

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 653**

51 Int. Cl.:

A61K 33/04 (2006.01)

A01N 1/00 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2006** **E 06751023 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013** **EP 1879599**

54 Título: **Procedimientos, composiciones y artículos de fabricación para mejorar la supervivencia de células, tejidos, órganos y organismos**

30 Prioridad:

20.04.2005 US 673037 P

20.04.2005 US 673295 P

31.08.2005 US 713073 P

28.10.2005 US 731549 P

26.01.2006 US 762462 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2014

73 Titular/es:

**FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH
CENTER (100.0%)**

**1100 FAIRVIEW AVENUE NORTH, C2M 027, P.O.
BOX 19024
SEATTLE, WA 98109-1024, US**

72 Inventor/es:

**ROTH, MARK B.;
MORRISON, MIKE;
MILLER, DANA y
BLACKSTONE, ERIC**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 443 653 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).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos, composiciones y artículos de fabricación para mejorar la supervivencia de células, tejidos, órganos y organismos

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0001] Esta solicitud se refiere a las solicitudes de patente provisionales de Estados Unidos 60/673.037 y 60/673.295, ambas presentadas el 20 de abril de 2005, así como a la solicitud de patente provisional 60/713.073, presentada el 31 de agosto de 2005, la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 60/731.549, presentada el 28 de octubre de 2005, y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 60/762.462, presentada el 26 de enero de 2006.

[0002] El gobierno puede poseer derecho sobre la presente invención en virtud al número de concesión GM048435 del National Institute of General Medical Sciences (NIGMS).

1. Campo de la Invención

[0003] En general, la presente invención se refiere al campo de la biología y la fisiología celular. Más particularmente, la divulgación se refiere a procedimientos, composiciones y aparatos para mejorar la supervivencia de y/o reducir el daño a células, tejidos, órganos y organismos, particularmente en condiciones adversas, incluyendo, pero sin limitación, estados hipóxicos o anóxicos, usando una o más sustancias, incluyendo aquellas que compiten con el oxígeno. En ciertas realizaciones, la presente divulgación incluye procedimientos, composiciones y aparatos para tratar, prevenir y diagnosticar enfermedades y afecciones exponiendo a un sujeto a un antagonista de oxígeno, un agente metabólico protector, u otro compuesto químico analizado en el presente documento, o un precursor del mismo, que puede conseguir su objetivo establecido (denominados colectivamente como "compuestos activos").

2. Descripción de la Técnica Relacionada

30

[0004] Estasis es término latino que significa "parálisis". En el contexto de la estasis en tejidos vivos, las formas más comunes de estasis se refieren a la conservación de los tejidos para trasplante o reimplantación. Típicamente, dichos tejidos se sumergen en un fluido fisiológico, tal como una solución salina, y se colocan en frío para reducir los procesos bioquímicos que conducen a un daño celular. Esta estasis está incompleta y no deben exponerse durante períodos prolongados. De hecho, el éxito del trasplante de órganos y la reimplantación de miembros está inversamente relacionado con el tiempo que el órgano o extremidad está fuera de contacto con el organismo intacto.

[0005] Una versión más extrema de la estasis consiste en poner un organismo entero en lo que se conoce coloquialmente como "animación suspendida". Aunque todavía se considera en gran medida en el ámbito de la ciencia ficción, se ha conseguido algo de notoriedad cuando individuos acaudalados han procurado ser criopreservados después de la muerte, con la esperanza de que futuros avances médicos permitan su reavivamiento y la curación de sus dolencias mortales. Supuestamente, más de un centenar de personas ha sido criopreservadas desde el primer intento en 1967, y más de mil personas han hecho disposiciones legales y financieras para la crónica con una de varias organizaciones, por ejemplo, Alcor Life Extension Foundation. Dichos procedimientos implican la administración de fármacos anti-isquémicos, conservación a baja temperatura y procedimientos para perfundir los organismos completos con fluidos en criosuspensión. Todavía no se ha confirmado que esta forma de estasis orgánica sea reversible.

[0006] La utilidad de inducir la estasis en materia biológica según lo contemplado por las composiciones, procedimientos o artículos de fabricación descritos en el presente documento, se caracteriza por la inducción o aparición de estasis seguido de un periodo de tiempo en el que se mantiene la estasis seguido entonces de la reversión a un estado fisiológico normal o casi normal, o un estado que un experto en la técnica reconocerá como un estado que es mejor que el estado de la materia biológica nunca haya experimentado estasis, en su conjunto o en parte. La estasis también pueden definirse como lo que no es. La estasis orgánica no es cualquiera de las siguientes fases: sueño, en coma, muerte, anestesiado o convulsión tónico-clónica.

[0007] Existen numerosos informes de personas que han sobrevivido al cese aparente del pulso y la respiración después de la exposición a condiciones hipotérmicas, normalmente en inmersión de agua fría. Aunque no se entiende completamente por los científicos, la capacidad para sobrevivir en dichas situaciones probablemente deriva

de lo que se denomina el "reflejo de inmersión mamífero". Se cree que este reflejo estimula el sistema nervioso vagal, controla los pulmones, el corazón, la laringe y el esófago, con el fin de proteger los órganos vitales. Presumiblemente, la estimulación con agua fría de los receptores del nervio en la piel provoca un desvío de sangre al cerebro y al corazón, y lejos de la piel, el tracto gastro-intestinal y las extremidades. Al mismo tiempo, una bradicardia refleja protectora, o desaceleración del latido del corazón, conserva los recursos de oxígeno menguantes dentro del cuerpo. Desafortunadamente, la expresión de este reflejo no es igual en todas las personas, y se cree que es un factor en sólo el 10-20% de los casos de inmersión en agua fría.

[0008] Las composiciones y procedimientos que no dependen totalmente o en absoluto de la hipotermia y/o el oxígeno pueden ser útiles en el contexto de la conservación de órganos, así como en cuanto a la conservación de tejidos o células. Las células y el tejido se conservan actualmente usando hipotermia, con frecuencia a temperaturas substancialmente bajo cero, tal como en nitrógeno líquido. Sin embargo, la dependencia de la temperatura puede ser problemática, ya que los aparatos y agentes para producir temperaturas tan bajas pueden no estar fácilmente disponibles cuando sea necesario o pueden requerir reemplazo. Por ejemplo, las células de cultivo de tejidos se almacenan con frecuencia durante períodos de tiempo en depósitos que mantienen el nitrógeno líquido; sin embargo, estos depósitos requieren frecuentemente que el nitrógeno líquido de la unidad se reemplace periódicamente, de otro modo, se agota y la temperatura no se mantiene. Además, se produce un daño a las células y tejidos como resultado del proceso de congelación/descongelación. Por lo tanto, son necesarias técnicas mejoradas.

[0009] Además, la falta de capacidad para controlar el metabolismo celular y fisiológico en organismos completos sometidos a traumas, tales como amputación e hipotermia, es un inconveniente clave en el campo de la medicina. Por otro lado, la evidencia anecdótica que se ha analizado anteriormente sugiere firmemente que si se entiende y se regula bien, es posible inducir estasis en células, tejidos y organismos completos. Por lo tanto, existe una gran necesidad de mejorar los procedimientos para controlar los procesos metabólicos particularmente en condiciones traumáticas.

[0010] Mok Ying-Yuan Pamela y col., (British Journal of Pharmacology 2004, vol. 143, N° 7, páginas 881-889) investigan el efecto de los inhibidores de la generación de H₂S en el choque hemorrágico en ratas midiendo la frecuencia cardíaca (FC), la presión arterial media (PAM) y la concentración de H₂S en plasma.

[0011] Geng y col., (Biochemical and Biophysical Research Communications 2004, vol. 318, páginas 756-763) describen la regulación de una lesión de miocardio (inducida por isoproterenol) por H₂S.

[0012] Chunyu y col., (Biophysical Research Communications 2003, vol. 302, páginas 810-816) describen el efecto de H₂S en la patogénesis de la hipertensión pulmonar hipóxica.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] Un primer aspecto de la invención es el uso de H₂S para la fabricación de un producto farmacéutico para el tratamiento de choque hemorrágico, en el que el producto farmacéutico se formula para administración intravenosa o administración por inhalación.

[0014] Un aspecto adicional de la invención es H₂S para su uso en el tratamiento de choque hemorrágico, en el que el H₂S se formula para administración intravenosa o administración por inhalación.

[0015] Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones para inducir la estasis en células, tejidos y órganos localizados dentro u obtenidos a partir de un organismo, así como en el propio organismo. Dichas composiciones pueden emplearse para proteger materia biológica, así como para prevenir, tratar o diagnosticar enfermedades y afecciones en el organismo. Además, dichas composiciones pueden inducir directamente estasis, o pueden actuar indirectamente sin inducir estasis, pero mejorando la capacidad de la materia biológica para entrar en estasis en respuesta a una lesión o afección de enfermedad, por ejemplo, reduciendo el tiempo o nivel de la lesión o enfermedad requerido para conseguir la estasis. Una afección de este tipo como denominarse como pre-estasis. A continuación se describen detalles de dichas aplicaciones y otros usos.

[0016] La invención se basa, en parte, en estudios con compuestos que se determinó que tenían una función protectora y, por lo tanto, sirven como agentes protectores. Además, los resultados globales de los estudios que implican diferentes compuestos indican que los compuestos con un centro donador de electrones disponible son particularmente eficaces en la inducción de estasis o pre-estasis. Además, estos compuestos inducen estasis

reversible, lo que significa que no son tan tóxicos para la materia biológica particular como para que la materia muera o se descomponga. Se contempla adicionalmente que la presente divulgación puede usarse para mejorar la supervivencia de y/o para prevenir o reducir un daño a la materia biológica, que puede someterse a o bajo condiciones adversas.

5

[0017] En realizaciones particulares, las composiciones de la presente invención se usan para inducir estasis o pre-estasis en materia biológica, por ejemplo, células, tejidos, órganos y/u organismos, después de una lesión (por ejemplo, una lesión traumática) o después de la aparición o evolución de una enfermedad, con el fin de proteger la materia biológica de un daño relacionado con la lesión o la enfermedad antes del, durante, o después del

10 tratamiento de la lesión o enfermedad. En otras realizaciones, se usan composiciones de la presente invención para inducir o promover estasis o pre-estasis en materia biológica antes del sometimiento a un evento perjudicial (por ejemplo, una cirugía electiva) o antes de la aparición o evolución de una enfermedad, con el fin de proteger la materia biológica de un daño relacionado con condiciones adversas, tales como una lesión o enfermedad. Dichos procedimientos se denominan generalmente "pretratamiento" con un compuesto activo. El pretratamiento incluye

15 procedimientos en los que la materia biológica se proporciona con un compuesto activo tanto antes como durante, y antes, durante y después de someter la materia biológica a condiciones adversas (por ejemplo, una lesión o la aparición o evolución de una enfermedad), y procedimientos en los que la materia biológica se proporciona con un compuesto activo únicamente antes de someter la materia biológica a condiciones adversas.

20 **[0018]** De acuerdo con diversas realizaciones de la presente divulgación, la estasis puede inducirse mediante el tratamiento de la materia biológica con un compuesto activo que induce la estasis directamente en ésta o, como alternativa, mediante el tratamiento de la materia biológica con un compuesto activo que no induce en ésta estasis, pero en su lugar, promueve o mejora la capacidad de o disminuye el tiempo requerido para que la materia biológica alcance la estasis en respuesta a otros estímulos, tales como, pero sin limitación, una lesión, una enfermedad,

25 hipoxia, sangrado excesivo, o un tratamiento con otro compuesto activo.

[0019] En realizaciones particulares, el tratamiento con un compuesto activo induce la "pre-estasis", que se refiere a un estado hipometabólico a través del cual la materia biológica debe marchar hasta alcanzar la estasis. La pre-estasis se caracteriza por una reducción en el metabolismo dentro del material biológico de una magnitud que es

30 menor que la definida como estasis. Con el fin de alcanzar la estasis usando un compuesto activo, la materia biológica debe marchar necesariamente a través de un estado hipometabólico gradual en el que el consumo de oxígeno y la producción de CO₂ se reducen menos de dos veces en la materia biológica. Tal continuidad, en la que el metabolismo o la respiración celular se reducen por un compuesto activo a un grado menor de dos veces, puede describirse como un estado de "pre-estasis".

35

[0020] En cuanto a que la estasis comprende una reducción de dos veces (es decir, una reducción al 50% o menor) en la producción de CO₂ o el consumo de O₂, la medición directa de estos parámetros en la materia biológica usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica en los que se detecta una reducción de menos de dos veces, es indicativa de pre-estasis. Por consiguiente, ciertas mediciones de los niveles de dióxido de carbono y

40 oxígeno en la sangre, así como otros marcadores de la tasa metabólica conocidos para los expertos en la técnica que incluye, pero sin limitación, niveles de sangre pO₂, VO₂, pCO₂, pH y lactato, pueden usarse en la presente invención para controlar la aparición o evolución de pre-estasis. Mientras que los indicadores de la actividad metabólica, por ejemplo, la producción de CO₂ a través de la respiración celular y el consumo de O₂, se reducen menos de desveces en comparación con condiciones normales, la pre-estasis puede relacionarse con una reducción de al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o el 50% en la evolución de CO₂, que se refiere a la cantidad de CO₂ liberado de los pulmones. Además, en diversas realizaciones, la pre-estasis se caracteriza por una reducción en uno o más indicadores de la actividad metabólica que es menor que o igual al 1%, 2%, 5%, 10%, 15%,

45 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 49% en comparación con condiciones fisiológicas normales. En otras realizaciones, la pre-estasis se caracteriza por su capacidad para mejorar o promover la entrada en estasis en respuesta a otro estímulo (donde los otros estímulos pueden incluir un tratamiento prolongado con el mismo agente activo), o su capacidad para mejorar la supervivencia de o proteger la materia biológica de un daño resultante de una lesión, la aparición o evolución de la enfermedad, o sangrado, particularmente un sangrado que puede conducir a un daño tisular irreversible, choque hemorrágico o letalidad.

50 **[0021]** Mientras que la presente divulgación ilustrada explícitamente en el presente documento puede referirse a inducir "estasis", se aprecia que estos procedimientos pueden adaptarse fácilmente para inducir "pre-estasis", y que dichos procedimientos de inducción de pre-estasis se contemplan por la presente divulgación. Además, también pueden usarse los mismos compuestos activos usados para inducir estasis para inducir pre-estasis, proporcionándolos a la materia biológica a una dosificación inferior y/o y durante un tiempo más corto que el usado

para inducir estasis.

[0022] En ciertas realizaciones, la presente divulgación implica exponer la materia biológica a una cantidad de un agente, para conseguir la estasis de la materia biológica. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones para inducir estasis en materia biológica *in vivo* que comprenden: a) identificar un organismo en el que se desea la estasis; y, b) exponer el organismo a una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo para inducir la estasis en la materia biológica *in vivo*. Inducir "estasis" en la materia biológica significa que la materia está viva pero se caracteriza por uno o más de los siguientes: al menos una reducción de dos veces en la velocidad o cantidad de producción de dióxido de carbono por la materia biológica; al menos una reducción de dos veces (es decir, 50%) en la velocidad o cantidad de consumo de oxígeno por la materia biológica; y al menos un descenso del 10% en el movimiento o motilidad (se aplica únicamente a células o un tejido que se mueve, tal como células espermáticas o un corazón o un miembro, o cuando se induce la estasis en todo el organismo) (denominados colectivamente como "indicadores de la respiración celular"). En ciertas realizaciones, se contempla que existe aproximadamente, al menos aproximadamente, un máximo de aproximadamente una reducción de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10000 veces o más en la velocidad de consumo de oxígeno por la materia biológica, o cualquier intervalo que pueda derivarse de la misma. Como alternativa, se contempla que las realizaciones pueden analizarse en cuanto a una reducción en la velocidad de consumo de oxígeno por la materia biológica como de aproximadamente, al menos aproximadamente, o un máximo de aproximadamente el 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o más, o cualquier intervalo que pueda derivarse de los mismos. Se contempla que puede emplearse cualquier ensayo para medir el consumo de oxígeno, y un ensayo típico implicará usar un entorno cerrado y medir la diferencia entre el oxígeno puesto en el entorno y el oxígeno que se deja en el entorno después de un periodo de tiempo. Se contempla adicionalmente que la producción de dióxido de carbono puede medirse para determinar la cantidad de consumo de oxígeno por la materia biológica. Por lo tanto, puede haber descensos en la producción de dióxido de carbono, lo que corresponderá a los descensos del consumo de oxígeno que se han analizado anteriormente.

[0023] En procedimientos de la divulgación, la estasis o pre-estasis es temporal y/o reversible, lo que significa que la materia biológica ya no muestra las características de la estasis en algún momento en el tiempo posterior. En algunas realizaciones, en lugar de un antagonista de oxígeno, se administra un compuesto que no se califica como un antagonista de oxígeno. Se contempla que pueden aplicarse procedimientos analizados con respecto a los antagonistas de oxígeno con respecto a cualquier compuesto que es un antagonista de oxígeno, un agente metabólico protector, un compuesto con la estructura de la Fórmula I, II, III o IV, cualquier otro compuesto analizado anteriormente en el presente documento, o una sal o precursor del mismo. Un compuesto que consigue cualquier procedimiento de la divulgación y se califica como un antagonista de oxígeno, agente metabólico protector, un compuesto con la estructura de la Fórmula I, II, III o IV, o una sal o precursor del mismo, se considerará un "compuesto activo". En realizaciones particulares, se desea la inducción de la estasis en cuyo caso el compuesto puede denominarse como un "compuesto activo de estasis". Se contempla que en algunas realizaciones, se consigue un procedimiento induciendo la estasis. Por ejemplo, los procedimientos terapéuticos pueden implicar la inducción de la estasis, en cuyo caso el compuesto activo es un compuesto activo de estasis. Se contempla específicamente que en las realizaciones en las que se analizan compuestos activos, la invención incluye, y puede limitarse a, antagonistas de oxígeno.

[0024] En ciertas realizaciones, la materia biológica se trata con un compuesto activo que no induce la estasis por sí mismo (al menos no al nivel y/o duración de tiempo proporcionado), sino que induce a la materia biológica a entrar en un estado de pre-estasis que tiene beneficios terapéuticos y que mejora la capacidad de la materia biológica para alcanzar la estasis en respuesta a otros estímulos, tales como, por ejemplo, una lesión, patología o tratamiento con otro compuesto activo o el mismo compuesto activo si se usa durante una mayor duración o una mayor dosificación.

[0025] La expresión "materia biológica" se refiere a cualquier material biológico vivo (material biológico mamífero en las realizaciones preferidas) que incluye células, tejidos, órganos y/u organismos, y cualquier combinación de los mismos. Se contempla que la estasis puede inducirse en una parte de un organismo (tal como en las células, en los tejidos y/o en uno o más órganos), si esa parte permanece dentro del organismo o se retira del organismo, o todo el organismo se pondrá en un estado de estasis. Además, se contempla en el contexto de las células y tejidos que las poblaciones celulares homogéneas y heterogéneas pueden ser el sujeto de las realizaciones de la invención. La expresión "materia biológica *in vivo*" se refiere a la materia biológica que está *in vivo*, es decir, aún dentro o sujeto a

un organismo. Además, la expresión "materia biológica" se entenderá como sinónimo de la expresión "material biológico". En ciertas realizaciones, se contempla que una o más células, tejidos u órganos se separan de un organismo. El término "aislado" puede usarse para describir dicha materia biológica. Se contempla que la estasis puede inducirse en una materia biológica aislada.

5

[0026] Un organismo u otra materia biológica que necesita estasis es organismo o materia biológica en el la estasis de todo o parte del organismo puede producir beneficios fisiológicos directos o indirectos. Por ejemplo, un paciente en riesgo de choque hemorrágico puede considerarse en necesidad de estasis, o un paciente que será sometido a cirugía de revascularización coronaria puede beneficiarse de proteger el corazón de una lesión por isquemia/reperfusión. Se analizan a lo largo de la solicitud otras aplicaciones. En algunos casos, un organismo u otra materia biológica se identifica o se determina que necesita estasis en base a una o más pruebas, detecciones o evaluaciones que indican una afección o enfermedad, o el riesgo de una afección o enfermedad que puede prevenirse o tratarse sometiéndose a estasis. Como alternativa, el registro del historial médico de un paciente o el familiar (entrevista del paciente) puede producir información de que un organismo u otra materia biológica necesita estasis. Como será evidente para un experto en la técnica, una aplicación de la presente invención será reducir las demandas de energía totales de un material biológico mediante la inducción de estasis.

[0027] Como alternativa, un organismo u otra materia biológica puede necesitar un compuesto activo para mejorar la capacidad de supervivencia. Por ejemplo, un paciente puede necesitar tratamiento para una lesión o enfermedad o cualquier otra aplicación analizada en el presente documento. Puede determinarse en necesidad de una mejor supervivencia o tratamiento en base a los procedimientos que se han analizado en el párrafo anterior, tales como por el registro del historial médico de un paciente o el familiar.

[0028] La expresión "antagonista de oxígeno" se refiere a una sustancia que compite con el oxígeno en la medida en que se usa por una materia biológica que requiere oxígeno para estar vivo ("materia biológica que utiliza oxígeno"). El oxígeno se usa típicamente o es necesario para diversos procesos celulares que crean la fuente principal de energía fácilmente utilizable de la materia biológica. Un antagonista de oxígeno reduce o elimina de forma eficaz la cantidad de oxígeno que está disponible para la materia biológica que utiliza oxígeno, y/o la cantidad de oxígeno que puede usarse por la materia biológica que utiliza oxígeno. En una realización, un antagonista de oxígeno puede lograr su antagonismo de oxígeno directamente. En otra realización, un antagonista de oxígeno puede lograr su antagonismo de oxígeno indirectamente.

[0029] Un antagonista directo de oxígeno compite con el oxígeno molecular para la unión a una molécula (por ejemplo, una proteína) que tiene un sitio de unión a oxígeno o la capacidad de unión a oxígeno. El antagonismo puede ser competitivo, no competitivo, o acompetitivo como se conoce en la técnica de la farmacología o la bioquímica. Los ejemplos de antagonistas directos de oxígeno incluye, pero sin limitación, monóxido de carbono (CO), que compite por la unión del oxígeno a hemoglobina y al citocromo c oxidasa.

[0030] Un antagonista indirecto de oxígeno influye en la disponibilidad o entrega de oxígeno a las células que usan oxígeno para la producción de energía (por ejemplo, en la respiración celular) en ausencia de la competición directamente por la unión del oxígeno a una molécula de unión a oxígeno. Los ejemplos de antagonistas indirectos de oxígeno incluyen, pero sin limitación, (i) dióxido de carbono, que, a través de un proceso conocido como el efecto Bohr, reduce la capacidad de la hemoglobina (u otras globinas, como mioglobina) para unirse a oxígeno en la sangre o la hemolinfa de animales que utilizan oxígeno, reduciendo así la cantidad de oxígeno que se entrega a células, tejidos y órganos que utilizan oxígeno del organismo, reduciendo así la disponibilidad de oxígeno para las células que usan oxígeno; (ii) inhibidores de anhidrasa carbónica (Supuran y col., 2003, incorporado por referencia en su totalidad) que, en virtud de la inhibición de la hidratación del dióxido de carbono en los pulmones u otros órganos respiratorios, aumenta la concentración de dióxido de carbono, reduciendo así la capacidad de la hemoglobina (u otras globinas, como mioglobina) para unirse a oxígeno en la sangre o la hemolinfa de animales que utilizan oxígeno, reduciendo así la cantidad de oxígeno que se entrega a las células, tejidos y órganos que utilizan oxígeno del organismo, reduciendo así la disponibilidad de oxígeno para células que usan oxígeno; y, (iii) moléculas que se unen al oxígeno y lo capturan de o eliminan su disponibilidad para unirse a las moléculas de unión a oxígeno, incluyendo, pero sin limitación, quelantes de oxígeno, anticuerpos y similares.

[0031] En algunas realizaciones, un antagonista de oxígeno es tanto un antagonista de oxígeno directo como indirecto. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, compuestos, fármacos, o agentes que compiten directamente por la unión de oxígeno al citocromo c oxidasa y son también capaces de unirse a e inhibir la actividad enzimática de la anhidrasa carbónica. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un antagonista de oxígeno inhibe o reduce la cantidad de respiración celular que se produce en las células, por ejemplo, mediante sitios de unión en la citocromo c oxidasa

que de lo contrario se unirían a oxígeno. La citocromo c oxidasa se une específicamente a oxígeno y después lo convierte en agua. En algunas realizaciones, dicha unión al citocromo c oxidasa es una unión preferiblemente liberable y reversible (por ejemplo, tiene una constante de disociación *in vitro*, K_d , de al menos 10^{-2} , 10^{-3} o 10^{-4} M, y tiene una constante de disociación *in vitro*, K_d , no superior a 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} o 10^{-11} M). En algunas realizaciones, un antagonista de oxígeno se evalúa midiendo la producción de ATP y/o dióxido de carbono.

[0032] La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que puede conseguir el resultado indicado. En ciertos procedimientos de la invención, una "cantidad eficaz" es, por ejemplo, una cantidad que induce estasis en la materia biológica que necesita estasis. En otros procedimientos, una "cantidad eficaz" es, por ejemplo, una cantidad que induce pre-estasis en una materia biológica que necesita estasis o que necesita una supervivencia mejorada. En realizaciones adicionales, una "cantidad eficaz" puede referirse a una cantidad que aumenta la supervivencia de un organismo o de otra materia biológica. Puede determinarse (o suponerse) en base a la comparación o la comparación previa de una materia biológica no tratada o una materia biológica tratada con una dosificación o régimen diferente que no experimenta una diferencia en la supervivencia.

[0033] Se entenderá que al inducir la estasis un tejido u órgano, una cantidad eficaz es aquella que induce estasis en el tejido u órgano como se determina por la cantidad colectiva de respiración celular del tejido u órgano. Por consiguiente, por ejemplo, si el nivel de consumo de oxígeno por un corazón (colectivamente con respecto a las células del corazón) se reduce al menos 2 veces (es decir, 50%) después de la exposición a una cantidad particular de un cierto antagonista de oxígeno u otro compuesto activo de estasis, se entenderá que era una cantidad eficaz para inducir en el corazón. De forma análoga, una cantidad eficaz de un agente que induce estasis en un organismo es aquella que se evalúa con respecto al nivel colectivo o agregado de un parámetro particular de estasis. Se entenderá también que al inducir estasis en un organismo, una cantidad eficaz es aquella que induce la estasis generalmente de todo el organismo, a menos que se dirigiera a una parte concreta del organismo. Además, se entiende que una cantidad eficaz puede ser una cantidad suficiente para inducir la estasis por sí misma, o puede ser una cantidad suficiente para inducir la estasis junto con otro agente o estímulo, por ejemplo, otro compuesto activo, una lesión o una patología.

[0034] El concepto de una cantidad eficaz de un compuesto particular está relacionado, en algunas realizaciones, a cuánto oxígeno útil está disponible para la materia biológica. En general, la estasis puede inducirse cuando hay aproximadamente 100.000 ppm o menos de oxígeno en ausencia de cualquier antagonista de oxígeno (el aire ambiental tiene aproximadamente 210.000 ppm de oxígeno). El antagonista de oxígeno sirve para alterar cuánto oxígeno está disponible de forma eficaz. En una concentración de 10 ppm de oxígeno, se induce la animación suspendida. Por lo tanto, mientras que la concentración real de oxígeno a la que la materia biológica se expone puede ser mayor, incluso mucho mayor, de 10 ppm, la estasis puede inducirse por el efecto competitivo de un antagonista de oxígeno con oxígeno para la unión a proteínas metabolizadoras de oxígeno esenciales en la materia biológica. En otras palabras, una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno reduce la concentración de oxígeno eficaz hasta un punto en el que no se puede usar el oxígeno que está presente. Esto ocurrirá cuando la cantidad de un antagonista de oxígeno reduce la concentración de oxígeno eficaz por debajo de la K_m de unión de oxígeno a proteínas metabolizadoras de oxígeno esenciales (es decir, comparable a 10 ppm de oxígeno). Por consiguiente, en algunas realizaciones, un antagonista de oxígeno reduce la concentración eficaz de oxígeno en aproximadamente, o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000-, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10000 veces o más, o cualquier intervalo que se deriva de las mismas. Como alternativa, se contempla que las realizaciones de la invención pueden analizarse en cuanto a una reducción de la concentración de oxígeno eficaz como de aproximadamente, al menos aproximadamente, o un máximo de aproximadamente el 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o más, o cualquier intervalo que se deriva de la misma. Se entiende que esta es otra manera de indicar una disminución de la respiración celular.

[0035] Además, en algunas realizaciones, la estasis puede medirse indirectamente por una caída de la temperatura corporal interna de un organismo. Se contempla que puede observarse una reducción de la temperatura corporal de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 °F o más, o cualquier intervalo que se deriva de la misma, en los procedimientos de la invención. En algunas realizaciones de la invención, puede inducirse hipotermia, tal como hipotermia moderada (una reducción de al menos 10 °F) o hipotermia severa (reducción de al menos 20 °F).

[0036] Además, la cantidad eficaz puede expresarse como una concentración con o sin una calificación sobre la duración del tiempo de exposición. En algunas realizaciones, se contempla generalmente que para inducir la estasis o alcanzar otros objetivos indicados de la invención, la materia biológica se expone a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo durante aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más años, y cualquier combinación o intervalo que se deriva de los mismos. Se contempla adicionalmente que la cantidad de tiempo puede ser indefinida, dependiendo de la razón o propósito para administrar el antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Después de eso, la materia biológica puede continuar exponiéndose a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo o, en otras realizaciones de la invención, la materia biológica ya no puede exponerse más al antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Esta última etapa puede conseguirse eliminando o eliminando de forma eficaz el antagonista de oxígeno u otro compuesto activo de la presencia de la materia biológica en la que se desea la estasis, o la materia biológica puede eliminarse de un entorno que contiene el antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Adicionalmente, la materia puede exponerse a o proporcionarse con cualquier compuesto activo continuamente (un periodo de tiempo sin un descanso en la exposición), intermitente (exposición en múltiples ocasiones), o en una base periódica (exposición en múltiples ocasiones sobre una base regular). La dosificación del compuesto activo sobre estas bases diferentes puede ser igual o puede variar. En ciertas realizaciones, se proporciona periódicamente un compuesto activo proporcionando o exponiendo una materia biológica a un compuesto activo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más años, o cualquier intervalo que de derive de los mismos.

[0037] Además, en algunas realizaciones de la invención, la materia biológica se expone a o se proporciona con un compuesto activo durante un periodo de tiempo sostenido, en el que "sostenido" se refiere a un periodo de tiempo de al menos aproximadamente 2 horas. En otras realizaciones, la materia biológica puede exponerse o proporcionarse con un compuesto activo en una base sostenida durante más de un solo día. En dichas circunstancias, la materia biológica se proporciona con un compuesto activo en una base sostenida continuamente. En ciertas realizaciones, la materia biológica puede exponerse a o proporcionarse con un compuesto activo durante aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más horas (o cualquier intervalo que pueda derivarse de las mismas) durante 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, y/o 1, 2, 3, 4, 5 semanas, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más años (o cualquier intervalo que pueda derivarse de los mismos) continuamente, de forma intermitente (exposición en múltiples ocasiones), o en una base periódica (exposición en una base regular recurrente).

[0038] En algunas realizaciones, la materia biológica puede exponerse a proporcionarse con un compuesto activo al menos antes y durante; antes, durante y después; durante y después; o únicamente después de una lesión, trauma o tratamiento particular (por ejemplo, cirugía), condición adversa u otro evento o situación relevante. Esta exposición puede o no ser sostenida.

[0039] La dosificación del compuesto activo en estas bases diferentes puede ser igual o puede variar.

[0040] Además, en ciertas realizaciones, un compuesto activo pueden proporcionarse en una base sostenida continuamente a un nivel que se considera "bajo", lo que significa un nivel que es menor que la cantidad que causa flexibilidad metabólica, tal como se observa con la caída en la TCI, la frecuencia cardíaca, o el consumo o producción de CO₂ u O₂.

[0041] En ciertas realizaciones, la materia biológica se expone o proporciona un compuesto activo, tal como un agente metabólico, en una cantidad que excede lo que se entendió anteriormente que era la máxima dosis tolerada antes de ramificaciones adversas fisiológicas, tales como apnea ("periodo de tiempo durante el cual la respiración se reduce marcadamente de tal forma que el sujeto toma el 10% o un número menor de inhalaciones"), falta de movimiento músculo-esquelético observable, distonía, y/o hiperactividad. Una cantidad de este tipo puede ser particularmente relevante para el aumento de la supervivencia en algunas realizaciones de la invención, por ejemplo, para aumentar las posibilidades de sobrevivir en condiciones adversas, tales como las que inducirán la muerte por

choque hemorrágico.

[0042] Puede inducirse un estado fisiológico por los compuestos activos de la presente invención, que mejora la supervivencia en un organismo en necesidad de una mejora de la supervivencia, y comprende un conjunto de cambios fisiológicos observables en respuesta a una dosis eficaz de un compuesto activo, dichos cambios pueden comprender uno, más o todos de hiperpnea, apnea y la pérdida concomitante o posterior del tono neuromuscular o el control voluntario del movimiento con latido continuo. También se puede observar un cambio transitorio y medible en el color de la sangre arterial. Hiperpnea se refiere a una respiración rápida y superficial. Apnea se refiere a un cese de la respiración o la reducción como se ha descrito anteriormente.

[0043] En ciertas realizaciones, el sujeto se convierte en apneico, que se caracteriza por un cese de la respiración y después una respiración apneica después de un corto periodo de tiempo. En ratas, esto ocurre después de aproximadamente 20 segundos. Por lo tanto, se contempla que un sujeto inducido a apnea puede mostrar el 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10% el número de respiraciones con posterioridad a la exposición a un compuesto activo. El sujeto puede tener una respiración ocasional, que puede considerarse una respiración apneica, después de eso. En ciertas realizaciones de la invención, la apnea continúa hasta que el sujeto ya no está expuesto al compuesto activo.

[0044] En algunas realizaciones de la invención, una cantidad eficaz puede expresarse como DL_{50} , que se refiere a la "dosis letal media", que significa la dosis que se administra que mata a la mitad de la población de animales (causa un 50% de mortalidad). Además, en realizaciones adicionales, una cantidad eficaz puede ser independiente del peso de la materia biológica ("peso independiente"). En roedores y seres humanos, por ejemplo, la DL_{50} de gas H_2S es de aproximadamente 700 ppm antes de que se produzcan efectos fisiológicos adversos. Además, en algunas realizaciones de la invención, el aumento de la capacidad de supervivencia se refiere generalmente a una vida más larga, que es realización de la invención.

[0045] La presente divulgación también se refiere a procedimientos para inducir apnea en un organismo que comprenden administrar al organismo una cantidad eficaz de un compuesto activo. En ciertas divulgaciones, el organismo tampoco muestra ningún movimiento músculo-esquelético como resultado del compuesto activo. Se contempla específicamente que el organismo puede ser un mamífero, incluyendo un ser humano. En otras realizaciones, una cantidad eficaz excede lo que se considera una concentración letal. En otras realizaciones, la concentración puede ser una cantidad letal, aunque el tiempo de exposición puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 segundos, 1, 2, 3, 4, 5 minutos o más (o cualquier intervalo que se deriva de los mismos o cualquier otro periodo de tiempo especificado en esta divulgación). En realizaciones particulares, un mamífero está expuesto a al menos aproximadamente 600 ppm de un compuesto de gas activo, tal como H_2S .

[0046] Además, en ciertos casos, existe una etapa de identificación de un animal que necesita tratamiento. En otros casos, existe una etapa de observación de la apnea en el organismo. Incluso en realizaciones adicionales, procedimientos que implican la obtención de una muestra de sangre del organismo y/o la evaluación del color de la sangre de los organismos. Se ha observado que la exposición a H_2S cambia el color de la sangre de un mamífero; va de un color rojo brillante a un color rojo vino más oscuro, y después a un color rojo ladrillo. La evaluación del color puede hacerse visualmente sin instrumentos ni máquinas, mientras que en otras realizaciones, puede usarse un instrumento, por ejemplo un espectrofotómetro. Además, puede obtenerse una muestra de sangre de un organismo y pueden hacerse otros tipos de análisis. Como alternativa, puede no ser necesaria una muestra de sangre y, en su lugar, la sangre se puede evaluar sin la muestra. Por ejemplo, puede emplearse un oxímetro de pulso modificado que radia IR o luz visible un través del dedo para controlar los cambios de color en la sangre.

[0047] En ciertas divulgaciones, la materia biológica está expuesta a una cantidad eficaz de un compuesto activo que no conduce a la estasis o pre-estasis. En algunos casos, haber o no haber ninguna evidencia de una reducción en el consumo de oxígeno o la producción de dióxido de carbono mientras que el compuesto activo está presente.

[0048] En realizaciones adicionales, un organismo puede estar expuesto al compuesto activo mientras duerme. Además, como se ha analizado anteriormente, la exposición puede ser regular, tal como diariamente (que significa una exposición al menos una vez al día).

[0049] Se contempla específicamente que en algunas realizaciones se proporciona un compuesto activo a un sujeto mediante un nebulizador. Esto puede aplicarse con cualquier realización de la invención. En ciertos casos, el nebulizador se usa para el tratamiento de choque hemorrágico. En otras realizaciones, el compuesto activo se proporciona como una única dosis para el sujeto. En casos específicos, una sola dosis o dosis múltiples es la que

inducirá apnea en un sujeto. En algunas realizaciones, se da a un sujeto al menos aproximadamente 1.000. 2.000. 3.000. 4.000. 5.000. 6.000. 7.000. 8.000. 9.000. 10.000. 11.000. 12.000 o más ppm de gas H₂S. El tiempo de exposición puede ser cualquier de los tiempos analizados en el presente documento, incluyendo aproximadamente o aproximadamente como mucho 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1 minutos o menos (o cualquier intervalo que se deriva de los mismos).

[0050] En realizaciones adicionales, después de la exposición a un compuesto activo, la tasa metabólica de la materia biológica puede cambiar. En ciertas realizaciones, la proporción CR (producción de CO₂/consumo de O₂) de la materia biológica cambia después de la exposición a un compuesto activo. Esto puede ocurrir después de una exposición inicial o una exposición repetida o después de una exposición aguda. En algunas realizaciones, la proporción CR disminuye después de la exposición. La disminución puede ser una disminución de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80% o más, o cualquier intervalo que puede derivarse de los mismos. La disminución puede ser el resultado del aumento del consumo de O₂, de la disminución de la producción de CO₂ en relación con el consumo de O₂.

[0051] En algunas realizaciones, no se observa ningún otro cambio fisiológico en la materia biológica expuesta al compuesto activo, excepto que su proporción de CR cambia después de la exposición. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, los procedimientos implican medir una proporción CR en un sujeto. Esto puede ocurrir antes de y/o después de la exposición al compuesto activo.

[0052] Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, se induce la estasis, y una etapa adicional en los procedimientos de la invención es mantener la materia biológica relevante en un estado de estasis. Esto puede realizarse continuando para exponer la materia biológica a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo y/o exponiendo la materia biológica a una temperatura no fisiológica u otro antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Como alternativa, la materia biológica puede colocarse en un agente o solución de conservación, o puede exponerse a condiciones normóxicas o hipóxicas. Se contempla que la materia biológica puede mantenerse en estasis durante aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más años, y cualquier combinación o intervalo que se deriva de los mismos. Además, se contempla que además de, o en lugar de cambiar la temperatura, pueden ponerse en práctica otros cambios en el entorno, tal como un cambio en la presión o efectuar un entorno crioprotector o de crioconservación (por ejemplo, uno que contiene glicerol).

[0053] Se apreciará que la "estasis" con respecto a un animal entero y la "estasis" con respecto a las células o los tejidos pueden requerir diferentes duraciones de tiempo en estasis. Por lo tanto, con respecto a sujetos humanos, por ejemplo, los sujetos sometidos a un tratamiento quirúrgico, tratamiento para hipertermia maligna, o víctima de trauma, se contempla generalmente un tiempo de estasis de hasta 12, 18 o 24 horas. Con respecto a sujetos animales no humanos, por ejemplo animales no humanos enviados o almacenados con fines comerciales, se contempla estasis durante un periodo de 2 ó 4 días, 2 ó 4 semanas, o más.

[0054] El término "exponer" se usa de acuerdo con su significado ordinario para indicar que la materia biológica se somete a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Esto puede conseguirse en algunas realizaciones poniendo en contacto la materia biológica con un antagonista de oxígeno o compuesto activo. En otras realizaciones, esto se logra poniendo en contacto la materia biológica con un compuesto activo, que puede o no ser un antagonista de oxígeno. En el caso de células, tejidos u órganos *in vivo*, "exponer" puede significar adicionalmente "mantener abiertos" estos materiales de manera que puedan estar en contacto con un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Esto se hace, por ejemplo, quirúrgicamente. La exposición de materia biológica a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo puede ser por incubación en o con (incluye inmersión) el antagonista, perfusión o infusión con el antagonista, inyección de la materia biológica con un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo, o aplicación de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo a la materia biológica. Además, si se desea la estasis de todo el organismo, se contempla la inhalación o ingestión del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo, o cualquier otra vía de administración farmacéutica para su uso con los antagonistas de oxígeno u otro compuesto activo. Además, el término "proporcionar" se usa de acuerdo con su significado ordinario y simple para referirse a "suministrar". Se contempla que puede proporcionarse un compuesto a la materia biológica en una forma y convertirse por reacción química en su forma como un compuesto activo. El término "proporcionar" incluye el término "exponer" en el contexto de la expresión "cantidad eficaz", de acuerdo con la presente invención.

[0055] En algunas realizaciones, una cantidad eficaz se caracteriza por ser una dosis subletal del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. En el contexto de inducir la estasis de células, tejidos u órganos (no todo el organismo), una "dosis subletal" se refiere a una administración única del antagonista de oxígeno o el compuesto activo que es menos de la mitad de la cantidad del antagonista de oxígeno o compuesto activo que causará al menos que la mayoría de las células de una materia biológica muera dentro de las 24 horas de la administración. Si se desea la estasis de todo el organismo, entonces una "dosis subletal" se refiere a una única administración del antagonista de oxígeno o compuesto activo que es menos de la mitad de la cantidad del antagonista de oxígeno que causaría la muerte del organismo dentro de las 24 horas de la administración. En otras realizaciones, una cantidad eficaz se caracteriza por ser una dosis casi letal del antagonista de oxígeno o compuesto activo. De forma análoga, en el contexto de inducción de la estasis de células, tejidos u órganos (no todo el organismo), una "dosis casi letal" se refiere a una única administración del antagonista de oxígeno o compuesto activo que se encuentra dentro del 25% de la cantidad del inhibidor que causaría al menos la muerte de una mayoría de células dentro de las 24 horas de la administración. Si se desea la estasis de todo el organismo, entonces una "dosis casi letal" se refiere a una única administración del antagonista de oxígeno o compuesto activo que se encuentra dentro del 25% de la cantidad del inhibidor que causaría la muerte del organismo dentro de las 24 horas de la administración. En algunas realizaciones se administra una dosis subletal administrando una cantidad predeterminada del antagonista de oxígeno o compuesto activo al material biológico. Se contempla específicamente que esto puede implementarse con respecto a cualquier compuesto activo.

[0056] Además, se contempla que en algunas realizaciones una cantidad eficaz se caracteriza como una dosis supraletal del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. En el contexto de la inducción de la estasis de células, tejidos u órganos (no todo el organismo), una "dosis supraletal" se refiere a una sola administración de un compuesto activo que es al menos 1,5 veces (1,5 x) la cantidad del compuesto activo que causaría al menos la muerte de una mayoría de células en una materia biológica dentro de las 24 horas de la administración. Si se desea una estasis de todo el organismo, entonces una "dosis supraletal" se refiere a una sola administración del compuesto activo que es de al menos 1,5 veces la cantidad del compuesto activo que causaría la muerte del organismo dentro de las 24 horas de la administración. Se contempla específicamente que la dosis supraletal puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10.000 veces o más, o cualquier intervalo que puede derivarse de los mismos, la cantidad del compuesto activo que causaría la muerte de al menos una mayoría de las células en una materia biológica (o todo el organismo) dentro de las 24 horas de la administración.

[0057] La cantidad del compuesto activo que se proporciona a la materia biológica puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 mg, mg/kg, o mg/m², o cualquier intervalo que puede derivarse de las mismas. Como alternativa, la cantidad puede expresarse como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 mM o M, o cualquier intervalo que puede derivarse de las mismas.

[0058] En algunas realizaciones una cantidad eficaz se administra controlando, sola o en combinación, la cantidad de antagonista de oxígeno u otro compuesto activo administrado, controlando la duración de administración del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo, controlando una respuesta fisiológica (por ejemplo, pulso, respiración, respuesta al dolor, movimiento o motilidad, parámetros metabólicos, tales como la producción de energía celular o estado redox, etc.) del material biológico a la administración del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo y reduciendo, interrumpiendo o cesando la administración del compuesto o compuestos cuando se

mide un mínimo o máximo determinado para un cambio en esa respuesta, etc. Además, estas etapas pueden emplearse adicionalmente en cualquier procedimiento de la divulgación.

[0059] Puede usarse tejido en un estado de estasis o que se ha sometido a estasis en una serie de aplicaciones.

- 5 Pueden usarse, por ejemplo, para transfusión o trasplante (aplicaciones terapéuticas, incluyendo los trasplantes de órganos); con fines de investigación; para ensayos de detección para identificar, caracterizar o fabricar otros compuestos que inducen la estasis; para ensayar una muestra a partir de la cual se obtuvo el tejido (aplicaciones de diagnóstico); para conservar o para prevenir daños en el tejido que se colocarán de vuelta al organismo a partir del cual se obtuvieron (aplicaciones preventivas); y para conservar o para prevenir daños durante el transporte o
- 10 almacenamiento. A continuación se describen detalles de dichas aplicaciones y otros usos. La expresión "tejido aislado" significa que el tejido no se encuentra dentro de un organismo. En algunas realizaciones, el tejido es todo o parte de un órgano. Los términos "tejido" y "órgano" se usan de acuerdo con sus significados ordinarios y simples. Aunque el tejido se compone de células, se entenderá que el "tejido" se refiere a un agregado de células similares que forman un tipo definido de material estructural. Además, un órgano es un tipo particular de tejido.

15

[0060] La presente divulgación se refiere procedimientos para inducir la estasis en un tejido aislado que comprende: a) identificar el tejido en el que se desea la estasis; y, b) exponer el tejido a una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno para inducir la estasis.

- 20 **[0061]** Pueden usarse las composiciones, procedimientos y artículos de fabricación desvelados en el presente documento sobre la materia biológica que se transferirá de nuevo al organismo donante a partir del cual se obtuvo (autólogo) o un sujeto receptor diferente (heterólogo). En algunos casos, la materia biológica se obtiene directamente de un organismo donante. En otros, la materia biológica se coloca en el cultivo antes de la exposición a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. En algunas situaciones, la materia biológica se obtiene de un
- 25 organismo donante administrado por oxigenación de la membrana extracorpórea antes de la recuperación de la materia biológica, que es una técnica implementada para facilitar la conservación de la materia biológica. Además, los procedimientos incluyen la administración o implantación de la materia biológica en la que se indujo la estasis a un organismo receptor vivo.

- 30 **[0062]** También se divulga cuando un órgano o tejido que se va a recuperar y después a trasplantar se expone al antagonista de oxígeno u otro compuesto activo aún en el sujeto donante. Se contempla que en algunos casos, la vasculatura del donante se usa para exponer el órgano o tejido al antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Esto puede hacerse si el corazón aún está bombeando, o puede usarse una bomba, catéter o jeringa para administrar el antagonista de oxígeno u otro compuesto activo en la vasculatura para la entrega al órgano o tejido.

35

[0063] Los procedimientos proporcionados en el presente documento también se refieren a la inducción de estasis en tejido aislado que comprenden incubar el tejido con un antagonista de oxígeno o compuesto activo de estasis que crea condiciones hipóxicas para una cantidad eficaz de tiempo para que el tejido entre en estasis.

- 40 **[0064]** Pueden usarse células en un estado de estasis o que se han sometido a estasis en varias aplicaciones. Pueden usarse, por ejemplo, para transfusión o trasplante (aplicaciones terapéuticas); para fines de investigación; para ensayos de detección para identificar, caracterizar o fabricar otros compuestos que inducen la estasis; para ensayar una muestra a partir de la cual se obtuvieron las células (aplicaciones de diagnóstico); para conservar o para prevenir daños en las células que se colocarán de nuevo en el organismo a partir del cual se obtuvieron
- 45 (aplicaciones preventivas); y para conservar o para prevenir daños en las células durante el transporte o almacenamiento. A continuación se describen los detalles de dichas aplicaciones y otros usos.

- [0065]** La presente divulgación se refiere procedimientos para inducir la estasis en una o más células separadas de un organismo que comprenden: a) identificar la célula o células en las que se desea la estasis; y, b) exponer la
- 50 célula o células a una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo de estasis para inducir la estasis.

- [0066]** Se contempla que la célula puede ser cualquier célula que utiliza oxígeno. La célula puede ser eucariota o procariota. En ciertas realizaciones, la célula es eucariota. Más particularmente, en algunas realizaciones, la célula
- 55 es una célula de mamífero. Las células de mamífero contempladas para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, aquellas que son de: ser humano, mono, ratón, rata, conejo, hámster, cabra, cerdo, perro, gato, hurón, vaca, oveja y caballo.

[0067] Además, las células pueden ser diploides pero en algunos casos, las células son haploides (células

sexuales). Además, las células pueden ser poliploides, aneuploides o anucleadas. La célula puede ser de un tejido u órgano determinado, tal como uno del grupo consiste en: corazón, pulmón, riñón, hígado, médula ósea, páncreas, piel, hueso, vena, arteria, córnea, sangre, intestino delgado, intestino grueso, cerebro, médula espinal, músculo liso, músculo esquelético, ovario, testículo, útero y cordón umbilical. Además, la célula también puede estar caracterizada

5

como uno de los siguientes tipos celulares: plaqueta, mielocito, eritrocito, linfocito, adipocito, fibroblasto, célula epitelial, célula endotelial, célula de músculo liso, célula músculo esquelética, célula endocrina, célula glial, neurona, célula secretora, célula con función de barrera, célula contráctil, célula de absorción, célula mucosal, célula limbar (córnea), células madre (totipotentes, pluripotentes o multipotentes), ovocitos no fertilizados o fertilizados, o espermatozoides.

10

[0068] La presente divulgación también proporciona procedimientos, composiciones y aparatos para mejorar la supervivencia de y/o reducir los daños a la materia biológica en condiciones adversas reduciendo la demanda metabólica, los requisitos de oxígeno, la temperatura, o cualquier combinación de los mismos en la materia biológica de interés. En algunos casos, la supervivencia de la materia biológica se mejora proporcionándole una cantidad

15

eficaz de un agente metabólico protector. El agente mejora la supervivencia impidiendo o reduciendo el daño a la materia biológica, evitando que toda o parte de la materia muera o envejezca, y/o prolongando la esperanza de vida de la totalidad o parte de la materia biológica, con respecto a la materia biológica no expuesta al agente. Como alternativa, el agente prolonga la supervivencia del tejido y/o un organismo que de lo contrario no sobreviviría sin el agente.

20

[0069] Se contempla que un "agente metabólico protector" es una sustancia o compuesto capaz de alterar de forma reversible el metabolismo de la materia biológica que se expone a o entra en contacto con éste y promueve o mejora la supervivencia de la materia biológica.

25

[0070] En ciertos casos, el agente metabólico protector induce la estasis en la materia biológica tratada; mientras que, en otros casos, el agente metabólico protector no induce por sí mismos directamente la estasis en la materia biológica tratada. Los agentes metabólicos protectores y otros compuestos activos, pueden mejorar la supervivencia y/o reducir el daño a la materia biológica sin inducir estasis en la materia biológica *per se*, sino reduciendo la respiración celular y la actividad metabólica correspondiente a un grado que es menor de aproximadamente una

30

disminución del cincuenta por ciento del consumo de oxígeno o la producción de dióxido de carbono. Adicionalmente, dichos compuestos pueden hacer que la materia biológica entre más rápida, fácil o eficazmente en o conseguir la estasis en respuesta a una lesión o patología, por ejemplo, induciendo a la materia biológica para lograr un estado de pre-estasis.

35

[0071] La supervivencia incluye la supervivencia cuando la materia está en condiciones adversas, es decir, condiciones en las que puede haber un daño o lesión adversa y no reversible a la materia biológica. Las condiciones adversas pueden incluir, pero sin limitación, cuando las concentraciones de oxígeno son reducidas en el entorno (hipoxia o anoxia, tal como a grandes altitudes o bajo el agua); cuando la materia biológica es incapaz de recibir ese oxígeno (tal como durante la isquemia), que puede ser causada por i) reducción del flujo sanguíneo a los órganos

40

(por ejemplo, corazón, cerebro y/o riñones) como resultado de la obstrucción de los vasos sanguíneos (por ejemplo, infarto de miocardio y/o ictus), ii) derivación sanguínea extracorpórea, como ocurre durante una cirugía de derivación de corazón/pulmón (por ejemplo, "síndrome *pumphead*" en el que el tejido del corazón o del cerebro se daña como resultado de una derivación cardio-pulmonar), o iii) como resultado de la pérdida de sangre debido a un traumatismo (por ejemplo, choque hemorrágico o cirugía); hipotermia, donde la materia biológica está sometida a temperaturas

45

sub-fisiológicas, debido a la exposición a un entorno frío o un estado de baja temperatura del material biológico, de tal forma que es incapaz de mantener la oxigenación adecuada de los materiales biológicos; hipertermia, temperaturas donde la materia biológica está sometida a temperatura supra-fisiológicas, debido a la exposición a un entorno cálido o un estado de alta temperatura del material biológico, tal como por una fiebre maligna; condiciones de exceso de metales pesados, tales como trastornos del hierro (genéticos, así como ambientales), tal como

50

hemocromatosis, sobrecarga de hierro adquirida, anemia drepanocítica, siderosis africana por hemocromatosis juvenil, talasemia, porfiria cutánea tardía, anemia sideroblástica, anemia por deficiencia de hierro y anemia de enfermedad crónica. Se contempla que un agente metabólico protector es un antagonista de oxígeno en ciertas realizaciones. También se contempla que en algunos otros casos, un antagonista de oxígeno no es un agente metabólico protector. En otros casos, puede usarse uno o más compuestos para aumentar o mejorar la capacidad

55

de supervivencia de la materia biológica, inhibir de forma reversible el metabolismo y/o la actividad de la materia biológica; reducir el requisito de oxígeno de la materia biológica, reducir o prevenir daños en la materia biológica en condiciones adversas; prevenir o reducir el daño o lesión a la materia biológica; prevenir el envejecimiento o senescencia de la materia biológica; y, proporcionar un beneficio terapéutico como se describe a lo largo de toda la solicitud con respecto a los antagonistas de oxígeno. Se contempla que las divulgaciones relativas a la inducción de

estasis pueden aplicarse también a estas otras divulgaciones. Por lo tanto, cualquier divulgación analizada con respecto a la estasis puede implementarse con respecto a estas otras divulgaciones.

[0072] Un compuesto activo usado para inducir la estasis o cualquiera de estas otras realizaciones, puede conducir o proporcionar sus efectos deseados, en algunas realizaciones, sólo cuando están en el contexto de la materia biológica (es decir, no tienen ningún efecto duradero) y/o pueden proporcionar estos efectos durante más de 24 horas después de que la materia biológica no esté expuesta a éste. Además, este también puede ser el caso cuando se usa una combinación de compuestos activos.

[0073] En ciertas realizaciones, la materia biológica se expone a una cantidad de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo que reduce la velocidad o cantidad de producción de dióxido de carbono en la materia biológica al menos 2 veces, pero también en aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200, 300, 400, 500 veces o más, o cualquier intervalo que puede derivarse de las mismas. Como alternativa, se contempla que las realizaciones pueden analizarse en cuanto a una reducción de la velocidad o cantidad de producción de dióxido de carbono por la materia biológica como de aproximadamente, al menos aproximadamente, o un máximo de aproximadamente el 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o más, o cualquier intervalo que puede derivarse de los mismos. Aún en realizaciones adicionales, la materia biológica está expuesta a una cantidad de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo que reduce la velocidad o cantidad de consumo de oxígeno por la materia biológica, al menos 2 veces, pero también en aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 200, 300, 400, 500 veces o más, o cualquier intervalo que puede derivarse de las mismas. Como alternativa, se contempla que las realizaciones pueden analizarse en cuanto a una reducción en la velocidad o cantidad de consumo de oxígeno por la materia biológica como de aproximadamente, al menos aproximadamente, o un máximo de aproximadamente el 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o más, o cualquier intervalo que puede derivarse de los mismos. Aún en realizaciones adicionales, la materia biológica está expuesta a una cantidad de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo que disminuye el movimiento o motilidad en al menos el 10%, pero también en aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente el 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 ó el 100%, o cualquier intervalo que puede derivarse de los mismos. Como con otras realizaciones, estas características y parámetros están en el contexto de cualquier materia biológica se induce a un estado de estasis. Por lo tanto, si la estasis se induce en el corazón de un organismo, estos parámetros se evaluarán para el corazón, y no el organismo en su totalidad. En el contexto de los organismos, una reducción del consumo de oxígeno en el orden de aproximadamente 8 veces es un tipo de estasis denominado como "hibernación". Además, se entenderá en esta solicitud que una reducción del consumo de oxígeno del orden de unas 1000 veces se puede considerar "animación suspendida". Se entenderá que las realizaciones de la invención que se refieren a la estasis pueden lograrse a un nivel de hibernación o animación suspendida, cuando sea apropiado. Se entiende que una "reducción de x veces" está en relación con la cantidad reducida; por ejemplo, si un animal no hibernante consume 800 unidades de oxígeno, el animal hibernante consume 100 unidades de oxígeno.

[0074] Adicionalmente, se proporcionan procedimientos para reducir la respiración celular, puede o no ser tan alta como sea necesario para alcanzar la estasis. Se proporciona una reducción en el consumo de oxígeno de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente el 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o el 100% en los procedimientos de la invención. También puede expresarse y evaluarse en cuanto a cualquier indicador de respiración celular.

[0075] Se contempla que la materia biológica puede exponerse a uno o más antagonistas de oxígeno u otros compuestos activos más de una vez. Se contempla que la materia biológica puede exponerse a uno o más compuestos activos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces, lo que significa que cuando una materia biológica se expone múltiples veces, hay periodos de pausa (con respecto a la exposición al compuesto activo) entre los mismos.

[0076] También se contempla que un compuesto activo puede administrarse antes, durante, después, o cualquier combinación de los mismos, en relación con la aparición o evolución de un traumatismo dañino o afección. En ciertas realizaciones, el pretratamiento de la materia biológica con un compuesto activo es suficiente para mejorar la supervivencia y/o reducir el daño de un traumatismo o afección perjudicial. El pretratamiento se define como la exposición de la materia biológica al compuesto activo antes de la aparición o la detección de la enfermedad o traumatismo perjudicial. El pretratamiento puede estar seguido de la terminación de la exposición en o cerca del inicio del traumatismo o la exposición continuada después de la aparición del traumatismo.

- [0077]** En ciertas realizaciones, se usan procedimientos que incluyen una pre-exposición a un compuesto activo (es decir, pretratamiento) para tratar afecciones en las que una enfermedad o traumatismo perjudicial es 1) programado o elegido por adelantado, o 2) se predice por adelantado para que se produzca de forma probable. Los ejemplos que cumplen la condición 1 incluyen, pero sin limitación, cirugía mayor donde la pérdida de sangre puede producirse espontáneamente o como consecuencia de un procedimiento, derivación cardiopulmonar, en la que la oxigenación de la sangre puede estar comprometida o en la que la entrega vascular de sangre puede reducirse (como en el ajuste de la cirugía de revascularización coronaria (CRC)), o en el tratamiento de los donantes de órganos antes de la extracción de órganos de los donantes para su transporte y trasplante en un receptor que necesita un trasplante de órganos. Los ejemplos que cumplen la condición 2 incluyen, pero sin limitación, afecciones medicas en las que un riesgo de lesión o avance de la enfermedad es inherente (por ejemplo, en el contexto de una angina inestable, tras una angioplastia, aneurismas sangrantes, ictus hemorrágicos, tras trauma mayor o pérdida de sangre), o en las que el riesgo puede diagnosticarse usando una prueba de diagnóstico médica.
- [0078]** La exposición al compuesto activo puede mejorar la supervivencia o reducir el daño cuando la exposición se produce después de la aparición o la detección de la enfermedad o traumatismo perjudicial para lograr un efecto terapéutico. La exposición al compuesto activo puede ser breve o prolongada. La duración de la exposición puede ser solamente durante tanto como sea necesario para alcanzar un indicador de actividad de estasis o pre-estasis (por ejemplo, niveles de sangre pCO_2 , pO_2 , pH, lactato o sulfahemoglobina, o temperatura corporal o), o puede ser más larga. En ciertas realizaciones, la exposición se produce después de una lesión traumática (incluyendo lesiones iatrogénica y/o no iatrogénicas) a un organismo y se usa para inducir la estasis o pre-estasis en todo el organismo o tejido lesionado en el mismo, con el fin de evitar o minimizar daños, por ejemplo, lesión por isquemia y reperfusión antes de, durante, y/o después del tratamiento.
- [0079]** En una realización, la presente invención incluye un procedimiento para proteger a un mamífero de padecer daño celular de una cirugía, que comprende proporcionar al mamífero una cantidad de ácido sulfhídrico u otro compuesto activo suficiente para inducir al mamífero a entrar en pre-estasis antes de la cirugía. La cirugía puede ser una cirugía electiva, planeada o de emergencia, tal como, por ejemplo, una cirugía cardio-pulmonar. El ácido sulfhídrico puede administrarse por cualquier medio disponible en la técnica, incluyendo, por ejemplo, por vía intravenosa o por inhalación.
- [0080]** En otra realización, la presente invención incluye un procedimiento para proteger a un mamífero de padecer un daño celular de una enfermedad o afección médica adversa, que comprende proporcionar al mamífero una cantidad de ácido sulfhídrico u otro compuesto activo suficiente para inducir al mamífero a entrar en pre-estasis antes de la aparición o evolución de la enfermedad o afección médica adversa. Esta realización puede usarse en el contexto de una diversidad de diferentes enfermedades y afecciones médicas adversas, incluyendo, por ejemplo, angina inestable, después de una angioplastia, aneurisma, apoplejía hemorrágica o choque, trauma y pérdida de sangre.
- [0081]** En realizaciones específicas, la invención se refiere procedimientos para impedir que un organismo, tal como un mamífero, muera desangrado o sufra un daño tisular irreversible debido a una hemorragia proporcionando al mamífero una cantidad de ácido sulfhídrico u otro compuesto activo suficiente para impedir que el animal muera desangrado. En ciertas realizaciones adicionales, el organismo puede entrar choque hemorrágico pero no muere de una hemorragia excesiva. Los términos "sagrado" y "hemorragia" se usan indistintamente para referirse a cualquier descarga de sangre de un vaso sanguíneo. Incluye, pero sin limitación, hemorragias internas y externas, sangrando de una lesión (que puede ser de una fuente interna, o de una fuente física externa, tal como a causa de un disparo, puñalada, trauma físico, etc.).
- [0082]** Además, las realizaciones adicionales de la invención se refieren a la prevención de muerte o daño tisular irreversible debido a la pérdida de sangre u otra falta de oxigenación de las células o tejidos, tales como por la falta de un suministro adecuado de sangre. Esto puede ser el resultado, por ejemplo, de una pérdida de sangre real, o puede darse a partir de afecciones o enfermedades que impiden que las células o tejidos se perfundan (por ejemplo, lesión por reperfusión), que causa la obstrucción de la sangre a las células o tejidos, que reducen la presión arterial local o global en un organismo, que reducen la cantidad de oxígeno que se lleva en la sangre, o que reduce el número de células portadoras de oxígeno en la sangre. Las afecciones y enfermedades que pueden estar implicadas incluye, pero sin limitación, coágulos de sangre y embolias, quistes, nódulos, tumores, anemia (incluyendo anemia drepanocítica), hemofilia, otras enfermedades de coagulación de la sangre (por ejemplo, von Willebrand, ITP) y aterosclerosis. Dichas afecciones y enfermedades también incluyen aquellas que crean afecciones básicamente hipóxicas o anóxicas para las células o tejidos en un organismo debido a una lesión,

enfermedad o afección.

[0083] En algunos casos, se administra una dosis subletal colectiva o una dosis no letal colectiva a la materia biológica. Como se ha analizado anteriormente, con respecto a la inducción de estasis en materia biológica que no es un organismo entero, una "dosis subletal colectiva" se refiere a una cantidad de múltiples administraciones del compuesto activo que colectivamente es menos de la mitad de la cantidad del compuesto activo que causaría la muerte de al menos una mayoría de células dentro de las 24 horas de una de las administraciones. En otras realizaciones, una cantidad eficaz se caracteriza por ser una dosis casi letal del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. De forma análoga, una "dosis casi letal colectiva" se refiere a una cantidad de varias administraciones del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo que se encuentra dentro del 25% de la cantidad del compuesto activo que causaría la muerte de al menos una mayoría de células dentro de las 24 horas de una de las administraciones. Además, una "dosis supraletal colectiva" se refiere a una cantidad de múltiples administraciones del compuesto activo que es de al menos 1,5 veces la cantidad del compuesto activo que causaría la muerte de al menos una mayoría de células (o el organismo entero) dentro de las 24 horas de una de las administraciones. Se contempla que se pueden administrar dosis múltiples con el fin de inducir estasis en todo el organismo. La definición para "dosis subletal colectiva", "dosis casi letal colectiva" y "dosis supraletal colectiva" se puede extrapolar en base a las dosis individuales que se han analizado anteriormente para la estasis en organismos enteros.

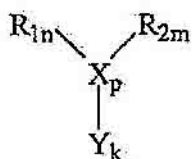
[0084] La materia biológica puede estar expuesta a o en contacto con más de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. La materia biológica puede estar expuesta a al menos un compuesto activo, incluyendo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más antagonistas de oxígeno u otro compuesto activo, o cualquier intervalo derivable de los mismos. Con múltiples compuestos activos, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad colectiva de compuestos activos. Por ejemplo, la materia biológica puede estar expuesta a un primer compuesto activo y después expuesta a un segundo compuesto activo. Como alternativa, la materia biológica puede exponerse a más de un compuesto activo a la vez o de una manera superpuesta. Además, se contempla que puede comprenderse o mezclarse más de un compuesto activos, tal como en una única composición a la que se expone la materia biológica. Por lo tanto, se contempla que, en algunas realizaciones, se emplea una combinación de compuestos activos en las composiciones, procedimientos y artículos de fabricación de la invención.

[0085] La materia biológica puede proporcionarse con o exponerse a un compuesto activo a través de la inhalación, inyección, cateterización, inmersión, lavado, perfusión, aplicación tópica, absorción, adsorción o administración oral. Además, la materia biológica puede proporcionarse con o exponerse a un compuesto activo mediante administración a la materia biológica por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleuraleal, intratraqueal, intranasal, intratecal, intravítrea, vaginal, rectal, tópica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, intraocular, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosal, intrapericardial, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación, por inyección, por infusión, por infusión continua, por perfusión localizada, mediante un catéter, o mediante un lavado.

[0086] Los procedimientos y aparatos desvelados en el presente documento implican un agente protector que en algunas realizaciones es un antagonista de oxígeno. Aún en otras realizaciones, el antagonista de oxígeno es un agente reductor. Además, el antagonista de oxígeno puede caracterizarse como un compuesto de calcogenuro. Se entenderá que los compuestos activos también pueden ser agentes protectores. Además, cualquier compuesto de calcogenuro puede considerarse un compuesto activo siempre y cuando se logre un objetivo de la invención, independientemente de si se trata de un antagonista de oxígeno.

[0087] En ciertos casos, el compuesto de calcogenuro comprende azufre, mientras que en otros, comprende selenio, telurio o polonio. En ciertos casos, un compuesto de calcogenuro contiene uno o más grupos sulfuro expuestos. Se contempla que este compuesto de calcogenuro contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más grupos sulfuro expuestos, o cualquier intervalo que pueda derivarse del mismo. En casos particulares, un compuesto que contiene sulfuro de este tipo es CS₂ (disulfuro de carbono).

[0088] Además, en algunos procedimientos, la estasis se induce en la célula o células exponiendo la célula o células a un agente reductor que tiene una estructura química de (denominada como Fórmula I):



(I)

en la que X es N, O, Po, S, Se o Te;

5 en la que Y es N u O;

en la que R₁ es H, C, alquilo inferior, un alcohol inferior o CN;

en la que R₂ es H, C, alquilo inferior, o un alcohol inferior o CN;

10 en la que n es 0 ó 1;

en la que m es 0 ó 1;

15 en la que k es 0, 1, 2, 3 ó 4; y,

en la que p es 1 ó 2.

Las expresiones "alquilo inferior" y "alcohol inferior" se usan de acuerdo con sus significados habituales y los
 20 símbolos son los usados para referirse a los elementos químicos. Esta estructura química se denominará como la
 "estructura del agente reductor" y cualquier compuesto que tenga esta estructura se denominará como un
 "compuesto con estructura de agente reductor". En realizaciones adicionales, k es 0 en la estructura de agente
 reductor. Además, en otras realizaciones, los grupos R₁ y/o R₂ pueden ser una amina o amino de alquilo inferior. En
 otras, R₁ y/o R₂ pueden ser un alcohol de cadena corta o una cetona de cadena corta. Además, R₁ y R₂ pueden ser
 25 un puente de cadena lineal o ramificada y/o el compuesto puede ser un compuesto cíclico. Aún en realizaciones
 adicionales, X también puede ser un halógeno. El término "inferior" pretende referirse a 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 átomos de
 carbono, o cualquier intervalo que pueda derivarse de los mismos. Además, R₁ y/o R₂ pueden ser otros grupos
 orgánicos pequeños, incluyendo, ésteres C₂-C₅, amidas, aldehídos, cetonas, ácido carboxílicos, éteres, nitrilos,
 anhídridos, haluros, haluros de acilo, sulfuros, sulfonas, ácidos sulfónicos, sulfóxidos y/o tioles. Dichas sustituciones
 30 se contemplan claramente con respecto a R₁ y/o R₂. En ciertas realizaciones diferentes, R₁ y/o R₂ pueden ser
 versiones de cadena corta de los grupos orgánicos pequeños que se han analizado anteriormente. "Cadena corta"
 se refiere a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 moléculas de carbono, o cualquier intervalo que puede derivarse de la
 misma.

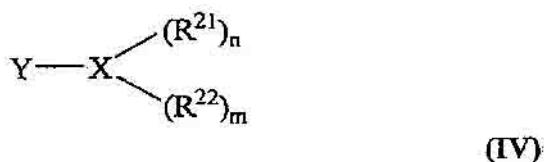
35 **[0089]** Se contempla que el compuesto con estructura de agente reductor puede ser un compuesto de
 calcogenuro en algunos casos. En ciertas realizaciones, el compuesto de calcogenuro tiene una cadena alquilo con
 un calcogenuro expuesto. En otros, el compuesto de calcogenuro tiene un calcogenuro que se expone una vez se
 recoge por la materia biológica. A este respecto, el compuesto de calcogenuro es similar a un profármaco en forma
 de un antagonista de oxígeno. Por lo tanto, una o más moléculas de azufre, selenio, oxígeno, telurio, polonio o
 40 ununhexio en el compuesto se vuelven disponibles después de la exposición de la materia biológica al compuesto
 de calcogenuro. En este contexto, "disponible" significa que el azufre, selenio, oxígeno, telurio, polonio o ununhexio
 retendrán una carga negativa.

