

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 273**

51 Int. Cl.:  
**A61K 33/00** (2006.01)  
**A61K 47/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03728926 .1**  
96 Fecha de presentación: **16.05.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1505990**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

54 Título: **MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS.**

30 Prioridad:  
**17.05.2002 US 381527 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**17.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**17.01.2012**

73 Titular/es:  
**Yale University**  
**Two Whitney Avenue**  
**New Haven, CT 06511, US y**  
**University of Pittsburgh - Of the Commonwealth**  
**System of Higher Education**

72 Inventor/es:  
**OTTERBEIN, Leo, E.;**  
**CHOI, Augustine, M., K. y**  
**ZUCKERBRAUN, Brian**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

**ES 2 372 273 T3**

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

## DESCRIPCION

Métodos de tratamiento de la hepatitis.

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 **[0001]** Esta solicitud reivindica los derechos de prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/381.527 presentada el 17 de mayo de 2002.

Declaración de Investigación Patrocinada Federalmente

**[0002]** Esta invención se realizó con apoyo Gubernamental con las subvenciones de los Institutos Nacionales de la Salud N° R01-GM-44100, HL 58688, HL55330, HL60234 y AI42365. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención

10 Campo Técnico

**[0003]** Esta invención se refiere al tratamiento de la hepatitis.

Antecedentes

15 **[0004]** El gas monóxido de carbono es venenoso a altas concentraciones. Sin embargo, ahora se reconoce como una molécula de señalización importante (Verma et al., Science 259: 381-384, 1993). También se ha sugerido que el monóxido de carbono actúa como una molécula mensajera neuronal en el cerebro (Id.) y como un modulador neuroendocrino en el hipotálamo (Pozzoli et al., Endocrinology 735: 2314-2317, 1994). Al igual que el óxido nítrico (NO), el monóxido de carbono es un relajante del músculo liso (Utz et al., Biochem Pharmacol. 47: 195-201, 1991; Christodoulides et al., Circulation 97: 2306-9, 1995) e inhibe la agregación plaquetaria (Mansouri et al., Thromb Haemost. 48: 286-8, 1982). Se ha demostrado que la inhalación de bajos niveles de monóxido de carbono (CO) tiene efectos antiinflamatorios en algunos modelos.

20 **[0005]** La hepatitis es una enfermedad caracterizada por inflamación del hígado. La inflamación puede caracterizarse por necrosis difusa o dispersa que afecta a los acinos. Los agentes causantes de la hepatitis incluyen, por ejemplo, virus, por ejemplo virus específicos de la hepatitis, por ejemplo, virus de la hepatitis A, B, C, D, E y G; alcohol; y otros fármacos (por ejemplo, isoniazida, metildopa, acetaminofeno, amiodarona y nitrofurantoína) (véase The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17ª Edición, Sección 4, Capítulo 42).

Explicación de la invención

25 **[0006]** La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración de CO puede proteger contra el desarrollo de la hepatitis.

30 **[0007]** Por consiguiente, la presente invención se refiere a una composición para uso en un método de tratamiento, prevención o reducción del riesgo de hepatitis en un paciente. El método incluye identificar a un paciente al que se le ha diagnosticado que padece o que tiene riesgo de padecer hepatitis (por ejemplo, un paciente al que se le ha diagnosticado hepatitis o riesgo de padecer hepatitis), y administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad de monóxido de carbono eficaz para tratar la hepatitis en el paciente.

35 **[0008]** La composición farmacéutica puede administrarse al paciente por cualquier método conocido en la técnica para administrar gases y/o líquidos a pacientes, por ejemplo, mediante inhalación, insuflación, infusión, inyección y/o ingestión. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica se administra al paciente mediante inhalación. En otra realización, la composición farmacéutica se administra al paciente por vía oral. En otra realización más, la composición farmacéutica se administra directamente en la cavidad abdominal del paciente. En otra realización, la composición farmacéutica se administra por un dispositivo extracorpóreo de intercambio de gases a través de una membrana o un pulmón artificial. En otra realización, el paciente es un alcohólico.

40 **[0009]** El paciente puede ser un animal, humano o no humano. Por ejemplo, el paciente puede ser cualquier mamífero, por ejemplo seres humanos, otros primates, cerdos, roedores tales como ratones y ratas, conejos, cobayas, hámsteres, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras. La hepatitis puede ser el resultado de, o una persona puede considerarse con riesgo de padecer hepatitis debido a cualquiera de varios factores, por ejemplo infecciones, por ejemplo infecciones virales, por ejemplo infección con el virus de la hepatitis A, B, C, D, E y/o G; uso de alcohol (por ejemplo alcoholismo); uso de fármacos (por ejemplo uno o más fármacos descritos en el presente documento, por ejemplo acetaminofeno, anestésicos, fármacos antituberculosos, agentes antifúngicos, fármacos antidiabéticos, agentes neurolépticos y fármacos usados para tratar la infección por VIH y el SIDA); afecciones autoinmunes (por ejemplo hepatitis autoinmune); y/o procedimientos quirúrgicos. La composición farmacéutica puede estar en cualquier forma, por

50 **[0010]** El método incluye además administrar al paciente al menos uno de los siguientes tratamientos: inducir HO-1 o ferritina en el paciente; expresar HO-1 o ferritina recombinante en el paciente; y administrar una composición farmacéutica que comprende HO-1, bilirrubina, biliverdina, ferritina o apoferritina, hierro, desferoxamina o dextrano de

hierro al paciente. También se contempla el uso de CO y cualquiera de los agentes indicados anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la hepatitis.

**[0011]** En otra realización, la hepatitis (o el riesgo de hepatitis) no se produce por cirugía (por ejemplo, cirugía abdominal o de trasplante), endotoxinas bacterianas, choque séptico y/o inflamación sistémica.

5 **[0012]** En otro aspecto, la invención se refiere a un método para tratar o prevenir la hepatitis en un paciente, que incluye identificar a un paciente que padece o tiene riesgo de padecer hepatitis (por ejemplo, un paciente al que se le ha diagnosticado hepatitis o riesgo de padecer hepatitis), proporcionar un recipiente que contiene un gas presurizado que comprende gas monóxido de carbono, liberar el gas presurizado desde el recipiente para formar una atmósfera que comprende gas monóxido de carbono, y exponer el paciente a la atmósfera, donde la cantidad de monóxido de carbono en la atmósfera es suficiente para tratar la hepatitis en el paciente.

10 **[0013]** En otro aspecto más, la invención se refiere a un método para realizar una cirugía abdominal, por ejemplo trasplante de hígado, en un paciente, que incluye identificar a un paciente que necesita una cirugía abdominal, en el que la hepatitis es un riesgo de la cirugía abdominal; realizar la cirugía abdominal en el paciente y, antes, durante o después de la etapa de realización, hacer que el paciente inhale una cantidad de gas monóxido de carbono suficiente para reducir el riesgo de hepatitis en el paciente. También se contempla el uso de CO en la preparación de un medicamento, por ejemplo, un medicamento gaseoso o líquido, para uso en el tratamiento o prevención de hepatitis.

15 **[0014]** La invención también se refiere a un método para tratar hepatitis en un paciente que padece o con riesgo de padecer hepatitis no producida por cirugía y/o endotoxinas, por ejemplo, hepatitis producida por cualquier factor descrito en el presente documento distinto de cirugía y/o endotoxinas. El método incluye identificar a un paciente que padece o con riesgo de padecer hepatitis no producida por cirugía y/o endotoxinas y administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad de monóxido de carbono eficaz para tratar la hepatitis en el paciente.

20 **[0015]** También se incluye en la invención un método para administrar un fármaco de inducción de hepatitis (es decir, un fármaco hepatotóxico, por ejemplo isoniazida, metildopa, acetaminofeno, amiodarona o nitrofurantoína) a un paciente. El método incluye administrar el fármaco al paciente y antes, durante y/o después de administrar el fármaco, administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende monóxido de carbono en una cantidad eficaz para tratar la hepatitis en el paciente.

**[0016]** El gas CO puede estar en mezcla con gas nitrógeno, con óxido nítrico y gas nitrógeno, o con gas que contiene oxígeno. El gas CO puede estar presente en la mezcla a una concentración de al menos aproximadamente un 0,025%, por ejemplo, de al menos aproximadamente un 0,05%, 0,10%, 0,50%, 1,0%, 2,0%, 10%, 50% o 90%.

30 **[0017]** También se incluye en la invención el uso de CO en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de hepatitis. El medicamento puede usarse en un método para tratar hepatitis en un paciente que padece o con riesgo de padecer hepatitis de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. El medicamento puede estar en cualquier forma descrita en el presente documento, por ejemplo, una composición de CO líquida o gaseosa.

35 **[0018]** A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. A continuación se describen métodos y materiales adecuados, aunque en la puesta en práctica o ensayo de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no deben considerarse limitantes.

40 **[0019]** Los detalles de una o más realizaciones de la invención se presentan en la descripción proporcionada a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes tras la descripción y las reivindicaciones.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### [0020]

La Fig. 1 es un gráfico de barras que ilustra que la inducción de HO-1 protege a los hepatocitos de ratón de la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ /D-gal. CoPP = protoporfirina de cobalto;

50 ALT = alanina aminotransferasa sérica; TNF = factor de necrosis tumoral alfa. Los resultados son la media  $\pm$  DT de 6-8 ratones/grupo \*p<0,005.

La Fig. 2 es un gráfico de barras que ilustra que el CO exógeno protege a los hepatocitos contra la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$  de una manera independiente de la ruta GMPc/p38 y dependiente de la activación por NF- $\kappa$ B. CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiente; TNF = factor de necrosis tumoral alfa; BAY = BAY 11-7082 (inhibe

la activación de NF- $\kappa$ B); I $\kappa$ B = I $\kappa$ B $\alpha$  (previene la activación de NF- $\kappa$ B); ODQ = 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (un inhibidor selectivo de la guanilil ciclasa); Lac-Z = pIEP-Lac-Z (control adenoviral). Los resultados mostrados son la media  $\pm$  DT de pocillos triplicados de cuatro experimentos independientes (\* $p$ <0,01).

5 La Fig. 3 es un gráfico de barras que ilustra que el CO exógeno protege a los hepatocitos humanos contra la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ /Actinomicina-D (ActD). CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiental; TNF = TNF- $\alpha$ /ActD. Los resultados son la media  $\pm$  DT de pocillos triplicados de 3 experimentos independientes. \*  $p$ <0,05.

10 La Fig. 4 es un gráfico de barras que ilustra que el CO exógeno produce un aumento en la activación de NF- $\kappa$ B en los hepatocitos. CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiental; BAY = BAY 11-7082; CM = mezcla de citocinas (TNF- $\alpha$  (500 U/ml), IL-1 $\beta$  (100 U/ml) e IFN- $\delta$  (100 U/ml)). Los resultados mostrados son la media  $\pm$  SE de pocillos por triplicado de tres experimentos independientes. \* $p$ <0,001 frente a Aire.

15 La Fig. 5 es una imagen de un gel de poliacrilamida que ilustra que el CO exógeno induce un aumento en la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y unión al ADN medido por un ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). FP = sonda libre (sin proteína nuclear, y por lo tanto sin unión al ADN); TOTAL = bandas de NF $\kappa$ B sin retardo adicional por anticuerpo.

20 Las Figs. 6A-6C son fotomicrografías de hepatocitos primarios inmunoteñidos para detectar la localización nuclear de p65, que ilustran que el CO exógeno produce un aumento en la activación de NF- $\kappa$ B en hepatocitos. Fig. 6A: hepatocitos expuestos a aire. Fig. 6B: hepatocitos expuestos a una mezcla de citocinas (TNF- $\alpha$  (500 U/ml), IL-1 $\beta$  (100 U/ml) e IFN- $\delta$  (100 U/ml)). Fig. 6C: hepatocitos expuestos a CO. Las imágenes son representativas de 6 campos diferentes. La barra representa 10  $\mu$ m.

25 La Fig. 7 es un gráfico de barras que ilustra que la protección inducida por CO exógeno de hepatocitos implica la expresión de iNOS dependiente de NF- $\kappa$ B. CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiental; BAY = BAY 11-7082; CM = mezcla de citocinas. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  ET de pocillos triplicados de cuatro experimentos independientes. \* $p$ <0,001 frente a células tratadas con aire y células tratadas con aire/BAY.

30 La Fig. 8 es una imagen de una transferencia de Western que ilustra que la expresión de la proteína iNOS en hepatocitos está aumentada notablemente por exposición a TNF- $\alpha$  en presencia de CO en comparación con la exposición a TNF- $\alpha$  solo. iNOS = óxido nítrico sintasa inducible; CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiental; TNF = TNF- $\alpha$ /ActD;  $\beta$ -Actina = proteína de control. La inmunotransferencia es representativa de 3 experimentos independientes.

35 La Fig. 9 es un gráfico de barras que ilustra que los hepatocitos de ratón deficientes en la actividad iNOS (*inos*<sup>-/-</sup>) no están protegidos por CO contra la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ . CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiental; TNF = TNF- $\alpha$ /ActD; *inos*<sup>-/-</sup> = ratones knockout para iNOS; L-NIO = L-N5-(1-iminoetil)-ornitina-2HCl. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  ET de pocillos triplicados de cuatro experimentos independientes. \* $p$ <0,01 frente a células no tratadas con TNF/ActD y CO/TNF/ActD.

40 La Fig. 10 es un gráfico de barras que ilustra que el CO administrado exógenamente previene la lesión hepática inducida por TNF- $\alpha$ /D-Gal en ratones. ALT = alanina aminotransferasa sérica; CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiental. Los resultados se presentan como media  $\pm$  DT de 18-20 ratones. \* $p$ <0,001 frente a tratado con aire.

45 Las Figs. 11A-11H son fotomicrografías de muestras de hígado que ilustran que el CO administrado exógenamente previene la lesión hepática inducida por TNF- $\alpha$ /D-Gal en ratones. Figs. 11A y 11B: muestras de hígado de ratones expuestos a aire ambiental y CO, respectivamente, y teñidas con hematoxilina y eosina (H y E). Figs. 11C y 11D: muestras hepáticas de ratones tratados con TNF- $\alpha$ /D-Gal expuestos a aire ambiental y CO, respectivamente, y teñidas con H y E. Figs. 11E y 11F: muestras hepáticas de ratones tratados con TNF- $\alpha$ /D-Gal expuestos a aire ambiental y CO, respectivamente, y teñidas para detectar la caspasa-3 activada. Figs. 11G y 11H: muestras hepáticas de ratones tratados con TNF- $\alpha$ /D-Gal expuestas a aire ambiental y CO, respectivamente, y teñidas usando marcaje de extremos fragmentados con dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL). Las imágenes son secciones representativas de 15-20 secciones/hígado de 3-4 ratones individuales/grupo. Las barras representan 20  $\mu$ m.

La Fig. 12 es una imagen de transferencia de Western que ilustra que los hígados de ratones expuestos a TNF- $\alpha$ /D-Gal y tratados con CO inhalado presentan mayores niveles de proteína iNOS. Tipo silvestre = ratones de tipo silvestre; *iNOS*<sup>-/-</sup> = ratones deficientes en iNOS; CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiental; TNF = TNF- $\alpha$ /D-Gal;  $\beta$ -Actina = proteína de control.

50 Las Figs 13A-13D son fotomicrografías de muestras hepáticas que ilustran que los hígados de ratones expuestos a TNF- $\alpha$ /D-Gal y tratados con CO inhalado presentan mayores niveles de proteína iNOS. Fig. 13A: muestra hepática de ratón expuesto a aire ambiental. Fig. 13B: muestra hepática de ratón expuesto a CO. Fig. 13C: muestra hepática de ratón expuesto a TNF- $\alpha$ /D-Gal y aire ambiental. Fig. 13D: muestra hepática de ratón expuesto a TNF- $\alpha$ /D-Gal y CO. Las imágenes son representativas de 6 animales distintos y 6-10 secciones/muestras de hígado diferentes. La barra representa 20  $\mu$ m.

