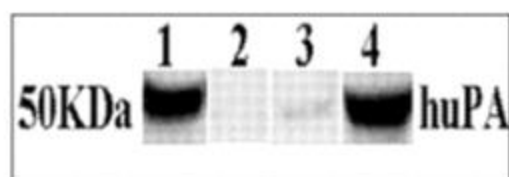


FIG. 2

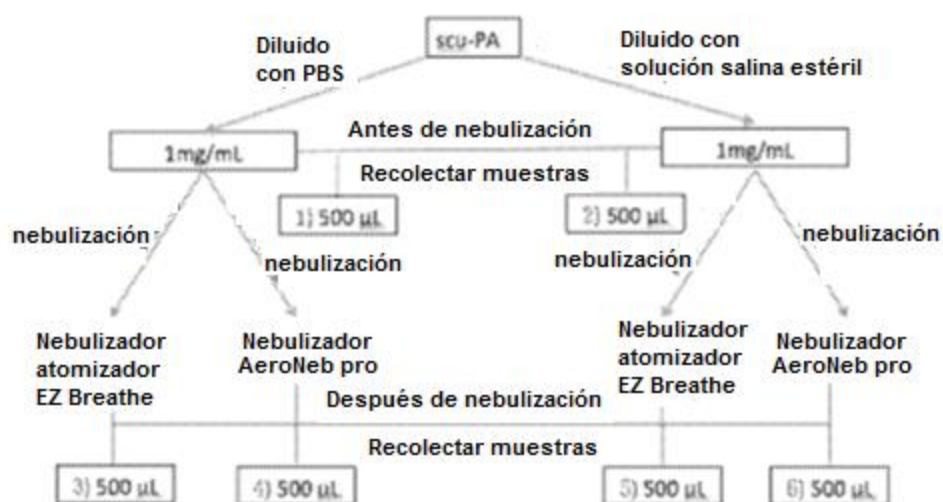


FIG. 3

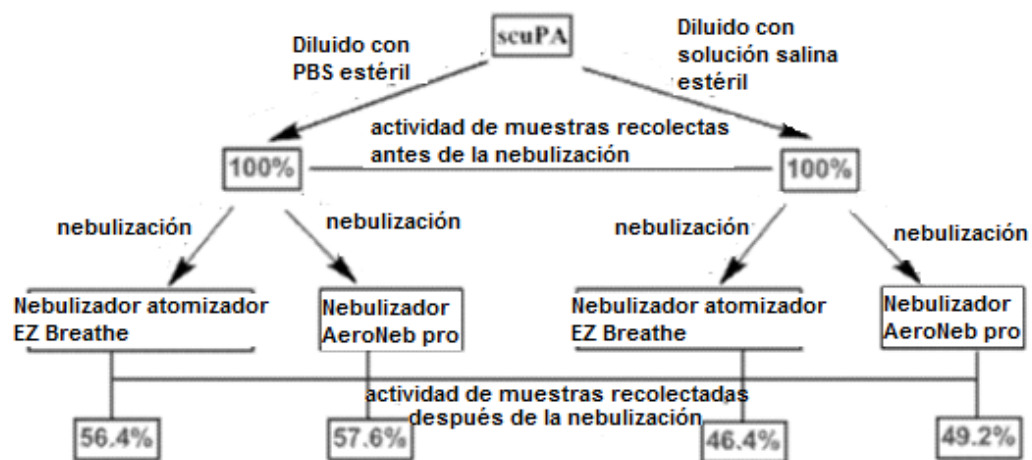


FIG. 4

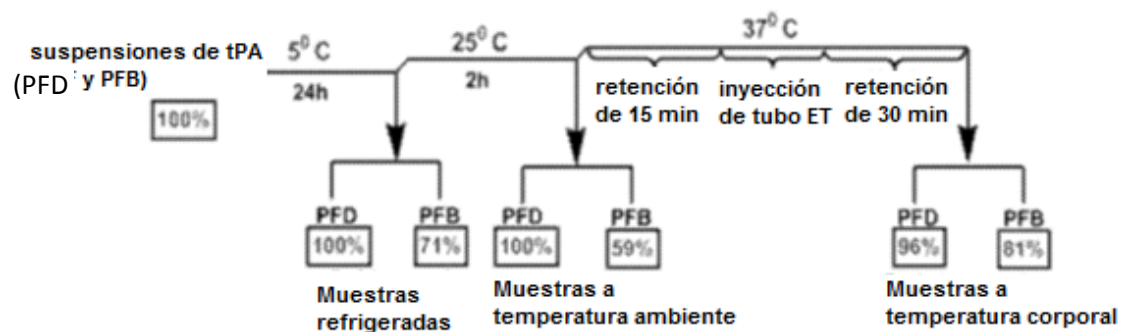


FIG. 5