[0090] En ciertas realizaciones, el calcogenuro es una sal, preferiblemente sales en las que el calcógeno está en
 45 un estado de oxidación -2. Las sales sulfuro incluidas por las realizaciones de la invención incluyen, pero sin
 limitación, sulfuro sódico (Na₂S), ácido sulfhídrico sódico (NaHS), sulfuro potásico (K₂S), ácido sulfhídrico potásico
 (KHS), sulfuro de litio (Li₂S), sulfuro de rubidio (Rb₂S), sulfuro de cesio (Cs₂S), sulfuro de amonio ((NH₄)₂S), ácido
 sulfhídrico de amonio (NH₄)HS, sulfuro de berilio (BeS), sulfuro de magnesio (MgS), sulfuro de calcio (CaS), sulfuro
 de estroncio (SrS), sulfuro de bario (BaS), y similares. De forma similar, las realizaciones de la presente invención
 50 incluyen, pero sin limitación, sales selenuro y telurio correspondientes. Se contempla específicamente que la
 invención incluye composiciones que contienen un sal calcogenuro (compuesto de calcogenuro que es una sal) con

un vehículo farmacéuticamente aceptable o preparado en forma de una formulación farmacéuticamente aceptable. Aún en realizaciones adicionales, el compuesto con estructura de agente reductor se selecciona entre el grupo que consiste en H_2S , H_2Se , H_2Te y H_2Po . En algunos casos, la estructura de agente reductor de Fórmula (I) tiene una X que es un S. En otros, X es Se, o X es Te, o X es Po, o X es O. Adicionalmente, k en la estructura de agente reductor es 0 ó 1 en algunas realizaciones. En ciertas realizaciones, el compuesto con estructura de agente reductor es dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilsulfuro (DMS), monóxido de carbono, metilmercaptano (CH_3SH), mercaptoetanol, tiocianato, cianuro ácido, metanotiol ($MeSH$) o CS_2 . En realizaciones particulares, el antagonista de oxígeno es H_2S , H_2Se , CS_2 , $MeSH$ o DMS. Se contemplan particularmente compuestos en el orden del tamaño de estas moléculas (es decir, dentro del 50% del promedio de sus pesos moleculares).

[0091] En ciertos casos, se emplea un compuesto que contiene selenio, tal como H_2Se . La cantidad de H_2Se puede estar en el intervalo de 1 a 1000 partes por billón en algunas realizaciones de la invención. Se contempla adicionalmente que cualquier realización analizada en el contexto de un compuesto que contiene azufre puede implementarse con un compuesto que contiene selenio. Esto incluye la sustitución de uno o más átomos de azufre en una molécula que contiene azufre con un átomo de selenio correspondiente.

[0092] Una divulgación adicional en el presente documento incluye compuestos representados por la Fórmula IV:



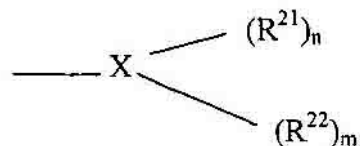
en la que:

X es N, O, P, Po, S, Se, Te, O-O, Po-Po, S-S, Se-Se o Te-Te;

n y m son independientemente 0 ó 1; y

en la que R^{21} y R^{22} son independientemente hidrógeno, halo, ciano, fosfato, tio, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, aminoalquilo, cianoalquilo, hidroxialquilo, haloalquilo, hidroxihaloalquilo, ácido alquilsulfónico, ácido tiosulfónico, ácido alquiltiosulfónico, tioalquilo, alquiltio, alquiltioalquilo, alquilarilo, carbonilo, alquilcarbonilo, haloalquilcarbonilo, alquiltiocarbonilo, aminocarbonilo, aminotiocarbonilo, alquilaminotiocarbonilo, haloalquilcarbonilo, alcoxycarbonilo, aminoalquiltio, hidroxialquiltio, cicloalquilo, cicloalquenilo, arilo, ariloxi, heteroariloxi, heterociclilo, heterocicliloxi, ácido sulfónico, éster alquil sulfónico, tiosulfato o sulfonamido; e

Y es ciano, isociano, amino, alquil amino, aminocarbonilo, aminocarbonil alquilo, alquilcarbonilamino, amidino, guanidina, hidrazino, hidrazida, hidroxilo, alcoxi, ariloxi, hetroariloxi, cicloalquiloxi, carboniloxi, alquilcarboniloxi, haloalquilcarboniloxi, arilcarboniloxi, carbonilperoxi, alquilcarbonilperoxi, arilcarbonilperoxi, fosfato, alquil-fosfato ésteres, ácido sulfónico, éster alquil sulfónico, tiosulfato, tiosulfenilo, sulfonamida, $-R^{23}R^{24}$, donde R^{23} es S, SS, Po, Po-Po, Se, Se-Se, Te o Te-Te, y R^{24} es como se define para R^{21} en el presente documento, o Y es



en la que X, R^{21} y R^{22} , son como se definen en el presente documento.

[0093] Además, se contempla que en algunas realizaciones, la materia biológica se proporciona con un compuesto precursor que se convierte en la versión activa del compuesto de Fórmula I o IV mediante la exposición a la materia biológica, tal como por medios químicos o enzimáticos. Además, el compuesto puede proporcionarse la materia biológica en forma de una sal del compuesto, en forma de un radical libre, o una especie cargada negativamente, cargada positivamente o cargada de forma múltiple. Algunos compuestos califican como tanto de un compuesto del

Fórmula I como un compuesto Fórmula IV y en dichos casos, el uso de la frase "Fórmula I o Fórmula IV" no pretende connotar la exclusión de dichos compuestos.

- [0094]** Un compuesto identificado por la estructura de Fórmula I o Fórmula IV puede caracterizarse también, en ciertas realizaciones, como un antagonista de oxígeno, un agente metabólico protector, o un precursor, profármaco o sal de los mismos. Se contempla adicionalmente que el compuesto no necesita estar caracterizado como tal o calificado como tal para ser un compuesto usado en la invención, en la medida en que consigue un procedimiento particular de la divulgación. En algunas realizaciones diferentes, el compuesto puede considerarse un compuesto de calcogenuro. Se contempla específicamente cualquier compuesto identificado por la estructura de la Fórmula I o la Fórmula IV o expuesto en esta divulgación que puede usarse en lugar de o además de un antagonista de oxígeno en los procedimientos, composiciones y aparatos; de forma análoga, puede usarse cualquier realización analizada con respecto a cualquier estructura que tiene la Fórmula I o la Fórmula IV o de otro modo se expone en este divulgación, en lugar de o además de un antagonista de oxígeno. Además, cualquier compuesto identificado por la estructura de las Fórmulas I o IV o expuesto en esta divulgación puede combinarse con cualquier antagonista de oxígeno o cualquier otro compuesto activo descrito en el presente documento. También se contempla que cualquier combinación de dichos compuestos puede proporcionarse o formularse conjunto, secuencialmente (solapante o no solapante) y/o de una forma secuencial solapante (la administración de un compuesto se inicial y antes de que se complete, se inicia la administración de otro compuesto) en los procedimientos, composiciones y otros artículos de fabricación de la invención para conseguir los efectos deseados expuestos en el presente documento.
- En ciertas realizaciones, se proporciona más de un compuesto con la estructura de la Fórmula I o la Fórmula IV. En ciertas realizaciones, se emplean múltiples compuestos diferentes con una estructura a partir de la misma fórmula (es decir, la Fórmula I o la Fórmula IV), mientras que en otras realizaciones, cuando se emplean múltiples compuestos diferentes, son de diferentes fórmulas.
- [0095]** En realizaciones específicas, se contempla que se usan múltiples compuestos activos, en los que uno de los compuestos es dióxido de carbono (CO_2). Se contempla que al menos un compuesto distinto es también un compuesto de la Fórmula I y/o la Fórmula IV en algunas realizaciones. En ciertos casos, se proporciona dióxido de carbono a la materia biológica junto con H_2S o un precursor de H_2S (de una forma conjunta, secuencial o secuencial solapante).
- [0096]** La cantidad de dióxido de carbono al que puede exponerse la materia biológica es aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente el 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30% o más, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma. En ciertas realizaciones, la cantidad se expresa en términos de ppm, tal como aproximadamente, al menos aproximadamente, o un máximo de aproximadamente 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000, 20000, 21000, 22000, 23000, 24000, 25000, 26000, 27000, 28000, 29000, 30000, 31000, 32000, 33000, 34000, 35000, 36000, 37000, 38000, 39000, 40000, 41000, 42000, 43000, 44000, 45000, 46000, 47000, 48000, 49000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 110000, 120000, 130000, 140000, 150000, 160000, 170000, 180000, 190000, 200000, 210000, 220000, 230000, 240000, 250000, 260000, 270000, 280000, 290000, 300000 o más ppm, o cualquier intervalo que puede derivarse de las mismas, así como un equivalente molar. Se contempla que estas concentraciones pueden aplicarse a cualquier otro compuesto activo en forma gaseosa.
- [0097]** En otras realizaciones, se contempla especialmente que el compuesto activo es sulfuro sódico, tiometóxido sódico, cisteamina, tiocianato sódico, sal sódica cisteamina-S-fosfato, o tetrahidrotiopiran-4-ol. En realizaciones adicionales, el compuesto activo es dimetilsulfóxido, ácido tioacético, selenourea, 2-(3-Aminopropil)-aminoetanotiol-dihidrógeno-fosfato-éster, 2-mercapto-etanol, tioglicoliceter, selenuro sódico, metano sulfinato sódico, tiourea o dimetilsulfuro. Se contempla específicamente que estos compuestos, o cualquier otro analizado en el presente documento, incluyendo cualquier compuesto con la Fórmula I, II, III o IV, puede proporcionarse o administrarse a la materia biológica en una cantidad que es aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177,

178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 5100, 5200, 5300, 5400, 5500, 5600, 5700, 5800, 5900, 6000, 6100, 6200, 6300, 6400, 6500, 6600, 6700, 6800, 6900, 7000, 7100, 7200, 7300, 7400, 7500, 7600, 7700, 7800, 7900, 8000, 8100, 8200, 8300, 8400, 8500, 8600, 8700, 8800, 8900, 9000, 9100, 9200, 9300, 9400, 9500, 9600, 9700, 9800, 9900, 10000 mM o mmol/kg (de materia biológica), o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma.

25

[0098] Se contempla específicamente que cualquier subconjunto de compuestos activos identificados por el nombre o la estructura puede usarse en los procedimientos, composiciones y artículos de fabricación. También se contempla específicamente que cualquier subconjunto de estos compuestos puede considerarse como realizaciones no constituyentes de la invención. La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos activos. Se entiende que dichas composiciones farmacéuticas se formulan en composiciones farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, la composición puede incluir un diluyente farmacéuticamente aceptable.

[0099] En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica contiene una dosis eficaz de un activo para proporcionar cuando se administra a un paciente una $C_{m\acute{a}x}$ o una concentración en plasma en estado estable del compuesto activo para producir un beneficio terapéuticamente eficaz. En ciertas realizaciones, la $C_{m\acute{a}x}$ o la concentración en plasma en estado estable que se va a conseguir es aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 0,01, 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 4, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 μM o más, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma. En ciertas realizaciones, tales como con H_2S , la $C_{m\acute{a}x}$ o concentración en plasma en estado estable deseada es aproximadamente entre 10 μM a aproximadamente 10 mM, o entre aproximadamente 100 μM a aproximadamente 1 mM, o entre aproximadamente 200 μM a aproximadamente 800 μM . Pueden tomarse las medidas apropiadas para considerar y evaluar los niveles del compuesto ya en la sangre, tal como azufre.

[0100] En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica proporciona una dosis eficaz de H_2S para proporcionar cuando se administra a un paciente una $C_{m\acute{a}x}$ o una concentración en plasma en estado estable de entre 10 μM a 10 mM, entre aproximadamente 100 μM a aproximadamente 1 mM, o entre aproximadamente 200 μM a aproximadamente 800 mM. En relación con la dosificación de ácido sulfhídrico con respecto a la dosificación con sales sulfuro, en realizaciones típicas, la dosificación de la sal se basa en la administración aproximadamente de los mismos equivalentes de azufre que la dosificación del H_2S . Se tomarán mediciones apropiadas para considerar y evaluar los niveles de azufre ya en la sangre.

[0101] En ciertas realizaciones, la composición comprende una forma gaseosa de uno o más de los compuestos activos que se han especificado anteriormente. En otra realización, la composición comprende una sal de uno o más de estos compuestos. En una realización particular, una composición farmacéutica comprende una forma gaseosa de la Fórmula I o la IV o una sal de la Fórmula I o IV. Se contempla específicamente una forma gaseosa o sal de H₂S en algunos aspectos de la invención. Se contempla que la cantidad de gas a la que se proporciona la materia biológica es aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000, 20000, 21000, 22000, 23000, 24000, 25000, 26000, 27000, 28000, 29000, 30000, 31000, 32000, 33000, 34000, 35000, 36000, 37000, 38000, 39000, 40000, 41000, 42000, 43000, 44000, 45000, 46000, 47000, 48000, 49000, 50000, 60000, 70000, 80000, 90000, 100000, 110000, 120000, 130000, 140000, 150000, 160000, 170000, 180000, 190000, 200000, 210000, 220000, 230000, 240000, 250000, 260000, 270000, 280000, 290000, 300000, 310000, 320000, 330000, 340000, 350000, 360000, 370000, 380000, 390000, 400000 o más ppm, o cualquier intervalo que puede derivarse de las mismas. Como alternativa, la cantidad eficaz de gas o gases puede expresarse como aproximadamente, al menos aproximadamente, o un máximo de aproximadamente el 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o el 100%, o cualquier intervalo que puede derivarse de las mismas, con respecto a la concentración en el aire al que se expone la materia biológica. Además, se contempla que con algunas realizaciones, la cantidad de gas al que se proporciona la materia biológica es aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100, 4200, 4300, 4400, 4500, 4600, 4700, 4800, 4900, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000 partes por billón (ppb) o cualquier intervalo que puede derivarse de las mismas. En particular casos, la cantidad de selenuro ácido proporcionado a la materia biológica está en este orden de magnitud.

[0102] En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica es un líquido. Como se analiza en otra parte, la composición puede ser un líquido con el compuesto o compuestos pertinentes disueltos o burbujeados en la composición. En algunos casos, la composición farmacéutica es un gas médico. De acuerdo con la United States Food and Drug Administration, son "gases médicos" aquellos gases que son fármacos dentro del significado de la sección §201 (g) (1) de la Ley Federal de Alimentos, Fármacos y Cosméticos ("la Ley") (21 U.S.C. §321 (g) y de acuerdo con la sección §503 (b) (1) (A) de la Ley (21 U.S.C. §353 (b) (1) (A) se requiere que sean dispensados con prescripción. Como tal, dichos gases médicos requieren una etiqueta de la FDA apropiada. Un gas médico incluye al menos un compuesto activo.

[0103] La presente divulgación comprende adicionalmente aparatos y artículos de fabricación que comprenden un material de envasado y, contenido dentro del material de envasado, un compuesto activo de estasis, donde el material de envasado comprende una etiqueta que indica que puede usarse para inducir la estasis en la materia biológica *in vivo*.

[0104] En algunas realizaciones, el aparato o artículo de fabricación incluye adicionalmente un diluyente farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones particulares, el aparato o artículo de fabricación tiene un agente tamponante. El compuesto activo se proporciona en un primer recipiente cerrado herméticamente y el diluyente farmacéuticamente aceptable se proporciona en un segundo recipiente cerrado herméticamente. En otras realizaciones, el dispositivo o artículo tiene adicionalmente instrucciones para mezclar el compuesto activo y el diluyente. Además, el compuesto activo puede reconstituirse para conseguir cualquier procedimiento de la invención, tal como para inducir estasis en una materia biológica *in vivo*. Se contempla que cualquier etiqueta especificará el

resultado que se consigue y el uso del compuesto para paciente que necesita ese resultado.

[0105] La presente divulgación también se refiere a un artículo de fabricación que comprende envasados juntos; un compuesto activo, instrucciones para el uso del compuesto activo de estasis, que comprenden: (a) identificar el tejido *in vivo* que necesita el tratamiento de estasis; y (b) administrar una cantidad eficaz del compuesto activo a la materia biológica *in vivo*.

[0106] En realizaciones adicionales, hay un artículo de fabricación que comprende un gas médico que incluye un compuesto activo y una etiqueta que incluye detalles o el uso y la administración para inducir estasis en una materia biológica o cualquier otro procedimiento de la invención.

[0107] La presente divulgación también se refiere a kits y procedimientos de uso de estos kits. En algunos casos, existen kits para la entrega de un compuesto activo a si sitio tisular que necesita tratamiento de estasis, o cualquier otro tratamiento de la invención reivindicada, que comprende: un paño adaptado para formar un sobre sellado contra un sitio de tejido; un contenedor que comprende un antagonista de oxígeno; y una entrada en el paño, donde el contenedor que comprende el compuesto activo está en comunicación con la entrada. En ciertos casos, el kit incluye una salida en el paño donde la salida está en comunicación con una fuente de presión negativa. En algunos casos, el paño comprende un material elastomérico y/o tiene un adhesivo sensible a la presión que cubre la periferia del paño. La salida se puede colocar en comunicación fluida con la fuente de presión negativa, que puede o no ser una bomba de vacío. También puede haber un conducto flexible que comunica entre la salida y la fuente de presión negativa. En algunas realizaciones, el kit incluye un bote, que puede o no ser desmontable, en comunicación fluida entre la salida y la fuente de presión negativa. Se contempla que el contenedor incluye un compuesto activo que está en comunicación gaseosa con la entrada. En ciertas realizaciones, el contenedor incluye un compuesto activo que es un gas o un gas líquido. El kit también puede incluir un vaporizador en comunicación entre el contenedor que comprende un antagonista de oxígeno y la entrada. Además, puede tener una salida de retorno en comunicación con el contenedor que comprende el compuesto activo.

[0108] En realizaciones particulares, el compuesto activo en los kits es H₂S. En ciertas realizaciones, el sitio de tejido para el que se emplea el kit o el procedimiento está herido.

[0109] Además, se entenderá generalmente que cualquier compuesto analizado en el presente documento como un antagonista de oxígeno puede proporcionarse en forma de profármaco a la materia biológica, lo que significa que la materia biológica u otra sustancia o sustancias en el entorno de la materia biológica alteran el profármaco en su forma activa, es decir, en un antagonista de oxígeno. Se contempla que el término "precursor" incluye los compuestos que se consideran "profármacos".

[0110] El antagonista de oxígeno u otro compuesto activo puede ser o puede proporcionarse en forma de un gas, un líquido semisólido (tal como un gel o pasta), un líquido o un sólido. Se contempla que la materia biológica puede estar expuesta a más de un compuesto activo de este tipo y/o a ese compuesto activo en más de un estado. Además, el compuesto activo puede formularse para un modo de administración particular, como se analiza en el presente documento. En ciertas realizaciones, el compuesto activo está en una formulación farmacéutica aceptable para administración intravenosa.

[0111] En ciertas realizaciones, el compuesto activo es un gas. En realizaciones particulares, el compuesto activo gaseoso incluye monóxido de carbono, dióxido de carbono, nitrógeno, azufre, selenio, telurio o polonio, o una mezcla de los mismos. Además, se contempla específicamente que el compuesto activo es un compuesto de calcogenuro en forma de un gas. En algunas realizaciones, el compuesto activo está en una mezcla de gas que comprende más de un gas. Los otros gases son un gas no tóxico y/o un gas no reactivo en algunas realizaciones. En algunas realizaciones, el otro gas es un gas noble (helio, neón, argón, criptón, xenón, radón, o ununocio), nitrógeno, óxido nitroso, hidrógeno, o una mezcla de los mismos. Por ejemplo, el gas no reactivo puede ser simplemente una mezcla que constituye el "aire ambiental", que es una mezcla de nitrógeno, oxígeno, argón y dióxido de carbono, así como cantidades traza de otras moléculas, tales como neón, helio, metano, criptón e hidrógeno. La cantidad precisa de cada uno varía, aunque una muestra típica puede contener aproximadamente nitrógeno al 78%, oxígeno al 21%, argón al 0,9% y dióxido de carbono al 0,04%. Se contempla que en el contexto de la presente invención, el "aire ambiental" es una mezcla que contiene de aproximadamente el 75 a aproximadamente el 81% de nitrógeno, aproximadamente del 18 a aproximadamente el 24% del oxígeno, aproximadamente el 0,7 a aproximadamente el 1,1% de argón, y aproximadamente el 0,02% a aproximadamente el 0,06% de dióxido de carbono. Un compuesto activo gaseoso puede diluirse en primer lugar con un gas no tóxico y/o no reactivo antes de la administración o la exposición a la materia biológica. Adicionalmente, o como alternativa,

cualquier compuesto activo gaseoso puede mezclarse con aire ambiental antes de la administración o la exposición a la materia biológica, o el compuesto puede administrarse o exponerse a la materia biológica en aire ambiental.

[0112] En algunos casos, la mezcla de gases también contiene oxígeno. Un gas de compuesto activo se mezcla con oxígeno para formar una mezcla de gas de oxígeno (O_2) en otras realizaciones de la invención. Se contempla específicamente una mezcla de gas oxígeno en la que la cantidad de oxígeno en la mezcla de gas oxígeno es menor que la cantidad total de todos los demás gases en la mezcla.

[0113] En algunos casos, el gas de compuesto activo es monóxido de carbono y la cantidad de monóxido de carbono es aproximadamente igual o excede cualquier cantidad de oxígeno en la mezcla de gas oxígeno. En divulgaciones particulares, se emplea monóxido de carbono con materia biológica sin sangre. La expresión "materia biológica sin sangre" se refiere a células y órganos cuya oxigenación no es dependiente, o ya no depende, de la vasculatura, tal como un órgano para trasplante. Preferiblemente, la atmósfera será CO al 100%, pero como será evidente para un experto en la técnica, la cantidad de CO puede equilibrarse con gases distintos del oxígeno que proporcionan que la cantidad de oxígeno útil se reduzca a un nivel que impide la respiración celular. En este contexto, la proporción de monóxido de carbono con respecto a oxígeno es preferiblemente 85:15 o mayor, 199:1 o mayor o 399:1 o superior. En ciertos casos, la relación es aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 1:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, 95:1, 100:1, 110:1, 120:1, 130:1, 140:1, 150:1, 160:1, 170:1, 180:1, 190:1, 200:1, 210:1, 220:1, 230:1, 240:1, 250:1, 260:1, 270:1, 280:1, 290:1, 300:1, 310:1, 320:1, 330:1, 340:1, 350:1, 360:1, 370:1, 380:1, 390:1, 400:1, 410:1, 420:1, 430:1, 440:1, 450:1, 460:1, 470:1, 480:1, 490:1, 500:1 o más, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma.

[0114] Aún en divulgaciones adicionales, los números anteriores corresponden a la proporción de monóxido de carbono con respecto a una mezcla de oxígeno y uno o más gases diferentes. En algunos casos, se contempla que el otro gas es un gas no reactivo, tal como nitrógeno (N_2). Por lo tanto, los números anteriores se aplican a proporciones de monóxido de carbono con respecto a una combinación de oxígeno y nitrógeno (O_2/N_2) que puede usarse en los procedimientos y aparatos desvelados en el presente documento. Por consiguiente, se entenderá que pueden o no estar presentes otros gases. En algunos casos, la relación CO:oxígeno se equilibra con uno o más gases diferentes (gases de monóxido sin carbono y gases sin oxígeno). En divulgaciones particulares, la relación CO:oxígeno se equilibra con nitrógeno. Aún en divulgaciones adicionales, la cantidad de CO es una relación de CO en comparación con el aire ambiental, como se describe por los números anteriores.

[0115] En algunos casos, la cantidad de monóxido de carbono es relativa a la cantidad de oxígeno, mientras que en otros, es una cantidad absoluta. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, la cantidad de oxígeno está en términos de "partes por millón (ppm)", que es una medida de la partes en volumen de oxígeno en un millón de partes de aire a temperatura convencional y una presión de 20 °C y una presión atmosférica y el equilibrio del volumen de gas se compone de monóxido de carbono. En este contexto, la cantidad de monóxido de carbono con respecto a oxígeno está relacionada en términos de partes por millón de oxígeno equilibrado con monóxido de carbono. Se contempla que la atmósfera a la que se expone o se incuba el material biológico puede ser al menos 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 ó 2000 partes por millón (ppm) de oxígeno equilibrado con monóxido de carbono y en algunos casos monóxido de carbono mezclado con un gas no tóxico y/o no reactivo. El término "entorno" se refiere al entorno inmediato de la materia biológica, es decir; el entorno con el que está en contacto directo. Por lo tanto, el material biológico debe exponerse directamente a monóxido de carbono, y es suficiente con que el depósito sellado de monóxido de carbono esté en la misma habitación que la materia biológica y se considere que se incubará un "entorno" de acuerdo con la divulgación. Como alternativa, la atmósfera puede expresarse en términos de kPa. Generalmente se entiende que 1 millón de partes = 101 kPa a 1 atmósfera. En divulgaciones en el presente documento, en entorno en el que un material biológico se incuba o se expone a, es aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 0,001, 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25, 0,26, 0,27, 0,28, 0,29, 0,30, 0,35, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,5, 0,90, 0,95, 1,0 kPa o más de O_2 , o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma. Como se ha descrito anteriormente, dichos niveles pueden equilibrarse con monóxido de carbono y/u otro gas o gases no tóxicos y/o no reactivos. Además, la atmósfera puede definirse en cuanto a niveles de CO en unidades de kPa. En ciertos casos, la atmósfera es aproximadamente; al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 101, 101,3 kPa de CO, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma. En casos particulares, la presión parcial es aproximadamente, o al menos aproximadamente 85, 90, 95, 101, 101,3 kPa de CO, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma.

- [0116]** La cantidad de tiempo que se incuba o se expone la muestra a monóxido de carbono también puede variar. En algunos casos, la muestra se incuba o se expone a monóxido de carbono durante aproximadamente, durante al menos aproximadamente, o durante un máximo de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 o más minutos y/o, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más días.
- [0117]** En algunas realizaciones, la invención se refiere a composiciones y artículos de fabricación que contienen uno o más compuestos activos. En ciertas realizaciones, una composición tiene uno o más de estos compuestos activos en forma de un gas que se burbujea en éste de manera que la composición proporcione el compuesto a la materia biológica cuando se expone a la composición. Dichos compuestos pueden ser geles, líquidos u otro material semisólido. En ciertas realizaciones, una solución tiene un antagonista de oxígeno en forma de un gas burbujeado a través de éste. Se contempla que la cantidad burbujeada en el gas proporcionará la cantidad apropiada del compuesto al material biológico que se expone a la solución. En ciertas realizaciones, la cantidad de gas burbujeado en la solución es aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 veces o más, o cualquier intervalo que puede derivarse del mismo, que la cantidad a la que la materia biológica se proporciona de forma eficaz.
- [0118]** La materia biológica está expuesta al gas en un recipiente cerrado en algunas divulgaciones en el presente documento. En algunos casos, el contenedor cerrado puede mantener un entorno particular o modular el entorno como se desee. El entorno se refiere a la cantidad de antagonista de oxígeno a la que la materia biológica se expone y/o la temperatura, la composición del gas, o la presión del entorno. En algunos casos, la materia biológica se coloca en vacío antes, durante o después de la exposición a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Además, en otros casos, la materia biológica está expuesta a un entorno normóxico después de estar expuesta a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. En ciertas realizaciones, la presente invención incluye composiciones para inducir estasis o proteger la materia biológica de una lesión o enfermedad que incluyen proporcionar un compuesto activo a la materia biológica en combinación con proporcionar otro compuesto activo de inducción de estasis o una condición ambiental a la materia biológica. Dicho tratamiento de combinación puede producirse en cualquier orden, por ejemplo, simultáneamente o secuencialmente. En ciertas realizaciones, se proporciona un compuesto activo a la materia biológica, y la materia biológica se pone posteriormente en condiciones hipóxicas; tal como O₂ al 5%, o se expone secuencialmente a condiciones hipóxicas en aumento, tal como O₂ al 5% seguido de O₂ al 4%, O₂ al 3%, O₂ al 2%, O₂ al 1%, o condiciones sin O₂, o cualquier combinación secuencial de dichas condiciones.
- [0119]** Además, en otras realizaciones, el entorno que contiene la materia biológica cicla al menos una vez una cantidad o concentración diferente del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo, donde la diferencia en la cantidad o la concentración es de al menos una diferencia de porcentaje. El entorno puede ciclar de forma alterna entre una o más cantidades o concentraciones del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo, o puede aumentar o disminuir gradualmente la cantidad o concentraciones de ese compuesto. En algunos casos, la cantidad o concentración diferente está entre aproximadamente el 0 y el 99,9% de la cantidad o concentración del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo al que la materia biológica se expuso inicialmente. Se contempla que la diferencia en la cantidad y/o concentración es aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente el 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o más, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma.
- [0120]** Los procedimientos de la divulgación también pueden incluir una etapa de someter la materia biológica a un entorno de temperatura controlada. En ciertas realizaciones, la materia biológica está expuesta a una temperatura que es un "entorno de temperatura no fisiológica", que se refiere a una temperatura en la que la materia biológica no puede vivir más de 96 horas. El entorno de temperatura controlada puede tener una temperatura de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente -210, -200, -190, -180, -170, -160, -150, -140, -130, -120, -110, -100, -90, -80, -70, -60, -50, -40, -30, -20, -10, -5, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126,

127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200 °C o más, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma. La materia biológica también puede estar expuesta a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo a temperatura ambiente, lo que significa una temperatura entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 25 °C. Además, se contempla que la materia biológica consigue una temperatura interna de cualquier cantidad o intervalo de las cantidades analizadas.

[0121] Se contempla que la materia biológica puede someterse a un entorno de temperatura no fisiológica o un entorno de temperatura controlada antes, durante o después de la exposición al antagonista o antagonistas de oxígeno u otro compuesto o compuestos activos. Además, en algunas realizaciones, la materia biológica se somete a un entorno de temperatura no fisiológica o un entorno de temperatura controlada durante un periodo de tiempo entre aproximadamente un minuto y aproximadamente un año. La cantidad de tiempo puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más años, u cualquier combinación o intervalo que puede derivarse de la misma. Además, puede haber una etapa de aumento de la temperatura ambiente con respecto a la temperatura reducida.

[0122] Además, se contempla que la temperatura puede alterarse o ciclarse durante el proceso en el que la temperatura se controla. En algunas realizaciones, la temperatura de la materia biológica puede reducirse en primer lugar antes de que se ponga en el entorno que tiene el antagonista de oxígeno u otro compuesto activo, mientras que en otros, la materia biológica pueden enfriarse colocándolo en el entorno con el compuesto activo que está por debajo de la temperatura de la materia biológica. La materia biológica y/o entorno puede enfriarse o calentarse gradualmente, de tal forma que la temperatura de la materia biológica o el entorno comienza a una temperatura pero entonces alcanza otra temperatura.

[0123] Los procedimientos de la divulgación también pueden incluir una etapa de sometimiento de la materia biológica a un entorno de presión controlada. En ciertas realizaciones, la materia biológica está expuesta a una presión que es menor que la presión en la que el organismo está típicamente por debajo. En ciertas realizaciones, la materia biológica se somete a un "entorno de presión no fisiológica", que se refiere a una presión por debajo de la cual la materia biológica no puede vivir durante más de 96 horas. El entorno de presión controlada puede tener una presión de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho 10^{-14} , 10^{-13} , 10^{-12} , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 0,2, 0,3, 0,4 ó 0,5 atm o más, o cualquier intervalo que puede derivarse del mismo.

[0124] Se contempla que la materia biológica puede someterse a un entorno de presión no fisiológica o un entorno de presión controlada antes, durante o después de la exposición al compuesto o compuestos activos. Además, en algunas realizaciones, la materia biológica se somete a un entorno de presión no fisiológica o un entorno de presión no controlada durante un periodo de tiempo entre aproximadamente un minuto y aproximadamente un año. La cantidad de tiempo puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más años, y cualquier combinación o intervalo que puede derivarse de la misma.

[0125] Además, se contempla que la presión puede alterarse o ciclarse durante el proceso en el que se controla la presión. En algunas realizaciones, la presión a que la materia biológica está expuesta puede reducirse en primer lugar antes de que se ponga en el entorno que tiene el compuesto activo, mientras que en otros, la materia biológica se pone a presión después de la exposición a un compuesto activo. La presión puede reducirse gradualmente, de tal forma que la presión del entorno comienza a una presión pero después alcanza otra presión en 10, 20, 30, 40, 50, 60 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o más, y cualquier combinación o intervalo que pueda derivarse de la misma. En ciertas realizaciones, los procedimientos incluyen la modulación de los niveles de oxígeno ambiental o eliminar el material biológico de un entorno que tiene oxígeno. Operacionalmente, la exposición del material biológico a un entorno en el que el oxígeno está disminuido o ausente puede imitar la exposición del material biológico a un antagonista de oxígeno. Se contempla que en algunas realizaciones de la invención, la materia biológica está expuesta a o se proporciona con un compuesto activo en condiciones en las que el entorno de la materia biológica es hipóxica o anóxica, como se describe en más detalle a continuación. Esto puede ser de forma

intencionada o no intencionada. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, la materia biológica se pone de forma intencionada en un entorno que es anóxico o hipóxico o en un entorno que está hecho anóxico o hipóxico. En otras realizaciones, la materia biológica está bajo dichas condiciones como resultado de una situación involuntaria, por ejemplo, si la materia biológica está en condiciones de isquemia o potencialmente isquémicas. Por lo tanto, se contempla en algunos casos que las condiciones de hipoxia o anoxia dañarán la materia en ausencia del compuesto activo.

[0126] En ciertos procedimientos, también existe una etapa de evaluar el nivel del antagonista de oxígeno y/o la fosforilación oxidativa en la materia biológica en la que se indujo la estasis. Por otra parte, en algunos casos, existe una etapa de evaluar el nivel del metabolismo celular que se produce generalmente en la materia biológica. En algunos casos, la cantidad del compuesto activo en la materia biológica se mide y/o se evalúa una reducción en la temperatura de la materia biológica. Además, en algunos casos, se evalúa la extensión de uno o más efectos terapéuticos.

[0127] En algunos otros casos, cualquier efecto de toxicidad sobre la materia biológica de un compuesto activo y/o un cambio ambiental (temperatura, presión) se supervisa o se controla. Se contempla que la toxicidad puede controlarse alterando el nivel, cantidad, duración o frecuencia de un compuesto activo y/o cambio ambiental al que se expone la materia biológica. En ciertos casos, la alteración es una reducción, mientras que en algunos otros casos, la alteración es un aumento. Se contempla que el experto en la técnica es consciente de varias formas de evaluar los efectos de la toxicidad en la materia biológica.

[0128] Otras etapas opcionales incluyen la identificación de un compuesto activo apropiado; el diagnóstico del paciente; recopilación de la historia del paciente y/o tener una o más pruebas hechas sobre el paciente antes de administrar o prescribir un compuesto activo al paciente.

[0129] Pueden usarse composiciones, procedimientos y artículos de fabricación de la divulgación en la materia biológica que se transferirá de nuevo al organismo donante desde el que se obtuvo (autólogo) o un sujeto receptor diferente (heterólogo). En algunos casos, la materia biológica se obtiene directamente de un organismo donante. En otros, la materia biológica se pone en el cultivo antes de la exposición a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. En algunas situaciones, la materia biológica se obtiene de un organismo donante administrado por oxigenación de membrana extracorpórea antes de la recuperación de la materia biológica, que es una técnica implementada para facilitar la conservación de la materia biológica. Además, los procedimientos incluyen la administración o implantación de la materia biológica en la que se indujo la estasis a un organismo receptor vivo.

[0130] Los procedimientos de la invención también se refieren a inducir estasis en materia biológica *in vivo* que comprenden incubar la materia biológica con un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo que crea condiciones hipóxicas durante una cantidad eficaz de tiempo para que la materia biológica entre en estasis.

[0131] Además, otras realizaciones de la invención incluyen procedimientos para reducir la demanda de oxígeno en materia biológica *in vivo* que comprenden poner en contacto la materia biológica con una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo para reducir su demanda de oxígeno. Se contempla que la demanda de oxígeno se reduce aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100%, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma, con respecto a la cantidad de demanda de oxígeno en células de la materia biológica o una muestra representativa de células de la materia biológica no expuesta o ya no expuesta al antagonista de oxígeno u otro compuesto activo.

[0132] Otros aspectos de la invención se refieren a procedimientos para conservar la materia biológica *in vivo* que comprenden exponer la materia biológica *in vivo* a una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo para conservar la materia biológica *in vivo*.

[0133] La presente invención también refiere a un procedimiento de retraso o reducción de los efectos de un trauma sobre o en un organismo que comprende exponer una materia biológica en riesgo de trauma a una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo.

[0134] En otros aspectos de la invención, hay procedimientos para tratar o prevenir el choque hemorrágico en un paciente que comprende exponer al paciente a una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto

activo. Como alternativa, en algunas realizaciones, los procedimientos previenen la mortalidad del paciente como resultado de la hemorragia y/o el choque hemorrágico. En dichos procedimientos para impedir que un paciente muera desangrado o prevenir la mortalidad en un paciente sangrante, las etapas incluyen exponer al paciente a una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. En ciertas realizaciones, el antagonista de oxígeno se contempla específicamente que es un compuesto de calcogenuro, tal como H₂S.

[0135] También se incluyen procedimientos para reducir la frecuencia cardíaca en un organismo como parte de la invención. Dichos procedimientos implican poner en contacto la muestra biológica u organismo con una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo.

[0136] Una divulgación en el presente documento se refiere a un procedimiento para inducir la hibernación en un mamífero que comprende poner en contacto el mamífero con una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo.

[0137] En otra divulgación, existe un procedimiento para anestesiarse un organismo que comprende exponer la materia biológica, en que se desea la anestesia, a una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Se contempla que la anestesia puede ser similar a la anestesia local o general.

[0138] La presente divulgación incluye adicionalmente procedimientos para proteger a un mamífero de la terapia de radiación o la quimioterapia que comprende poner en contacto el mamífero con una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo antes de o durante la terapia de radiación o la quimioterapia. Con la administración local de la terapia del cáncer, se contempla específicamente que el antagonista de oxígeno u otro compuesto activo también puede administrarse por vía local al órgano, tejido y/o células afectadas. En ciertos casos, pueden usarse procedimientos de prevención o reducción de pérdida del pelo en un paciente de quimioterapia. Se contempla que un paciente de este tipo puede haber recibido ya quimioterapia o ser un candidato para la quimioterapia. En casos particulares, se contempla que un compuesto activo se proporciona al paciente en forma de un gel tópico que se aplicará donde se anticipa o está presente la pérdida de cabello.

[0139] La presente divulgación también incluye reducir la necesidad de oxígeno de la materia biológica, lo que significa que la cantidad de oxígeno necesaria por la materia biológica para sobrevivir se reduce. Esto se logra proporcionando una cantidad eficaz de uno o más compuestos activos. Generalmente se conoce cuánto oxígeno requiere una materia biológica particular para sobrevivir, que también puede depender el tiempo, la presión y la temperatura. En ciertos casos de la invención, la necesidad de oxígeno de la materia biológica se reduce en aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente el 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100%, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma, en comparación con la necesidad de la materia biológica en ausencia de la cantidad eficaz del compuesto o compuestos activos.

[0140] En una divulgación adicional, existen procedimientos de tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer) en un mamífero que comprende poner en contacto al mamífero con una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo y someter al mamífero a terapia de hipertermia.

[0141] Mientras que los procedimientos desvelados en el presente documento pueden aplicarse a la conservación de órganos para trasplantes, otros aspectos de la invención se refieren al organismo receptor. En algunos casos, existen procedimientos para inhibir el rechazo de un trasplante de órganos en un mamífero que comprende proporcionar el mamífero con una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo.

[0142] La regulación de la temperatura puede conseguirse en los organismos empleando antagonistas de oxígeno u otros compuestos activos. En algunos casos, existe un procedimiento para tratar a un sujeto con hipotermia que comprende (a) poner en contacto el sujeto con una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno, y después (b) someter al sujeto a una temperatura ambiental superior a la del sujeto. En otros casos, la presente invención incluye un procedimiento para tratar un sujeto con hipertermia que comprende (a) poner en contacto el sujeto con una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. En algunos casos, el tratamiento de la hipertermia también incluye (b) someter al sujeto a una temperatura ambiental que es de al menos aproximadamente 20 °C por debajo de la del sujeto. Como se ha analizado anteriormente, la exposición del sujeto a un entorno de temperatura no fisiológica o controlada puede usarse en realizaciones adicionales. Se contempla que este procedimiento puede lograrse generalmente con compuestos activos.

[0143] En algunos casos, la invención se refiere a un procedimiento para inducir la cardioplejía en un paciente que se somete a cirugía de derivación que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Se contempla que la administración puede ser local en el corazón con el fin de protegerlo.

[0144] Otros aspectos de la invención se refieren a un procedimiento para la prevención de choque hematológico en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo.

[0145] Además, existen procedimientos para promover la curación de heridas en un organismo que comprenden administrar al organismo o herida una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo.

[0146] Además, la presente divulgación proporciona un procedimiento para prevenir o tratar la neurodegeneración en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo.

[0147] La presente invención también incluye reducir la necesidad de oxígeno de la materia biológica, lo que significa que la cantidad de oxígeno requerida por la materia biológica para sobrevivir se reduce. Esto se logra proporcionando una cantidad eficaz de uno o más compuestos activos. Generalmente se conoce cuánto oxígeno requiere una materia biológica particular para sobrevivir, que también puede ser dependiente del tiempo, la presión y la temperatura. En ciertas realizaciones de la invención, la necesidad de oxígeno de la materia biológica se reduce en aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100%, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma, en comparación con la necesidad de la materia biológica en ausencia de la cantidad eficaz del compuesto o compuestos activos.

[0148] Divulgaciones adicionales se refieren a los procedimientos para prevenir la pérdida del cabello, tales como debido a quimioterapia, administrando a un paciente que tiene o se someterá a quimioterapia una cantidad eficaz de al menos un compuesto activo.

[0149] En casos en los que la materia biológica se protege contra daños o daños adicionales, se contempla que la materia biológica puede estar expuesta a un antagonista de oxígeno en aproximadamente, en al menos aproximadamente, o en como mucho aproximadamente 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más años, y cualquier combinación o intervalo que puede derivarse de los mismos, después de que se produzca un daño inicial (trauma o herida o degeneración). Por lo tanto, en divulgaciones adicionales, los procedimientos incluyen una evaluación inicial de cualquier daño, trauma, una herida o degeneración.

[0150] En ciertas divulgaciones existen procedimientos para el tratamiento de un paciente afectado con un trastorno hematológico, que se refiere a una enfermedad, trastorno o afección que afecta a cualquier célula hematopoyética o tejido. Los ejemplos incluyen enfermedad drepanocítica y talasemia. Por lo tanto, en algunos casos, existen procedimientos para tratar un paciente con enfermedad de las células falciformes o talasemia con una cantidad eficaz de un compuesto activo. En otros casos, existen procedimientos para mejorar la supervivencia en un paciente con fibrosis quística (FQ), administrando o proporcionando una cantidad eficaz de un compuesto activo. En otros casos, existen procedimientos para el tratamiento de envenenamiento con cianuro en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto activo. En ciertas realizaciones, el compuesto es H₂S.

[0151] Otras divulgaciones se refieren a procedimientos para la conservación de una o más células separadas de un organismo que comprenden poner en contacto la célula o las células con una cantidad eficaz de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo para conservar la una o más células. Además de las células y los tipos de células que se han analizado anteriormente y en otros lugares en esta solicitud, se contempla que los embriones de camarón se contemplan específicamente para su uso con los procedimientos desvelados.

[0152] Además, también se proporcionan procedimientos para la conservación de las plaquetas. Los inconvenientes de la técnica anterior se reducen o se eliminan usando las técnicas de esta divulgación. Los casos

relativos a las plaquetas y la reducción de oxígeno encuentran una amplia aplicación, incluyendo, pero sin limitación, cualquier aplicación que se beneficiará de un almacenamiento de duradero de las plaquetas.

- [0153]** En uno de los casos, las técnicas de reducción de oxígeno pueden incorporarse en un kit. Por ejemplo, el kit que se vende actualmente con el número de producto 261215, disponible en Becton Dickinson, aprovecha las técnicas de selección aquí descritas. Este kit incluye un generador anaeróbico (por ejemplo, un generador de gas hidrógeno), catalizadores de paladio, un indicador anaeróbico y una "BioBag" impermeable a gas y sellable, en la que los componentes anteriores (junto con las plaquetas en una bolsa permeable a gas) se colocan y se sellan.
- [0154]** En otras divulgaciones, existen procedimientos para inhibir de forma reversible el metabolismo de una célula y/o un organismo proporcionando una cantidad eficaz de un compuesto activo. Se contempla específicamente que la rotenona no es el compuesto empleado en este procedimiento, o posiblemente otros procedimientos. Además, también se contempla que en algunos casos, la rotenona es excluida como compuesto activo. De forma análoga, se contempla que el óxido nítrico puede excluirse como compuesto activo.
- [0155]** En otras divulgaciones, se proporcionan procedimientos para mejorar la capacidad de la materia biológica para entrar en estasis en respuesta a una lesión o enfermedad proporcionando una cantidad eficaz de un compuesto activo; protegiendo así la materia biológica de daños o lesiones, mejorando de este modo la supervivencia de la materia biológica. Las divulgaciones relacionadas incluyen procedimientos de preparación o cebado de la materia biológica para entrar en estasis en respuesta a una lesión o enfermedad proporcionando una cantidad eficaz de un compuesto activo. Otros casos relacionados incluyen un procedimiento de inducción de la materia biológica en pre-estasis, protegiendo así la materia biológica de daños o lesiones. Por ejemplo, el tratamiento con un compuesto activo a una dosificación o durante menos tiempo de lo necesario para inducir la estasis, permite que la materia biológica logre más fácilmente o más completamente un estado beneficioso de estasis en respuesta a una lesión o enfermedad, mientras que en ausencia de tratamiento con el compuesto activo, la materia biológica morirá o padecerá daños o lesiones antes de alcanzar un nivel protector de estasis, por ejemplo, un nivel suficiente para convertir la materia biológica resistente a la hipoxia letal.
- [0156]** Ciertas lesiones y patologías hacen que la materia biológica reduzca su metabolismo y/o temperatura a grados que no pueden alcanzar la estasis. Por ejemplo, hipoxia, isquemia y la pérdida de sangre reducen la cantidad de oxígeno disponible y suministrado con respecto al oxígeno utilizando la materia biológica, reduciendo así la utilización de oxígeno en las células de la materia biológica, reduciendo la producción de energía obtenida a partir de la fosforilación oxidativa y disminuyendo así la termogénesis, lo que conduce a hipotermia. Dependiendo de la gravedad o el tiempo transcurrido después de la aparición o evolución del traumatismo perjudicial o enfermedad, la "estasis" puede haberse conseguido o no. El tratamiento con un compuesto activo disminuye el umbral (es decir, la gravedad o duración del traumatismo que se necesita para lograr la estasis) para la inducción de estasis, o puede añadir o sinergizar con los estímulos de dolencia o de enfermedad para inducir la estasis en la materia biológica en condiciones perjudiciales que no tendrán resultado en la estasis no si fuera por el tratamiento del compuesto activo. Dicha actividad de los compuestos activos se determina comparando los efectos inductores de estasis (magnitud, cinética) de estímulos de dolencia o de enfermedad en solitario con aquellos en los que la materia biológica se expusieron previamente, se expusieron de forma concomitante, se expusieron después, o cualquier combinación de los mismo, con el compuesto activo. Por ejemplo, como se describen en el Ejemplo 11 de la presente solicitud de patente, la exposición previa de ratones a 150 ppm de H₂S en aire causó una caída de aproximadamente dos veces en la producción CO₂ antes de la exposición a la hipoxia (O₂ al 5%). Posteriormente, la producción de CO₂ en ratones pretratados cayó aproximadamente 50 veces durante la hipoxia. Por el contrario, mientras que la producción de CO₂ en ratones no tratados con H₂S de control también cayó, la supervivencia de la hipoxia de los ratones no se logró, presumiblemente ya que los ratones murieron antes de alcanzar la estasis.
- [0157]** En otras divulgaciones, existen procedimientos para inducir el sueño en un organismo que comprenden exponer al organismo a una cantidad eficaz de un compuesto activo, donde la cantidad eficaz es inferior a una cantidad que puede inducir la estasis en el organismo. El término "sueño" se usa de acuerdo con su significado habitual y simple en un contexto médico. El sueño es distinguible de otros estados de inconsciencia, que también se contemplan como estados que se pueden lograr usando procedimientos de la invención.
- [0158]** La presente divulgación también se refiere a procedimientos para anestesiarse la materia biológica que comprenden exponer la materia a una cantidad eficaz de un compuesto activo, donde la cantidad eficaz es inferior a una cantidad que puede inducir la estasis en el organismo.

[0159] En los procedimientos que se han analizado anteriormente, una cantidad eficaz que es menor que una

cantidad que puede inducir estasis en un organismo puede reducirse con respecto a la duración y/o la cantidad. Esta reducción puede ser una reducción en una cantidad del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma, de la cantidad para inducir estasis. Una reducción puede ser una reducción de la duración (duración del tiempo de exposición) en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, días, 1, 2, 3, 4, 5 semanas, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma. Como alternativa, la reducción puede ser en términos de la cantidad eficaz global proporcionada a la materia biológica, que puede ser una reducción del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 por ciento, o cualquier intervalo que puede derivarse de la misma, con respecto a la cantidad eficaz global para inducir la estasis en un organismo de esa especie y/o tamaño.

[0160] Se contempla específicamente que la presente divulgación puede usarse para la conservación de los organismos que se usan para consumo o investigación de laboratorio, tales como moscas, ranas, peces, ratones, ratas, perros, camarones y embriones de los mismos.

[0161] Los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden implicar el empleo de un aparato o sistema que mantiene el entorno en el que la materia biológica se pone o se expone. La divulgación incluye un aparato en el que un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo, particularmente en forma de un gas, se suministra. En algunos casos, el aparato incluye un contenedor con una cámara de muestras para mantener la materia biológica, donde el contenedor está conectado a un suministro de gas que comprende el antagonista o antagonistas de oxígeno. Se contempla específicamente que el contenedor puede ser un contenedor sólido o puede ser flexible, tal como una bolsa.

[0162] En algunos casos se desvela un aparato para la conservación de células, comprendiendo el aparato: un contenedor que tiene una cámara de muestras con un volumen de no más de 775 litros; y un primer suministro de gas en comunicación fluida con la cámara de muestras, incluyendo el primer suministro de gas monóxido de carbono. En casos adicionales, el aparato también incluye una unidad de refrigeración que regula la temperatura en el interior de la cámara de muestras y/o un regulador de gas que regula la cantidad de antagonista de oxígeno u otro compuesto activo en la cámara o la cantidad de antagonista de oxígeno u otro compuesto activo en una solución que está en la cámara.

[0163] Se contempla que puede haber un suministro de gas para un segundo gas o adicionales o un segundo suministro de gas o adicionales para el antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. El segundo suministro de gas puede conectarse con la cámara de muestras o puede conectarse con el primer suministro de gas. El gas adicional, como se ha analizado anteriormente, puede ser un gas no tóxico y/o no reactivo.

[0164] Un regulador de gas es parte del aparato en algunos casos. Pueden emplearse uno, dos, tres o más reguladores de gas. En algunos casos, el regulador de gas regula el gas suministrado a la cámara de muestras del primer suministro de gas. Como alternativa, que regula el gas suministrado a la cámara de muestras o el primer suministro de gas del segundo suministro de gas, o puede haber un regulador para tanto el primer suministro de gas como para el segundo. Se contempla adicionalmente que cualquier regulador de gas puede programarse para controlar la cantidad de gas suministrado a la cámara de muestras y/o al otro suministro de gas. La regulación puede o no ser durante un periodo de tiempo determinado. Puede haber un regulador de gas, que puede o no ser programable, para cualquier suministro de gas directa o indirectamente conectado a la cámara de muestras. En algunos casos, el regulador de gas se puede programar electrónicamente.

[0165] En algunos casos, la presión y/o la temperatura en el interior de la cámara pueden regularse con un regulador de presión o un regulador de temperatura, respectivamente. Como con el regulador de gas, estos reguladores pueden programarse electrónicamente. El aparato de la invención también puede tener una unidad de refrigeración y/o calentamiento para alcanzar las temperaturas que se han analizado anteriormente. La unidad puede o no ser programable electrónicamente.

[0166] En casos adicionales, el aparato incluye un carrito con ruedas en el contenedor en el que descansa el contenedor o puede tener una o más asas.

[0167] Se contempla específicamente que la divulgación incluye un aparato para una célula o células, tejidos, órganos e incluso organismos enteros, en el que el aparato tiene: un contenedor que tiene una cámara de muestras; un primer suministro de gas en comunicación fluida con la cámara de muestras, incluyendo el primer suministro de gas el antagonista o antagonistas de oxígeno u otro compuesto o compuestos activos; y un regulador de gas programable electrónicamente que regula el gas suministrado a la cámara de muestras del primer suministro de gas.

[0168] En algunos casos, el aparato también tiene una estructura configurada para proporcionar un vacío dentro de la cámara de muestras.

10

[0169] Además, cualquier antagonista de oxígeno u otro compuesto activo descrito en esta solicitud se contempla para su uso con los aparatos proporcionados. En casos específicos, el monóxido de carbono puede administrarse usando este aparato. En otros casos, puede administrarse un compuesto de calcogenuro o un compuesto que tiene la estructura de agente reductor. Aún en casos adicionales, un compuesto activo se administra usando el aparato. En casos concretos, la divulgación proporciona un dispositivo o su uso. En ciertos casos, el dispositivo es un dispositivo de administración de dosis única. En otros casos, el dispositivo es un inhalador o nebulizador. En más casos, otros dispositivos incluyen, pero sin limitación, un dispositivo de inyección, tal como un bolígrafo, una bomba, tal como una bomba de infusión, o un parche. Además, se contempla que estos dispositivos pueden o no ser dispositivos de administración de dosis única.

20

[0170] Adicionalmente, la presente divulgación proporciona ensayos de detección. En algunos casos, una sustancia candidata se detecta por la capacidad de actuar como un antagonista de oxígeno o compuesto activo, incluyendo específicamente un agente metabólico protector. Esto puede hacerse usando cualquier ensayo descrito en el presente documento, tal como midiendo la salida de dióxido de carbono. Cualquier sustancia identificada como que tiene características de exhibición de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo puede caracterizarse o ensayarse adicionalmente. Además, se contempla que tal sustancia puede administrarse a una materia biológica para inducir la estasis o fabricarse después de esto.

25

[0171] En ciertos casos, existen procedimientos de detección para compuestos activos, incluyendo compuestos activos de estasis. Además, los procedimientos de detección pueden ser para antagonistas de oxígeno o cualquier otro compuesto que puede realizar los procedimientos analizados en el presente documento. En algunos casos, existen procedimientos de detección implican a) exponer un embrión de pez cebra a una sustancia; b) medir la frecuencia cardíaca del embrión; c) comparar la frecuencia cardíaca del embrión en presencia de la sustancia con respecto a la frecuencia cardíaca en ausencia de la sustancia, donde una reducción de la frecuencia cardíaca, tal como del 50 o más, identifica la sustancia como un compuesto activo candidato. En lugar de embriones de pez cebra, se contempla que pueden usarse también otros organismos no humanos, tales como peces, ranas, moscas, camarones, o sus embriones. En casos adicionales, la frecuencia cardíaca del embrión se mide contando el número de latidos del corazón. Esto puede hacerse, en algunos casos, visualizando el embrión con un microscopio de disección.

40

[0172] Otros procedimientos de detección implican: a) exponer un nematodo a una sustancia; b) ensayar uno o más de los siguientes factores de respiración celular: i) temperatura corporal; ii) consumo de oxígeno; iii) motilidad; o, iv) producción de dióxido de carbono; c) comparar el factor de la respiración celular del nematodo en presencia de la sustancia con el factor de la respiración celular en ausencia de la sustancia, donde una reducción de la característica identifica la sustancia como un compuesto activo candidato. Se contempla específicamente que la motilidad de los nematodos se ensaya en algunos procedimientos desvelados en el presente documento.

45

[0173] En algunas revelaciones, los procedimientos implican en primer lugar identificar una sustancia correspondiente a detectar. En ciertos casos, la sustancia será un calcogenuro, un agente reductor, o tendrán la estructura de la Fórmula I o la Fórmula IV, o cualquier otro compuesto analizado en el presente documento.

50

[0174] Se contempla adicionalmente que pueden hacerse detecciones posteriores en organismos considerados mayores o más complejos que los usados en detecciones preliminares o iniciales. Por lo tanto, se contempla que se ensayarán uno o más factores de la respiración celular en estos otros organismos para evaluar adicionalmente un compuesto candidato. En ciertas realizaciones, las detecciones posteriores implican el uso de ratones, ratas, perros, etc.

55

[0175] Se contempla que pueden usarse varios organismos o materia biológica diferentes (otras células o tejidos) y pueden ensayarse varios factores de la respiración celular diferentes en los procedimientos de detección. Además,

se contempla que se realizan múltiples detecciones de este tipo al mismo tiempo.

[0176] Por supuesto, se entenderá que para que una sustancia se considere un compuesto activo candidato (o antagonista de oxígeno, o inductor de estasis o agente metabólico protector, etc.), la sustancia no debe matar al organismo o las células en el ensayo y el efecto debe ser reversible (es decir, la característica que se altera ha de retomar su nivel antes de la exposición a la sustancia).

[0177] Por supuesto, se entiende que cualquier procedimiento de tratamiento puede usarse en el contexto de una preparación de un medicamento para el tratamiento de o la protección contra la enfermedad o afección especificada. Esto incluye, pero sin limitación, la preparación de un medicamento para el tratamiento de choque hemorrágico o hematológico, heridas y daño tisular, hipertermia, hipotermia, neurodegeneración, sepsis, cáncer y trauma. Además, la divulgación incluye, pero sin limitación, la preparación de un medicamento para un tratamiento para prevenir la muerte, choque, trauma, rechazo de órganos o tejidos, daños causados por la terapia contra el cáncer, neurodegeneración, y heridas o daño tisular.

[0178] Como se ha analizado anteriormente, la estasis orgánica no es ninguno de los siguientes estados: sueño, estado de coma, muerte, anestesiado o convulsión tónico-clónica. Sin embargo, se contempla en algunas realizaciones de la invención, que dichos estados son la meta deseada del empleo de procedimientos, composiciones y artículos de fabricación de la invención. Cualquier realización analizada con respecto a un aspecto de la invención se aplica también a otros aspectos de la invención. Además, las realizaciones pueden combinarse.

[0179] Cualquier realización que implica "exponer" la materia biológica a un compuesto activo también puede implementarse de manera que la materia biológica se proporcione con el compuesto activo o se administre al compuesto activo. El término "proporcionar" se usa de acuerdo su significado ordinario y simple, que significa: "suministrar o proveer para su uso" (Oxford English Dictionary), que, en el caso de los pacientes, puede referirse a la acción realizada por un doctor u otro personal médico que prescribe un compuesto activo particular o lo administra directamente al paciente.

[0180] Las realizaciones en la sección de Ejemplo se entienden como realizaciones de la invención que se aplican a todos los aspectos de la invención.

[0181] El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para referirse a "y/o" a menos que explícitamente se indique que se refiere a alternativas únicamente o que las alternativas son excluyentes entre sí, aunque la divulgación apoya una definición que se refiere únicamente a alternativas y a "y/o".

[0182] A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o procedimiento que se emplea para determinar el valor. En cualquier realización analizada en el contexto de un valor numérico usando junto con el término "aproximadamente", se contempla específicamente que el término aproximadamente puede omitirse.

[0183] Siguiendo la antigua ley de patentes, las palabras "un" y "una", cuando se usan junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones o la memoria descriptiva, representa uno o más, a menos que se indique específicamente.

[0184] Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se dan únicamente a modo de ilustración.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0185] Los siguientes forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos junto con la descripción detallada de realizaciones específicas presentes en el presente documento.

Figura 1 Los queratinocitos humanos sobreviven a la exposición a CO al 100%. Las células se inspeccionaron visualmente usando un microscopio de contraste de fase invertida. La cuantificación del número de queratinocitos viables se determinó por tinción azul de tripán, que es un indicador de la muerte celular.

Figura 2 Discontinuidad de la supervivencia en hipoxia. Se ensayaron las viabilidades hasta la edad adulta tras la exposición a 24 horas de anoxia (N_2 puro), hipoxia intermedia (0,01 kPa de O_2 , 0,05 kPa de O_2 o 0,1 kPa de O_2) o hipoxia leve (0,5 kPa de O_2) en embriones de tipo natural. Todos los puntos de datos son el resultado de al menos 3 experimentos independientes, y los gusanos que no pudieron contarse se redujeron del total.

Figura 3 El monóxido de carbono protege contra hipoxia. Se ensayaron las viabilidades hasta la edad adulta tras la exposición a 24 horas de monóxido de carbono puro, 0,05 kPa de O_2/N_2 o 0,05 kPa de O_2/CO en embriones de tipo natural. Todos los puntos de datos son el resultado de al menos 3 experimentos independientes, y los gusanos que no pudieron contarse se redujeron del total.

Figura 4A La tasa metabólica disminuye antes de la temperatura corporal interna cuando los ratones se exponen a ácido sulfhídrico. La exposición de ratones a 80 ppm (a 0 minutos en el eje X) como resultado un descenso de aproximadamente 3 veces la producción de CO_2 (línea de color negro) en menos de cinco minutos. Esto precede a la caída de la temperatura interna del animal hacia la temperatura ambiente (línea de color gris).

Figura 4B Temperatura de ratones expuestos a ácido sulfhídrico. Cada traza representa una medición continua de la temperatura corporal interna en un ratón individual expuesto a 80 ppm de H_2S , o a aire ambiental. Los números del eje vertical son la temperatura en ° Celsius. En el eje horizontal, los números reflejan el tiempo en horas. Los experimentos se realizaron durante 6 horas seguidos de registros de la recuperación. El punto de comienzo está en 1:00, y el final del tratamiento de 6 h es aproximadamente 7:00,

Figura 5 La exposición a 80 ppm de ácido sulfhídrico hace que la temperatura corporal interna de un ratón alcance la temperatura ambiente. El gas se puso en marcha y la temperatura descendió partiendo de un tiempo 0:00. La atmósfera se intercambiaba de nuevo a aire ambiental en el momento 6:00. Los triángulos indican la temperatura corporal interna del ratón según se determina por radiotelemetría. Ésta fue aproximadamente 39 °C en el momento 0:00. Los rombos indican la temperatura ambiente que se redujo de 23 °C a 13 °C en las primeras 3 horas del experimento, y después se aumentó de nuevo hacia 23 °C desde la hora 6:00, estabilizándose sobre la hora 9:00.

Figura 6 La velocidad de la caída de la temperatura corporal interna depende de la concentración de ácido sulfhídrico dado a los ratones. Todas las líneas representan la temperatura corporal interna de un único ratón como se determinó por radiotelemetría. Los ratones sometidos a 20 ppm y 40 ppm de H_2S muestran menores caídas de la temperatura interna. La exposición a 60 ppm indujo una caída sustancial de la temperatura que comenzó aproximadamente a la hora 4:00. El ratón expuesto a 80 ppm mostró una caída sustancial de la temperatura que comenzó aproximadamente a la hora 2:00.

Figura 7 Menor temperatura corporal interna. La menor temperatura corporal interna registrada para un ratón expuesto a 80 ppm de ácido sulfhídrico fue 10,7 °C. Los triángulos indican la temperatura corporal interna del ratón según se determinó por radiotelemetría, que se inició en aproximadamente 39 °C en el momento 0. Los rombos indican la temperatura ambiente que comenzó en aproximadamente 23 °C y se redujo a menos de 10 °C por el punto medio del experimento, después de lo cual aumentó de nuevo hacia la temperatura ambiente.

Figura 8A Se aumentan los niveles endógenos de ácido sulfhídrico en ratones aclimatados a temperaturas calientes. Las barras de color gris (dos barras a la izquierda) indican concentraciones endógenas de H_2S de dos ratones individuales aclimatados a 4 °C; las barras de color negro (dos barras a la derecha) indican las concentraciones endógenas de H_2S de dos ratones individuales aclimatados a 30 °C. Concentración de ácido sulfhídrico determinada por CG/EM.

Figura 8B Efectos de la temperatura ambiente sobre una caída de la temperatura dependiente de ácido sulfhídrico. La velocidad de la caída de la temperatura interna (expresada en grados centígrados) debido a una exposición a ácido sulfhídrico depende de la temperatura de aclimatación. Los ratones se expusieron al gas a 1:00. Los triángulos indican la temperatura corporal interna del ratón, aclimatado a 12 °C, como se determinó por radiotelemetría. Los cuadrados indican la temperatura corporal interna del animal aclimatado a 30 °C.

La **figura 9** es un diagrama de bloques que ilustra un sistema de administración de gas de respiración de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

La **figura 10** es un dibujo esquemático que ilustra un sistema de administración de gas de respiración de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

La **figura 11** es un dibujo esquemático que ilustra un sistema de administración de gas de respiración de acuerdo con realizaciones adicionales de la presente invención.

La **figura 12** es un diagrama de flujo que ilustra operaciones de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

La **figura 13** es un dibujo esquemático que ilustra un sistema de administración de gas de tratamiento tisular de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

La **figura 14** es un diagrama de flujo que ilustra operaciones de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

La **figura 15** La inhibición metabólica protege contra la muerte inducida por hipotermia en Nematodos. Los Nematodos expuestos a temperaturas frías (4 °C) no pueden sobrevivir después de 24 horas. Sin embargo, si se mantienen en condiciones anóxicas durante el periodo de hipotermia (y durante un periodo de 1 hora antes y después), una proporción sustancial de los nematodos sobrevive.

La **figura 16** Un pretratamiento corto con CO₂ conduce a la mayor extensión de supervivencia anóxica. Se expusieron moscas adultas a CO₂ al 100% durante el tiempo indicado, la atmósfera se hizo anóxica mediante lavado con N₂, y después el tubo se cerró herméticamente. Después de 22 h, los tubos se abrieron al aire ambiental. Se dejó que las moscas se recuperasen durante 24 h antes de clasificar la viabilidad.

Figura 17 El CO₂ mejora de forma variable la supervivencia anóxica. Las moscas adultas se hicieron anóxicas en un experimento de flujo bajo, directamente del aire ambiental (sin pretratamiento) o después de exponerse a CO₂ al 100% durante 10 min. Después del tiempo indicado, los tubos se abrieron al aire ambiental. Se dejó que las moscas se recuperasen durante 24 h antes de clasificar la viabilidad.

Figura 18 Se añadieron 50 ppm de H₂S a CO que aumentó la fracción de moscas que sobreviven a la anoxia. Las moscas adultas se hicieron anóxicas en experimentos de flujo bajo, directamente del aire ambiental (sin pretratamiento) o después se exponerse a 50 ppm de H₂S equilibrado con CO.

La **figura 19** es un diagrama esquemático de un sistema ejemplar para eliminar el oxígeno de las plaquetas y una solución de acuerdo con realizaciones de la presente divulgación.

La **figura 20A-B** muestran el cambio en la temperatura interna de ratas expuestas a ácido sulfhídrico (A) y ratones expuestos a dióxido de carbono (B).

Figura 21 La matriz de gas muestra un plan experimental por etapas para determinar la concentración de compuestos activos.

La **figura 22A-B** muestran dispositivos de presión negativa que pueden usarse para entregar o administrar compuestos activos.

Figura 23 Supervivencia de ratones oxígeno al 5%. Los ratones se expusieron a 30 minutos de aire ambiental antes de la exposición a O₂ al 5% (control; línea de color negro; n = 9) o 10 minutos de aire ambiental seguido de 20 minutos de 150 ppm de H₂S antes de la exposición a O₂ al 5% (experimental; línea de color rojo; n = 20) y su longitud de supervivencia se midió. Los experimentos se detuvieron a los 60 minutos y si los animales aún estaban vivos (cada uno de los experimentos, ninguno de los controles) se devolvieron a sus jaulas.

Figura 24 El H₂S aumenta la supervivencia a tensiones de oxígeno letales. El diagrama muestra resultados del experimento que se ha descrito en la figura 23. El eje x muestra el tiempo en minutos que los ratones sobrevivieron en las menores tensiones de oxígeno. Las barras oscuras muestran cuando el H₂S está ausente, mientras que las barras más claras muestran cuando está presente el H₂S. En los últimos grupos, los ratones se expusieron a 150 ppm de H₂S antes de que la tensión de oxígeno se redujera entre el 5% y el 2,5%. Los tiempos de supervivencia se midieron y fueron al menos de 60 minutos en todos los grupos tratados con H₂S.

Figura 25 Tasa metabólica de un ratón en oxígeno al 5%. Un ratón se expuso a 10 minutos de aire ambiental seguido de 20 minutos de 150 ppm de H₂S antes de la exposición a O₂ al 5%. La tasa metabólica se midió mediante salida de CO₂. La pre-exposición a la salida de CO₂ fue aproximadamente 2500 ppm, después de 20 minutos de H₂S entonces la tasa metabólica se redujo aproximadamente 2 veces, y después de varias horas de exposición a O₂ al 5%, la salida de CO₂ cayó aproximadamente 50 veces de los niveles de pre-exposición a aproximadamente 50 ppm. A la hora 6, el ratón se devolvió a aire ambiental y se dejó que se recuperase. Estos datos son de uno de los ratones incluidos en figura 23 (grupo experimental).

Figura 26 Ratón expuesto a 100 ppb de H₂Se. El gráfico muestra una exposición a H₂Se en minutos (eje x) con una caída de la temperatura corporal interna (temperatura en celsius mostrada a la derecha representada con una línea que muestra un descenso gradual) y con un descenso de la respiración (CO₂ en ppm mostrado a la izquierda representado con una línea dentada que muestra un descenso).

Figura 27 Ratón expuesto a 10 ppb de H₂Se. La gráfica muestra una exposición a H₂Se en minutos (eje x) con una caída de la temperatura corporal interna (temperatura en celsius mostrada a la derecha representada con una línea que muestra un descenso gradual) y con un descenso de la respiración (CO₂ en ppm mostrado a la izquierda representado con una línea dentada que muestra un descenso con el punto más bajo en el minuto cinco de exposición).