La Fig. 14 es un gráfico de barras que ilustra que CO no protege contra la lesión hepática en ausencia de

la función/expresión de iNOS. L-NIL = diclorhidrato de L-N6-(1-iminoetil)-lisina (un inhibidor selectivo de iNOS); CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiental; TNF = TNF- $\alpha$ /D-Gal. Los resultados son media  $\pm$  DT de 6-8 animales/grupo. \* $p$ <0,01 frente a CO/TNF- $\alpha$ /D-gal y controles de aire y CO.

5 La Fig. 15 es una imagen de una transferencia de Western que ilustra que los hígados de ratones tratados con CO presentaban una mayor expresión de HO-1 tanto en presencia como en ausencia de TNF- $\alpha$ /D-Gal.

CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiental; TNF = TNF- $\alpha$ /D-Gal;  $\beta$ -Actina = proteína de control. La transferencia es representativa de 2 experimentos independientes.

10 La Fig. 16 es una imagen de una transferencia de Western que ilustra que los hígados de ratones tratados con CO no presentan una mayor expresión de HO-1 en presencia o ausencia de TNF- $\alpha$ /D-Gal si la iNOS se inhibe usando L-NIL. CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiental; TNF = TNF- $\alpha$ /D-Gal;  $\beta$ -Actina = proteína de control; L-NIL = diclorhidrato de L-N6-(1-iminoetil)-lisina (un inhibidor selectivo de iNOS). La transferencia representativa de 2 experimentos independientes.

15 La Fig. 17 es un gráfico de barras que ilustra que la HO-1 inducida con CO es protectora contra la lesión hepática inducida por TNF- $\alpha$  en ratones. ALT = alanina aminotransferasa sérica; Aire = aire ambiental; TNF = TNF- $\alpha$ /D-Gal; Sn = protoporfirina de estaño (un inhibidor de HO-1); VP = V-PYRRO (un donante de óxido nítrico). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SD de 8-10 ratones/grupo. \* $p$ < 0,05 frente a ratones tratados con CO/TNF/D-gal.

20 La Fig. 18 es un gráfico de barras que ilustra que la inducción de HO-1 es protectora contra la lesión hepática inducida por TNF- $\alpha$  independiente de la actividad de iNOS. ALT = alanina aminotransferasa sérica; Aire = aire ambiental; TNF = TNF- $\alpha$ /D-Gal; L-NIL = diclorhidrato de L-N6-(1-iminoetil)-lisina (un inhibidor selectivo de iNOS); CoPP = protoporfirina de cobalto (un inductor de HO-1); iNOS<sup>-/-</sup> = ratones deficientes en iNOS. Los resultados son la media  $\pm$  DT de 6-8 ratones/grupo. \* $p$ <0,001 frente a Aire/TNF y L-NIL/TNF.

25 La Fig. 19 es un gráfico de barras que ilustra que la expresión de HO-1 es necesaria para la protección inducida por CO de hepatocitos de ratón frente a la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ /ActD. Tipo silvestre (barras negras) = hepatocitos aislados a partir de ratones C57BL/6J de tipo silvestre; *hmx-1*<sup>-/-</sup> (barras blancas) = hepatocitos aislados de ratones null para HO-1; CO = monóxido de carbono; Aire = aire ambiental; TNF- $\alpha$  = TNF- $\alpha$ /ActD. \* $p$ <0,01 frente a células no tratadas con TNF- $\alpha$ /ActD y frente a células tratadas con TNF- $\alpha$ /ActD que también se trataron con CO.

30 La Fig. 20 es un gráfico de barras que ilustra que la expresión de HO-1 se requiere para la protección inducida por NO de hepatocitos de ratón frente a la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ /ActD. Tipo silvestre (barras negras) = hepatocitos aislados a partir de ratones C57BL/6J de tipo silvestre; *hmx-1*<sup>-/-</sup> (barras blancas) = hepatocitos aislados a partir de ratones null para HO-1; SNAP = s-nitroso-N-acetil-penicilamina (un donante de NO); Aire = aire ambiental; TNF- $\alpha$  = TNF- $\alpha$ /ActD. \* $p$ <0,01 frente a células no tratadas con TNF- $\alpha$ /ActD y frente a células tratadas con TNF- $\alpha$ /ActD que también se trataron con NO.

35 La Fig. 21 es un gráfico de barras que ilustra que los ratones expuestos a CO estaban protegidos de la lesión hepática inducida por acetaminofeno. ALT = alanina aminotransferasa sérica; Aire = aire ambiental; APAP = acetaminofeno. Los resultados son la media  $\pm$  DT de 4-8 ratones/grupo.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 **[0021]** La expresión "monóxido de carbono" (o "CO"), como se usa en el presente documento, describe monóxido de carbono molecular en su estado gaseoso, comprimido en forma líquida o disuelto en solución acuosa. Las expresiones "composición de monóxido de carbono" y "composición farmacéutica que comprende monóxido de carbono" se usan a lo largo de toda la memoria descriptiva para describir una composición gaseosa o líquida que contiene monóxido de carbono que puede administrarse a un paciente y/o un órgano, por ejemplo el hígado. El experto en la materia reconocerá la forma de la composición farmacéutica, por ejemplo, gaseosa, líquida o tanto gaseosa como líquida, que se prefiere para una aplicación dada.

45 **[0022]** Las expresiones "cantidad eficaz" y "eficaz para tratar", como se usan en el presente documento, se refieren a una cantidad o concentración de monóxido de carbono utilizada durante un periodo de tiempo (incluyendo la administración aguda o crónica y la administración periódica o continua) que es eficaz dentro del contexto de su administración para producir un efecto o resultado fisiológico deseado. Las cantidades eficaces de monóxido de carbono para uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, cantidades que previenen la hepatitis, reducen el riesgo de hepatitis, reducen los síntomas de hepatitis o mejoran el resultado de otros tratamientos para la hepatitis.

50 **[0023]** En el caso de gases, las cantidades eficaces de monóxido de carbono generalmente están dentro de aproximadamente un 0,0000001% a aproximadamente un 0,3% en peso, por ejemplo, de un 0,0001% a aproximadamente un 0,25% en peso, preferentemente al menos aproximadamente un 0,001%, por ejemplo, al menos un 0,005%, 0,010%, 0,02%, 0,025%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,22% o 0,24% en peso de monóxido de carbono. Los intervalos preferidos incluyen, por ejemplo, de un 0,001% a aproximadamente un 0,24%, de aproximadamente un 0,005% a aproximadamente un 0,22%, de aproximadamente un 0,005% a aproximadamente un 0,05%, de aproximadamente un 0,010% a aproximadamente un 0,20%, de aproximadamente un

0,02% a aproximadamente un 0,15%, de aproximadamente un 0,025% a aproximadamente un 0,10%, o de aproximadamente un 0,03% a aproximadamente un 0,08%, o de aproximadamente un 0,04% a aproximadamente un 0,06%. En el caso de las soluciones líquidas de CO, las cantidades eficaces generalmente están dentro del intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,0044 g de CO/100 g de líquido, por ejemplo, al menos 0,0001, 0,0002, 0,0004, 0,0006, 0,0008, 0,0010, 0,0013, 0,0014, 0,0015, 0,0016, 0,0018, 0,0020, 0,0021, 0,0022, 0,0024, 0,0026, 0,0028, 0,0030, 0,0032, 0,0035, 0,0037, 0,0040 o 0,0042 g de CO/100 g de solución acuosa. Los intervalos preferidos incluyen, por ejemplo, de aproximadamente 0,0010 a aproximadamente 0,0030 g de CO/100 g de líquido, de aproximadamente 0,0015 a aproximadamente 0,0026 g de CO/100 g de líquido o de aproximadamente 0,0018 a aproximadamente 0,0024 g de CO/100 g de líquido. Un experto en la materia apreciará que pueden usarse cantidades fuera de estos intervalos, dependiendo de la aplicación.

**[0024]** El término “paciente” se usa a lo largo de toda la memoria descriptiva para describir un animal, humano o no humano, al que se le proporciona el tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente invención. La presente invención contempla aplicaciones veterinarias. El término incluye, pero sin limitación, mamíferos, por ejemplo, seres humanos, otros primates, cerdos, roedores tales como ratones y ratas, conejos, cobayas, hámsteres, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras. El término “tratamiento” se usa en el presente documento para describir el retraso del inicio, la inhibición o el alivio de los efectos de una afección, por ejemplo hepatitis, en un paciente.

**[0025]** El término “hepatitis” es un término reconocido en la técnica y se usa en el presente documento para hacer referencia a una enfermedad de pacientes caracterizada en parte por inflamación del hígado. Los agentes causantes de hepatitis incluyen, por ejemplo, infecciones, por ejemplo, infección con virus específicos de hepatitis, por ejemplo, virus de la hepatitis A, B, C, D, E y G; o agentes hepatotóxicos, por ejemplo, fármacos hepatotóxicos (por ejemplo, isoniazida, metildopa, acetaminofeno, amiodarona y nitrofurantoína) y toxinas (por ejemplo, endotoxina o toxinas ambientales). La hepatitis puede producirse postoperatoriamente en pacientes con trasplante de hígado. Se describen otros ejemplos de fármacos y toxinas que pueden producir hepatitis (es decir, agentes hepatotóxicos) en Feldman: Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, 7ª ed., Capítulo 17 (Liver Disease Caused by Drugs, Anesthetics, and Toxins), cuyo contenido se incorpora expresamente en el presente documento como referencia en su totalidad. Dichos ejemplos incluyen, pero sin limitación, metildopa y fenitoína, barbituratos, por ejemplo fenobarbital; sulfonamidas (por ejemplo, en fármacos combinados tales como co-trimoxazol (sulfametoxazol y trimetoprim); sulfasalazina; salicilatos; disulfiram; agentes bloqueantes  $\beta$ -adrenérgicos, por ejemplo, acebutolol, labetalol y metoprolol); bloqueantes de los canales de calcio, por ejemplo nifedipina, verapamil y diltiazem; retinoides sintéticos, por ejemplo etretinato; fármacos de supresión de ácido gástrico, por ejemplo omeprazol, esomeprazol, lansoprazol, rabeprazol, pantoprazol y famotidina; antagonistas del receptor de leucotrienos, por ejemplo, zafirlukast; y fármacos antituberculosos, por ejemplo, rifampicina y pirazinamida; agentes antifúngicos, por ejemplo ketoconazol, terbinafina, fluconazol e itraconazol; fármacos antidiabéticos, por ejemplo tiazolidinadionas, por ejemplo troglitazona y rosiglitazona; fármacos usados en trastornos neurológicos, por ejemplo agentes neurolépticos, antidepresivos (por ejemplo, fluoxetina, paroxetina, venlafaxina, trazodona, tolcapona y nefazodona), hipnóticos (por ejemplo alpidem, zolpidem y bentazepam), y otros fármacos, por ejemplo tacrina, dantroleno, riluzol, tizanidina y alverina; antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo bromfenac; inhibidores de COX-2; acetato de ciproterona; leflunomida; agentes antivirales, por ejemplo fialuridina, didanosina, zalcitabina, estavudina, lamivudina, zidovudina, abacavir; fármacos anticancerosos, por ejemplo tamoxifeno y metotrexato; drogas, por ejemplo cocaína, fenciclidina y 5-metoxi-3,4-metilendioximetanfetamina; L-asparaginasa; amodiaquina; hicanatona; agentes anestésicos; por ejemplo, halotano, enflurano e isoflurano; vitaminas, por ejemplo vitamina A; y toxinas dietéticas y/o ambientales, por ejemplo alcaloides de pirrolizidina, toxina de Amanita phalloides u otros hongos tóxicos, aflatoxina, arsénico, mezcla de Burdeos (sales de cobre y cal), monómero de cloruro de vinilo; tetracloruro de carbono, berilio, dimetilformamida, dimetilnitrosamina, metilendianilina, fósforo, clordecona (Kepone), 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo p-dioxina (TCDD), tetracloroetano, tetracloroetileno, 2,4,5-trinitrotolueno, 1,1,1-tricloroetano, tolueno y xileno, y “remedios a base de hierbas” conocidos, por ejemplo efedrina y eugenol.

**[0026]** Los síntomas de hepatitis pueden incluir fatiga, pérdida de apetito, molestias de estómago y/o ictericia (amarillamiento de la piel y/o los ojos). Se proporcionan descripciones más detalladas de hepatitis, por ejemplo, en The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17ª Edición, Sección 4, Capítulo 42, Sección 4, Capítulo 44 y Sección 4, Capítulo 40, cuyos contenidos se incorporan expresamente en el presente documento como referencia en su totalidad.

**[0027]** Los expertos en la materia apreciarán que un médico puede diagnosticar hepatitis a un paciente por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por evaluación de la función hepática, por ejemplo, usando ensayos sanguíneos para determinar los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (AP) o bilirrubina.

**[0028]** Los individuos considerados con riesgo de desarrollar hepatitis pueden beneficiarse particularmente de la invención, principalmente porque el tratamiento profiláctico puede empezar antes de que haya cualquier indicio de hepatitis. Los individuos “con riesgo” incluyen, por ejemplo, pacientes infectados con virus de la hepatitis o individuos que padecen cualquiera de las afecciones o que tiene los factores de riesgo descritos en el presente documento (por ejemplo, pacientes expuestos a agentes hepatotóxicos). El experto en la materia apreciará que puede determinarse que un paciente tiene riesgo de hepatitis por un diagnóstico médico.

**[0029]** Las cantidades de CO eficaces para tratar la hepatitis pueden administrarse a un paciente el día en el que se diagnostica que el paciente padece hepatitis o cualquier afección asociada con hepatitis, o que tiene cualquier factor de riesgo asociado con una mayor probabilidad de que el paciente desarrolle hepatitis (por ejemplo, que el paciente haya

estado recientemente, esté o se vaya a exponer a un agente hepatotóxico, por ejemplo un fármaco hepatotóxico tal como acetaminofeno). Los pacientes pueden inhalar CO a concentraciones que varían de 10 ppm a 1000 ppm, por ejemplo, de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 800 ppm, de aproximadamente 150 ppm a aproximadamente 600 ppm, o de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 500 ppm. Las concentraciones preferidas incluyen, por ejemplo, aproximadamente 30 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, o aproximadamente 1000 ppm. El CO puede administrarse al paciente de forma intermitente o continua. El CO puede administrarse durante aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 ó 20 días o más de 20 días, por ejemplo, 1, 2, 3, 5 ó 6 meses, o hasta que el paciente ya no presente síntomas de hepatitis, o hasta que al paciente ya no se le diagnostique riesgo de hepatitis. En un día dado, el CO puede administrarse continuamente durante todo el día, o intermitentemente, por ejemplo, una sola inhalación de CO al día (cuando se usa una alta concentración) o durante hasta 23 horas al día, por ejemplo, hasta 20, 15, 12, 10, 6, 3 ó 2 horas al día, o hasta 1 hora al día.

**[0030]** Si el paciente necesita tratarse con un fármaco hepatotóxico (por ejemplo, porque se lo ha recetado un médico), el paciente puede tratarse con CO (por ejemplo, una composición gaseosa de CO) antes, durante y/o después de la administración del fármaco. Por ejemplo, el CO puede administrarse al paciente, de forma intermitente o continua, empezando de 0 a 20 días antes de administrar el fármaco (y cuando se administran múltiples dosis, antes de cada dosis individual), por ejemplo, empezando al menos aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 5, 7 ó 10 horas, o aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 ó 20 días, o más de 20 días, antes de la administración. Como alternativa o adicionalmente, el CO puede administrarse al paciente conjuntamente con la administración del fármaco. Como alternativa o además, el CO puede administrarse al paciente después de la administración del fármaco, por ejemplo, empezando inmediatamente después de la administración y continuando de forma intermitente o continua durante aproximadamente 1, 2, 3, 5, 7 ó 10 horas, o aproximadamente 1, 2, 5, 8, 10, 20, 30, 50 ó 60 días, indefinidamente, o hasta que un médico determine que ya no se necesita la administración de CO (por ejemplo, después de eliminar el fármaco hepatotóxico del cuerpo o de que ya no pueda dañar al hígado).