Figura 28 El pretratamiento con H₂S mejora la supervivencia de ratones en condiciones hipóxicas. Los ratones se expusieron a 30 minutos de aire ambiental (sin PT) o 10 minutos de aire ambiental seguido de 20 minutos de 150 ppm de H₂S (PT) antes de una exposición a O₂ al 5% (5%), O₂ al 4% (4%), O₂ al 5% durante 1 h seguido de O₂ al 4% (4% + 1 h al 5%), o O₂ al 5% durante 1 h seguido de O₂ al 3% (3% + 1 h al

5%), y su longitud de la supervivencia se midió. Los experimentos se detuvieron a los 60 minutos, y si los animales aún estaban vivos, se devolvieron a sus jaulas.

Figura 29 Producción de CO₂ durante la transición a hipoxia letal. Los cambios en la producción de CO₂ tras la transición a O₂ al 5% u O₂ al 4% se midieron en ratones expuestos a aire ambiental durante 30 minutos (sin PT) o aire ambiental durante 10 minutos seguido de 150 ppm de H₂S durante 20 minutos (PT). Además, se midió el cambio en la producción de CO₂ tras una transición por etapas a O₂ al 5% durante 1 h seguido de O₂ al 4%. El porcentaje de cambio en la producción de CO₂ se representa con un error típico indicado.

Figura 30 Los queratinocitos humanos sobreviven a la exposición a monóxido de carbono al 100% (CO). Las células se inspeccionaron visualmente usando un microscopio de contraste de fase invertida. La cuantificación del número de queratinocitos viables se determinó por tinción azul de tripán, que es un indicador de la muerte celular.

Figura 31 Una exposición crónica a bajos niveles de H₂S conduce a una resistencia térmica en *C. elegans*. Los nematodos adaptados a entornos que contenían aproximadamente 50 ppm de H₂S en aire doméstico, eran significativamente más resistentes a los efectos letales de la elevación de la temperatura ambiente a 35 grados C en comparación con sus hermanos criados únicamente en aire doméstico.

Figura 32 Una exposición crónica a bajos niveles de H₂S aumenta la esperanza de vida en *C. elegans*. Los nematodos que se adaptaron a entornos que contenían aproximadamente 50 ppm de H₂S en aire doméstico tenían una esperanza de vida mayor en comparación con los controles no tratados.

Figura 33 Ejemplos de caída de la temperatura interna transitoria en ratas Sprague-Dawley. Mediciones de la temperatura interna de ratas expuestas a ácido sulfúrico al 0,03% mezclado con aire ambiental (línea de color gris/discontinua) o dióxido de carbono al 15%/oxígeno al 8%/helio al 77% (línea oscura/continua). En este experimento, la temperatura de la cámara ambiental fue de 10 °C durante la fase de tratamiento. La temperatura de la cámara ambiental se restauró a la temperatura ambiente (22 °C) cuando el gas regresó al aire ambiental. En cada caso, este fue el punto (aproximadamente 2 horas para la línea oscura/continua y aproximadamente 7,4 horas para la línea de color gris/discontinua) donde la temperatura interna comenzó a ascender.

Figura 34 Temperatura corporal interna del ratón durante una exposición a 1,2 ppm de selenuro ácido durante 2 horas y 10 minutos en aire ambiental a 5 °C de temperatura ambiente.

Figura 35 Temperatura corporal interna de la rata durante una exposición a aire ambiental en una cámara ambiental a una temperatura ambiente de 10 °C. La línea oscura describe la temperatura interna de la rata. La línea de color gris describe la temperatura ambiente.

Figura 36 Temperatura corporal interna de una rata expuesta a helio al 80%, oxígeno al 20% y a una temperatura ambiente de 7 °C. El tiempo se describe en el eje X en horas. El tiempo total de exposición fue aproximadamente 5 horas (de 9:15 AM a 2:15 PM). No se observó una caída significativa de la n temperatura corporal interna.

Figura 37 Temperatura corporal interna de una rata durante la exposición a dióxido de carbono al 15%, oxígeno al 20%, y helio al 75% a una temperatura ambiente de 7 °C. El tiempo de exposición fue de aproximadamente 2 horas. La rata se expuso a aire ambiental que comenzó en el punto en el que la temperatura comenzó a subir (poco después de que el punto marcara 38512,6). Durante el periodo en el que la rata se expuso a aire ambiental, la temperatura del entorno se restauró a la temperatura ambiente.

Figura 38. Temperatura interna de una rata expuesta a dióxido de carbono al 15%, oxígeno al 8% y helio al 77% a una temperatura ambiente de 7 °C. El tiempo de exposición fue de aproximadamente 4 horas. La línea de color gris describe la temperatura ambiente. La línea oscura describe la temperatura interna. En el punto en el que la temperatura ambiente y la interna se elevan es el punto en el que el gas se cambia a aire ambiental.

Figura 39. Temperatura interna de un perro expuesto a dióxido de carbono/helio/oxígeno. Son líneas de puntos cuando el gas pasa (aproximadamente 24 minutos) y sale (aproximadamente 55 minutos).

Figura 40. Temperatura interna de un perro expuesto a concentraciones en aumento de dióxido de carbono. Las líneas de puntos indican cuando se hicieron los cambios en el gas. En aproximadamente 63 minutos, el gas se cambió de aire ambiental a dióxido de carbono al 9% en aire ambiental. En aproximadamente 85 minutos, la atmósfera se cambió de dióxido de carbono al 9% en aire ambiental a dióxido de carbono al 12% en aire ambiental. En aproximadamente 115 minutos, la atmósfera se cambió de dióxido de carbono al 12% en aire ambiental a dióxido de carbono al 15% en aire ambiental. El experimento acabó en aproximadamente 135 minutos.

Figura 41 Aparato empleado en procedimientos de detección.

Figura 42 Consumo de oxígeno (barras de color gris) y producción de dióxido de carbono (barras de color negro) de animales expuestos a ácido sulfhídrico durante 4 horas por día durante al menos 1 semana y para animales de control que se expusieron a las mismas condiciones carentes de ácido sulfhídrico.

Figura 43 Cociente respiratorio para animales expuestos a ácido sulfhídrico durante 4 horas por día durante al menos 1 semana (H_2S 2900 y H_2S 2865) y para animales de control (2893 y 2894) que se expusieron a las mismas condiciones carentes de ácido sulfhídrico.

5 DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

I. Estasis

[0186] En la "estasis" o "animación suspendida", una célula, tejido u órgano, u organismo (denominado comúnmente como "material biológico") está vivo, pero las funciones celulares necesarias para la división celular, la evolución del desarrollo y/o el estado metabólico se ralentizan o incluso se detienen. Este estado es deseable en varios contextos. La estasis puede usarse como un procedimiento para conservación por sí mismo, o puede inducirse como parte de un régimen de crioconservación. Los materiales biológicos pueden conservarse para su uso en investigación, para su transporte, para trasplante, para tratamiento terapéutico, (tal como terapia *ex vivo*), y para impedir la aparición de trauma, por ejemplo. La estasis con respecto a organismos enteros tiene usos similares. Por ejemplo, el transporte de organismos puede facilitarse si han entrado en estasis. Esto puede reducir el daño físico y psicológico al organismo reduciendo o eliminando el estrés o una lesión física. Estas realizaciones se analizan en más detalle a continuación. La estasis puede ser beneficiosa disminuyendo la necesidad del material biológico de oxígeno y, por lo tanto, del flujo sanguíneo. Puede prolongar el periodo de tiempo que el material biológico puede aislarse en un entorno de sustentación vital y exponerse a un entorno de inducción de muerte.

[0187] Aunque se ha informado de una recuperación de hipotermia accidental durante un periodo de tiempo relativamente prolongado (Gilbert y col., 2000), ha habido un reciente interés en inducir de forma intencionada la animación suspendida en organismos (El análisis de cualquier referencia no debe interpretarse como una admisión de que la referencia constituye la técnica anterior. De hecho, algunas referencias analizadas en el presente documento no serán una técnica anterior con respecto a las solicitudes de prioridad). Se ha explorado la hipertermia controlada, así como la administración de un enjuague frío de una solución en la aorta (Tisherman, 2004), la inducción de parada cardíaca (Behringer y col., 2003), o la animación suspendida inducida por óxido nítrico (Teodoro y col., 2004).

[0188] Un organismo en estasis puede distinguirse de un organismo bajo anestesia general. Por ejemplo, un organismo en estasis leve (disminución entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 veces de la respiración celular) que se expone a aire ambiental comenzará a temblar, mientras que un organismo bajo anestesia no lo hará. Además, un organismo en estasis leve se anticipa a responder a un apretón del dedo del pie, mientras que un organismo bajo anestesia normalmente no. En consecuencia, la estasis no es igual bajo anestesia a como se practica comúnmente.

[0189] La producción de CO_2 es un marcador directo de la respiración celular relacionada con el metabolismo de un organismo. Puede distinguirse de la "evolución de CO_2 " que se refiere a la cantidad de CO_2 soplado fuera de los pulmones. Ciertos compuestos activos, por ejemplo, ácido sulfhídrico, pueden inhibir la actividad de la anhidrasa carbónica en los pulmones, inhibiendo esto la conversión de carbonato en CO_2 y su liberación de la sangre pulmonar, mostrando así una reducción asociada de la evolución de CO_2 , sin un descenso correspondiente en la producción de CO_2 celular.

[0190] La presente invención se basa en la observación de que ciertos tipos de compuestos inducen de forma eficaz la estasis reversible en la materia biológica. Otras solicitudes de patente analizan la inducción de estasis, incluyendo las siguientes: solicitudes de patente de Estados Unidos 10/971.576, 10/972.063 y 10/971.575; solicitud de patente de Estados Unidos 10/971.576; solicitud de patente de Estados Unidos 10/972.063; y solicitud de patente de Estados Unidos 10/971.575, cada una de las cuales se incorpora por la presente por referencia.

A. Termorregulación

[0191] La estasis en un animal de sangre caliente afectará a la termorregulación. La termorregulación es una característica de los animales denominados "de sangre caliente", que permite que el organismo mantenga una temperatura corporal interna relativamente constante incluso cuando se expone a temperaturas ambientales significativamente alteradas (frío o calor). La capacidad de controlar la termorregulación por inducción de estasis es un aspecto de la invención, y permite usos similares a los que se han analizado anteriormente.

[0192] La termorregulación puede facilitarse mediante la colocación de organismos, extremidades u órganos o

tejidos aislados en cámaras/dispositivos, cuya temperatura puede controlarse. Por ejemplo, habitaciones calientes o dispositivos tipo cámaras similares a las cámaras hiperbáricas pueden incluir un organismo entero y estar conectados a aparatos termorreguladores. También se contemplan dispositivos más pequeños, tales como mantas, mangas, puños o guantes (por ejemplo, el sistema de refrigeración CORE CONTROL de AVAcore Technologies, 5 Palo Alto, CA, patente de Estados Unidos 6.602.277). Dichas cámaras/dispositivos pueden usarse tanto para aumentar o para reducir la temperatura ambiente.

B. Materia biológica

10 **[0193]** La materia biológica contemplada para su uso con la presente invención incluye un material obtenido de invertebrados y vertebrados, incluyendo mamíferos; los materiales biológicos incluyen organismos. Además de seres humanos, la invención puede emplearse con respecto a mamíferos de importancia veterinaria o agrícola, incluyendo aquellos de las siguientes clases: canina, felina, equina, bovina, ovina, murina, porcina, caprina, roedores, lagomorfo, lupino y osuno. La invención también se extiende a los peces y aves. A continuación se desvelan otros 15 ejemplos.

[0194] Además, el tipo de materia biológica varía. Puede ser células, tejidos y órganos, así como organismos para los que las diferentes composiciones, procedimientos y aparatos tienen importancia.

20 **[0195]** En algunas realizaciones, el material biológico es o comprende células. Se contempla que la célula puede ser cualquier célula que utiliza oxígeno. La célula puede ser eucariota o procariota. En ciertas realizaciones, la célula es eucariota. Más particularmente, en algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. Las células de mamífero contempladas para su uso con la invención incluyen, pero sin limitación, aquellas que se forman a partir de: ser humano, mono, ratón, rata, conejo, hámster, cabra, cerdo, perro, gato, hurón, vaca, oveja y caballo.

25 **[0196]** Además, las células de la invención pueden ser diploides, pero en algunos casos, las células son haploides (células sexuales). Además, las células pueden ser poliploides, aneuploides o anucleadas. La célula puede ser de un tejido u órgano particular, tal como uno del grupo que consiste en: corazón, pulmón, riñón, hígado, médula ósea, páncreas, piel, hueso, vena, arteria, córnea, sangre, intestino delgado, intestino grueso, cerebro, médula espinal, 30 músculo liso, músculo esquelético, ovario, testículo, útero y cordón umbilical. Además, la célula también puede estar caracterizada como uno de los siguientes tipos celulares: plaqueta, mielocito, eritrocito, linfocito, adipocito, fibroblasto, célula epitelial, célula endotelial, célula de músculo liso, célula músculo esquelética, célula endocrina, célula glial, neurona, célula secretora, célula con función de barrera, célula contráctil, célula de absorción, célula mucosal, célula limbar (córnea), células madre (totipotentes, pluripotentes o multipotentes), ovocitos no fertilizados o 35 fertilizados, o esperma.

1. Fuentes Diferentes

40 **[0197]** Los siguientes son ejemplos de fuentes a partir de las cuales puede obtenerse una materia biológica. Las realizaciones de la invención incluyen, pero sin limitación, estos ejemplos.

a. Mamíferos

45 **[0198]** En ciertos aspectos de la invención, el mamífero es del Orden monotremas, marsupiales, insectívoros, macroscelídeos, dermópteros, quirópteros, escandentios, primates, xenartros, folíidos, tubulidentados, lagomorfos, roedores, cetáceos, carnívoros, proboscídeos, hiracoídeos, sirenios, perisodáctilos, o artiodáctilos.

[0199] Los ejemplos de monotremas incluyen las Familias taquiglósidos (por ejemplo, equidnas) y ornitorrínquidos (por ejemplo, ornitorrinco). Los ejemplos de marsupiales incluyen las Familias didélfidos (por ejemplo, pódums), 50 microbiotéridos (por ejemplo, Monito del Monte), cenoléstidos (por ejemplo, ratones runchos), dasiúridos (por ejemplo, ratones marsupiales), *Myrmecobiidae* (por ejemplo, numbat), tilacínidos (por ejemplo, tilacino), peramélidos (por ejemplo, bandicots), *Macrotis* (por ejemplo, conejo bandicot), notorictídeos (por ejemplo, topos marsupiales), falangéridos (por ejemplo, cuscuses), petáuridos (por ejemplo, lémur de cola de anillo, lémur planeador), burramidos (por ejemplo, zarigüella pigmea), macropódidos (por ejemplo, canguros, ualabíes), *Tarsipedidae* (por ejemplo, 55 falangero mielero), vombátidos (por ejemplo, uómbats), y fascalárcidos (por ejemplo, koalas).

[0200] Los insectívoros incluyen, por ejemplo, las Familias *Solenodontidae* (por ejemplo, soledones), tenrécidos (por ejemplo, tenrecs, musaraña nutria), crisolóridos (por ejemplo, topos dorados), erinaceidos (por ejemplo, erizos, rata lunar), sorícidos (por ejemplo, musarañas), y tálpidos (por ejemplo, topos, desmanes). El Orden macroscelídeos

incluye la Familia *Macroscelididae* (por ejemplo, musarañas elefante). El Orden escandentios incluye *Tupaiaidae* (por ejemplo, musarañas arborícolas). El Orden dermópteros incluye la Familia *Cynocephalidae* (por ejemplo, lémures voladores). Los quirópteros incluyen las Familias *Pteropodidae* (por ejemplo, murciélagos de la fruta, zorros voladores), rinopomátidos (por ejemplo, murciélagos de cola de ratón), *Craseonycteridae* (por ejemplo, murciélago nariz de cerdo de Kitti o murciélago moscardón), embalonúridos (por ejemplo, murciélago de cola de vaina de Seychelles), nictéridos (por ejemplo, murciélago africano de cara hendida), megadermátidos (por ejemplo, falsos vampiros), rinolófidos (por ejemplo, murciélagos de herradura), *Noctilionidae* (por ejemplo, murciélago Bulldog, murciélago pescador), mormoopidos, filostómidos (por ejemplo, murciélagos de nariz de hoja del Nuevo Mundo), natálidos, furiptéridos, tiroptéridos, *Myzopodidae*, vespertilióridos (por ejemplo, murciélago común), mistacínidos (por ejemplo, murciélagos de cola corta), y molósidos (por ejemplo, murciélagos sin cola).

[0201] El Orden Primates incluye las Familias lemúridos (por ejemplo, lémures), quirogaleidos (por ejemplo, lémures ratón), índridos (por ejemplo, indri, lémures lanudos), *Daubentoniidae* (por ejemplo, Aye-Aye), lorísidos (por ejemplo, loris, galágidos, gálagos), tarseros (por ejemplo, tarsios), cébidos (por ejemplo, monos del nuevo mundo, calitricidos, tamarinos), hilobátidos (por ejemplo, gibones), póngidos (por ejemplo, simios), y homínidos (por ejemplo, seres humanos).

[0202] Los ejemplos de xenartros incluyen mirmecofágidos (por ejemplo, osos hormigueros), *Bradypodidae* (por ejemplo, perezosos tridáctilos), megaloníquidos (por ejemplo, perezosos didáctilos), y dasipódidos (por ejemplo, armadillos). Los ejemplos de folídotos incluyen Manis (por ejemplo, pangolines). Los ejemplos de tubulidentados incluyen *Orycteropodidae* (por ejemplo, cerdo hormiguero). Los ejemplos de lagomorfos incluyen ocotónidos (por ejemplo, picas) y lepóridos (por ejemplo, liebres y conejos).

[0203] El Orden roedores incluye las Familias *Aplodontidae* (por ejemplo, castores de montaña), esciúridos (por ejemplo, ardillas, marmotas, ardillas rayadas), geómidos (por ejemplo, taltuzas), heterómidos (por ejemplo, ratones de abazones, ratones canguro), castóridos (por ejemplo, castor), anomalúridos (por ejemplo, falsas ardillas voladoras), *Pedetidae* (por ejemplo, liebre saltadora), múridos (por ejemplo, ratas y ratones), glíridos (por ejemplo, lirones), *Selevinidae* (por ejemplo, lirón del desierto), *Zapodidae* (por ejemplo, Ratones saltarines), dipódidos (por ejemplo, jerbos), histricidos (por ejemplo, puercoespines del Viejo Mundo), eretizóntidos (por ejemplo, puercoespines del Nuevo Mundo), cávidos (por ejemplo, conejillos de Indias, maras), *Hydrochaeridae* (por ejemplo, capibara), dinómidos (por ejemplo, pacarana), dasipróctidos (por ejemplo, pacas), dasipróctidos (por ejemplo, agutíes), chinchillidos (por ejemplo, chinchillas, vizcachas), capromiidos (por ejemplo, jutías), *Myocastoridae* (por ejemplo, nutria), *Ctenomyidae* (por ejemplo, tuco tucos), octodóntidos (por ejemplo, octodontes, degües), *Abrocomidae* (por ejemplo, ratas chinchilla), equimiidos (por ejemplo, ratas espinosas), *Thryonomyidae* (por ejemplo, ratas de bastón), *Petromyidae* (por ejemplo, rata damán), *Bathyergidae* (por ejemplo, ratas topo), y ctenodactílicos (por ejemplo, gundis).

[0204] El Orden cetáceos incluye las Familias ínidos (por ejemplo, delfín rosado), *Lipotidae*, *Platanistidae*, *Pontoporiidae*, *Ziphiidae* (por ejemplo, zifios), fisetéridos (por ejemplo, cachalotes), monodóntidos (por ejemplo, beluga, narval), delfínidos (por ejemplo, delfines marinos, orcas), focénidos (por ejemplo, marsopas), balenoptéridos (por ejemplo, rorcuales), balénidos (por ejemplo, ballenas francas), y escrióntidos (por ejemplo, ballenas grises).

[0205] El Orden Carnívoros incluye las Familias cánidos (por ejemplo, perros, zorros, lobos, chacales, coyotes), úrsidos (por ejemplo, osos), procióntidos (por ejemplo, mapaches, coatíes, quincayúes, Pandas menores), *Ailuropodidae* (por ejemplo, pandas gigantes), mustélidos (por ejemplo, comadrejas, mofetas, tejones, nutrias), vivéridos (por ejemplo, civetas, ginetas), herpéstidos (por ejemplo, mangostas), *Proteridae* (por ejemplo, lobo de tierra), hiénidos (por ejemplo, hienas), félidos (por ejemplo, gatos), otáridos (por ejemplo, focas orejadas, leones marinos), *Odobenidae* (por ejemplo, morsas), y fócidos (por ejemplo, focas).

[0206] El Orden Proboscídeos incluye la familia elefántidos (por ejemplo, elefantes). Los hiracoideos incluyen la familia *Procaviidae* (por ejemplo, damanes). Los sirenios incluyen las Familias dugóngidos (por ejemplo, dugón) y triquéquidos (por ejemplo, manatíes). El Orden perisodáctilos incluye las Familias équidos (por ejemplo, caballos, asnos, cebras), tapíridos (por ejemplo, tapires), y rinocerótidos (por ejemplo, rinocerontes). El Orden artiodáctilos incluye las Familias suídeos (por ejemplo, cerdos, babirusa), tayasuídeos (por ejemplo, pecaríes), hipopotámidos (por ejemplo, hipopótamos), camélidos (por ejemplo, camellos, llamas, vicuñas), tragúlidos (por ejemplo, vionís), mósquidos (por ejemplo, ciervos almizcleros), cérvidos (por ejemplo, ciervo, uapití, alce), jiráfidos (por ejemplo, jirafa, okapi), antilocápridos (por ejemplo, berrendo), y bóvidos (por ejemplo, vaca, oveja, antílope, cabras).

b. Reptiles

[0207] En ciertas realizaciones, el material biológico es un reptil o se obtiene a partir de un reptil. El reptil puede ser del Orden quelónidos, *Pleurodira*, escamosos, rincocéfalos, o crocodilios. Un reptil del Orden quelónidos puede ser, por ejemplo, una tortuga boba papuana, un quelídrido (por ejemplo, tortugas mordedoras), *Cheloniidae* (por ejemplo, tortuga Carey marina, tortugas verdes), *Dermatemyidae* (por ejemplo, tortuga laúd), emídidos (por ejemplo, tortugas pintadas, tortuga de orejas amarillas, tortuga escurridiza, tortugas come caracoles, tortugas de caja), quinostérnidos (por ejemplo, tortugas apestosas), *Saurotypidae*, testudínidos (por ejemplo, tortuga gigante de Floreana, tortugas del desierto, tortugas de Aldabra, tortuga mora, tortuga mediterránea), trioníquidos (por ejemplo, tortuga china de caparazón blando, tortuga de caparazón blando espinosa), o un *Platysternidae*. Un reptil del Orden *Pleurodira* puede ser, por ejemplo, un quelido (por ejemplo, tortuga de cuello de serpiente) o *Pelomedusidae* (por ejemplo, tortuga de escudo africana).

[0208] Un reptil del Orden escamosos puede ser, por ejemplo, un agámido (por ejemplo, lagartos arcoiris, dragones barbudos, calotes versicolor, lagartos de cola espinosa), *Chamaeleontidae* (por ejemplo, camaleones), iguánidos (por ejemplo, anoles, basiliscos, lagartos de collar, iguanas, lagartos cornudos, chachahuas, lagartija escamosa de artemisa, utas), geconidos (por ejemplo, geckos), *Pygopodidae*, teídeos (por ejemplo, lagartos corredores, lagarto overo), lacértidos (por ejemplo, lagartos ágiles, lagartos ocelados, lagartijas vivíparas, lagartijas roqueras, Falso Anolis), xantusidos, escíncidos (por ejemplo, escincos), *Cordylidae* (por ejemplo, lagartos de cola pinchuda), *Dibamidae*, *Xenosaurus*, ánguinos (por ejemplo, lucián, lagarto aligátor, Sheltopusik, lagartos de cristal), *Helodermatidae* (por ejemplo, Monstruo de Gila), *Lanthanotidae*, varánidos (por ejemplo, Dragones de Komodo), *Leptotyphlopidae*, tiflopídeos, *Anomalepididae*, *Aniliidae* (por ejemplo, serpientes tubo), *Uropeitidae*, *Xenopeltidae*, *Boidae* (por ejemplo, Boas, Anacondas, pitón de Seba), *Acrochordidae* (por ejemplo, serpientes verrugosas), colúbridos (por ejemplo, serpientes manglar, serpientes látigo, coronellas, serpientes comedoras de huevos, boomslangs, serpientes ratoneras, culebra de Esculapio, culebra de cuatro rayas, serpiente asiática de la belleza, serpientes tentaculadas, serpientes de hocico elevado, serpientes reales, culebra de Montpelier, culebras de collar, culebra de agua, serpientes ligero, serpientes rama, serpientes Keelback), elápidos (por ejemplo, víboras de la muerte, craits, mambas, serpientes de coral, cobras, copperhead, víbora bufadora), vipéridos (por ejemplo, víboras, víbora común europea, serpientes de cascabel, Massasaugas, crócalos), *Hydrophiidae* (por ejemplo, Serpiente de mar), anfisbenas (por ejemplo, culebrillas ciegas), *Bipedidae* o a *Trogonophidae* (por ejemplo, lagarto excavador).

[0209] Un reptil del orden esfenodontos puede ser, por ejemplo, un *Sphenodontidae* (por ejemplo, tuátaras). Puede ser un reptil del orden crocodilios, por ejemplo, un (por ejemplo, cocodrilos, caimanes), aligatónidos, crocodilios (por ejemplo, cocodrilos) o un gaviálidos (por ejemplo, gaviales).

35 c. Anfibios

[0210] El material biológico de la presente invención puede ser un anfibio o puede obtenerse de un anfibio. Los anfibios pueden ser, por ejemplo, una rana o un sapo. La rana o sapo puede ser, por ejemplo, un artroléptido (por ejemplo, ranas chillonas), *Ascaphidae* (por ejemplo, ranas con cola), braquicéfalo (por ejemplo, rana dorada y sapo limosa), bufónidos (por ejemplo, sapos verdaderos), centrolénidos (por ejemplo, ranas de cristal y las ranas hoja), dendrobátidos (por ejemplo, ranas venenosas), Discoglósidos (por ejemplo, sapos vientre de fuego), *Heleophrynidae* (por ejemplo, ranas fantasmas), Hemisotidae (por ejemplo, ranas nariz de pala), *Hylidae* (por ejemplo, Ranas del nuevo mundo), *Hyperoliidae* (por ejemplo, ranas arborícolas africanas), *Leiopelmatidae* (por ejemplo, ranas de Nueva Zelanda), *Leptodactylidae* (por ejemplo, ranas neotropicales), *Megophryidae* (por ejemplo, ranas del sur de Asia), *Microhylidae* (por ejemplo, ranas diminutas), *Myobatrachidae* (por ejemplo, Ranas australianas), *Pelobatidae* (por ejemplo, sapos de espuelas), *Pelodytidae* (por ejemplo, sapillo moteado), *Pipidae* (por ejemplo, ranas sin lengua), *Pseudidae* (por ejemplo, ranas paradoja), *Ranidae* (por ejemplo, ranas ribereñas y ranas verdaderos), *Rhacophoridae* (por ejemplo, ranas arborícolas del viejo mundo), *Rhinodermatidae* (por ejemplo, ranas de Darwin), *Rhinophrynidae* (por ejemplo, sapo cavador), *Sooglossidae* (por ejemplo, ranas de las Seychelle), caudados (por ejemplo, salamandras) o un gimnofione (por ejemplo, cecilias).

[0211] El anfibio puede ser una salamandra. La salamandra puede ser, por ejemplo, un *Ambystomatidae* (por ejemplo, salamandras topo), *Amphiumidae* (por ejemplo, anfiumas), *Cryptobranchidae* (por ejemplo, salamandras gigantes y Hellbender), *Dicamptodontidae* (por ejemplo, salamandras gigantes pacíficas), *Hynobiidae* (por ejemplo, salamandras asiáticas), *Plethodontidae* (por ejemplo, salamandras apulmonadas), proteidos (por ejemplo, proteos y perros de agua), *Rhyacotritonidae* (por ejemplo, salamandras olímpicas), salamándridos (por ejemplo, tritones y salamandras), o un sirénido (por ejemplo, sirenas). Como alternativa, el anfibio puede ser un Caecilian. El Caecilian puede ser, por ejemplo, un *Caeciliidae* (por ejemplo, cecilios), ictiofido (por ejemplo, cecilios asiáticos con cola), *Rhinatreumatidae* (por ejemplo, cecilios neotropicales con cola), *Scolecomorphidae* (por ejemplo, cecilios Africanos),

Typhlonectidae (por ejemplo, cecilios acuáticos), o un Uraeotyphlidae (por ejemplo, cecilio Indio).

d. Aves

- 5 **[0212]** El material biológico de la presente invención puede ser un ave, o puede obtenerse a partir de un ave. El ave puede ser, por ejemplo, un Anseriforme (por ejemplo, aves acuáticas), Apodiforme (por ejemplo, colibríes y vencejos), Caprimulgiforme (por ejemplo, aves noctámbulas), Charadriiforme (por ejemplo, aves playeras), Ciconiiforme (por ejemplo, cigüeñas), Coliiforme (por ejemplo, aves ratón), Columbiforme (por ejemplo, palomas y pichones), Coraciiforme (por ejemplo, Martín pescador), Craciiforme (por ejemplo, chacalacas, Pavones, pavas de Monte, megápodos), Cuculiforme (por ejemplo, cucos, hoatzin, turacos), Falconiforme (por ejemplo, rapaces diurnas), Galliforme (por ejemplo, aves tipo pollo), Gaviiforme (por ejemplo, colimbos), Gruiforme (por ejemplo, fochas, grullas, rálidas), Passeriforme (por ejemplo, aves percheras), Pelecaniforme (por ejemplo, pelícanos), Phoenicopteriforme (por ejemplo, flamencos), Piciforme (por ejemplo, pájaros carpinteros), Podicipediforme (por ejemplo, somormujos), Procellariiforme (por ejemplo, aves marinas nariz de tubo), Psittaciforme (por ejemplo, loros), 10 Sphenisciforme (por ejemplo, pingüinos), Strigiforme (por ejemplo, Buhos), Struthioniforme (por ejemplo, casuarios, emús, kiwis, avestruces, ñandúes), Tinaniiforme (por ejemplo, tinamús), Trogoniforme (por ejemplo, trogones), o un Turniciforme (por ejemplo, torillo pechirrufo).

e. Peces

- 20 **[0213]** El material biológico de la presente invención puede ser un pez o puede obtenerse a partir de un pez. El pez puede ser, por ejemplo, un Acipenseriforme (por ejemplo, peces remo, peces espátula y esturiones), Polypteriforme (por ejemplo, bichires, birchers, peces con aletas lobuladas y peces de arrecife), Atheriniforme (por ejemplo, peces arco iris y pejerreyes), Beloniforme (por ejemplo, beloniformes y agujones), Beryciforme, 25 Channiforme, Cyprinodontiforme (por ejemplo, afanios), Dactylopteriforme (por ejemplo, peces voladores), Gasterosteiforme (por ejemplo, peces pipa y espinosos), Mugiliforme (por ejemplo, lisas), Pegasiforme (por ejemplo, peces dragón polillas del mar), Perciforme (por ejemplo, peces tipo perca), Pleuronectiforme (por ejemplo, peces planos, lenguados y salmonetes), Scorpaeniforme (por ejemplo, peces escorpión y escorpiones), Stephanoberyciforme, Synbranchiforme (por ejemplo, anguilas de pantano), Tetraodontiforme (por ejemplo, peces cofre, lijas, leatherjackets, puffers, peces tigre y jureles), Zeiforme (por ejemplo, peces jabalí, peces de San Pedro y peces de San Pedro), Atherinomorpha, Clupeiforme (por ejemplo, anchoas y arenques), Aulopiforme, Albuliforme, Anguilliforme (por ejemplo, anguilas), Elopiforme (por ejemplo, tarpones), Notacanthiformes (por ejemplo, anguilas espinosas y halosaurios), Saccopharyngiformes, Lampridiforme (por ejemplo, opahs y peces sable), Characiforme (por ejemplo, leporinos y pirañas), Cypriniforme (por ejemplo, madrillas, chupadores, pez cebra), Gonorhynchiforme 35 (por ejemplo, sabalote y shellears), Gymnotiforme, Siluriforme (por ejemplo, peces gato), Aphredoderiforme (por ejemplo, peces de la caverna y percas pirata), Batrachoidiforme, Gadiforme (por ejemplo, bacalaos y merluzas), Gobiesociforme, Lophiiforme (por ejemplo, rapas), Ophidiiforme, Percopsiforme (por ejemplo, truchas-carpas), Polymixiiforme (por ejemplo, peces oso), Cetomimiforme, Ctenothrissiforme, Esociforme (por ejemplo, madrillas de barro y pikes), Osmeriforme (por ejemplo, Argentinos y esperlanos), Salmoniforme (por ejemplo, salmones), 40 Myctophiforme (por ejemplo, Peces linterna), Ateleopodiforme, Stomiiforme, Amiiforme (por ejemplo, bowfins), Semionotiforme (por ejemplo, gars), Syngnathiforme (por ejemplo, peces pipa y caballitos de mar), Ceratodontiforme (por ejemplo, pulmonados Australianos), Lepidosireniforme (por ejemplo, pulmonados de América del Sur y pulmonado Africanos), o un Coelacanthiforme (por ejemplo, celacantos).

45 f. Invertebrados

- [0214]** El material biológico puede ser un invertebrado o puede obtenerse a partir de un invertebrado. El invertebrado puede ser, por ejemplo, un porífero (por ejemplo, esponga), cnidario (por ejemplo, medusas, hidras, anémonas de mar, carabela portuguesa y corales), platelmintos (por ejemplo, platelmintos, incluyendo planaria, 50 cestodos y trematodos), nematodo (por ejemplo, ascárides, incluyendo rotíferos y nematodos), Mollusca (por ejemplo, moluscos, caracoles, babosas, pulpos, calamares), anélidos (por ejemplo, gusanos segmentados, incluyendo lombrices de tierra, sanguijuelas y gusanos marinos), equinodermos (por ejemplo, estrellas de mar, pepinos de mar, conchas, erizos de mar), foronídeos (por ejemplo, Gusanos de la herradura), tardígrados (por ejemplo, osos de agua), acantocéfalos (por ejemplo, Gusanos de cabeza Espinosa), tenóforos (por ejemplo, 55 ctenóforos), o un artrópodo (por ejemplo, arácnidos, crustáceos, milpiés, ciempiés, insectos) .

[0215] Un artrópodo puede ser, por ejemplo, un coleópteros (por ejemplo, escarabajos), díptero (por ejemplo, moscas verdaderas), Himenóptero (por ejemplo, hormigas, abejas, avispas), Lepidoptero (por ejemplo, mariposas, polillas), Mecóptero (por ejemplo, moscas escorpión), Megalóptero, Neuróptero (por ejemplo, crisopas y familiares),

sifonáptero (por ejemplo, pulgas), estrepsíptero (por ejemplo, insectos parasitoides y parásitos de alas torcidas), Trichoptera (por ejemplo, tricópteros), Anopluro (por ejemplo, piojos chupadores), hemípteros (por ejemplo, chinches verdaderas y sus parientes), malófago (por ejemplo, piojos mordedores), psocóptero (por ejemplo, psocidos), tisanópteros (por ejemplo, trips), ortópteros (por ejemplo, saltamontes, langostas), dermápteros (por ejemplo, tijeretas), dictióptero, embióptero (por ejemplo, embiópteros), grilloblatodeo, mantofasmatodeo (por ejemplo, gladiadores), plecópteros (por ejemplo, moscas de las piedras), Zoraptera (por ejemplo, zorápteros), efemerópteros (por ejemplo, efímeras), odonatos (por ejemplo, libélulas y caballitos del diablo), Phasmatoptera (por ejemplo, bastones), tisanuros (por ejemplo, bristletails), arqueognatos, Collembola (por ejemplo, moscas de nieve y colémbolos), quilópodo (por ejemplo, ciempiés), diplópodos (por ejemplo, milpiés), paurópodos (por ejemplo, paurópodos, pauropodanos y progoneados), sínfilos (por ejemplo, pseudociempiés y sínfilos), malacostráceo (por ejemplo, cangrejos, camarones antárticos, cochinillas, gambas), maxilópodo, Branchiopoda (por ejemplo, branquiópodos), cefalocárido, Ostracoda (por ejemplo, ostrácodos), remipedio, branquiuro, cirrípedo (por ejemplo, percebes), Arachnida (por ejemplo, arácnidos, incluyendo amblipigios, arañas, zancudas, Opiliones, microescorpiones, escorpiones de libro, falsos escorpiones, pseudoescorpiones, escorpiones, solífugos, arañas de sol y vinagrillos), merostomados (por ejemplo, cangrejos herradura) o un picnogónido (por ejemplo, arañas de mar).

g. Hongos

[0216] El material biológico puede ser un hongo o puede obtenerse a partir de un hongo. Los hongos pueden ser, por ejemplo, un Ascomiceto (ascomicetes), Basidiomiceto (hongo en maza), Quitiridiomiceto (quitiridios), Deuteromiceto, o un Cigomiceto. El hongo puede ser un *Rhizopus*, *Pilobolus*, *Arthrobotrys*, *Aspergillus*, *Allomyces*, *Chytridium*, *Agaricus*, *Amanita*, *Cortinarius*, *Neurospora*, *Morchella*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Schizosaccharomyces* o *Ergot*. En realizaciones particulares, los hongos pueden ser *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans* o *Pichia pastoris*.

h. Plantas

[0217] El material biológico puede ser una planta o puede obtenerse a partir de una planta. La planta puede ser una briofita (por ejemplo, musgos, hepáticas, hornabeques), licofitas (por ejemplo, lycopodios, pinto de tierra), esfenofitas (por ejemplo, equisetos), Pterofitas (por ejemplo, helechos), Cicadofitas (por ejemplo, cícadás), Gnetofitas (por ejemplo, gnetum, ephedra, welwitschia), Coniferofitas (por ejemplo, coníferas), Ginkofitas (por ejemplo, ginko), o Antofitas (por ejemplo, plantas con flores). La antofita puede ser una monocotiledónea o un dicot. Los ejemplos no limitantes de plantas monocotiledóneas incluyen trigo, maíz, centeno, arroz, césped, sorgo, mijo, caña de azúcar, lirio, iris, ágave, aloe, orquídeas, bromelias y palmas. Los ejemplos de plantas no limitantes de dicotiledóneas incluyen tabaco, tomate, patata, soja, girasol, alfalfa, canola, rosa, Arabidopsis, café, frutas cítricas, frijoles, alfalfa y algodón.

i. Protistas

[0218] El material biológico puede ser un Protista o puede obtenerse a partir de un Protista. El Protista puede ser una Rhodophyte (por ejemplo, alga roja), Phaeophyte (por ejemplo, algas marrones, algas), Chlorophyte (por ejemplo, alga verde), Euglenophyte (por ejemplo, euglenoides) Myxomycot (por ejemplo, moho de limo), Oomycot (por ejemplo), moho de agua, mildiús polvorientos, tizón de la papa) o Bacillariophyte (por ejemplo, diatomeas).

j. Procariotas

[0219] En ciertos casos, el material biológico es un procariota o se obtiene a partir de un procariota. En ciertos casos, el procariota es una Archaea (arquibacteria). La arquibacteria puede ser, por ejemplo, a Crenarqueota, Euriarqueota, Korarqueota o Nanoarqueota. En ciertos aspectos, la Euriarqueota es una *Halobacteria*, *Methanobacteria*, *Methanococci*, *Methanomicrobia*, *Methanosarcinae*, *Methanopyri*, *Archeoglobi*, *Thermoplasmas* o una *Thermococci*. Los ejemplos no limitantes específicos de arquibacterias incluyen: *Aeropyrum pernix*, *Methanococcus jannaschii*, *Halobacterium, maris- mortui* y *Thermoplasma acidophilum*.

[0220] En ciertos casos, el procariota es una Eubacteria. La Eubacteria puede ser, por ejemplo, una Actinobacteria, acuíficas, bacteroidetas, bacteria verde del azufre, clamidias, Verrucomicrobia, bacterias verdes no del azufre, Crisiogenetas, Cianobacteria, Deferribacteráceas, Deinococcus-Thermus, Dictioglomias, Fibrobacterias/Acidobacterias, Firmicutes, Fusobacteria, gimmatimonadetas, Nitrospirae, Omnibacteria, Planctomicetos, Proteobacteria, espiroquetas, termodesulfobacterias o termotogas. Los ejemplos no limitantes de Actinobacterias incluyen bacterias de los géneros *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Prankia*,

Micrococcus, *Micromonospora*, *Micobacterium*, *Propionibacterium* y *Streptomyces*. Los ejemplos específicos de Actinobacteria incluyen *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Corynebacterium glutamicum*, *Propionibacterium acnes* y *Rhodococcus equi*.

- 5 [0221] Los ejemplos no limitantes de acuíficas incluyen bacterias de los géneros *Aquifex*, *Hydrogenivirga*, *Hydrogenobacter*, *Hydrogenobaculum*, *Thermocrinis*, *Hydrogenothermus*, *Persephonella*, *Sulfurihydrogenibium*, *Balnearium*, *Desulfurobacterium* y *Thermovibrio*. Los ejemplos no limitantes de Firmicutes incluyen bacterias de los géneros *Bacilli*, *Clostridia* y *Molecutes*. Los ejemplos específicos de Firmicutes incluyen: *Listeria innocua*, *Listeria inonacytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma pulmonis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus faecalis*.

- 15 [0222] Los ejemplos no limitantes de clamidias/Verrucomicrobia incluyen bacterias tales como *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, I *Chlamydia psittaci*. Los ejemplos no limitantes de *Deinococcus-Thermus* incluyen bacterias de los géneros *Deinococcus* y *Thermus*.

- [0223] Proteobacterias gram negativas. Los ejemplos no limitantes de proteobacterias incluyen bacterias del género *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Rickettsia*, *Agrobacterium*, *Brucella*, *Rhizobium*, *Neisseria*, *Bordetella*,
20 *Burkholderi*, *Buchnera*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Actinobacillus*, *Legionella*, *Mannheimia*, *Coxiella*, *Aeromonas*, *Francisella*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, y *Helicobacter*. Los ejemplos específicos de proteobacterias incluyen: *Rickettsia conorii*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, *Ehrlichia bovis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella melitensis*, *Rhizobium rhizogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Burkholderi mallei*, *Burkholderi pseudomallei*, *Neisseria gonorrhoeae*,
25 *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus vulgaris*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella dysenterica*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus somnus*, *Legionella pneumophila*, *Mannheimia haemolytica*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Coxiella burnetii*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Francisella tularensis*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Campylobacter jejuni*, y *Helicobacter pylori*.

- [0224] Los ejemplos no limitantes de espiroquetas incluyen bacterias de las familias *Brachyspiraceae*, *Leptospiraceae*, y *Spirochaetaceae*. Los ejemplos específicos de espiroquetas incluyen *Borrelia burgdorferi*, y *Treponema pallidum*.

35

2. Diferentes tipos de Materia biológica

- [0225] Los procedimientos y aparatos de la divulgación pueden aplicarse a los organismos. La estasis del organismo puede inducirse, o puede inducirse estasis dentro de las células, tejidos y/u órganos del organismo. La
40 materia biológica en la que puede inducirse estasis que se contempla para su uso con procedimientos y aparatos se limita únicamente en la medida de comprender células que utilizan oxígeno para producir energía.

- [0226] La estasis puede inducirse en células, tejidos u órganos que envuelven el corazón, pulmón, riñón, hígado, médula ósea, páncreas, piel, hueso, vena, arteria, córnea, sangre, intestino delgado, intestino grueso, cerebro,
45 médula espinal, músculo liso, músculo esquelético, ovario, testículo, útero y cordón umbilical.

- [0227] Además, la estasis puede inducirse en células del siguiente tipo: plaqueta, mielocito, eritrocito, linfocito, adipocito, fibroblasto, célula epitelial, célula endotelial, célula de músculo liso, célula músculo esquelética, célula endocrina, célula glial, neurona, célula secretora, célula con función de barrera, célula contráctil, célula de absorción,
50 célula mucosal, célula limbar (córnea), células madre (totipotentes, pluripotentes o multipotentes), ovocitos no fertilizados o fertilizados, o esperma.

- [0228] Además, la estasis puede inducirse en plantas o partes de plantas, incluyendo frutas, flores, hojas, tallos, semillas, esquejes. Las plantas pueden ser agrícolas, medicinales o decorativas. La inducción de la estasis en las
55 plantas puede mejorar la aumentar la vida útil o resistencia del patógeno de la totalidad o parte de la planta.

[0229] Pueden usarse procedimientos y aparatos de la divulgación para inducir la estasis en materia biológica *in vivo*. Esto puede servir para proteger y/o conservar la materia biológica o el propio organismo, o para prevenir daños o lesiones (o daños o lesiones adicionales) del mismo o el organismo global.

3. Ensayos

[0230] La estasis puede medirse de varias maneras, incluyendo mediante la cuantificación de la cantidad de oxígeno consumido por una muestra biológica, la cantidad de dióxido de carbono producido por la muestra (medición indirecta de la respiración celular), o caracterización de la motilidad.

[0231] Para determinar la velocidad de consumo de oxígeno o la velocidad de producción de dióxido de carbono, la materia biológica se pone en una cámara que se cierra herméticamente con dos aberturas; para importar y exportar gas. El gas (aire ambiental u otros gases) pasa a la cámara a un caudal determinado y sale del puerto de salida para mantener aproximadamente 1 atmósfera de presión en la cámara. Antes y después de la exposición a la cámara, el gas se pasa a través de un detector de dióxido de carbono y/o un detector de oxígeno para medir (cada segundo) la cantidad de cada compuesto en la mezcla de gas. La comparación de estos valores con el tiempo proporciona la velocidad de consumo de oxígeno o la producción de dióxido de carbono.

II. Antagonistas de Oxígeno y Otros Compuestos Activos

[0232] La presente divulgación se refiere a procedimientos, composiciones y artículos de fabricación que implican uno o más agentes que pueden actuar sobre la materia biológica para producir varios efectos, incluyendo, pero sin limitación, inducir la estasis, mejorar o aumentar la supervivencia, inhibir de forma reversible el metabolismo, reducir la actividad y el metabolismo celular u orgánico, reducir la necesidad de oxígeno, reducir o impedir un daño, prevenir un daño isquémico, prevenir el envejecimiento o la senescencia, y/o lograr una gran diversidad de aplicaciones terapéuticas analizadas en el presente documento. En ciertas realizaciones, los agentes se califican como "compuestos activos".

[0233] En algunas realizaciones, el agente es un antagonista de oxígeno, que podrá actuar directa o indirectamente. El metabolismo de oxígeno es un requisito fundamental para la vida en los metazoos aeróbicos. La respiración aeróbica representa la gran mayoría de producción de energía en la mayor parte de los animales y también sirve para mantener el potencial redox necesario para realizar reacciones celulares importantes. En la hipoxia, la disminución de disponibilidad de oxígeno da como resultado una transferencia ineficaz de electrones al oxígeno molecular en la etapa final de la cadena de transporte de electrones. Esta ineficiencia da como resultado tanto un descenso en la producción de energía aeróbica como un aumento en la producción de radicales libres dañinos, principalmente debido a la liberación prematura de electrones en el complejo III y la formación de O_2^- por la citocromo oxidasa (Semenza, 1999). Los suministros de energía limitados y el daño de los radicales libres pueden interferir con los procesos celulares esenciales, tales como la síntesis de proteínas y el mantenimiento de las polaridades de membrana (Hochachka y col., 1996) y conducen finalmente a la muerte celular.

[0234] En otras realizaciones, el agente es un agente metabólico protector. El metabolismo se entiende generalmente que se refiere a los procesos químicos (en una célula o un organismo) que se requieren para la vida; implican una gran diversidad de reacciones para mantener la producción de energía y sintetizar (anabolismo) y descomponen (catabolismo) moléculas complejas.

[0235] En ciertas realizaciones de la invención, un compuesto activo tiene una estructura química como se expone en la Fórmula I o IV descritas en el presente documento, o es un precursor de la Fórmula I o IV.

[0236] En el presente documento se describen una diversidad de estructuras químicas y compuestos. Las siguientes definiciones se aplican a términos usados para describir estas estructuras y compuestos analizados en el presente documento:

"Alquilo", cuando se usa, solo o junto con otros términos, tales como "arilalquilo", "aminoalquilo", "tioalquilo", "cianoalquilo" e "hidroxialquilo", se refiere a radicales lineales o ramificados que tienen de uno a aproximadamente veinte átomos de carbono. La expresión "alquilo inferior" se refiere a radicales alquilo C_1 - C_6 . Como se usa en el presente documento, el término alquilo incluye aquellos radicales que están sustituidos con grupos tales como hidroxilo, halo (tal como F, Cl, Br, I), haloalquilo, alcoxi, haloalcoxi, alquiltio, ciano, isociano, carboxi ($-COOH$), alcocarbonilo, ($-COOR$), acilo, aciloxi, amino, alquilamino, urea ($-NHCONHR$), tiol, alquiltio, sulfoxi, sulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, sulfonamido, arilsulfonamido, heteroarilo, heterociclilo, heterocicloalquilo, amidilo, alquilimino carbonilo, amidino, guanidono, hidrazino, hidrazida, sulfonilo sódico ($-SO_3Na$), sulfonilalquilo sódico ($-R SO_3Na$). Los ejemplos de dichos radicales incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, iso-amilo, hexilo y similares.

"Hidroxialquilo" se refiere a un radical alquilo, como se define en el presente documento, sustituido con uno o más radicales hidroxilo. Los ejemplos de radicales hidroxialquilo incluyen, pero sin limitación, hidroximetilo, 2-hidroxietilo, 2-hidroxipropilo, 3-hidroxipropilo, 2-hidroxibutilo, 3-hidroxibutilo, 4-hidroxibutilo, 2,3-dihidroxipropilo, 1-(hidroximetil)-2-hidroxietilo, 2,3-dihidroxibutilo, 3,4-dihidroxibutilo y 2-(hidroximetil)-3-hidroxipropilo, y similares.

"Arlalquilo" se refiere al radical R'R-, en el que un radical alquilo, "R" está sustituido con un radical arilo "R'". Los ejemplos de radicales arilalquilo incluyen, pero sin limitación, bencilo, feniletilo, 3-fenilpropilo y similares.

10 "Aminoalquilo" se refiere al radical H₂NR'-, en el que un radical alquilo está sustituido con un radical amino. Los ejemplos de dichos radicales incluyen aminometilo, amino etilo y similares.

"Alquilaminoalquilo" se refiere a un radical alquilo sustituido con un radical alquilamino.

15 "Alquilsulfonamido" se refiere a un grupo sulfonamido (-S(O)₂-NRR') adjunto a un grupo alquilo, como se define en el presente documento.

"Tioalquilo" se refiere a en el que un radical alquilo está sustituido con uno o más radicales tiol.

20 "Alquiltioalquilo" se refiere a en el que un radical alquilo está sustituido con uno o más radicales alquiltio. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, metiltiometilo, etiltioisopropilo y similares.

"Arltioalquilo" se refiere a en el que un radical alquilo, como se define en el presente documento, está sustituido con uno o más radicales arltio.

25 "Carboxialquilo" se refiere a los radicales -RCO₂H, en el que un radical alquilo está sustituido con un radical carboxilo. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, carboximetilo, carboxietilo, carboxipropilo, y similares.

"Alquilenio" se refiere a la unión de radicales alquilo.

30 **[0237]** El término "alquenilo" se refiere a un radical hidrocarburo acíclico insaturado en la medida en que contiene al menos un doble enlace. Dichos radicales alquenilo contienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono. El término "alquenilo inferior" se refiere a radicales alquenilo C₁-C₆. Como se usa en el presente documento, el término radicales alquenilo incluye aquellos radicales sustituidos por radicales alquilo. Los ejemplos de radicales alquenilo adecuados incluyen propenilo, 2-cloropropenilo, buten-1-ilo, isobutenilo, pent-1-en-1-ilo, 2-2-metil-1-buten-1-ilo, 3-metil-1-buten-1-ilo, hex-2-en-1-ilo, 3-hidroxihex-1-en-1-ilo, hept-1-en-1-ilo y oct-1-en-1-ilo, y similares.

40 **[0238]** El término "alquinilo" se refiere a un radical hidrocarburo acíclico insaturado en la medida en que contiene uno o más triples enlaces, conteniendo dichos radicales aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono. La expresión "alquinilo inferior" se refiere a radicales alquinilo C₁-C₆. Como se usa en el presente documento, la expresión radicales alquinilo incluye aquellos radicales sustituidos por radicales alquilo. Los ejemplos de radicales alquinilo adecuados incluyen radicales etinilo, propinilo, hidroxipropinilo, but-1-in-1-ilo, but-1-in-2-ilo, pent-1-in-1-ilo, pent-1-in-2-ilo, 4-metoxipent-1-in-2-ilo, 3-metilbut-1-in-1-ilo, hex-1-in-1-ilo, hex-1-in-2-ilo, hex-1-in-3-ilo, 3, 3-dimetil-1-buten-1-ilo, y similares.

[0239] "Alcoxi" se refiere al radical R'O-, donde R' es un alquilo radical como se define en el presente documento. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, metoxi, etoxi, propoxi, butoxi, isopropoxi, terc-butoxi alquilos, y similares. "Alcoxialquilo" se refiere a radicales alquilo sustituidos por uno o más alcoxi radicales. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, metoximetilo, etoxietilo, metoxietilo, isopropoxietilo, y similares.

[0240] "Alcoxycarbonilo" se refiere al radical R-O-C(O)-, donde R es un alquilo radical como se define en el presente documento. Los ejemplos de radicales alcoxycarbonilo incluyen, pero sin limitación, metoxycarbonilo, etoxycarbonilo, sec-butoxycarbonilo, iso-prroxycarbonilo, y similares. Alcoxitiocarbonilo se refiere a R-O-C(S)-.

55 **[0241]** "Arilo" se refiere al radical carbocíclico aromático monovalente que consiste en un anillo individual, o uno o más anillos condensados en los que al menos un anillo es aromático en la naturaleza, que puede opcionalmente estar sustituido con uno o más, preferiblemente uno o dos, sustituyentes, tales como hidroxilo, halo (tal como F, Cl, Br, I), haloalquilo, alcoxi, haloalcoxi, alquiltio, ciano, carboxi (-COOH), alcoxycarbonilo, (-COOR), acilo, aciloxi, amino,

alquilamino, urea ($--NHCONHR$), tiol, alquiltio, sulfoxi, sulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, sulfonamido, arilsulfonamido, heteroarilo, heterociclilo, heterocicloalquilo, amidilo, alquilimino carbonilo, amidino, guanidono, hidrazino, hidrazida, sulfonil sódico ($-SO_3Na$), sulfonilalquilo sódico ($-R SO_3Na$), a menos que se indique otra cosa. Como alternativa, dos átomos adyacentes del anillo arilo pueden estar sustituidos con un grupo metilenodioxi o etilenodioxi. Los ejemplos de radicales arilo incluyen, pero sin limitación, fenilo, naftilo, bifenilo, indanilo, antraquinolilo, terc-butil-fenilo, 1,3-benzodioxolilo, y similares.

[0242] "Arilsulfonamido" se refiere a un grupo sulfonamido, como se define en el presente documento, pegado a un grupo arilo, como se define en el presente documento.

[0243] "Tioarilo" se refiere a un grupo arilo sustituido con uno o más radicales tiol.

[0244] "Alquilamino" se refiere a grupos amino que están sustituidos con uno o dos radicales alquilo. Los ejemplos incluyen radicales N-alquilamino monosustituidos y radicales N, N-dialquilamino. Los ejemplos incluyen N-metilamino, N-etil-amino, N,N-dimetilamino, N,N-dietilamino, N-metilo, N-etil-amino, y similares.

[0245] "Aminocarbonilo" se refiere al radical H_2NCO- . "Aminocarbonilalquilo" se refiere a la sustitución de un radical alquilo, como se define en el presente documento, con uno o más radicales aminocarbonilo.

[0246] "Amidilo" se refiere a $RCO-NH-$, donde R es H o alquilo, arilo o heteroarilo, como se define en el presente documento.

[0247] "Imino carbonilo" se refiere a un radical carbono que tiene dos de los cuatro sitios de enlace covalente compartidos con un grupo imino. Los ejemplos de dichos radicales imino carbonilo incluyen, por ejemplo, $C=NH$, $C=NCH_3$, $C=NOH$ y $C=NOCH_3$. La expresión "alquilimino carbonilo" se refiere a un radical imino sustituido con un grupo alquilo. El término "amidino" se refiere a un grupo amino sustituido o no sustituido unido a uno de dos enlaces disponibles de un radical iminocarbonilo. Los ejemplos de dichos radicales amidino incluyen, por ejemplo, $NH_2-C=NH$, $NH_2-C=NCH_3$, $NH-C=NOCH_3$ y $NH(CH_3)-C=NOH$. El término "guanidino" se refiere a un grupo amidino unido a un grupo amino como se ha definido anteriormente, donde dicho grupo amino puede unirse a un tercer grupo. Los ejemplos de dichos radicales guanidino incluyen, por ejemplo, $NH_2-C(NH)NH-$, $NH_2-C(NCH_3)NH-$, $NH_2-C(NOCH_3)NH-$, y $CH_3NH-C(NOH)NH-$. El término "hidrazino" se refiere a $-NH-NRR'$, donde R y R' son independientemente hidrógeno, alquilo y similares. "Hidrazida" se refiere a $-C(=O)NH-NRR'$.

[0248] El término "heterociclilo" se refiere a radicales con forma de anillo que contienen un heteroátomo saturado y parcialmente saturado que tienen de 4 a 15 miembros en el anillo, denominado en presente documento como "heterociclilo C_4-C_{15} " seleccionado entre carbono, nitrógeno, azufre y oxígeno, donde al menos un átomo del anillo es un heteroátomo. Los raciales heterociclilo pueden contener uno, dos o tres anillos, donde dichos anillos pueden unirse de forma colgante o condensarse. Los ejemplos de radicales heterocíclicos saturados incluyen un grupo heteromonocíclico de 3 a 6 miembros saturado que contiene de 1 a 4 átomos de nitrógeno [por ejemplo pirrolidinilo, imidazolidinilo, piperidino, piperazinilo, etc.]; un grupo heteromonocíclico de 3 a 6 miembros saturado que contiene de 1 a 2 átomos de oxígeno y de 1 a 3 átomos de nitrógeno [por ejemplo morfolinilo, etc.]; un grupo heteromonocíclico de 3 a 6 miembros saturado que contiene de 1 a 2 átomos de azufre y de 1 a 3 átomos de nitrógeno [por ejemplo, tiazolidinilo, etc.]. Los ejemplos de radicales heterociclilo parcialmente saturados incluyen dihidrotiofeno, dihidropirano, dihidrofurano y dihidrotiazol. Los ejemplos no limitantes de radicales heterocíclicos incluyen 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, pirrolindinilo, 1,3-dioxolanilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, piperidinilo, 1,4-dioxanilo, morfolinilo, 1,4-ditianilo, tiomorfolinilo, y similares. Dichos grupos heterociclilo pueden estar opcionalmente sustituidos con grupos tales como sustituyentes, tales como hidroxilo, halo (tal como F, Cl, Br, I), haloalquilo, alcoxi, haloalcoxi, alquiltio, ciano, carboxi ($-COOH$), alcocixarbonilo, ($-COOR$), acilo, aciloxi, amino, alquilamino, urea ($--NHCONHR$), tiol, alquiltio, sulfoxi, sulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, sulfonamido, arilsulfonamido, heteroarilo, heterociclilo, heterocicloalquilo, amidilo, alquilimino carbonilo, amidino, guanidono, hidrazino, hidrazida, sulfonil sódico ($-SO_3Na$), sulfonilalquilo sódico ($-RSO_3Na$).

[0249] "Hetroarilo" se refiere a radicales cíclicos aromáticos monovalentes que tienen uno o más anillos, preferiblemente de uno a tres anillo, de cuatro a ocho átomos por anillo, incorporando uno o más heteroátomos, preferiblemente uno o dos, dentro del anillo (seleccionados entre nitrógeno, oxígeno o azufre), que pueden sustituirse opcionalmente con uno o más, preferiblemente uno o dos sustituyentes seleccionados entre sustituyentes, tales como hidroxilo, halo (tal como F, Cl, Br, I), haloalquilo, alcoxi, haloalcoxi, alquiltio, ciano, carboxi ($-COOH$), alcocixarbonilo, ($-COOR$), acilo, aciloxi, amino, alquilamino, urea ($--NHCONHR$), tiol, alquiltio, sulfoxi, sulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, sulfonamido, arilsulfonamido, heteroarilo, heterociclilo, heterocicloalquilo,

amidilo, alquilimino carbonilo, amidino, guanidono, hidrazino, hidrazida, sulfonilo sódico ($-\text{SO}_3\text{Na}$), sulfonilalquilo sódico ($-\text{RSO}_3\text{Na}$), a menos que se indique otra cosa. Los ejemplos de heteroarilo radicales incluyen, pero sin limitación, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, pirazinilo, tienilo, furanilo, piridinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, benzofurilo, benzotiofenilo, benzotipiranilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzotiazolilo, benzopiranilo, indazolilo, indolilo, isoindolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, naftiridinilo, benecensulfonil-tiofenilo, y similares.

[0250] "Heteroariloxi" se refiere a radicales heteroarilo unidos a un radical oxi. Los ejemplos de dichos radicales incluyen, pero sin limitación, 2-tiofeniloxi, 2-pirimidiloxi, 2-piridiloxi, 3-piridiloxi, 4-piridiloxi, y similares.

10 **[0251]** "Heteroariloxialquilo" se refiere a radicales alquilo sustituidos con uno o más radicales heteroariloxi. Los ejemplos de dichos radicales incluyen 2-piridiloximetilo, 3-piridiloxietilo, 4-piridiloximetilo, y similares.

[0252] "Cicloalquilo" se refiere a radicales monocíclicos saturados monovalentes que consiste en uno o más anillos, típicamente uno o dos anillos, de tres a ocho carbonos por anillo, que pueden sustituirse típicamente con uno o más sustituyentes hidroxilo, halo (tal como F, Cl, Br, I), haloalquilo, alcoxi, haloalcoxi, alquiltio, ciano, carboxi ($-\text{COOH}$), alcóxicarbonilo, ($-\text{COOR}$), acilo, aciloxi, amino, alquilamino, urea ($-\text{NHCONHR}$), tiol, alquiltio, sulfoxi, sulfonilo, arilsulfonilo, alquilsulfonilo, sulfonamido, arilsulfonamido, heteroarilo, heterociclilo, heterocicloalquilo, amidilo, alquilimino carbonilo, amidino, guanidono, hidrazino, hidrazida, sulfonilo sódico ($-\text{SO}_3\text{Na}$), sulfonilalquilo sódico ($-\text{R SO}_3\text{Na}$), a menos que se indique otra cosa. Los ejemplos de radicales cicloalquilo incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, 3- etilciclobutilo, ciclopentilo, cicloheptilo, y similares. "Cicloalquenilo" se refiere a radicales que tienen de tres a diez átomos de carbono y uno o más dobles enlaces carbono-carbono. Los radicales cicloalquenilo típicos tienen de tres a siete átomos de carbono. Los ejemplos incluyen ciclobutenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, cicloheptenilo, y similares. "Cicloalquenilalquilo" se refiere a radicales en los que un alquilo radical, como se define en el presente documento, está sustituido con uno o más radicales cicloalquenilo.

25 **[0253]** "Cicloalcoxi" se refiere a radicales cicloalquilo unidos a un radical oxi. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, ciclohexoxi, ciclopentoxi y similares.

[0254] "Cicloalcoxialquilo" se refiere a radicales alquilo sustituidos con uno o más radicales cicloalcoxi. Los ejemplos incluyen ciclohexoxietilo, ciclopentoximetilo, y similares.

Sulfenilo" se refiere a $-\text{S(O)}-$.

35 **[0255]** "Sulfonilo" se refiere a $-\text{S(O)}_2-$, en el que "alquilsulfonilo" se refiere a un radical sulfonilo sustituido con un radical alquilo, RSO_2- , arilsulfonilo se refiere a radicales arilo unidos a un radical sulfonilo. "Sulfonamido" se refiere a $-\text{S(O)}_2-\text{NRR}'$. "Ácido sulfónico" se refiere a $-\text{S(O)}_2\text{OH}$. "Éster sulfónico" se refiere a $-\text{S(O)}_2\text{OR}$, donde R es un grupo tal como un alquilo como en alquil éster sulfónico.

40 **[0256]** "Tio" se refiere a $-\text{S}-$. "Alquiltio" se refiere a $\text{RS}-$, donde un radical tiol está sustituido con un radical alquilo R. Los ejemplos incluyen metiltio, etiltio, butiltio, y similares. "Arlitio" se refiere a $\text{R}'\text{S}-$, donde un radical tio está sustituido con un radical arilo, como se define en el presente documento. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, feniltio y similares. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, feniltiometil y similares. "Ácido alquiltiosulfónico" se refiere al radical $\text{HO}_3\text{SR}'\text{S}-$, en el que un radical alquiltio está sustituido con un radical ácido sulfónico.

45 **[0257]** "Tiosulfenilo" se refiere a $-\text{S}-\text{SH}$.

[0258] "Acilo", solo o en combinación, se refiere a un grupo carbonilo o tionocarbonilo unido a un radical seleccionado entre, por ejemplo, hidrido, alquilo, alquenilo, alquinilo, haloalquilo, alcoxi, alcóxialquilo, haloalcoxi, arilo, heterociclilo, heteroarilo, alquilsulfonilalquilo, alquilsulfonilalquilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquenilo, alquiltio, ariltio, amino, alquilamino, dialquilamino, aralcoxi, ariltio y alquiltioalquilo. Ejemplos de "acilo" son formilo, acetilo, benzoilo, trifluoroacetilo, ftaloilo, malonilo, nicotinilo, y similares.

[0259] El término "aciltio" y "disulfuro de acilo" se refiere a los radicales $\text{RCOS}-$ y $\text{RCOSS}-$, respectivamente.

55 **[0260]** El término "tiocarbonilo" se refiere a los compuestos y restos que contienen un carbono conectado con un doble enlace a un átomo de azufre $-\text{C}(=\text{S})-$. "Alquiltiocarbonilo" se refiere a cuando un grupo tiocarbonilo está sustituido con un radical alquilo, R, como se define en el presente documento, para formar el radical monovalente $\text{RC}(=\text{S})-$. "Aminotiocarbonilo" se refiere a un grupo tiocarbonilo sustituido con un grupo amino, $\text{NH}_2\text{C}(=\text{S})-$.

[0261] "Carboniloxi" se refiere a -OCOR.

[0262] "Alcoxicarbonilo" se refiere a -COOR.

5 [0263] "Carboxilo" se refiere a -COOH.

[0264] Para aquellos compuestos con estereoisómeros, se contemplan todos los estereoisómeros de los mismos, incluyendo isómeros geométricos cis/trans, diastereómeros y enantiómeros individuales.

10 A. Monóxido de Carbono

[0265] El monóxido de carbono (CO) es un gas incoloro, inodoro e insípido que puede ser tóxico para los animales, incluidos a los seres humanos. De acuerdo con el Centro de Control de Enfermedades, más de 450 personas mueren accidentalmente por monóxido de carbono cada año.

15

[0266] Puede ser tóxico para los organismos cuya sangre lleva oxígeno para sustentar su supervivencia. Puede ser venenoso entrando en los pulmones a través una respiración normal y desplazando el oxígeno del torrente sanguíneo. La interrupción del suministro normal de oxígeno pone en peligro las funciones del corazón, cerebro y otras funciones vitales del cuerpo. Sin embargo, se explora el uso de monóxido de carbono para aplicaciones

20

[0267] En cantidades de 50 partes por millón (ppm), el monóxido de carbono no presenta síntomas en los seres humanos expuestos a éste. Sin embargo, a 200 ppm, en de dos-tres horas el monóxido de carbono puede provocar dolor de cabeza leve; a 400 ppm, en una a dos horas dos puede causar un dolor de cabeza frontal que puede

25

generalizarse en tres horas; y, a 800 ppm puede causar mareos, náuseas y/o convulsiones en 45 minutos, y dejar al sujeto insensible en horas dos. A niveles de aproximadamente 1000 ppm, un organismo puede expirar después de la exposición durante más de aproximadamente 1-2 minutos.

30

[0268] Debido a los efectos tóxicos ya conocidos y documentados del monóxido de carbono para un organismo, por lo tanto, es sorprendente e inesperado que el monóxido de carbono pueda usarse para inducir la estasis de y/o ayuda a conservar muestras biológicas vivas. Así, se contempla que el monóxido de carbono puede usarse para inducir la estasis en materia biológica aislada, tal como materia biológica sin sangre (debido a los efectos que tiene el monóxido de carbono con respecto a la hemoglobina, que es una ruta independiente que la involucrada en la inducción de estasis).

35

[0269] Además de la exposición al monóxido de carbono para inducir la estasis o para limitar o evitar cualquier daño causado por un agente inductor de estasis, la divulgación indica que el monóxido de carbono puede usarse junto con agentes o procedimientos que facilitan el proceso de conservación y/o trasplante/injerto de materiales biológicos.

40

B. Compuestos de calcogenuro

[0270] Los compuestos que contienen un elemento calcógeno; aquellos en el Grupo 6 de la tabla periódica, pero que excluyen los óxidos, se denominan comúnmente "calcogenuros" o "compuestos de calcogenuro (usados de

45

forma intercambiable en el presente documento). Estos elementos son azufre (S), selenio (Se), telurio (Te) y polonio (Po). Los calcogenuros comunes contienen uno o más de S, Se y Te, además de otros elementos. Los calcogenuros incluyen formas elementales, tales como partículas micronizadas y/o nanotrituradas de S y Se. Pueden emplearse compuestos de calcogenuro como agentes reductores.

50

[0271] El presente inventor, aunque sin quedar ligado a la siguiente teoría, cree que la capacidad de los calcogenuros para inducir la estasis en las células, y para permitir la modulación de la temperatura corporal interna en los animales, proviene de la unión de estas moléculas al citocromo oxidasa. Al hacerlo, los calcogenuros inhiben o reducen la actividad de la fosforilación oxidativa. Se cree que la capacidad de los calcogenuros para bloquear la termorregulación autónoma, es decir, para permitir que la temperatura corporal interna de los animales de "sangre caliente" se manipule a través de control de temperaturas ambientales, proviene del mismo mecanismo que se ha

55

expuesto anteriormente, la unión al citocromo oxidasa, y el bloqueo o reducción de la actividad de la fosforilación oxidativa. Pueden proporcionarse calcogenuros en formas líquidas, así como en formas gaseosas.

[0272] Los calcogenuros pueden ser tóxicos, y en algunos niveles letales, para los mamíferos. De acuerdo con la

presente invención, se prevé que los niveles de calcogenuro no deben superar los niveles letales en el entorno adecuado. Pueden encontrarse niveles letales de calcogenuros, por ejemplo, en Material Safety Data Sheets para cada calcogenuro o a partir de fichas de información disponibles en la Occupational Safety and Health Administration (OSHA) del gobierno de Estados Unidos.

5

[0273] Mientras que tanto el monóxido de carbono como los compuestos de calcogenuro pueden inducir la estasis actuando como un antagonista de oxígeno, tienen diferentes efectos tóxicos que son independientes de sus habilidades para inducir la estasis. Además, las concentraciones necesarias para mediar un efecto de estasis son diferentes debido a las diferentes afinidades de la citocromo oxidasa. Mientras que la afinidad de la citocromo oxidasa para el oxígeno es aproximadamente 1:1 en comparación con el monóxido de carbono, la afinidad para H₂S aparece en el orden de aproximadamente 300:1 en comparación con el oxígeno. Esto afecta a los efectos tóxicos observados con una concentración de inducción de estasis. Por lo tanto, se contempla que los compuestos de calcogenuro son particularmente adecuados para inducir la estasis de materia biológica en los organismos al completo y del conjunto de organismos.

10
15

[0274] También puede resultar útil proporcionar estímulos adicionales a una materia biológica antes de retirar el calcogenuro. En particular, se prevé que se puede someter a un animal a una mayor temperatura ambiente antes de retirar la fuente de calcogenuro.

20 1. H₂S y Otros Compuestos que Contienen Azufre

[0275] El ácido sulfhídrico (H₂S) es un gas potencialmente tóxico que suele estar asociado con petroquímica y gas natural, aguas residuales, pulpa de papel, curtido y procesamiento de alimentos. El efecto primario, a nivel celular, parece ser la inhibición de la citocromo oxidasa y otras enzimas oxidativas, dando como resultado hipoxia celular. La exposición a niveles extremos (500 ppm) da como resultado un colapso repentino e inconsciencia, un efecto denominado "fulminante", seguido de recuperación. Los efectos posteriores a la exposición pueden persistir durante años, e incluyen pérdida de coordinación, pérdida de memoria, disfunción motora, cambios de personalidad, alucinaciones e insomnio.

[0276] Sin embargo, la mayor parte del contacto con H₂S se produce muy por debajo de esos niveles de toxicidad aguda. Sin embargo, hay una preocupación general por el contacto a largo plazo a niveles sub-agudos. Existen algunos informes que indican que pueden producirse deficiencias persistentes en el equilibrio y la memoria, así como funciones motoras sensoriales alteradas en los seres humanos tras la exposición crónica de bajo nivel de H₂S. Kilburn y Warshaw (1995); Kilburn (1999). Otros han informado que la exposición perinatal de ratas a un nivel de H₂S bajo (20 ó 50 ppm) durante 7 horas al día desde la gestación hasta el día 21 postnatal dio como resultado ramificaciones dendríticas mayores con arborización reducida de células de Purkinje cerebelosas. Otros defectos neurológicos asociados con niveles relativamente bajos de H₂S incluyen concentraciones alteradas de neurotransmisor en el cerebro y respuestas neurológicas alteradas, tal como un aumento de la actividad EEG theta del hipocampo.

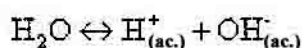
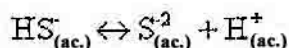
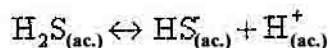
40

[0277] Se estudió la toxicidad del comportamiento en ratas expuestas a niveles moderados de H₂S. Los resultados mostraron que H₂S inhibe las respuestas de evasión discriminada inmediatamente después del final de la exposición (Higuchi y Fukamachi, 1997), y también interfiere con la capacidad de las ratas para aprender una tarea de laberinto con brazo radial con cebo (Partlo y col., 2001). En otro estudio perinatal usando 80 ppm de H₂S, no se observaron efectos neuropatológicos ni una alteración de la actividad motora, evasión pasiva, ni respuesta al sobresalto acústico en crías de rata. Dorman y col. (2000). Finalmente, Struve y col. (2001) expusieron ratas a H₂S en gas a diversos niveles durante 3 horas por día cinco días consecutivos. Se observaron reducciones significativas en la actividad motora, realización del laberinto de agua y la temperatura corporal después de la exposición a 80 ppm o más de H₂S. Tomados juntos, estos informes indican que H₂S puede tener una diversidad de efectos sobre la bioquímica de los tejidos mamíferos, pero no hay ningún patrón claro de respuesta en cuando al comportamiento.

45
50

[0278] Una vez disuelto plasma, el H₂S estará involucrado en una serie de reacciones químicas. Las reacciones químicas son: (1) la disociación del H₂S molecular para formar el ión bisulfuro, (2) la disociación del ión bisulfuro con respecto al ión sulfuro, y (3) la auto-ionización del agua. Las reacciones se proporcionan a continuación:

55



[0279] Usando las constantes de equilibrio $K_1 = 1,039 \text{ E}^{-07}$, $K_2 = 6,43 \text{ E}^{-16}$ y $K_w = 1,019 \text{ E}^{-14}$, a pH 7,4 la cantidad calculada de las diferentes especies con respecto a la concentración S total es aproximadamente H_2S al 23% y HS^- al 77%, mientras que la cantidad de S^{2-} tiende a cero.

[0280] El inventor usa una técnica de alquilación extractiva acoplada con cromatografía de gas y detección específica de masa para cuantificar el ácido sulfhídrico (adaptado a partir de Hyspler y col., 2002). Este procedimiento implica añadir en primer lugar 50 μl de muestra de sangre, suero o extracto de tejido que se ha diluido en agua desoxigenada purgada con nitrógeno a una concentración de 1 mg/ml, junto con 150 μl de un tampón de reacción que consiste en cloruro de benzalconio 5 mM (BZK) en un tampón borato saturado. Se añaden a éste, en primer lugar, 100 μl de una solución 15 μM de metil sulfuro de 4-cloro-bencilo (4CBMS) en acetato de etilo y después 100 μl de una solución 20 mM de bromuro de pentafluorobencilo (PFBBBr) en tolueno. Después, esta solución se cierra herméticamente y se incuba a 55 °C con rotación o agitación durante 2 h. Después de este periodo de incubación, entonces se añaden 200 μl de una solución saturada de KH_2PO_4 , y la fase orgánica se elimina y se analiza mediante cromatografía de gas y detección específica de masa de acuerdo con los procedimientos descritos en Hyspler y col., 2002. Después, estas mediciones se comparan con una curva convencional generada usando el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente, comenzando con concentraciones convencionales conocidas que varían de μM a 1 mM de Na_2S preparado en agua desoxigenada purgada con nitrógeno H_2O , para determinar la concentración de niveles de ácido sulfhídrico endógeno. Con el fin de analizar los niveles de sulfuro unido y/o oxidado, se aplica el mismo procedimiento, excepto que se usa un tampón de reacción desnaturalizante/de reducción, que consiste en BZK 5 mM con hidróxido de tetraetilamonio al 1% (TEAH) y clorhidrato de tris(2-carboxietil)-fosfina 1 mM (TCEP) en tampón borato saturado, en lugar del tampón de reacción que se ha descrito anteriormente.

[0281] Los niveles típicos de ácido sulfhídrico contemplados para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen valores de aproximadamente 1 a aproximadamente 150 ppm, de aproximadamente 10 a aproximadamente 140 ppm, de aproximadamente 20 a aproximadamente 130 ppm, y de aproximadamente 40 a aproximadamente 120 ppm, o la dosificación oral, intravenosa o transdérmica equivalente de los mismos. Otros intervalos pertinentes incluyen de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 ppm, de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 ppm, de aproximadamente 10 a aproximadamente 70 ppm, de aproximadamente 20 a aproximadamente 70 ppm, de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 ppm, y de aproximadamente 30 a aproximadamente 60 ppm, o la dosificación oral, intravenosa o transdérmica equivalente de los mismos. También se contempla que, para un animal determinado en un periodo de tiempo dado, la atmósfera de calcogenuro debería reducirse para evitar una acumulación potencialmente letal de calcogenuro en el sujeto. Por ejemplo, una concentración ambiental inicial de 80 ppm puede reducirse después de 30 min a 60 ppm, seguido de reducciones adicionales a 1 h (40 ppm) y 2 h (20 ppm).

a. Precursores de H_2S

[0282] La presente invención también se refiere al uso de compuestos y agentes que pueden producir H_2S en ciertas condiciones, tales como tras la exposición, o pronto después de ésta, a la materia biológica. Se contempla que dichos precursores producen H_2S tras una o más reacciones enzimáticas o químicas.

3. Otros Calcogenuros

[0283] En ciertas realizaciones, el compuesto con estructura de agente reductor es dimetilsulfóxido (DMSO),

dimetilsulfuro (DMS), metilmercaptano (CH_3SH), mercaptoetanol, tiocianato, cianuro ácido, metanotiol (MeSH) o CS_2 . En realizaciones particulares, el antagonista de oxígeno es CS_2 , MeSH o DMS. Se contemplan particularmente compuesto en el orden del tamaño de estas moléculas (es decir, dentro de aproximadamente el 50% de sus pesos moleculares).

5

[0284] Los compuestos adicionales que se prevén como útiles para inducir estasis incluyen, pero sin limitación, las siguientes estructuras, muchas de las cuales están fácilmente disponibles y se conocen por los expertos en la técnica (identificadas por el número CAS): 104376-79-6 (Ceftriaxona Sal Sódica); 105879-42-3; 1094-08-2 (Etopropatina HCl); 1098-60-8 (Triflupromazina HCl); 111974-72-2; 113-59-7; 113-98-4 (Penicilina G K^+); 115-55-9; 1179-69-7; 118292-40-3; 119478-56-7; 120138-50-3; 121123-17-9; 121249-14-7; 1229-35-2; 1240-15-9; 1257-78-9 (Sal Edisilato de Proclorperazina); 128345-62-0; 130-61-0 (Tioridazina HCl) 132-98-9 (Penicilina V K^+); 13412-64-1 (Dicloxacilina Na^+ Hidrato); 134678-17-4; 144604-00-2; 146-54-3; 146-54-5 (Fluphenazina 2HCl); 151767-02-1; 159989-65-8; 16960-16-0 (Fragmento de Hormona Adrenocorticotrópica 1-24); 1982-37-2; 21462-39-5 (Clindamicina HCl); 22189-31-7; 22202-75-1; 23288-49-5 (Probuco); 23325-78-2; 24356-60-3 (Cefapirina); 24729- 96-2 (Clindamicina); 25507-04-4; 26605-69-6; 27164-46-1 (Cefazolina Na^+); 2746-81-8; 29560-58-8; 2975-34-0; 32672-69-8 (Mesoridazina Benceno Sulfonato); 32887-01-7; 33286-22-5 (($^+$)-cis-Diltiazem HCl); 33564-30-6 (Cefoxitina Na^+); 346-18-9; 3485-14-1; 3511-16-8; 37091-65-9 (Azlocilina Na^+); 37661-08-8; 3819-00-9; 38821-53-3 (Cefradina); 41372-02-5; 42540-40-9 (Nafato de Cefamandol); 4330-99-8 (Sal hemi-($^+$)-tartrato de Trimeprazina); 440-17-5 Trifluoperazina 2HCl; 4697-14-7 (Ticarclina 2 Na^+); 4800-94-6 (Carbenicilina 2 Na^+); 50-52-2; 50-53-3; 5002-47-1; 51481-61-9 (Cimetidina); 52239-63-1 (6-propil-2-tiouracilo); 53-60-1 (Promazina HCl); 5321-32-4; 54965-21-8 (Albendazol); 5591-45-7 (Tiotixeno); 56238-63-2 (Cefuroxima Na^+); 56796-39-5 (Cefmetazol Na^+); 5714-00-1; 58-33-3 (Prometazina HCl); 58-38-8; 58-39-9 (Perfenazina); 58-71-9 Cefalotina Na^+ ; 59703-84-3 (Piperacilina Na^+); 60-99-1 (Sal Maleato de Metotrimetoprima); 60925-61-3; 61270-78-8; 6130-64-9 (Sal de Penicilina G Procaína Hidrato); 61318-91-0 Sal Nitro de Sulconazol; 61336-70-7 Amoxicilina Trihidrato; 62893-20-3 Cefoperazona Na^+ ; 64485-93-4 (Cefotaxima Na^+); 64544-07-6; 64872-77-1; 64953-12-4 Moxalactama Na^+ ; 66104-23-2 (Sal Mesilato de Pergolida); 66309-69-1; 66357- 59-3 (Ranitidina HCl); 66592-87-8 (Cefodroxilo); 68401-82-1; 69-09-0 (Clorpromazina HCl); 69-52-3 (Ampicilina Na^+); 69-53-4 (Ampicilina); 69-57-8 Penicilina G Na^+ ; 70059-30-2; 70356-03-5; 7081-40-5; 7081-44-9 (Cloxacilina Na^+ H_2O); 7177-50-6 Nafcilina Na^+ H_2O ; 7179-49-9; 7240-38-2 (Oxacilina Na^+ H_2O); 7246-14-2; 74356-00-6; 74431-23-5; 74849-93-7; 75738-58-8; 76824-35-6 (Famotidina); 76963-41-2; 79350-37-1; 81129-83-1; 84-02-6 (Sal Dimaleato de Proclorperazina); 87-08-1 (Ácido Fenoximetilpenicilínico); 87239-81-4; 91-33-8 (Benzotiazida); 91832-40-5; 94841-17-5; 99294-94-7; 154-42-7 (6-Tioguanina); 36735-22-5; 536-33-4 (Etionamida); 52-67-5 (D-Penicilamina); 304-55-2 (Ácido Meso-2,3-Dimercaptosuccínico); 59-52-9 2,3-Dimercapto + propanol 6112-76-1 (6-mercaptopurina); 616-91-1 (N-acetil-L-cisteína); 62571-86-2 (Captoprilo); 52-01-7 (espironolactona); y, 80474-14-2 (propionato de fluticasona). Los compuestos adicionales que se contemplan como posiblemente útiles para la estasis incluyen aquellos con la estructura química de las Fórmulas I o IV.

C. Otros Antagonistas o Compuestos activos y Condiciones Ambientales Relacionadas

1. Hipoxia y Anoxia

40

[0285] La hipoxia es una tensión natural común y existen varias respuestas bien conservadas que facilitan la adaptación celular a entornos hipóxicos. Para compensar la disminución de la capacidad para la producción de energía aeróbica en la hipoxia, la célula debe aumentar la producción de energía anaeróbica o disminuir la demanda de energía (Hochachka y col., 1996). Los ejemplos de ambas de estas respuestas son comunes en los metazoos y la respuesta particular utilizada depende, en general, de la cantidad de oxígeno disponible para la célula.

45

[0286] En la hipoxia leve, la fosforilación oxidativa sigue estando parcialmente activa, por lo que es posible algo de producción de energía aeróbica. La respuesta celular a esta situación, que está mediada en parte por el factor de transcripción inducible por la hipoxia, HIF-1, es complementar la producción de energía aeróbica reducida regulando por aumento los genes involucrados en la producción de energía anaeróbica, tales como enzimas glucolíticas y transportadores de glucosa (Semenza, 2001; Guillemin y col., 1997). Esta respuesta también promueve la regulación por aumento de antioxidantes, tales como catalasa y superóxido dismutasa, que protegen contra el daño provocado por radicales libres. Como resultado, la célula es capaz de mantener niveles casi normóxicos de actividad en la hipoxia leve.

55

[0287] En una forma extrema de la hipoxia, denominada "anoxia", denominada aquí como $<0,001$ kPa de O_2 , la fosforilación oxidativa cesa y, por lo tanto, la capacidad de generar energía se reduce drásticamente. Para poder sobrevivir en este entorno, la célula debe disminuir la demanda de energía reduciendo la actividad celular (Hochachka y col., 2001). Por ejemplo, en los hepatocitos de tortuga privados de oxígeno, un esfuerzo dirigido por la

célula para limitar las actividades, tales como la síntesis de proteínas, la actividad del canal iónico y las vías anabólicas da como resultado una reducción del 94% de la demanda de ATP (Hochachka y col., 1996). En embriones de pez cebra (*Danio rerio*), la exposición a la anoxia conduce a una completa detención de los latidos del corazón, movimiento, progresión del ciclo celular y progresión en el desarrollo (Padilla y col., 2001). De forma análoga, *C. elegans* responden a anoxia entrando en animación suspendida, en la que todos los movimientos observables, incluyendo la división celular y la progresión del desarrollo, cesan (Padilla y col., 2002; Van Voorhies y col., 2000). *C. elegans* pueden permanecer suspendidos durante 24 horas o más y, a su regreso a la normoxia, se recuperarán con alta viabilidad. Esta respuesta permite a los *C. elegans* sobrevivir al estrés hipóxico reduciendo la velocidad de los procesos de gasto energético y evitando la aparición de eventos dañinos e irrevocables, tal como aneuploidía (Padilla y col., 2002; Nystul y col., 2003).

[0288] Se descubrió recientemente que la respuesta es la generación inducida por hipoxia de monóxido de carbono por la hemo oxigenasa-1 (Dulak y col., 2003). El monóxido de carbono producido endógenamente puede activar cascadas de señalización que mitigan el daño hipóxico a través de una actividad anti-apoptótica (Brouard y col., 2003) y antiinflamatoria (Otterbein y col., 2000), y pueden conseguirse efectos citoprotectores similares en modelos de trasplante por perfusión con monóxido de carbono exógeno (Otterbein y col., 2003; Amersi y col., 2002). En concentraciones más altas, el monóxido de carbono compite con el oxígeno en la unión a las proteínas que contienen hierro, tales como los citocromos mitocondriales y la hemoglobina (Gorman y col., 2003), aunque no se ha investigado el efecto citoprotector que esta actividad puede tener en la hipoxia.

[0289] A pesar de la existencia de estos sofisticados mecanismos de defensa contra el daño hipóxico, la hipoxia es a menudo un estrés perjudicial. Por ejemplo, los mamíferos tienen tanto hemo oxigenasa-1 como HIF-1, y algunas evidencias indican que la animación suspendida es posible también en los mamíferos (Bellamy y col., 1996; Alam y col., 2002). Sin embargo, el daño hipóxico debido a trauma, tal como ataque cardíaco, ictus o pérdida de sangre es una causa principal de muerte. La comprensión de las limitaciones de las dos estrategias fundamentales para sobrevivir el estrés hipóxico, permaneciendo en animación animada o suspendida, se ve obstaculizada por el hecho de que se ha basado en estudios en una diversidad de sistemas bajo una diversidad de condiciones.

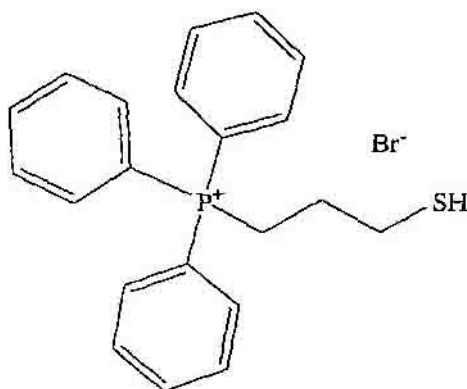
[0290] La "hipoxia" se produce cuando los niveles fisiológicos normales de oxígeno no se suministran a una célula o tejido. La "normoxia" se refiere a niveles fisiológicos normales de oxígeno para el tipo de célula particular, el estado celular o el tejido en cuestión. La "anoxia" es la ausencia de oxígeno. "Condiciones hipóxicas" son aquellas que conducen a la hipoxia celular. Estas condiciones dependen del tipo celular, y de la arquitectura o posición específica de una célula dentro de un tejido u órgano, así como el estado metabólico de la célula. Para los fines de la presente invención, las condiciones hipóxicas incluyen las condiciones en las que la concentración de oxígeno está en o inferior que las condiciones atmosféricas normales, que es menor del 20,8, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0%; como alternativa, estos números pueden representar el porcentaje de atmósfera a 1 atmósfera de presión (101,3 kPa). Una concentración de oxígeno del cero por ciento define las condiciones anóxicas. Por lo tanto, las condiciones hipóxicas incluyen condiciones anóxicas, aunque en algunas realizaciones, se implementan condiciones hipóxicas no inferior al 0,5%. Como se usa en el presente documento, las "condiciones normóxicas" constituyen concentraciones de oxígeno de aproximadamente el 20,8% o superior.

[0291] Los procedimientos convencionales para lograr la hipoxia o la anoxia están bien establecidos e incluyen usar cámaras ambientales que dependen de catalizadores químicos para eliminar el oxígeno de la cámara. Dichas cámaras están disponibles en el mercado, por ejemplo, en BD Diagnostic Systems (Sparks, MD) como Sobres de hidrógeno + dióxido de carbono desechables GASPAC o cámaras ambientales BIO-BAG. Como alternativa, el oxígeno puede agotarse intercambiando el aire en una cámara con un gas no oxígeno, tal como nitrógeno. Puede determinarse la concentración de oxígeno, por ejemplo usando un analizador de oxígeno FYRITE (Bacharach, Pittsburgh PA).

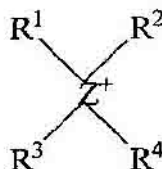
[0292] Se contempla los procedimientos de la divulgación pueden usar una combinación de exposición al antagonista de oxígeno u otro compuesto activo y la alteración de las concentraciones de oxígeno en comparación con el aire ambiental. Además, la concentración de oxígeno del entorno que contiene la materia biológica puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30;31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100%, o cualquier intervalo que pueda derivarse de la misma. Además, se contempla que un cambio en la concentración puede cualquiera de los porcentajes o intervalos anteriores, en cuanto a un descenso o aumento comparado con el aire ambiental o con un entorno controlado.

D. Agentes de Obtención de Dianas Mitocondriales

- [0293] Las mitocondrias de obtención de dianas selectivamente se considerada una realización de la divulgación en algunos aspectos con el fin de mejorar la actividad. Dicha obtención de dianas mitocondriales selectiva se ha realizado conjugando agentes con un catión de trifenilfosfonio lipófilo, que cruzan fácilmente las bicapas lipídicas y se acumulan aproximadamente 1000 veces dentro matriz mitocondrial impulsado por el gran potencial (150-180 mv) a través de la membrana interna mitocondrial. Se han preparado análogos tanto de vitamina E como de ubiquinona y se usan para obtener dianas con éxito de las mitocondrias (Smith y col., 1999; Kelso y col., 2001; Dhanasekaran y col., 2004). Se ha preparado un tiol, bromuro de tributiltrifosfonio (mostrado a continuación), y se ha usado para las mitocondrias de destino, donde se acumula varios cientos de veces (Burns y col., 1995; Burns & Murphey, 1997).



- [0294] Dichos conjugados parecen ser candidatos adecuados para los compuestos activos. Además de agentes tiol libres, pueden ser útiles compuestos de tiosulfenilo sustituido, (H-S-S-R). Se contempla que en algunas realizaciones, los agentes tienen la estructura:



- en la que Z es P o N;

R^1 , R^2 y R^3 son arilo, heteroarilo, alquilarilo, cicloalquilo o alquilo (adecuadamente fenilo, bencilo, toliilo, piridilo, ciclohexilo, alquilo C_3 - C_{10} , opcionalmente halogenados);

R^4 es $-R^5SR^6$, en la que R^5 es alquilo C_1 - C_{10} , R^6 es H o SH, SO_3H o PO_3H .

III. Ensayos para Estasis

- [0295] Pueden evaluarse inicialmente diversos compuestos útiles para inducir la estasis usando una diversidad de pruebas diferentes. La estasis puede medirse mediante varias formas, incluyendo mediante la cuantificación de la cantidad de oxígeno consumido por una muestra biológica, la cantidad de dióxido de carbono producido por la muestra (medición indirecta de la respiración celular), o caracterización de la motilidad.
- [0296] Para determinar la velocidad de consumo de oxígeno o la velocidad de producción de dióxido de carbono, la materia biológica se pone en una cámara que se cierra herméticamente con dos aberturas; para importación y exportación de gas. Se pasa gas (aire ambiental u otros gases) a la cámara en un caudal determinado y sale del puerto de salida para mantener aproximadamente 1 atmósfera de presión en la cámara. Antes y después de la

exposición a la cámara, el gas pasa a través de un detector de dióxido de carbono y/o un detector de oxígeno para medir (cada segundo) la cantidad de cada compuesto en la mezcla de gases. La comparación de estos valores en el tiempo da la velocidad de consumo de oxígeno o la producción de dióxido de carbono.

- 5 **[0297]** Se han establecido otras cribas para identificar compuestos activos candidatos de estasis. Estas cribas y variaciones de los mismos pueden emplearse para implementar los aspectos de la invención.

A. Ensayos con Pez Cebra

- 10 **[0298]** Se estableció un ensayo de detección para inductores de estasis usando embriones de 48 horas de edad de pez cebra (*D. rerio*). Estos embriones son transparentes, lo que permitirá ver, usando un microscopio de disección con una lente de 4-20 aumentos de potencia, el latido del corazón y el flujo sanguíneo resultante en el vaso principal a lo largo de la espalda y en la cola. El ritmo cardíaco en estos animales es un indicador de la actividad metabólica del organismo, de tal forma que una reducción de la frecuencia cardíaca significa una reducción en el metabolismo. Los embriones se diseccionaron de sus cáscaras de huevo y se distribuyeron cinco por pocillo en una placa de cultivo tisular de poliestireno con fondo plano y se incubaron en 1 ml de agua peces estándar. El agua de peces se compone de 1 cucharadita de Instant Ocean (mezcla de agua marina artificial, Aquarium Systems, Inc.) por 5 galones. Se ajustó el cloruro cálcico a 150 ppm y el bicarbonato sódico a ~100 ppm. La conductividad del agua es de 900 microsiemens y el pH es de aproximadamente 6,5-7,4. Se preparó una solución de ácido sulfhídrico mediante burbujeo de una mezcla de ácido sulfhídrico (100 ppm) equilibrado con aire ambiental en un matraz que contenía 150 ml de agua de peces a una velocidad de 100 centímetros cúbicos por minuto durante 60-90 minutos. Se estimó que esto era suficiente para lograr una solución saturada, casi saturada, o saturada en su mayoría de ácido sulfhídrico. En base a la solubilidad conocida del ácido sulfhídrico en solución de Ringer a pH 7 en 1 atmósfera y temperatura ambiente, se calculó que el agua de peces contenía hidrógeno sulfuro aproximadamente 0,1 molar. Los peces se expusieron a la solución de ácido sulfhídrico y sus ritmos cardíacos se controlaron durante las 24 horas subsiguientes contando el número de latidos por minuto. El pez de control (expuesto a agua de peces solo) tenía aproximadamente 160-200 latidos por minuto que no cambiaron significativamente durante el período de observación de 24 horas. 2-3 horas después de la exposición al ácido sulfhídrico, que contenía agua para peces, los latidos del corazón se redujeron a la mitad a 60-80 latidos por minuto. En cuatro horas, los lados del corazón se redujeron aún más, incluyendo algunos ejemplos en los que el latido del corazón fue cero o sólo unos pocos latidos por minuto. Después de cinco horas de exposición, la solución de ácido sulfhídrico se reemplazó por agua para peces y se dejó que los embriones se recuperasen durante una noche a 28 grados Celsius. 24 horas después de la exposición inicial a ácido sulfhídrico, los animales tratados y enjuagados mostraron un ritmo cardíaco normal de 160-200 latidos por minuto. Ya que el ácido sulfhídrico causó la quietud del latido del corazón, en algunos casos hasta una parálisis, seguido de un retorno a la normalidad, se consideró que el ácido sulfhídrico se había identificado como un inductor de estasis u otro compuesto activo por los criterios de este ensayo de detección.

B. Ensayos con Nematodos

- 40 **[0299]** Se estableció un ensayo de detección usando nematodos (*C. elegans*). Los nematodos no sobreviven bien a 4 grados Celsius, de tal forma que 24 horas a esta temperatura, mueren todos. Se expusieron gusanos durante X minutos a temperatura ambiente a una atmósfera que contenía monóxido de carbono Y%, antes de exponerlos a 4 grados C durante 16 h. En comparación con los gusanos de control previamente expuestos a aire ambiental donde todos murieron, los gusanos tratados con monóxido de carbono sobrevivieron con alta viabilidad después de la exposición al frío. Puesto que el monóxido de carbono es un conocido inductor de estasis en nematodos y queratinocitos de prepucio humano neonatal, el ensayo con nematodos es capaz de identificar compuestos inductores de estasis como tales por su capacidad para aumentar la supervivencia de gusanos expuestos a hipotermia letal cuando los gusanos se preequilibraban en el inductor de estasis u otro compuesto activo.

50 IV. Aplicaciones Terapéuticas o Preventivas

A. Trauma

- [0300]** La presente divulgación puede encontrar uso en el tratamiento de pacientes que reciben, o que son susceptibles a trauma. Un trauma puede causarse por traumatismos externos, tales como quemaduras, heridas, amputaciones, heridas de bala o trauma quirúrgico, o traumatismos internos, tales como ictus o ataque al corazón que dan como resultado la reducción aguda en la circulación, o reducciones en la circulación debido al estrés no invasivo, tal como la exposición al frío o la radiación. A nivel celular, el trauma a menudo da como resultado la exposición de células, tejidos y/u órganos a la hipoxia, dando como resultado de este modo la inducción de la

muerte celular programada, o "apoptosis". Sistémicamente, un trauma conduce a la inducción de una serie de procesos bioquímicos, tales como la coagulación, inflamación, hipotensión, y puede dar lugar al choque, que si persiste puede conducir a la disfunción del órgano, un daño celular irreversible y la muerte. Los procesos biológicos están diseñados para defender el cuerpo frente a un insulto traumático; sin embargo, pueden llevar a una secuencia de eventos que resulta perjudicial y, en algunos casos, fatal.

[0301] Por consiguiente, la presente invención contempla la colocación de tejidos, órganos, extremidades e incluso organismos completos en estasis como una manera de protegerlos de los efectos perjudiciales del trauma. En un escenario específico, donde atención médica no está fácilmente disponible, la inducción de estasis *in vivo* o *ex vivo*, como alternativa junto con la reducción en la temperatura del tejido, órgano u organismo, puede "comprar tiempo" para el sujeto, llevando atención médica al sujeto, o transportando el sujeto a la atención médica. La presente divulgación también contempla procedimientos para inducir la regeneración tisular y la curación de heridas mediante la prevención/retraso de los procesos biológicos que pueden dar como resultado una curación de heridas y regeneración tisular retardados. En este contexto, en situaciones en las que hay una herida considerable para la extremidad o el organismo, la inducción de estasis *in vivo* o *ex vivo*, como alternativa junto con una reducción en la temperatura del tejido, órgano u organismo, puede facilitar la curación de heridas y el proceso de regeneración tisular mediante la gestión de los procesos biológicos que inhiben la cicatrización y regeneración.

[0302] Además de la cicatrización de heridas y el choque hemorrágico analizados a continuación, pueden implementarse procedimientos para prevenir o tratar un trauma tal como paro cardíaco o ictus. La divulgación tiene particular importancia con respecto al riesgo de trauma en procedimientos quirúrgicos de emergencia, tales como toracotomía, laparotomía y transección esplénica.

1. Cicatrización de Heridas

[0303] En muchos casos, las heridas y el daño tisular son intratables o llevan períodos excesivos de tiempo para sanar. Ejemplos son heridas crónicas abiertas (úlceras de pie diabético y úlceras por presión estadio 3 y 4), heridas agudas y traumáticas, colgajos e injertos, y heridas subagudas (es decir, incisiones dehiscentes). Esto también se puede aplicar a otro daño en los tejidos, por ejemplo quemaduras y lesiones pulmonares por la inhalación de humo/aire caliente.

[0304] Experimentos anteriores demuestran que la hibernación protege contra la lesión (por ejemplo, pines en el cerebro), por lo tanto, puede tener efectos de curación. En consecuencia, esta tecnología puede ser útil en el control de los procesos de cicatrización de heridas, llevando al tejido a un entorno metabólicamente más controlado. Más particularmente, la extensión de tiempo que las células o tejidos se mantienen en estasis puede variar dependiendo de la lesión. En algunas realizaciones de la invención, la materia biológica está expuesta a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo durante aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1, 12 meses o mas.

2. Choque Hematológico (Choque hemorrágico)

[0305] El choque es una afección potencialmente mortal que progresa rápidamente cuando las intervenciones se retrasan. El choque es un estado en el que la perfusión adecuada para sustentar las necesidades fisiológicas de los tejidos de los órganos no está presente. Esta es una afección de hemodinámica profunda y alteración metabólica caracterizada por un fallo del sistema circulatorio para mantener la perfusión adecuada de los órganos vitales. Puede resultar de un volumen sanguíneo inadecuado (choque hipovolémico), una función cardíaca inadecuada (choque cardiogénico), o un tono vasomotor inadecuado; también se denomina choque distributivo (choque neurogénico, choque séptico, choque anafiláctico). A menudo da como resultado una rápida mortalidad del paciente. Muchas afecciones; incluyendo sepsis, pérdida de sangre, autorregulación deteriorada y pérdida del tono autonómico, pueden producir estados de choque o similares a choque. La presente invención se anticipa para prevenir los efectos perjudiciales de todos los estados de choque anteriores, y mantener la vida de la materia biológica que se somete a tal choque.

[0306] En el choque hemorrágico, la pérdida de sangre supera a la capacidad del cuerpo para compensar y proporcionar una perfusión y oxigenación tisular adecuados. Esto suele deberse a un traumatismo, pero también puede ser causado por una hemorragia espontánea (por ejemplo, sangrado gastrointestinal, el parto), cirugía y otras causas. Más frecuentemente, un choque hemorrágico clínico es provocado por un episodio hemorrágico agudo con

un evento precipitante discreto. Menos comúnmente, puede observarse un choque hemorrágico en afecciones crónicas con pérdida subaguda de sangre.

[0307] Los mecanismos de compensación fisiológicos en el caso de una hemorragia incluyen una vasoconstricción mesentérica y periférica inicial, para desviar sangre hacia la circulación central. Esto se refuerza entonces mediante una taquicardia progresiva. Una monitorización invasiva puede revelar un índice cardíaco elevado, un aporte de oxígeno aumentado (es decir, DO_2) y un consumo de oxígeno elevado (es decir VO_2) por los tejidos. El nivel de lactato, el estado ácido-base, y otros marcadores pueden ser asimismo indicadores útiles para un estado fisiológico. La edad, los tratamientos medicamentosos así como los factores comórbidos pueden influir en la reacción de un paciente a un choque hemorrágico.

[0308] Un fallo de los mecanismos de compensación puede conducir a la muerte en el caso de un choque hemorrágico. Sin intervención, en el caso de un choque hemorrágico grave ha de considerarse una distribución trimodal clásica de las muertes. En el plazo de minutos tras una hemorragia aparece un pico de mortalidad inicial debido a un desangrado inmediato. Aparece otro pico debido a la descompensación progresiva después de 1 a varias horas. Aparece un tercer pico después de días o semanas debido a una septicemia y a un fallo orgánico.

[0309] En los Estados Unidos, una lesión accidental es la causa principal de morbilidad y mortalidad en las personas entre las edades de 1 y 44 años. En 2001, se produjeron 157.078 muertes de residentes como resultado de lesiones. De éstas, el 64,6 por ciento se clasificaron como accidentales, el 19,5 por ciento fueron suicidios, el 12,9 por ciento fueron homicidios, el 2,7 por ciento era de intención indeterminada, y el 0,3 por ciento involucró una intervención legal u operaciones de guerra. Las principales causas de muerte por lesiones fueron el tráfico de vehículos a motor, armas de fuego y caídas. Una gran proporción de estas muertes se dan como resultado de una pérdida masiva de sangre debido al trauma, lo que conduce a un choque hemorrágico.

[0310] En la mayoría de los casos de lesiones de trauma, los pacientes que acuden a un servicio de urgencias de un hospital se tratan por médicos de urgencias y se dan de alta sin necesidad de cirugía o cuidados por un servicio de trauma. Sin embargo, los pacientes con graves lesiones requieren estabilización dentro de la "Hora Dorada" después de que ocurrió la lesión, para mejorar las posibilidades de supervivencia y minimizar la discapacidad.

[0311] Como la mayoría de casos de choque se debe a una lesión causada por un accidente, una atención pre-hospitalaria es crítica para la supervivencia del paciente. Esto implica una evaluación rápida, estabilización y transporte expedito a un centro adecuado para la evaluación y cuidado definitivo. En todos los pacientes con el síndrome de choque, el mantenimiento de las vías respiratorias del paciente, una respiración adecuada y una circulación adecuada son el foco primario del tratamiento de emergencia. La evaluación es esencial, ya que los cambios en el paciente indican la progresión del síndrome del choque. La intervención temprana es vital para minimizar el daño a tejidos y órganos y minimizar la incapacidad permanente, y la identificación temprana de la causa clínica primaria es fundamental. Los tratamientos están dirigidos a corregir la causa del síndrome del choque y la reducción del avance. El acceso intravenoso y la reanimación con líquidos (típicamente solución salina IV) son básicos, sin embargo, existe cierto debate sobre esto. La rápida inversión de la hipovolemia puede aumentar la hemorragia, los coágulos parcialmente formados por desalojamiento, y los factores de coagulación diluidos.

[0312] Una vez en el departamento de emergencias, el enfoque es en la optimización de la perfusión y la oxigenación de los órganos vitales. El diagnóstico y tratamiento de la hemorragia subyacente deben realizarse rápidamente y concurrentemente con la gestión del choque. Hay dos etapas principales de choque: fase de compensación temprana o fase progresiva. Se contempla que las realizaciones de la invención pueden aplicarse a pacientes en cualquiera o ambas fases.

[0313] Cuando el choque hipovolémico el resultado de una hemorragia masiva, el líquido de reemplazo de elección es sangre entera o glóbulos rojos empaquetados. Las soluciones cristaloides mejorarán temporalmente el volumen circulante, pero el paciente también necesita un reemplazo de glóbulos rojos para transportar oxígeno a los tejidos. La gestión del choque se centra en la gestión de fluidos, el equilibrio del ácido-base y en mejorar la contracción miocárdica. El tratamiento de la causa subyacente del choque también debe tratarse para disminuir la progresión del síndrome de choque. Se indujo la hibernación de todo el cuerpo en ratones, y hubo una caída inmediata en estado metabólico general (según se midió por el desprendimiento de CO_2). Esto era reversible, y los ratones parecían funcionar normalmente, incluso después de exposiciones repetidas. Por consiguiente, la invención se refiere a la inducción de un estado de hibernación de todo el cuerpo usando H_2S (u otro antagonista de oxígeno u otro compuesto activo), para conservar órganos vitales y la vida del paciente. Esto permitirá el transporte a un entorno controlado (por ejemplo, cirugía), donde que se puede abordar la causa inicial del choque, y entonces el

paciente recuperará una función normal de forma controlada. Para esta indicación, la primera hora después de la lesión, denominada la "Hora Dorada", es crucial para un resultado exitoso. La estabilización del paciente en este periodo de tiempo es la meta principal, y el transporte a un centro de cuidados críticos (por ejemplo, urgencias, cirugía, etc.) donde la lesión puede abordarse correctamente. Por lo tanto, sería ideal para mantener al paciente en estasis para permitir esto y para abordar las preocupaciones inmediatas, tal como la fuente del choque, reposición de la pérdida de sangre y el restablecimiento de la homeostasis. Mientras que esto variará significativamente, en la mayoría de los casos, la cantidad de tiempo que se mantendrá la estasis es entre aproximadamente 6 y aproximadamente 72 horas después de la lesión. En algunas realizaciones de la invención, la materia biológica está expuesta a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo durante aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o más, y cualquier intervalo o combinación de los mismos.

[0314] La biología de la hemorragia mortal y los eventos fisiológicos que conducen al choque y finalmente a la muerte no se entienden completamente. Sin embargo, existen mecanismos a través de los cuales el H₂S podría reducir los efectos letales de hipoxia isquémica. El ácido sulfhídrico inhibe la citocromo C oxidasa y podría reducir la demanda de oxígeno mediante la inhibición de esta enzima³. La demanda de oxígeno disminuido puede reducir los efectos nocivos de los niveles de oxígeno bajos incluyendo una reducción de la acidosis metabólica. Además, los niveles de sulfidrilo del tejido disminuyen durante el choque (Beck y col., 1954). El H₂S exógeno puede prevenir este estado hipo-sulfídico y mantener la homeostasis de azufre.

[0315] El ácido sulfhídrico se produce de forma natural en los animales y muestra actividades biológicas potentes (Kamoun, 2004). La mayoría de las proteínas contiene residuos de cisteína ligados a disulfuro, y la conversión reversible de tiol libre a disulfuro puede regular las actividades enzimáticas específicas (Ziegler, 1985). Además, el sulfuro es electronegativo y muestra una alta afinidad para los metales de transición. Las proteínas que contienen átomos de metales de transición, tal como la citocromo oxidasa, pueden verse afectadas profundamente por el H₂S. Y finalmente, el metabolismo de H₂S en otras moléculas que contienen azufre reducido aumenta el número de tioles que pueden mostrar actividad biológica específica. Además de (o quizás debido a) estos modos potenciales de acción, el H₂S puede ejercer efectos sobre los sistemas cardio-pulmonar, neuroendocrino, inmune y/o hemostático que finalmente resultan ser beneficiosos en lesiones y enfermedades.

[0316] Una solicitud de patente provisional de Estados Unidos titulada "Methods, compositions and articles of manufacture for treating shock" presentada el 20 de abril de 2006 en nombre de Mark B. Roth, Mike Morrison y Eric Blackstone, describe el tratamiento del choque.

B. Hipotermia

[0317] En otra realización más, el presente inventor propone el uso de la presente divulgación para tratar gente con hipotermia extrema. Los procedimientos y las composiciones de la presente divulgación son útiles para inducir la hipotermia en un mamífero que necesita hipotermia. La hipotermia puede ser leve, moderada o profunda. La hipotermia leve comprende conseguir una temperatura corporal interna de aproximadamente entre 0,1 y 5 grados Celsius por debajo de la temperatura interna normal del mamífero. La temperatura corporal interna normal de un mamífero está generalmente entre 35 y 38 grados Celsius. La hipotermia moderada comprende conseguir una temperatura corporal interna de aproximadamente entre 5 y 15 grados centígrados por debajo de la temperatura corporal interna normal del mamífero. La hipotermia profunda comprende conseguir una temperatura corporal interna de aproximadamente entre 15 y 37 grados centígrados por debajo de la temperatura corporal interna normal del mamífero.

[0318] Se sabe en la técnica que la hipotermia leve es terapéuticamente útil y eficaz tanto en mamíferos no humanos como en seres humanos. El beneficio terapéutico de la hipotermia leve se ha observado en ensayos clínicos en seres humanos en el contexto de una parada cardíaca fuera del hospital. La exposición de los seres humanos a hipotermia leve en el contexto de paro cardíaco da como resultado una ventaja en la supervivencia y un resultado neurológico mejorado en comparación con el estándar del cuidado con normotermia, o la ausencia de hipotermia leve (Bernard y col., 2002; The Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group y col. 2002).

[0319] Los procedimientos y composiciones de la presente invención pueden tener ventajas sobre otros procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, envasando al sujeto en hielo, o rodeando el sujeto con una "carpa de refrigeración" en la que circula aire frío o líquido, para inducir una hipotermia leve, moderada o profunda en mamíferos o seres humanos. En estos casos, el sujeto resiste a la reducción de la

temperatura corporal interna por debajo de la normotermia e intenta generar calor temblando. El temblor, y el calor corporal engendrado en el mismo, pueden tener un impacto negativo en el logro de la hipotermia leve, por ejemplo, desacelerando la velocidad de descenso en la temperatura corporal interna que se consigue usando los procedimientos convencionales de inducción de hipotermia. En consecuencia, los seres humanos sometidos a niveles terapéuticos de hipotermia también se tratan con un fármaco que inhibe el temblor (bloqueando la neurotransmisión en las uniones neuromusculares) (Bernard y col., 2002).

[0320] Los procedimientos y composiciones de la presente invención se combinan con procedimientos o dispositivos médicos invasivos, conocidos en la técnica para inducir hipotermia terapéutica en mamíferos o seres humanos. Dichos procedimientos y dispositivos invasivos incluyen, pero sin limitación, sondas flexibles o catéteres que pueden insertarse en la vasculatura del sujeto que necesita hipotermia, donde la temperatura del catéter se ajusta por debajo de la temperatura corporal interna normal del sujeto, dando como resultado el enfriamiento de la sangre que está en contacto con el catéter. La sangre enfriada posteriormente genera una disminución de la temperatura corporal interna del mamífero. Mediante la incorporación de una retroalimentación de un termopar que controla la temperatura corporal interna del mamífero, la temperatura del catéter puede modularse para mantener una temperatura corporal interna especificada previamente. Dichos dispositivos médicos para lograr y mantener la hipotermia leve o moderada, denominada en la técnica como terapia de temperatura endovascular, se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Internet en innercool.com y radiantmedical.com.

[0321] El procedimiento proporciona que los pacientes con hipotermia extrema sean administrados con o se expongan a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo y después se restaure gradualmente su temperatura normal mientras se retira, de una forma controlada, el antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. De esta manera, el antagonista de oxígeno u otro compuesto activo tampona los sistemas biológicos dentro del sujeto de manera que puedan iniciarse gradualmente sin choque (o daño) al sujeto.

[0322] En un caso, a un sujeto que padece hipotermia se le dará una dosis oral o intravenosa de un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. El suministro intravenoso puede preferible debido a la no respuesta potencial del sujeto y la capacidad para proporcionar una dosificación controlada durante un periodo de tiempo. Como alternativa, si está disponible, el antagonista de oxígeno u otro compuesto activo puede proporcionarse en estado gaseoso, por ejemplo, usando una máscara de inhalación o incluso una cámara sellada que puede alojar todo el sujeto.

[0323] Idealmente, el paciente se estabilizará en cuando a ritmo cardíaco, respiración y temperatura ambiente antes de realizar cualquier cambio. Una vez estable, la temperatura ambiental se aumentará, de nuevo gradualmente. Esto puede lograrse simplemente retirando el sujeto de las condiciones hipotérmicas. Un aumento más regulado de la temperatura puede realizarse mediante la adición de capas sucesivas de ropa o mantas, mediante el uso de una envoltura térmica con aumento gradual de calor, o si es posible, colocando al sujeto en la cámara cuya temperatura puede aumentarse gradualmente.

[0324] Es preferible que los signos vitales del sujeto se supervisen en el transcurso del aumento de la temperatura. Además, junto con el aumento de la temperatura, el antagonista de oxígeno u otro compuesto activo se retira del entorno del sujeto. Tanto el tratamiento con calor como con el antagonista de oxígeno (u otro compuesto activo) se cesa en el momento final apropiado, determinado por el personal médico que supervisa la situación, pero en cualquier caso, en el momento que la temperatura del sujeto y otros signos vitales recuperan un rango normal. Se recomienda una supervisión continuada tras el cese del tratamiento durante de periodo de al menos 24 h.

C. Hipertermia

[0325] En ciertas condiciones, que pueden resultar de causas genéticas, infecciosas, por fármacos o ambientales, los pacientes pueden perder la regulación de temperatura homeostática dando como resultado una fiebre grave incontrolable (hipertermia). Esto puede dar como resultado la mortalidad o la morbilidad a largo plazo, especialmente daño cerebral, si no se controla adecuadamente.

[0326] Los ratones que inhalaban H₂S a 80 ppm inmediatamente experimentaron la hibernación. Esto incluyó una incapacidad para regular su temperatura corporal cuando la temperatura ambiente cayó por debajo de la temperatura ambiente. Por consiguiente, esta tecnología podría usarse para controlar la temperatura de todo el cuerpo en ciertos estados de hipertermia. Esto implicará probablemente la administración de H₂S (u otro antagonista de oxígeno o compuesto activo) a través de inhalación o perfundido en el suministro de sangre para inducir un estado de hibernación. Será útil que el paciente esté en estasis durante entre aproximadamente 6 y

aproximadamente 24 horas, tiempo durante el cual puede abordarse el origen de la fiebre. En algunas realizaciones de la invención, un paciente se expone a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo durante aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o más, y cualquier intervalo o combinación de los mismos.

[0327] Esto puede combinarse con una regulación de la temperatura de todo el cuerpo (baño en hielo/manta/sistema de refrigeración).

10 D. Cardioplejía y Enfermedad Cardíaca Coronaria

[0328] La presente invención puede encontrar uso en forma de soluciones para el tratamiento de enfermedad cardíaca coronaria (ECC) incluyendo un uso para la cardioplejía para la cirugía de revascularización coronaria (CRC).

15

[0329] La ECC es resultado de la aterosclerosis, un estrechamiento y endurecimiento de las arterias que suministran sangre rica oxígeno al músculo cardíaco. Las arterias se endurecen y se estrechan debido a la acumulación de placa en las paredes internas o revestimientos de las arterias. El flujo de sangre hacia el corazón se reduce según la placa estrecha las arterias coronarias. Esto disminuye el suministro de oxígeno al músculo cardíaco. Esto puede manifestarse en 1) angina de pecho, que es dolor o malestar de pecho que ocurre cuando el corazón no está recibiendo suficiente sangre; 2) ataque al corazón, puede producirse cuando un coágulo de sangre corta de forma repentina la mayor parte o todo el suministro sanguíneo a la parte del corazón y las células en el músculo cardíaco que no reciben suficiente sangre que transporta oxígeno empiezan a morir, causando potencialmente un daño permanente al músculo del corazón; 3) insuficiencia cardíaca, que es cuando el corazón no puede bombear sangre eficazmente al resto del cuerpo; arritmias, que son los cambios en el ritmo normal de los latidos del corazón.

[0330] Desde 1990, han muerto más personas de ECC que de cualquier otra causa. 3,8 millones de hombres y 3,4 millones de mujeres mueren cada año de ECC. En 2002, en los Estados Unidos más de 500.000 personas murieron como resultado directo de enfermedad cardíaca. A pesar de las mejoras las tasas de supervivencia, 1 de 4 hombres y 1 de 3 mujeres en los Estados Unidos aún mueren dentro de un año de un primer ataque al corazón reconocido.

[0331] El tratamiento médico de la ECC incluye medicamentos para reducir el riesgo de ataque cardíaco, insuficiencia cardíaca e ictus, junto con cambios de estilo de vida importantes para impedir la acumulación adicional de depósitos grasos en las arterias coronarias. No obstante, también se indica con frecuencia algún tipo de intervención quirúrgica.

[0332] Aproximadamente un tercio de los pacientes con ECC se someterán a angioplastia coronaria y stents. Durante la angioplastia con balón, se emplea un catéter con punta de balón para empujar la placa contra la pared arterial para permitir un mejor flujo de sangre en la arteria. La colocación del stent coronario acompaña a menudo al procedimiento de angioplastia. Los stents son tubos metálicos de malla de alambre pequeños que proporcionan estructuras para soportar la pared arterial dañada, reduciendo la posibilidad de que el vaso se cierre de nuevo (reestenosis) después de la angioplastia. En los Estados Unidos, se realizan casi 1 millón procedimientos de angioplastia de balón cada año. No todos los pacientes pueden tratarse por esta técnica; dichos pacientes deben someterse a cirugía cardíaca. Michaels y col., 2002.

45

[0333] Aproximadamente el 10% de los pacientes con ECC se someterá a cirugía de revascularización coronaria (CRC). Los pacientes con estrechamiento u bloqueo severo de la arteria coronaria principal izquierda o aquellos con una enfermedad que afecte a dos o tres arterias coronarias se consideran generalmente candidatos para la cirugía de revascularización. En la CRC, el cirujano utiliza una porción de un vaso sano (una arteria o una vena) de otra parte del cuerpo para crear un desvío (o derivación) alrededor de la parte bloqueada de la arteria coronaria. Los pacientes típicamente reciben de 1 a 5 derivaciones en una operación determinada. Durante el procedimiento, generalmente el corazón se deja en un estado de parálisis, conocido como cardioplejía (CP), durante el cual una máquina corazón-pulmón mantiene de forma artificial la circulación. Los pacientes se anestesian con anestesia general durante la operación, dura generalmente entre 3 a 6 horas.

50

[0334] Aproximadamente el 13% de todos los pacientes se re-admiten en el hospital dentro de 30 días debido a razones relacionadas con la CRC. Hannan y col., 2003; Mehlhorn y col., 2001. Uno de los principales motivos para la readmisión es la insuficiencia cardíaca, presumiblemente debido al daño isquémico durante la cirugía. Por lo tanto, se está haciendo mucho trabajo para mejorar la protección del miocardio durante el período en el que el corazón no

se perfunde con normalidad.

[0335] Recientes avances en cirugía cardíaca se han centrado en optimización de parámetros cardiopléjicos con la esperanza de prevenir la disfunción ventricular postoperatoria y mejorar el resultado global. Cohen y col., 1999.

[0336] Se perfunden soluciones cardiopléjicas a través de los vasos y cámaras del corazón y hacen que su latido intrínseco se detenga, manteniendo al mismo tiempo la viabilidad del órgano. La cardioplejía (parálisis del corazón) es deseable durante una cirugía a corazón abierto y durante la adquisición, transporte y almacenamiento de corazones de donantes para su uso en procedimientos de trasplante de corazón.

[0337] Las técnicas cardiopléjicas anteriores empleaban soluciones cristaloides frías para iniciar y mantener el paro cardíaco intraoperatorio. Sin embargo, ha quedado claro que la cardioplejía sanguínea facilitó el metabolismo miocárdico aeróbico durante el período de pinzamiento y redujo la producción de lactato anaerobio. Además, la cardioplejía sanguínea mejora la capacidad de transporte de oxígeno, mejora el consumo de oxígeno miocárdico y conserva las reservas de fosfato de alta energía del miocardio. Están disponibles varias soluciones cardiopléjicas diferentes y se conocen diferentes técnicas para usar las soluciones de cardioplejía en la técnica. Por ejemplo, las soluciones cardiopléjicas a menudo tienen diferentes cantidades de potasio, magnesio y varios otros componentes menores. A veces los fármacos se añaden a la solución cardiopléjica para facilitar la relajación del músculo y la protección de la isquemia. Los enfoques actuales también incluyen formulaciones de sólo sangre con la suplementación de electrolitos apropiada, tal como glutamato-aspartato. Ejemplos específicos de las soluciones usadas son la solución del Hospital Santo Tomás, la solución de la Universidad de Wisconsin, la solución de Stanford y la solución de Bretschneider. Los ejemplos de otras soluciones emergentes implican las soluciones que contienen adenosina, insulina o L-arginina que se han mencionado anteriormente. La variación de la temperatura a la que se usa la solución cardiopléjica también puede tener efectos beneficiosos.

[0338] Una combinación de retrógrado continuo junto con cardioplejía anterógrada intermitente reduce la producción de lactato del miocardio, conserva las acumulaciones de ATP y mejora la recuperación metabólica después de la liberación del pinzamiento. La cardioplejía tibia (29 °C) reduce la producción de lactato y ácido durante la parada cardiopléjica, y mejora la función ventricular postoperatoria. Se requieren flujos cardiopléjicos de al menos 200 ml/min para lavar los productos finales metabólicos perjudiciales y mejorar la función ventricular. Es claro ahora que la gestión de las direcciones futuras en la gestión cardiopléjica implicará el uso de aditivos cardiopléjicos para mejorar adicionalmente los efectos protectores. Por ejemplo, se han hecho intentos para implementar los efectos beneficiosos del preacondicionamiento isquémico usando adenosina. De forma análoga, se ha empleado cardioprotección de insulina para mejorar el rendimiento ventricular estimulando el metabolismo aeróbico postoperatorio temprano. Finalmente, se ha demostrado que la L-arginina, un donante de óxido nítrico, es beneficioso en estudios experimentales y puede representar una opción adicional para la mejora de la protección miocárdica intraoperatoria. Es probable que se observe un beneficio futuro de la suplementación cardiopléjica en un alto riesgo con una función ventricular deficiente, para la cual las técnicas de protección actuales son insuficientes. Hay un aumento constante en la incidencia de pacientes que presentan alto riesgo, y estos casos, y las consiguientes complicaciones, colocan una carga desproporcionada en el sistema de salud. Por lo tanto, las mejoras en esta área son prometedoras para el adelanto de la atención en este campo.

[0339] A pesar de los efectos protectores proporcionados por los procedimientos actuales para inducir la cardioplejía, todavía existe algún grado de lesión por isquemia-reperfusión al miocardio. La lesión por isquemia-reperfusión durante la cirugía de revascularización coronaria da como resultado unos resultados deficientes (tanto en la morbilidad como la mortalidad), especialmente debido a un estado ya debilitado del corazón. La isquemia miocárdica da como resultado un metabolismo miocárdico anaerobio. Los productos finales del metabolismo anaeróbico conducen rápidamente a acidosis, una disfunción mitocondrial y la necrosis de miocito. El agotamiento del fosfato de alta energía se produce casi de inmediato, con una pérdida del 50 por ciento de las reservas de ATP en 10 minutos. La disminución de la contractilidad se produce en 1 a 2 minutos, con el desarrollo de contractura isquémica y lesión irreversible después de 30 a 40 minutos de isquemia normotérmica (37 °C).

[0340] La lesión por reperfusión es un fenómeno bien conocido tras la restauración de la circulación coronaria. La lesión por reperfusión se caracteriza por un metabolismo oxidativo del miocardio anormal. Además de los cambios estructurales creados durante la isquemia, la reperfusión puede producir radicales libres de oxígeno citotóxicos. Estos radicales libres de oxígeno tienen una función significativa en la patogénesis de la lesión por reperfusión oxidando fosfolípidos sarcolemas y afectando así a la integridad de la membrana. Se liberan ácidos grasos libres oxidados en la sangre venosa coronaria y son un marcador de la peroxidación de fosfolípidos de la membrana miocárdica. La protamina induce la activación del complemento, que activa los neutrófilos. Los neutrófilos activados

y otros leucocitos son una fuente adicional de radicales libres de oxígeno y otras sustancias citotóxicas.

[0341] La presente divulgación proporciona procedimientos y composiciones para inducir la cardioplejía que proporcionará una mayor protección del corazón durante la cirugía de revascularización. En ciertos casos, la presente invención proporciona una solución cardiopléjica que comprende H₂S (otro compuesto activo) disuelto en una solución o burbujado en forma de un gas en la solución. En algunos casos, la divulgación comprende adicionalmente al menos un primer dispositivo, tal como un catéter o cánula, para introducir una dosis adecuada de la solución cardiopléjica al corazón. En ciertos aspectos, la divulgación comprende adicionalmente al menos un segundo dispositivo, tal como un catéter o cánula, para eliminar la solución cardiopléjica del corazón.

[0342] La cirugía de revascularización dura típicamente 3-6 horas, sin embargo, las complicaciones y la CRC de múltiples vasos pueden extender la duración a 12 horas o más. Se contempla que el corazón se mantendrá en estasis durante la cirugía. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención, el corazón está expuesta a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo durante aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 horas o más, y cualquier intervalo o combinación de los mismos.

E. Reducción del Daño por Terapia contra el Cáncer

[0343] El cáncer es la causa principal de mortalidad en países industrializado por todo el mundo. El enfoque más convencional para el tratamiento del cáncer es mediante la administración de un agente citotóxico para el paciente de cáncer (o tratamiento *ex vivo* de un tejido) de tal forma que el agente tiene un efecto más letal sobre las células cancerosas que sobre las células normales. Cuanto mayor sea la dosis o más letal sea el agente, más eficaz será; sin embargo, por la misma razón, dichos agentes son más tóxicos (y a veces mortales) para las células normales. Por lo tanto, la quimioterapia y la radioterapia a menudo se caracterizan por efectos secundarios graves, algunas de los cuales amenazan la vida, por ejemplo, llagas en la boca, dificultad para tragar, boca seca, náuseas, diarrea, vómitos, fatiga, sangrado, pérdida de cabello e infección, irritación de la piel y pérdida de energía (Curran, 1998; Brizel, 1998).

[0344] Estudios recientes sugieren que la disminución transitoria y reversible de la temperatura corporal interna, o "hipotermia", puede llevar a mejoras en la lucha contra el cáncer. Se ha descubierto recientemente una hipotermia de 28 °C para reducir la radiación, la toxicidad inducida por doxorubicina y cisplatino en ratones. La actividad de combatir el cáncer de estos fármacos/tratamientos no se vio comprometida cuando se administraron a los animales enfriados; por el contrario, se mejoró, particularmente para el cisplatino (Lundgren-Eriksson y col., 2001). En base a este y otros trabajos publicados, el inventor propone que una reducción adicional de la temperatura interna proporcionará beneficios a pacientes con cáncer. Por lo tanto, la presente divulgación contempla el uso de antagonistas de oxígeno o de otro compuesto activo para inducir la estasis en tejidos normales de un paciente de cáncer, reduciendo así el impacto potencial de la quimioterapia o radioterapia sobre los tejidos. También permite el uso de mayores dosis de quimioterapia y radioterapia, lo que aumenta los efectos anticancerosos de estos tratamientos.

[0345] Se contempla el tratamiento de prácticamente cualquier trastorno hiperproliferativo, incluyendo neoplasias benignas y malignas, afecciones hiperproliferativas no neoplásicas, afecciones pre-neoplásicas y lesiones precancerosas. Dichos trastornos incluyen reestenosis, cáncer, cáncer resistente a múltiples fármacos, psoriasis primaria y tumores metastásicos, angiogénesis, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, eccema y cataratas secundarias, así como leucoplasia vellosa oral, displasia bronquial, carcinomas *in situ* e hiperplasia intraepitelial. En particular, la presente divulgación se dirige al tratamiento de cánceres humanos, incluyendo cáncer de próstata, pulmón, cerebro, piel, hígado, mama, sistema linfático, estómago, testículos, ovarios, páncreas, huesos, médula ósea, gastrointestinal, cabeza y cuello, cuello uterino, esófago, ojo, la vesícula biliar, riñón, glándulas suprarrenales, corazón, colon y sangre. También se contemplan para el tratamiento cánceres que implican las células epiteliales y endoteliales.

[0346] Generalmente, la quimioterapia y la radioterapia están diseñadas para reducir el tamaño del tumor, reducir el crecimiento de células tumorales, inducir apoptosis células tumorales, reducir la vasculatura tumoral, reducir o evitar la metástasis, reducir la velocidad de crecimiento del tumor, acelerar la muerte celular tumoral y matar a las células tumorales. Los objetivos de la presente divulgación no son diferentes. Por lo tanto, se contempla que se combinarán composiciones de antagonistas de oxígeno (u otro compuesto activo) con agentes anticancerosos secundarios (agentes secundarios) eficaces en el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa. Un agente "anticanceroso" es capaz de afectar negativamente al cáncer en un sujeto, por ejemplo, mediante la destrucción de

las células cancerosas, la estimulación de la apoptosis en las células cancerosas, la reducción del ritmo de crecimiento de las células cancerosas, la reducción de la incidencia o el número de metástasis, la reducción del tamaño del tumor, la inhibición del crecimiento tumoral, la reducción del riego sanguíneo de un tumor o de las células cancerosas, la potenciación de una respuesta inmunitaria contra las células cancerosas o un tumor, la prevención o inhibición de la evolución del cáncer o el aumento de la esperanza de vida en un sujeto con cáncer.

[0347] Los agentes anticancerosos secundarios incluyen agentes biológicos (bioterapia), agentes de quimioterapia y agentes de radioterapia. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionan en una cantidad combinada eficaz para matar o inhibir la proliferación del cáncer o células tumores, reduciendo o minimizando al mismo tiempo el impacto de los agentes secundarios sobre las células normales. Este proceso puede implicar poner en contacto o exponer las células con un antagonista de oxígeno (u otro compuesto activo) y el agente o agentes secundarios al mismo tiempo. Esto puede lograrse poniendo en contacto la célula con una única composición o formulación farmacológica que incluye ambos agentes, o poniendo en contacto o exponiendo la célula con dos composiciones o formulaciones diferentes, al mismo tiempo, donde una composición incluye un antagonista de oxígeno y la otra incluye el segundo agente o agentes.

[0348] Como alternativa, la terapia de antagonista de oxígeno (u otro compuesto activo) puede preceder o seguir el tratamiento con un agente secundario en intervalos que van de minutos a semanas. En realizaciones donde el otro agente y la construcción de la expresión se aplican por separado a la célula, generalmente se asegurará que no pase un periodo de tiempo considerable entre el tiempo de cada entrega, de tal forma que el agente y la construcción de expresión aún puedan ejercer un efecto combinado ventajosamente sobre la célula. En dichos casos, se contempla que se pueda poner en contacto la célula con ambas modalidades en aproximadamente 12-24 h entre sí y, más preferiblemente, en aproximadamente 6-12 h entre sí. En algunas situaciones, puede ser conveniente extender el periodo de tratamiento significativamente, sin embargo, cuando pasen de varios días (2, 3, 4, 5, 6 ó 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ó 8) entre las administraciones respectivas. En ciertas realizaciones, se prevé que la materia biológica se mantendrá en estasis durante aproximadamente entre 2 y aproximadamente 4 horas mientras que se administra el tratamiento contra el cáncer. En algunas realizaciones de la invención, la materia biológica está expuesta a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo durante aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6 horas o más, y cualquier intervalo o combinación de los mismos.

[0349] Pueden emplearse diversas combinaciones, el compuesto activo es "A" y el agente anticanceroso secundario, tal como radio o quimioterapia, es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0350] La administración de los antagonistas de oxígeno u otros compuestos activos de la presente invención a un paciente seguirá los protocolos generales para la administración de productos de quimioterapia, teniendo en cuenta en la toxicidad, si la hubiera, del compuesto. Se espera que los ciclos de tratamiento se repetirían según fuera necesario. También se contempla que diversas terapias convencionales, así como una intervención quirúrgica, pueden aplicarse junto con la terapia contra el cáncer que se ha descrito anteriormente. Se contempla adicionalmente que cualquier tratamiento de combinación contemplado para su uso con un compuesto activo y un compuesto no activo (tal quimioterapia como), puede aplicarse con respecto a múltiples compuestos activos.

1. Quimioterapia

[0351] Las terapias contra el cáncer también incluyen una gran diversidad de terapias de combinación tanto con tratamientos basados en productos químicos como en radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión del receptor de estrógenos, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de la proteína farnesilo, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), o alguna variante análoga o derivada de los anteriores. La combinación de quimioterapia con terapia biológica se conoce como bioquimioterapia.

2. Radioterapia

[0352] Otros factores que ocasionan daño al ADN y se han utilizado extensamente incluyen los comúnmente conocidos como rayos γ , rayos X, y/o el suministro directo de radioisótopos a células tumorales. También se contemplan otras formas de factores de daño a ADN, tales como microondas y radiación UV. Es muy probable que todos estos factores afecten la amplia escala de daño sobre ADN, sobre los precursores de ADN, sobre la replicación y reparación de ADN, y sobre el ensamble y mantenimiento de cromosomas. Los intervalos de dosis para rayos X varían de dosis diarias de 50 a 200 roentgen durante periodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), a dosis individuales de 2000 a 6000 roentgen. Los intervalos de dosificación para radioisótopos varían ampliamente y dependen de la vida media del isótopo, la resistencia y tipo de radiación emitida, y la captación por parte de las células neoplásicas.

[0353] Las expresiones "en contacto" y "expuesto", cuando se aplican a una célula, se usan en el presente documento para describir el proceso mediante el cual una composiciones de la invención (por ejemplo, un compuesto antitumoral hipóxico) o agente quimioterapéutico o radioterapéutico se suministran a una célula diana o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana. En la terapia de combinación, para lograr la aniquilación o estasis de la célula, ambos agentes se suministran a una célula en una cantidad combinada eficaz para aniquilar o prevenir su división.

3. Inmunoterapia

[0354] Los productos inmunoterapéuticos, en general, se basan en el uso de células efectoras inmunes y moléculas para definir la diana y destruir células cancerosas. El efector inmune puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador sobre la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo por sí solo puede servir como un efector de terapia o puede reclutar otras células para realizar realmente la muerte celular. El anticuerpo también puede conjugarse con un fármaco o toxina (quimioterapéutica, radionuclido, cadena de ricina A, toxina de cólera, toxina pertusis, etc) y sirve simplemente como un agente de diana. Como alternativa, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula superficial que interactúa, directamente o indirectamente, con una diana celular de célula tumoral. Diversas células efectoras incluyen linfocitos T citotóxicos y células NK.

[0355] La inmunoterapia también puede usarse como parte de una terapia combinada. El enfoque general para la terapia combinada se analiza a continuación. En un aspecto de la inmunoterapia, la célula tumoral debe llevar algún marcador que sea responsable de la activación como diana, es decir, no está presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para definir una diana en el contexto de la presente divulgación. Los marcadores tumorales comunes incluyen antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a un tumor urinario, un antígeno fetal, la tirosinasa (p97, gp68, TAG-72, HMFG, Sialyl Lewis Antigen, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógeno, receptor de laminina, erb B y p155. Un aspecto alternativo de la inmunoterapia es obtener efectos anticancerosos con efectos inmunoestimuladores. También existen moléculas de inmunoestimulación que incluyen: citocinas, tales como IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, gamma-IFN, quimiocinas, tales como MIP-1, MCP-1, IL-8 y factores de crecimiento, tales como ligando FLT3. Se ha demostrado que la combinación de las moléculas de inmunoestimulación, como proteínas o el uso de administración génica en combinación con un supresor de tumor, tal como mda-7, mejoran los efectos antitumorales (Ju y col., 2000).

[0356] Como se ha analizado anteriormente, los ejemplos de inmunoterapias actualmente bajo investigación o en uso, son adyuvantes inmunes (por ejemplo, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos) (Patente de Estados Unidos 5.801.005; Patente de Estados Unidos 5.739.169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides y col., 1998), terapia de citocinas (por ejemplo, interferones α , β y γ , IL-1, GM-CSF y TNF) (Bukowski y col., 1998; Davidson y col., 1998; Hellstrand y col., 1998) terapia génica (por ejemplo, TNF, IL1, IL-2, p53) (Qin y col., 1998; Austin- Ward y Villaseca, 1998; Patente de Estados Unidos 5.830.880 y Patente de Estados Unidos 5.846.945) y anticuerpos monoclonales (por ejemplo, antigangliósido GM2, anti- HER- 2, anti- p185) (Pietras y col., 1998; Hanibuchi y col., 1998). La herceptina (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal quimérico (ratón-humano) que bloquea el receptor HER2- neu. Posee actividad antitumoral y se ha aprobado para su uso en el tratamiento de tumores malignos (Dillman, 1999). La terapia de combinación del cáncer con herceptina y quimioterapia ha mostrado ser más eficaz que las terapias individuales. Por lo tanto, se contempla que puede emplearse una o más terapias anticáncer con las terapias antitumorales que se describen en el presente documento.

F. Neurodegeneración

[0357] La presente divulgación puede usarse para tratar enfermedades neurodegenerativas. Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la degeneración de tejido neuronal, y a menudo están acompañadas de pérdida de memoria, pérdida de la función motora y demencia. Con las enfermedades relacionadas con la demencia, las facultades intelectuales y cognitivas integrales superiores se alteran cada vez más con el tiempo. Se estima que aproximadamente el 15% de personas de 65 años o más tienen demencia de leve a moderada. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen la enfermedad de Parkinson; enfermedad neurodegenerativa primaria; Corea de Huntington; ictus y otros procesos hipóxicos o isquémicos; neurotrauma; daño neurológico inducido metabólicamente; secuelas de infartos cerebrales; choque hemorrágico; enfermedad neurodegenerativa secundaria (metabólica o tóxica); enfermedad de Alzheimer y otros trastornos de la memoria; o demencia vascular, demencia multi-infarto, demencia de cuerpos de Lewy o demencia neurodegenerativa.