#### Preparación de Composiciones Gaseosas

**[0031]** Una composición de monóxido de carbono puede ser una composición gaseosa de monóxido de carbono. El gas comprimido o presurizado útil en los métodos de la invención puede obtenerse a partir de cualquier fuente comercial y en cualquier tipo de recipiente apropiado para el almacenamiento de gas comprimido. Por ejemplo, pueden obtenerse gases comprimidos o presurizados a partir de cualquier fuente que suministre gases comprimidos, tales como oxígeno, para uso médico. La expresión gas de "calidad médica", como se usa en el presente documento, se refiere a un gas adecuado para administración a los pacientes, como se define en el presente documento. El gas presurizado, incluyendo el CO usado en los métodos de la presente invención, puede proporcionarse de tal forma que todos los gases de la composición final deseada (por ejemplo, CO, He, NO, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) estén en el mismo recipiente, con la excepción de que el NO y O<sub>2</sub> no pueden almacenarse juntos. Opcionalmente, los métodos de la presente invención pueden realizarse usando múltiples recipientes que contienen gases individuales. Por ejemplo, puede proporcionarse un solo recipiente que contiene monóxido de carbono, con o sin otros gases, cuyo contenido opcionalmente puede mezclarse con aire ambiental o con los contenidos de otros recipientes, por ejemplo, recipientes que contienen oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, aire comprimido o cualquier otro gas adecuado o mezclas de los mismos.

**[0032]** Las composiciones gaseosas administradas a un paciente de acuerdo con la presente invención típicamente contienen de un 0% a aproximadamente un 79% en peso de nitrógeno, de aproximadamente un 21% a aproximadamente un 100% en peso de oxígeno y de aproximadamente un 0,000001% a aproximadamente un 0,3% en peso (correspondiente a aproximadamente 1 ppb o 0,001 ppm a aproximadamente 3.000 ppm) de monóxido de carbono. Preferentemente, la cantidad de nitrógeno en la composición gaseosa es de aproximadamente un 79% en peso, la cantidad de oxígeno es de aproximadamente un 21% en peso y la cantidad de monóxido de carbono es de aproximadamente un 0,0001% a aproximadamente un 0,25% en peso, preferentemente de al menos aproximadamente un 0,001%, por ejemplo, de al menos aproximadamente un 0,005%, 0,010%, 0,02%, 0,025%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,22% o 0,24% en peso. Los intervalos preferidos de monóxido de carbono incluyen de aproximadamente un 0,005% a aproximadamente un 0,24%, de aproximadamente un 0,01% a aproximadamente un 0,22%, de aproximadamente un 0,015% a aproximadamente un 0,20%, de aproximadamente un 0,08% a aproximadamente un 0,20% y de aproximadamente un 0,025% a aproximadamente un 0,1% en peso. Debe indicarse que pueden usarse composiciones gaseosas de monóxido de carbono que tienen concentraciones de monóxido de carbono mayores del 0,3% (tales como del 1% o mayores) durante cortos periodos (por ejemplo, una o unas pocas respiraciones), dependiendo de la aplicación.

**[0033]** Puede usarse una composición gaseosa de monóxido de carbono para crear una atmósfera que comprenda gas monóxido de carbono. Puede crearse una atmósfera que incluya niveles apropiados de gas monóxido de carbono, por ejemplo, proporcionando un recipiente que contenga un gas presurizado que comprende gas monóxido de carbono, y liberando el gas presurizado desde el recipiente a una cámara o espacio para formar una atmósfera que incluya el gas monóxido de carbono dentro de la cámara o espacio. Como alternativa, los gases pueden liberarse en un aparato que culmine en una máscara de respiración o tubo de respiración, creando de esta manera una atmósfera que comprende gas monóxido de carbono en la máscara de respiración o tubo de respiración, asegurándose de que el paciente es la única persona en la sala expuesta a niveles significativos de monóxido de carbono.

**[0034]** Los niveles de monóxido de carbono en una atmósfera pueden medirse o monitorizarse usando cualquier

método conocido en la técnica. Dichos métodos incluyen detección electroquímica, cromatografía de gases, recuento de radioisótopos, absorción infrarroja, colorimetría y métodos electroquímicos basados en membranas selectivas (véase, por ejemplo, Sunderman et al., Clin. Chem. 28: 2026-2032, 1982; Ingi et al., Neuron 16: 835-842, 1996). Pueden detectarse niveles de subpartes por millón de monóxido de carbono, por ejemplo, por cromatografía de gases y recuento de radioisótopos. Además, en la técnica se sabe que pueden medirse niveles de monóxido de carbono en el intervalo sub-ppm en tejidos biológicos por un sensor de gas infrarrojo medio (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol 280:H482-H488. 2001). Están ampliamente disponibles en muchas fuentes comerciales sensores de monóxido de carbono y dispositivos de detección de gas.

#### Preparación de Composiciones Líquidas

**[0035]** Una composición de monóxido de carbono también puede ser una composición líquida de monóxido de carbono. Un líquido puede convertirse en una composición de monóxido de carbono por cualquier método conocido en la técnica para hacer que los gases se disuelvan en líquidos. Por ejemplo, el líquido puede ponerse en un denominado "incubador de CO<sub>2</sub>" y exponerse a un flujo continuo de monóxido de carbono, preferentemente equilibrado con dióxido de carbono, hasta que se alcance una concentración deseada de monóxido de carbono en el líquido. Como otro ejemplo, puede "burbujearse" gas monóxido de carbono directamente en el líquido hasta que se alcance la concentración deseada de monóxido de carbono en el líquido. La cantidad de monóxido de carbono que puede disolverse en una solución acuosa dada aumenta al reducirse la temperatura. Como otro ejemplo, puede pasarse un líquido apropiado a través de un tubo que permite la difusión de gas, donde el tubo pasa a través de una atmósfera que comprende monóxido de carbono (por ejemplo, utilizando un dispositivo tal como un oxigenador de membrana extracorpóreo). El monóxido de carbono se difunde en el líquido creando una composición líquida de monóxido de carbono.

**[0036]** Es probable que dicha composición líquida destinada a introducirse en un animal vivo esté a una temperatura de 37 °C o aproximadamente a esta temperatura en el momento en el que se introduce en el animal.

**[0037]** El líquido puede ser cualquier líquido conocido por los expertos en la materia y adecuado para la administración a pacientes (véase, por ejemplo, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). En general, el líquido será una solución acuosa. Los ejemplos de soluciones incluyen Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS), Celsior™, Perfadex™, solución de Collins, solución de citrato y solución de la Universidad de Wisconsin (UW) (Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). En una realización de la presente invención, el líquido es solución de Ringer, por ejemplo, Solución de Ringer con lactato, o cualquier otro líquido que pueda usarse infundido en un paciente. En otra realización, el líquido incluye sangre, por ejemplo, sangre entera.

**[0038]** Cualquier líquido adecuado puede saturarse a una concentración establecida de monóxido de carbono a través de difusores de gas. Como alternativa, pueden usarse soluciones prefabricadas que se han sometido a control de calidad para contener niveles establecidos de monóxido de carbono. El control preciso de la dosis puede conseguirse por mediciones con una membrana impermeable a líquidos y permeable a gases conectada a un analizador de monóxido de carbono. Las soluciones pueden saturarse a concentraciones eficaces deseadas y mantenerse a esos niveles.

#### Tratamiento de Pacientes con Composiciones de Monóxido de Carbono

**[0039]** Un paciente puede tratarse con una composición de monóxido de carbono por cualquier método conocido en la técnica de administración de gases y/o líquidos a pacientes. Las composiciones de monóxido de carbono pueden administrarse a un paciente al que se le ha diagnosticado, o en el que se ha determinado riesgo de, hepatitis. La presente invención contempla la administración sistémica de composiciones líquidas o gaseosas de monóxido de carbono a pacientes (por ejemplo, mediante inhalación y/o ingestión), y la administración tópica de las composiciones en el hígado del paciente (por ejemplo, por introducción en la cavidad abdominal).

#### Administración Sistémica de Monóxido de Carbono

**[0040]** Las composiciones gaseosas de monóxido de carbono pueden administrarse sistémicamente a un paciente, por ejemplo, un paciente al que se le ha diagnosticado o que se ha determinado que tiene riesgo de hepatitis. Las composiciones gaseosas de monóxido de carbono típicamente se administran mediante inhalación a través de la boca o las vías nasales a los pulmones, donde el monóxido de carbono se absorbe fácilmente en la corriente sanguínea del paciente. La concentración de compuesto activo (CO) utilizada en la composición gaseosa terapéutica dependerá de las velocidades de absorción, distribución, inactivación y excreción (generalmente, mediante la respiración) del monóxido de carbono, así como de otros factores conocidos por los expertos en la materia. Se entenderá adicionalmente que para cualquiera sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos en el presente documento son sólo ejemplares y no deben considerarse limitantes del alcance o práctica de la composición reivindicada. Los tratamientos pueden monitorizarse y las dosificaciones de CO pueden ajustarse para asegurar el tratamiento óptimo del paciente. La presente invención contempla la administración aguda, subaguda y crónica del monóxido de carbono, dependiendo, por



ejemplo, de la gravedad o persistencia de la hepatitis en el paciente. El monóxido de carbono puede administrarse al paciente durante un tiempo (incluyendo indefinidamente) suficiente para tratar la afección y ejercer el efecto farmacológico o biológico deseado.

5 **[0041]** A continuación se proporcionan ejemplos de algunos métodos y dispositivos que pueden utilizarse para administrar composiciones gaseosas de monóxido de carbono a pacientes.

#### *Ventiladores*

10 **[0042]** El monóxido de carbono de calidad médica (las concentraciones pueden variar) puede adquirirse mezclado con aire u otro gas que contenga oxígeno en un tanque convencional de gas comprimido (por ejemplo, 21% de O<sub>2</sub>, 79% de N<sub>2</sub>). Es no reactivo y las concentraciones necesarias para los métodos de la presente invención están muy por debajo del intervalo combustible (10% en aire). En el escenario hospitalario, el gas supuestamente se suministrará en la  
 15 cabecera, donde se mezclará con oxígeno o aire doméstico en un mezclador hasta una concentración deseada en ppm (partes por millón). El paciente inhalará la mezcla de gas a través de un ventilador, que se ajustará a un caudal basado en la comodidad y las necesidades del paciente. Esto se determina por gráficos pulmonares (es decir, velocidad respiratoria, volúmenes tidales, etc.). En el sistema de liberación pueden diseñarse mecanismos de fallo/seguridad para  
 20 impedir que el paciente reciba innecesariamente cantidades mayores que las deseadas de monóxido de carbono. El nivel de monóxido de carbono del paciente puede supervisarse estudiando (1) la carboxihemoglobina (COHb), que puede medirse en la sangre venosa, y (2) el monóxido de carbono exhalado recogido de un orificio lateral del ventilador. La exposición al monóxido de carbono puede ajustarse basándose en el estado de salud del paciente y basándose en los marcadores. Si es necesario, puede retirarse el monóxido de carbono del paciente cambiando a una inhalación de O<sub>2</sub> al 100%. El monóxido de carbono no se metaboliza; de esta forma, lo que se inhale finalmente se exhalará con la excepción de un porcentaje muy pequeño que se convierte en CO<sub>2</sub>. El monóxido de carbono también puede mezclarse con cualquier nivel de O<sub>2</sub> para proporcionar una liberación terapéutica de monóxido de carbono sin que se produzcan condiciones hipóxicas.

#### *Máscara Facial y Tienda*

25 **[0043]** Se prepara una mezcla de gas que contiene monóxido de carbono como se ha indicado anteriormente para permitir la inhalación pasiva por el paciente usando una máscara facial o tienda. La concentración inhalada puede cambiarse y eliminarse simplemente cambiando a 100 de O<sub>2</sub>. La supervisión de los niveles de monóxido de carbono se realizaría en o cerca de la máscara o tienda con un mecanismo de fallo-seguridad que impediría que se inhalara una concentración demasiado elevada de monóxido de carbono.

#### *Inhalador portátil*

30 **[0044]** El monóxido de carbono comprimido puede envasarse en un dispositivo inhalador portátil e inhalarse en una dosis medida, por ejemplo, para permitir el tratamiento intermitente de un receptor que no está en un escenario hospitalario. En los recipientes podrían envasarse diferentes concentraciones de monóxido de carbono. El dispositivo podría ser tan sencillo como un pequeño depósito (por ejemplo, de menos de 5 kg) de CO diluido apropiadamente con una válvula de apertura-cierre y un tubo a partir del cual el paciente realiza una inspiración de CO de acuerdo con un régimen estandarizado o cuando sea necesario.

#### *Pulmón Artificial Intravenoso*

35 **[0045]** Puede usarse un pulmón artificial (un dispositivo de catéter para el intercambio de gas en la sangre) diseñado para la administración de O<sub>2</sub> y la eliminación de CO<sub>2</sub> para la administración de monóxido de carbono. El catéter, cuando se implanta, reside en una de las venas grandes y podría suministrar monóxido de carbono a concentraciones dadas para la administración sistémica o en un sitio local. La administración puede ser una administración local de una alta concentración de monóxido de carbono durante un corto periodo de tiempo en el sitio del procedimiento, por ejemplo, cerca del hígado (esta alta concentración rápidamente se diluiría en la corriente sanguínea), o una exposición relativamente mayor a una menor concentración de monóxido de carbono (véase, por ejemplo, Hattler et al., *Artif. Organs* 18(11): 806-812 (1994); y Golob et al., *ASAIO J.*, 47(5): 432-437 (2001)).

#### *Cámara normobárica*

40 **[0046]** En ciertos casos, sería deseable exponer al paciente entero al monóxido de carbono. El paciente estaría dentro de una cámara hermética inundada con monóxido de carbono (a un nivel que no perjudique al paciente, o a un nivel que suponga un riesgo aceptable para el paciente sin exponer a riesgos a los espectadores). Después de finalizar la  
 45 exposición, la cámara podría inundarse con aire (por ejemplo 21% de O<sub>2</sub> y 79% de N<sub>2</sub>) y podrían analizarse muestras con analizadores de monóxido de carbono para asegurarse de que no queda monóxido de carbono antes de permitir que el paciente salga del sistema de exposición.

#### Administración Sistémica de Composiciones Líquidas de CO

55 **[0047]** La presente invención contempla además que pueden crearse soluciones acuosas que comprenden monóxido de carbono para la administración sistémica a un paciente, por ejemplo, para administración oral y/o por infusión en el

paciente, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal y/o subcutánea. Por ejemplo, pueden infundirse composiciones líquidas de CO, tales como Solución de Ringer saturada con CO, en un paciente que padece o con riesgo de padecer hepatitis. Como alternativa o además, puede infundirse en el paciente sangre entera (o parcial) parcial o completamente saturada con CO.

- 5 **[0048]** La presente invención también contempla que pueden utilizarse agentes capaces de administrar dosis de composiciones gaseosas de CO o composiciones líquidas de CO (por ejemplo, gomas de liberación de CO, cremas, pomadas, grageas o parches).

#### Tratamiento Tópico de Órganos con Monóxido de Carbono

- 10 **[0049]** Como alternativa o además, pueden aplicarse composiciones de monóxido de carbono directamente en el hígado, por ejemplo, en el hígado entero o en cualquier parte del mismo. Una composición gaseosa puede aplicarse directamente en el hígado de un paciente por cualquier método conocido en la técnica para insuflar gases en un paciente. Por ejemplo, con frecuencia se insuflan gases, por ejemplo dióxido de carbono, en la cavidad abdominal de pacientes para facilitar el examen durante procedimientos laparoscópicos (véase, por ejemplo, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). El experto en la materia apreciará que podrían usarse procedimientos similares para administrar composiciones de monóxido de carbono directamente en el hígado de un paciente.

- 15 **[0050]** También pueden administrarse tópicamente composiciones acuosas de monóxido de carbono en el hígado de un paciente. Pueden administrarse formas acuosas de las composiciones por cualquier método conocido en la técnica para administrar líquidos a pacientes. Como ocurre con las composiciones gaseosas, las composiciones acuosas pueden aplicarse directamente en el hígado. Por ejemplo, pueden inyectarse líquidos, por ejemplo soluciones salinas que contienen CO disuelto, en la cavidad abdominal de pacientes durante procedimientos laparoscópicos. El experto en la materia apreciará que podrían usarse procedimientos similares para administrar composiciones líquidas de monóxido de carbono directamente en el hígado de un paciente. Además, puede realizarse una exposición in situ lavando el hígado o una parte del mismo con una composición líquida de monóxido de carbono (véase Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)).