[0358] Las pruebas muestran que la salud de un organismo, especialmente el sistema nervioso, depende de ciclos entre estados oxidativos y reductores, que se relacionan íntimamente con los ritmos circadianos. Es decir, el estrés oxidativo impuesto sobre el cuerpo durante la consciencia se cicla a un entorno reductor durante el sueño. En gran parte es por esto por lo que se piensa que el sueño es tan importante para la salud. Ciertas patologías neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Alzheimer, así como los procesos normales del envejecimiento se han relacionado con un desequilibrio en este patrón de ciclos. Existen algunas pruebas de que los niveles de H_2S del cerebro se reducen en estas condiciones (Eto y col., 2002).

[0359] La presente divulgación puede usarse para regular y controlar los ciclos entre los estados oxidativos y reductor, por ejemplo, para impedir o invertir los efectos de enfermedades y procesos neurodegenerativos. El control de los ritmos circadianos puede tener otras aplicaciones, por ejemplo, ajustar estos patrones cíclicos después de viajar de una zona horaria a otra, con el fin de ajustarse a la nueva zona horaria. Además, se ha demostrado que una actividad metabólica reducida en general está correlacionada con la salud en los animales y seres humanos de edad avanzada. Por lo tanto, la presente divulgación será también útil para suprimir la función metabólica global para el aumento de la longevidad y la salud en la edad avanzada. Se contempla que este tipo de tratamiento probablemente se administrará por la noche, durante el sueño durante un periodo de aproximadamente 6 a 10 horas cada día. Esto puede requerir un tratamiento diario durante periodos prolongados de tiempo de meses a años.

30 G. Envejecimiento

[0360] Además, en ciertos estados de estasis, incluyendo, pero sin limitación, estados en los que la materia biológica está en un estado de animación suspendida, el propio envejecimiento puede inhibirse por completo durante el periodo de tiempo en el que la materia biológica está en este estado. Por lo tanto, la presente divulgación puede inhibir el envejecimiento del material biológico, con respecto a la extensión de la cantidad de tiempo en que el material biológico sobrevivirá normalmente y/o con respecto a la evolución de una fase de desarrollo de la vida a otra.

40 H. Enfermedad sanguínea

[0361] Pueden abordarse varias enfermedades y afecciones de la sangre usando composiciones y procedimientos de la divulgación. Estas enfermedades incluyen, pero sin limitación, talasemia y anemia de células falciformes.

45 I. Talasemia

[0362] La hemoglobina normal contiene dos cadenas polipeptídicas de alfa globina y dos de beta globina (proteína), cada una unida a un hemoanillo que contiene hierro. La talasemia es un grupo de afecciones en las que existe un desequilibrio de las cadenas alfa y beta que conduce a las cadenas no compatibles a precipitarse sobre la membrana de los glóbulos rojos normalmente frágiles, lo que conduce a la destrucción celular. Esto conduce a anemia grave que la medula intenta compensar intentando producir más glóbulos rojos. Desafortunadamente, debido a la toxicidad de las cadenas no compatibles, este proceso es muy ineficaz, lo que conduce a una expansión masiva del espacio de la medula y a la diseminación de la sangre hasta otras partes del cuerpo. Esto y la anemia conducen a mayores toxicidades. Existen varios modelos por los cuales las cadenas de globina no emparejadas son tan dañinas pero muchos requieren que los radicales libres aumentados generados por el hierro unido a las cadenas de globina no emparejadas sean fundamentales para la destrucción temprana de los glóbulos rojos. Por lo tanto, cualquier intervención que pueda disminuir el daño oxidativo de estos radicales libres puede aumentar la esperanza de vida de los glóbulos rojos, mejorar la anemia, conducir a una necesidad disminuida de fabricación de glóbulos rojos y un menor daño de la expansión y diseminación de la medula.

[0363] Se estima que alrededor de 30.000 niños nacen con talasemia grave cada año, de los cuales se estima que la mayor parte de los que viven en países desarrollados viven hasta los 20, mientras que en los países del tercer mundo (donde vive la mayor parte de pacientes) muere como niños de corta edad. En base a los resultados actuales en otros sistemas modelo presentados aquí, se espera que la exposición de los animales a talasemia con sulfuros aumente la capacidad de sus glóbulos rojos para soportar el daño oxidativo, lo que conduce a una supervivencia de los glóbulos rojos prolongada.

2. Enfermedad de las células falciformes

[0364] La hemoglobina normal (HbA) contiene dos cadenas polipeptídicas de alfa globina y dos beta globina (proteína), cada una unida a un hemo anillo que contiene hierro. En la enfermedad de las células falciformes (ECF; también denominada anemia de células falciformes) es un grupo de afecciones en el que una cadena mutante beta conduce a una alteración de la hemoglobina (HbS). Tras la desoxigenación, HbS puede polimerizar (cristalizar) y precipitar daños en la membrana de los glóbulos rojos normalmente frágil, lo que conduce a la destrucción celular y anemia por bajos contenidos de glóbulos rojos (GR). Además las células con HbS polimerizado cambian de forma (falciformes) y se vuelven pegajosas y activan mecanismos que conducen a la coagulación y el bloqueo del flujo sanguíneo. Esto puede conducir a daño hipóxico del tejido circundante dando como resultado dolor, disfunción orgánica y eventualmente muerte prematura. Se aprecian reservas disminuidas de antioxidantes que contienen azufre en los pacientes. Además, el daño oxidativo y las especies de oxígeno de reactivo aumentado (EOR) se ven implicadas en la cristalización, el daño a la membrana de los glóbulos rojos y el daño tisular relacionado con un flujo sanguíneo inadecuado. Los sulfuros se han visto implicados en la "recarga" de reservas de antioxidantes, minimizando potencialmente el daño oxidativo. Existen motivos para pensar que los sulfuros pueden impedir problemas en fases graves de la patología de las células falciformes. Además, dada la capacidad de los antagonistas de oxígeno para proteger contra hipoxia en otros sistemas, sugiere que debe también proteger animales y seres humanos sometidos a las condiciones adversas que posee esta patología.

[0365] Alrededor de 120.000 niños nacen con ECF cada año. Actualmente, los pacientes en países desarrollados viven hasta los 40 y los 50 años, sin embargo, con tremendos problemas de dolor y daños en los órganos, incluyendo ictus, problemas pulmonares, cardíacos y de piel. En los países del tercer mundo (donde vive la mayor parte de los pacientes) muchos mueren como niños de corta edad. Nuestra hipótesis es que la exposición de los animales y eventualmente de los seres humanos con ECF a sulfuros dará como resultado mejoras en la salud.

IV. Aplicaciones de conservación

[0366] La presente invención puede usarse para conservar o almacenar una diversidad de materias biológicas. Incluyendo células, tejidos, órganos y organismos completos para fines de transporte y/o almacenamiento. En ciertos casos, la materia biológica se conserva para impedir un daño frente a condiciones adversas.

[0367] En ciertas divulgaciones, la materia biológica puede exponerse a un compuesto activo durante aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5 semanas, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más años, cualquier combinación o intervalo que puede derivarse de los mismos. Se contempla que pueden usarse compuestos activos para inducir estasis y que pueden usarse otros agentes para mantener la estasis y conservarlos durante cualquier periodo de tiempo significativo. Como alternativa, se contempla que puede usarse un compuesto activo para inducir y/o mantener la estasis. Puede estar en combinación con otros agentes, tal como cambios ambientales en la presión y/o la temperatura.

1. Células

[0368] Como se ha analizado anteriormente, se contemplan una diversidad de células para su uso con la presente divulgación. Se contempla que dichas células pueden conservarse en procedimientos, aparatos y composiciones que se describen en el presente documento.

55 a. Plaquetas

[0369] En ciertos casos, la presente divulgación puede encontrar uso en la conservación de plaquetas. Las plaquetas son fragmentos de células pequeños (1/3 del tamaño de los eritrocitos) que tienen una función vital en la formación de los coágulos de sangre en el sitio de la hemorragia. La hemostasis se consigue por la adherencia a las

paredes de los vasos sanguíneos, la liberación de productos químicos coagulantes, forman coágulos de sangre para obstruir la ruptura en la pared bascular y/o los vasos sanguíneos estrechados. Los recuentos plaquetarios normales están entre 150.000-400.000 recuentos/ μ l. Los concentrados plaquetarios se transfunden para una diversidad de aplicaciones, por ejemplo, 1) para impedir el sangrado debido a trombocitopenia; 2) en un paciente sangrante para mantener el recuento de plaquetas por encima de 50.000; 3) para abordar la función plaquetaria anormal que es congénita o debido a medicaciones, sepsis, malignidades, trauma tisular, complicaciones obstétricas, circulación extra corpórea o fallo orgánico, tal como enfermedad hepática o renal.

10 **[0370]** Cada unidad de plaquetas contiene una media de $0,8-0,85 \times 10^{11}$ plaquetas. Los concentrados plaquetarios también contienen aproximadamente 60 ml de plasma (factores de coagulación) y pequeños números de glóbulos rojos y leucocitos. Las unidades plaquetarias deben mantenerse a temperatura ambiente (20 °C-24 °C) y agitarse durante el almacenamiento. Pueden almacenarse en el banco de sangre hasta 5 días. No es posible un almacenamiento más prolongado en el presente debido al deterioro de las plaquetas y el riesgo de contaminación microbiana. Actualmente existen dos fuentes de plaquetas:

15

1) **Concentrados plaquetarios de donantes aleatorios combinados** se preparan a partir de plaquetas que se han recolectado por unidades de centrifugación de sangre entera. Pueden agruparse hasta 8 unidades de plaquetas, cada una de un donante por separado, en una única bolsa para transfusión. Las plaquetas expiran 4 horas después del agrupamiento. Todas las unidades son del mismo tipo ABO. Si no hay disponibles plaquetas ABO compatibles, 20 las plaquetas incompatibles ABO pueden sustituirse con muy poco riesgo. La dosis para adultos habitual es 4-6 unidades de plaquetas de donantes aleatorios combinadas.

2) **Plaquetas de aféresis**, recogidas de un único donante, se preparan en tamaños convencionales (equivalente a ~4 unidades agrupadas) y "grandes" (equivalente a ~6 unidades combinadas). Un concentrado de plaquetas de 25 aféresis contiene 200-400 ml de plasma. Pueden recogerse como una unidad aleatoria (plaquetas de aféresis aleatorias) o pueden obtenerse para un receptor específico de un miembro de la familia o un donante "dirigido" HLA compatible voluntario. Las plaquetas de aféresis duran 4 horas después de su tratamiento durante su salida del banco de sangre.

30 **[0371]** El almacenamiento plaquetario tiene problemas que no se dan con el almacenamiento de sangre entera u otros componentes. Mientras que la sangre entera, los glóbulos rojos y blancos pueden almacenarse a 4 °C durante semanas, las plaquetas se agregaran en almacenamiento frío y cuando se permita sedimentarán. Por lo tanto, el procedimiento convencional de almacenamiento de plaquetas es a temperatura ambiente, aproximadamente de 20 °C a 24°C, con agitación suave. Incluso en estas condiciones, las plaquetas pueden almacenarse únicamente 35 durante 5 días antes de que sea necesario desecharlas. Este problema de caducidad da como resultado aproximadamente una pérdida anual de 500 millones de dólares en costes para los hospitales de Estados Unidos. Si pudiera conseguirse incluso un aumento moderado de la esperanza de vida, aproximadamente el 90% de esta pérdida podría evitarse.

40 **[0372]** Un problema adicional con el almacenamiento de las plaquetas es la contaminación bacteriana. La contaminación se debe principalmente a los estafilococos de la piel durante la flebotomía, o incluso bacteremia del donante. La contaminación bacteriana de las plaquetas representa el mayor riesgo de infección con cualquier procedimiento de transfusión sanguínea.

45 **[0373]** Un factor significativo que afecta a la viabilidad de las plaquetas es la regulación del pH. Virtualmente todas las unidades de plaquetas almacenadas de acuerdo con los procedimientos aceptados actualmente muestran un descenso del pH desde su valor inicial de aproximadamente 7,0. Este descenso se debe principalmente a la producción de ácido láctico por la glucólisis plaquetaria y hasta un punto menor con respecto a la acumulación de CO₂ de la fosforilación oxidativa. Según el pH cae, las plaquetas cambian de forma de discos a esferas. Si el pH cae 50 por debajo de 6,0, los cambios irreversibles en la morfología y la fisiología de las plaquetas las convierten en no viables después de la transfusión. Por lo tanto, una meta importante en la conservación de las plaquetas es impedir este descenso del pH. Previamente se pensó que las plaquetas debían almacenarse en recipientes permeables a oxígeno ya que la glucólisis se estimula cuando la disponibilidad de oxígeno es limitada (véase por ejemplo, patente de Estados Unidos 5.569.579) . La presente invención, sin embargo, demuestra que la viabilidad de las plaquetas 55 almacenadas puede prolongarse almacenándolas en un entorno anóxico.

[0374] La presente divulgación proporciona procedimientos y composiciones que aumenta el tiempo de supervivencia de las plaquetas almacenadas y reducen la contaminación bacteriana. En un caso, la presente divulgación proporciona un recipiente impermeable a oxígeno que puede cerrarse herméticamente en el que se

colocan las plaquetas. Después del sellado, un generador anaerobio (por ejemplo, una tableta de borohidruro sódico con un catalizador de paladio) convierte el oxígeno atmosférico en el recipiente en agua. El recipiente también puede contener un indicador, que indica el nivel de tensión del oxígeno. Una vez en condiciones anóxicas, las plaquetas también pueden almacenarse a temperaturas inferiores.

5

[0375] Las plaquetas pueden suspenderse y almacenarse en plasma o cualquier solución de almacenamiento de plaquetas conocida en la técnica. Por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 4.828.976 y 4.447.415 desvelan varias soluciones usadas comúnmente adecuadas para el almacenamiento de plaquetas.

10 **[0376]** Típicamente, las plaquetas se almacenan en plasma del donante y se administran de esta forma.

[0377] Generalmente, la divulgación consiste en un entorno sellado (recipiente, bote, bolsa impermeable o cámara) en el que la tensión de oxígeno puede reducirse a menos del 1% (10.000 ppm) y más específicamente en el intervalo de 10-100 ppm, o menor. La reducción en oxígeno atmosférico en este entorno puede conseguirse mediante varios procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la reducción del oxígeno atmosférico puede conseguirse con la generación de gas hidrógeno, con o sin un catalizador, para combinar con el oxígeno para producir agua. Otras reacciones pueden catalizarse para combinar el oxígeno con otros compuestos, tales como carbono para producir dióxido de carbono y así sucesivamente. Además, el oxígeno puede remplazarse intercambiando todo el aire en la cámara con gas que contiene cualquier combinación de gases que no incluyen oxígeno. Además, el oxígeno puede eliminarse colocando la cámara al vacío para eliminar todos los gases. Como alternativa, el oxígeno puede competir usando otro gas o compuesto que compite por el oxígeno, tal como CO₂. También puede usarse una combinación de eliminación de oxígeno y competición del oxígeno restante. El dispositivo también puede comprender un modo para medir la concentración de oxígeno para asegurar que se ha conseguido el estado anaerobio apropiado. Por ejemplo, la concentración de oxígeno puede medirse usando el indicador anaerobio en base a metileno azul que cambia de color azul a incoloro en ausencia de oxígeno. Como alternativa, puede usarse un medidor de oxígeno u otro dispositivo de medición de oxígeno.

[0378] El dispositivo también comprende algún modo para contener las plaquetas en el entorno sellado de tal forma que el oxígeno pueda eliminarse de la solución que contiene las plaquetas, así como de las propias plaquetas. Un ejemplo de esto es tener las plaquetas en una bolsa permeable al gas colocada dentro del entorno sellado. Las plaquetas también pueden mantenerse en un recipiente abierto en el interior del entorno sellado. Como alternativa, las plaquetas pueden colocarse directamente en el contenedor/bolsa sellada impermeable.

[0379] La Bio-Bag™ de Becton Dickinson (número de producto 261215) es un ejemplo de un recipiente impermeable a oxígeno que puede cerrarse herméticamente que puede usarse para crear un entorno anóxico para el almacenamiento de plaquetas. La Bio-Bag, que es un kit que se vende para el aislamiento de bacterias anaeróbicas, incluye una bolsa impermeable a gas que puede cerrarse herméticamente; un indicador anaerobio; un generador anaerobio (generador de gas hidrógeno); y catalizadores de paladio. Las plaquetas en una bolsa permeable a gas se sellarán en el interior de la Bio-Bag para su almacenamiento.

40

[0380] El generador anaerobio en la Bio-Bag es un dispositivo activado por la adición de agua, que pasa a través de una serie de canales hasta una mecha de papel de filtro. La mecha retarda y regula la introducción de agua en la cámara de la tableta, proporcionando una liberación controlada del gas hidrógeno. La tableta generadora de gas consiste en borohidruro sódico. El hidrógeno liberado de esta reacción se combina con el oxígeno atmosférico en el recipiente sellado para producir agua. Esta reacción se cataliza por el paladio en el recipiente.

45

[0381] El Puget Sound Blood Center (PSBC) evaluó independientemente el estado de las plaquetas almacenadas en condiciones anóxicas los días 0,5 y 8 usando un panel estandarizado de pruebas *in vitro*. Los resultados indicaron que las plaquetas almacenadas en condiciones anóxicas hasta 8 días realizan plaquetas tan buenas o mejores que las almacenadas en condiciones convencionales. Los estudios en curso replican este experimento, y prolongan el tiempo de observación a 13 días.

50

[0382] Los expertos en la técnica estarán familiarizados con procedimientos para ensayar la función plaquetaria. Por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos 6.790.603, la función plaquetaria puede ensayarse mediante (1) expresión de la proteína interna sobre la membrana celular en respuesta al estímulo con un agonista inductor de la activación; (2) la capacidad de agregación al estimularse por un antagonista; y (3) la secreción de trifosfato de adenosina. Los ejemplos de agonista que pueden causar activación de la función plaquetaria incluyen trombina, epinefrina, ADP y colágeno.

55

[0383] La expresión de la proteína interna puede medirse mediante conjugación de una molécula con tinte fluorescente seguido de clasificación en un clasificador de células fluorescentes. En general, es preferible usar dos anticuerpos monoclonales, uno que se une a una molécula superficial celular que se expresa constitutivamente y un segundo que se une a una molécula de superficie celular que se expresa únicamente después de la activación.

5 Cada anticuerpo monoclonal se conjuga en un tinte coloreado diferente, que puede distinguirse mediante espectrofluorometría. Un ejemplo no limitante de una molécula de superficie celular expresada constitutivamente es GPIIb/IIIa; un ejemplo no limitante de una molécula de superficie celular expresada después de la activación es P-selectina. Se conoce bien en la técnica la elaboración de anticuerpos monoclonales para proteínas. La patente de Estados Unidos Nº 5.470.738, es un ejemplo de un procedimiento de preparación de anticuerpos monoclonales para
10 GPIIIa. Otro anticuerpo monoclonal antiplaquetario es aquel para GP IV, como se desvela por la patente de Estados Unidos Nº 5.231.025, Los anticuerpos también pueden adquirirse en el mercado a partir de tales empresas, tal como Becton-Dickinson (Filadelfia).

[0384] Otro parámetro de la función plaquetaria es la capacidad de agregación cuando se estimulan por un
15 agonista. La suspensión de las plaquetas es tensa y con un color blanco lechoso. La agregación y la posterior sedimentación de los agregados puede estimarse visualmente, o medirse con un densitómetro.

[0385] Todavía otra medida de la función plaquetaria es la secreción de ATP. Las plaquetas que son capaces de funcionar bien son capaces de secretar glóbulos blancos ATP que ya se han activado o han perdido función en otras
20 formas que no pueden secretar ATP.

2. Cultivo celular

[0386] La presente divulgación puede extenderse a la protección de células en cultivo, que podrían de otro morir o
25 inducirse en apoptosis. En el contexto de la presente divulgación, las células se exponen a un compuesto activo antes de y/o mientras están en el cultivo. Las células que pueden cultivarse de acuerdo con la invención incluyen aquellas que pueden colocarse eventualmente de nuevo en un contexto fisiológico, es decir, aquellas para un trasplante posterior. Dichas células incluyen, pero sin limitación, médula ósea, células de la piel y células epiteliales. Además, algunas células trasplantables se beneficiaran en gran medida de la expansión en el cultivo, aumentando
30 de este modo la cantidad de material que puede introducirse en el huésped. Las células epiteliales del tracto gastrointestinal se contemplan específicamente como células que pueden beneficiarse de la exposición a un compuesto activo.

[0387] Además, la divulgación se extiende al cultivo de células tumorales. Se sabe que el cultivo de células
35 tumorales tiene como resultado la alteración del fenotipo, y en algunos casos la muerte. Esto hace que los experimentos de cultivo tisular sobre células tumorales sean altamente impredecibles.

[0388] Se conocen bien por los expertos en la técnica técnicas de cultivo celular generales. Pueden encontrarse ejemplos de este conocimiento en Shaw (1996) y Davis (1994), ambos de los cuales se incorporan por referencia en
40 el presente documento. También se encuentra información general y modificaciones de las técnicas de cultivo celular tradicionales en la patente de Estados Unidos 5.580.781. Además, se describen técnicas para cultivar piel en la patente de Estados Unidos 6.057.148. Se contempla que estas técnicas, así como otras conocidas por los expertos en la técnica, se complementarán con el medio que contiene uno o más compuestos activos, o se perfundirán con un compuesto activo en forma de líquidos y/o gases.

45

E. Conservación de células, tejido y órganos

[0389] En ciertas realizaciones de la divulgación, es deseable conservar materia biológica, para impedir lo máximo posible un daño a la materia por perecimiento o descomposición. Aunque el primer trasplante de riñón con éxito se
50 realizó en 1954 y los primeros trasplantes de corazón e hígado se realizaron en 1967, cada año miles de personas mueren necesitando trasplante de órgano. Debido a una diversidad de causas, necesitan corazones, pulmones, riñones e hígados. Además, hay pacientes que pueden usar un páncreas o una cornea. Aunque existe una necesidad constante de donantes de órganos, otro obstáculo significativo para proporcionar a aquellos que necesitan un trasplante de órgano con un órgano es las limitaciones en las técnicas de conservación de órganos
55 actuales. Por ejemplo, se cree ampliamente que un corazón humano debe transportarse dentro de 4 horas durante para que exista cualquier oportunidad de que el trasplante posterior sea un éxito. Rager, 2004 (véase la tabla a continuación).

Tiempo de isquemia fría máximo

[0390]

Órgano	Tiempo de Conservación
Corazón y Pulmones	4-6 horas
Hígado	12-24 horas
Riñón	48-72 horas
Páncreas	12-24 horas
Intestino delgado	12 horas

5 Además, la causa principal del fallo del trasplante de órganos para corazones trasplantados en los primeros 30 días es lesión por isquemia-reperusión.

[0391] La obtención y conservación del órgano, la compatibilidad tisular y la inmunosupresión son los ingredientes principales para el éxito de un trasplante de órgano sólido. Los aspectos técnicos de la operación de obtención del
10 órgano permiten que múltiples equipos trabajen en conjunto para procurar todos los órganos útiles de un solo donante. De media se obtienen 3,6 órganos de un único donante fallecido.

[0392] La conservación de los órganos sólidos depende de la refrigeración intravascular rápida *in situ* seguido de la retirada de los órganos, el almacenamiento de los órganos en fluido de conservación enfriado con hielo y el
15 transporte rápido a los hospitales receptores. El tiempo de isquemia fría es la longitud de tiempo que los órganos están en hielo, sin flujo sanguíneo. El tiempo de isquemia fría máximo limita la cantidad de tiempo que puede pasar entre la recuperación del órgano y el trasplante del órgano (Tabla 5). Entre el 2%-10% de los órganos compatibles y obtenidos no puede usarse debido al tiempo de isquemia prolongado, dependiendo del tiempo de órgano. De forma análoga, aproximadamente del 10 al 20% de los órganos obtenidos no se usa debido a una función del órgano
20 deficiente y/o infección (sin incluir VIH/CMV/hepatitis).

[0393] Las técnicas de conservación actuales implican el uso de soluciones enfriadas con hielo que incluyen electrolitos, antioxidantes, tampones de ión hidrógeno y azúcares. Punch y col., 2001. Una compatibilidad tisular apropiada depende de la correspondencia con el grupo sanguíneo (por ejemplo, el tipo de sangre, A, B o O) para
25 todos los órganos. Los regímenes inmunosupresores típicamente incluyen tres fármacos: un glucocorticoide, tal como prednisona, un antimetabolito, tal como azatioprina o micofenolato, y un inhibidor de calcineurina, tal como ciclosporina o tacrolimus.

[0394] Los dos procedimientos usados más frecuentemente para conservar/transportar corazones para trasplante
30 son almacenamiento hipotérmico y perfusión continua. El primer procedimiento, el corazón se para se retira del donante y después se enfría rápidamente y se transporta en almacenamiento frío. En el ultimo procedimiento, se emplean típicamente las siguientes etapas: 1) flujo pulsátil; 2) hipotermia; 3) oxigenación de las membranas, y 4) un perfusato que contiene ambos.

35 [0395] Para mejorar la perspectiva de un trasplante con éxito, se han desarrollado técnicas para una mejor conservación de un órgano para trasplante. Se han producido dos áreas generales de desarrollo, una en el área de las soluciones de conservación y la otra en el área de los contenedores de órganos.

[0396] En ciertos contextos, tal como trasplante, las consecuencias adversas de la cicatrización de heridas pueden
40 perjudicar o impedir un injerto apropiado del tejido trasplantado. En el contexto de la presente invención, se prevé que los tejidos donados y recibidos se traten previamente al trasplante con un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo, como se ha analizado anteriormente con respecto a la cicatrización de heridas, en un esfuerzo por inhibir los procesos biológicos, tales como inflamación, apoptosis y otros acontecimientos de cicatrización de heridas/post-trasplante que dañen los tejidos injertados.

45

F. Organismos

[0397] Dichos organismos pueden usarse con fines de investigación, tales como ratones de laboratorio (banco de ratones), o para consumo, tal como peces. En esta situación, se contempla que la estasis puede mantenerse de
50 forma indefinida. Además, la estasis puede inducirse en plantas o partes de plantas, incluyendo una fruta, flores, hojas, tallos, semillas, esquejes. Las plantas pueden ser agrícolas, medicinales o decorativas. La inducción de estasis en plantas puede mejorar la vida útil o la resistencia del patógeno del conjunto o parte de la planta. Por lo tanto, en realizaciones de la invención, un organismo o parte del mismo puede exponerse a un antagonista de

oxígeno u otro compuesto activo durante aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 30 segundos, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5 semanas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más años, y cualquier combinación o intervalo que pueda derivarse de los mismos.

G. Agentes de conservación

[0398] Se han desvelado una diversidad de soluciones de conservación en las que el órgano se rodea o se perfunde con la solución de conservación mientras se transporta. Una de las soluciones usada más comúnmente es ViaSpan® (Belzer UW), que se emplea con almacenamiento en frío. Otros ejemplos de dichas soluciones o componentes de dichas soluciones incluyen la solución de St. Thomas (Ledingham y col., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 93: 240-246, 1987), solución de Broussais, solución UW (Ledingham y col., Circulation 82 (Parte 2) IV 351-8, 1990), solución de Celsior (Menasche y col., Eur. J. Cardio. Thorax. Surg. 8: 207-213, 1994); solución de la Universidad de Stanford, y solución B20 (Bernard y col., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 90: 235-242, 1985), así como las descritas y/o reivindicadas en las patentes de Estados Unidos 6.524.785; 6.492.103; 6.365.338; 6.054.261; 5.719.174; 5.693.462; 5.599.659; 5.552.267; 5.405.742; 5.370.989; 5.066.578; 4.938.961; y 4.798.824.

[0399] Además de soluciones, también se conocen otro tipo de materiales para su uso en el transporte de órganos y tejidos. Estos incluyen material gelatinoso u otros materiales semi-sólidos, tales como los descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.736.397.

[0400] Algunos de los sistemas y soluciones para la conservación de órganos implican específicamente la perfusión de oxígeno en la solución o el sistema para exponer el órgano al oxígeno, ya que se cree que mantener el órgano o el tejido en un entorno oxigenado mejora la viabilidad. Véase Kuroda y col., (Transplantation 46 (3): 457-460, 1988) y las patentes de Estados Unidos 6.490.880; 6.046.046; 5.476.763; 5.285.657; 3.995.444; 3.881.990; y 3.777.507. Se cree que los corazones aislados que se ven privados de oxígeno durante más de cuatro horas pierden vigor y no son útiles en el receptor ya que debido a la lesión por isquemia/reperfusión. Véase la patente de Estados Unidos 6.054.261.

[0401] Además, muchas, si no todas, las soluciones y contenedores para la conservación y el trasplante de órganos implican hipotermia (temperatura por debajo de la temperatura ambiente, a menudo cerca pero no bajo 0 °C), lo que se ha denominado "fundamento de todos los procedimientos útiles de conservación de órgano y tejidos". Patente de Estados Unidos 6.492.103.

[0402] Para mejorar la perspectiva de un trasplante con éxito, se han desarrollado técnicas para una mejor conservación de un órgano para trasplante. Se han producido dos áreas generales de desarrollo, una en el área de soluciones de conservación y la otra en el área de los contenedores de órganos.

[0403] Además, muchas, si no todas, las soluciones y contenedores para la conservación y el trasplante de órganos implican hipotermia (temperatura por debajo de la temperatura ambiente, a menudo cerca pero no bajo 0 °C), lo que se ha denominado "fundamento de todos los procedimientos útiles de conservación de órgano y tejidos". Patente de Estados Unidos 6.492.103.

[0404] En el campo del trasplante de órganos, se cree que ciertas condiciones están relacionadas con la afección del órgano y el pronóstico para un trasplante con éxito: 1) minimización del hinchamiento celular y edema; 2) prevención de acidosis intracelular; 3) minimización del daño isquémico; y 4) provisión de sustrato para la regeneración de compuestos de fosfato de alta energía y ATP durante la reperfusión. La lesión por isquemia/reperfusión en el trasplante de órganos es especialmente problemática ya que el órgano colectado se retira del cuerpo, se aísla de la fuente sanguínea y se ve privado así de oxígeno y nutrientes durante un periodo de tiempo prolongado (Patente de Estados Unidos 5.912.019). De hecho, uno de los problemas más importantes en el trasplante es la incidencia relativamente alta de la función retardada del injerto (FRI) debido a la necrosis tubular aguda (NTA) después de la cirugía. Los procedimientos actuales aun experimentan problemas en estas áreas, lo que destaca la importancia de la presente invención.

[0405] No obstante, la presente invención puede usarse junto con otras composiciones y procedimientos de conservación. Como se analiza en las patentes de Estados Unidos 5.952.168, 5.217.860, 4.559.258 y 6.187.529, los materiales biológicos pueden conservarse, por ejemplo, guardando los órganos trasplantables o reemplazables un largo tiempo.

[0406] En las células, tejidos/órganos, o cadáveres pueden darse compuestos que mejoran o mantienen la condición de los órganos para el trasplante. Dichos procedimientos y composiciones incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos 5.752.929 y 5.395.314.

5

[0407] Además, los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden incluir la exposición de la materia biológica a soluciones de conservación, tales como las analizadas, además de una exposición a un antagonista de oxígeno u otro compuesto activo.

10 [0408] Se contempla que cualquier agente o solución usados con una muestra biológica que está viva y que se usara como un material vivo será farmacéuticamente aceptable o farmacológicamente aceptable. La frase "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción alérgica o una reacción adversa similar cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como un ingrediente activo se
15 entiende bien en la técnica. Típicamente, dichas composiciones se preparan como soluciones líquidas o suspensiones; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de usar.

20 [0409] Los órganos para trasplantes pueden controlarse para evaluar su condición, particularmente con respecto al uso como un trasplante. Dichos procedimientos se describen en la patente de Estados Unidos 5.699.793.

[0410] Pueden administrarse varios fármacos a un paciente después de recibir un trasplante de órgano para facilitar el proceso de recuperación. Dichos fármacos incluyen compuestos y agentes que reducen o inhiben una respuesta inmune contra el órgano donado.

25

[0411] Además, se están investigando continuamente fármacos adicionales que se ofrecen para su uso en trasplantes de órganos, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos 6.552.083 (agente inhibidor que comprende ácido N-(3,4-dimetoxicinnamoyl)antranílico) y 6.013.256 (anticuerpos que se unen al receptor IL-2, tal como un anticuerpo humanizado anti-Tax).

30

H. Aparatos y Aplicaciones de Conservación

[0412] A lo largo de los años también se han desarrollado sistemas y contenedores para transportar órganos y tejidos. Cualquiera de estas realizaciones puede combinarse con los aparatos de la invención, lo que permite su uso
35 con antagonistas de oxígeno u otro compuesto activo.

[0413] La mayoría implican sistemas de refrigeración para su implementación, por ejemplo, los descritos en las patentes de Estados Unidos 4.292.817, 4.473.637, y 4.745.759, que emplean refrigeración activa con un líquido refrigerante que se bombea a través del sistema. Se han diseñado varios dispositivos sofisticados que implican
40 múltiples cámaras o contenedores duales, tales como en las patentes de Estados Unidos 5.434.045 y 4.723.974.

[0414] Algunos constituyen un sistema en el que el aparato se prevé para perfusión del órgano o del tejido en una solución de conservación, como se describe en las patentes de Estados Unidos 6.490.880; 6.100.082; 6.046.046; 5.326.706; 5.285.657; 5.157.930; 4.951.482; 4.502.295; y 4.186.565.

45

[0415] Algunos de los sistemas y soluciones para la conservación de órganos implican específicamente perfusión de oxígeno en la solución o el sistema para exponer el órgano a oxígeno ya que se cree que mantener el órgano o el tejido en un entorno oxigenado mejora la viabilidad. Véase Kuroda y col., (Transplantation 46 (3): 457-460, 1988) y las patentes de Estados Unidos 6.490.880; 6.046.046; 5.476.763; 5.285.657; 3.995.444; 3.881.990; y 3.777.507. Se
50 cree que los corazones aislados que se ven privados de oxígeno durante más de cuatro horas pierden vigor y no son útiles en el receptor debido a lesión por isquemia/reperfusión. Véase la patente de Estados Unidos 6.054.261.

[0416] Además, en algunas realizaciones de la divulgación, existen procedimientos para conservar plaquetas, como se ha mencionado anteriormente. Los inconvenientes de la técnica anterior se reducen o se eliminan usando
55 técnicas de esta divulgación. Las realizaciones relacionadas con las plaquetas y la reducción de oxígeno encuentran una amplia aplicación que incluye, pero sin limitación, cualquier aplicación que se beneficie del almacenamiento de larga duración de las plaquetas.

[0417] En un caso, las técnicas de reducción de oxígeno pueden realizarse en un kit. Por ejemplo, el kit vendido

actualmente con el número de producto 261215, disponible en Becton Dickinson, aprovecha las técnicas seleccionadas descritas aquí. Este kit incluye un generador anaerobio (por ejemplo, un generador de gas hidrógeno), catalizadores de paladio, un indicador anaerobio, y una "BioBag" impermeable a gas que puede cerrarse herméticamente, en el que los componentes anteriores (junto con las plaquetas en una bolsa permeable a gas) se colocan y se cierran herméticamente.

[0418] El generador anaerobio de este kit de ejemplo se activa por la adición de agua, que pasa a través de una serie de canales a una mecha de papel de filtro. La mecha retrasa y regula la introducción de agua en la cámara de la tableta, proporcionando una liberación controlada de gas hidrógeno. La tableta generadora de gas incluye borohidruro sódico. El hidrógeno liberado de esta reacción se combina con el oxígeno atmosférico en el contenedor cerrado herméticamente para producir agua. Esta reacción se cataliza por el paladio en el contenedor.

[0419] En un aspecto más general, las técnicas de esta divulgación pueden realizarse usando cualquier número de entornos cerrados herméticamente (por ejemplo, un contenedor, tal como un bote, bolsa impermeable o cámara), en los que la tensión de oxígeno puede reducirse. En un caso, un nivel de oxígeno dentro del contenedor y/o dentro de las plaquetas o una solución asociada puede reducirse a menos de aproximadamente el 1% (aproximadamente 10.000 partes por millón). En otro caso, el oxígeno puede reducirse aproximadamente a un intervalo de 10-100 partes por millón, o menos. En algunos otros casos, el oxígeno puede reducirse a cualquier valor porcentual que representa un descenso de oxígeno dentro de un contenedor y/o dentro de las plaquetas o una solución asociada. En casos preferidos, el contenedor es impermeable a gas, cerrable herméticamente. Como apreciarán los expertos en la técnica, "impermeable a gas" no connota necesariamente un nivel absoluto al 100% de impermeabilidad. Por el contrario, "impermeable a gas" debe interpretarse como está en la técnica para significar, por ejemplo, capaz de mantener una atmósfera que es menor de 10 ppm (frente a un gradiente de aire ambiente, típicamente 210.000 ppm) durante al menos 4 días. Típicamente, las bolsas disponibles en el mercado son impermeables durante 6 semanas o más.

[0420] Un contenedor puede cerrarse herméticamente una vez que los elementos reductores de oxígeno pertinentes se colocan en el interior. La reducción del oxígeno atmosférico en este entorno puede conseguirse mediante la generación de gas hidrógeno con o sin un catalizador, para combinar con el oxígeno para producir agua. Otras reacciones pueden catalizarse para combinar el oxígeno con otros compuestos, tales como carbono para producir dióxido de carbono. Otras realizaciones y combinaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Además, el oxígeno puede remplazarse intercambiando gases en la cámara con un gas que contiene una combinación de gases que no incluyen oxígeno. Adicionalmente, el oxígeno puede retirarse colocando un contenedor con un vacío suficiente para eliminar gases y particularmente para eliminar el oxígeno a un nivel reducido deseado. Como alternativa, el oxígeno puede competirse usando otro gas o compuesto que compite por el oxígeno, tal como CO. Puede usarse una combinación de la eliminación de oxígeno y la competición del oxígeno restante.

[0421] En diferentes realizaciones, puede usarse un dispositivo para medir los niveles de oxígeno para asegurar que se ha conseguido el estado anaerobio apropiado. Puede usarse el indicador anaerobio basado en metileno azul que cambia de color azul a incoloro en ausencia de oxígeno. Como alternativa, puede usarse un medidor de oxígeno disponible en el mercado, (por ejemplo, un medidor mecánico y/o eléctrico) u otro dispositivo de medición de oxígeno.

[0422] En diferentes realizaciones, las plaquetas están contenidas en un entorno sellado de tal forma que el oxígeno pueda eliminarse de la solución que contiene las plaquetas, así como de las propias plaquetas. Por ejemplo, las plaquetas en una bolsa permeable a gas pueden colocarse dentro del entorno sellado. Otros ejemplos limitantes pueden ser tener un contenedor abierto dentro de un entorno sellado para mantener las plaquetas. Como alternativa, se pueden contener plaquetas en un contenedor impermeable sellado (por ejemplo, una bolsa) y tener un mecanismo de eliminación de oxígeno incorporado.

[0423] En una realización, la divulgación implica un procedimiento en que las plaquetas y una solución se introducen en un contenedor impermeable a gas. El contenedor está graduado. El oxígeno se elimina del contenedor o de las plaquetas y la solución. Se contempla que se elimina aproximadamente, al menos aproximadamente o como mucho aproximadamente el 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100%, o cualquier intervalo derivable de los mismos, del oxígeno en la bolsa permeable a gas.

[0424] Este procedimiento también puede incluir indicar un nivel de oxígeno restante del contenedor tras la retirada de oxígeno. El oxígeno en el contenedor puede reducirse a un nivel de aproximadamente 10.000 partes por millón o menos. El oxígeno en el contenedor puede reducirse a un nivel entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 partes por millón. La introducción de las plaquetas puede implicar la inserción de un contenedor permeable a gas que mantiene las plaquetas y la solución en el contenedor impermeable a gas. La introducción de las plaquetas puede implicar insertar las plaquetas y la solución en una bolsa sellable y flexible o una cámara sellable rígida. El sellado del contenedor que puede producirse en cualquier fase de un proceso dado, puede implicar el uso de un adhesivo.

[0425] La eliminación del oxígeno puede implicar el bombeo de oxígeno del contenedor, y dicho bombeo puede implicar el bombeo con una bomba de vacío previo y/o turbobomba. La eliminación de oxígeno puede implicar introducir hidrógeno en el contenedor, que se combina con el oxígeno para producir agua. El hidrógeno puede introducirse a través de una reacción química. La reacción química puede catalizarse. La eliminación de oxígeno puede implicar introducir hidrógeno en el contenedor usando una tableta generadora de gas. El agua puede añadirse a una tableta generadora de gas que comprende borohidruro sódico para generar hidrógeno. Dicho agua puede añadirse de forma retardada y regular. Por ejemplo, puede usarse una mecha de papel de filtro. El agua puede introducirse a la mecha de papel de filtro a través de uno o más canales. El paladio puede catalizar una reacción química que genera hidrógeno. La eliminación de oxígeno puede implicar introducir uno o más agentes en el contenedor que se unen con el oxígeno. Puede introducirse CO en el contenedor, que se une con el oxígeno para formar CO₂. La eliminación de oxígeno puede implicar desplazar el oxígeno con uno o más gases.

[0426] La indicación de un nivel de oxígeno restante puede implicar el uso de un indicador de metileno azul que cambia de color en ausencia de oxígeno. Como alternativa, puede usarse un medidor de oxígeno. La indicación de un nivel de oxígeno restante dentro del contenedor puede implicar la indicación de un nivel de oxígeno restante dentro de las plaquetas o una solución.

[0427] En una realización, la divulgación implica un procedimiento en el que las plaquetas y una solución se introducen en un contenedor impermeable a gas. El contenedor se cierra herméticamente. El hidrógeno se genera a través de una reacción química añadiendo agua a borohidruro sódico. La reacción química elimina el oxígeno de las plaquetas y la solución a través de la combinación con el hidrógeno para formar agua. Se indica un nivel de oxígeno restante dentro del contenedor tras la retirada de oxígeno.

[0428] La reacción química puede catalizarse usando paladio. La adición de agua puede implicar el uso de una mecha de papel de filtro.

[0429] En una realización, la divulgación implica un sistema para eliminar el oxígeno de la plaquetas y una solución. El sistema incluye (a) un contenedor sellable e impermeable a gas, (b) un generador reductor de oxígeno, y (c) un indicador de oxígeno. El contenedor sellable impermeable a gas se configura y se dimensiona para recibir las plaquetas y la solución. El generador reductor de oxígeno se acopla al contenedor y se configura para eliminar oxígeno de las plaquetas y la solución a través del bombeo o una reacción química. En indicador de oxígeno se acopla al contenedor y se configura para indicar un nivel de oxígeno dentro del contenedor tras la retirada de oxígeno.

[0430] El contenedor puede ser una bolsa flexible y sellable. El generador reductor de oxígeno puede incluir un generador de hidrógeno configurado para generar hidrógeno para la combinación con el oxígeno para producir agua. El generador de hidrógeno puede incluir una sustancia generadora de gas que, cuando se combina con un agente, genera el hidrógeno. Esta sustancia generadora de gas puede incluir una tableta de borohidruro sódico, y el agente puede incluir agua. Un generador de hidrógeno también puede incluir un catalizador de paladio. El sistema también puede incluir un miembro configurado para retrasar o regular una reacción química controlando la introducción de uno o más componentes de la reacción química. Por ejemplo, el miembro puede incluir una mecha que retrasa o regula una reacción química.

[0431] En una realización, la divulgación implica un kit que incluye un generador de hidrógeno; un contenedor sellable impermeable a gas; y un indicador de oxígeno.

[0432] El generador de hidrógeno puede incluir una sustancia generadora de gas que, cuando se combina con un agente, genera el hidrógeno. Esta sustancia generadora de gas puede incluir una tableta de borohidruro sódico, y el agente puede incluir un catalizador de paladio. El kit también puede incluir una mecha configurada para retrasar o regular una reacción química que genera el hidrógeno.

[0433] Como se ha analizado anteriormente, los procedimientos de la divulgación pueden implicar emplear un aparato o sistema que mantiene el entorno en el que la materia biológica se coloca o se expone. La divulgación incluye un aparato en el que un compuesto activo, particularmente en forma de un gas, se suministra. En algunas realizaciones, el aparato incluye un contenedor con una cámara de muestras para mantener la materia biológica, en el que el contenedor está conectado a un suministro de gas que comprende los compuestos activos. Se contempla específicamente que el contenedor puede ser un contenedor sólido o puede ser flexible, tal como una bolsa.

[0434] En algunas realizaciones, la divulgación es un aparato para conservar una célula o células, comprendiendo el aparato: un contenedor que tiene una cámara de muestras con un volumen de no más de 775 litros; y un primer suministro de gas en comunicación fluida con la cámara de muestras, incluyendo el primer suministro de gas monóxido de carbono. En realizaciones adicionales, el aparato también incluye una unidad de refrigeración que regula la temperatura en el interior de la cámara de muestras y/o un regulador de gas que regula la cantidad de compuesto activo en la cámara o la cantidad de compuesto activo en una solución que está en la cámara.

[0435] Se contempla que puede haber un suministro de gas para un segundo gas o adicional o un segundo suministro de gas o adicional para el compuesto activo. El segundo suministro de gas puede estar conectado con la cámara de muestras o puede estar conectado con el primer suministro de gas. El gas adicional, como se ha analizado anteriormente, puede ser un gas no tóxico y/o no reactivo.

[0436] Un regulador de gas es parte del aparato en algunas realizaciones de la divulgación. Pueden emplearse uno, dos, tres, o más reguladores de gas. En algunos casos, el regulador de gas regula el gas suministrado a la cámara de muestras del primer suministro de gas. Como alternativa, regula el gas suministrado a la cámara de muestras o el primer suministro de gas del segundo suministro de gas, o puede ser un regulador tanto para el primer como el segundo suministro de gas. Se contempla adicionalmente que cualquier regulador de gas puede programarse para controlar la cantidad de gas suministrado a la cámara de muestra y/o a otro suministro de gas. La regulación puede o no ser durante un periodo de tiempo especificado. Puede haber un regulador de gas, que puede o no ser programable, para cualquier suministro de gas directa o indirectamente conectado a la cámara de muestras. En algunos casos, el regulador de gas se programa electrónicamente.

[0437] En algunos casos, la presión y/o la temperatura en el interior de la cámara pueden regularse con un regulador de presión o un regulador de temperatura, respectivamente. Como con el regulador de gas, estos reguladores pueden programarse electrónicamente. El aparato de la invención también puede tener una unidad de refrigeración y/o calentamiento para conseguir las temperaturas que se han analizado anteriormente. La unidad puede o no ser programable electrónicamente.

[0438] En realizaciones adicionales, el aparato incluye un carro con ruedas sobre el que descansa el contenedor o puede tener una o más asas.

[0439] Se contempla específicamente que la divulgación incluye un aparato para una célula o células, en el que el aparato tiene: un contenedor que tiene una cámara de muestras; un primer suministro de gas en comunicación fluida con la cámara de muestras, incluyendo el primer suministro de gas los compuestos activos; y un regulador de gas electrónicamente programable que regula el gas suministrado a la cámara de muestras desde el primer suministro de gas.

[0440] En algunas realizaciones, el aparato también tiene una estructura configurada para proporcionar un vacío dentro de la cámara de muestras.

[0441] Además, cualquier antagonista de oxígeno descrito en esta solicitud se contempla para su uso con los aparatos de la divulgación. En realizaciones específicas, el monóxido de carbono puede administrarse usando este aparato. En otros casos, puede administrarse un compuesto de calcogenuro o un compuesto que tiene la estructura de agente reductor.

[0442] La figura 19 es un diagrama esquemático de un sistema ejemplar para eliminar oxígeno de las plaquetas y una solución e incluye los conceptos que se han analizado anteriormente. La bolsa permeable a gas 1902 puede colocarse en un contenedor impermeable a gas sellable 1904. El contenedor impermeable a gas 1904 puede acoplarse al generador reductor de oxígeno 1906. El generador reductor de oxígeno 1906, en una realización, puede envolver el contenedor impermeable a gas sellable 1904. En diferentes realizaciones, el generador reductor de oxígeno 1906 puede tomar diferentes formas. Por ejemplo, puede ser una bomba (por ejemplo, una bomba de vacío

previo y/o turbobomba) o un generador de hidrógeno. Asociados con un generador de reductor de oxígeno 1906 puede haber uno o más componentes, tales como una mecha, u otro mecanismo de retardo. Acoplados a un contenedor impermeable a gas sellable 1904 están el detector 1908 y el regulador 1910. El detector 1908, en una realización, puede ser un medidor de oxígeno, que puede tomar diversas formas. En otras realizaciones, el detector 5 1908 puede ser un medidor de temperatura o presión. Por supuesto, puede usarse más de un detector. En una realización, el regulador 1901 puede ser un regulador de temperatura o presión. Por ejemplo, el regulador 1901 puede ser un dispositivo calentador o de refrigeración para regular la temperatura en el interior del contenedor impermeable a gas sellable 1904.

10 V. Aplicaciones de Diagnóstico

[0443] Los sulfitos se producen por todas las células del cuerpo durante un metabolismo normal de los aminoácidos que contienen azufre. La oxidasa sulfito elimina y, por lo tanto, regula el nivel de sulfitos.

15 **[0444]** Las actividades diferenciales de estas enzimas conducirán a diferentes niveles de sulfitos desarrollados en un tejido de forma específica. En el ejemplo que se ha descrito anteriormente, para tumores sólidos en condiciones hipóxicas, los sulfitos pueden producirse a niveles mayores para proporcionar un estado protector local a las células tumorales a través de la reducción del estado metabólico, así como la inhibición de la vigilancia inmunológica. Por lo tanto, será beneficioso medir los niveles de sulfitos e incorporar esto como parte del diagnóstico para varias patologías, tales como tumores sólidos. Además, ya que se propone el uso de sulfitos para diversas aplicaciones, 20 será útil seguir esto usando alguna clasificación de imagen u otro proceso de control.

[0445] Es posible medir los niveles de sulfito en suero para obtener un nivel de sulfitos totales usando la tecnología actual (por ejemplo, HPLC). Cabe explorar la posibilidad de diagnosticar por imagen los sulfitos. Como 25 alternativa, un enfoque proteómico puede permitir un entendimiento de cómo la regulación de las enzimas implicadas en el metabolismo de los sulfitos puede alterarse en ciertas patologías, permitiendo este enfoque para diagnóstico.

VI. Aplicaciones de Detección

30

[0446] Aún en realizaciones adicionales, la presente divulgación proporciona procedimientos para identificar antagonistas de oxígeno y moléculas que actúan de una forma similar con respecto a la inducción de estasis y otros compuestos activos. En algunos casos, el antagonista de oxígeno o los compuestos activos que se procuran 35 trabajan como un compuesto de calcogenuro en la reducción de la temperatura corporal interna o la conservación de la viabilidad en entornos hipóxicos o anóxicos que de otro modo matarían la materia biológica si no fuese por la presencia del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Estos ensayos pueden comprender la detección aleatoria de grandes bibliotecas de sustancias candidatas; como alternativa, los ensayos pueden usarse para centrarse en clases particulares de compuestos seleccionados con vistas a atributos que se creen que las hacen más probables de actuar como antagonistas de oxígeno o compuestos activos proporcionando un compuesto activo 40 candidato;

(a) mezclar el compuesto activo candidato con una materia biológica;

(b) medir una o más respuestas celulares características del tratamiento de antagonista de oxígeno; y

45

(c) comparar una o más respuestas con la materia biológica en ausencia del compuesto activo candidato.

Los ensayos pueden realizarse con células, tejidos/órganos, u organismos intactos aislados.

50 **[0447]** Por supuesto, se entenderá que todos los procedimientos de detección de la presente divulgación son útiles por sí mismos a pesar del hecho de que pueden no encontrarse candidatos eficaces. La divulgación proporciona procedimientos para la detección de dichos candidatos, no únicamente procedimientos para encontrarlos. Sin embargo, también se entenderá que el compuesto activo candidato puede identificarse como un compuesto activo eficaz de acuerdo con uno o más ensayos, lo que significa que el compuesto activo candidato parece tener alguna 55 capacidad de actuar como un compuesto activo, tal como induciendo estasis en una materia biológica. La detección, en algunas realizaciones, implica el uso de un ensayo descrito en los Ejemplos o en cualquier otra parte de la divulgación para identificar un modulador. Además, además de o en lugar del procedimiento descrito en esta sección, puede probarse un compuesto activo candidato para obtener su actividad como un antagonista de oxígeno o como otro compuesto que tiene una propiedad de un compuesto activo, tal como un agente metabólico protector o

una sustancia terapéutica. Algunas realizaciones de los procedimientos de detección se proporcionan anteriormente.

[0448] Puede identificarse adicionalmente o ensayarse un compuesto activo eficaz. Además, el compuesto activo eficaz puede usarse en un animal o modelo animal *in vivo* (como se analizara más adelante) o puede usarse en animales o modelos animales *in vivo* adicionales, que pueden implicar las mismas especies de animales o especies de animales diferentes.

[0449] Además, se contempla que también puede fabricarse un compuesto activo identificado de acuerdo con las realizaciones de la invención después de la detección. Además, la materia biológica puede exponerse o entrar en contacto con un compuesto activo eficaz de acuerdo con los procedimientos de la divulgación, particularmente con respecto a realizaciones terapéuticas o de conservación.

A. Compuestos activos

[0450] Como se usa en el presente documento, la expresión "compuesto activo candidato" se refiere a cualquier molécula que puede inducir estasis en materia biológica, por ejemplo, alterando la temperatura corporal interna. El compuesto activo candidato puede ser una proteína o un fragmento de la misma; una molécula pequeña o incluso una molécula de ácido nucleico. También se pueden adquirir, a partir de diversas fuentes comerciales, bibliotecas de moléculas pequeñas que se cree que cumplen los criterios básicos para los fármacos útiles en un esfuerzo por forzar la identificación de compuestos útiles. La detección de dichas bibliotecas, incluyendo bibliotecas generadas de forma combinatoria (por ejemplo, bibliotecas de péptidos), es una forma rápida y eficaz de detectar un gran número de compuestos relacionados (y no relacionados) en cuanto a actividad. Los enfoques combinatorios también se prestan a una evolución rápida de los fármacos potenciales mediante la creación de segundos, terceros y cuartos compuestos de generación modelados de compuestos activos, pero de otro modo no deseados.

[0451] Los compuestos activos candidatos pueden incluir fragmentos o partes de compuestos de origen natural, o pueden encontrarse como combinaciones activas de compuestos conocidos, que de otro modo son inactivas. Se propone que el compuesto aislado de fuentes naturales, tales como animales, bacterias, hongos, fuentes vegetales, incluyendo hojas y corteza, y muestras marinas puedan ensayarse como candidatos para conservar la presencia de agentes farmacéuticos potencialmente útiles. Se apreciara que los agentes farmacéuticos que se detectaran también pueden obtenerse o sintetizarse a partir de composiciones químicas o compuestos hechos por el hombre. Por lo tanto, se apreciara que el compuesto activo candidato identificado puede ser un péptido, un polipéptido, un polinucleótido, inhibidores de moléculas pequeñas o cualquier otro compuesto que puede diseñarse a través del diseño de fármaco racional partiendo de inhibidores o estimuladores conocidos.

[0452] Otros compuestos activos adecuados incluyen moléculas antisentido, ARNs, ribocimas y anticuerpos (incluyendo anticuerpos de cadena monocatenarios), cada uno de los cuales será específico para la molécula diana. Dichos compuestos se describen en mayor detalle en otra parte en este documento. Por ejemplo, una molécula antisentido que se une a un sitio de inicio traslacional o de transcripción, o uniones serán inhibidores candidatos ideales.

[0453] Además de los compuestos activos identificados inicialmente, el inventor también contempla que pueden formularse otros compuestos estructuralmente similares para imitar las porciones clave de la estructura de los compuestos activo. Dichos compuestos, que pueden incluir peptidomiméticos de moduladores peptídicos, pueden usarse de la misma manera que los compuestos activos iniciales.

B. Ensayos *in vivo*

[0454] Los ensayos *in vivo* implican el uso de diversos modelos animales. Debido a su tamaño, facilidad de manejo e información en su fisiología y constitución genética, los ratones son una realización preferida. Sin embargo, también son adecuados otros animales, incluyendo ratas, conejos, hámsteres, cobayas, gerbos, marmotas, ratones, gatos, perros, ovejas, cabras, cerdos, vacas, caballos y monos (incluyendo chimpancés, gibones y babuinos). También se contemplan peces para su uso en ensayos *in vivo*, como son los nematodos. Pueden realizarse ensayos para moduladores usando el modelo animal obtenido a partir de cualquiera de estas especies.

[0455] En dichos ensayos, se administra una o más sustancias candidatas a un animal, y la capacidad de la sustancia o sustancias candidatas para inducir estasis, reducir la temperatura corporal interna, o dotar al material biológico de la capacidad de supervivencia en condiciones ambientales y hipóxicas o anóxicas, en comparación con un vehículo inerte (control negativo) y H₂S (control positivo), identifica un modulador. El tratamiento de animales con

compuestos de ensayo implicara la administración del compuesto, en una forma apropiada, al animal. La administración del compuesto candidato (gas o líquido) será mediante cualquier ruta que pueda utilizarse con fines clínicos o no clínicos, incluyendo, pero sin limitación, oral, nasal (inhalación o aerosol), bucal o incluso tópica. Como alternativa, la administración puede ser instilación intratecal, instilación bronquial, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o inyección intravenosa. Las rutas contempladas específicamente con inyección intravenosa sistémica, administración regional a través suministros de sangre o linfa, o directamente a un sitio afectado.

VII. Modo de Administración y Composiciones Farmacéuticas

10

[0456] Una cantidad de una composición farmacéutica de un calcogenuro, antagonista de oxígeno, o su compuesto activo, generalmente se define como la cantidad suficiente para mejorar, reducir, minimizar o limitar de forma detectable la extensión de la afección de interés. Definiciones más rigurosas pueden aplicar, incluyendo eliminación, erradicación o cura de la enfermedad.

15

A. Administración

[0457] Las vías de administración de un calcogenuro u otro compuesto activo variaran, naturalmente, con la localización y naturaleza de la afección a tratar, e incluyen, por ejemplo, inhalación, administración y formulación intradérmica, transdérmica, parenteral, intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, percutánea, intratecal, intraperitoneal, intratumoral, perfusión, lavado, inyección directa y oral. Como se detalla a continuación, los compuestos activos pueden administrarse en forma de gases médicos mediante inhalación o intubación, en forma de líquidos inyectables mediante administración intravascular, intravenosa, intraarterial, intracerebro-ventricular, intraperitoneal, administración subcutánea, en forma de líquidos o geles tópicos, o en formas de dosificación orales sólidas.

[0458] Además, las cantidades pueden variar dependiendo del tipo de materia biológica (tipo de célula, tipo de tejido, género y especie del organismo, etc.) y/o su tamaño (peso, área superficial, etc.). Será generalmente el caso de que cuanto mayor es el organismo mayor es la dosis. Por lo tanto, una cantidad eficaz para un ratón será generalmente menor que una cantidad eficaz para una rata, que generalmente será inferior que una cantidad eficaz para un perro, que generalmente será inferior que una cantidad eficaz para un ser humano. La concentración eficaz de sulfuro de ácido para conseguir estasis en un ser humano depende de la forma de dosificación y la vía de administración. Para inhalación, en algunas realizaciones las concentraciones eficaces están en intervalo de 50 ppm a 500 ppm, administradas continuamente. Para administración intravenosa, en algunas realizaciones, las concentraciones eficaces están en el intervalo de 0,5 a 50 miligramos por kilogramo de peso corporal administradas continuamente.

[0459] De forma similar, la extensión de tiempo de administración puede variar del tipo de materia biológica (tipo de célula, tipo de tejido, género y especie del organismo, etc.) y/o su tamaño (peso, área superficial, etc.), y dependerá también en parte de la forma de dosificación y la vía de administración. En realizaciones particulares, se proporciona un compuesto activo durante aproximadamente, o al menos 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 3 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, cuatro horas, cinco horas, seis horas, ocho horas, doce horas, veinticuatro horas, o más de veinticuatro horas. Un compuesto activo puede administrarse en una sola dosis o en múltiples dosis con cantidades variables de tiempo entre dosis administradas.

45

[0460] En caso de trasplante, la presente invención puede usarse pre- y/o postoperativamente para inactivar los materiales del huésped o injerto. En una realización específica, un sitio quirúrgico puede inyectarse o prefundirse con una formulación que comprende un calcogenuro. La perfusión puede continuarse después de la cirugía, por ejemplo, dejando un catéter implantado en el sitio de la cirugía.

50

B. Composiciones y Formulaciones Inyectables

[0461] Los procedimientos preferidos para la administración de antagonistas de oxígeno u otro compuesto activo de la presente invención son inhalación, inyección intravenosa, perfusión de un área particular, y administración oral. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden administrarse como alternativa por vía parenteral, intradérmica, intramuscular, transdérmica, o incluso intraperitoneal como se describe en la patente de Estados Unidos 5.543.158; la Patente de Estados Unidos 5.641.515 y la Patente de Estados Unidos 5.399.363.

[0462] Pueden prepararse soluciones de los compuestos activos en agua mezcladas de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso eyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles, y polvos estériles para preparación extemporánea de las soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de Estados Unidos 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en cuanto a que exista una fácil inyectabilidad con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación, almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede llevarse a cabo mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0463] Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse de forma adecuada si es necesario y el diluyente líquido en primer lugar convertirse en isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral e intraperitoneal. A este respecto, se conocerán por los expertos en la técnica medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, un dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclisis o inyectarse en el sitio propuesto de infusión, (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Algunas variaciones en la dosificación se producirán de forma necesaria dependiendo de la afección del sujeto que se trata. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para la administración en seres humanos, las preparaciones deben cumplir estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad y pureza generales como se requiere por la oficina de la FDA de estándares de productos biológicos.

[0464] Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos ingredientes diferentes que se han enumerado anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución filtrada estéril previamente del mismo.

[0465] Como se usa en este documento, "portador" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, tampones, soluciones de vehículo, suspensiones, coloides y similar. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. A menos que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse en las composiciones ingredientes activos complementarios.

[0466] La frase "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente-aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o reacción adversa similar cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo se conoce bien en la técnica. Típicamente, dichas composiciones se preparan como inyectables, en forma de soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en líquido antes de su inyección.

C. Formulaciones Intravenosas

[0467] En una realización, los compuestos activos de la invención pueden formularse para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraarterial). En los casos en los que el compuesto activo es un gas a

- temperatura ambiente, se contempla una solución que contiene una concentración conocida y deseada de la molécula de gas disuelta en un líquido o una solución para administración parenteral. La preparación del compuesto de la solución del compuesto activo puede conseguirse mediante, por ejemplo, contacto (por ejemplo, burbujeo o infusión) del gas con la solución para hacer que las moléculas de gas se disuelvan en la solución. Los expertos en la
- 5 técnica reconocerán que la cantidad de gas que se disuelve en la solución dependerá del número de varias variables que incluyen, pero sin limitación, la solubilidad del gas en el líquido o solución, la composición química del líquido o solución, su temperatura, su pH, su resistencia iónica, así como la concentración del gas y la duración del contacto (por ejemplo, velocidad de y duración del burbujeo o infusión). La concentración del compuesto activo en el líquido o
- 10 solución para administración parenteral puede determinarse usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. La estabilidad del compuesto activo en el líquido o solución puede determinarse midiendo la concentración del antagonista de oxígeno disuelto después de intervalos variables de tiempo tras la preparación o fabricación de la solución antagonista de oxígeno, donde un descenso en la concentración del antagonista de oxígeno en comparación con la concentración de inicio indica la pérdida o conversión química del compuesto activo.
- 15 **[0468]** En algunas realizaciones, existe una solución que contiene un compuesto de calcogenuro que se produce disolviendo una forma salina del calcogenuro en agua estéril o una solución salina (cloruro sódico al 0,9%) para producir una forma de dosificación intravenosa farmacéuticamente aceptable. La forma de dosificación líquida intravenosa puede tamponarse a un cierto pH para mejorar la solubilidad del compuesto de calcogenuro o para influenciar el estado de ionización del compuesto de calcogenuro. En los casos de ácido sulfhídrico o selenuro ácido,
- 20 cualquiera de varias formas salinas conocidas por los expertos en la técnica puede ser suficiente, incluyendo, pero sin limitación, sodio, calcio, bario, litio, o potasio. En otra realización preferida, se disuelve el sulfuro de sódico o selenuro sódico en una solución salina tamponada con fosfato estéril y el pH se ajusta a 7,0 con ácido clorhídrico para producir una solución de concentración conocida que puede administrarse a un sujeto por vía intravenosa o intraarterial.
- 25 **[0469]** Se contempla que en algunas realizaciones, una composición farmacéutica de la invención es una solución saturada con respecto al compuesto activo. La solución puede ser una formulación farmacéuticamente aceptable, muchas de las cuales se conocen bien, tal como la solución de Ringer. En ciertas realizaciones, la concentración del compuesto activo es de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 0,001,
- 30 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0 M o más, o cualquier intervalo que pueda derivarse de los mismos (a temperatura y presión convencionales (STP)). Con H₂S, por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración puede ser de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 M (en STP). Se contempla específicamente que las
- 35 concentraciones anteriores pueden aplicarse con respecto al monóxido de carbono y dióxido de carbono en una solución por separado o juntas.
- [0470]** Además, cuando la administración es intravenosa se contempla que pueden aplicarse los siguientes parámetros. Un caudal de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como mucho aproximadamente 1, 2, 3,
- 40 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 gtts/min o µgtts/min, o cualquier intervalo que puede derivarse de los mismos. En algunas realizaciones, la cantidad de la solución se especifica en volumen, dependiendo de la concentración de la solución. Una cantidad de
- 45 tiempo puede ser de aproximadamente, al menos aproximadamente como mucho aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5 semanas, y/o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, o cualquier intervalo que pueda derivarse de la misma.
- 50 **[0471]** Pueden administrarse volúmenes de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210,
- 55 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 ml o litros, o cualquier intervalo de los mismos, en general o en una sola sesión.

[0472] En algunas realizaciones, la solución del compuesto activo para administración parenteral se prepara en un líquido o solución en el que el oxígeno se ha eliminado antes del contacto del líquido o la solución con el compuesto activo. Ciertos antagonistas de oxígeno, en particular ciertos compuestos de calcogenuro (por ejemplo, ácido sulfhídrico, selenuro ácido), no son estables en presencia de oxígeno debido a su capacidad de reaccionar químicamente con el oxígeno, lo que conduce a su oxidación y transformación química. El oxígeno puede eliminarse de los líquidos o las soluciones usando procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, la aplicación de presión negativa (desgasificación al vacío) al líquido o solución, o el contacto de la solución o líquido con un reactivo que hace que el oxígeno se una o se "quele", eliminándolo de forma eficaz de la solución.

[0473] En otra realización, la solución del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo para la administración parenteral puede almacenarse en un contenedor hermético a gas. Esto es particularmente deseable cuando el oxígeno se ha eliminado previamente de la solución para limitar o impedir la oxidación del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo. Adicionalmente, el almacenamiento en un contenedor hermético a gas inhibirá la volatilización del antagonista del gas del antagonista de oxígeno u otro compuesto activo del líquido o solución, permitiendo que se mantenga una concentración constante del antagonista del oxígeno disuelto. Se conocen contenedores herméticos a gas por los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, "bolsas i.v." que comprenden un material de construcción impermeable a gas, o un vial de vidrio sellado. Para impedir la exposición al aire en el contenedor de almacenamiento hermético a gas, puede introducirse un gas inerte, tal como nitrógeno o argón, en el contenedor antes de su cierre.

D. Formulaciones Tópicas y Usos de las mismas

[0474] Los procedimientos y composiciones de la presente divulgación son útiles para inducir estasis en capas superficiales de la piel y la mucosa oral, incluyendo, pero sin limitación, células de los folículos capilares, células endoteliales capilares, y células epiteliales de la boca y la lengua. La terapia de radiación y quimioterapia para el tratamiento del cáncer daña las células normales en los folículos capilares y la mucosa oral, lo que conduce a efectos secundarios no intencionados, pero debilitantes de la terapia del cáncer, pérdida del cabello y mucositis oral, respectivamente. La inducción de estasis en las células de los folículos capilares y/o las células vasculares que suministran sangre a los folículos capilares puede ralentizar, limitar o impedir el daño a las células de los folículos capilares y la pérdida de cabello resultante que acompaña a la terapia de radiación y quimioterapia, u otras, como alopecia, calvicie de patrón masculino, calvicie de patrón femenino, u otra ausencia del pelo en zonas de la piel donde normalmente está presente. La inducción de estasis en las células epiteliales orales y mesenquimales puede ralentizar, limitar o impedir el daño a células que cubren la boca, el esófago, la lengua y una afección dolorosa resultante de la mucositis oral.

[0475] En ciertas realizaciones, el compuesto activo se administra por vía tópica. Esto se consigue formulando el compuesto activo en una crema, gel, pasta, o colutorio y aplicando dicha formulación directamente en las áreas que requieran la exposición al compuesto activo (por ejemplo, el cuero cabelludo, boca, lengua, garganta).

[0476] Las composiciones tópicas de esta invención pueden formularse en forma de aceites, cremas, lociones, pomadas y similares por la elección de los portadores adecuados. Los portadores adecuados incluyen aceites vegetales o minerales, vaselina blanca (parafina blanda blanca), grasas o aceites de cadena ramificada, grasas animales y alcohol de alto peso molecular (mayor de C₁₂). Los portadores preferidos son aquellos en los que el ingrediente activo es soluble. También pueden incluirse emulsionantes, estabilizadores, humectantes y antioxidantes, así como agentes que imparten color o fragancia, si se desea. Adicionalmente, pueden emplearse potenciadores de la penetración transdérmica en estas formulaciones tópicas. Ejemplos de dichos potenciadores pueden encontrarse en las patentes de Estados Unidos N° 3.989.816 y 4.444.762.

[0477] Las cremas se formulan preferiblemente a partir de una mezcla de aceite mineral, cera de abeja autoemulsionante y agua en la que la mezcla del ingrediente activo, disuelto en una pequeña cantidad de un aceite, tal como aceite de almendra, se mezcla. Un ejemplo típico de una crema de este tipo es una que incluye aproximadamente 40 partes de agua, aproximadamente 20 partes de cera de abeja, aproximadamente 40 partes de aceite mineral, y aproximadamente 1 parte de aceite de almendra.

[0478] Las pomadas pueden formularse mezclando una solución del ingrediente activo en un aceite vegetal, tal como aceite de almendra con parafina blanda caliente y permitiendo que la mezcla se enfríe: Un ejemplo típico de una pomada de este tipo es una que incluye aproximadamente un 30% de aceite de almendra y aproximadamente un 70% de parafina blanda blanca en peso.

[0479] Las lociones pueden prepararse convenientemente disolviendo el ingrediente activo, en un alcohol de alto peso molecular adecuado, tal como propilenglicol o polietilenglicol.

- 5 [0480] Las preparaciones farmacéuticas posibles que pueden usarse por vía rectal incluyen, por ejemplo, supositorios, que consisten en una combinación de uno más de los compuestos activos con una base de supositorio. Las bases de supositorio adecuadas son, por ejemplo, triglicéridos naturales o sintéticos, o hidrocarburos de parafina. Además, también es posible usar capsulas rectales de gelatina que consisten en una combinación de compuestos activos con una base. Los materiales bases posibles incluyen, por ejemplo, triglicéridos líquidos,
10 polietilenglicoles o hidrocarburos de parafina.

E. Formas de Dosificación sólidas

- [0481] Las composiciones farmacéuticas incluyen formas de dosificación sólidas en las que el compuesto activo queda atrapado, o retenido, en una estructura portadora porosa que es capaz de conseguir un estado sólido cristalino. Dichas formas de dosificación sólidas con la capacidad de almacenamiento de gas se conocen en la técnica y pueden producirse en formas farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, Yaghi y col. 2003). Una ventaja particular de una composición farmacéutica de este tipo pertenece a los compuestos de calcogenuro (por ejemplo, ácido sulfhídrico, monóxido de carbono, selenuro ácido), que pueden ser tóxicos para ciertos mamíferos en ciertas concentraciones en su forma libre. En ciertas realizaciones, el compuesto puede formularse para su administración oral.

F. Sistemas de Perfusión

- 25 [0482] Puede usarse un sistema de perfusión para células para exponer un tejido u órgano a un compuesto activo en forma de un líquido o un semisólido. La perfusión se refiere a un flujo continuo de una solución a través de o sobre una población de células. Implica la retención de las células dentro de la unidad de cultivo en contraposición a un cultivo de flujo continuo, que lava las células con el medio retirado (por ejemplo, quimiostato). La perfusión permite un mejor control del entorno de cultivo (pH, pO₂, niveles de nutrientes, niveles del compuesto activo, etc.) y
30 es un medio para aumentar significativamente la utilización del área superficial dentro de un cultivo para la unión celular.

- [0483] La técnica de perfusión se desarrolló para imitar el medio *in vivo* en el que las células se suministran continuamente con fluidos sanguíneos, linfa u otros fluidos corporales. Sin perfusión de una solución de nutrientes fisiológica, las células del cultivo atraviesan fases alternas de ser alimentadas y pasar hambre, limitando así la expresión completa de su crecimiento y el potencial metabólico. En el contexto de la presente invención, también puede usarse un sistema de perfusión para perfundir células con un antagonista de oxígeno para inducir estasis.

- [0484] Los expertos en la técnica están familiarizados con sistemas de perfusión, y existen varios sistemas de perfusión disponibles en el mercado. Cualquiera de estos sistemas de perfusión puede emplearse en la presente invención. Un ejemplo de un sistema de perfusión es un reactor de lecho relleno perfundido que usa una matriz de lecho de un tejido no tejido (CelliGen™, New Brunswick Scientific, Edison, NJ; Wang, y col., 1992; Wang y col., 1993; Wang y col., 1994). Descrito en resumen, este reactor comprende un reactor mejorado para cultivar tanto células dependientes de anclaje como sin anclaje. El reactor se diseña como un lecho relleno con un medio para
45 proporcionar recirculación interna. Preferiblemente, se coloca un portador de matriz de fibras en una cesta dentro de un recipiente del reactor. Una porción superior e inferior de la cesta tiene orificios, permitiendo que el medio fluya a través de la cesta. Un propulsor diseñado especialmente proporciona la recirculación del medio a través del espacio ocupado por la matriz de fibras para asegurar un suministro uniforme de nutriente y la eliminación de residuos. Esto asegura simultáneamente que una cantidad insignificante de la masa celular total se suspende en el medio. La
50 combinación de la cesta y la recirculación también proporciona un flujo sin burbujas de medio oxigenado a través de la matriz de fibras. La matriz de fibras es un tejido no tejido que tiene un diámetro de "poro" de 10 µm a 100 µm, proporcionando un volumen interno alto con volúmenes de poro que corresponden de 1 a 20 veces los volúmenes de las células individuales.

- 55 [0485] El reactor de lecho relleno perfundido ofrece varias ventajas. Con un portador de matriz de fibra, las células están protegidas frente al estrés mecánico de la agitación y la espumación. El flujo libre que fluye a través de la cesta proporciona las células con niveles regulados óptimos de oxígeno, pH y nutrientes. Los productos pueden eliminarse continuamente del cultivo y los productos recolectados están libres de células y pueden producirse en un medio bajo en proteínas, lo que facilita posteriores etapas de purificación. Esta tecnología se explica en detalle en el

documento WO 94/17178 (4 de agosto de 1994, Freedman y col.).

[0486] El módulo Cellcube™ (Corning- Costar) proporciona una gran área estirénica para la inmovilización y el crecimiento de células fijadas al sustrato. Es un dispositivo de un solo uso estéril íntegramente encapsulado que tiene una serie de placas de cultivo paralelas unidas para crear espacios de flujo laminares sellados finos entre las placas adyacentes.

[0487] El módulo Cellcube™ tiene puertos de entrada y salida que están opuestos diagonalmente entre sí y ayudan a regular el flujo de los medios. Durante los primeros pocos días del crecimiento, el cultivo se satisface generalmente por el medio contenido dentro del sistema después de la siembra inicial. La cantidad de tiempo entre la siembra inicial y el inicio de la perfusión del medio depende de la densidad de las células en el inóculo de siembra y la tasa de crecimiento celular. La medición de la concentración de nutrientes en el medio de circulación es un buen indicador del estado del cultivo. Al establecer un procedimiento puede ser necesario controlar la composición de los nutrientes en una diversidad de velocidades de perfusión diferentes para determinar los parámetros operativos más económicos y productivos.

[0488] Otros sistemas de perfusión disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, CellPerf® (Laboratories MABIO International, Tourcoing, Francia) y Stovall Flow Cell (Stovall Life Science, Inc., Greensboro, NC)

[0489] El tiempo y parámetros de la fase de producción de los cultivos depende del tipo y uso de una línea celular particular. Muchos cultivos requieren un medio diferente para la producción del que se requiere para la fase de crecimiento del cultivo. La transición de una fase a la otra requerirá probablemente múltiples etapas del lavado en cultivos tradicionales. Sin embargo, uno de los beneficios de un sistema de perfusión es la capacidad de proporcionar una transición suave entre diversas fases operativas. El sistema de perfusión puede también facilitar la transición de una fase de crecimiento a una fase estática inducida por un antagonista de oxígeno. Asimismo, el sistema de perfusión puede facilitar la transición de una fase estática a una fase de crecimiento reemplazando la solución que comprende un antagonista de oxígeno con, por ejemplo, un medio de nutrientes fisiológico.

G. Catéteres

[0490] En ciertas realizaciones, se usa un catéter para proporcionar un compuesto activo a un organismo. Es de particular interés la administración de un agente de este tipo al corazón o al sistema vascular. Con frecuencia, se usa un catéter para este fin. Yaffe y col., 2004 analizan catéteres particularmente en el contexto de la animación suspendida, aunque el uso de catéteres se conocía generalmente antes de esta publicación.

H. Administración de Gases

I. Sistema de Respiración

[0491] Un sistema de administración de gas ejemplar **100** se ilustra en la figura 9. El sistema de administración **100** se adecuado para administrar gases respirables, incluyendo un agente activo, al sistema respiratorio de un sujeto. El sistema de administración de gas **100** incluye una o más fuentes de gas **102**. Cada una de las fuentes de gas **102** está conectada a un regulador **104** y un caudalímetro **106**. El sistema de administración de gas **100** también incluye una fuente de agente activo **107**, un vaporizador opcional **108**, un controlador de salida **110**, un eliminador **112** y un sistema de alarma/supervisión **114**.

[0492] El sistema de administración **100** puede incluir ciertos elementos usados generalmente en una máquina de administración de anestesia. Por ejemplo, las máquinas de administración de anestesia generalmente incluyen un circuito a alta presión, un circuito a baja presión, un circuito de respiración, y un circuito eliminador. Como se describe en las figuras 10-11, una o más de las fuentes de gas **102**, el vaporizador **108**, el controlador de salida **110**, el eliminador **112**, y/o el sistema de alarma/supervisión **114** puede proporcionarse como parte de un dispositivo que tiene un circuito a alta presión, a baja presión, de respiración y/o eliminador, y estos elementos pueden ser similares a los usados generalmente en una máquina de administración de anestesia. Se describen máquinas de administración de anestesia, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos 4.034.753; 4.266.573; 4.442.856; y 5.568.910, cuyo contenido se incorpora por la presente por referencia en su totalidad.

[0493] Las fuentes de gas **102** pueden proporcionarse mediante depósitos de gas comprimido; sin embargo, debe apreciarse que las fuentes de gas **102** pueden ser una fuente de gas o una fuente de líquido que se convierte en un gas. Por ejemplo, el vaporizador **108** puede usarse para vaporizar una fuente de gas líquido. Los reguladores **104**

incluyen válvulas que reducen la presión de cada una de las fuentes de gas **102**. Después, el gas descomprimido pasa a través de uno de los caudalímetros **106**, que mide y controla el flujo de gas de cada una de las fuentes de gas respectivas **102**.

5 **[0494]** Las fuentes de gas **102** pueden ser gases transportadores que se usan para administrar el agente activo **107**. Los gases portadores pueden seleccionarse para proporcionar un entorno deseado para un sujeto al que se administra el agente activo a partir de la fuente **107**. Por ejemplo, si el agente activo se administra a un paciente en forma de un gas respirable, los gases portadores pueden incluir oxígeno, óxido nitroso o aire en cantidad suficiente para satisfacer la necesidad del paciente. Pueden usarse otros gases insertes o activos.

10

[0495] En algunas realizaciones, una de las fuentes de gas **102** incluye la fuente de agente activo **107**. El agente activo de la fuente **107** puede ser una fuente de gas líquido que se vaporiza por el vaporizador **108** o el agente activo puede ser una fuente gaseosa, tal como un gas comprimido a alta presión. El agente activo puede mezclarse con una o más de las fuentes de gas **102**. El controlador de salida **110** controla la cantidad de la mezcla de gas que se proporciona al sujeto.

15

[0496] El eliminador **112** es un dispositivo o sistema que elimina y/o ventila los gases que se proporcionan al sujeto. Por ejemplo, si el agente activo de la fuente **107** se proporciona en forma de un gas respirable a un paciente, el eliminador **112** puede usarse para retirar los gases residuales del inhalante (tal como el agente activo), oxígeno no utilizado y dióxido de carbono exhalado.

20

[0497] El sistema de alarma/supervisión **114** incluye detectores que controlan el flujo de gas y/o el contenido de gas en una o más ubicaciones dentro del sistema de administración **100**. Por ejemplo, el flujo o cantidad de oxígeno puede controlarse cuando el agente activo de la fuente **107** se proporciona en forma de un gas respirable a un paciente para asegurar que los gases portadores incluyen suficiente oxígeno para el paciente. El sistema de alarma/supervisión **114** también incluye una interfaz de usuario que está configurada para proporcionar un alarma de audio o visual o información de supervisión a un usuario del sistema de administración **100**, tal como una pantalla visual, una luz o una alarma de audio. El sistema de alarma/supervisión **114** puede configurarse para avisar al usuario cuando se cumple una condición predeterminada y/o para proporcionar información con respecto a los niveles de gas.

25

[0498] Con referencia a la **figura 10**, un sistema **100A** incluye un circuito a alta presión **116**, un circuito a baja presión **118**, un circuito de respiración **120**, y un circuito eliminador **122**.

30

[0499] El circuito a alta presión **116** incluye las fuentes de gas comprimido **102**, que se conectan a válvulas del regulador **104b**, **104a**. Las válvulas del regulador **104a** controlan la cantidad de gas que fluye desde cada una de las fuentes de gas **102**, y las válvulas del regulador **104b** pueden abrirse para aumentar la presión del gas, por ejemplo, proporcionando una abertura a la atmósfera circundante.

35

[0500] El circuito a baja presión **118** incluye los caudalímetros **106**, la fuente de agente activo **107** y el vaporizador **108**. Se proporciona una mezcla de gas a partir de las fuentes de gas **102** por los caudalímetros **106**, que controlan la cantidad de cada uno de los gases de las fuentes de gas **102**. Como se ilustra en la figura 10, la fuente de agente activo **107** es un líquido. La fuente de agente activo **107** se vaporiza por el vaporizador **108** y se añade a la mezcla de gas.

40

[0501] El circuito de respiración **120** incluye el controlador de salida **110**, dos válvulas de una vía **124**, **126** y un absorbedor **128**. El circuito eliminador **122** incluye una válvula **112a**, un depósito **112b**, y una salida **112c**. Un sujeto **130** recibe la mezcla de gas del controlador de salida **110** y el gas resultante se ventila por el circuito eliminador **122**. Más específicamente, el controlador de salida **110** controla la cantidad de la mezcla de gas que se administra al sujeto **130** a través de la válvula de una vía **124**. Los gases espirados fluyen a través de la válvula de una vía **126** a la válvula **112a** y al depósito **112b**. El exceso de gases sale a través de la salida **112c** del eliminador **112**. Algunos de los gases pueden reciclarse y fluyen a través del absorbedor **128** y al circuito de respiración **120**. El absorbedor **128** puede ser un frasco de absorción de dióxido de carbono para reducir los gases de dióxido de carbono de los gases exhalados. En esta configuración, el oxígeno espirado y/o el agente activo pueden volver a circular o reutilizarse.

45

[0502] Pueden añadirse uno o más detectores **S** en diversas posiciones en el sistema **100A**. Los detectores **S** detectan y/o controlan los gases en el sistema **100A**. Por ejemplo, si una de las fuentes de gas **102** es oxígeno, uno de los detectores **S** puede ser un detector de oxígeno configurado y situado para supervisar el oxígeno en el sistema

100A de manera que el paciente reciba una cantidad adecuada de oxígeno. Los detectores **S** están en comunicación con el sistema de alarma/supervisión **114** (véase la figura 9). Si están presentes niveles de gas no deseables o peligrosos en el sistema **100**, el sistema de alarma/supervisión **114** puede alertar a un usuario del sistema **100A** de manera que pueda tomarse una acción apropiada, tal como aumentar los niveles de oxígeno dados al sujeto **130** o desconectar al sujeto **130** del sistema de administración **100A**.

[0503] Con referencia a la figura 11, se muestra un sistema **100B** en el que la fuente de agente activo **107** está conectada a dos de las válvulas del regulador **104b**, **104a**. Si la fuente de agente activo **107** es una fuente de gas líquido, se proporciona un vaporizador opcional **108** para vaporizar la fuente de gas líquido. Si la fuente de agente activo **107** es gaseosa (por ejemplo, un gas a alta presión), entonces el vaporizador **108** puede omitirse. El agente activo de la fuente **107** se mezcla con las otras fuentes de gas **102** en el circuito a baja presión **118** en cantidades que se controlan por los caudalímetros **106**. El circuito a baja presión **118** incluye un depósito de gas **109** que contiene cualquier derrame de la mezcla de gas según fluye al circuito de respiración **120**. Se ha de apreciar que la fuente de agente activo **107** y/o cualquiera de las fuentes de gas **102** puede proporcionarse como una fuente de gas líquido con un vaporizador. Los elementos del sistema **100B** ilustrado en la figura 11 son básicamente iguales que los que se han descrito anteriormente con respecto a la figura 10 y no se describirán adicionalmente.

[0504] Se ilustran procedimientos de acuerdo con las realizaciones de la presente invención que puede realizarse usando los sistemas **100**, **100A**, **100B** en la figura 12. Se proporciona una mezcla de una o más fuentes respirables de gas (Bloque **202**). Las fuentes de gas respirables pueden obtenerse a partir de las fuentes de gas **102** como se describe con respecto a las figuras 9-11. Se añade una cantidad predeterminada del agente activo a la mezcla de gas (Bloque **204**), tal como se muestra con respecto a la fuente de agente activo **107** en las figuras 9-11. La mezcla de gas se administra al sujeto **120** (Bloque **306**). Los gases exhalados se ventilan y/o se reciclan (Bloque **208**), por ejemplo, por el eliminador **112**. Aunque los procedimientos de la figura 12 se describen con respecto a los sistemas **100**, **100A**, **100B** de la figura 9-11, debe apreciarse que puede usarse cualquier sistema o dispositivo adecuado para realizar las etapas en la figura 12.

2. Sistema de Administración a Presión Reducida

[0505] Se ilustran realización de un sistema de administración de gas **300** con respecto a la figura 13. El sistema de administración de gas **300** se coloca sobre un sujeto **302**. El sistema de administración de gas **300** es particularmente adecuado para administrar un agente activo en una mezcla de gas al tejido de un sujeto **302**, por ejemplo, tejido de herida.

[0506] El sistema **300** incluye una cámara a presión reducida **304** que tiene una pantalla **306** que cobre el área de tratamiento del sujeto **302**. La cámara a presión reducida **304** está conectada a una bomba de vacío **310** mediante una salida de la bomba **310a**. La cámara a presión reducida **304** incluye una entrada **308a** y una salida **308b**, que están a su vez conectadas a una fuente de agente activo **307**. Un controlador **320** está conectado a la fuente de agente activo **307** y la bomba de vacío **310**. Las cámaras a presión reducida y los sistemas de bomba de vacío se analizan en las patentes de Estados Unidos 5.645.081 y 5.636.643, cuyo contenido se incorpora por la presente por referencia en su totalidad.

[0507] La cámara a presión reducida **304** se configura para alojar un área del sujeto **302** para proporcionar un alojamiento hermético a flujos y hermético a gas para realizar el tratamiento del área con una presión reducida o negativa y la fuente de agente activo **307**. La cámara de presión **304** puede fijarse al sujeto **302** con una cubierta (no mostrada), tal como una lámina polimérica flexible, adhesiva, impermeable a líquidos. La cubierta puede tener reverso adhesivo que funciona para cubrir la piel alrededor de la periferia del área que se va a tratar y para proporcionar un sello generalmente hermético a gas o hermético a líquido y para sostener la cámara **304** en posición.

[0508] La pantalla **306** se coloca sobre la zona de tratamiento del sujeto **302**. Por ejemplo, si la zona de tratamiento del sujeto **302** incluye una herida, la pantalla **306** puede colocarse sobre la herida para impedir su sobrecrecimiento. El tamaño y configuración de la pantalla **306** puede ajustarse para encajar la zona de tratamiento individual, y puede formarse a partir de una diversidad de materiales porosos. El material debe ser lo suficientemente poroso para permitir que el oxígeno o cualquier otro gas, tal como gases de la fuente de agente activo **307**, alcance la zona de tratamiento. Por ejemplo, la pantalla **306** puede estar en forma de una espuma polimérica de célula abierta, tal como una espuma de poliuretano, que es lo suficientemente porosa para permitir que un gas fluya hasta y/o desde la zona de tratamiento. Pueden usarse espumas que varían en espesor y rigidez, aunque puede ser deseable usar un material esponjoso para acomodar al paciente si el paciente debe acostarse sobre el aparato

durante el tratamiento. La espuma también puede perforarse para mejorar el flujo de gas y para reducir el peso del sistema **300**. La pantalla **306** puede cortarse en una forma y tamaño apropiados para ajustarse a la zona de tratamiento, o como alternativa, la pantalla **306** puede ser lo suficientemente grande para solapar la piel circundante.

- 5 **[0509]** La bomba de vacío **310** proporciona una fuente de succión en la cámara a presión reducida **304**. La fuente de agente activo **307** proporciona una cantidad del agente activo a la cámara a presión reducida **304**. El controlador **320** controla la cantidad de vacío aplicado a la cámara a presión reducida **304** por la bomba de vacío **310** y la cantidad del agente activo que se suministra a la cámara **304** por la fuente de agente activo **307**.
- 10 **[0510]** Se ha de apreciar que el controlador **320** puede aplicar un vacío y/o el agente activo en de una forma sustancialmente constante, de forma cíclica, o usando diversas fluctuaciones o patrones, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el agente activo se suministra por la fuente de agente activo **307** como alternativa con la acción de bombeo al vacío de la bomba de vacío **310**. Es decir, como alternativa, el controlador **320** activa la bomba de vacío **310** mientras que desactiva la fuente de agente activo **307**, y después activa la fuente
- 15 de agente activo **307** mientras que desactiva la bomba de vacío **310**. La presión en la cámara a presión reducida **304** se deja fluctuar. En otras realizaciones, se mantiene una presión sustancialmente constante por la bomba de vacío **310** y la fuente de agente activo **307** proporciona una cantidad sustancialmente constante de agente activo a la cámara **304** en el entorno de presión reducida. En algunas realizaciones, se mantiene una presión sustancialmente constante por la bomba de vacío **310** y la cantidad del agente activo varía de forma cíclica. En otras
- 20 realizaciones, la presión en la cámara a presión reducida **304** se hace fluctuar por la bomba de vacío **310**, y la cantidad de agente activo suministrado por la fuente **307** también fluctúa. Las fluctuaciones de la bomba de vacío **310** y la presión resultante en la cámara **304**, o la cantidad de agente activo suministrado por la fuente **307** pueden ser cíclicas o no cíclicas.
- 25 **[0511]** En la figura 14 se ilustran procedimientos de acuerdo con realizaciones de la presente invención que pueden realizarse usando el sistema **300**. La cámara **304** se coloca sobre la zona de tratamiento del sujeto **302** (Bloque **402**). La presión se reduce en la cámara **304** por la bomba de vacío **310** (Bloque **404**). Se aplica una cantidad predeterminada de agente activo de la fuente de agente activo **307** a la cámara (Bloque **406**). Aunque los procedimientos de la figura 14 se describen con respecto al sistema **300** de la figura 12, debe apreciarse que puede
- 30 usarse cualquier sistema o dispositivo adecuado para realizar las etapas en la figura 14. Por ejemplo, la salida **308b** puede omitirse y el agente activo puede suministrarse a la cámara **304** por la única entrada **308a**. También pueden añadirse otros gases a la cámara **304**, por ejemplo, usando una entrada individual o una entrada y una salida, tal como se ilustra con respecto a la fuente de agente activo **307** y la entrada **308a** y la salida **308b**. En algunas realizaciones, la bomba de vacío **310** se fija a un recipiente de recolección adicional entre la bomba **310** y la cámara
- 35 **304** para recoger exudados de la zona de tratamiento, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos 5.636.643.

- [0512]** En algunas realizaciones, el sistema de administración de gas a presión negativa **500**, como se representa en la figura 22A, comprende una fuente de antagonista de oxígeno activo en un recipiente **502**, conectada a un paño
- 40 **504**, a través de una entrada **506**, por un conducto **508**. El paño forma una envoltura cerrada frente al sitio del tejido **510**, que puede ser el sitio de una herida. En algunas realizaciones, el paño tiene una salida **512** en comunicación con una fuente de presión negativa **514**, a través de un conducto **516**. En algunas realizaciones un contenedor de residuos **518**, que puede ser un recipiente para residuos extraíble, está en comunicación entre salida y la fuente de presión negativa. En algunas realizaciones, una salida de retorno **520** está en conexión con el recipiente **502** a
- 45 través de un conducto **522**. En algunas realizaciones, como se muestra en la figura 22B, un vaporizador **524** se interpone en la comunicación entre el recipiente **502** y el paño **504**.

- [0513]** Los conductos pueden ser flexibles y pueden ser adecuadamente de plástico del material de una manguera. La fuente de presión negativa **514**, que puede ser adecuadamente una bomba de vacío, está en algunas
- 50 realizaciones en comunicación fluida con la salida **512** a través del conducto **516**, para promover el drenaje del fluido, como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, el bote de residuos **518** se pone al vacío a través de comunicación fluida para recoger el fluido drenado. Preferiblemente, un filtro (no mostrado), que puede ser un filtro de membrana hidrófoba, se interpone entre el bote y la fuente de presión negativa para protegerlo frente a la contaminación de los flujos de drenado recogidos en el bote aspirados en el bote. En algunas realizaciones, el paño
- 55 **504** comprende un material elastomérico, que puede, por lo tanto, acomodar cambios de presión sobre la zona del sitio del tejido durante una operación intermitente de la fuente de presión negativa. En algunas realizaciones, la periferia del paño se cubre con un adhesivo sensible a la presión, que puede ser un adhesivo acrílico, para sellar el paño sobre el sitio del tejido.

[0514] Los sistemas de administración de gas de presión negativa **300** y **500** como se ilustran en la **figura 12 y la figura 22A-B** son útiles para tratar una diversidad de zonas para tratamiento, y, en particular, para tratar heridas. Las heridas que pueden tratarse usando el sistema **300** incluyen heridas abiertas infectadas, úlceras de decúbito, incisiones dehiscentes, quemaduras de espesor parcial, y diversas lesiones a las que se han fijado colgajos o injertos. El tratamiento de una herida puede realizarse fijando un sistema de administración de gas al sitio de tratamiento como se ha mostrado y se ha descrito previamente, manteniendo una presión reducida sustancialmente continua o cíclica en la cámara a presión reducida **304** y suministrando el agente activo a la cámara **304** de forma sustancialmente continua o cíclica hasta que la herida ha alcanzado una condición mejorada deseada. Un estado seleccionado de condición mejorada puede incluir la formación de suficiente tejido de granulación para la fijación de un colgajo o injerto, la reducción de una infección microbiana en la herida, parada o inversión de la penetración de una quemadura, cierre de la herida, integración de un colgajo o injerto con el tejido herido subyacente, curación completa de la herida, u otras fases de mejora o curación apropiadas para un tipo determinado de herida o completo de herida. El sistema de administración de gas puede cambiarse de forma periódica, tal como a intervalos de 48 h, durante el tratamiento, particularmente al usar un sistema de administración de gas que incorpora una pantalla sobre o en la herida. El procedimiento puede practicarse usando una presión negativa o reducida que varía de 0,01 a 0,99 atmósferas, o el procedimiento puede practicarse usando una presión negativa o reducida que varía entre 0,5 a 0,8 atmósferas. El periodo de tiempo para el uso del procedimiento sobre una herida puede ser al menos 12 h, pero, por ejemplo, puede prolongarse durante uno o más días. No hay ningún límite superior más allá que el uso del procedimiento ya no sea beneficioso; el procedimiento puede aumentar la velocidad de cierre hasta el momento en que la herida se cierra realmente. El tratamiento satisfactorio de diversos tipos de heridas puede obtenerse a través del uso de presiones reducidas equivalentes a aproximadamente 2 a 7 mmHg por debajo de la presión atmosférica.

[0515] Puede ser útil suministrar presión reducida al sistema de administración de gas de una forma intermitente o cíclica, tal como se ha descrito anteriormente, para tratar heridas en presencia del agente activo. El suministro intermitente o cíclico de una presión reducida a un sistema de administración de gas puede conseguirse por control manual o automático del sistema de vacío. Una relación del ciclo, la relación de tiempo "encendido" a tiempo "apagado", en tal tratamiento a presión reducida intermitente puede ser tan baja como de 1:10 o tan alta como de 10:1. Una relación típica es aproximadamente 1:1, que normalmente se realiza en intervalos alternos de 5 minutos de suministro de presión reducida y no suministro.

[0516] Un sistema de vacío adecuado incluye cualquier bomba de succión capaz de proporcionar al menos 0,1 libras de succión a la herida, o hasta tres libras de succión, o hasta catorce (14) libras de succión. La bomba puede ser cualquier bomba de succión habitual adecuada para fines médicos que sea capaz de proporcionar la succión necesaria. La dimensión del entubado que interconecta la bomba y el aparato de presión reducida se controla por la capacidad de la bomba para proporcionar el nivel de succión necesario para la operación. Puede ser adecuado un tubo de 1/4 pulgadas de diámetro.

[0517] Las realizaciones de la presente divulgación también incluyen procedimientos de tratamiento del tejido dañado, que incluyen las etapas de aplicar presión negativa a una herida y el agente activo durante un tiempo seleccionado y a una magnitud seleccionada suficiente para reducir la densidad bacteriana en la herida. Las heridas abiertas están casi siempre contaminadas con bacterias perjudiciales. Generalmente una densidad bacteriana de 10^5 organismos bacterianos por gramo de tejido se considera como infectado. Generalmente se acepta que a este nivel de infección, el tejido injertado no se adherirá a una herida. Estas bacterias han de eliminarse, a través de la respuesta inmune natural del huésped de la herida o a través de algún procedimiento externo, antes del cierre de la herida. La aplicación de presión negativa y el agente activo a una herida puede reducir la densidad bacteriana de la herida. Se cree que este efecto puede deberse a la incompatibilidad de las bacterias con un entorno de presión negativa o el aumento del flujo sanguíneo a la zona de la herida junto con una exposición al agente activo, ya que la sangre trae células y enzimas para destruir las bacterias. Pueden usarse procedimientos de acuerdo con las realizaciones de la presente invención para reducir la densidad bacteriana en una herida al menos a la mitad. En algunas realizaciones, puede usarse para reducir la densidad bacteriana en al menos 1.000 veces o al menos 1.000.000 de veces.

[0518] Las realizaciones de la presente divulgación también incluyen procedimientos de tratamiento de una quemadura que incluyen las etapas de aplicar presión negativa y el agente activo a la quemadura sobre un área con una presión reducida predeterminada y durante un tiempo suficiente para inhibir la formación de una quemadura de espesor completo. Una quemadura de espesor parcial, una que tiene una capa superficial de tejido muerto y una zona subyacente de estasis, está a menudo lo suficientemente infectada, de manera que se transformará en 24-48 h en una quemadura de espesor completo, una en la que se destruyen todas las estructuras epidérmicas. La aplicación de presión negativa y una cantidad del agente activo a la herida puede impedir que la infección

[0519] se vuelva lo suficientemente grave como para causar la destrucción de las estructuras epidérmicas subyacentes. La magnitud, patrón y duración de la aplicación de presión puede variar con cada herida.

- 5 [0520] Las realizaciones de la presente divulgación también incluyen procedimientos para mejorar la fijación del tejido vivo a una herida que comprende las etapas de unir en primer lugar el tejido vivo a la herida para formar un complejo de herida-tejido, después aplicar una presión negativa o reducida de una magnitud seleccionada y una cantidad del agente activo al complejo de herida-tejido sobre un área suficiente para promover la migración del tejido epitelial y subcutáneo hacia el complejo, manteniéndose la presión negativa y la exposición al agente activo durante
10 un periodo de tiempo seleccionado suficiente para facilitar el cierre de la herida. La fijación del tejido vivo a una herida es un procedimiento común que puede tomar muchas formas. Por ejemplo, una técnica común es el uso de un "colgajo", una técnica en la que un tejido de piel de una zona adyacente a la herida se desprende sobre tres lados pero permanece fijado sobre el cuarto, y después desplaza sobre la herida. Otra técnica que se usa con frecuencia es un injerto de piel abierto en el que la piel se desprende completamente de otra superficie de piel y se injerta sobre
15 la herida. La aplicación de presión negativa y el agente activo al complejo herida-injerto reduce la densidad bacteriana en el complejo y mejora el flujo sanguíneo a la herida, mejorando así la fijación del tejido injertado.

I. Otros Aparatos

- 20 [0521] En ciertas realizaciones de la invención, puede ser deseable complementar los procedimientos de la presente divulgación para el tratamiento de pacientes que se someterán o se han sometido a un trauma con la capacidad de manipular de forma externa la temperatura corporal interna del paciente. A este respecto, la temperatura corporal interna de un paciente puede manipularse, junto con los procedimientos de la presente divulgación, mediante rutas invasivas o no invasivas. Los procedimientos invasivos para la manipulación de la
25 temperatura corporal interna incluyen, por ejemplo, el uso de una bomba cardio-pulmonar para calentar o enfriar la sangre del paciente, elevando o reduciendo de este modo la temperatura corporal interna del paciente. Las rutas no invasivas para manipular la temperatura corporal interna incluyen sistemas y aparatos que transfieren calor dentro o fuera del cuerpo del paciente.

30 J. Dispositivos o Aparatos de Administración Adicionales

- [0522] En algunas realizaciones se contempla que los procedimientos o composiciones implicarán un dispositivo o aparato de administración específico. Cualquier procedimiento analizado en el presente documento puede implementarse con cualquier dispositivo para entrega o administración que incluye, pero sin limitación, los
35 analizados en el presente documento.

- [0523] Para administración tópica, los compuestos activos de la invención pueden formularse como soluciones, geles, pomadas, cremas, suspensiones, etc. como se conoce bien en la técnica. Las formulaciones sistémicas pueden incluir aquellas diseñadas para administración por inyección o infusión, por ejemplo, inyección subcutánea,
40 intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como aquellas diseñadas para administración transdérmica, transmucosal, oral o pulmonar.

- [0524] Para administración oral, los compuestos activos de la invención se formularan como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, genes, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un
45 paciente a tratar, o preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones.

- [0525] Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos, pastillas, etc. formuladas de forma convencional. Otra administración intramucosal puede ser mediante supositorios o por vía
50 intranasal.

- [0526] Para la administración directamente al pulmón por inhalación, el compuesto de la invención puede administrarse convenientemente al pulmón mediante varios dispositivos diferentes. Por ejemplo,

- [0527] Inhaladores de Dosis Medida (IDM): Puede usarse un inhalador de dosis medida ("IDM") que utiliza botes
55 que contienen un propulsor de baja ebullición adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado, para administrar el compuesto de la invención directamente al pulmón. Los dispositivos IDM están disponibles en varios proveedores, tales como 3M Corporation (por ejemplo, en la red en 3m.com/us/healthcare/manufacturers/dds/pdf/idd_valve_canister_brochure.pdf), Nasacort de Aventis (por ejemplo, página web: products.sanofi-aventis.us/Nasacort_HFA/nasacort_HFA.html 63k-),

Boehringer Ingelheim, (por ejemplo, página web: boehringer-ingelheim.com/corporate/home/download/r_and_d2003.pdf) Aerobid from Forest Laboratories, (por ejemplo, página web: frx.com/ products/ aerobid.aspx) Glaxo-Wellcome, (por ejemplo, página web: .gsk.com/research/newmedicines/ newmedicines_ harma.html) y Schering Plough, (página web: .schering-plough.com/ schering_plough/pc/ allergy_respiratory.jsp).

5

[0528] Inhaladores de polvo seco (IPS): Los dispositivos IPS típicamente usan un mecanismo, tal como una ráfaga de gas para crear una nube de polvo seco dentro de un recipiente, que después puede inhalarse por el paciente. Los dispositivos IPS se conocen bien en la técnica y pueden adquirirse en varios proveedores que incluyen, por ejemplo, Foradil aerolizer de Schering Corporation, (por ejemplo, página web: .spfiles.com/ piforadil.pdf) Advair Diskus de Glaxo-Wellcome. (por ejemplo, página web: us.gsk.com/ products/ assets/us_advair.pdf-). Una variante popular es el sistema IPS de dosis múltiple ("IPSDM"), que permite la administración de más de una dosis terapéutica. Los dispositivos IPSDM están disponibles en empresas, tales como Plumicort Turbuhaler de AstraZeneca, (por ejemplo, página web: twistclickinhale.com/ GlaxoWellcome, (por ejemplo, página web: us.gsk.com/ products/ assets/us_advair.pdf-) y Schering Plough, (por ejemplo, página web: .schering-plough.com/ schering_plough/pc/ allergy_respiratory.jsp). Se contempla adicionalmente que dichos dispositivos, o cualquier otro dispositivo analizado en el presente documento, puede alterarse para un único uso.

[0529] Administración en aerosol electrohidrodinámica (EHD): Los dispositivos de aerosol EHD usan energía eléctrica para aerosolizar soluciones o suspensiones de fármacos líquidas (véase, por ejemplo, Noakes y col., Pat. de Estados Unidos Nº 4.765.539; Coffee, Pat. de Estados Unidos Nº 4.962.885; Coffee, Solicitud PCT, WO 94/12285; Coffee, Solicitud PCT, WO 94/14543; Coffee, Solicitud PCT, WO 95/26234, Coffee, Solicitud PCT, WO 95/26235, Coffee, Solicitud PCT, WO 95/32807. Los dispositivos de aerosol EHD administran de forma más eficiente fármacos al pulmón que las tecnologías de administración pulmonar existentes.

[0530] Nebulizadores: Los nebulizadores crean aerosoles a partir de formulaciones de fármacos líquidas usando, por ejemplo, energía ultrasónica para formar partículas finas que pueden inhalarse fácilmente. Los ejemplos de nebulizadores incluyen dispositivos suministrados por Sheffield/Systemic Pulmonary Delivery Ltd. (véase, Armer y col., Pat. de Estados Unidos Nº 5.954.047; van der Linden y col., Pat. de Estados Unidos Nº 5.950.619; van der Linden y col., Pat. de Estados Unidos Nº 5.970.974), solución de nebulizador Intal de Aventis, (por ejemplo, página web: .fda.gov/ medwatch/ SAFETY/ 2004/feb_ PI/ Intal_ Nebulizer_ PI.pdf).

[0531] Para la administración de un gas directamente a los pulmones por inhalación pueden usarse diversos procedimientos de administración actualmente disponibles en el mercado para administrar oxígeno. Por ejemplo, puede emplearse un respirador, tal como la bolsa ambu (véanse las patentes de Estados Unidos 5.988.162 y 4.790.327). Una bolsa ambu consiste en una bolsa de compresión flexible fijada a una mascarilla, que se usa por el especialista para introducir aire/gas en los pulmones de la víctima.

[0532] Dispositivo de administración de medicina portátil capaz de producir agentes atomizados que se adaptan para inhalarse a través de un nebulizador por un paciente que padece una afección respiratoria. Además, dicho dispositivo de administración proporciona a medio en el que la dosis del agente inhalado puede controlarse a distancia y, si es necesario, alterarse por un especialista o doctor. Véase la Pat. de Estados Unidos Nº 7.013.894. La administración del compuesto de la invención puede realizarse por un procedimiento para la entrega de un gas suplementado a una persona en combinación con la monitorización de la ventilación de la persona, realizándose ambas sin el uso de una mascarilla sellada, tal como se describe en la pat. de Estados Unidos Nº 6.938.619. Un dispositivo de conservación de oxígeno neumático para dispensar de forma eficiente oxígeno u otro gas usado durante una terapia respiratoria, de tal forma que únicamente la primera parte de la respiración del paciente contenga el oxígeno u otro gas terapéutico. (Véase la Pat. de Estados Unidos Nº 6.484.721). Se usa un dispositivo de administración de gas que se acciona cuando el paciente comienza a inhalar. Se administra una cola de flujo de gas al paciente después del periodo transcurrido desde la inhalación inicial para impedir el impulso de la administración de gas por el paciente. De esta manera, el gas se administra únicamente al paciente durante la primera porción de inhalación, impidiendo que el gas se administre, que únicamente llenará los pasos de aire a los pulmones del paciente. Usando de forma eficiente el oxígeno, las botellas de oxígeno usadas cuando un paciente se mueve durarán más y serán más pequeñas y fáciles de transportar. Administrando de forma neumática el gas al paciente no se usarán baterías ni productos electrónicos.

55

[0533] Todos los dispositivos descritos aquí pueden tener un sistema de escapa para unir o neutralizar el compuesto de la invención.

[0534] La administración transdérmica del compuesto de la invención puede conseguirse mediante un dispositivo o

parche medicado que se fija a la piel de un paciente. El parche permite que un compuesto medicinal contenido dentro del parche se absorba a través de las capas de la piel y en el torrente sanguíneo del paciente. Dichos parches están disponibles en el mercado como parche Nicoderm CQ en Glaxo Smithkline, (página web: nicodermcq.com/NicodermCQ.aspx) y como Ortho Evra de Ortho-McNeil Pharmaceuticals, (página web: ortomcneilpharmaceutical.com/healthinfo/womenshealth/products/orto-evra.html). La administración de fármacos transdérmica reduce el dolor asociado a las inyecciones de fármacos y la administración de fármacos intravenosa, así como el riesgo de infección asociado a estas técnicas. La administración de fármacos transdérmica también evita el metabolismo gastrointestinal de los fármacos administrados, reduce la eliminación de fármacos por el hígado, y proporciona una liberación sostenida del fármaco administrado. La administración transdérmica también mejora el compromiso del paciente con un régimen farmacológico debido a la relativa facilidad de administración y la liberación sostenida del fármaco.

[0535] Otras modificaciones del parche incluyen el parche Ultrasónico, que está diseñado con materiales que permiten la transmisión de ultrasonidos a través del parche, realizando la administración de los medicamentos almacenados dentro del parche, y que se usará junto con procesos de administración de fármacos ultrasónicos (véase la Pat. de Estados Unidos Nº 6.908.448). El parche en una botella (Pat. de Estados Unidos Nº 6.958.154) incluye una composición fluida, por ejemplo, un pulverizador en aerosol en algunas realizaciones, que se aplica sobre una superficie como un fluido, pero posteriormente se seca para formar un elemento de cubrición, tal como un parche, sobre una superficie de un huésped. El elemento de cubrición formado así tiene una superficie externa que no pega y una superficie pegajosa posterior que facilita la adherencia del parche al sustrato.

[0536] Otro sistema de administración de fármacos comprende uno o más agregados semiconductores de bolos y que facilita la liberación de un fármaco almacenado en un depósito. El primer agregado se usa para detectar y memorizar, y un segundo agregado para aspectos de control, tales como para bombear y dispensar el fármaco. El sistema puede comunicar con un sistema de control a distancia, o funcionar independientemente en la red local durante un largo periodo de tiempo para administrar el fármaco en base a una petición del paciente, una liberación retardada bajo control por el sistema, o la administración de acuerdo con marcadores medidos. Véase la patente de Estados Unidos Nº 6.464.687.

[0537] BOMBAS y Dispositivos de infusión: Una bomba de infusión o perfusor inducen fluidos, medicación o nutrientes en el sistema circulatorio de un paciente. Las bombas de infusión pueden administrar fluidos de forma fiable y económica. Por ejemplo, pueden administrar inyecciones de tan poco como 0,1 ml por hora (demasiado pequeñas para un gotero), inyecciones cada minuto, inyecciones con bolos repetidos solicitados por el paciente, hasta un número máximo por hora (por ejemplo, en analgesia controlada por el paciente), o fluidos cuyo volumen varía según la hora del día. Se han descrito antes diversos tipos de dispositivos de infusión en las siguientes solicitudes de patente de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos. Estas incluyen, pero sin limitación, la Pat. de Estados Unidos Nº 7.029.455, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.805.693, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.800.096, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.764.472, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.742.992, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.589.229, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.626.329, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.355.019, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.328.712, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.213.738, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.213.723, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.195.887, la Pat. de Estados Unidos Nº 6.123.524 y la Pat. de Estados Unidos Nº 7.022.107. Además, también están disponibles bombas de infusión en Baxter International Inc. (página web: baxter.com/products/medication_management/infusion_pumps/), Alaris Medical Systems (página web: alarismed.com/products/infusion.shtml) y en B Braun Medical Inc. (página web: bbraunusa.com/index.cfm?uid=001AA837D0B759A1E34666434FF604ED).

[0538] Dispositivo de administración de bolos de Oxígeno/Gas: Tal dispositivo para administrar un gas a pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) está disponible en Tyco Healthcare (página web: tycohealthcare.com/files/d0004/ty_zt7ph2pdf). También puede usarse para administrar el compuesto de la invención. El dispositivo anterior es económico, ligero, discreto y portátil.

[0539] "Patch in a bottle" (Pat. de Estados Unidos Nº 6.958.154) incluye una composición fluida, por ejemplo, un pulverizador en aerosol en algunas realizaciones, que se aplica sobre una superficie en forma de un fluido, pero se seca posteriormente para formar un elemento de cubrición, tal como un parche, sobre una superficie de un huésped. El elemento de cubrición formado así tiene una superficie externa que no pega y una superficie pegajosa posterior que facilita la adherencia del parche al sustrato.

[0540] Sistema de Administración de Fármacos Implantable: Otro sistema de administración de fármacos comprende uno o más agregados semiconductores de bolos y que facilita la liberación de un fármaco

almacenado en un depósito. El primer agregado se usa para detectar y memorizar, y un segundo agregado para aspectos de control, tales como para bombear y dispensar el fármaco. El sistema puede comunicar con un sistema de control a distancia, o funcionar independientemente en la red local durante un largo periodo de tiempo para administrar el fármaco en base a una petición del paciente, una liberación retardada bajo control por el sistema, o la administración de acuerdo con marcadores medidos. Véase la patente de Estados Unidos N° 6.464.687.

VIII. Terapias de Combinación

[0541] Los compuestos y procedimientos de la presente invención pueden usarse en el contexto de varias aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Para aumentar la eficacia de un tratamiento con las composiciones de la presente invención, tales como antagonistas de oxígeno y otros compuestos activos, puede deseable combinar estas composiciones con otros agentes eficaces en el tratamiento de aquellas enfermedades y afecciones (terapia secundaria). Por ejemplo, el tratamiento de ictus (tratamiento anti-ictus) típicamente implica un antiplaquetario (aspirina, clopidogrel, dipyridamol, ticlopidina), un anticoagulante (heparina, warfarina), o un trombolítico (activador del plasminógeno tisular).

[0542] Pueden emplearse diversas combinaciones; por ejemplo, un compuesto activo, tal como H₂S, es "A" y la terapia secundaria es "B":

20 A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/AB/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

25 **[0543]** La administración de los antagonistas de oxígeno y/o otros compuestos activos de la presente invención a la materia biológica seguirán protocolos generales para la administración de esta terapia secundaria particular, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera, del tratamiento de antagonista de oxígeno (u otro compuesto activo). Es de esperar que los ciclos de tratamiento se repitan según sea necesario. También se contempla que pueden aplicarse diversas terapias convencionales, así como una intervención quirúrgica, junto con las terapias descritas.

IX. Ejemplos

35 **[0544]** Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Debe apreciarse por los expertos en la técnica que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán, a la luz de la presente divulgación, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y aún obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLO 1:

CONSERVACIÓN DE NEMATODOS EN MONÓXIDO DE CARBONO

45 **[0545]** La atmósfera contiene 210.000 ppm de oxígeno. La exposición a bajos niveles de oxígeno, o hipoxia, da como resultado daño celular y muerte en los seres humanos. En el nematodo, *C. elegans*, las concentraciones de oxígeno entre 100 ppm y 1000 ppm son también letales. Estudiando críticamente la respuesta de los nematodos a un intervalo de tensiones de oxígeno, se descubrió que las concentraciones de oxígeno por debajo de 10 ppm y por encima de 5000 ppm no son letales. En 10 ppm de oxígeno equilibrado con nitrógeno, los nematodos entran en un estado de animación suspendida reversible en el que todos los aspectos de la animación que pueden observarse bajo la luz del microscopio cesan (Padilla y col., 2002). En concentraciones de oxígeno de 5000 ppm (equilibrado con nitrógeno) y superiores, los nematodos progresan a través de su ciclo de vida normalmente. En la búsqueda de fármacos que protegen a los nematodos frente al daño hipóxico se ensayó el monóxido de carbono.

55 **[0546]** Para conseguir unas condiciones atmosféricas específicas se usó el siguiente aparato: un cilindro de jeringa de vidrio que tiene una punta con un dispositivo de bloqueo, tal como una conexión LUER-LOCK con la gran abertura del cilindro cerrada herméticamente con una junta de acero mecanizado personalizado y caucho para hacer un sello hermético se bloqueó a través de un dispositivo de bloqueo al puerto de entrada de una cámara ambiental que tiene un puerto de entrada y un puerto de salida equipado cada uno con un dispositivo de bloqueo, tal como una

conexión LUER-LOCK. Un gas definido se humidificó y se proporcionó a la cámara ambiental ventilando en primer lugar el gas de un depósito comprimido (Byrne Specialty Gas, Seattle, WA) a través de una botella de lavado de gases (500 ml de Kimex) cargada con agua doblemente destilada. La botella de lavado de gases se conectó a la cámara ambiental después de un caudalímetro de gas. Se usó un caudalímetro de gas para proporcionar un flujo regulado de 70 cc/min a través de la cámara ambiental durante toda la incubación de 24 h.

[0547] Para probar si puede conseguirse una estasis reversible inducida en nematodos *C. elegans*, se recogieron embriones de *C. elegans* de 2 células, larvas L3 o nematodos adultos y se expusieron a un entorno de CO eficazmente al 100%, un entorno de N₂ al 100%, un entorno que comprende 500 ppm de oxígeno equilibrado con monóxido de carbono, o a entornos que comprenden 100, 500 ó 1000 ppm de oxígeno equilibrado con nitrógeno a temperatura ambiente. Los nematodos se visualizaron usando microscopía de contraste de interferencia diferencial (también conocido como óptica de Nomarski). Se recogieron imágenes y se analizaron usando imagen de NIH y Adobe Photoshop 5.5. Los embriones tienen aproximadamente 50 µm de longitud.

15 [0548] Los resultados de estos experimentos mostraron que el monóxido de carbono al 100% no era letal e indujo animación suspendida reversible. Los nematodos no sobrevivieron a 500 ppm de oxígeno equilibrado con nitrógeno, sin embargo, los tratados con 500 ppm de oxígeno equilibrado con monóxido de carbono entraron en animación suspendida y sobrevivieron. Véase a continuación:

20 EJEMPLO 2:

CONSERVACIÓN DE PIEL HUMANA EN MONÓXIDO DE CARBONO

[0549] El monóxido de carbono es extraordinariamente tóxico en seres humanos ya que compite fuertemente con el oxígeno para la unión a hemoglobina, la molécula principal que distribuye oxígeno a los tejidos. El hecho de que los nematodos, que no tienen hemoglobina, sean resistentes al monóxido de carbono e incluso se protejan frente al daño hipóxico por este fármaco, sugirió la posibilidad de que el monóxido de carbono protegerá frente a daño hipóxico al tejido humano en situaciones en las que no está presente la sangre, tal como en trasplante de tejidos o campos quirúrgicos sin sangre. Esta hipótesis se ensayó usando piel humana.

30 [0550] Se obtuvieron tres prepucios humanos para este fin. El tejido de los prepucios se conservó en medio de crecimiento de queratinocitos (MCQ) que contenía insulina, EGF (0,1 ng/ml), hidrocortisona (0,5 mg/ml) y extracto de pituitaria bovina (aprox. 50 microgramos/ml de proteína). Los prepucios se aclararon en PBS, y se eliminó el exceso de tejido graso. Cada muestra de prepucio se dividió en 2 pedazos iguales. Cada pedazo se puso en un recipiente separado que contenía una solución de PBS con 24 mg/ml de Dispase II (de Bacillus Polymyxa EC 3.4.24.4: Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Un recipiente (que contenía un pedazo de prepucio en PBS con Dispase II) se mantuvo en una cámara húmeda en una campana de extracción. El otro recipiente (con la otra mitad del prepucio en PBS con Dispase II) se colocó en la misma campana de extracción en una cámara ambiental perfundida con CO humidificado al 100%. Ambas muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 h. Los procedimientos usados para establecer las condiciones atmosféricas definidas eran idénticos a los que se han usado en el Ejemplo 1.

45 [0551] Después de 24 h de exposición a normoxia o CO al 100%, los queratinocitos se aislaron de los prepucios de acuerdo con el procedimiento descrito por Boyce y col. (1983; 1985; cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad). En resumen, la epidermis de cada muestra de prepucio se retiró a una placa recién preparada que contenía PBS. La epidermis se picó en trozos y se homogeneizó antes de la incubación en 3 ml de tripsina al 0,05%, EDTA 1 mM durante 5 minutos, a temperatura ambiente, para separar las células basales de la epidermis. Después de la incubación, se añadieron 6 ml de 400 µg/ml (microgramos por ml) de inhibidor de tripsina de soja, 1 mg/ml de BSA y las muestras se centrifugaron a 900 RPM. El sobrenadante de cada muestra se desechó, y los mismos gránulos se suspendieron de nuevo en 10 ml de KGM. Cada muestra se dividió en dos placas de 10 cm, cada una de las cuales contenía 5 ml de KGM y 100 µl de HEPES a pH 7,3 (ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etano sulfónico). Las placas se incubaron en una incubadora a 37 °C perfundida con aire ambiental al 95%, dióxido de carbono al 5% durante cinco días.

55 [0552] Las células se inspeccionaron visualmente usando un microscopio de contraste de fase invertida. Las tres poblaciones de queratinocitos expuestas a normoxia mostraron poco o ningún crecimiento. Las tres poblaciones de queratinocitos expuestas a CO al 100% mostraron un crecimiento significativo. La cuantificación del número de queratinocitos viables según se determinó por la formación de colonias se cuantificó para dos de los tres prepucios. Véase la figura 1.

Tabla 1 - Cuantificación de Formación de Colonias

Prepucio	Atmósfera	Colonias totales
1	CO al 100%	542 colonias (muchas de las cuales son muy grandes)
1	Normoxia	2 colonias (ambas pequeñas)
2	CO al 100%	780 colonias (muchas de las cuales son muy grandes)
2	Normoxia	0 colonias

EJEMPLO 3:

5

EXPERIMENTOS DE CONSERVACIÓN ADICIONALES CON NEMATODOS

[0553] El siguiente ejemplo contiene información que superpone y extiende la información desvelada en el Ejemplo 1.

10

A. Materiales y Procedimientos

[0554] Cámaras y aparatos ambientales. Los experimentos de privación de oxígeno se realizaron usando una cámara atmosférica a medida diseñada por W. Van Voorhies (Van Voorhies y col., 2000). La cámara es una jeringa de vidrio de 30 ml (Fisher N° 14-825-10B) equipada con un tapón de acero a medida que se reviste con dos juntas tóricas de vitón para asegurar un cierre firme. El tapón se perfora y tiene un luer-lock de acero en la cara exterior de manera que pueda fijarse una manguera que lleva gas comprimido. Se administra una mezcla de gas definida a la cámara a una presión y caudal constantes desde los depósitos comprimidos pasando en primer lugar a través de un rotámetro (Aalborg, tubo de flujo número 032-41 ST) o un controlador del flujo de masa (Sierra Instruments N° 810) para controlar el caudal, y después a través de una botella de lavado de gases de 500 ml (Fisher N° K28220-5001) que contiene 250 ml de agua para hidratar el gas. Se un entubado de nylon 1/4" OD (Cole-Parmer N° P-06489-06) o FEP (Cole-Parmer N° A-06450-05) y se hicieron conexiones entre el entubado y los reguladores y entre el entubado y los rotámetros con racores de latón de tipo John-Guest (Byrne Gas). Todas las demás conexiones se hicieron con racores de conexión rápida de microflujo (Cole-Parmer N° A-06363-57, N° A-06363-52) o conexiones luer convencionales (Cole-Parmer #A- 06359-37, #A-06359-17).

[0555] Viabilidad de los nematodos en hipoxia. Una cepa Bristol N₂ se mantuvo constantemente a 20 °C con cuidado para asegurar que la población no muriera de hambre. Se recogieron *C. elegans* adultos en fase Log en una gota de agua estéril que contenía 100 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de tetraciclina y 200 µg/ml de estreptomycin sobre una placa de vidrio. Los adultos se cortaron con una cuchilla y se recogieron embriones de 2 células usando una pipeta de boca. Se transfirieron 30-60 embriones de 2 células a un bote de vidrio pequeño (hecho a medida para equipar cámaras atmosféricas, Avalon Glass Works, Seattle WA) cargado con 3 ml de agarosa al 1% en M9. Después, los botes se colocaron en una cámara húmeda durante 2 horas para permitir que los embriones madurasen, y después se colocaron en la cámara ambiental. Las cámaras ambientales se perfundieron continuamente a temperatura ambiente con N₂ puro (grado 4,5), 100 ppm de O₂/N₂, 500 ppm de O₂/N₂, 1000 ppm de O₂/N₂, o 5000 ppm de O₂/N₂ a 70 cc/min durante 24 h. Tras la exposición, se cortaron del bote pedazos de agarosa que contenían los embriones y se pusieron con los embriones hacia arriba sobre una placa de NGM de tamaño medio sembrada con *E. coli* (OP50). Los embriones se clasificaron para su incubación 24 horas después de la exposición y los L1 incubados se transfirieron a la superficie de la placa de NGM y se siguieron hasta la edad adulta. Los animales que no pudieron contarse se retiraron del total. Todos los gases se suministraron por Byrne Gas (Seattle, WA). El N₂ puro se garantizó que contenía menos de 10 ppm de impurezas y todas las mezclas de O₂/N₂ se certificaron a ±2% del contenido de oxígeno (por ejemplo, 100 ppm de O₂/N₂ se certificó que contenían entre 98 ppm de O₂ y 102 ppm de O₂). Las partes por millón para una conversión en kPa se basó en 1 millón de partes = 101 kPa a 1 atmósfera.

45

[0556] Viabilidad de los nematodos en atmósferas basadas en monóxido de carbono. Se recolectaron 30-60 embriones de cepas Bristol N₂ y *hif-2* (*ia04*) mantenidas continuamente como se ha descrito anteriormente. Las cámaras ambientales se perfundieron continuamente a temperatura ambiente con CO puro (grado CP) o 500 ppm de O₂/CO a 70 cc/min durante 24 h. Para conseguir 2500 ppm de O₂/CO o 2500 ppm de O₂/N₂, se mezclaron 5000 ppm de O₂/N₂ a una proporción 1:1 con CO puro o N₂ puro usando dos controladores del flujo de masa (Sierra Instruments 810) para controlar con precisión el flujo. Cada gas se administró en una válvula de 3 vías (Cole-Parmer #A-30600-23) a 50 cc/min, y después la mezcla resultante se pasó a través de una botella de lavado de gases y a una cámara ambiental a lo largo de las 24 horas de exposición. Todos los gases se suministraron por Byrne Gas

50

(Seattle, WA). La mezcla de 500 ppm de O₂/CO se certificó a $\pm 2\%$ del contenido de oxígeno y contenía 7000 ppm de N₂ para asegurar una relación O₂/CO coherente durante todo el uso del depósito.

[0557] Análisis biológico celular. Para determinar la extensión de la evolución en el desarrollo en atmósferas basadas en nitrógeno (Tabla 2), se expusieron embriones de 2 células a diversos grados de hipoxia como se ha descrito anteriormente y se fotografiaron inmediatamente, o después de un periodo de recuperación de 12 h en una cámara húmeda. Para determinar si los embriones se interrumpieron en atmósferas basadas en monóxido de carbono, se maduraron embriones de 2 células en aire ambiental durante dos horas y se fotografiaron inmediatamente o puestos en monóxido de carbono al 100% o 0,05 kPa de O₂/CO durante 24 horas, y se fotografiaron inmediatamente después de la exposición. En todos los casos, se realizó la microscopía DIC colocando los embriones en un cubreobjetos sobre una lecho fino de agarosa al 1% y visualizándolos sobre un axioscopio Zeiss. Se tomaron fotografías usando el software RS Image y Adobe Photoshop.

B. Resultados

[0558] Se informó previamente que HIF-1 se requería en *C. elegans* en hipoxia leve (0,5 kPa de O₂ (Padilla y col., 2002) y 1 kPa de O₂ (Jiang y col., 2001)) y se sabe que la animación suspendida es posible en anoxia (>0,001 kPa de O₂) (Padilla y col., 2002). Para definir con precisión los intervalos en los que cada una de estas respuestas está activa, se determinó la viabilidad de los embriones de *C. elegans* de tipo natural tras la exposición a diversas tensiones de oxígeno entre hipoxia moderada y anoxia durante 24 h. Los embriones expuestos a anoxia entraron en animación suspendida como se ha indicado previamente, y, por lo tanto, sobrevivieron a la exposición con alta viabilidad. Los embriones en 0,5 kPa de O₂ permanecieron animados a lo largo de la exposición y también sobrevivieron con alta viabilidad. Sin embargo, los embriones expuestos a un intervalo intermedio de tensiones de oxígeno entre hipoxia moderada y anoxia (0,1 kPa de O₂ con respecto a 0,01 kPa de O₂) sorprendentemente no sobrevivieron (figura 2).

[0559] Los embriones no maduraron durante la exposición a este intervalo intermedio de hipoxia, lo que indicó que no ejecutaron con éxito la respuesta mediada por HIF-1. Para determinar si parecían suspendidos, se examinó si los embriones en este intervalo intermedio detuvieron la embriogénesis durante la exposición. Los embriones en tensiones de oxígeno letales no detuvieron la embriogénesis, y el aumento de la cantidad de oxígeno se correlacionó con un aumento en la extensión de la evolución en el desarrollo en el embrión (Tabla 2). Tras la reoxigenación, la mayoría de estos embriones no pudieron madurar y muchos de aquellos que maduraron se interrumpieron como L1 anormales. Estos datos muestran que este intervalo intermedio de hipoxia es un estrés único en el que los niveles de oxígeno tampoco son lo suficientemente altos para facilitar una animación continuada ni suficientemente bajos para inducir la animación suspendida.

[0560] En base a estos hallazgos, se esgrimió la hipótesis de que si el monóxido de carbono, un inhibidor competitivo de la unión de oxígeno, puede inducir la animación suspendida en presencia de bajos niveles de oxígeno, proporcionar protección frente a este intervalo letal de hipoxia. Para examinar esta posibilidad, se determinó en primer lugar la viabilidad de embriones de *C. elegans* en diversas concentraciones de monóxido de carbono. A pesar de los efectos tóxicos que los altos niveles de monóxido de carbono pueden tener en algunos sistemas, se descubrió que los embriones de *C. elegans* eran extraordinariamente tolerantes a un amplio intervalo de tensiones de monóxido de carbono, de hecho, los embriones de *C. elegans* pueden soportar una exposición continua a 101 kPa de CO (CO al 100%) durante 24 h con alta viabilidad (supervivencia del 81,5% hasta la edad adulta, figura 3). Notablemente, en 101 kPa de CO, los embriones no progresaron a través de la embriogénesis durante la exposición, indicando que entraron en animación suspendida. Para probar si el monóxido de carbono puede proteger los embriones en presencia de tensiones de oxígeno letales, se determinó la viabilidad de los embriones expuestos a 0,05 kPa de O₂ equilibrado con monóxido de carbono. A diferencia de los embriones expuestos a 0,05 kPa de O₂ equilibrado con N₂ (la mayor parte de los cuales no sobreviven), estos embriones recuperaron una viabilidad del 96,2% hasta la edad adulta (figura 3). Además, al igual que embriones tratados con 101 kPa de CO, los embriones en 0,05 kPa de O₂ equilibrado con monóxido de carbono interrumpieron la embriogénesis, lo que indica que entraron en animación suspendida. Por lo tanto, el monóxido de carbono puede proteger contra el daño hipóxico en presencia de tensiones de oxígeno letales induciendo la animación suspendida.

[0561] Para examinar adicionalmente el intervalo de tensiones de oxígeno que pueden protegerse por el exceso de monóxido de carbono, se usaron embriones que carecían de la función HIF-1 (la cepa *hif-1 (ia04)*) para abordar si también era posible la protección contra el daño hipóxico en hipoxia leve. Después de ensayar diversas tensiones de oxígeno entre 0,1 kPa de O₂ y 1 kPa de O₂ equilibrado con nitrógeno, se descubrió que el requisito máximo para HIF-1 estaba en 0,25 kPa de O₂ equilibrado con nitrógeno. En esta atmósfera, los embriones de origen natural

evolucionan con normalidad a través del desarrollo y muestran una alta viabilidad, pero los embriones *hif-1 (ia04)* no completan la embriogénesis y muestran una mortalidad del 100% (Tabla 3). Por lo tanto, se examinó si el monóxido de carbono puede proteger a los embriones *hif-1 (ia04)* en 0,25 kPa de O₂. En 0,25 kPa de O₂ equilibrado con monóxido de carbono, los embriones tanto de origen natural como *hif-1 (ia04)* entraron en animación suspendida y sobrevivieron a la exposición con altas viabilidades (supervivencia al 78,7% y al 84,0% hasta la edad adulta, respectivamente) (Tabla 3). Por lo tanto, la inducción de la animación suspendida por monóxido de carbono es posible a tensiones de oxígeno como mucho de 0,25 kPa de O₂, y el monóxido de carbono puede proteger contra hipoxia moderada, incluso en ausencia de la función HIF-1.

10 **Tabla 2 - Cuantificación de la progresión del desarrollo en hipoxia**

Atmósfera	Porcentaje de embriones dentro del intervalo	Intervalo de embriogénesis (min post fase de 2 células)	N
>0,001 kPa de O ₂ /N ₂	100% ± 0,0	20-40 min	35
0,01 kPa de O ₂ /N ₂	92,9% ± 6,0	40-80 min	115
0,05 kPa de O ₂ /N ₂	97,7% ± 2,0	100-140 min	108
0,1 kPa de O ₂ /N ₂	91,4% ± 1,3	300-340 min	60

[0562] Se colocaron embriones de tipo natural de 2 células en diversos grados de hipoxia durante 24 h y se clasificaron en cuanto a la extensión a la que se procesaron a través de la embriogénesis. La exposición a atmósferas que contienen cantidades aumentadas de oxígeno dio como resultado un aumento de la progresión a través de la embriogénesis. Se determinó el porcentaje de embriones que se interrumpieron dentro de un intervalo de 20-40 minutos determinado de embriogénesis. Los datos son el resultado de 3 experimentos independientes.

Tabla 3 - El monóxido de carbono protege a los embriones *hif-1* contra hipoxia moderada

	0,25 kPa de O ₂ /N ₂	n	0,25 kPa de O ₂ /CO	N
N2	94,2% ± 1,2	49	78,7% ± 21,9	109
<i>hif-1(ia04)</i>	0,0% ± 0,0	68	83,9% ± 13,8	108

20 [0563] Se ensayaron las viabilidades hasta la edad adulta tras la exposición a 24 horas de 0,25 kPa de O₂/N₂ o 0,25 kPa de O₂/CO en embriones de tipo natural y *hif-1 (ia04)*. Todos los puntos de datos son el resultado de al menos 3 experimentos independientes y los gusanos que no pudieron contarse se dedujeron del total.

Viabilidad de los Nematodos en respuesta a la hipotermia.

25 [0564] La viabilidad de los nematodos también es sensible a la temperatura, muriendo el 100% de una población después de una exposición de 24 h a temperatura fría (4 °C; figura 15). Sin embargo, si los nematodos se inducen a estasis por equilibrio en condiciones anóxicas (<10 ppm de oxígeno) durante 1 h antes de la caída de la temperatura, una proporción sustancial de ellos sobrevive después de una exposición durante 24 h a 4 °C (figura 15). En este experimento, los nematodos se mantuvieron en estasis durante el periodo de hipotermia, y durante una hora después regresaron a la temperatura ambiente. A continuación, se describen las condiciones anóxicas (N₂ puro), condiciones de crecimiento y mediciones de viabilidad.

EJEMPLO 4:

REDUCCIÓN DE LA TEMPERATURA CORPORAL INTERNA Y RESPIRACIÓN EN RATONES

A. Materiales y Procedimientos

40 [0565] Implantación de dispositivos de telemetría. Se implantaron ratones hembra C57BL/6J (Jackson Laboratories - Bar Harbor, Maine) con dispositivos de telemetría (PDT-4000 HR E-Mitter - MiniMitter Inc. - Bend, OR) de acuerdo con el protocolo convencional proporcionado por el fabricante. Se dejó que los ratones se recuperaran durante varias semanas para permitir que la temperatura corporal y las señales de la frecuencia cardíaca se estabilizaran. La temperatura corporal interna, frecuencia cardíaca y el movimiento de los ratones se controló continuamente a través de los dispositivos de telemetría y se registró usando el software VitalView (proporcionado por MiniMitter). La temperatura ambiente se controló usando un HOBO (Onset Computer Corp. - Pocasset, MA) y los datos se analizaron usando el software BoxCar (proporcionado por Onset Computer Corp.).

[0566] Exposición de los Ratones a una Atmósfera regulada. Cada ratón se expuso a 1 l/min de (a) una atmósfera que contenía 500 ppm de nitrógeno equilibrado con H₂S (Byrne Specialty Gas - Seattle, Washington) mezclado con aire ambiental (usando un medidor de medicador de gas de 3 canales de Aalborg - Orangeburg, Nueva York) para dar una concentración final de 80 ppm de H₂S y O₂ al 17%, o (b) una atmósfera de nitrógeno mezclado con aire ambiental para dar una concentración final de O₂ al 17%. Las mediciones de H₂S y O₂ se tomaron usando un monitor de gas portátil de la serie Innova GasTech GT (Thermo Gas Tech - Newark, California).

[0567] Antes de y durante la exposición al ensayo en atmósferas reguladas y reguladas por aumento, los ratones se colocaron en una cámara de gasificación que comprende una jaula de vidrio (con agua para beber y sin comida) equipada con tubos de importación y exportación de entubado de FEP de Cole-Parmer (Vernon Hills, Illinois) para la introducción y ventilación de la atmósfera. La jaula se cerró herméticamente con una tapa usando grasa al vacío de silicona Dow Corning (Sigma - St. Louis, Missouri.). El gas de cada jaula se ventiló a través del tubo de exportación en la campana química. Para asegurarse de que el sistema era hermético al gas, se usó un monitor portátil GasTech GT para detectar fugas.

[0568] Respirometría. En algunos experimentos, el consumo de oxígeno se midió mediante el uso de un analizador de O₂ PA-10a (Sable Systems) que se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. De forma análoga, el dióxido de carbono que se produjo por los animales se controló usando un analizador de CO₂/H₂O LI-7000 (Li-Cor company) que se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos instrumentos se colocaron en línea con las cámaras ambientales de tal forma que muestren el entubado de importación y exportación de gas.

[0569] Regulación de la Temperatura Ambiente. Los ratones se alojaron en una incubadora de iluminación diurna a baja temperatura She1 Lab (Sheldon Manufacturing Inc. - Cornelius, Oregón) para regular tanto el ciclo de temperatura como el de luz (luces encendidas a las 8 AM, luces apagadas a las 8 PM) para los ratones. Los ratones se expusieron a una atmósfera regulada como se ha descrito anteriormente. Cuando los ratones se expusieron a la atmósfera regulada, la temperatura en el interior de la incubadora cayó hasta la temperatura deseada, por ejemplo, a 10 °C o 15 °C. Los ratones se mantuvieron en la atmósfera regulada y en la temperatura reducida durante seis horas. La atmósfera en la cámara de gasificación se reemplazó por aire ambiental y los ratones se devolvieron a la temperatura ambiente normal (22 °C) y se dejó que se recuperasen.

B. Resultados

[0570] Datos de Referencia. Para determinar la respuesta de los ratones a dosis subletales de ácido sulfhídrico, el inventor estableció en primer lugar medidas iniciales de temperatura interna, frecuencia cardíaca y movimiento registrando los datos durante un periodo de una semana de cuatro ratones con transceptores implantados en la incubadora mantenidos a temperatura ambiente y perfundidos con aire ambiental. Los datos de referencia demostraron que los ratones tenían un ritmo circadiano con pico de actividad por la noche justo después de que las luces se apagan, y por la mañana temprano justo antes de que las luces se enciendan. La temperatura interna varió de una alta de 37 °C durante sus periodos activos a una baja de 33,5 °C durante sus periodos inactivos. La frecuencia cardíaca varió de 750 lpm (latidos por minuto) durante sus periodos activos a 250 lpm durante sus periodos inactivos. La frecuencia cardíaca se correlaciona probablemente con la temperatura interna (a mayor temp., mayor frecuencia cardíaca). Asimismo, el movimiento motor grueso fue el mayor durante el anochecer y justo antes del amanecer.