#### Uso de Hemoxigenasa-1, Otros Compuestos y Otros Tratamientos para la Hepatitis

- 20 **[0051]** También se contempla por la presente invención la inducción o expresión de la hemoxigenasa-1 (HO-1) junto con la administración de CO. Por ejemplo, la HO-1 puede inducirse en un paciente que padece o que tiene riesgo de padecer hepatitis. Como se usa en el presente documento, el término "inducido" significa que produce una mayor producción de proteína, por ejemplo HO-1, en células aisladas o las células de un tejido, órgano o animal usando el gen endógeno de las propias células (por ejemplo, no recombinante) que codifica la proteína.

- 25 **[0052]** La HO-1 puede inducirse en un paciente por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la producción de HO-1 puede inducirse por hemina, por protoporfirina de hierro, o por protoporfirina de cobalto. Una diversidad de agentes no hemo incluyendo metales pesados, citocinas, hormonas, NO, COCl<sub>2</sub>, endotoxinas y choque térmico también son fuertes inductores de la expresión de HO-1 (Choi et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15: 9-19, 1996; Maines, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37: 517-554, 1997; y Tenhunen et al., J. Lab. Clin. Med 75: 410-421, 1970). La HO-1 también se induce en gran medida por una diversidad de agentes que producen estrés oxidativo, incluyendo peróxido de hidrógeno, agentes para reducir los niveles de glutatión, irradiación UV, endotoxinas e hiperoxia (Choi et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15: 9-19, 1996; Maines, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37: 517-554, 1997; y Keyse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 99-103, 1989). Una "composición farmacéutica que comprende un inductor de HO-1" significa una composición farmacéutica que contiene cualquier agente capaz de inducir HO-1 en un paciente, por ejemplo, cualquiera de los agentes descritos anteriormente, por ejemplo NO, hemina, protoporfirina de hierro y/o protoporfirina de cobalto.

- 30 **[0053]** La expresión de HO-1 en una célula puede aumentarse por transferencia génica. Como se usa en el presente documento, el término "expresado" significa que produce una mayor producción de una proteína, por ejemplo HO-1 o ferritina, en células aisladas o las células de un tejido, órgano o animal usando un gen administrado exógenamente (por ejemplo, un gen recombinante). La HO-1 o ferritina preferentemente es de la misma especie (por ejemplo, humano, ratón, rata, etc.) que el receptor, para minimizar cualquier reacción inmune. La expresión podría dirigirse por un promotor constitutivo (por ejemplo, promotores de citomegalovirus) o un promotor específico de tejido (por ejemplo, promotor del suero de leche para células de mamífero o promotor de albúmina para células hepáticas). Un vector de terapia génica apropiado (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado (AAV), poxvirus (por ejemplo, vaccinia), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus diminuto de ratón, el virus de la hepatitis B, virus de la gripe, Virus Herpes Simplex-1 y lentivirus) que codifica HO-1 o ferritina se administraría a un paciente que padece o con riesgo de padecer hepatitis, a través de la boca, mediante inhalación o inyección en el hígado. De forma similar, pueden administrarse vectores plasmídicos que codifican HO-1 o apoferritina, por ejemplo, como ADN desnudo, en liposomas, o en micropartículas.

- 35 **[0054]** Además, puede administrarse proteína HO-1 exógena directamente a un paciente por cualquier método conocido en la técnica. La HO-1 exógena puede administrarse directamente además, o como alternativa, a la inducción

o expresión de HO-1 en el paciente como se ha descrito anteriormente. La proteína HO-1 puede administrarse a un paciente, por ejemplo, en liposomas, y/o como una proteína de fusión, por ejemplo, como una proteína de fusión con TAT (véase, por ejemplo, Becker-Hapak et al., Methods 24: 247-256, 2001).

5 **[0055]** Como alternativa o además, pueden administrarse cualquiera de los productos del metabolismo por HO-1, por ejemplo, bilirrubina, biliverdina, hierro y/o ferritina a un paciente junto con CO para prevenir o tratar la hepatitis. Además, la presente invención contempla que pueden administrarse al paciente moléculas de unión a hierro distintas de ferritina, por ejemplo, desferoxamina (DFO), dextrano de hierro y/o apoferritina. Además, la presente invención contempla que pueden inhibirse enzimas (por ejemplo, biliverdina reductasa) que catalizan la degradación de cualquiera de estos productos para crear/aumentar el efecto deseado. Cualquiera de los anteriores puede administrarse, por ejemplo, por  
10 vía oral, intravenosa o intraperitoneal, o por administración directa en el hígado.

**[0056]** La presente invención contempla que en los métodos de la presente invención también pueden usarse compuestos que liberan CO en el cuerpo después de la administración del compuesto (por ejemplo, compuestos de liberación de CO, por ejemplo compuestos de liberación de CO fotoactivables), por ejemplo, dimanganeso decacarbonilo, dímero de tricarbonildiclororrutenio (II) y cloruro de metileno (por ejemplo, a una dosis comprendida entre  
15 400 y 600 mg/kg, por ejemplo, de aproximadamente 500 mg/kg), así como carboxihemoglobina y sustitutos de hemoglobina donadores de CO.

**[0057]** Lo anterior puede administrarse a un paciente de cualquier forma, por ejemplo, por administración oral, intraperitoneal, intravenosa o intraarterial. Cualquiera de los compuestos anteriores puede administrarse al paciente local y/o sistémicamente, y en cualquier combinación.

20 **[0058]** La presente invención contempla además el tratamiento/prevención de hepatitis por administración de CO al paciente en combinación con cualquier otro método o compuesto conocido para tratar hepatitis, por ejemplo, el cese o reducción de la administración de fármacos causantes; la administración de corticosteroides y/o interferón- $\alpha$  u otros agentes antivirales al paciente; y/o la realización de cirugía en el paciente, por ejemplo, trasplante hepático.

25 **[0059]** La invención se ilustra, en parte, por los siguientes ejemplos, que no deben considerarse limitantes de la invención de forma alguna.

#### Ejemplo 1. El Monóxido de Carbono Atenúa la Lesión Hepática

##### **Animales**

30 **[0060]** Para los experimentos in vivo se usaron ratones C57BL/6J macho (Charles Rivers Laboratories, Bar Harbor, ME), de 8-12 semanas de edad, inos-/- y compañeros de camada de tipo silvestre (criados/mantenidos en la Universidad de Pittsburg).

##### **Modelos de lesión hepática aguda**

35 **[0061]** A grupos de ratones se les administró TNF- $\alpha$ /D-gal (0,3  $\mu$ g/8mg/ratón, i.p., respectivamente). Dependiendo de la condición experimental, algunos ratones recibieron CO (250 ppm), el donante de NO selectivo 1-(pirrolidin-1-il) diazen-1-ilo-1,2-diolato de vinilo (V-PYRRO; 10 mg/kg por vía subcutánea (s.c), Alexis Biochem., San Diego, CA) o protoporfirina de cobalto (CoPP, 5 mg/kg, por vía intraperitoneal (i.p.), Frontier Scientific, Logan, UT). Además, se administró el inhibidor selectivo de iNOS diclorhidrato de L-N6-(1-iminoetil)-lisina (L-NIL; 5 mg/kg, i.p., Alexis Biochemicals) o el inhibidor de HO-1 protoporfirina de estaño (SnPP; 50  $\mu$ mol/kg, i.p., Frontier Scientific) cuando se especificó. Donde se indica, se administró acetaminofeno (Sigma Chem. Co.; St Louis, MO) (500 mg/kg, i.p.).

##### **Cultivo celular de hepatocitos.**

40 **[0062]** Se recogieron hepatocitos primarios de ratón de ratones C57BL/6J, mkk3-/-, inos-/- (colonia de cría interna) o hmox-1-/- como se describe en Kim et al. (J. Biol. Chem. 272: 1402-1411 (1997)). Los hepatocitos se usaron los días 1-3 después de la recolección.

##### **Inducción de muerte/apoptosis de hepatocitos**

45 **[0063]** Se trataron células con TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) y actinomicina-D (Act-D; 200 ng/ml, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) para inducir la muerte celular. Se ha demostrado que el tratamiento con TNF- $\alpha$ /ActD induce la muerte celular, específicamente la apoptosis, en hepatocitos primarios (véase, por ejemplo, Kim et al. (J. Biol. Chem. 272: 1402-1411 (1997))). Los hepatocitos se trataron con CO, el donante de NO s-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP; 250-750  $\mu$ M), y/o agentes farmacológicos adicionales cuando se indica. Doce horas después del tratamiento con TNF- $\alpha$ /ActD, las células se lavaron y se tiñeron con violeta de cristal para determinar la viabilidad como se ha descrito previamente (Id). Cuando  
50 se indica, se administró el inhibidor selectivo in vitro de iNOS, L-N5-(1-iminoetil)-ornitina-2HCl (LNIO; 1-2 mM; Calbiochem, San Diego, CA).

##### **Transferencia génica/plásmidos.**

**[0064]** En algunos experimentos, se realizó transferencia génica de un super-represor de I $\kappa$ B $\alpha$  (Hellerbrand et al.,

Hepatology 27: 1285-1295 (1998)) o  $\beta$ -galactosidasa usando vectores adenovirales (10 ufp/célula) 12 horas antes del tratamiento con TNF- $\alpha$ /ActD. La activación de NF- $\kappa$ B se evaluó usando un ensayo de indicador de luciferasa como se describe en Chow et al. (J. Biol. Chem. 274: 10689-10692 (1999)). En resumen, se cotransfectaron hepatocitos con construcciones de indicador de NF- $\kappa$ B (pGL3-kappa $\beta$  luciferasa, 100 ng/pocillo; y pLEP-Lac-z 0,5  $\mu$ g/pocillo) usando Lipofectin™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) como se indica por el fabricante. La evaluación de la expresión de iNOS se realizó usando un ensayo de indicador de luciferasa como se describe en Lowenstein et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90: 9730-9734 (1993)). En resumen, se cotransfectaron hepatocitos con construcciones indicadoras de promotor de iNOS (pXP2; 1  $\mu$ g/pocillo) y pLEP-LacZ (0,5  $\mu$ g/pocillo) como se ha descrito anteriormente.

#### Ensayos de indicador de luciferasa

10 **[0065]** Se transfectaron hepatocitos con plásmidos como se ha descrito anteriormente y se trataron con diversos estímulos 24 horas después de la transfección. La actividad luciferasa (presentada como unidades arbitrarias; U.A.) se ensayó 6 horas después del inicio del tratamiento, usando un kit de ensayo de luciferasa (Promega, Madison, WI) y un Luminómetro Berthold. Los resultados se corrigieron con respecto a la eficacia de transfección y la concentración de proteínas.

#### 15 Ensayo de cambio de movilidad electroforética

**[0066]** Se extrajeron núcleos de hepatocitos después del tratamiento. Una secuencia consenso de ADN bicatenario de NF- $\kappa$ B (GGGGACTTTCCC (SEC ID N°: 1)); Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) se marcó con [ $\delta$ -<sup>32</sup>P]-ATP y se incubó con 5 mg de proteína nuclear total. Algunas incubaciones se realizaron en presencia de anticuerpos contra p65/RelA o p50 (Santa Cruz Biotech) para evaluar el retraso adicional. El ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) se realizó como se describe en Taylor et al. (J. Biol. Chem. 273: 15148-15156 (1998)).

#### 20 Análisis de inmunotransferencia

**[0067]** El análisis de transferencia de Western se realizó en hepatocitos primarios en cultivo o en homogeneizados hepáticos con anticuerpos contra iNOS (Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky; 1:1000), HO-1 (Calbiochem; 1:2000), o  $\beta$ -actina (Sigma Chemical; 1:5000). Se cargaron treinta  $\mu$ g de proteína en experimentos de cultivo celular o 100  $\mu$ g de proteína de homogeneizados hepáticos por pocillo para SDS-PAGE.

#### Histología/Inmunohistoquímica

**[0068]** Para la histología e inmunohistoquímica, los hígados se fijaron en paraformaldehído al 2% y después se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Después, los hígados se seccionaron (7 micrómetros de espesor) y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E). También se tiñeron secciones hepáticas para TUNEL y caspasa-3 activada usando kits de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). Las secciones para la inmunocitoquímica de iNOS se bloquearon con suero de cabra al 5% que contenía un 0,2% de albúmina de suero bovino. Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo anti-iNOS (Transduction Laboratories; 1:300), y después se lavaron y se sondaron con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, OR). Los núcleos se tiñeron con colorante Hoechst. Las imágenes se adquirieron usando un microscopio Olympus Provus. Los hepatocitos en cultivo se pusieron en placas en cubreobjetos gelatinizados, se estimularon como se indica y después se fijaron en paraformaldehído al 2% que contenía Tritón X-100 al 0,1%. El bloqueo y la tinción fueron similares a los de las secciones hepáticas con la excepción de que se utilizó anticuerpo anti-p65/RelA (Santa Cruz Biotechnology; 1:350).

#### Exposición a CO

40 **[0069]** Los animales se expusieron a CO a una concentración de 250 ppm. En resumen, se mezcló CO al 1% en aire con aire (21% de oxígeno) en un cilindro de mezcla de acero inoxidable y después se dirigió a una cámara de exposición de vidrio de 3,70 pies<sup>3</sup> a un caudal de 12 l/min. Se usó un analizador de CO (Interscan, Chatsworth, CA) para medir los niveles de CO continuamente en la cámara. Las concentraciones de CO se mantuvieron a 250 ppm durante todo el tiempo. Los ratones se pusieron en la cámara de exposición cuando fue necesario.

#### 45 HO-1 protege frente a la lesión hepática

**[0070]** Se investigó si HO-1 es protectora contra la insuficiencia hepática aguda. Los resultados se presentan en la Fig. 1. Se administró protoporfirina de cobalto (5 mg/kg, i.p.) a ratones C57BL/6J macho. Veinticuatro horas después, se administró TNF- $\alpha$ /D-gal (0,3  $\mu$ g/8 mg/ratón, i.p., respectivamente) a los ratones. Se midieron los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) en los ratones 8 horas después de la administración de TNF- $\alpha$ /D-gal. La inducción de HO-1 impidió la lesión hepática como se mide por los niveles de ALT en suero.

#### El CO exógeno protege a los hepatocitos

**[0071]** Se investigó si el CO exógeno es protector contra la muerte celular de los hepatocitos in vitro. Los resultados se presentan en las Figs. 2 y 3. Para generar los datos presentados en la Fig. 2, se preincubaron hepatocitos de ratón con CO (250 ppm) durante 1 hora (tiempo de pretratamiento estándar para todos los experimentos) antes de la adición

de TNF $\alpha$ /Act-D (10 ng/200 ng/ml respectivamente). Las células se mantuvieron en CO durante todo el experimento. Doce horas después, se midió la viabilidad celular como se describe en Kim et al. (J. Biol. Chem. 272: 1402-1411 (1997)). Los experimentos adenovirales implicaron la incubación de hepatocitos durante una noche con 10 ufp/célula del adenovirus antes de la adición de TNF $\alpha$ /ActD, y después el ensayo con respecto a la viabilidad usando violeta de cristal.

5 En este modelo también se investigaron los papeles de moléculas de señalización guanilil ciclasa y p38 MAPK. Para evaluar el papel de GMPc y confirmar el papel de NF- $\kappa$ B, los hepatocitos se trataron por separado con el inhibidor de guanilato ciclasa soluble (sGC) 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ; Calbiochem; 2-10  $\mu$ M) o el inhibidor de NF- $\kappa$ B BAY 11-7082, (10  $\mu$ M). Las células se trataron con los inhibidores durante 1 hora antes del pretratamiento de

10 1 hora con CO. Después se añadió TNF- $\alpha$ /ActD y las células se ensayaron con respecto a la viabilidad 12 horas después. La activación de NF- $\kappa$ B fue crítica para la protección inducida por CO mientras que el GMPc no estaba implicado. La exposición a CO condujo a una muerte celular significativamente menor (\* $p$ <0,01) que sin CO.

**[0072]** Para generar los datos presentados en la Fig. 3, se trataron hepatocitos primarios humanos obtenidos a partir de una resección de hígado de un donante con CO y TNF- $\alpha$ /ActD como se ha descrito anteriormente.

**[0073]** La exposición de hepatocitos primarios de ratón, rata y humanos a CO inhibió la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ . La inhibición de la apoptosis de los hepatocitos era independiente de la generación de GMPc, ya que el inhibidor selectivo de guanilil ciclasa ODQ no invertía la protección proporcionada por CO (Fig. 2). Además, el tratamiento con CO inhibía la muerte celular en presencia de SB203580 (3-30  $\mu$ M, Calbiochem), un inhibidor selectivo de la activación de p38 MAPK, y en hepatocitos de ratones mkk3 $^{-/-}$ , en presencia de la quinasa dominante aguas arriba para p38 (datos no mostrados). De esta manera, los efectos de CO fueron independientes de la ruta de GMPc/p38 MAPK. En estos

15 experimentos, los hepatocitos se pretrataron con CO durante una hora antes de la adición de TNF- $\alpha$ /ActD al medio. Si el tratamiento con CO se iniciaba después de la adición de TNF $\alpha$ , se observaba menos protección (datos no mostrados).

20

#### El papel de NF- $\kappa$ B en la protección por CO

**[0074]** Se investigó si la protección inducida por CO de hepatocitos depende de NF- $\kappa$ B. Las Figs. 4, 5 y 6A-6C presentan datos que ilustran que CO inducía un aumento en la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y en la unión al ADN en hepatocitos de ratón como se mide por la actividad del ensayo de indicador de luciferasa de NF- $\kappa$ B, EMSA e

25 inmunotinción para la translocación nuclear de RelA/p65, respectivamente.

**[0075]** Para generar los datos presentados en la Fig. 4, se realizó una evaluación de la activación de NF- $\kappa$ B usando un ensayo de indicador de luciferasa como se describe en Chow et al. (J. Biol. Chem. 274: 10689-10692 (1999)). En resumen, se contransfectaron hepatocitos con construcciones indicadoras de NF- $\kappa$ B y pIEP-Lac-z 24 h antes de la adición de BAY 11-7082 (10  $\mu$ M) o vehículo. Las células se incubaron durante 1 hora antes de la exposición a CO (250 ppm). La actividad luciferasa (presentada como unidades arbitrarias; U.A.) se ensayó 6 h después de la exposición a CO o a una mezcla de citocinas (CM) compuesta de TNF- $\alpha$  (500 U/ml), IL-1 $\beta$  (100 U/ml) e IFN- $\delta$  (100 U/ml), que se usó como control positivo para la activación de NF- $\kappa$ B. Los resultados se corrigieron con respecto a la eficacia de transfección y concentración de proteínas.

30

**[0076]** Para generar los datos de la Fig. 5, se evaluó la unión al ADN de NF- $\kappa$ B usando EMSA en hepatocitos tratados con CO (250 ppm). Obsérvese el aumento dependiente del tiempo en la unión a NF- $\kappa$ B (total) con el pico de expresión a una hora (Calles 1, 4, 7). Después, los extractos se sometieron a un retardo adicional (supershift) para identificar los diferentes dímeros de NF- $\kappa$ B usando anticuerpos contra p50 (Calles 2, 5, 8) y p65 (Calles 3, 6, 9).

35

**[0077]** Para generar los datos de las Figs. 6A-6C, se inmunotñeron hepatocitos primarios con respecto a localización nuclear de p65 después de la exposición durante 1 h a CO (250 ppm). Las imágenes representan la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B (las flechas que apuntan a núcleos verdes representan la translocación de NF- $\kappa$ B) tanto en células tratadas con CM (usadas como control positivo) como en células tratadas con CO frente a la ausencia de localización en células tratadas con aire (flechas que apuntan a núcleos azules).

40

**[0078]** La actividad del ensayo de indicador de luciferasa NF- $\kappa$ B mostró un pico una hora después de poner las células en la atmósfera de CO. En los grupos de tratamiento se incluyó una mezcla de citocinas (CM) como señal positiva así como un patrón para la actividad máxima del indicador mediante el cual evaluar los efectos de CO. La eficacia de la transfección en hepatocitos primarios es difícil, pero la actividad indicadora fue muy significativa (\* $p$ <0,001 frente al control). Estos datos combinados con la inmunotinción positiva y los resultados de EMSA confirman la creencia de que CO induce un aumento moderado en NF- $\kappa$ B que, por sí mismo, puede dar como resultado, en parte, una expresión génica selectiva. Para evaluar si la actividad de NF- $\kappa$ B es necesaria para la protección mediada por CO, se utilizó la transferencia de genes adenovirales de I $\kappa$ B $\alpha$  para prevenir la translocación de NF- $\kappa$ B y se usó BAY 11-7082 (1-10 mM, Calbiochem) para inhibir la activación de NF- $\kappa$ B. Los efectos protectores de CO se anularon por inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B.

45

50

#### El papel de la expresión de iNOS dependiente de Nf- $\kappa$ B en la protección por CO

**[0079]** Se investigó si la protección mediada por CO de hepatocitos requiere la expresión de iNOS y la generación de NO. Los resultados se presentan en las Figs. 7, 8 y 9.

55

**[0080]** Para generar los datos en la Fig. 7, la evaluación de la expresión de iNOS se realizó usando un ensayo de

indicador de luciferasa como se describe en Lowenstein et al. (Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A 90: 9730-9734 (1993)). En resumen, se contranfectaron hepatocitos con una construcción indicadora de promotor de iNOS y pIEP-LacZ 24 h antes de la exposición a BAY 11-7082 (10  $\mu$ M) o vehículo. Las células se incubaron con BAY 1 h antes de la exposición a CO (250 ppm). La actividad luciferasa (presentada como unidades arbitrarias; U.A.) se ensayó como se ha indicado anteriormente. La mezcla de citocinas (CM; véase anteriormente) se usó como control positivo para inducir la expresión de iNOS, y los resultados se corrigieron con respecto a la eficacia de transfección y la concentración de proteínas.

**[0081]** Para generar los datos en la Fig. 8, la expresión de proteína iNOS se evaluó usando técnicas de inmunotransferencia. En resumen, se trataron extractos celulares de hepatocitos con TNF- $\alpha$ /ActD durante 6-8 h en presencia y ausencia de CO (250 ppm). Las células de control recibieron aire o CO solo. Obsérvese en la Fig. 8 que el TNF- $\alpha$  induce la expresión de iNOS mínimamente, mientras que las células tratadas con TNF- $\alpha$  en presencia de CO muestran una inducción significativamente mayor en la proteína iNOS.

**[0082]** Para generar los datos presentados en la Fig. 9, se aislaron hepatocitos de ratón a partir de ratones inos $^{-/-}$  o de ratones C57BL/6J de tipo silvestre, que después se pretrataron durante 1 h con L-NIO (1 mM) para inhibir iNOS antes de la administración de CO. Los grupos expuestos a CO recibieron un pretratamiento de una hora antes de la adición de TNF- $\alpha$ /ActD y después se devolvieron a la exposición a CO. El CO no proporcionó protección contra la muerte celular, como se evalúa por exclusión de violeta de cristal 12 h después, en células en las que la expresión de iNOS estaba ausente o se había inhibido.

**[0083]** La exposición de hepatocitos a CO produjo un aumento muy significativo de actividad en un ensayo de indicador luciferasa de iNOS (Fig. 7). De nuevo, se usó una mezcla de citocinas como control positivo en estas transfecciones de baja eficacia y como patrón mediante el cual evaluar los efectos de CO. Coherente con la dependencia de NF- $\kappa$ B de la expresión de iNOS, se observó una reducción de la actividad indicadora en hepatocitos tratados con BAY 11-7082 (Fig. 7). Además, la proteína iNOS aumentaba visiblemente en respuesta a TNF- $\alpha$  en presencia de CO en comparación con TNF- $\alpha$  solo (Fig. 8). Usando hepatocitos de ratones knockout para iNOS (inos $^{-/-}$ ) y hepatocitos de tipo silvestre tratados con el inhibidor selectivo de iNOS L-NIO (1 mM, Calbiochem), los solicitantes investigaron si CO podría proteger contra la muerte inducida por TNF- $\alpha$  en ausencia de la actividad de iNOS. Los hepatocitos que carecían de actividad de iNOS no se protegían por CO frente a la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ , mientras que los hepatocitos de tipo silvestre sí se habían protegido (Fig. 9). Considerados conjuntamente, estos datos demuestran que CO requiere la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de iNOS para proteger a los hepatocitos de la muerte celular in vitro.

### 30 **El CO Inhalado es Protector contra la Insuficiencia Hepática**

**[0084]** Se investigó si el CO inhalado protege a los ratones contra la lesión hepática en un modelo de TNF- $\alpha$ /D-gal de insuficiencia hepática fulminante. Los resultados se presentan en las Figs. 10 y 11A-11H.

**[0085]** Para generar los datos presentados en la Fig. 10, se pretrataron ratones con CO (250 ppm) durante una hora antes de recibir TNF- $\alpha$ /D-gal (0,3  $\mu$ g/8 mg/ratón; i.p., respectivamente). Después de recibir TNF- $\alpha$ /D-gal, los ratones se devolvieron a la cámara de exposición de CO y su suero se analizó con respecto a los niveles de ALT 6-8 horas después. Sin exposición a CO, se produjo insuficiencia hepática en 6-8 horas dirigida principalmente por apoptosis de hepatocitos como en el modelo in vitro descrito anteriormente. La ALT sérica en los ratones tratados con CO fue un 74% menor que en los ratones expuestos al aire.

**[0086]** Para generar los datos presentados en las Figs. 11A-11H, se seccionaron muestras hepáticas de ratones tratados con TNF- $\alpha$ /D-gal en presencia y ausencia de CO (250 ppm) durante 8 horas y se tiñeron para hematoxilina y eosina (H y E), caspasa 3 activada como se indica por un aumento en la intensidad del rojo) y para células positivas para TUNEL (como se indica por la mayor tinción celular de color verde; un marcador de muerte celular). Los núcleos se tiñeron de azul. La exposición a CO redujo notablemente la lesión hepática inducida por TNF- $\alpha$ /D-gal como se evalúa por tinción con H y E. Los hígados de ratones expuestos a CO también presentaron menos células positivas para TUNEL, presentaron menos tinción de caspasa-3 activada y tenían una arquitectura normal. Los ratones de control expuestos a aire que recibieron TNF- $\alpha$ /D-gal mostraron una notable inflamación, edema, hemorragia y pérdida de arquitectura hepática.

**[0087]** Los resultados analizados anteriormente se confirmaron usando lipopolisacárido (LPS, también denominado endotoxina) en lugar de TNF. En estos estudios de confirmación, la administración de LPS/D-Gal dio como resultado un aumento en los niveles de ALT en suero desde un nivel de control de 20 +/- 5 UI/ml a >1000 UI/ml, medido 8 horas después de la administración de LPS/D-Gal. En ratones pretratados con 250 ppm de CO, el aumento en ALT se redujo en >75%, a 250 +/- 75 UI/ml. Para caracterizar adicionalmente los efectos observados con CO en este modelo, se midió la interleucina-6 en suero y se observó que se reducía en un 65% en animales que respiraban CO frente a controles que respiraban aire (datos no mostrados). La histopatología tisular de los hígados de estos ratones fue similar a la demostrada usando TNF/D-Gal. Los ratones no tratados y tratados con CO (sin LPS/D-Gal) no tuvieron signos de lesión, mientras que los tratados con aire y LPS/D-Gal mostraron una lesión notable incluyendo edema, hemorragia, infiltración de neutrófilos y destrucción global de la morfología y la arquitectura normal. Por el contrario, los hígados de ratones tratados con CO y LPS/D-Gal se protegieron en la misma medida que los ratones tratados con CO y TNF/D-Gal. Se observaron pocos cambios en los marcadores de inflamación (edema, hemorragia, infiltración de neutrófilos). La

arquitectura se mantuvo y, en general, parecía similar a la de los ratones no tratados y tratados con CO (en ausencia de LPS/D-Gal). En general, el uso de LPS/D-Gal para inducir la hepatitis aguda correspondía y confirmaba los datos generados usando el tratamiento con TNF/D-Gal.

#### El Papel de iNOS en la Protección con CO contra la Lesión Hepática

5 **[0088]** Se investigó si se aumentaban los niveles de proteína iNOS hepática en los hígados de ratones expuestos a CO después del tratamiento con TNF- $\alpha$ /D-gal usando técnicas de inmunotransferencia e inmunohistoquímica. Además, se investigó si CO protegería a los ratones inos-/- o ratones de tipo silvestre tratados con el inhibidor selectivo de iNOS L-NIL (10 mg/kg, i.p.; dosificado cada 2 horas) para determinar si la expresión de iNOS tiene un papel funcional. Los resultados se proporcionan en las Figs. 12, 13A-13D y 14.

10 **[0089]** Para generar los datos presentados en la Fig. 12, se trataron ratones C57BL/6J macho con aire o CO (250 ppm) 1 h antes de la administración de TNF- $\alpha$ /D-gal (0,3  $\mu$ g/8 mg/ratón, i.p., respectivamente). Seis horas después, se recogieron los hígados para evaluar la expresión de iNOS por inmunotransferencia. Los resultados muestran que la expresión de iNOS aumentaba modestamente en ratones tratados con aire/ TNF- $\alpha$ /D-gal, pero aumentaba notablemente en ratones tratados con TNF- $\alpha$ /D-gal y CO. Como era de esperar, los ratones inos-/- no mostraron expresión de proteína iNOS.

15 **[0090]** Para generar los datos de las Figs. 13A-13D, se inmunotifieron secciones hepáticas de ratón para la expresión de iNOS. Las secciones hepáticas se obtuvieron a partir de ratones tratados con TNF- $\alpha$ /D-gal en presencia o ausencia de CO, y a partir de controles de aire y CO que no recibieron TNF- $\alpha$ /D-gal. Los hígados de los ratones expuestos a CO y que no recibieron TNF- $\alpha$ /D-gal presentaron un modesto aumento en la expresión de iNOS. Sin embargo, se observó un aumento significativamente mayor en la expresión (indicado por un aumento en las células teñidas de verde) en hígados de ratones que se expusieron a CO y recibieron TNF- $\alpha$ /D-gal. El aumento de expresión parecía estar localizado alrededor de los vasos sanguíneos.

20 **[0091]** Para generar los datos de la Fig. 14, se ensayó la eficacia de la protección inducida por CO en ausencia de actividad de iNOS usando ratones inos-/- y de tipo silvestre que se trataron con L-NIL, el inhibidor selectivo de iNOS (L-NIL; 5 mg/kg, i.p. dosificado cada dos horas). L-NIL se administró 2 h antes que CO. Los animales tratados con CO después se pretrataron (250 ppm) durante 1 h antes de exponerse a TNF- $\alpha$ /D-gal. En ausencia de la función/expresión de iNOS, CO no puede proteger contra la lesión hepática como se evalúa por los niveles séricos de ALT y la histopatología (datos no mostrados).

25 **[0092]** De esta manera, parece ser que el efecto protector del CO inhalado sobre la insuficiencia hepática inducida por TNF- $\alpha$  depende de la actividad de iNOS.

#### El Papel de HO-1 en la Protección de CO contra la Insuficiencia Hepática Aguda

30 **[0093]** Se investigó si CO y NO ejercen protección frente a la insuficiencia hepática aguda a través de un mecanismo dependiente de HO-1. Los datos se presentan en las Figs. 15, 16, 17 y 18.

35 **[0094]** Para generar los datos presentados en la Fig. 15, se realizó inmunotransferencia para observar la expresión de HO-1 en los hígados de ratones que recibieron TNF- $\alpha$ /D-gal en presencia y ausencia de CO (250 ppm). Los ratones tratados con CO mostraron un aumento significativo en la expresión de HO-1 tanto en presencia como en ausencia de TNF- $\alpha$ /D-gal.