[0571] Exposición de los Ratones a atmósferas Reguladas a Temperatura Ambiente. El primer ensayo de la exposición de un ratón a ácido sulfhídrico implicó en primer lugar la colocación del ratón en la cámara de gasificación mantenida a 27 °C en la incubadora durante una hora. Después de la hora, la cámara se perfundió con 80 ppm como se ha descrito en general anteriormente, y la temperatura de la incubadora se redujo a 18 °C durante la duración del experimento. Aunque no se detectó ningún cambio inmediato en la frecuencia cardíaca y el movimiento motor grueso, se observó un descenso dramático en la temperatura interna. El experimento se dejó de desarrollar durante 90 min, tiempo durante el cual la temperatura interna cayó a 28,6 °C, cinco grados por debajo del registro más bajo para cualquiera de los cuatro ratones en el estudio de referencia que se ha descrito anteriormente. Durante la recuperación después de perfundir la cámara con aire ambiental, el inventor apreció que el animal en primer lugar estaba relativamente inmóvil (fácil de capturar); sin embargo, en 60 min recuperó un intervalo normal de temperatura interna y actividad. Un segundo ratón se expuso al mismo protocolo; sin embargo, esta vez la gasificación a 80 ppm se realizó durante 3 h. Durante este tiempo, el inventor apreció que la frecuencia cardíaca cayó significativamente de 600 lpm a 250 lpm, el movimiento motor grueso casi no mostró actividad, y la temperatura interna cayó a 18,6 °C.

[0572] Cambios en la respiración acompañan a la caída de la temperatura interna. La exposición de los ratones a 80 ppm de H₂S da como resultado también una disminución de la tasa metabólica, como se determinó midiendo el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono. Por ejemplo, un ratón que tenía una temperatura interna y una producción de dióxido de carbono medidas simultáneamente, demostró una rápida reducción en la producción de dióxido de carbono que precede a la caída de la temperatura interna del animal (figura 4A). La reducción de aproximadamente tres veces en la producción de dióxido de carbono estableció una nueva medida basal en aproximadamente 5 minutos después de la exposición a H₂S.

[0573] La Tabla 4 muestra los resultados de un experimento con mediciones concurrentes de concentraciones de O₂ y CO₂ de ratones expuestos a aire ambiental que tenían el CO₂ depurado (por lo tanto los valores 0 para controles), con o sin H₂S (80 ppm). Las mediciones se hicieron durante un periodo de 15 minutos, con los ratones en una cámara ambiental cerrada herméticamente de 0,5 l con caudales de 500 cc/min. El consumo de oxígeno se obtiene restando la concentración de oxígeno cuando el ratón está presente, del control cuando el ratón está ausente. Asimismo, la producción de dióxido de carbono se obtiene restando la concentración de dióxido de carbono cuando el ratón está presente, del control cuando el ratón está ausente. CR representa el cociente respiratorio, y es igual a la proporción de dióxido de carbono producido con respecto al oxígeno producido. Este resultado demuestra, una caída de 2-3 veces del consumo de oxígeno en presencia de H₂S, así como una caída de 3-4 veces en la producción de dióxido de carbono. El cambio en el cociente respiratorio refleja una disparidad en el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono por los ratones en presencia o ausencia del H₂S.

Tabla 4 - La exposición a H₂S inhibe la respiración en ratones.

Ratón presente	H ₂ S presente	[O ₂] ppm	[CO ₂] ppm	CR
-	-	207.000	0	
+	-	203.600	2800	
	Consumo, producción	3.400	2800	0,82
-	+	166.200	0	
+	+	164.900	750	
	Consumo, producción	1300	750	0,58

[0574] Los diferentes parámetros de estasis (reducción del consumo de oxígeno, disminución de la producción de dióxido de carbono o descenso de la motilidad) pueden evaluarse mediante una diversidad de ensayos y técnicas. Por ejemplo, probablemente la forma más fácil de medir la inducción de estasis en ratones con administración de H₂S sea a través de la observación de su respiración. De hecho, ésta incluye los tres parámetros en cuanto a que es indicativa del descenso del consumo de oxígeno, la producción de dióxido de carbono y la motilidad. Un ratón normal en aire ambiental en condiciones convencionales respirará aproximadamente 200 veces por minuto. Si se administra H₂S al ratón a 80 ppm, y la temperatura interna se reduce a 15 °C, la respiración se reduce al menos un orden de magnitud de aproximadamente entre 1-10 respiraciones por minuto. De hecho, se observó un ratón en estas condiciones que no respiró durante un periodo de tiempo mayor de una hora, lo que indica que pueden conseguirse niveles profundos de estasis. Por lo tanto, esto representa al menos aproximadamente un descenso de 1-20 veces en la respiración celular (es decir, el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono).

[0575] Exposición de Ratones a atmósferas Reguladas a Temperaturas Ambientes Reducidas. Para comenzar a definir los límites de la capacidad del ácido sulfhídrico para reducir la actividad en ratones, el inventor realizó varios experimentos en los que se usó un ratón sin telemetría seguido de exposición de un ratón que tenía telemetría para adquirir los datos. El primer experimento fue someter a un ratón sin telemetría a una atmósfera regulada de H₂S a 80 ppm en una temperatura de gabinete reducida de 10 °C básicamente como se ha descrito en Materiales y Procedimientos que fueron como anteriormente excepto que el ratón se colocó en la cámara de gasificación durante una hora a 27 °C antes de la exposición al gas y la reducción de la temperatura ambiente. El ratón sin telemetría funcionó bien en este tratamiento, y recuperó actividad en aproximadamente 90 min después de la retirada de la cámara de gasificación. El ratón de telemetría se sometió a las mismas condiciones comportándose también bien, y mostró un descenso de la temperatura interna hasta aproximadamente 12,5 °C. El inventor no pudo determinar con precisión esta temperatura ya que los aparatos electrónicos fallaron a 15,3 °C. Por lo tanto, la caída de temperatura a 12,5 °C es una estimación en base a la inclinación de la caída antes del fallo y el tiempo que el animal permaneció en la cámara después del fallo de los aparatos electrónicos.

[0576] Debido a la limitación del equipo, el inventor ensayó a continuación cada uno de los cuatro ratones de telemetría durante un periodo de 6 h en la cámara de gasificación con una atmósfera regulada que contenía aproximadamente 80 ppm de ácido sulfhídrico o con aire ambiental básicamente como se ha descrito anteriormente. La temperatura de la incubadora se redujo al inicio del experimento (exposición a la atmósfera regulada, o momento

0 para los ratones expuestos a aire ambiental) a una temperatura constante de 15 °C. Al final del periodo de seis horas, los ratones regresaron a una atmósfera de aire ambiental y una temperatura ambiente de 22 °C como se ha descrito en general anteriormente. Hubo un claro descenso de la temperatura corporal interna en los cuatro ratones que fue dependiente del uso de 80 ppm de ácido sulfhídrico (figura 4B). También hubo una caída marcada de la frecuencia cardíaca y el movimiento motor grueso relacionada con el descenso de la temperatura. Los ratones se mantuvieron durante 4 semanas sin ningún cambio aparente en el comportamiento de los animales.

EJEMPLO 5

10 ESTUDIOS MURINOS SOBRE LA REDUCCIÓN DE UNA LESIÓN POR RADIACIÓN

A. Fundamento Científico

[0577] Mientras que los aspectos del modelo de lesión por radiación pueden y se han evaluado en el cultivo celular, para ensayar la capacidad de un fármaco experimental para afectar a la lesión y el proceso de curación requiere la inclusión de cada uno de los sistemas de respuesta que se ven afectados. En este punto en el tiempo, el único modo de conseguir esto es en un animal entero. El inventor propone el uso de ratones que dichos estudios según el modelo más apropiado. Los ratones C57BL/6 se han seleccionado para su estudio porque esta cepa de ratón es fácilmente susceptible a una lesión pulmonar por radiación, se ha establecido el nivel de radiación que se tolera en esta cepa, y el inventor ha descubierto recientemente que el H₂S disminuye la temperatura interna de la cepa de ratón.

[0578] Se planean dos experimentos idénticos bajo este protocolo. Cada experimento investigará la eficacia de la hipotermia inducida por H₂S sobre el desarrollo de una lesión de pulmón inducida por radiación. Se expondrán diez ratones por grupo a una de cuatro condiciones de ensayo (H₂S/17,5 Gy de irradiación torácica, H₂S/sin irradiación torácica, sin H₂S/17,5 Gy de irradiación torácica, o sin H₂S/sin irradiación torácica), después se siguen durante 13 semanas. Se expusieron de forma similar doce animales por grupos y se siguieron durante 26 semanas (el aumento de *n* se requiere para compensar el aumento de mortalidad que se produce tarde en el transcurso de la enfermedad).

[0579] Para estos experimentos, se usará un análisis de varianza (ANOVA) como el modelo estadístico para el análisis de datos. Se usarán un análisis ANOVA de dos factores completamente cruzado o aleatorizado con 4 grupos (ratones irradiados o no irradiados que recibieron H₂S o que no recibieron H₂S) y dos intervalos de tiempo (13 ó 26 semanas) para analizar los cambios temporales en el número de células inflamatorias de lavado broncoalveolar y la concentración de proteínas total y los niveles de hidroxiprolina de pulmón. Asumiendo una potencia del 80%, una significancia al 5% y una prueba bilateral, cinco ratones supervivientes por combinación de un grupo de lesión, grupo de intervención y un punto de tiempo permitirán una diferencia detectable entre las medias de grupo mayores de o igual a 1,7 veces la desviación estándar intra-grupo subyacente. Se espera que la desviación estándar intra-grupo sea igual a aproximadamente el 25%. Por lo tanto, cambios en el número de células inflamatorias o el contenido de colágeno del pulmón del 35-50% de valores de control deben poder discernirse en estos experimentos.

[0580] La exposición a H₂S y la irradiación torácica se realizarán en SLU AHR en una gama de acelerador lineal. El lavado broncoalveolar y la adquisición de pulmón en necropsia se realizaron en la sala de necropsia de ratón AHR. Los recuentos de células de lavado broncoalveolar y las concentraciones de proteínas y las mediciones del contenido de hidroxiprolina de pulmón se realizaron en otro laboratorio (D3-255). Los ratones C57BL/6 de genotipo no manipulado recibieron 17,5 Gy de irradiación torácica. Los ratones se anestesiaron con Avertina intraperitoneal, se colocaron en retenciones de ratón de tejido individuales y se irradiaron a través del acelerador lineal con 8,5 Gy a una velocidad de dosis de 3 Gy/min a través de dos campos laterales colimados para apuntar únicamente al tórax (dosis torácica total de 17,5 Gy).

B. Protocolo

[0581] Anestesia. Los ratones C57BL/6 de genotipo no manipulado se anestesiarán para dosificación intratecal con isoflurano. La intensidad de la anestesia se controlará por la frecuencia respiratoria y la respuesta a la estimulación táctil. Se usará una inyección intraperitoneal de Avertina (0,4-0,7 ml/ratón i.p.) para anestesiar a los animales para el procedimiento de irradiación torácica. La intensidad de la anestesia se controlará por la frecuencia respiratoria y la respuesta a la estimulación táctil.

[0582] Exposición a ácido sulfhídrico. Los ratones se colocarán en una cámara de gasificación cerrada de plexiglás

similar a la que se ha usado previamente para los ratones (IR1606). La cámara tendrá dos puertos (importación y exportación). Un gas que contenía H₂S (80 ppm) equilibrado con aire ambiental se ventilará a través de la cámara a una velocidad de 1 litro por minuto. El gas se ventilará de la habitación usando el sistema de ventilación doméstico con una manguera que se extiende desde la salida de exportación a la salida de escape para la sala.

5

[0583] Administración de agente peligroso. Los ratones se irradiarán mientras que están en la cámara de gasificación con una dosis total de 17,5 Gray usando el acelerador lineal. Esta dosis de radiación inducirá una lesión pulmonar subaguda en los ratones que evoluciona a fibrosis. Los ratones no serán radioactivos o de otro modo supondrán un peligro para el personal u otros animales. No se requiere ningún control especial, contención o

10 desecho debido a la irradiación.

[0584] Eutanasia programada. En aproximadamente las semanas 13 y 26 después de la irradiación torácica, los animales se someterán a eutanasia mediante anestesia profunda (usando 0,4-0,7 ml de avertina i.p.) seguido de desangrado a través de punción en la vena cava inferior. Se realizará un lavado broncoalveolar para determinar el

15 número de células inflamatorias, los recuentos diferenciales y las concentraciones de proteína en el fluido de lavado. Se retirará tejido de pulmón y esófago para su evaluación histológica y el análisis del contenido de colágeno.

[0585] Animales moribundos. La radiación torácica está asociada a una tasa de mortalidad finita en ratones, muriendo el 15% en la semana 10 y el 50% en la semana 22 post-irradiación. Los investigadores controlarán a los

20 animales a diario para observar efectos adversos (2-3 veces por día inicialmente, hasta que parecen estables, entonces una vez al día hasta que la enfermedad comienza a evolucionar, punto en el que el inventor regresa a observaciones múltiples a diario). Si un animal pierde peso, deja de asearse, muestra dificultad respiratoria grave y/o movimiento torpe o significativamente disminuido, se someterá a eutanasia con una sobredosis de avertina. Cuando sea práctico, se realizará para estas eutanasias no programadas un lavado broncoalveolar y una recogida de tejido

25 para histología.

[0586] La irradiación torácica debe producir una lesión de pulmón que por sí misma no es dolorosa pero puede manifestarse (semana 10) por velocidad respiratoria aumentada, pérdida de apetito moderada, pérdida de peso moderada y/o falta de acicalamiento. Los investigadores y el personal de la instalación de los animales supervisarán

30 a los animales a diario para observar dichos efectos adversos. Si el animal no parece estar alimentándose, se le proporcionará alimento blando y soporte fluido. Si se percibe que el animal tiene dolor, se le administrará según sea necesario analgesia con Butorfanol (0,2 mg/kg i.p.) o Buprenorfina (1,0 mg/kg dos veces c.s.). Si un animal parece estar sufriendo y las medidas paliativas no conducen a una mejora, se someterá a eutanasia inmediatamente. Se recogerá tejido de pulmón y esófago para la evaluación histopatológica y el análisis del contenido de colágeno en las

35 necropsias programadas.

[0587] Administración Post-irradiación. Para minimizar el riesgo de transmitir cualquier patógeno al resto de la instalación, y para proteger a estos animales mientras que están algo inmunodeprimidos, todo el trabajo de administración de estos animales se hará en primer lugar cada día (antes de cualquier otro animal en la instalación)

40 y se hará en una cabina de bioseguridad. Para minimizar el riesgo de infecciones adventicias, los ratones tendrán jaulas y lechos esterilizados en autoclave. Además, se alimentarán con alimento para roedores convencional que se ha irradiado para eliminar los patógenos.

[0588] Los ratones C57BL/6 de genotipo no manipulado recibieron 17,5 Gy de irradiación torácica. Los ratones se

45 anestesiaron con Avertina intraperitoneal, se colocaron en retenciones de ratón de tejido individuales y se trasladaron hasta una cámara de gasificación de plexiglás cerrada similar a la que se ha usado previamente para los ratones (IR1606). La cámara tendrá dos puertos (importación y exportación). Un gas que contenía H₂S (80 ppm) equilibrado con aire ambiental se ventilará a través de la cámara a una velocidad de 1 litro por minuto. El gas se ventilará de la habitación usando el sistema de ventilación doméstico con una manguera que se extiende desde la

50 salida de exportación a la salida de escape para la sala. Una vez en la cámara de gasificación, los ratones se irradiarán a través del acelerador lineal con 8,5 Gy a una velocidad de dosis de 3 Gy/min a través de dos campos laterales colimados para apuntar únicamente al tórax (dosis torácica total de 17,5 Gy). Después de la finalización de la irradiación torácica, los animales se devolverán a sus jaulas micro-aisladoras controladas hasta que se recuperan de la anestesia.

55

[0589] Necropsias programadas. Un conjunto de animales se necropsió en la semana 13 post-irradiación para evaluar la fase inflamatoria de la lesión. El segundo conjunto se sometió a eutanasia en la semana 26 para evaluar la fase fibrótica de la lesión. Los animales se anestesiarán con avertina y después se desangrarán. Los pulmones se

lavarán con 1000 µl de PBS y el fluido de lavado se mantendrá sobre hielo durante los recuentos de células total y

diferencial. Después, el pulmón derecho se cosechará para evaluar el contenido de hidroxiprolina y el pulmón izquierdo se infundirá con NBF al 10% a 25-30 cm de presión a través de la tráquea. El esófago, la tráquea, el pulmón izquierdo y el corazón se sumergirán en NBF al 10% y se pondrán en el laboratorio de recursos compartidos de histología de FHCRC para la evaluación de procesamiento y patología.

5

[0590] La irradiación torácica debe producir una lesión de pulmón que por sí misma no es dolorosa pero puede manifestarse (semana 10) por un aumento de la frecuencia respiratoria, una pérdida moderada del apetito, pérdida moderada de peso y/o falta de aseo. Los investigadores y el personal de la instalación de los animales supervisarán a los animales a diario para observar dichos efectos adversos. Si el animal no parece estar alimentándose, se le proporcionará alimento blando y soporte fluido. Si se percibe que el animal tiene dolor, se le administrará según sea necesario analgesia con Butorfanol (0,2 mg/kg i.p.) o Buprenorfina (1,0 mg/kg dos veces al día c.s.). Si un animal parece estar sufriendo y las medidas paliativas no conducen a una mejora, se someterá a eutanasia inmediatamente por asfixia con CO₂.

[0591] Los problemas principales serán probablemente la esofagitis (dando como resultado un descenso de la ingesta de alimento y agua) e insuficiencia respiratoria (reducción de la captación de oxígeno). El inventor comprobará estos animales 2-3 veces por día hasta que se convenza de que están estables y bien, punto en el que el inventor puede reducir la frecuencia de las comprobaciones a una vez al día, hasta que la enfermedad comience a evolucionar, punto en el cual vuelve a hacer múltiples comprobaciones diarias. Se proporcionarán cuidados de apoyo de varias formas. Si un animal no come ni bebe bien (evidenciado por pérdida de peso y problemas de acicalamiento), el inventor proporcionará alimento blando e intentará una suplementación fluida (solución de Ringer lactada, 1-2 ml/ratón, sc usando una aguja de calibre pequeño (>20 G), 1-2 veces al día). Si se percibe que el animal tiene dolor, se le administrará analgesia con Butorfanol (0,2 mg/kg i.p.) o Buprenorfina (1,0 mg/kg dos veces al día c.s.) según sea necesario. Si un animal parece estar sufriendo y las medidas paliativas no conducen a una mejora, se someterá a eutanasia inmediatamente por asfixia con CO₂. En el caso de que un animal experimente un dolor significativo o distrés en el momento de la irradiación torácica, el animal se someterá a eutanasia por asfixia con CO₂.

[0592] Un tercer experimento era someter un ratón de telemetría a una atmósfera regulada de H₂S a 80 ppm en una temperatura de cabina reducida de 10,5 °C básicamente como se ha descrito anteriormente. Durante el experimento, el ratón se observó visualmente y se registraron sus movimientos mediante una cámara web, y las mediciones de telemetría se registraron como se ha descrito anteriormente. El ratón se expuso a una atmósfera regulada de 80 ppm de H₂S, y la temperatura de la cabina se redujo a una constante de 10,5 °C. Al final de un periodo de aproximadamente seis horas, se aplicó calor a la cabina ajustando la temperatura de cabina a 25 °C. Se dejó que el ratón se calentara en la atmósfera regulada de H₂S hasta que la temperatura interna del ratón estuvo entre 17 °C y 18 °C, tiempo después del cual la atmósfera regulada se reemplazó por aire ambiental. Hubo un claro descenso en la temperatura corporal interna del ratón a 10,5 °C en la atmósfera regulada acompañado por una caída marcada del movimiento motor grueso. La velocidad de respiración cayó a una velocidad indetectable mediante observación visual durante aproximadamente una hora y quince minutos. Después de calentar la cabina, se observó una respiración débil cuando la temperatura corporal interna del ratón alcanzó 14 °C. Durante la fase de calentamiento, cuando la temperatura corporal interna se elevó a entre 17 °C y 18 °C, y el ratón mostró respiración y movimiento, la atmósfera regulada se reemplazó por aire ambiental. Un movimiento y respiración normales fueron completamente evidentes cuando la temperatura corporal interna regresó a 25 °C. El ratón no mostraba ningún cambio aparente en el comportamiento en comparación con los animales que estaban sin tratar.

45

EJEMPLO 6:

ESTUDIOS DE CÉLULAS Y MAMÍFEROS

50 A. Estudios Caninos

[0593] Los estudios caninos se realizarán con perros implantados quirúrgicamente con dispositivos de telemetría para controlar su temperatura corporal interna. Los animales se estudiarán en presencia o ausencia de una dosis subletal de ácido sulfhídrico durante 10 h. Durante este tiempo, se controlan continuamente para observar signos vitales por telemetría. La temperatura del entorno también se reducirá a 15 °C durante 30 min para determinar si tiene algún efecto sobre la temperatura corporal interna de los animales.

[0594] El procedimiento se realizará con 2 grupos de 2 perros (cuatro en total). Debido al coste del equipo de telemetría, el inventor no hará estos experimentos en sucesión. Si los resultados del primer grupo indican que la

hipótesis es correcta, el estudio se repetirá con el segundo grupo de dos perros. Si los resultados del segundo grupo no sostienen la hipótesis, el proyecto se interrumpirá.

[0595] Los estudios toxicológicos demuestran que, mientras que el nivel de H₂S está por encima del límite OSHA para seres humanos (10 ppm), se ha demostrado previamente que la exposición tanto de ratas como de ratones a 80 ppm de H₂S durante 6 h por día, 5 días por semana, durante 90 días, no mostró ningún efecto adverso observado. Esto incluía tanto un examen general como histopatológico del intestino, pulmón, corazón, hígado, riñones u otros órganos realizando al final del tratamiento. Para el conocimiento del inventor, no hay disponible ninguna información con respecto a la exposición de perros a ácido sulfhídrico.

[0596] Un aspecto crítico al trabajar con H₂S es no exceder la dosis (80 ppm) descrita por otros que han publicado estudios sobre roedores expuestos a ácido sulfhídrico y no observaron efectos perjudiciales. Existe una considerable experiencia en la ciencia de gas disponible, y el inventor es capaz de administrar el gas a los ratones en la dosis prescrita. Se toman muchas precauciones para asegurar que tanto los animales como los investigadores no resultan dañados. Estas precauciones incluyen un control constante de la mezcla de gas con una alarma establecida en los límites OSHA y una sensibilidad a 1 ppm, y una diversidad de equipo que es capaz de mezclar y administrar el gas de acuerdo con las especificaciones sin escapes en o fuera del sistema.

[0597] Se proporciona una línea temporal para el protocolo en la Tabla 5.

Tabla 5 - Línea Temporal del Estudio

Día	Actividad	Detalle
-1	Pre-cirugía	Se realizará una CBC/Química; el perro se dejó en ayunas en p.m., pero tuvo acceso libre a agua.
0	Cirugía	Parque transdérmico de fentanilo colocado p.m. del día antes a la cirugía para analgesia preventiva. Colocación preoperatoria de catéter cefálico; premedicación con Acepromazina, Buprenorfina, Glicopirrolato; inducción con Ketamine:Diazepam o Propofol para permitir la intubación; anestesia de mantenimiento por isoflurano y oxígeno. El perro se colocó en decúbito dorsal y el abdomen se cortó/preparó y se cubrió. Se realizará la monitorización del pulso, frecuencia respiratoria, dióxido de carbono espiratorio final, porcentaje inhalado de agente anestésico, SpO ₂ y se registran cada 15 minutos o más frecuentemente. Se producirá soporte fluido durante y después de la cirugía. Una vez que el perro está estable y preparado de forma apropiada para el procedimiento, se realizará una laparotomía mediana ventral, comenzando caudal al ombligo y extendiéndose 5-10 cm caudalmente. Se colocará un transmisor estéril en la cavidad peritoneal. La colocación se comprobará para asegurar que el transmisor es capaz de moverse libremente; el momentum se reemplazará, y se realizará el cierre de la cavidad peritoneal en 3 capas. El perro se monitorizará hasta que se extube, sea capaz de termorregularse y se recueste esternalmente. Se realizará una monitorización a diario del sitio de incisión del perro, el abdomen (a través de palpación y ultrasonido, si está indicado), el apetito, la temperatura (durante los primeros 3-5 tras la operación), el peso y la actividad.
7	Establecimiento de Líneas Basales	Esta fecha es flexible. Sólo se procederá con esta etapa con aprobación. Se colocarán cuatro animales sobre el equipo receptor (esto no implica la retirada de los animales de sus jaulas y se producirá en AHR) y se establecerán líneas basales para los signos vitales para los cuatro animales.
8	Exposición a H ₂ S	Los animales se transferirán a una sala a determinar, donde se colocarán en una jaula con alimento y agua que tiene una atmósfera cerrada. Después del establecimiento de líneas basales, dos de los cuatro animales se someterán a H ₂ S a una concentración de 80 ppm. Tras una exposición de diez horas, la atmósfera regresó a una temperatura ambiente y los animales se devolvieron a sus jaulas. La exposición a H ₂ S se repetirá una vez por semana para comenzar a determinar si puede reproducirse cualquier conjunto de datos.

B. Plaquetas Humanas

[0598] Para probar el concepto de que el uso de inhibidores de la fosforilación oxidativa puede usarse para beneficio humano, el inventor indujo un estado de animación suspendida en tejidos humanos para protegerlos de una exposición letal a oxígeno. En experimentos piloto, el inventor colocó piel humana en un entorno de CO al

100%. El inventor observa que después de 24 horas, las células de la piel sobreviven 100 veces mejor en CO que las que están en aire ambiental. Estos resultados son muy excitantes; proporcionan la prueba de que los inhibidores de la fosforilación oxidativa pueden ser eficaces los tejidos humanos.

5 **[0599]** Otro conjunto de experimentos demuestra los efectos protectores de la animación suspendida inducida sobre las plaquetas. Una unidad de plaquetas se dividió por la mitad. La primera mitad se mantuvo en condiciones de almacenamiento convencionales, lo que implica mantener las plaquetas a temperatura ambiente (22-25 °C) con agitación constante. La otra mitad se puso en el interior de un entorno anóxico (<10 ppm de oxígeno) usando procedimientos convencionales para eliminar el oxígeno. Los dos conjuntos de plaquetas se compararon los días 0,
10 5 y 8. Las plaquetas mantenidas en condiciones anóxicas tuvieron un rendimiento tan bueno o mejor que las mantenidas en condiciones convencionales sobre un panel de cinco pruebas *in vitro* diferentes, incluyendo la capacidad de agregación, morfología celular, tinción con Annexin-V (fosfatidil-serina volteando a la membrana externa como un marcador apoptótico temprano), y así sucesivamente. Esto indica que el control de la actividad metabólica, específicamente la fosforilación oxidativa, puede realizarse por la retirada de oxígeno y tiene un efecto
15 protector sobre la función celular durante periodos prolongados de estasis.

[0600] El ácido sulfhídrico es capaz de unir la citocromo C oxidasa, así como CO, y detener la fosforilación oxidativa a petición. Es tan potente el impedimento de la fosforilación oxidativa, que una persona que tome una única respiración en una atmósfera con ácido sulfhídrico al 0,1%, no tomará otra. En su lugar, caen inmediatamente al suelo, un evento comúnmente denominado en entornos industriales como "fulminante". También parece ser reversible ya que, si se retiran rápidamente a tomar aire fresco (y sin heridas de la caída), estos individuos a veces se reaniman y siguen viviendo sin problemas neurológicos. Aquí es un agente que no es únicamente común en nuestro mundo, de hecho, se produce incluso en nuestras propias células, pero también es un potente inhibidor reversible de la fosforilación oxidativa que no afecta a la administración de oxígeno.

25 C. Estudios Murinos

[0601] Inducción de un Estado Tipo Hibernación Usando H₂S. Los animales homeotérmicos, por definición, mantienen una temperatura corporal interna de 10-30 °C por encima de la temperatura ambiente. Para que estos
30 animales hagan esto, deben generar calor a partir de la energía producida por fosforilación oxidativa. El complejo enzimático terminal en la fosforilación oxidativa es la citocromo C oxidasa. Puesto que el ácido sulfhídrico inhibe este complejo (Petersen, 1977; Khan y col., 1990), el inventor predice que la exposición de un animal homeotérmico a ácido sulfhídrico impedirá que tal animal mantenga su temperatura corporal interna muy por encima de las temperaturas ambiente.

[0602] Para probar esta hipótesis, el inventor quiere monitorizar continuamente tanto la temperatura corporal interna como los niveles de actividad de un animal homeotérmico (un ratón). Los dispositivos telemétricos, implantados en los peritoneos de los ratones, pueden hacer ambas cosas y tienen la ventaja de de no introducir desviaciones en las lecturas debido al manejo de los ratones (Briese, 1998). Adicionalmente, pueden monitorizar a
40 distancia los ratones durante la exposición al gas ácido sulfhídrico. Se ha demostrado previamente que una dosis de 80 partes por millón (ppm) de ácido sulfhídrico es inocua para los ratones durante exposiciones que duran hasta diez semanas (CUT 1983; Hays, 1972). Por lo tanto, para estos experimentos, el inventor usó una dosis de 80 ppm de ácido sulfhídrico para probar la hipótesis. La creación de una atmósfera que contenía 80 ppm de ácido sulfhídrico no es trivial. Con el tiempo, en presencia de oxígeno, el ácido sulfhídrico se oxidará para dar sulfato. Por este motivo,
45 para que el inventor exponga continuamente un ratón a una atmósfera que contiene 80 ppm de ácido sulfhídrico, el inventor mezcla constantemente aire ambiental con depósito de 500 ppm de nitrógeno equilibrado con ácido sulfhídrico.

50 Caracterización del Control de la Temperatura Interna

[0603] La exposición de un ratón a 80 ppm de H₂S redujo su temperatura interna a aproximadamente dos grados Celsius por encima de la temperatura ambiente (figura 5). Este efecto se pudo reproducir altamente como la temperatura corporal interna media de siete ratones expuestos a 80 ppm de ácido sulfhídrico durante 6 h seguido de un patrón similar (figura 5). La average temperatura corporal interna media menor de estos siete ratones fue 15 °C
55 en una temperatura ambiente de 13 °C. Todos estos ratones se recuperaron con éxito después de calentarse de nuevo cuando la atmósfera se cambió a una que contenía únicamente aire ambiental. Como control, el inventor sustituyó nitrógeno por el ácido sulfhídrico y no observó la caída sustancial de la temperatura corporal interna.

[0604] Aunque estos ratones parecen suficientemente normales a pesar del descenso temporal tanto de la

temperatura corporal interna como de la velocidad de respiración, el inventor realizó una batería de pruebas de comportamiento para excluir la posibilidad de un daño neurológico por la exposición a gas ácido sulfhídrico, la reducción extrema de la temperatura corporal interna, la reducción de la frecuencia respiratoria, o la combinación de estos efectos. Cada una de estas pruebas se realizó sobre los ratones tanto antes como después de la exposición a

- 5 ácido sulfhídrico. Estas pruebas de comportamiento se seleccionaron entre el protocolo SHIRPA desarrollado por el consorcio Mouse Models for Human Disease (Rogers y col., 1997). No hubo ninguna diferencia detectable del comportamiento en los ratones después de la exposición al gas. A partir de esto, el inventor concluyó que la entrada en un estado tipo hibernación no es perjudicial.
- 10 **[0605] Optimización Preliminar de la Dosis de H_2S .** Los experimentos anteriores describen el efecto de 80 ppm de ácido sulfhídrico sobre la temperatura corporal interna de un ratón. Con el fin de determinar la concentración de ácido sulfhídrico suficiente para la pérdida de la termorregulación, el inventor expuso los ratones a un intervalo de
- 15 concentraciones de ácido sulfhídrico (20 ppm, 40 ppm, 60 ppm y 80 ppm), (figura 6). Aunque fueron suficientes 20 ppm y 40 ppm de ácido sulfhídrico para provocar una caída de la temperatura corporal interna de un ratón, ésta fue menor en comparación con la caída observada con 60 ppm y 80 ppm de ácido sulfhídrico. A partir de este experimento, el inventor concluyó que la pérdida de termogénesis depende directamente de la concentración de ácido sulfhídrico dada a los ratones. Este estudio preliminar sobre el intervalo de dosis y la farmacocinética del ácido sulfhídrico hace hincapié en la necesidad de un análisis más extenso.
- 20 **[0606] Definición Preliminar de Límite de Temperatura Interna Baja.** El inventor también tiene interés en establecer un entendimiento más completo de la tolerancia tanto del intervalo de temperaturas corporales internas como de la duración de tiempo permitida en este estado para los ratones. Los experimentos anteriores han mostrado que el inventor puede reducir repetidamente la temperatura corporal interna de un ratón a 13-15 °C a petición. Además, los ratones parecen tolerar el tratamiento durante muchas horas. Usando el mismo protocolo, reduciendo al mismo
- 25 tiempo la temperatura ambiente, el inventor ha llevado con éxito la temperatura corporal interna de un ratón a 10,7 °C (figura 7). En el futuro se realizarán intentos adicionales para impulsar temperaturas corporales internas incluso menores, y durante mayores periodos de tiempo. Aunque de forma preliminar, estos resultados demuestran que existe un intervalo significativo de temperaturas corporales internas permitidas por la biología del ratón y que este intervalo puede explorarse a través de la pérdida de la termorregulación debido a la exposición a ácido sulfhídrico.
- 30 **[0607] Modulación de Niveles Endógenos de H_2S .** Se conoce bien que las células de mamíferos hacen ácido sulfhídrico de forma endógena (Wang 2002). Ya que este producto químico se produce de forma dinámica en la célula, es crucial entender los niveles basales en diferentes condiciones, ya que esto puede afectar dramáticamente a la farmacocinética del ácido sulfhídrico administrado de forma exógena. Para abordar este aspecto esencial de la
- 35 investigación, el inventor ha comenzado a ensayar niveles de ácido sulfhídrico endógeno en el ratón. El inventor usa una técnica de alquilación extractiva acoplada con cromatografía de gases y detección específica de masas para cuantificar ácido sulfhídrico (Hyspler y col., 2002). Usando este procedimiento, el inventor consideró los niveles de ácido sulfhídrico en ratones sin alteraciones. La figura 8A muestra que existe una cantidad significativa de ácido sulfhídrico en el ratón. Adicionalmente, los niveles de ácido sulfhídrico parecen depender de la temperatura ambiente del ratón. Específicamente, cuando los ratones están en frío, tienen niveles de sulfuro endógeno reducidos
- 40 y, cuando están a temperaturas ambiente calientes, tienen niveles de sulfuro endógeno aumentados. A partir de esto, el inventor concluye que los ratones regulan sus niveles de sulfuro en respuesta a la temperatura ambiente.
- [0608] Cambios en los Niveles Endógenos Afectan a la Eficacia de H_2S .** Puesto que la temperatura ambiente cambia los niveles endógenos del sulfuro en ratones, los inventores plantearon la hipótesis de que la temperatura ambiente puede tener un impacto en los cambios de la temperatura corporal interna tras la exposición a ácido sulfhídrico exógeno. La aclimatación de un ratón a temperaturas frías, -12 °C, crea una meseta de larga duración que el inventor observa después de la caída inicial de la temperatura corporal interna (figura 8B). Por lo tanto,
- 50 parece que esta aclimatación al frío hizo al ratón más resistente al enfriamiento corporal interno por la acción del gas ácido sulfhídrico. Sin embargo, permitiendo que el ratón se aclimato a una temperatura termoneutra caliente antes de la exposición al gas elimina esta meseta. De hecho, el ratón normotérmico se enfrió mucho más rápido cuando se expuso a ácido sulfhídrico que el ratón aclimatado al frío (figura 8B). Estos datos sugieren que los niveles endógenos de ácido sulfhídrico en el ratón tienen un impacto directo en la eficacia del ácido sulfhídrico exógeno.
- 55 **[0609] H_2S protege a los ratones contra hipoxia.** El aire ambiental normal contiene oxígeno aproximadamente al 21%. En un experimento preliminar que explora los efectos protectores de la estasis en la hipoxia en el modelo de ratón, un ratón expuesto a 80 ppm de ácido sulfhídrico sobrevivió 11 minutos con oxígeno al 5,2% y 3 semanas más tarde, aún estaba bien. El trabajo que se ha publicado previamente muestra que el 90% de estos animales (C57B1) expuestos de este modo sin ácido sulfhídrico no sobreviven (Zhang y col., 2004). Este experimento implicó el pre-

equilibrado del el ratón a 80 ppm de H₂S durante 3 horas, después una caída de la tensión de oxígeno en la cámara como se ha descrito en los experimentos anteriores. Se usaron los mismos caudales como se ha descrito anteriormente (es decir, 500 cc/ml en una cámara de 0,5 l). Está bien establecido en aquellos familiarizados con el campo que si un grupo de ratones se expone a oxígeno al 4%, el 100% morirán en 15 minutos. Sin embargo, los ratones a los que se les administra H₂S durante periodos en los que la tensión de oxígeno se reduce al 4%, permanecen viables, incluso durante periodos prolongados (hasta una hora) en estas condiciones hipóxicas. Los ratones parecen no verse afectados por estas condiciones después de la recuperación, y son viables y responden con normalidad cuando se comprueba 24 horas más tarde. Este experimento difiere del anterior en que los ratones se mantuvieron en el H₂S al final de la exposición hipóxica hasta que las tensiones de oxígeno regresaron a niveles normales (O₂ al 21%).

EJEMPLO 7

ESTUDIOS ANIMALES ADICIONALES

A. Protección de Condiciones Adversas

[0610] Se realizaron experimentos para ensayar la capacidad de un ratón en un estado "tipo hibernación" para sobrevivir en condiciones en las que normalmente moriría. La condición adversa fue hipoxia, en la que la bibliografía indica que los ratones (machos C57BL6/J) pueden vivir durante un máximo de 20 minutos en oxígeno al 5%. (Zhang y col. 2004).

[0611] Como se muestra en la Tabla 6, el experimento implicó la exposición del ratón a 80 ppm (a menos que se indique otra cosa) de H₂S durante el tiempo indicado seguido del descenso de la tensión de oxígeno en la cámara, aún bajo H₂S. La exposición hipóxica se cronometró (indicado a continuación) y la viabilidad de los ratones se determinó.

[0612] Una exposición corta de los ratones a H₂S (al menos a 80 ppm) tuvo menos éxito en la protección del ratón contra hipoxia, aunque hubo al menos uno que sobrevivió a una exposición hipóxica de 50 minutos después de justo 8 minutos en H₂S. Además, se observó que un ratón expuesto a 90 ppm de H₂S durante justo 10 minutos sobrevivió mucho más tiempo en la condición de oxígeno al 5%, aunque eventualmente murió.

[0613] La exposición de los ratones a 80 ppm de H₂S durante mayores periodos de tiempo tuvo un fuerte efecto sobre su protección contra hipoxia durante hasta una hora.

TABLA 6

Temperatura Ambiente	Tiempo en H ₂ S Antes de la Exposición Hipóxica	% de Oxígeno	Tiempo en Hipoxia	Resultado
20 °C	5 h	5,20%	11 minutos	vivo
20 °C	5.5 h	5,00%	25 minutos	vivo
20 °C	5 h	5,00%	60 minutos	vivo
20 °C	5 h	4%	28 minutos	vivo
24 °C	sin H ₂ S	5%	14 minutos	muerto
24 °C	simultánea	5,10%	10 minutos	muerto
24 °C	8 minutos	5%	20 minutos	muerto
24 °C	8 minutos	4,00%	8 minutos	muerto
24 °C	8 minutos	4,50%	23 minutos	muerto
30 °C	8 minutos	4,50%	6 minutos	muerto
24 °C	10 minutos (90 ppm)	5%	56 minutos	muerto
24 °C	8 minutos	5,00%	50 minutos	vivo

B. Mejora de la Tolerancia a Anoxia

1. Antecedentes

[0614] Se investigó el uso de dióxido de carbono (CO₂) y ácido sulfhídrico (H₂S) para mejorar la supervivencia de un metazoario complejo, *Drosophila melanogaster*, en anoxia. Estos experimentos indicaron que estos agentes, especialmente H₂S, pueden aumentar la tolerancia a anoxia de la *D. melanogaster* adulta.

[0615] Los embriones de *C. elegans* sobreviven en anoxia (<10 ppm de O₂) entrando en animación suspendida, y el desarrollo puede continuar en O₂ al 0,5%. Sin embargo, existe un intervalo de 10 veces (O₂ al 0,01-0,1%) de concentraciones de oxígeno letales. Además, impedir la utilización de oxígeno con monóxido de carbono puede evitar un daño hipóxico en los embriones. Por lo tanto, si no existe suficiente oxígeno disponible para una actividad biológica eficiente, entonces es mejor no tener (ni usar) nada de oxígeno.

[0616] En metazoarios más complejos, la concentración de oxígeno celular no es necesariamente la misma que los niveles de oxígeno ambientales. En *C. elegans*, el oxígeno se suministra al tejido por difusión. Sin embargo, en organismos mayores, existen proteínas que se unen al oxígeno para transportarlo a los tejidos, tales como la hemoglobina. Por lo tanto, cuando los niveles de oxígeno ambiental caen, puede haber oxígeno residual en las células.

[0617] La mayor parte de los organismos no pueden sobrevivir a la exposición a anoxia ambiental. Una posibilidad es que el oxígeno residual a nivel celular es tóxico, lo que corresponde al intervalo de oxígeno letal observado en embriones de *C. elegans*. En este escenario, la supervivencia de la anoxia se mejorará si el oxígeno residual se eliminó o se hizo inutilizable. El CO₂ promueve la liberación de O₂ de la hemoglobina y el H₂S es un potente inhibidor de la fosforilación oxidativa.

20 **2. Materiales y Procedimientos**

[0618] Configuración experimental básica. Se introdujeron moscas adultas en tubos de 35 ml hechos de vidrio con un tapón de caucho hermético a gas (tubos Balsh). Esto se realizó normalmente anestesiando moscas con CO₂, moviendo grupos de moscas a viales con alimento para la recuperación durante al menos 2 horas, y después transfiriéndolas al tubo Balsh. Para intercambiar el entorno gaseoso en el tubo Balsh, se insertaron dos agujas de calibre 18 en el tapón de caucho, y el gas se introdujo en una de las agujas a 100 ml/min. Para impedir la desecación, los gases se humidificaron mediante burbujeo en 10 ml de agua antes de pasar a través del tubo Balsh. El agua en el burbujeador se equilibra con el gas durante al menos 20 minutos antes de iniciar el experimento.

[0619] Para experimentos de "flujo interrumpido", el intercambio de gas continuó durante 60 minutos antes de sellar el tubo. Para experimentos de "flujo bajo", el flujo de gas continuó a lo largo del experimento. El CO₂ era de la fuente doméstica (100%), y se establecieron entornos anóxicos lavando el aire ambiental con nitrógeno al 100% (N₂). Se tuvo cuidado para impedir la introducción de aire ambiental en el sistema al intercambiar la atmósfera de CO₂ a N₂.

[0620] Después del tratamiento anóxico, el oxígeno se introdujo de nuevo en el tubo Balsh mediante lavado abundante con aire ambiental durante 20 minutos. Después, el tapón de caucho se retiró y el vial de alimento se invirtió sobre la parte superior de los tubos Balsh con Parafilm. Las muestras se clasificaron como vivas si reinician el movimiento. La viabilidad se clasificó al menos 18 horas después del fin del tratamiento anóxico. Después de dos semanas, si los viales de alimento contenían larvas y/o pupas, se consideró que las moscas eran fértiles.

3. Resultados

[0621] Tratamiento con CO₂ antes de una exposición anóxica. Las moscas adultas mostraron una tasa mayor de supervivencia anóxica si se pretratan en primer lugar con CO₂. Después de una exposición anóxica de 19 h en un experimento de flujo interrumpido, las moscas adultas pretratadas con CO₂ durante 30 ó 90 minutos mostraron una supervivencia del 54% o del 28%, respectivamente. No se observó supervivencia en los controles expuestos a anoxia sin pretratamiento con CO₂ o CO₂ sin una exposición anóxica posterior. Además, ninguna mosca sobrevivió a la exposición anóxica con pretratamiento de CO₂ si se expusieron también a CO₂ inmediatamente después de la exposición anóxica durante 20 minutos.

[0622] Una corta exposición a CO₂ fue suficiente para mejorar la supervivencia de la anoxia. En experimentos de flujo interrumpido con 22 h de exposición anóxica, la fracción de moscas que sobrevive fue la mayor si el CO₂ se administró durante 0,5-5 minutos antes del intercambio a la atmósfera de nitrógeno (figura 16). Por lo tanto, para experimentos posteriores, el protocolo convencional fue un tratamiento con CO₂ durante 10 minutos antes de la exposición anóxica. En un experimento de flujo bajo usando este protocolo, el 6% de moscas adultas sobrevivieron a 20 h de exposición anóxica, y esta supervivencia requirió el pretratamiento con CO₂.

- [0623]** Los experimentos sugirieron que es importante impedir la reintroducción de O₂ entre el tratamiento con CO₂ y establecer el entorno de N₂. Cuando el agua en el burbujeador usado para humidificar el aire no se equilibró con N₂ antes de aclarar el CO₂, no sobrevivió ninguna mosca a una exposición anóxica de 13 h en estos experimentos, si el N₂ se introdujo a 10, 50 ó 100 ml/min. En estas condiciones, la atmósfera de CO₂ se lavó con una mezcla de N₂/O₂ resultante del O₂ disuelto en el agua.
- [0624]** Se realizaron una serie de experimentos de flujo bajo para determinar el tiempo de exposición anóxica que puede tolerarse con una exposición de CO₂ en comparación con ningún pretratamiento, ensayando cada condición por duplicado (figura 17). En estos datos, la tendencia es que el pretratamiento con CO₂ da como resultado una mayor supervivencia. Una salvedad importante es que estos experimentos se desviaron del protocolo convencional en que las moscas se anestesiaran con CO₂ y se transfirieron a los tubos Balsh y se dejó que se recuperasen durante sólo 10-20 minutos antes de iniciar el tratamiento con CO₂ (excepto para el Ensayo 2 del espacio de tiempo de 18 h).
- [0625]** Se realizaron varios experimentos diferentes que no daban información a si el pretratamiento con CO₂ era beneficioso. Por ejemplo, en un experimento no se observó supervivencia después de 17, 22 y 24 h de anoxia en un experimento de flujo bajo con un periodo de pretratamiento de 10 min con CO₂. Sin embargo, en otros experimentos, muchas moscas sobrevivieron después de 17 h. Esto puede indicar que en ciertos casos otros factores afectan al resultado, tal como la edad de los adultos, los ritmos circadianos o las variaciones en la temperatura ambiente. En otro experimento para comparar la configuración de flujo interrumpido con respecto a la configuración de flujo bajo, no sobrevivió ninguna mosca a una exposición anóxica de 17 o 19,5 h; sin embargo, en este caso, una contaminación por moho puede haber contribuido a extinción de las moscas.
- [0626]** Tratamiento con H₂S antes de la exposición anóxica. La inclusión de H₂S en el protocolo de pretratamiento mejoró más dramáticamente la capacidad de las moscas adultas para sobrevivir a anoxia. En una serie de experimentos análogos a los mostrados en la figura 17, la adición de 50 ppm de H₂S al pretratamiento con CO₂ (H₂S/CO₂) aumento la fracción de moscas que sobrevivieron al tratamiento (figura 18). Estas moscas parecen sanas y producen descendencia después de la exposición. Sin embargo, en un experimento similar no sobrevivió ninguna mosca a 18, 20, 25 ó 30 h en anoxia después de 10 minutos en H₂S/CO₂. La causa de esta discrepancia no está clara. Coherente con una influencia beneficiosa del tratamiento con H₂S, después de una exposición anóxica de 15 h el 50% de las moscas pretratadas con H₂S sobrevivieron, mientras que no hubo recuperación de las moscas de control que no se expusieron a H₂S. En este experimento, las moscas se trataron con CO₂ durante 10 min, después con H₂S/CO₂ durante 10 min, después con N₂/H₂S durante 10 min, y finalmente con N₂ durante la duración del experimento de flujo bajo.
- [0627]** No se requiere tratamiento con CO₂ para el aumento dependiente de H₂S de la supervivencia de la anoxia. El 25% de las moscas tratadas con 50 ppm de H₂S en aire ambiental antes de hacerse anóxico durante 18,5 h sobrevivieron. La fracción de moscas que sobrevivieron no se vio afectada cuando se añadió una exposición de 10 min a H₂S/CO₂ antes de establecer el entorno anóxico. En un experimento de control en el que las moscas se trataron únicamente con CO durante 10 min antes de la exposición anóxica, únicamente el 11% de las moscas se recuperó.
- [0628]** El momento en el que se administra H₂S parece importante para mejorar la supervivencia anóxica. Si está presente H₂S a lo largo de toda la exposición anóxica (20 h) no se recupera ninguna mosca, si estuvo o no presente H₂S durante el pretratamiento con CO₂. Sin embargo, el 35% de moscas sobreviven si 50 ppm de H₂S están presentes en el pretratamiento con CO₂, y después se eliminan según se establece el entorno anóxico. En experimentos paralelos, el 6% de las moscas expuestas a anoxia después de 10 min de pretratamiento con CO₂ (sin H₂S) sobrevivieron.
- [0629]** Experimentos preliminares con larvas y embriones. La supervivencia mejorada de la anoxia después del tratamiento con CO y CO con HS también se observa en embriones y larvas. Después de la exposición a anoxia durante 24 h, se formaron 7 pupas a partir de una agrupación de embriones de 0-19 h de edad. Sin embargo, se observaron 20 pupas de una agrupación emparejada que se pretrató con CO₂ durante 10 min. De forma análoga, las larvas expuestas a anoxia durante 24,5 h pueden reiniciar el movimiento tras la reoxigenación únicamente si se pretrataron con CO₂ o H₂S/CO₂. Los embriones de 0-24 h de edad sobreviven a una exposición anóxica de 18,5 h y se desarrollan hasta la edad adulta si se pretrataron con CO₂ o H₂S/CO₂.
- [0630]** Tratamiento frío durante la anoxia. El descenso de la temperatura ambiental puede prolongar la longitud de tiempo que las moscas adultas pueden sobrevivir a una exposición anóxica. A temperatura ambiente, no sobrevivió

ninguna mosca a una exposición anóxica de 15,5 h en una configuración de flujo interrumpido, pero el 20% de las mantenidas a 4 °C mientras tanto anóxicas se recuperaron. De forma análoga, ninguna mosca sobrevivió a la transición a anoxia a 4 °C, y después se pusieron a temperatura ambiente durante 16,5 h. Sin embargo, después de 16,5 e incluso 40 h, las moscas que se mantuvieron a 4 °C durante toda la exposición se recuperaron y eran fértiles.

- 5 El pretratamiento con CO₂ antes de establecer un entorno anóxico no tuvo una diferencia notable en estos experimentos.

EJEMPLO 8:

10 CAÍDA DE LA TEMPERATURA CORPORAL INTERNA

[0631] Tanto en ratas como en ratones, se mostró que usando H₂S y CO₂, la producción metabólica puede reducirse, mostrado como una temperatura corporal interna reducida. Las figuras 20A-B muestran que en el momento 0 cuando se aplican en primer lugar H₂S o CO₂, la temperatura corporal interna de los animales comienza a caer. Seis horas más tardes, cuando el H₂S o el CO₂ se eliminan, la temperatura comienza a recuperar la normalidad. Es evidente que los mamíferos más grandes requieren más H₂S para afectar al metabolismo.

EJEMPLO PROFÉTICO 9:

20 MATRIZ DE GAS

[0632] Con el fin de determinar la concentración de cada gas de componente en una atmósfera mezclada a medida que proporciona la mayor capacidad de control de la flexibilidad metabólica en mamíferos, pueden realizarse los siguientes experimentos. Los gases incluyen oxígeno (O₂), nitrógeno (N₂), dióxido de carbono (CO₂), ácido sulfhídrico (H₂S) y helio (He). Aunque el H₂S reduce probablemente la demanda de oxígeno en las mitocondrias, el CO₂ puede reducir adicionalmente la demanda de oxígeno. Además, se ha descubierto que una temperatura corporal interna reducida es esencial para un metabolismo reducido. Por lo tanto, el gas helio, con su alta capacidad térmica, puede proporcionar un procedimiento de refrigeración simple y no invasivo. Además, usando O₂ al 100%, puede mantenerse un oxígeno normóxico al 20,95% en cualquier mezcla de gas en la que los otros constituyentes constituyen menos del 79,05% del total. Y finalmente, se usa nitrógeno para equilibrar la mezcla al 100%.

[0633] Estos experimentos describen un enfoque progresivo para ensayar los gases de forma individual y en combinación en primer lugar con un ratón y después con una rata, y después un perro. Es un objetivo con esta matriz de gas desarrollar una base sobre la que trabajar con múltiples variables en un orden lógico. Este diseño experimental se representa en la figura 21.

[0634] Una de las características de la matriz de gas es que resulta evidente que los experimentos únicamente se realizarán si se completan los experimentos anteriores (unidos por flechas). La mezcla de experimentos no se realizará en ningún modelo animal sin optimizar en primer lugar los gases de componentes. Además, no se usará un gas o una mezcla de gases en una rata sin optimizar en primer lugar la dosis en un ratón, ni en un perro sin optimizar en primer lugar en una rata. Por lo tanto, muestra la progresión de los experimentos usando gases individuales para múltiples mezclas de gases (leyendo desde la parte superior derecha a la parte inferior izquierda) y ratones con respecto a ratas con respecto a perros (leyendo desde la parte superior izquierda a la parte inferior derecha). Siempre podrán usarse ratones para determinar en primer lugar la concentración de gases de componentes que proporcionan el mejor control de la flexibilidad metabólica. Una vez se determina la dosis más eficaz de un usando ratones, se realizarán los mismos experimentos en una rata. Al mismo tiempo, el siguiente gas o mezcla de gases se ensayarán usando ratones. Una vez que se determina la concentración en una rata, el gas se ensayará en perros. La siguiente tabla proporciona una forma ligeramente diferente de ver la matriz de gas y define el orden de los experimentos:

orden secuencial	ratón	rata	perro
1	H ₂ S+CO ₂	CO ₂	
2	He/O ₂	H ₂ S+CO ₂	CO ₂
3	H ₂ S+CO ₂ +He	He/O ₂	H ₂ S+CO ₂
4		H ₂ S+CO ₂ +He	He/O ₂
5			H ₂ S+CO ₂ +He

Procedimiento 1. Dióxido de carbono (CO₂)

[0635] Ratones: Se descubrió que el CO₂ al 15% proporciona el control de la flexibilidad metabólica en ratones. Sin embargo, dadas las limitaciones de las capacidades de mezcla, no se pudo ensayar a mayores concentraciones. Esto ya no es cierto, y se pueden ensayar concentraciones de CO₂ hasta del 80%. Por lo tanto, se comenzará en CO₂ al 15% y se aumentará en aumentos del 5% al 40% después aumentos del 10% al 80%. Los animales se expondrán durante 6 horas. Los ratones se expondrán usando una cámara de vidrio de 375 ml en la que a los animales se les suministrará agua y en la que fluirá una atmósfera de gas premezclado a una velocidad de 500 mililitros por minuto. Estas cámaras estarán alojadas en una incubadora de manera que la temperatura ambiente pueda controlarse. Esta tabla proporciona un marco para cuatro experimentos de CO₂ de alta concentración, pero pueden requerirse experimentos adicionales para comprender mejor los efectos. Pueden usarse ratones en múltiples experimentos, pero no se usará un animal más de una vez por semana. Además, los animales pueden funcionar como sus propios controles en experimentos posteriores.

% de CO ₂	15	20	25	30	35	40	50	60	70	79
% de O ₂	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
% de N ₂	64	59	54	49	44	39	29	19	9	0

[0636] Se monitorizarán el metabolismo (consumo de O₂ y temperatura corporal interna) y la actividad. En CO₂ al 15%, el volumen corriente aumenta pero la velocidad de respiración permanece inalterada. Los ratones no parecen "jadear". El aumento de las concentraciones de CO₂ debe aumentar el efecto narcótico.

[0637] Estos experimentos se realizarán en una incubadora de manera que puede entonces reducirse la temperatura ambiente a 10 °C para ensayar la relación entre la temperatura corporal interna y la producción metabólica.

[0638] Ratas: Los experimentos en ratas comenzarán usando un entorno de nitrógeno equilibrado con CO₂ al 3% y O₂ al 21%. Esto se considera como normocapnia ya que es la concentración exhalada de CO₂. A partir del 3% se aumentará en aumentos del 2% al 15%. Este aumento puede realizarse en un experimento de referencia individual en el que se aumenta la concentración de CO₂ hasta que se observa un cambio en el metabolismo. El metabolismo se monitorizará midiendo el consumo de O₂ y la temperatura corporal interna. Puede usarse una sola rata en un experimento para determinar esta dosis mínima de CO₂. En experimentos posteriores, donde se ensayarán los efectos de 6 horas de exposición a CO₂, se usará una sola rata para una sola dosis de CO₂ (es decir, el nivel no cambiará durante el experimento). Las ratas pueden usarse en múltiples experimentos; no se usarán más de una vez en una semana. Las ratas se expondrán usando un recipiente de vidrio de 2800 ml en el que a los animales se les suministrará agua y en el que fluirán gases premezclados a una velocidad de 3 litros por minuto. Esta tabla muestra la estructura de los primeros experimentos de CO₂ usando ratas, pero pueden requerirse otros para explorar completamente los efectos.

% de CO ₂	3	5	7	9	11	13	15
% de O ₂	21	21	21	21	21	21	21
% de N ₂	76	74	72	70	68	66	64

[0639] Desde el 15% al 80% los experimentos progresarán como cuando se usaron ratones (aumentos al 5% del 15%-40%, aumentos al 10% del 40%-80%). Se monitorizaron el metabolismo y el comportamiento. Una vez determinada la dosis eficaz de CO₂ para las ratas, la temperatura ambiente se reducirá para saber si el metabolismo se reduce adicionalmente por la temperatura corporal interna reducida al igual que al usar H₂S. Estos experimentos se realizarán en una incubadora que proporcionará la refrigeración al comienzo de y durante el experimento, así como el calor al final del experimento.

[0640] Después de finalizar los estudios de CO₂ con ratas, se sabrá si las ratas requieren más CO₂ que los ratones para reducir su metabolismo (como sucede con H₂S), el mismo o menos. El entendimiento de esta tendencia alométrica fundamental proporcionar una mejor hipótesis para la dosis de CO₂ activa en perros.

[0641] Los puntos de detención para estos procedimientos en ratones y ratas serán una cantidad en el consumo de O₂ del 99% o una caída en la producción de CO₂ del 99%.

[0642] Perros: El diseño experimental para los perros será el mismo que el usado para las ratas y ratones (usando un caudal de 10 litros/minuto). Los experimentos comenzarán usando CO₂ al 3% y aumentará hasta que se observa una respuesta fisiológica. Los perros se expondrán a gases mezclados usando una máscara de anestesia a la que se han preacondicionado antes de la exposición. Se monitorizarán el consumo de O₂ y la temperatura corporal

interna. El mismo o dos perros pueden usarse para estos experimentos.

Procedimiento 2. Ácido sulfhídrico y Dióxido de carbono (H₂S + CO₂)

- 5 **[0643]** Mezclando H₂S y CO₂ se buscan efectos sinérgicos de los dos gases. Es decir, H₂S y CO₂ pueden usarse juntos para reducir el metabolismo tan profundamente como las concentraciones mayores de gases individuales. En los primeros experimentos, usando ratones, se usará H₂S a 20 ppm y valorado en CO₂ al 15% (u otra concentración que se determinará en el procedimiento 1). Puede usarse un único animal para variar la concentración de CO₂ mientras que se mantiene el H₂S constante. En segundo lugar, se usarán 40 ppm de H₂S y se añadirá CO₂ al 15%.
- 10 En tercer lugar, se usarán 80 ppm de H₂S y se llevará al CO₂ al 15%. Puede usarse un único animal en cada uno de estos experimentos. Se monitorizarán el consumo de O₂, la temperatura corporal interna y el comportamiento. Los experimentos enumerados en las tablas proporcionan una base para la exploración de los efectos de la mezcla H₂S + CO₂ y serán necesarios otros experimentos para comprender los efectos.

exp.	% de O ₂	H ₂ S ppm	% de CO ₂
1	21	20	5-10-15
2	21	40	5-10-15
3	21	80	5-10-15

15

- [0644]** Una vez determinada una mezcla eficaz, la temperatura ambiente se reducirá para saber si la mezcla de gas optimizada sinergiza con una temperatura corporal interna inferior para reducir adicionalmente la tasa metabólica. En estos experimentos dependientes de la temperatura, las concentraciones de los gases en la mezcla no cambiarán. De nuevo, puede usarse un animal en múltiples experimentos con no más de un procedimiento experimental por animal por semana.
- 20

- [0645]** Los experimentos que usan ratas y perros se realizarán usando la misma metodología. Las concentraciones de CO₂ para una rata y un perro se optimizarán en el procedimiento 1, pero se plantea la hipótesis de que estarán entre el 5% y el 15%. Para perros, la alta concentración de H₂S es mayor de 400 ppm, pero todavía no se ha determinado.
- 25

Procedimiento 3. Helio (He)

- [0646]** El helio es un disipador de calor eficaz; su conductancia térmica es seis veces mayor que la del nitrógeno. Se ha usado en muchos mamíferos, incluyendo, ratas, perros y seres humanos para promover el enfriamiento. No es tóxico, es económico y fácil de manejar. Es deseable usar helio ya que otros tienen una mezcla del 80%/20% con oxígeno (He-O₂) para mejorar la conductividad térmica a través de la respiración. Se proponen cinco experimentos preliminares para analizar el efecto de He-O₂ sobre el metabolismo y el comportamiento. Se empleará la mezcla al 80%-20% convencional que se usa ampliamente. También se ensayará una mezcla que contiene He al 60% para reflejar mejor la mezcla mínima de He-O₂ que se usará en el protocolo 5, en el que se mezcla H₂S, CO₂ y He.
- 30
- 35

exp.	animal	temp.	He-O ₂ -N ₂
1	ratón	23 °C	80-20-0
2	ratón	10 °C	80-20-0
3	ratón	23 °C	60-20-20
4	ratón	10 °C	60-20-20
5	rata	23 °C	80-20-0
6	rata	10 °C	80-20-0
7	rata	23 °C	60-20-20
8	rata	10 °C	60-20-20
9	perro	23 °C	80-20-0
10	perro	23 °C	60-20-20

- [0647]** Se monitorizarán el consumo de oxígeno, la producción de dióxido de carbono, la temperatura corporal interna y el comportamiento para saber si pueden inducirse los mismos efectos que otros que usan He-O₂.
- 40

Procedimiento 4: Oxígeno (O₂)

- [0648]** Que la concentración de oxígeno reducido puede reducir la temperatura corporal interna se mostró por

Gellhorn y Janus en 1936 usando cobayas. Se desea reproducir estos experimentos en primer lugar en ratones, después en ratas, y finalmente en perros para saber si la concentración de O_2 disminuida disminuye el metabolismo.

[0649] Ratones: Se proponen experimentos en los que los ratones se expondrán a concentraciones decrecientes de O_2 hasta el 6%. Los experimentos progresarán en aumentos del 5%. Se ensayarán el consumo de O_2 , la producción de CO_2 , temperatura corporal interna y el comportamiento. Si se observa un comportamiento convulsivo indicativo de hipoxia extrema, el O_2 se devolverá al 21%. La tabla que se muestra a continuación proporciona una descripción general de los experimentos con O_2 . El tiempo de exposición es de seis horas en una cámara controlada (con agua) en la que flujo gas premezclado. Puesto que hay evidencia de preacondicionamiento hipóxico, se usan cuatro animales separados para estos cuatro experimentos.

exp.	% de O_2	% de N_2
1	21	79
2	16	84
3	11	89
4	6	94

[0650] Una vez que se ha determinado la relación entre la tensión de O_2 y el metabolismo, puede ser importante repetir los experimentos en un entorno frío. Estos experimentos se realizarán exactamente como los experimentos anteriores, excepto que la temperatura de la incubadora se reducirá a 10 °C.

[0651] Ratas: Es deseable realizar los mismos experimentos usando ratas que se realizaron previamente con ratones. Si se observa un comportamiento convulsivo indicativo de hipoxia extrema, la concentración de O_2 se devolverá a 21%.

[0652] Perros: Si se observa una correlación positiva entre la tensión de oxígeno reducida y la tasa metabólica reducida en ratones y/o ratas, será deseable realizar la misma serie de experimentos usando perros.

Procedimiento 5: Ácido sulfhídrico, Dióxido de carbono, Helio y Oxígeno ($H_2S + CO_2 + He + O_2$)

[0653] Estos experimentos son el objetivo de la matriz de gas; para determinar la mezcla de O_2 , CO_2 , H_2S y He combinados con una temperatura ambiente optimizada que proporciona el control más fuerte y reversible del metabolismo. Por lo tanto, usando las concentraciones de los gases individuales que se determinaron en los procedimientos anteriores como base, las mezclas de los cuatro gases se ensayaron para encontrar la que proporciona el mejor control de la flexibilidad metabólica. O_2 , CO_2 y H_2S se variarán con respecto el uno con el otro mientras que se usará helio para equilibrar la mezcla. En los experimentos de ratón que se muestran a continuación, el CO_2 se variará, mientras que el O_2 y el H_2S se mantendrán constantes; el helio se cambiará para mantener un flujo constante. Se usarán los mismos ensayos metabólicos que incluyen el consumo de oxígeno y la temperatura corporal interna. Puede usarse un único animal en múltiples experimentos. Los ratones se expondrán durante seis horas. Después, estos experimentos se repetirán usando una temperatura ambiente inferior para saber cuánto afecta la temperatura corporal interna reducida al metabolismo usando la mezcla de gas.

[0654] Ratón:

	O_2	H_2S	CO_2	He
exp.	conc. %	conc. ppm	conc. %	equilibrio
1	21	20	5-10-15	
2	21	40	5-10-15	
3	21	80	5-10-15	
4	16	20	5-10-15	
5	16	40	5-10-15	
6	16	80	5-10-15	
7	11	20	5-10-15	
8	11	40	5-10-15	
9	11	80	5-10-15	
10	9	20	5-10-15	
11	9	40	5-10-15	
12	9	80	5-10-15	
13	6	20	5-10-15	

14	6	40	5-10-15	
15	6	80	5-10-15	

[0655] Ratas: Después de aprender que la mezcla de gas óptima es para los ratones, los experimentos que usan ratas serán idénticos a los realizados usando ratones, excepto que las concentraciones de H₂S son 100, 200 y 300 ppm. Las ratas se tratarán durante 6 horas.

5

[0656] Perros: Los experimentos que usan perros serán idénticos a los que usan ratones y ratas. Las concentraciones comenzarán a 300 ppm e irán hasta una concentración a determinar. Puede usarse un único animal para múltiples experimentos pero no más de una vez por semana. Los ratones y las ratas se tratarán durante 6 horas, y los perros se tratarán durante dos horas.

10

EJEMPLO PROFÉTICO 10:

SELECCIÓN DE DOSIS DE ÁCIDO SULFÚDRICO EN SERES HUMANOS

[0657] Puede administrarse ácido sulfúdrico a un animal o ser humano para inducir la estasis mediante cualquiera de varias formas de dosificación y vías de administración, incluyendo, pero sin limitación, inhalación de la forma gaseosa o administración intravenosa de una solución de ácido sulfúdrico. Se describe un procedimiento para determinar la forma de dosificación y la vía de administración de ácido sulfúdrico suficiente para inducir la estasis en todo un organismo que necesita estasis. Se expone un organismo de prueba (por ejemplo, una rata, perro, cerdo, mono) a concentraciones en aumento de ácido sulfúdrico administrado en forma de dosis bolo, de forma intermitente, o continuamente, y se monitoriza el estado fisiológico, incluyendo, pero sin limitación, la temperatura corporal interna, el consumo de oxígeno, la producción de dióxido de carbono, frecuencia cardíaca, presión sanguínea, tasa respiratoria, pH de la sangre, movimiento y vigilia, al mismo tiempo que se eliminan muestras de sangre (0,5 ml) en diversos puntos de tiempo. Las concentraciones de ácido sulfúdrico que están presentes en el plasma obtenido de sangre de los animales se miden usando procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, derivación de X, extracción de Y, y cuantificación usando cromatografía de gas y espectrometría de masas.

[0658] La correlación de los niveles de plasma en estado estable de ácido sulfúdrico generada por un régimen de dosificación particular en el animal de prueba con el logro de estasis, a grados variables, en el animal de prueba, define una dosis eficaz de ácido sulfúdrico suficiente para inducir la estasis en el animal de prueba. La dosis eficaz para inducir estasis en un ser humano que necesita estasis se determina identificando la dosis, vía de administración, y régimen de dosificación del que consigue las mismas concentraciones de plasma en estado estable de ácido sulfúdrico en los seres humanos que se consiguen en los animales de prueba en condiciones en las que se induce la estasis. La concentración eficaz de ácido sulfúdrico para conseguir estasis en un ser humano depende de la forma de dosificación y la vía de administración. Para inhalación, en algunas realizaciones las concentraciones eficaces están en el intervalo de 50 ppm a 500 ppm, en administración continua. Para administración intravenosa, en algunas realizaciones las concentraciones eficaces están en el intervalo de 0,5 a 50 miligramos por kilogramo de peso corporal administrados de forma continua.

40

[0659] El intervalo en cada caso se caracteriza por grados en aumento de la estasis conseguida con el aumento de la dosis del ácido sulfúdrico. Una dosis de ácido sulfúdrico suficiente para causar una caída sostenida de 12-24 horas de tres a cinco grados Celsius a 32-34 grados Celsius en la temperatura corporal interna de un ser humano que ha sufrido una parada cardíaca fuera de un hospital y que está inconsciente tras la reanimación y reanudación de un latido del corazón, se predice que tiene una supervivencia significativa sobre un ser humano similar no expuesto a ácido sulfúdrico, como se describe en Bernard y col., 2002.

45

EJEMPLO 11:

50 ESTUDIOS DE PRETRATAMIENTO DE ANIMALES

[0660] Los estudios mostrados en el Ejemplo 7 demostraron que el tratamiento anterior y continuo de ratones macho C57B1/6 con H₂S puede mejorar su capacidad para sobrevivir en condiciones hipóxicas de oxígeno al 5% u oxígeno al 4%.

55

[0661] Para determinar el efecto del tratamiento únicamente con H₂S sobre la supervivencia en condiciones hipóxicas (sin exposición continua a H₂S durante la hipoxia), los ratones se expusieron a 30 minutos de aire

ambiental (sin PT) o 10 minutos de aire ambiental seguido de 20 minutos de 150 ppm de H₂S en aire ambiental (PT) antes de la exposición a O₂ al 5% (5%), O₂ al 4% (4%), 1 h de O₂ al 5% seguido de O₂ al 4% (4% + 1 h al 5%), o 1 h de O₂ al 5% seguido de O₂ al 3% (3% + 1 h al 5%), y su tiempo de supervivencia determinado. Los experimentos se detuvieron a los 60 minutos, y los animales aún estaban vivos cuando se devolvieron a sus jaulas. Como se muestra en la figura 23, cada uno de los ratones en una cohorte de animales pre-expuestos a 150 ppm de H₂S en aire ambiental durante 20 minutos sobrevivió a una exposición posterior a O₂ al 5%, mientras que cada uno de los animales de control expuestos únicamente a aire ambiental murieron dentro de los 15 minutos de exposición a O₂ al 5%. Por lo tanto, la pre-exposición de ratones a H₂S establece un estado fisiológico en los ratones que permite una supervivencia prolongada a, de otro modo, una hipoxia letal. La protección observada en los ratones pretratados con H₂S excede en gran medida el efecto protector conocido del preacondicionamiento de la hipoxia de todo el cuerpo que se ha indicado en la bibliografía, en la que la supervivencia en O₂ al 5% se extendió únicamente dos veces (Zhang y col. 2004). Aunque no se muestra en la figura 23, algunos ratones pretratados con H₂S fueron capaces de sobrevivir durante más de cuatro horas en O₂ al 5% y pudieron recuperarse sin deficiencias motoras o conductuales apreciables.