40 **[0095]** Para evaluar el papel de iNOS sobre la expresión de HO-1 inducida por TNF- $\alpha$ /D-gal en el hígado (datos presentados en la Fig. 16), se administró a los ratones L-NIL (5 mg/kg, i.p.) 2 h antes del pretratamiento con CO (250 ppm) y cada 2 h posteriormente. Los ratones de control recibieron L-NIL y se mantuvieron en aire ambiental. Obsérvese en la Fig. 16 que el CO aumentaba la expresión de HO-1 en ratones tratados con vehículo, pero no podía inducir la expresión cuando se inhibía iNOS. El tratamiento con L-NIL solo tuvo un efecto mínimo sobre la expresión de HO-1.

45 **[0096]** Para ensayar el papel protector de HO-1 inducido por CO (datos presentados en la Fig. 17), los ratones recibieron SnPP (50  $\mu$ mol/kg, s.c), el inhibidor selectivo de HO-1, 5 h antes de CO. Como alternativa, los ratones recibieron VPYRRO (VP), un donante de NO (10 mg/kg, s.c). VP se diseñó selectivamente para suministrar NO directamente al hígado. Una hora después de la dosis de VP inicial, los animales se expusieron a CO durante 1 h antes de la administración de TNF- $\alpha$ /D-gal (véase anteriormente). Los niveles de ALT en suero se determinaron 6-8 horas después. Obsérvese que el CO no podía proporcionar protección en animales cuando se bloqueaba la actividad de HO-1. VP, cuando se administraba 2 horas antes y después cada 2 horas posteriormente, proporcionaba protección contra la lesión determinada 8 horas después por las mediciones de ALT en suero.

50 **[0097]** Para generar los datos presentados en la Fig. 18, se pretrataron ratones C57BL/6J de tipo silvestre durante 24 horas con L-NIL en el agua para beber (4,5 mM) como se describe en Stenger et al. (J. Exp. Med. 183: 1501-1514 (1996)). Estos ratones y los ratones inos-/- después recibieron CoPP. Se mantuvo L-NIL en el agua a lo largo de todo el experimento. Los ratones de control e inos-/- recibieron agua potable normal. Veinticuatro horas después de la administración de CoPP, se administró TNF- $\alpha$ /D-gal y se determinó la ALT en suero 6-8 horas después. Obsérvese en la Fig. 18 que la inducción de HO-1 proporciona protección independientemente de la presencia de iNOS.

**[0098]** La inmunotransferencia de extractos hepáticos de ratones tratados con CO en presencia o ausencia de TNF- $\alpha$ /D-gal mostró la regulación positiva de HO-1 (Fig. 15). La adición del inhibidor de iNOS L-NIL a estos grupos anteriores, que anulaba la protección (Fig. 17), también impedía la regulación positiva de HO-1 (Fig. 16). Para determinar si HO-1 era importante para la hepatoprotección inducida por CO, se usó protoporfirina de estaño-IX (SnPP, 50  $\mu$ mol/kg, s.c, Frontier Scientific) como inhibidor selectivo de la actividad de HO-1. SnPP disminuía significativamente los efectos protectores de CO en este modelo (Fig. 17). La administración de SnPP en ausencia de TNF- $\alpha$ /D-gal no tuvo ningún efecto, ni perjudicial ni protector (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la regulación positiva de HO-1 es importante para los efectos protectores de CO.

**[0099]** Para determinar si también sería necesaria la regulación positiva de HO-1 si se iniciara la protección por NO, los ratones se trataron con el donante de NO farmacológico V-PYRRO/NO. Este agente se metaboliza por el hígado, dando como resultado la liberación de NO por los hepatocitos. V-PYRRO/NO también proporciona protección después de la administración de LPS/D-gal o TNF- $\alpha$ /D-gal. Los ratones se distribuyeron aleatoriamente y se trataron con TNF- $\alpha$ /D-gal con o sin SnPP para evaluar el papel de HO-1. V-PYRRO/NO era protector, como se evalúa por la ALT en suero. Sin embargo, SnPP anulaba la capacidad de este donante de NO de proteger contra la lesión hepática (Fig. 17). De esta manera, parece ser que la hepatoprotección iniciada por CO o NO es al menos parcialmente dependiente de HO-1.

**[00100]** Como estos datos sugieren que CO y NO requieren la actividad HO-1 para proteger contra la muerte de hepatocitos inducida por TNF- $\alpha$ , se investigó si la protección mediada por HO-1 requiere actividad de iNOS. Usando ratones inos- $-/-$ , se indujo HO-1 mediante la administración de CoPP. Se inyectó TNF- $\alpha$ /D-gal 24 horas después, en el pico de la expresión de HO-1, y la lesión hepática se evaluó 6-8 horas después. Los resultados demuestran que la inducción de HO-1 podía prevenir significativamente la lesión hepática independientemente de la actividad iNOS con una reducción  $>50\%$  en la ALT sérica (Fig. 18). Estos resultados se confirmaron usando L-NIL. Los ratones se pretrataron con agua para beber que contenía L-NIL (4,5 mM) durante 24 horas. Este método inhibe eficazmente la actividad NOS. Los ratones de control recibieron agua normal. Posteriormente, se administró CoPP para inducir la expresión de HO-1 y, 24 horas después, los ratones se expusieron a TNF- $\alpha$ /D-gal. El tratamiento con L-NIL solo no cambió la gravedad de la lesión inducida en este modelo. Todos los animales que recibieron CoPP (con y sin L-NIL) se protegieron de la lesión hepática (Fig. 18).

**[00101]** Se investigó si se necesita la expresión de HO-1 para la protección inducida por CO- o NO frente a la muerte de hepatocitos inducida por TNF- $\alpha$ /ActD. Los datos se presentan en las Figs. 19 y 20.

**[00102]** Para generar los datos presentados en la Fig. 19, se aislaron hepatocitos de ratón a partir de ratones null para HO-1 (hmx-1 $-/-$ ) y compañeros de camada de tipo silvestre (C57BL/6J), pretratados durante 1 hora con CO (250 ppm) y tratados con TNF- $\alpha$ /ActD. La viabilidad se evaluó como se ha descrito anteriormente. CO protegió significativamente a los hepatocitos de tipo silvestre, pero no pudo proteger a los hepatocitos aislados de ratones hmx-1 $-/-$ .

**[00103]** Para generar los datos presentados en la Fig. 20, se aislaron hepatocitos de ratón a partir de ratones null para HO-1 (hmx-1 $-/-$ ) y compañeros de camada de tipo silvestre (C57BL/6J), pretratados con el SNAP donante de NO (500  $\mu$ M) y después tratados con TNF- $\alpha$ /ActD 1 hora después. Se ha demostrado que SNAP protege a los hepatocitos en este modelo. SNAP protegía significativamente frente a la muerte celular en hepatocitos de tipo silvestre, pero no proporcionó una protección significativa contra la muerte celular en hepatocitos aislados a partir de ratones hmx-1 $-/-$ .

**[00104]** Como se ha analizado anteriormente, las células hmx-1 $-/-$  y de tipo silvestre tratadas con aire expuestas a TNF- $\alpha$ /ActD experimentaron muerte celular como era de esperar, mientras que las células de tipo silvestre tratadas con CO o NO se protegieron en ausencia de TNF- $\alpha$ /ActD (Figs. 19 y 20). La protección conferida por CO y NO se perdió en las células que carecían de HO-1 funcional (hmx-1 $-/-$ ). De esta manera, parece ser que HO-1 puede proporcionar protección en este modelo sin la implicación de iNOS, lo que sugiere que HO-1 o uno o más de sus productos catalíticos, en parte, pueden ejercer efectos citoprotectores en este modelo.

#### 45 **El CO inhalado protege frente a la hepatitis inducida por acetaminofeno**

**[00105]** Se investigó si el CO inhalado protege frente a la hepatitis inducida por acetaminofeno (APAP). Los datos se presentan en la Fig. 21.

**[00106]** Para generar los datos de la Fig. 21, se expusieron ratones C57BL/6J macho a CO (250 ppm) 1 hora antes o 4 horas después de la administración de APAP (500 mg/kg, i.p.). Los ratones después se mantuvieron en CO durante todo el experimento. Los niveles de ALT en suero se determinaron 20 horas después de la administración de APAP. Los ratones de control recibieron APAP y se mantuvieron en aire. Este protocolo se diseñó para permitir que la hepatitis se desarrollara durante cuatro horas antes de administrar CO. El CO redujo significativamente la lesión en el hígado como se evalúa por la ALT sérica ( $622 \pm 44$  frente a  $175 \pm 137$ ,  $p < 0,01$  en comparación con los controles). Esta protección fue similar a la observada en un grupo separado de animales que se habían pretratado con CO antes de APAP. Estos datos confirman el uso terapéutico de CO en una situación clínicamente relevante en la que empezaría el tratamiento después del inicio de la hepatitis.

**[00107]** Los resultados analizados en este ejemplo demuestran que una baja concentración de CO puede proteger frente a la hepatitis fulminante inducida por TNF- $\alpha$ /D-gal e ilustran una dependencia única y no reconocida previamente



de HO-1 e iNOS en la protección inducida por CO de hígados frente al daño por TNF- $\alpha$ /D-gal.

[00108] Sin intención de limitarse por ninguna teoría, es posible que la protección mediada por CO funcione activando NF- $\kappa$ B, que en presencia de un estímulo inflamatorio conduce a la regulación positiva de iNOS con la producción consiguiente de NO. Además de la inducción de iNOS, pueden inducirse otros genes antiapoptóticos/protectores dependientes de NF- $\kappa$ B. Durante el pretratamiento de 1 hora con CO y antes de tratar las células con TNF- $\alpha$ , estaba presente una activación significativa de NF- $\kappa$ B, que podría ser parte de la inducción del aparato celular analizado anteriormente. La activación de NF- $\kappa$ B por CO puede ser el resultado, en parte, de un ligero aumento en la generación de especies de oxígeno reactivas procedentes de las mitocondrias (observaciones preliminares). Una hora también podría dejar tiempo para la expresión de genes antiapoptóticos dependientes de NF- $\kappa$ B. La siguiente etapa en dicho modelo hipotético podría conducir a la producción de NO después de la regulación positiva de iNOS. NO conduce a la regulación positiva de HO-1, cuya actividad confiere efectos protectores. El efecto protector de HO-1 podría deberse a la eliminación de hemo o uno cualquiera o más de sus tres productos: CO, biliverdina/bilirrubina o hierro/ferritina. Dado que el CO exógeno se administró durante todo el experimento, parece poco probable que el CO producido endógenamente solo medie la protección de HO-1. Sin embargo, podría estar implicada la combinación de CO con otros productos de HO-1 o estos otros productos actuando individualmente.

[00109] En un estudio descrito anteriormente, se administró CO en un modelo clínicamente relevante de hepatitis inducida por acetaminofeno (APAP) que tiene un curso de tiempo que es similar al desarrollo de hepatitis aguda en seres humanos. Los datos demuestran que la exposición a CO 4 horas después de la administración de APAP (500 mg/kg, i.p.) daba como resultado una reducción del 62% en la lesión hepática (Fig. 21). En este modelo de lesión hepática inducida por APAP, los ratones muestran signos de hepatitis ya a las 2-4 horas después de la administración de APAP y se produce letalidad a las 24-48 horas. Por lo tanto, se administró CO después del inicio de la lesión hepática. Son coherentes con los datos en el modelo APAP los resultados en un modelo murino de choque hemorrágico en el que el inicio terapéutico de CO inhalado durante la resucitación después de una fase de choque de 2,5 horas daba como resultado una protección frente a la lesión hepática (reducción >65% en ALT sérica a las 24 horas  $p < 0,01$ ;  $n = 6-10$ /grupo).

[00110] En resumen, empleando un modelo de lesión hepática dirigida principalmente por apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ , se demostró lo siguiente: en primer lugar, el CO inhalado puede prevenir la hepatitis en este modelo; en segundo lugar, la protección por CO requiere la generación de una segunda molécula gaseosa, NO; en tercer lugar, NO ejerce sus efectos beneficiosos, al menos en parte, mediante la regulación positiva de HO-1; y en cuarto lugar, la regulación positiva de HO-1 es protectora sin necesidad de actividad iNOS/NO, es decir, sin una continuación obligada del ciclo.

#### Ejemplo 2. Protocolo para el Tratamiento de Hepatitis

[00111] El siguiente ejemplo ilustra protocolos para uso en el tratamiento de un paciente al que se le ha diagnosticado hepatitis. El ejemplo también ilustra protocolos para tratar a pacientes antes, durante y/o después de procedimientos quirúrgicos, por ejemplo, un procedimiento quirúrgico para un trasplante de hígado. Los expertos en la materia apreciarán que puede adaptarse cualquier protocolo descrito en el presente documento basándose en las necesidades individuales del paciente, y puede adaptarse para usarse junto con cualquier otro tratamiento de hepatitis.

#### **Tratamiento de Pacientes**

[00112] El tratamiento de un paciente con CO puede empezar el día en el que al paciente se le diagnostica hepatitis, por ejemplo, hepatitis producida por una infección viral y/o abuso de alcohol. El paciente puede diagnosticarse por un médico usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, un médico puede realizar dicho diagnóstico usando datos obtenidos de ensayos de sangre, por ejemplo ensayos para determinar los niveles séricos de ALT y ensayos para determinar si un paciente está infectado con un virus particular (por ejemplo, cualquier virus de la hepatitis conocido). Además, un médico puede considerar la historia médica de un paciente al realizar dicho diagnóstico (por ejemplo, considerando si un paciente es alcohólico o un usuario crónico de fármacos). El paciente puede inhalar CO a una concentración de aproximadamente 250 a 500 ppm durante una hora al día. Este tratamiento puede continuar durante aproximadamente 30 días o hasta que se diagnostica que el paciente ya no tiene o no está en riesgo de padecer hepatitis.

#### **Procedimientos de Trasplante Hepático**

##### *Tratamiento de un Donante de Hígado*

[00113] Antes de recoger un hígado o una parte del mismo, el donante puede tratarse con monóxido de carbono inhalado (250 ppm) durante una hora. El tratamiento puede administrarse a dosis que varían de 10 ppm a 1000 ppm durante tiempos que varían de una hora a seis horas, o durante todo el periodo desde el momento en el que se hace posible tratar a un donante cerebralmente muerto (cadáver) hasta el momento en el que se retira el órgano. Para un donante humano, el tratamiento debe empezar tan pronto como sea posible después de la declaración de que está presente muerte cerebral. En algunas aplicaciones, puede ser deseable empezar el tratamiento antes de la muerte cerebral.

[00114] En el caso de animales no humanos (por ejemplo, cerdos) a usar como donantes de xenotrasplantes, el animal

donante vivo puede tratarse con niveles relativamente elevados de monóxido de carbono inhalado, cuando se desee, siempre que la carboxihemoglobina producida no comprometa la viabilidad y función del órgano a trasplantar. Por ejemplo, se podrían usar niveles mayores de 500 ppm (por ejemplo 1000 ppm o superiores, y de hasta 10.000 ppm, particularmente durante periodos cortos).

#### 5 *Tratamiento del Hígado in situ*

10 **[00115]** Antes de recoger el hígado de un donante, puede lavarse o profundirse con una solución, por ejemplo un tampón o medio, mientras que aún está en el donante. La intención es lavar el hígado con una solución saturada con monóxido de carbono y mantenida en una atmósfera de monóxido de carbono de forma que el contenido de monóxido de carbono se mantenga en la saturación. El lavado puede realizarse durante un periodo de tiempo de al menos 10 minutos, por ejemplo 1 hora, varias horas o más. Idealmente, la solución debe administrar la mayor concentración de monóxido de carbono posible a las células del hígado (o parte del mismo).

#### *Tratamiento del Hígado ex vivo*

15 **[00116]** Un hígado puede conservarse en un medio que incluye monóxido de carbono desde el momento en el que se retira del donante hasta el momento en el que se trasplanta en el receptor. Esto puede realizarse manteniendo el hígado en el medio que comprende CO, o profundiéndolo con dicho medio. Como esto se hace ex vivo en lugar de en un animal, pueden usarse concentraciones muy elevadas de gas CO (por ejemplo 10.000 ppm) para mantener el medio saturado con CO.

#### *Tratamiento de un Receptor de Hígado*

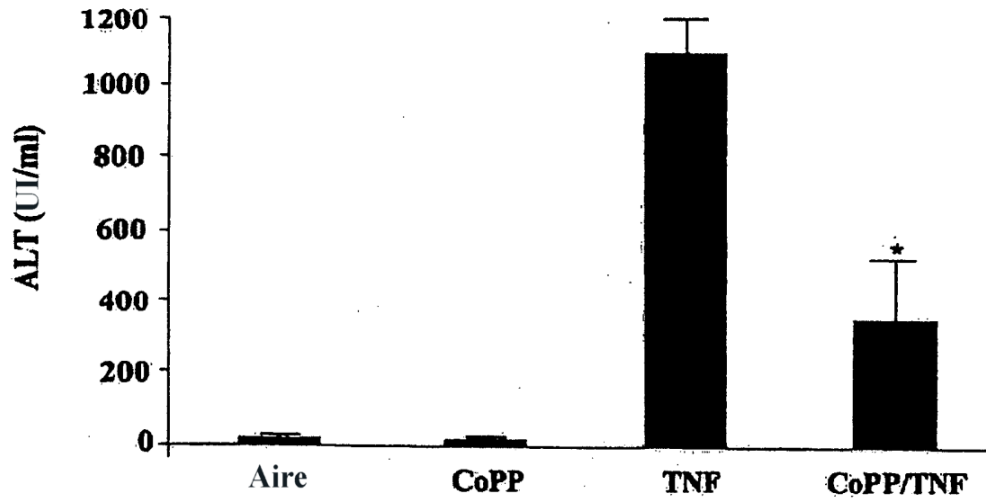
20 **[00117]** El tratamiento del receptor con CO puede empezar el día del trasplante al menos 30 minutos antes de que empiece la cirugía. Como alternativa, podría empezar al menos 30 minutos antes de la reperfusión del órgano en el receptor. Puede continuarse durante al menos 30 minutos, por ejemplo 1 hora. Pueden administrarse dosis de monóxido de carbono entre 10 ppm y 3000 ppm durante tiempos variables, por ejemplo minutos u horas, y pueden administrarse en el día de y en los días siguientes al trasplante. Por ejemplo, el paciente puede inhalar una concentración de monóxido de carbono, por ejemplo, 3000 ppm, durante tres respiraciones consecutivas de 10 segundos. Como  
25 alternativa, puede administrarse una menor concentración del gas intermitentemente de forma constante durante un periodo de tiempo mayor, con respiración regular en lugar de manteniendo la respiración. Pueden utilizarse concentraciones de carboxihemoglobina como guía para la administración apropiada de monóxido de carbono a un paciente. Normalmente, los tratamientos para los receptores no deben elevar los niveles de carboxihemoglobina por encima de los que se considera que suponen un riesgo aceptable para un paciente que necesita un trasplante.

30

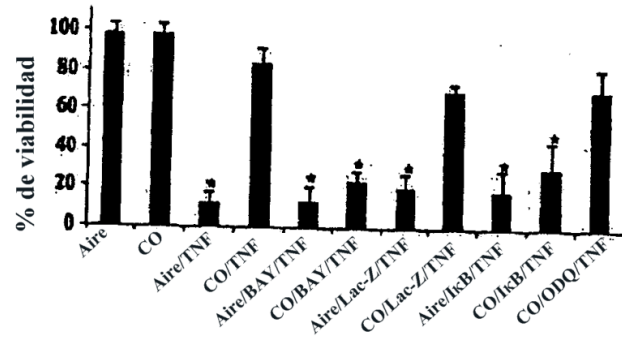
**REIVINDICACIONES**

1. Uso de monóxido de carbono para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir la hepatitis en un paciente.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que la composición farmacéutica está en forma gaseosa.
- 5 3. El uso de la reivindicación 1, en el que la composición farmacéutica se administra al paciente por vía oral, mediante inhalación o administración directa en la cavidad abdominal del paciente.
4. El uso de la reivindicación 1, en el que el paciente está infectado con un virus seleccionado del grupo que consiste en: virus de la hepatitis A; virus de la hepatitis B; virus de la hepatitis C; virus de la hepatitis D; virus de la hepatitis E; y virus de la hepatitis G.
- 10 5. El uso de la reivindicación 1, en el que el paciente es un alcohólico.
6. El uso de la reivindicación 1, en el que el tratamiento de la hepatitis comprende además administrar al paciente un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en: aplazar o reducir la administración de fármacos inductores de hepatitis; y administrar corticosteroides o agentes antivirales al paciente.
- 15 7. El uso de la reivindicación 1, en el que la composición farmacéutica se administra al paciente por un pulmón artificial o un dispositivo extracorpóreo de intercambio de gases a través de una membrana.
8. El uso de la reivindicación 1, en el que la hepatitis se produce por exposición a un agente hepatotóxico.
9. El uso de la reivindicación 1, en el que la hepatitis no se produce por cirugía o endotoxinas.
10. El uso de la reivindicación 9, en el que el paciente padece o tiene riesgo de padecer hepatitis no producida por cirugía o endotoxinas.
- 20 11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la composición farmacéutica se libera desde un recipiente que contiene la composición farmacéutica en forma de un gas presurizado que comprende gas monóxido de carbono, para formar una atmósfera que comprende gas monóxido de carbono; y el paciente se expone a la atmósfera.
12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la composición farmacéutica se administra al paciente antes, durante o después de administrar un fármaco hepatotóxico al paciente.
- 25 13. El uso de la reivindicación 12, en el que el fármaco hepatotóxico se selecciona del grupo que consiste en: isoniazida, metildopa, acetaminofeno, amiodarona y nitrofurantoina.
14. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la composición farmacéutica está en forma gaseosa y el monóxido de carbono está presente en la composición gaseosa en una cantidad de 0,001 ppm a 3000 ppm.
15. Monóxido de carbono para uso para el tratamiento o la prevención de la hepatitis en un paciente.
- 30 16. Monóxido de carbono para el uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que
  - (a) el monóxido de carbono está en una composición gaseosa;
  - (b) el monóxido de carbono se administra al paciente por vía oral, mediante inhalación o administración directa en la cavidad abdominal del paciente;
  - 35 (c) el paciente está infectado con un virus seleccionado del grupo que consiste en: virus de la hepatitis A; virus de la hepatitis B; virus de la hepatitis C; virus de la hepatitis D; virus de la hepatitis E; y virus de la hepatitis G;
  - (d) el paciente es un alcohólico,
  - (e) la hepatitis se produce por exposición a un agente hepatotóxico; o
  - (f) la hepatitis no se produce por cirugía o endotoxinas.
- 40 17. Monóxido de carbono para el uso de acuerdo con la reivindicación 15, donde el monóxido de carbono se administra al paciente antes, durante o después de administrar un fármaco hepatotóxico al paciente.
18. Monóxido de carbono para el uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el fármaco hepatotóxico se selecciona del grupo que consiste en: isoniazida, metildopa, acetaminofeno, amiodarona y nitrofurantoina.
19. El uso de la reivindicación 1, en el que la hepatitis es insuficiencia hepática aguda.
- 45 20. Monóxido de carbono para el uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la hepatitis es insuficiencia hepática

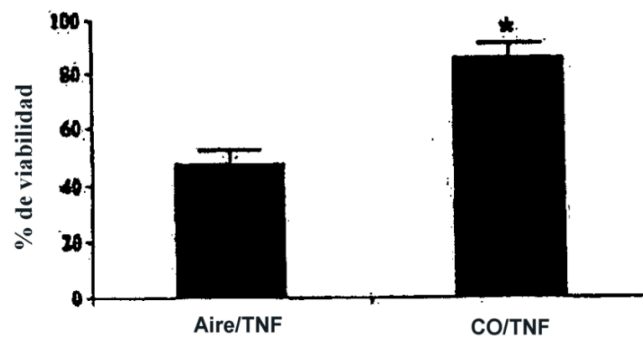
aguda.



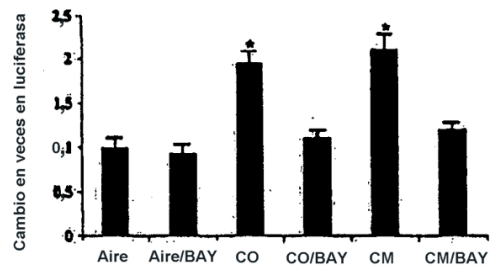
**Fig. 1**



**Fig. 2**

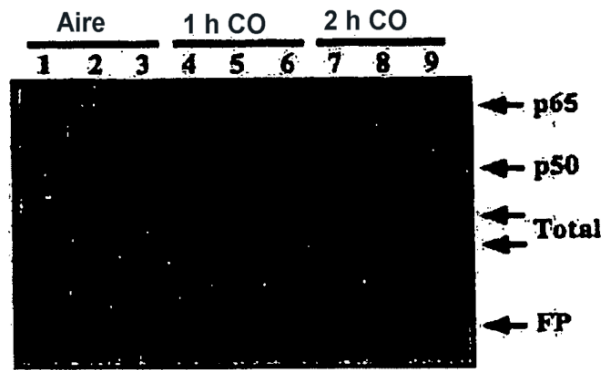


**Fig. 3**

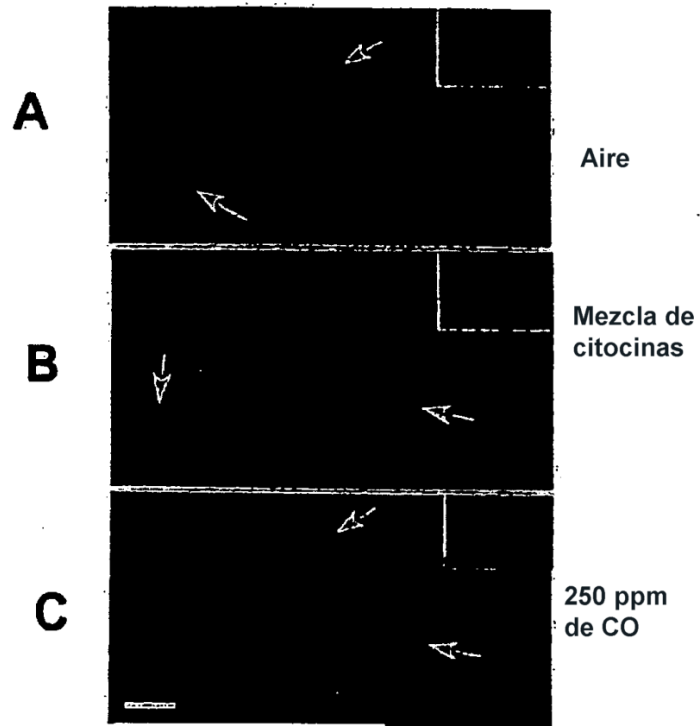


**Fig. 4**

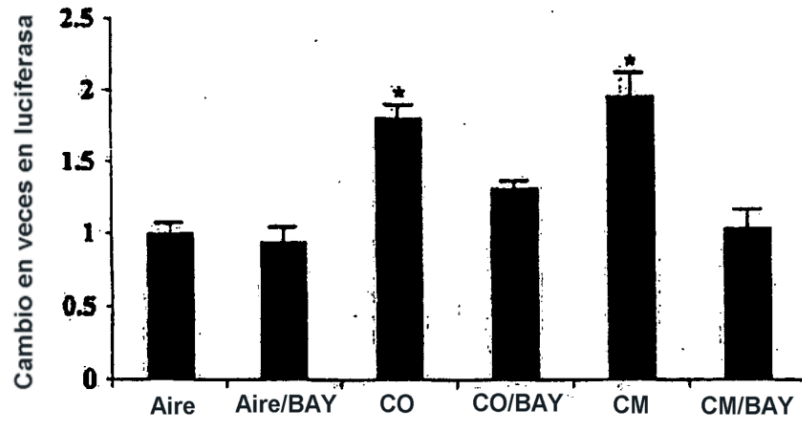




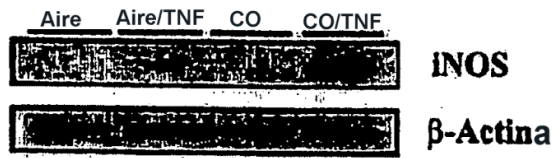
**Fig. 5**



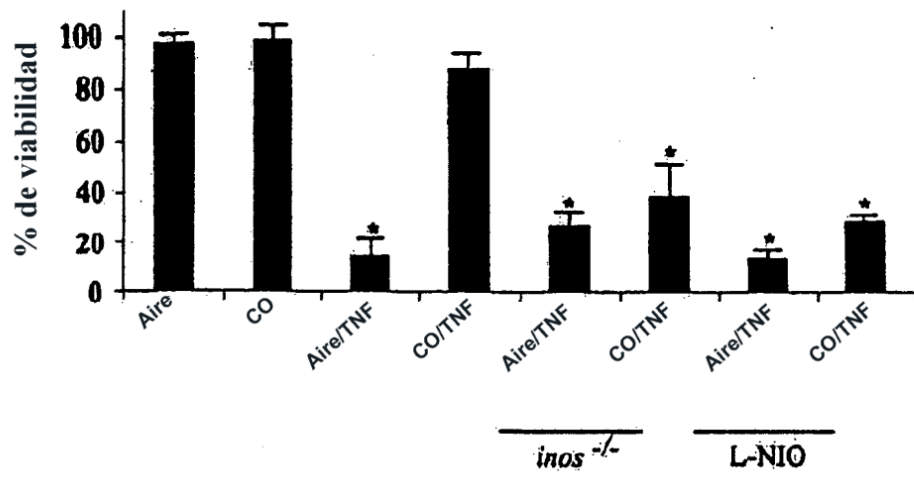
**Fig. 6A-6C**



**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9**



**Fig. 10**

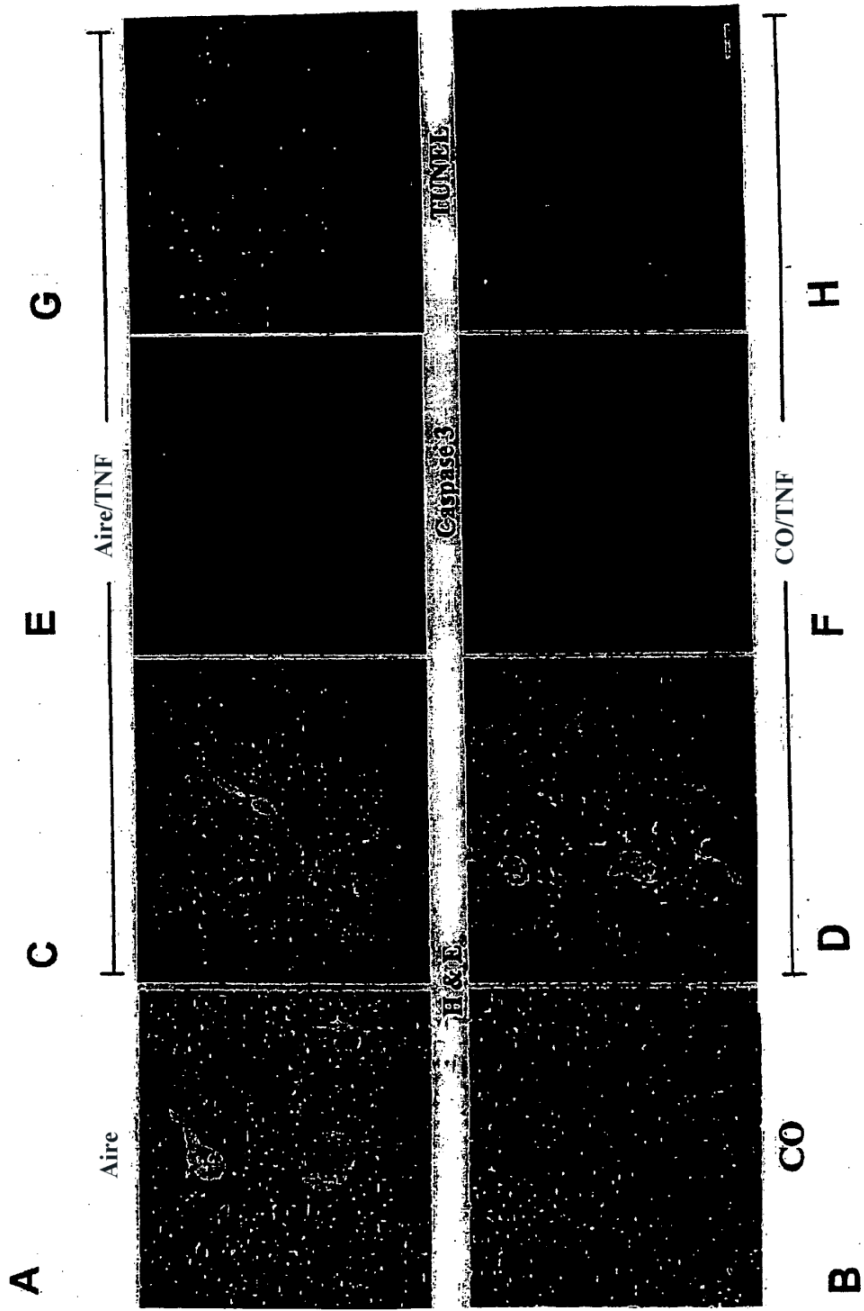


Fig. 11A-11H

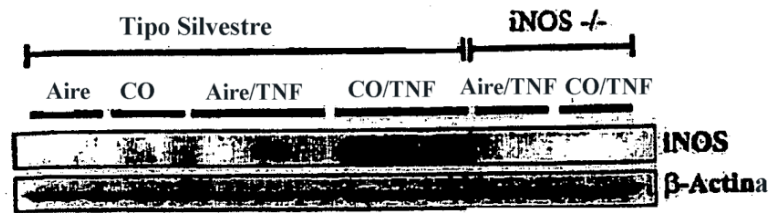
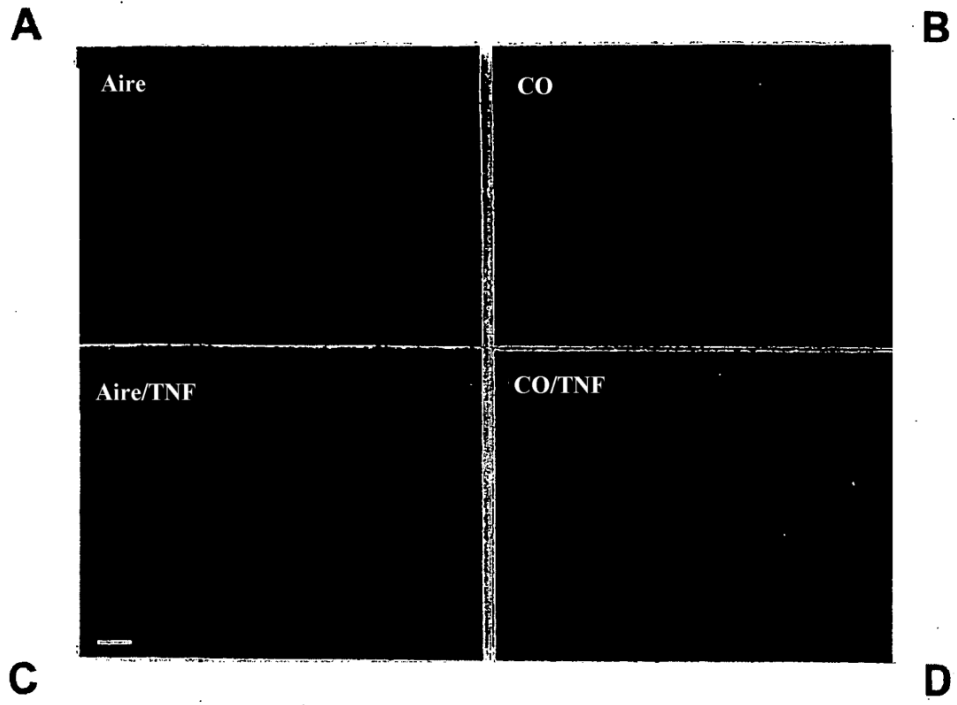
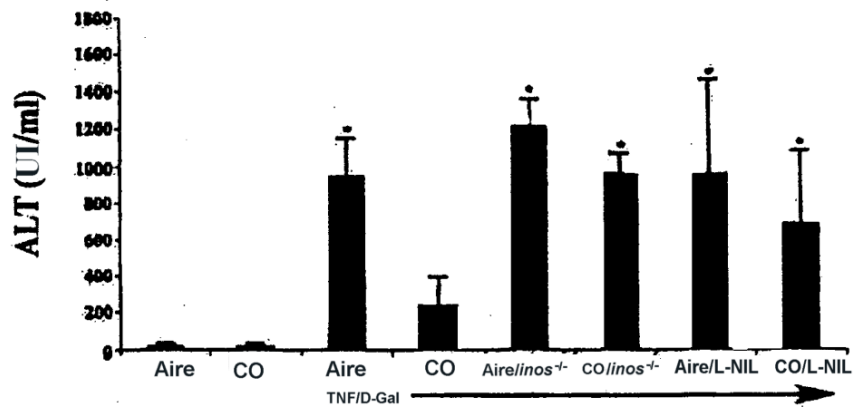


FIG. 12





**Fig. 13A-13D**



**Fig. 14**



**Fig. 15**

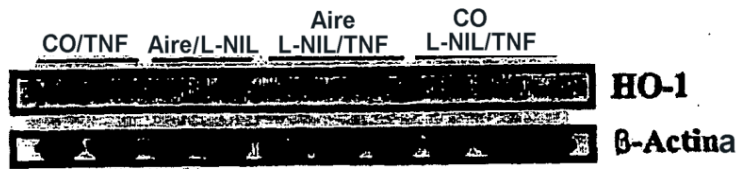
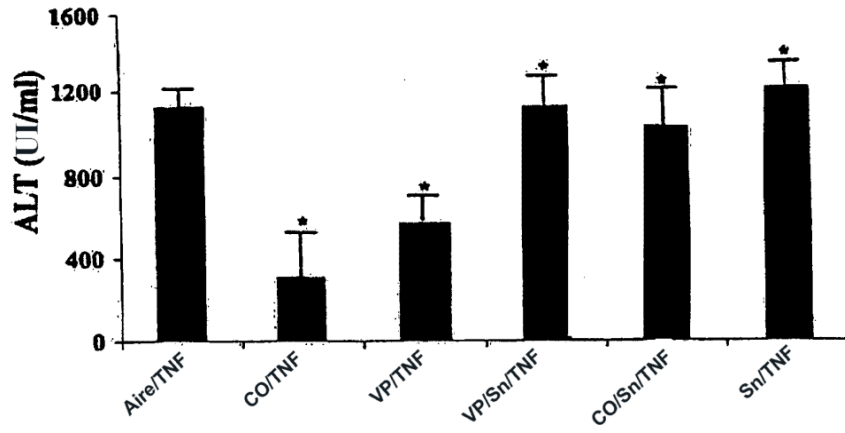
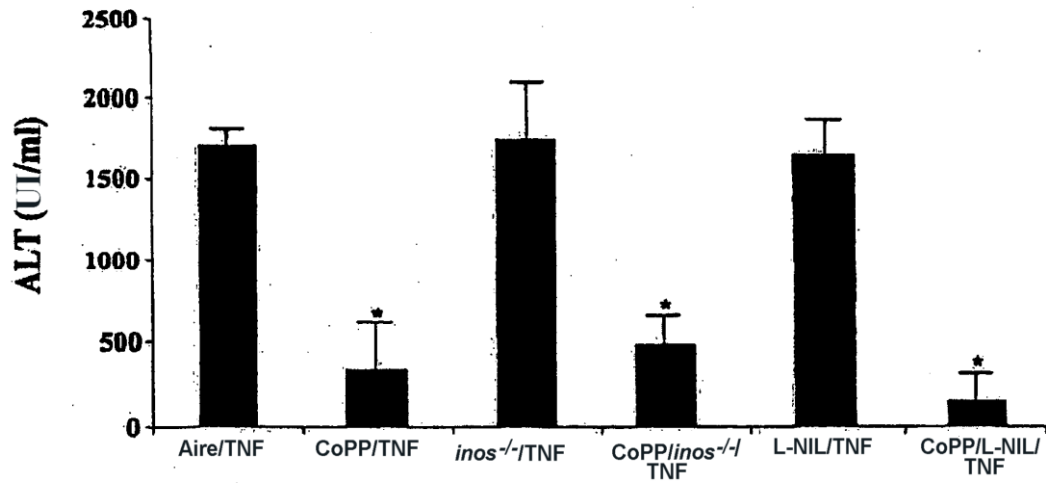


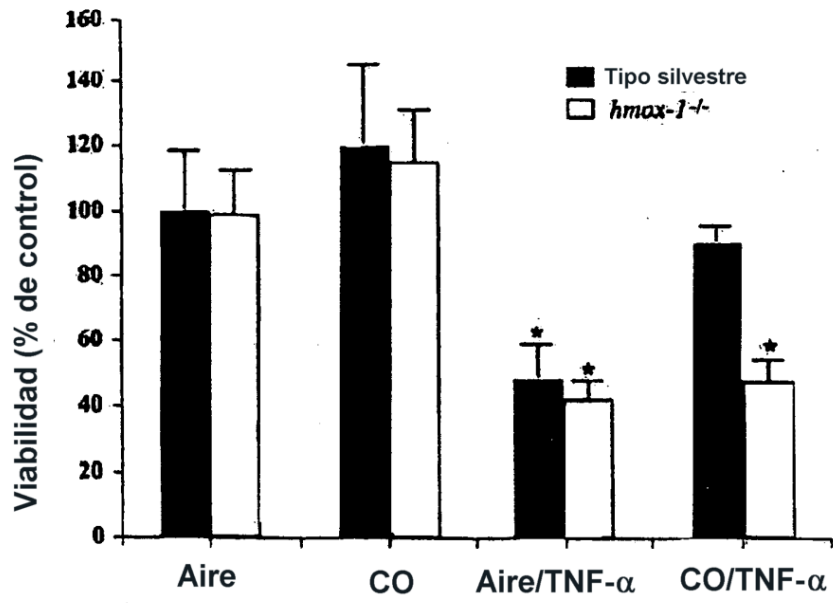
FIG. 16



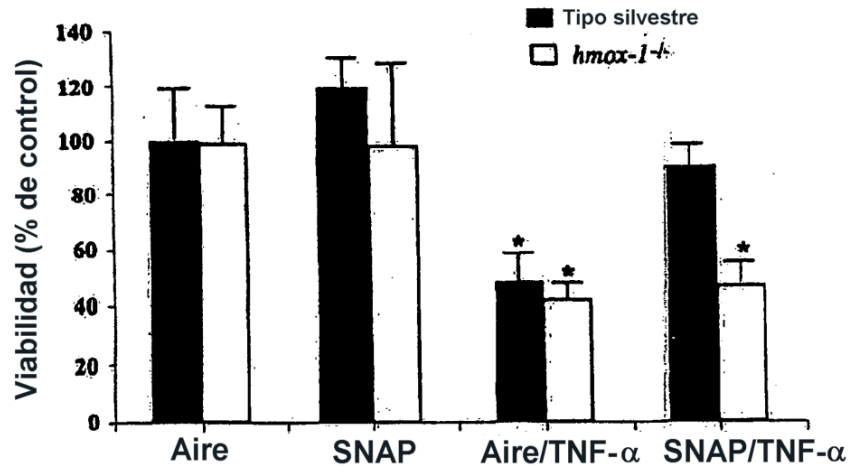
**Fig. 17**



**Fig. 18**

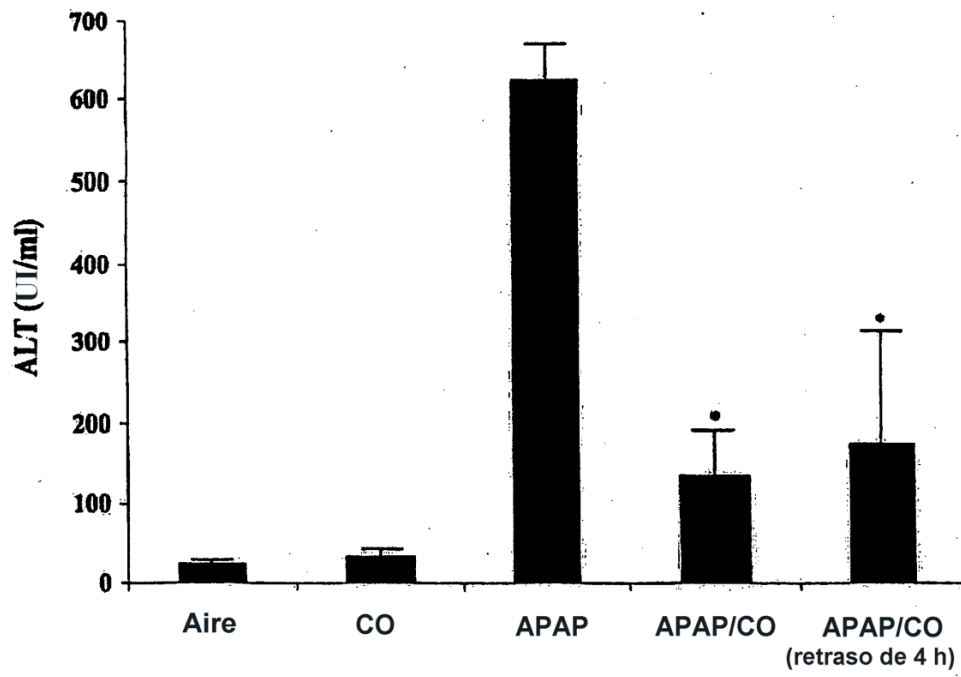


**Fig. 19**



**Fig. 20**





**Fig. 21**

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

## Documentos de patentes citados en la descripción

- US 38152702 P [0001]

## Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- Verma et al. *Science*, 1993, vol. 259, 381-384 [0004]
- Pozzoli et al. *Endocrinology*, 1994, vol. 735, 2314-2317 [0004]
- Utz et al. *Biochem Pharmacol.*, 1991, vol. 47, 195-201 [0004]
- Christodoulides et al. *Circulation*, 1995, vol. 97, 2306-9 [0004]
- Mansouri et al. *Thromb Haemost.*, 1982, vol. 48, 286-8 [0004]
- The Merck Manual of Diagnosis and Therapy [0005] [0026]
- Sunderman et al. *Clin. Chem.*, 1982, vol. 28, 2026-2032 [0034]
- Ingi et al. *Neuron*, 1996, vol. 16, 835-842 [0034]
- Morimoto et al. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2001, vol. 280, H482-H488 [0034]
- Oxford Textbook of Surgery. Oxford University Press, 1994 [0037] [0049] [0050]
- Hattler et al. *Artif. Organs*, 1994, vol. 18 (11), 806-812 [0045]
- Golob et al. *ASAIO J.*, 2001, vol. 47 (5), 432-437 [0045]
- Choi et al. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1996, vol. 15, 9-19 [0052]
- Maines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1997, vol. 37, 517-554 [0052]
- Tenhunen et al. *J. Lab. Clin. Med.*, 1970, vol. 75, 410-421 [0052]
- Keyse et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 99-103 [0052]
- Becker-Hapak et al. *Methods*, 2001, vol. 24, 247-256 [0054]
- Kim et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 1402-1411 [0062] [0071]
- Kim et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 1402-1411 [0063]
- Hellerbrand et al. *Hepatology*, 1998, vol. 27, 1285-1295 [0064]
- Chow et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 10689-10692 [0064]
- Lowenstein et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, vol. 90, 9730-9734 [0064] [0080]
- Taylor et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 15148-15156 [0066]
- Chow et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 10689-10692 [0075]
- Stenger et al. *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 183, 1501-1514 [0097]