[0662] Para determinar si el pretratamiento con H₂S mejora la supervivencia a incluso tensiones de oxígeno menores, los ratones se expusieron a concentraciones menores de O₂. Como se muestra en la figura 24, el pretratamiento con H₂S mejora en gran medida la supervivencia en presencia de O₂ al 5%. Por el contrario, el pretratamiento con H₂S proporcionó únicamente un pequeño aumento de la supervivencia en presencia de O₂ al 4%. Sin embargo, si los ratones pretratados con H₂S se expusieron a una reducción por etapas en niveles de O₂, de tal forma que se trataron en primer lugar y después se expusieron durante 1 hora a O₂ al 5%, y después se expusieron a O₂ al 4% u O₂ al 3%, su tiempo de supervivencia se mejoró al mismo nivel que el observado cuando se expusieron a O₂ al 5% tras el pretratamiento con H₂S (figura 28). Por lo tanto, la pre-exposición a H₂S establece un estado fisiológico en el que los ratones pueden sobrevivir a una reducción gradual en tensiones de oxígeno que exceden el 80% (21% de normoxia reducida al 3% de O₂). Además, en algunos experimentos, la reducción gradual de la tensión de oxígeno tras el pretratamiento con H₂S mostró que los ratones pueden sobrevivir durante una hora en tensiones de oxígeno tan bajas como del 2,5%.

[0663] Estos datos y los descritos en el Ejemplo 7 demuestran que la exposición a H₂S tiene un efecto farmacológico en el que la supervivencia en hipoxia, de otro modo letal, se mejora en gran medida. En este contexto, los efectos farmacológicos de H₂S dependen de los niveles de dosis y la duración de la exposición a H₂S, los parámetros que un experto en la técnica puede variar para alcanzar una supervivencia óptima a la hipoxia letal. Un experto en la técnica apreciará que la vía de administración (por ejemplo, administración inhalada frente a parenteral) también puede variarse para conseguir el efecto deseado de la tolerancia a hipoxia letal en un mamífero. Además, el efecto farmacológico puede observarse cuando la exposición a H₂S se limita al pretratamiento, o se extiende hasta el periodo de hipoxia. Asimismo, el cronometraje de la exposición a H₂S con respecto a la aparición de hipoxia letal puede variarse para maximizar la supervivencia mejorada. Estos datos son coherentes con la hipótesis de que la reducción de la demanda de oxígeno resultante del pretratamiento con un compuesto activo, tal como un antagonista de oxígeno, permite la supervivencia en un suministro de oxígeno reducido que de otro modo es letal para el animal.

[0664] Para caracterizar los cambios en el metabolismo que se producen en la configuración de la supervivencia mejorada a la hipoxia letal proporcionada por el tratamiento con H₂S, se midió la producción de CO₂ por los ratones durante la exposición a H₂S y, después de eso, tras la terminación del tratamiento con H₂S y la exposición posterior a O₂ al 5%. El cambio en la producción de CO₂ se muestra en la figura 25. Se midieron los cambios en la producción de CO₂ tras la transición a O₂ al 5% u O₂ al 4% en ratones expuestos a aire ambiental durante 30 minutos (sin PT) o aire ambiental durante 10 minutos seguido de 150 ppm de H₂S durante 20 minutos (PT). Además, se midió el cambio en la producción de CO₂ tras una transición por etapas a O₂ al 5% durante 1 h seguido de O₂ al 4%. Los resultados de estos experimentos se proporcionan en la figura 29.

[0665] La producción de CO₂ se redujo aproximadamente de dos a tres veces en los primeros cinco a diez minutos del pretratamiento con H₂S, lo que sugiere que la estasis se induce en los ratones durante los 20 minutos del pretratamiento con 150 ppm de H₂S en aire ambiental. Sin embargo, el consumo de O₂ y la temperatura corporal interna de los animales no cambiaron de forma significativa durante el pretratamiento con H₂S (datos no mostrados), lo que sugiere que puede establecerse un estado fisiológico distinto de estasis en los ratones durante la exposición a H₂S que permite una supervivencia mejorada a la hipoxia letal. Tal estado puede caracterizarse por una reducción en el metabolismo dentro del material biológico de una magnitud que es menor que la definida como estasis. Con el fin de conseguir la estasis usando un compuesto activo, la materia biológica debe hacer la transición necesariamente a través de un estado hipometabólico gradual en el que el consumo de oxígeno y la producción de

CO₂ se reducen menos de dos veces en la materia biológica. Tal continuidad, en la que se reduce el metabolismo o la respiración celular por un compuesto activo hasta un grado menor de dos veces, se describe como un estado de "pre-estasis". La monitorización continua de la producción de CO₂ tras la finalización del pretratamiento con H₂S y la inducción de hipoxia letal mostrada en la figura 25 demuestra una reducción de aproximadamente 50 veces en la producción de CO₂, lo que indica que la estasis se consigue durante la exposición a hipoxia letal. Un descenso concomitante en el consumo de O₂ y una fuerte atenuación de la motilidad en los ratones durante la exposición a hipoxia letal sustenta adicionalmente la observación de que la estasis se consigue posteriormente durante la exposición a hipoxia letal.

- 10 [0666] Se midieron los cambios en la producción de CO₂ relacionados con la transición a condiciones hipóxicas de O₂ al 5% u O₂ al 4% después del pretratamiento con H₂S o sin pretratamiento. Como se muestra en la figura 28, los ratones expuestos a O₂ al 5% en ausencia de pretratamiento con H₂S o expuestos a O₂ al 4% en presencia de pretratamiento con H₂S mostraron un descenso sustancial en la producción de CO₂. Por el contrario, los ratones pretratados con H₂S que se expusieron posteriormente a O₂ al 5% u O₂ al 5% seguido de O₂ al 4% no mostraron
- 15 ningún cambio significativo en la producción de CO₂ en comparación con el nuevo nivel de referencia tras el pretratamiento con H₂S. Estos resultados demuestran una correlación entre una actividad metabólica reducida y la muerte asociada con la exposición a O₂ al 5% en ausencia de pretratamiento con H₂S o exposición a O₂ al 4% con pretratamiento con H₂S. Además, estos datos demuestran que la exposición a O₂ al 5% o una reducción por etapas de O₂ al 5% a O₂ al 4% tras el pretratamiento con H₂S no dan como resultado una reducción adicional de la actividad
- 20 metabólica. Para resumir estos resultados, los descensos en el desprendimiento de CO₂ que se producen tras la transición de normoxia a hipoxia letal se redujeron en ratones que se pretrataron con H₂S. La transición de normoxia a hipoxia letal provocó una reducción del 40% del desprendimiento de CO₂, pero el pretratamiento con H₂S, al mismo tiempo que provocó una reducción del 50-60% en el desprendimiento de CO₂ con respecto a una nueva línea basal inferior, impidió cualquier descenso adicional del desprendimiento de CO₂ en la transición a hipoxia letal. Estos
- 25 datos demostraron que el pretratamiento con H₂S en solitario impide reducciones adicionales de la actividad metabólica típicamente asociadas con una transición a hipoxia letal, mejorando así la supervivencia en condiciones hipóxicas. Además, estos datos apoyan un modelo en el que la pre-exposición de la materia biológica a los compuestos activos es suficiente para mejorar la supervivencia y/o reducir el daño por lesiones o traumatismos.

30 EJEMPLO 12:

SELENURO ÁCIDO REDUCE LA TEMPERATURA CORPORAL INTERNA EN RATONES A CONCENTRACIONES REDUCIDAS

- 35 [0667] Se ha indicado previamente en la bibliografía que más de 1 ppm de H₂Se era letal para los animales. Los experimentos se realizaron de acuerdo con los Materiales y Procedimientos que se han analizado en el Ejemplo 4, excepto que se usó H₂Se a incluso concentraciones menores que con H₂S. El H₂Se usado tenía una concentración inicial del depósito fuente de 20 ppm en nitrógeno, que después se diluyó con aire ambiental a aproximadamente 10 ó 100 partes por billón (ppb). Después, los animales se expusieron a esta mezcla.
- 40 [0668] Se expusieron dos ratones a 100 ppb de H₂Se durante menos de 10 minutos. La figura 26 muestra la caída de la temperatura corporal interna y una reducción de 3 veces en la actividad metabólica como es evidente por la respiración en un ratón.
- 45 [0669] La concentración de H₂Se se redujo incluso adicionalmente a 10 ppb. Un ratón expuesto a 10 ppb de H₂Se también experimentó una reducción de la temperatura corporal interna y la respiración (figura 27).

[0670] Además, los efectos del H₂Se parecían completamente reversibles en base a las pruebas usadas para evaluar la reversibilidad con H₂S (Blackstone y col., 2005, que se incorpora por la presente por referencia).

50

EJEMPLO 13:

ÁCIDO SULFHÍDRICO PROTEGE CONTRA HEMORRAGIA LETAL

- 55 [0671] Los estudios mostrados en los Ejemplos 7 y 11 demostraron que el tratamiento de ratones con ácido sulfhídrico (H₂S) mejora su capacidad para sobrevivir en condiciones hipóxicas de oxígeno al 5% u oxígeno al 4%. Para determinar si el tratamiento con H₂S puede usarse también para reducir la morbilidad y/o el daño tisular asociado con un modelo de lesión aguda clínicamente relevante de hipoxia isquémica, las ratas se trataron con H₂S durante una hemorragia letal controlada, que reduce el suministro de oxígeno a los tejidos y da como resultado la

muerte (Blackstone y col., 2005). En este estudio, las ratas tratadas con H₂S sobrevivieron a una pérdida de sangre letal y se recuperaron completamente.

[0672] Las ratas se trataron con H₂S durante una hemorragia letal controlada (pérdida de sangre al 60%). Después del implante quirúrgico de catéteres y la recuperación, la sangre se eliminó de animales conscientes en 40 minutos. Se administró una pequeña cantidad (300 ppm) de H₂S mezclado con aire ambiental a los animales tratados veinte minutos después del comienzo del sangrado (es decir, después de una pérdida de sangre del 30%). Los animales se devolvieron a aire ambiental sin H₂S al final del sangrado. Tres horas después del final del sangrado, a los animales supervivientes se les dio un volumen de sangre derramada de solución de Ringer lactada por vía intravenosa.

[0673] La mayor parte (6/7) de las ratas tratadas con H₂S sobrevivieron a la hemorragia y un periodo de choque de 3 horas y se recuperaron completamente (Tabla 7). Ninguna de estas ratas supervivientes mostró defectos conductuales o funcionales después de la recuperación. Un animal tratado con H₂S murió 174 minutos después del final del sangrado. Todos los animales no tratados murieron dentro de los 82 minutos después del final del sangrado; el tiempo de supervivencia medio de los animales no tratados fue de 35 ± 26 minutos. Usando una prueba t exacta de Fisher bilateral, el valor de p es 0,0047.

[0674] En los primeros veinte minutos de sangrado (antes de una pérdida de sangre del 30%) las ratas aumentaron la velocidad de respiración y el volumen corriente para compensar el descenso de la capacidad de transporte de oxígeno debido a la pérdida de sangre. Este aumento de la ventilación dio como resultado un descenso de la producción de dióxido de carbono respiratorio (V_{CO_2}) (Tabla 7). Después de una pérdida de sangre del 60%, tanto los animales tratados con H₂S como los no tratados mostraron un descenso de la V_{CO_2} . El lactato en sangre arterial aumento mientras que el pCO₂, el bicarbonato ([HCO₃⁻]), el pH y el exceso de base disminuyeron (Tabla 7). Por lo tanto, la hemorragia dio como resultado una acidosis metabólica con compensación respiratoria. Sin embargo, en las ratas tratadas con H₂S, estos cambios fueron menores, representando un descenso de la acidosis metabólica. Además, en los animales tratados con H₂S, la V_{CO_2} no siguió disminuyendo después de la hemorragia. En los animales no tratados, la V_{CO_2} disminuyó de forma estable hasta que los animales dejaron de respirar. La administración de H₂S parece impedir la respuesta de choque de progresión en muerte.

Tabla 7. Supervivencia y fisiología de un modelo de hemorragia de rata usando H₂S

	Tratadas con H ₂ S	No tratadas
Supervivencia		
Recuperación completa	85,7% (6/7)	0% (0/7)
Tiempo hasta la muerte de no supervivientes (min)	174 (1/7)	35 +/- 26
Producción de CO ₂ (V_{CO_2}) en ml/kg/min:		
Pre-sangrado	25 +/- 4	26 +/- 6
Sangrado central	20 +/- 2	21 +/- 3
Fin del sangrado	16 +/- 2	11 +/- 3
15 minutos después del sangrado	17 +/- 3	7 +/- 5
Contenido de CO ₂ en sangre (pCO ₂) en mmHg		
Pre-sangrado	45 +/- 6	44 +/- 3
Fin del sangrado	35 +/- 6	21 +/- 3
Contenido de bicarbonato en sangre ([HCO ₃ ⁻]) en mmol/l		
Pre-sangrado	32 +/- 3	30 +/- 1
Fin del sangrado	21 +/- 3	12 +/- 3
pH en sangre		
Pre-sangrado	7,46 +/- 0,03	7,45 +/- 0,02
Fin del sangrado	7,41 +/- 0,02	7,35 +/- 0,06
Exceso de base en sangre en mmol/l		
Pre-sangrado	8 +/- 2	6 +/- 1
Fin del sangrado	-5 +/- 4	-14 +/- 3
Lactato en sangre en mmol/l		
Pre-sangrado	1,4 +/- 0,5	1,2 +/- 0,2
Fin del sangrado	6,6 +/- 1	11 +/- 3

EJEMPLO 14:

BENEFICIO DE LA EXPOSICIÓN A CORTO PLAZO A ÁCIDO SULFÚRICO DURANTE LA HEMORRAGIA

[0675] Se adquirieron ratas macho Sprague Dawley con un peso de 275-350 gramos en Charles River Laboratories una semana antes de cada experimento y se dejó que se aclimataran. El día del experimento, se implantaron catéteres quirúrgicamente en la arteria femoral derecha y la vena. Los catéteres salieron tras la 5 escápula. A las ratas se les administró Buprenorfina después de la cirugía y se dejó que se recuperaran.

[0676] El fármaco anticoagulante heparina (80-100 unidades) se administró por vía intravenosa en forma de bolo para reducir la capacidad de coagulación de la sangre y potenciar la hemorragia. Tras la administración de heparina, las ratas conscientes en libertad se colocaron de forma individual en una placa de cristalización de 2,75 litros con 10 una tapa de vidrio. Se pasaron catéteres, una sonda de temperatura y un tubo de muestreo de gas a través de un orificio perforado en el medio de la tapa. La temperatura se mantuvo a aproximadamente una temperatura isotérmica (27 +/- 2 °C).

[0677] El modelo de hemorragia se definió por la retirada del 60% de sangre corporal total en el transcurso de un 15 sangrado de 40 minutos. La sangre se eliminó usando una bomba peristáltica. Para determinar la cantidad de sangre que constituye el 60% de la sangre corporal total, las ratas se pesaron y el volumen de sangre se calculó usando la siguiente ecuación ($0,06 \times \text{masa corporal}$) + 0,77 (Lee y col., (1985).

[0678] Los grupos de tratamiento recibieron una exposición a aire ambiental con ácido sulfhídrico (animales de 20 ensayo), o aire ambiental que contenía nitrógeno (animales de control) a una velocidad de 3 litros por minuto administrada por un controlador de flujo de masa térmico (Sierra Instruments).

[0679] Se diluyó ácido sulfhídrico (H_2S) (20.000 ppm equilibrado con nitrógeno) (Byrne Specialty Gas) en aire ambiental a una concentración de 2000 ppm para el tratamiento. La sangre se eliminó a la velocidad calculada a 25 través de la arteria femoral del catéter. La sangre se pesó según se retiró. Después de veinte (o al 50% del sangrado de 40 minutos), los animales de prueba se expusieron a aire ambiental que contenía 2000 ppm de ácido sulfhídrico. La exposición terminó cuando los animales mostraron apnea y distonía. La duración media de la exposición a ácido sulfhídrico (H_2S) fue generalmente entre 1 y 2 minutos. La concentración máxima de H_2S en la cámara se estimó que estaba entre 1000 y 1500 ppm. Cuando la apnea y la distonía se observaron, los animales recibieron una 30 exposición a aire ambiental. Los animales de prueba reanudaron patrones de respiración regulares en 20 a 30 segundos tras la exposición. Los animales de control se desangraron a la misma velocidad que los animales de prueba, pero no recibieron tratamiento con ácido sulfhídrico. Los animales de control no mostraron apnea ni distonía durante el transcurso del experimento.

[0680] La tasa metabólica se determinó midiendo la producción de CO_2 (Licor Li7000). Se recogieron los datos de 35 temperatura y CO_2 (ADI PowerLab). Se midieron los valores de la sangre arterial (analyzer químico de sangre I-Stat). Tras el sangrado, los animales se colocaron en una jaula durante tres horas y se observaron. Al final de las tres horas, a las ratas supervivientes se les dio solución de Ringer lactada *ad libitum*. Para los animales que no sobrevivieron, se declaró la hora de la muerte cuando los animales dejaron de respirar y se detuvo la producción de 40 CO_2 . Después de la reanimación, las ratas se transfirieron a jaulas limpias con alimento y agua y se alojaron a 30 °C durante aproximadamente 16 horas. Los catéteres se retiraron quirúrgicamente y se dejó que los animales se recuperaran durante varias horas a 30 °C antes de devolverlos de vuelta a la colonia. Se seleccionaron pruebas de comportamiento y función entre una batería de pruebas descritas en el protocolo SHIRPA (Rogers y col., 1997).

[0681] En estos experimentos, 7 de 8 (88%) de los animales tratados con ácido sulfhídrico (H_2S) durante el 45 transcurso de la hemorragia sobrevivieron a la hemorragia. Dos animales de control que no recibieron tratamiento murieron durante el periodo de observación de tres horas.

EJEMPLO 15:

50

RESULTADOS ADICIONALES DEL EJEMPLO 2

[0682] Como se ha analizado en el Ejemplo 2 anterior, se usaron prepucios humanos para evaluar la conservación de células y tejido en monóxido de carbono. Se evaluaron por último un total de ocho prepucios humanos (el 50 Ejemplo 2 informa de tres). El número de queratinocitos viables se evaluó usando azul tripán (Tabla 8 y figura 30). Mostró que la exposición a monóxido de carbono aumentó el número de células viables.

Tabla 8. Viabilidad de los queratinocitos aislados de prepucios expuestos a aire ambiental (AA) o CO durante 24 horas que se ensayaron para obtener su viabilidad usando tinción con azul tripán (tb).

	AA			CO		
	vivos (tb -)	mueritos (tb +)	fracción viva	vivos (tb -)	mueritos (tb +)	fracción viva
	0	3	0,00	10	1	0,91
	1	1	0,50	4	4	0,50
	0	0		10	3	0,77
	0	0		5	1	0,83
	7	34	0,17	49	42	0,54
	0	1	0,00	24	6	0,80
	1	2	0,33	3	3	0,50
	0	1	0,00	1	1	0,50
SUMA	9	42	0,18	106	61	0,63
	<u>Nº de células recuperadas</u>		<u>fracción viva</u>			
no tratados	51		0,18		ttest	0,000883884
CO	167		0,63			

EJEMPLO 16:

EL BAJO NIVEL DE EXPOSICIÓN CRÓNICA A H₂S AUMENTA LA SUPERVIVENCIA

5

[0683] Usando los procedimientos y aparatos que se han descrito en el Ejemplo 1, los nematodos *C. elegans* se expusieron a bajos niveles de H₂S (<100 ppm). Los nematodos adaptados a este tratamiento muestran una esperanza de vida aumentada y resistencia a estrés térmico, sin embargo, no hay un descenso apreciable de la actividad metabólica como con la inducción de estasis.

10

[0684] En los nematodos, la incapacidad de realizar el metabolismo aeróbico (reduciendo la concentración de oxígeno ambiental o adición de CO) da como resultado la inducción de la animación suspendida, o estasis (véase el Ejemplo 1). Sin embargo, la animación suspendida no se indujo exponiéndolos a <100 ppm de H₂S en aire ambiental. A dosis por encima de 100 ppm, el H₂S puede dar como resultado una mortalidad considerable de la población de nematodos expuestos. De forma interesante, incluso en condiciones en las que la mayoría de los gusanos son exterminados por H₂S, aquellos que sobreviven parecen normales y obviamente no son dañados por el agente. Los gusanos que crecen en aproximadamente 50 ppm de H₂S completan la embriogénesis, desarrollan hasta la madurez sexual y producen progenie a la misma velocidad que los hermanos crecidos en entornos sin H₂S. Por el contrario, en concentraciones de oxígeno en la que la tasa metabólica se reduce (menos del 3,5% de O₂), cada uno de estos procesos se ralentiza. Además, los gusanos que crecieron en H₂S producen el mismo número de progenie que los de control en aire ambiente, lo que sugiere que no hay efectos dañinos a partir de estas condiciones. Estos datos indican que el H₂S no reduce la actividad metabólica en estas condiciones en *C. elegans*.

15

[0685] Los nematodos que crecieron en H₂S son más resistentes al estrés por calor que los controles emparejados por edad únicamente en aire ambiental (figura 31). En este ensayo, los gusanos que crecieron en 50 ppm de H₂S se expusieron a alta temperatura en H₂S, y los gusanos que crecieron en aire ambiental se expusieron a aire ambiental. Por lo tanto, la resistencia inducida por H₂S al estrés no se correlaciona con el descenso de la actividad metabólica. Sin embargo, esta resistencia al estrés térmico requiere que los nematodos se adapten al entorno H₂S. Los gusanos criados en aire ambiental y expuestos a estrés térmico en H₂S mueren más rápidamente que si se exponían en aire ambiental. La adaptación a H₂S es persistente, en la medida en que los gusanos criados en H₂S y expuestos a estrés térmico en aire ambiental sobreviven mejor que los controles criados en aire ambiental. Además, los gusanos adaptados a una baja concentración no tóxica de H₂S (por ejemplo, 50 ppm) eran resistentes a mayores concentraciones de H₂S que son letales para los gusanos no adaptados.

20

[0686] Estos datos son coherentes con los datos de que las moscas expuestas de forma transitoria a H₂S son capaces de sobrevivir posteriormente a la mejor que los controles no tratados (por ejemplo, Ejemplo 7 y Ejemplo 11). La protección contra estrés térmico (en gusanos) y estrés anóxico (en moscas) sugiere que el H₂S puede ser capaz de aumentar la supervivencia en una diversidad de estados adversos o estresantes que pueden encontrarse clínicamente.

35

[0687] Los gusanos adaptados a 50 ppm de H₂S también tienen una esperanza de vida aumentada en comparación con los controles isogénicos no tratados (figura 32). Esto se coherente con la idea de que están en un

40

estado que es generalmente más resistente a diversos estados de estrés asociados con el envejecimiento. De hecho, los gusanos mayores que crecen en H₂S parecen más vigoroso y sanos que aquellos de edad similar no tratados con H₂S. Además, esto también es cierto cuando se comparan gusanos de cada población en el punto medio de la esperanza de vida (es decir, los controles de aire ambiental y los gusanos tratados con H₂S no se corresponden en edad cronológicamente, sino en el punto en el que el 50% de cada población ha muerto). Por lo tanto, la adaptación a H₂S puede ralentizar el daño celular crónico asociado con el envejecimiento en *C. elegans*.

EJEMPLO 17:

10 IMPLEMENTACIÓN DE EXPERIMENTOS DE MATRIZ DE GAS

[0688] La flexibilidad metabólica se evaluó en ratas y perros usando entornos de gas alterados. Se usaron tres parámetros para definir esta reducción en el metabolismo, incluyendo cambios en la producción de dióxido de carbono, consumo de oxígeno medido por respirometría, y temperatura interna que se midió usando telemetría. En los experimentos con ratones y ratas, los animales se colocaron en cámaras selladas con una importación de gas y una exportación de gas. Para los perros, se les puso una máscara sobre el hocico del animal con dos mangueras (importación y exportación) fijadas a la máscara. El caudal de gas para cada uno de los animales ratones-500 cc por minuto, ratas, 2 litros por minuto, y perros 40 litros por minuto. Cada atmósfera se construyó a partir de gas comprimido mediante dilución en aire ambiental a menos que se indique otra cosa. Para experimentos con ratas y ratones, la temperatura ambiente era de 7 a 10 °C durante la exposición a los gases de prueba. Para los perros, la temperatura del aire era la temperatura ambiente (22 °C).

Tabla 9: Descripción de entornos de gas contruidos para ensayar la flexibilidad metabólica en ratones, ratas y perros.

	Ratón	Rata	Perro
Ácido sulfhídrico	Sí 0,01%	Sí 0,03%	No 0,85%
Selenuro ácido	Sí 0,0001%	Sí 0,003%	N/R
Fosfina	No 0,016%	N/R	N/R
Dióxido de carbono	Sí 15%	Sí 15%	No 9%
H ₂ S + CO ₂	Sí 0,01% + 15%	N/R	N/R
CO ₂ + O ₂ bajo	Sí 15% + 8%	sí 15% + 8%	N/R
CO ₂ + O ₂ bajo + He 77%	Sí 15% + 8% + 77%	Sí 15% + 8% + 77%	Sí 9% + 15%

[0689] La Tabla 9 muestra la cantidad de cada gas, que se da como un porcentaje de la atmósfera de aire ambiental a menos que se indique otra cosa. Una evidencia de depresión en la tasa metabólica de más de 5 veces como se determina por la producción de dióxido de carbono o el consumo de oxígeno durante un tratamiento de 6 horas se describe mediante "Sí"; "No" (una reducción o una reducción de menos de 5 veces en estos valores se describe tal cual; "N/R" representa experimentos no realizados. La caída de la temperatura en el experimento con perro (Dióxido de carbono + oxígeno bajo + Helio) fue aproximadamente 1,5 °C durante el transcurso de 30 minutos de exposición. Esta caída de la temperatura se consideró significativa porque el perro tenía 12 kg y no se observó tal caída de temperatura durante el extenso registro de la línea basal del animal en aire ambiental.

[0690] Los animales expuestos a diversas atmósferas contruidas mostraron flexibilidad metabólica como se demostró por los cambios en la temperatura corporal interna (TCI) que se aproximan a la temperatura ambiente (figuras 33-40). La figura 33 demuestra que una rata expuesta a una atmósfera que contenía CO₂ al 15%, O₂ al 8% y He al 77% tiene una depresión metabólica que se acelera en comparación con una rata expuesta a 300 ppm de H₂S en condiciones similares. La figura 34 demuestra una caída significativa en la TCI de un ratón expuesto a 1,2 ppm de H₂Se. Las ratas expuestas a aire ambiental a una temperatura ambiente de 10 °C no muestran una caída significativa de la TCI (figura 35), ni tampoco las ratas expuestas a He al 80%, O₂ al 20% a 7 °C (figura 36). Las ratas expuestas a una atmósfera de CO₂ al 15%, O₂ al 20%, He al 65% a una temperatura ambiente de 7 °C muestran una caída significativa de la TCI (figura 37). De forma análoga, la figura 38 muestra una caída significativa de la TCI en una rata expuesta a una atmósfera de CO₂ al 15%, O₂ al 8%, He al 77% a 7 °C. También se demostró una caída significativa de la TCI en un perro expuesto a una atmósfera de CO₂ al 9%, O₂ al 20%, He al 71% (figura 39). La magnitud de la caída es inferior, presumiblemente debido al mayor tamaño del animal y las limitaciones de la difusión térmica. Se observa una caída similar en un perro expuesto a diferentes concentraciones de CO₂.

EJEMPLO 18:

DETECCIÓN DE COMPUESTOS

[0691] Se realizó una detección de compuesto para identificar los compuestos de ensayos capaces de provocar una caída reversible de la temperatura subcutánea en un ratón. Después, se ensayaron los compuestos de prueba identificados para evaluar su capacidad de proporcionar protección frente a hipoxia letal (medido en O₂ al 4% en oposición a un entorno típico de un entorno de nitrógeno equilibrado con O₂ al 21%). Todo el procedimiento de detección implica tres etapas:

- 1) una detección principal (1ª) para determinar la dosis mínima eficaz de un compuesto de ensayo que producirá una caída medible de una temperatura subcutánea de un ratón de ensayo;
- 2) una detección secundaria (2ª) para determinar la reversibilidad de la caída de la temperatura, como se define por el ratón de prueba que tiene un comportamiento normal 24 horas después del tratamiento y que ha recuperado una temperatura subcutánea normal en 24 horas o menos; y
- 3) una detección terciaria (3ª) para evaluar la capacidad del ratón de prueba para sobrevivir a hipoxia letal (O₂ al 4%) en comparación con un sujeto de control no tratado en condiciones hipóxicas idénticas.

[0692] Los ratones usados en estos estudios fueron ratones machos C57BL/6 cateterizados en la vena yugular (JVC), de 5-6 semanas de edad (Taconic), a los que se les implantó dorsalmente un detector de temperatura RFID subcutáneo (IPTT-300, Bio Medic Data Systems, Inc. (BMDS)) y se dejó que se recuperasen durante al menos 24 horas. Los ratones se dosificaron a través del catéter permanente con la infusión del compuesto de prueba usando jeringas Luer-Lok de 1 ó 5 ml (Becton Dickinson) y una bomba de infusión (Harvard Apparatus). Un módulo de adquisición de datos DAS-6008 de BMDS registró la temperatura subcutánea del ratón a través del transpondedor, y estos datos se introdujeron en una hoja de cálculo y se representaron en función del tiempo.

Detección primaria (1ª):

[0693] Para la detección primaria, la infusión del compuesto de ensayo se constituyó a una concentración que se consideró que era la concentración optimizada máxima. El pH se ajustó con NaOH o HCl a 6-8, la osmolalidad se ajustó con cloruro sódico a 250-350 mOsm y la dosis total del compuesto de prueba a administrar (en mg) dividido por el peso del sujeto de prueba (en kg) no excedió el 400% de su DL₅₀ en mg/kg publicada en un ratón.

[0694] Los ratones se colocaron en un tarro con fondo de vidrio alto con paredes opacas y se infundió a través de la vena yugular. El compuesto de prueba se infundió usando un protocolo de etapas con tasas de infusión aumentadas durante 2 horas (Tabla 10).

Tabla 10. Protocolo por Etapas de Infusión del Compuesto de Prueba

tiempo (min)	tasa de infusión (µl/ml)	microlitros infundidos	microlitros infundidos totales
0-20	0,8	15,875	15,875
20-40	1,6	31,75	47,625
40-60	3,2	63,5	111,125
60-80	6,3	127	238,125
80-100	12,7	254	492,125
100-120	25,4	508	1000,125

[0695] Durante la infusión, la temperatura subcutánea del ratón se leyó cada 3-5 minutos, y se registró cualquier cambio en el comportamiento del ratón. Los resultados de la detección primaria revelaron si el compuesto de prueba tenía la capacidad de reducir la temperatura subcutánea a 33 °C o menos, e indicaron la dosis eficaz requerida para reducir la temperatura subcutánea como se midió por la velocidad de infusión del compuesto de prueba en el que se observó en primer lugar una caída de temperatura estable.

Detección secundaria (2ª):

[0696] Los compuestos de ensayo que produjeron un descenso de la temperatura subcutánea del ratón a 33 °C o menos se ensayaron en la detección secundaria. En la detección secundaria, el ratón se infundió con el compuesto de prueba durante 60 minutos a una velocidad del 50% de la velocidad de infusión eficaz determinada en la detección primaria. Durante la infusión, la temperatura subcutánea del ratón se controló tomando mediciones cada 3-5 minutos. Si la temperatura subcutánea no aumentó en los primeros 60 minutos, la velocidad de infusión se dobló y continuó durante 60 minutos más. Cuando la temperatura subcutánea del ratón disminuyó a 33 °C o menor, la

infusión se detuvo inmediatamente, y se evaluó la recuperación del ratón midiendo la temperatura subcutánea y observando el comportamiento del ratón. La temperatura y el comportamiento del ratón se observaron y se registraron 24 horas después del tratamiento. El resultado de la detección secundaria determinó si el compuesto de prueba provocó una caída reversible de la temperatura subcutánea sin mortalidad.

5

- [0697]** Detección terciaria/hipoxia letal (3ª): En la detección terciaria, el ratón se infundió con el compuesto de prueba a la velocidad determinada en la detección secundaria. La temperatura subcutánea del ratón se midió cada 3-5 minutos hasta que descendió a 33 °C, como en la detección secundaria. La infusión se detuvo y el ratón se transfirió inmediatamente a una cámara hipóxica (O₂ al 4%), junto con un ratón de control, infundido con vehículo (solución salina, 148 mM, osmolalidad = 300), o no tratado. La cámara de vidrio cerrada se perfundió con aire y nitrógeno a un flujo continuo para conseguir la atmósfera hipóxica deseada de O₂ al 4%. Si el ratón sobrevivió 60 minutos en la atmósfera hipóxica, se transfiere de nueva a aire ambiental, y su recuperación se supervisa durante 24 horas registrando la temperatura subcutánea y mediante observación conductual.

- 15 **[0698]** El ratón de control típicamente murió en 6-15 minutos.

- [0699]** Los ratones infundidos con sulfuro sódico (dosis eficaz de 0,79 mmol/kg), tiometóxido sódico (dosis eficaz de 4,61 mmol/kg), o tiocianato sódico (dosis eficaz de 4,67 mmol/kg) sobrevivieron a la exposición a hipoxia letal durante 60 minutos. Un ratón infundido con cisteamina (dosis eficaz de 7,58 mmol/kg) sobrevivió en hipoxia letal durante 45 minutos; un ratón infundido con sal sódica de cisteamina-S-fosfato sobrevivió en hipoxia letal durante 31 minutos; y un ratón infundido con tetrahidrotiopiran-4-ol sobrevivió en hipoxia letal durante 15 minutos. Estas tasas de supervivencia se comparan con la tasa de supervivencia de un ratón de control, que típicamente murió dentro de 6-15 minutos en el entorno hipóxico.

- 25 **[0700]** En comparación, ciertos compuestos de prueba diferentes identificados en la detección primaria como que tienen la capacidad de reducir la temperatura corporal no protegían contra hipoxia letal. Cada uno del ácido tioacético, selenourea y S-(2-((3-aminopropil)amino)etil) éster del ácido fosforotioico redujo la temperatura corporal, pero no mejoraron la supervivencia en hipoxia. Cada uno de 2-mercapto-etanol, ácido tioglicólico y 2-mercaptoetil éter redujo la temperatura corporal, pero eran tóxicos en la dosis eficaz de reducción de la temperatura. Tiourea, sulfuro de dimetilo, selenuro sódico, sulfinato de metano sódico, N-acetil-L-cisteína no redujeron la temperatura subcutánea en las dosis más altas dadas en este estudio. Se excluyó el dimetilsulfóxido porque la dosis eficaz (DMSO al 10%) era demasiado alta para considerarse para fines farmacéuticos.

- 35 **[0701]** Estos estudios establecen que los procedimientos de detección desarrollados pueden usarse con éxito para identificar compuestos capaces de proteger a animales sometidos a hipoxia letal. Además, los resultados de este estudio indican que los compuestos identificados, así como otros compuestos que se identificarán usando este procedimiento, pueden usarse para proteger a los pacientes contra una lesión resultante de lesión hipóxica e isquémica.

40 **EJEMPLO 19:**

EXPOSICIÓN DIARIA AL COMPUESTO ACTIVO

- 45 **[0702]** La capacidad de adaptarse fisiológicamente a un tratamiento prolongado con ácido sulfhídrico (H₂S) y el tiempo requerido para la adaptación se ensayaron en un ratón. La adaptación se define como un fallo para mostrar un descenso de la temperatura corporal interna (mayor de 4 °C) cuando un animal se expuso a 80 ppm de ácido sulfhídrico en aire ambiental durante un tratamiento prolongado. Tratamiento prolongado se definió como una exposición a 80 ppm de ácido sulfhídrico en aire ambiental durante cuatro horas por día, cuatro días por semana durante seis semanas.

50

- [0703]** Los ratones usados en estos estudios fueron ratones macho C57BL/6 o ratones macho C129, de 5-6 semanas de edad. Se implantaron dispositivos telemétricos en la cavidad celómica de los ratones antes de los experimentos para registrar la temperatura interna.

- 55 **[0704]** Los ratones (ocho por tratamiento) se expusieron a ácido sulfhídrico en una sola caja de plexiglás con cámaras separadas para cada ratón a un caudal de 10 litros por minuto. La detección de la producción de dióxido de carbono y el consumo de oxígeno en los animales en cuencos de cristal de 500 cc tenía un caudal de 0,5 litros por minuto.

[0705] Los ratones se adaptaron a una exposición a ácido sulfhídrico en promedio, en un periodo de una semana. La adaptación se definió por un fallo para mostrar un descenso (mayor de 4 °C) de la temperatura interna cuando los animales se expusieron a 80 ppm de ácido sulfhídrico en aire ambiental durante 4 horas. Los ratones que no mostraron una caída de la temperatura interna se consideró que tenían una adaptación fisiológica a ácido sulfhídrico. Los ratones tratados con ácido sulfhídrico que desarrollaron una adaptación mostraron un aumento del consumo de oxígeno (vO_2) comparado con la producción de dióxido de carbono (vCO_2) en comparación con los ratones de control no tratados (figura 42). Los ratones con una adaptación a H_2S mostraron un Cociente Respiratorio inferior (proporción CR), definido como la proporción de vCO_2/vO_2 o una comparación del dióxido de carbono producido con respecto al oxígeno consumido (figura 43).

EJEMPLO 20:

APLICACIONES PARA TALASEMIA

[0706] En base a los resultados actuales en otros sistemas modelo presentados aquí, se espera que los glóbulos rojos de animales con el trastorno hematológico, talasemia, tengan una capacidad aumentada para soportar un daño oxidativo, lo que conduce a una supervivencia prolongada de los glóbulos rojos cuando se tratan con sulfuros. Los siguientes experimentos se realizarán para confirmar que el tratamiento con compuestos activos puede proteger a los animales con talasemia contra un daño oxidativo.

[0707] En una primera serie de experimentos, se tratarán animales con talasemia mediante exposición crónica a un compuesto activo. Después de las pruebas iniciales para establecer líneas basales, se iniciará el tratamiento siguiendo el protocolo resumido a continuación. Si se mejoran la eritropoyesis o la supervivencia de los glóbulos rojos, puede observarse un efecto tan pronto como en 1-2 semanas, ya que se estima que la semivida de los glóbulos rojos talasémicos es de 4-7 días. Se revisará un frotis y se obtendrá un recuento de reticulocitos en dos semanas, y se iniciarán estudios más extensos después de dos semanas más. Si se determina una mejora de los glóbulos rojos en los ratones, como se identificó por un recuento de reticulocitos mejorado y un frotis de sangre, el estudio continuará hasta que se observe una meseta en la métrica usada en los estudios mensuales. Este estudio tiene un punto de finalización proyectado de un año. En un año, se completarán estudios de supervivencia de los glóbulos rojos, y los animales se sacrificarán. Si no se observa ninguna mejora, la exposición continuará hasta un año adicional, cuando se realizarán estudios de supervivencia y los animales se sacrificarán.

Protocolo 1:

[0708]

1) Los animales se someterán a los estudios iniciales.

2) En una semana después de los estudios iniciales, los animales se alojarán de forma idéntica y:

A) se expondrán a 80 ppm de H_2S durante 8 horas/día;

B) no tendrán exposición; o

C) se les dará agua con sulfuro de dimetilo al 0,25% (DMSO) y se dejará que beba *ad lib* (los cálculos de estudios anteriores sugieren que los ratones consumirán 5-10 cc/día/ratón con un contenido de 2,5-25 microgramos/día de DMSO. Usando un peso medio de 18 g por ratón, se estima que el consumo será de 700-1.400 ug/kg/día).

[0709] En una segunda serie de experimentos, se determinará el efecto del tratamiento *in utero* con un compuesto activo, siguiendo el protocolo resumido a continuación.

Protocolo 2:

[0710]

1) Se tratarán hebras reproductoras en uno de los siguientes grupos tres días después de la concepción:

A) expuestas a 80 ppm de H_2S durante 8 horas/día;

B) sin exposición; o

C) se les dio agua con sulfuro de dimetilo al 0,25% (DMSO) y se les dejó beber *ad lib* (los cálculos de estudios anteriores sugieren que los ratones consumirán 5-10 cc/día/ratón con un contenido de

2,5-25 microgramos/día de DMSO. Usando un peso medio de 18 g por ratón, se estima que el consumo será de 700-1.400 ug/kg/día).

- 5 2) Se permitirá que las hembras reproductoras tengan un parto natural, y se obtendrá el genotipo de las pupas y se sacrificarán para un análisis detallado después del nacimiento.

[0711] Los animales de prueba se monitorizarán a lo largo de estos estudios como se indica a continuación.

Monitorización:

10

[0712]

1) Estudios Iniciales:

15

1. Recuento de reticulocitos;
2. Frotis de sangre;
3. Tomografía Computerizada (detección TC) del bazo y los huesos;
4. Consumo de O₂ y producción CO₂;
5. Peso;
6. Metabolitos de sulfuro; y
7. Hematocrito (60 µl de sangre total).

20

2) En dos semanas: Recuento de reticulocitos y frotis de sangre (5 µl de sangre).

25

3) Estudios mensuales:

1. Recuento de reticulocitos;
2. TC de bazo y huesos;
3. Consumo de O₂ y producción CO₂;
4. Peso; y
5. metabolitos de sulfuro (la extracción de sangre será menor de 30 µl).

30

4) Un mes antes del sacrificio: estudios de supervivencia de los glóbulos rojos.

35

5) Sacrificio y análisis *in vitro* detallado.

EJEMPLO 21:

APLICACIONES PARA ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES

40

[0713] Para probar esta hipótesis, se usará un modelo de ratón de enfermedad de las células falciformes (ECF) en el que la cepa se desarrollo por ingeniería de manera que ya no exprese Hba y Hbb de ratón, pero exprese HBA y HBB humano (Patsy y col., 1997). Imita las características genéticas, hematológicas e histopatológicas que se encuentran en seres humanos afectados por anemia de las células falciformes, incluyendo glóbulos rojos irreversiblemente falciformes, anemia y patología multiorgánica. Un porcentaje significativo de ratones de células falciformes no sobreviven hasta la edad adulta.

45

[0714] Usando este modelo de ratón, se ensayarán diversos agentes y compuestos que contienen sulfuro para probar su eficacia frente a ECF. Las exposiciones serán agudas y crónicas, y los animales se expondrán en el nacimiento o *in utero*. La viabilidad en el nacimiento para las pupas expuestas *in utero* o hasta la edad adulta será un punto de referencia para medir la eficacia. Se evaluarán los efectos fenotípicos a través del recuento de reticulocitos, el hematocrito y mediciones de la semivida de los glóbulos rojos (GR) (que son normalmente 20 veces menos para ECF en comparación con controles no manipulados).

50

55 EJEMPLO 21:

EXPERIMENTO DE EXPOSICIÓN A CIANURO

[0715] Este ejemplo muestra que cuando los ratones se exponen a 80 ppm de cianuro en aire ambiental reducen

gradualmente su temperatura interna a aproximadamente 34 °C.

[0716] Una meta de estos estudios de flexibilidad metabólica es la identificación de compuestos que pueden reducir el consumo de oxígeno y proteger a los animales de una lesión hipóxica. Previamente, se demostró que el ácido sulfhídrico (H₂S), un potente inhibidor del consumo de oxígeno, puede reducir el metabolismo proteger a los ratones y las ratas lesiones hipóxicas. El cianuro ácido (HCN) es similar al H₂S de muchas formas y se usará en estos ensayos de producción metabólica para saber si puede usarse para regular el metabolismo. Al igual que H₂S, HCN se usa ampliamente en la síntesis química industrial y se encuentra en muchos sistemas biológicos, incluyendo los seres humanos. No se sabe si HCN es simplemente un subproducto del metabolismo de carbono-nitrógeno o si posee actividades biológicas específicas. Al igual que H₂S, se cree que HCN actúa reaccionando con proteínas que contienen metales de transición, tales como oxidasas y deshidrogenasas. El HCN no es demasiado reactivo con componentes de la hemoglobina.

[0717] En los seres humanos, el valor de NIOSH IDLH (riesgo inmediato para la vida y la salud) es de 50 ppm. El OSHA PEL (límite de exposición permitido) en TWA (tiempo medio ponderado para 8 horas) es de 10 ppm. El LC50 para una rata es de 143 ppm durante 60 minutos.

[0718] Para medir los efectos metabólicos de HCN, los ratones se expusieron a concentraciones en aumento de HCN partiendo de 1 ppm. Se midieron o se evaluaron el consumo de oxígeno (O₂), la producción de dióxido de carbono (CO₂), temperatura corporal interna (TCI) y el comportamiento. La concentración de HCN se elevó en aumentos de 10 ppm hasta que se observó un efecto sobre el metabolismo o cuando los animales parecían mostrar signos de distrés. Un efecto metabólico se define como un cambio del 10% en menos de 10 minutos en cualquiera de los valores de ensayo que se han descrito anteriormente.

[0719] Se descubrió que cuando los ratones se expusieron a 80 ppm de cianuro en aire ambiental a temperatura ambiente, redujeron gradualmente su temperatura interna a aproximadamente 34 °C. Esto es distinto del descenso observado con 80 ppm de ácido sulfhídrico, donde la temperatura interna cae hasta aproximadamente 28 grados C. Además, hubo una recuperación muy lenta de la temperatura interna en ratones expuestos a cianuro (aproximadamente 14 horas) en comparación con ácido sulfhídrico (aproximadamente 2 horas).

[0720] Se ensayó la hipótesis de que la recuperación lenta, como se determinó por la temperatura interna, en cianuro podría rescatarse por una breve exposición a 80 ppm de ácido sulfhídrico. Esto se basa en la idea de que, una enzima conservada, rodanasa (u otras enzimas similares), pueden usar ácido sulfhídrico y cianuro para producir el agente relativamente menos tóxico, tiocianato. Ya se ha mostrado que la rodanasa puede usar cianuro y tiosulfato para producir tiocianato. (Chen 1933). Además, la administración intravenosa de tiosulfato la estándar de atención para tratar una intoxicación por cianuro en los Estados Unidos. Se descubrió que el tiempo para recuperar la temperatura interna tras la exposición a cianuro se redujo mediante un breve tratamiento con ácido sulfhídrico. Este resultado sugiere que la exposición a ácido sulfhídrico podría usarse para tratar afecciones en las que los pacientes padecen una intoxicación por cianuro.

[0721] Cada una de las composiciones y procedimientos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden hacerse y ejecutarse sin demasiada experimentación a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y procedimientos de esta invención se han descrito en cuanto a realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y procedimientos, y en las etapas o en la secuencia de los procedimientos descritos en el presente documento sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están relacionados tanto química como fisiológicamente pueden estar sustituidos por los agentes descritos en el presente documento consiguiendo al mismo tiempo los mismos o semejantes resultados. Todos los sustitutos y modificaciones similares de este tipo evidentes para los expertos en la técnica se consideran que están dentro del espíritu, alcance y concepto de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

REFERENCIAS

[0722] Las siguientes referencias se proporcionan en cuanto a que proporcionan procedimientos ejemplares u otros detalles complementarios a los expuestos en el presente documento.

Patente de Estados Unidos 3.777.507
Patente de Estados Unidos 3.881.990
Patente de Estados Unidos 3.989.816

Patente de Estados Unidos 3.995.444
 Patente de Estados Unidos 4.034.753
 Patente de Estados Unidos 4.186.565
 Patente de Estados Unidos 4.266.573
 5 Patente de Estados Unidos 4.292.817
 Patente de Estados Unidos 4.442.856
 Patente de Estados Unidos 4.444.762
 Patente de Estados Unidos 4.447.415
 Patente de Estados Unidos 4.473.637
 10 Patente de Estados Unidos 4.502.295
 Patente de Estados Unidos 4.559.258
 Patente de Estados Unidos 4.723.974
 Patente de Estados Unidos 4.745.759
 Patente de Estados Unidos 4.798.824
 15 Patente de Estados Unidos 4.828.976
 Patente de Estados Unidos 4.938.961
 Patente de Estados Unidos 4.951.482
 Patente de Estados Unidos 5.066.578
 Patente de Estados Unidos 5.157.930
 20 Patente de Estados Unidos 5.217.860
 Patente de Estados Unidos 5.231.025
 Patente de Estados Unidos 5.285.657
 Patente de Estados Unidos 5.326.706
 Patente de Estados Unidos 5.370.989
 25 Patente de Estados Unidos 5.395.314
 Patente de Estados Unidos 5.399.363
 Patente de Estados Unidos 5.405.742
 Patente de Estados Unidos 5.434.045
 Patente de Estados Unidos 5.466.468
 30 Patente de Estados Unidos 5.470.738
 Patente de Estados Unidos 5.476.763
 Patente de Estados Unidos 5.543.158
 Patente de Estados Unidos 5.552.267
 Patente de Estados Unidos 5.568.910
 35 Patente de Estados Unidos 5.569.579
 Patente de Estados Unidos 5.580.781
 Patente de Estados Unidos 5.599.659
 Patente de Estados Unidos 5.636.643
 Patente de Estados Unidos 5.641.515
 40 Patente de Estados Unidos 5.645.081
 Patente de Estados Unidos 5.693.462
 Patente de Estados Unidos 5.699.793
 Patente de Estados Unidos 5.719.174
 Patente de Estados Unidos 5.736.397
 45 Patente de Estados Unidos 5.739.169
 Patente de Estados Unidos 5.752.929
 Patente de Estados Unidos 5.801.005
 Patente de Estados Unidos 5.830.880
 Patente de Estados Unidos 5.846.945
 50 Patente de Estados Unidos 5.912.019
 Patente de Estados Unidos 5.952.168
 Patente de Estados Unidos 6.013.256
 Patente de Estados Unidos 6.046.046
 Patente de Estados Unidos 6.054.261
 55 Patente de Estados Unidos 6.057.148
 Patente de Estados Unidos 6.100.082
 Patente de Estados Unidos 6.187.529
 Patente de Estados Unidos 6.365.338
 Patente de Estados Unidos 6.490.880

- Patente de Estados Unidos 6.492.103
 Patente de Estados Unidos 6.524.785
 Patente de Estados Unidos 6.552.083
 Patente de Estados Unidos 6.602.277
- 5 Patente de Estados Unidos 6.790.603
 Sol. de Patente de Estados Unidos 10/971.575.
 Sol. de Patente de Estados Unidos 10/971.576
 Sol. de Patente de Estados Unidos 10/972.063
 Sol. Prov. de Estados Unidos 60/513.458
- 10 Sol. Prov. de Estados Unidos 60/548.150
 Sol. Prov. de Estados Unidos 60/557.942
- Alam, Antioxid Redox Signal, 4 (4): 559-62, 2002. Amersi y col., Hepatology, 35 (4): 815-823, 2002.
 Austin-Ward and Villaseca, Revista Medica de Chile, 126 (7): 838-845, 1998.
- 15 Barton & Ollis, Oxford, UK, Jones (Ed.), Pergamon Press, 3: 373-487, 1979.
 Baskin and Wang, Tetrahedron Lett., 43: 8479-8483, 2002.
 Baskin y col., Org. Lett., 4: 4423, 2002.
 Beauchamp y col., Crit. Rev. Toxicol. 13, 25, 1984.
 Beck y col., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 823, 1954.
- 20 Behringer y col., Crit. Care Med., 31 (5): 1523-1531, 2003.
 Bellamy y col., Crit. Care Med., 24 (2 Suppl): S24-47, 1996.
 Bernard y col., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 90: 235-242, 1985.
 Bernard y col., N. Engl. J. Med., 346 (8): 557-563, 2002.
 Blackstone y col., Science, 308: 518, 2005.
- 25 Boyce and Ham, J. Invest. Dermatol., 81: 335-405, 1983.
 Boyce and Ham, J. Tissue Culture Methods, 9: 83-93, 1985.
 Brieze, Neurosci. Biobehav. Rev., 22 (3): 427-436, 1998.
 Brizel, Seminars Radiation Oncol., 8 (4Suppl): 17-20, 1998.
 Brouard y col., J. Biol. Chem., 277 (20): 17950-17961, 2002.
- 30 Bukowski y col., Clinical Cancer Res., 4 (10): 2337-2347, 1998.
 Bums & Murphey, Arch. Biochem. Biophys., 339: 33-39, 1997.1997
 Bums y col., Arch. Biochem. Biophys., 10: 60-68, 1995.
 Cairns y col., J. Am. Chem. Soc., 74: 3982, 1952.
 Chapter IV; Chapter VI; Chapter VII; Chapter VIII; Chapter IX of Klayman, D. L.; Gunther, W. H. H. Eds, Wiley
- 35 Interscience, New York, 1973.
 Chasteen and Bentley, Chem. Rev., 103 (1): 1-25, 2003. Christodoulides y col., Microbiology, 144 (Pt 11): 3027-3037, 1998.
 CIIT (Chemical Industry Institute of Toxicology), In: 90 day vapor inhalation toxicity study of hydrogen sulfide, Toxigenics, 420-0710, 1983.
- 40 Clive y col., J. Org. Chem., 47: 1641, 1982.
 Cloarec & Charette, Org. Lett., 6: 4731, 2004.
 Cohen y col., Ann. Thorac. Surg., 67 (5): 1489-1491, 1999.
 Curran, Seminars Radiation Oncol., 8 (4Suppl): 2-4, 1998.
 Davidson y col., J. Immunother., 21 (5): 389-398, 1998.
- 45 Davis (1994)
 Demuynck and Vialle, Bulletin de la Societe Chimique de France, 4: 1213-1218, 1967 Demuynck y col., Bulletin de la Societe Chimique de France, 3366-3367, 1966. Demuynck y col., Bulletin de la Societe Chimique de France, 8: 2748-2754, 1967. Dhanasekaran y col., J. Biol. Chem., 279: 37575-37587, 2004. Dillman, Cancer Biother. Radiopharm., 14 (1): 5-10, 1999.
- 50 Dittmer and Hoey, In: The Chemistry of Sulphinic Acids, Esters, and Their Derivatives, Wiley: Chichester, U.K., 239-273, 1990.
 Dorman y col. Neurotoxicol. Teratol., 22 (1): 71-84, 2000. Dulak y col., Antioxid. Redox Signal, 4 (2): 229-240, 2002.
 Duus., In Comprehensive Organic Chemistry: The Synthesis and Reactions of Organic Compounds, 1st Ed., 1994.
 Eto y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 293: 1483-1488, 2002. Ganther, Carcinogenesis 20 (9): 1657-66 (1999)
- 55 Gilbert y col., LANCET, 355: 375-376, 2000.
 Gladysz y col., J. Org. Chem., 43: 1204, 1978.
 Glass, Phosph. Sulfur Silicon Rel. Elem., 136, 137, 138: 159-174, 1998.
 Gorman y col., Toxicology, 187 (1): 25-38, 2003.
 Guillemin y col., Cell, 89 (1): 9-12, 1997.

- Hanibuchi y col., *Intl. J. Cancer*, 78 (4): 480-45, 1998.
 Hannan y col., *JAMA*, 290 (6): 773-780, 2003.
 Harris, J. *Org. Chem.*, 25: 225, 1960.
 Harris, J. *Org. Chem.*, 30: 2190, 1965.
- 5 Hays, In: *Studies of the Effects of Atmospheric Hydrogen Sulfide in Animals*, thesis dissertation, University of Missouri-Columbia, 1972.
 Hellstrand y col., *Acta Oncologica*, 37 (4): 347-353, 1998.
 Higuchi and Fukamachi, *Folia Pharmacologica Japonica*, 73 (3): 307-319, 1977.
 Hobert y col., *Organometallics*, 20: 1370, 2001.
- 10 Hochachka y col., *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 130 (4): 435-459, 2001.
 Hochachka y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 (18): 9493-94938, 1996.
 Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66 (11): 5329-5336, 1998.
 Hwang & Greenberg, *Biochemistry*, 38: 14248, 1999.
 Hyspler y col., *J. Chromatography*, 770: 255-259, 2002.
- 15 Innicenti y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 5769 (2004).
 Jiang y col., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280: 1140-1150, 2001.
 Ju y col., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59 (3): 241-50, 2000.
 Kamoun, *Amino Acids* 26, 243, 2004.
 Kelso y col., *J. Biol. Chem.*, 276: 4588-4596, 2001.
- 20 Khan y col., *Toxicol. Applied Pharmacol.*, 103: 482-490, 1990.
 Kilburn and Warshaw, *Toxicology Indust. Health*, 11 (2): 185-197, 1995.
 Kilburn, *Environ. Health*, 54(3): 150, 1999
 Kilburn, *Environ. Res.*, 81 (2): 92-99, 1999.
 Knapp and Darout, *Org. Lett.*, 7: 203, 2005.
- 25 Kontou y col., *J. Agriculture and Food Chem.*, 52: 1212, 2004.
 Kuroda y col., *Transplantation*, 46 (3): 457-460, 1988.
 Kuroda y col., *Transplantation*, 46 (3): 457-460, 1988.
 Lai y col., *Biochemistry*, 40: 4904-4910, 2001.
 Langer y col., *Biochemistry* 33: 14034, 1994.
- 30 Langer y col., *Biochemistry*, 33: 10867, 1997.
 Ledingham y col., *Circulation*, 82 (2): IV351-358, 1990.
 Ledingham y col., *J. Thorac. Cardiobasc. Surg.*, 93: 240-246, 1987.
 Lee y col., *J. Nuc. Med.* 26: 72, 1985.
 Liu y col., *J. Org. Chem.*, 67: 9267, 2002.
- 35 Lundgren-Eriksson y col., *Anticancer Res.* 2001 Sep-Oct; 21 (5): 3269-74 Mehlhorn y col., *Cardiovasc Surg.*, 9 (5): 482-486, 2001. Menasche y col., *Eur. J. Cardio. Thorax. Surg.*, 8: 207-213, 1994. Michaels y col., *Circulation*, 106 (23): e187-190, 2002. Mugeshe y col., *Chem. Rev.*, 101: 2125, 2001.
 Murai and Kato, In: *Organoselenium Chemistry: Modern Developments in Organic Synthesis*, Wirth (Ed.), Springer, NY, Vo. 28, 2000.
- 40 Murai, y col., *J. Org. Chem.*, 66: 8101, 2001.
 Netherton & Fu, *Org. Lett.*, 3: 4295, 2001.
 Noguchi y col., *Biochemistry*, 42: 11642, 2003. Nogueira y col., *Chem. Rev.*, 104: 6255, 2004. Nystul y col., *Science*, 302 (5647): 1038-1041, 2003. O'Sullivan y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 126: 2194, 2004. Olojo y col., *J. Phys. Chem. A*, 108: 1018, 2004.
- 45 Otterbein y col., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 279 (6): L1029-L1037, 2000. Otterbein y col., *Trends Immunol.*, 24 (8): 449-455, 2003. Padilla y col., *Molec. Biology of the Cell*, 13: 1473-1483, 2002.
 Padilla y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (13): 7331-7335., 2001. Partlo y col., *Neurotoxicology*, 22 (2): 177-189, 2001.
 PCT Appln. WO 94/17178
- 50 Petersen, *Biochemica et Biophysica Acta*, 460: 299-307, 1977. Pietras y col., *Oncogene*, 17 (17): 2235-2249, 1998.
 Punch y col., 2001
 Qin y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (24): 14411-14416, 1998. Quirante y col., *J. Org. Chem.*, 67: 2323, 2002.
 Rager y col., *NC Med. J.*, 65 (1): 18-25, 2004. Reigan y col. *J. Med. Chem.*, 48: 392, 2005.
 Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 15th ed., pages 1035-1038 and 1570-1580, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.
- 55 Rogers y col., *Mamm. Genome*, 8: 711-713, 1997. Ryter and Otterbein, *BioEssays*, 26: 270-280, 2004.
 Seburg abd Squires, *Intl. J. Mass Spectrometry Ion Proc.*, 167/168: 541, 1997.
 Semenza, *Cell*, 98 (3): 281-284, 1999. Semenza, *Trends Mol. Med.*, 7 (8): 345-350, 2001. Shaw (1996)

- Shawali y col., J. Org. Chem., 61: 4055, 2001. Shen y col., J. Agric. Food Chem., 50: 2644, 2002. Smith y col., Eur. J. Biochem., 263: 709-716, 1999. Soledad y col., Org. Lett., 3: 1213, 2001. Steudel, Chem. Rev., 102: 3905, 2002. Struve y col., Neurotoxicology, 22 (3): 375-385, 2001. Sundarajan y col., Macromolecules, 35: 3331, 2002. Supuran y col., Med. Res. Rev., 23 (2): 146-189, 2003.
- 5 Sweeney, In: A Survey of Compounds from the Antiradiation Drug Development Program of the U.S. Army Medical Research and Development Command. Walter Reed Army Institute of Research, Washington D.C., 1979.
- Teodoro and O'Farrell, EMBO J., 22 (3): 580-587, 2003.
- The Hypothermia After Cardiac Arrest Study Group y col., 2002.
- Tisherman, Crit. Care Med., 32 (2): S46-S50, 2004.
- 10 Van Voorhies y col., J. Exp. Biol., 203 (Pt 16): 2467-2478, 2000.
- Wang y col., 1992 Wang y col., 1993 Wang y col., 1994
- Wang, FASEB J., 16 (13): 1792-1798, 2002.
- Yaffe y col., Crit. Care Med., 32 (2): S51-55, 2004.
- Yaghi y col., Nature, 423 (6941): 705-714, 2003.
- 15 Yang y col., J. Agric. Food Chem., 52: 7051, 2004.
- Yoshikawa y col., J. Biochem. (Tokyo), 71: 859-872, 1972.
- Zhang y col., J. Appl. Physiol. 96 (1): 392-397, 2004.
- Zhang y col., J. Org. Chem. 63: 5314, 1998. Ziegler, Ann. Rev. Biochem. 54, 305, 1985.

REIVINDICACIONES

1. Uso de H_2S para la fabricación de un producto farmacéutico para el tratamiento de choque
5 hemorrágico, en el que el producto farmacéutico se formula para administración intravenosa o administración por
 inhalación.
2. Uso de la reivindicación 1, en el que el tratamiento es durante una pérdida de sangre.
3. Uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el tratamiento se va a realizar antes de una cirugía, en
10 particular en el que la cirugía es una cirugía electiva, una cirugía planeada, una cirugía de emergencia, o una cirugía
 cardio-pulmonar.
4. Uso de la reivindicación 3, en el que el ácido sulfhídrico se formula para administración por
15 nebulización.
5. Uso de la reivindicación 1, en el que el producto farmacéutico se formula en forma de un gas, un
 líquido semi-sólido, un líquido, o un sólido.
6. Uso de la reivindicación 1, en el que el producto farmacéutico se formula para administración por
20 infusión.
7. H_2S para su uso en el tratamiento de choque hemorrágico, en el que el H_2S se formula para
 administración intravenosa o administración por inhalación.

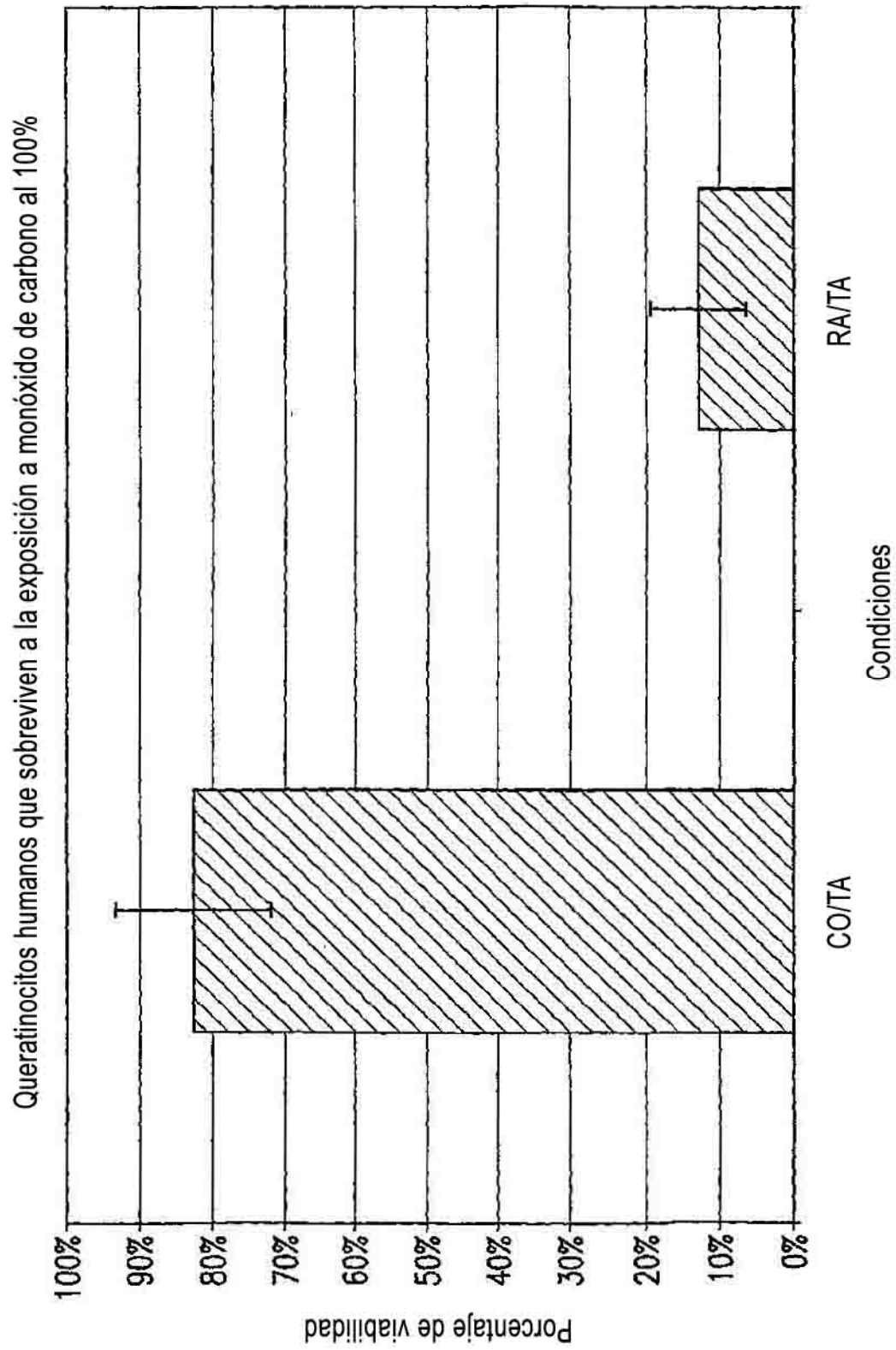
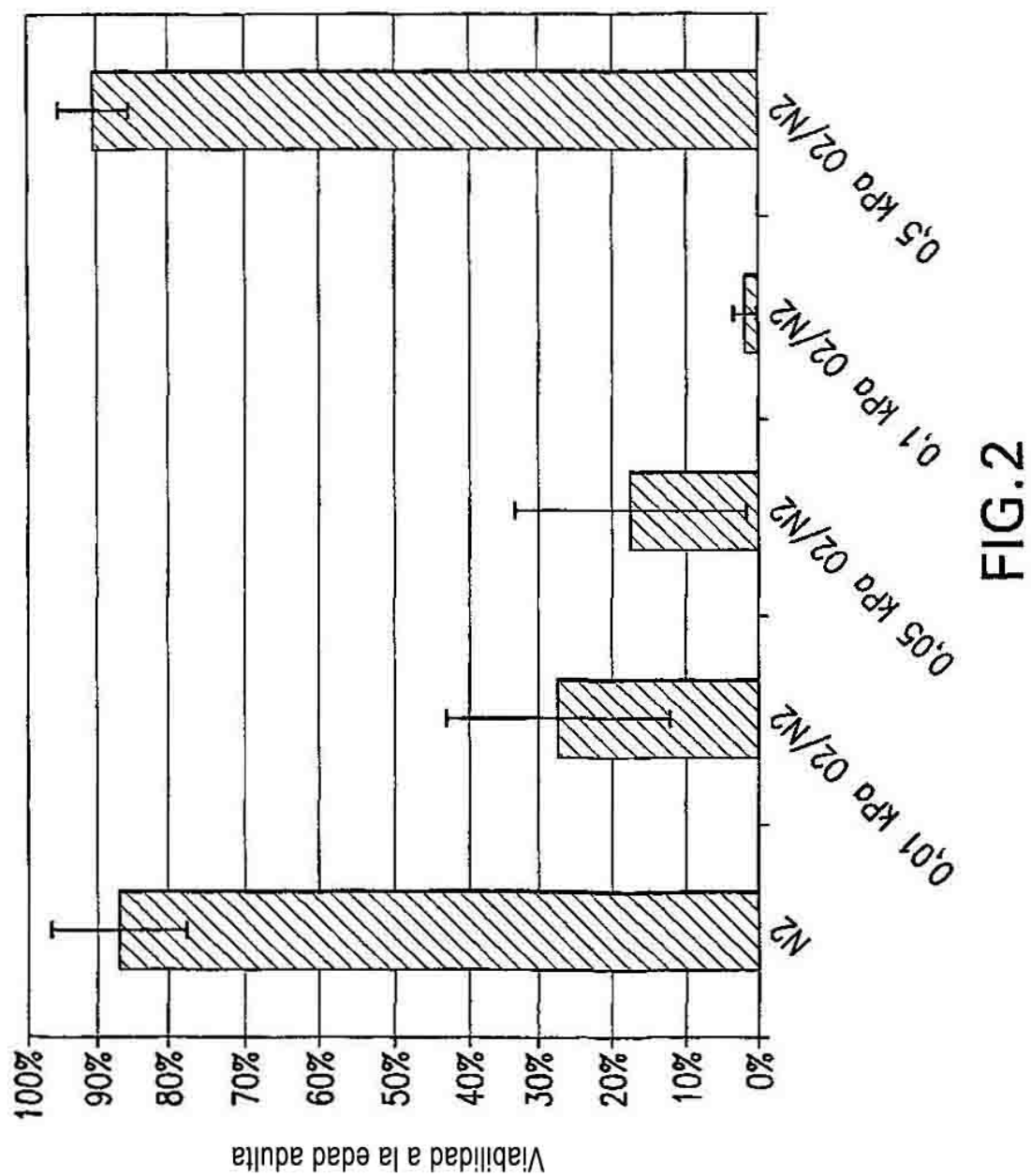


FIG.1



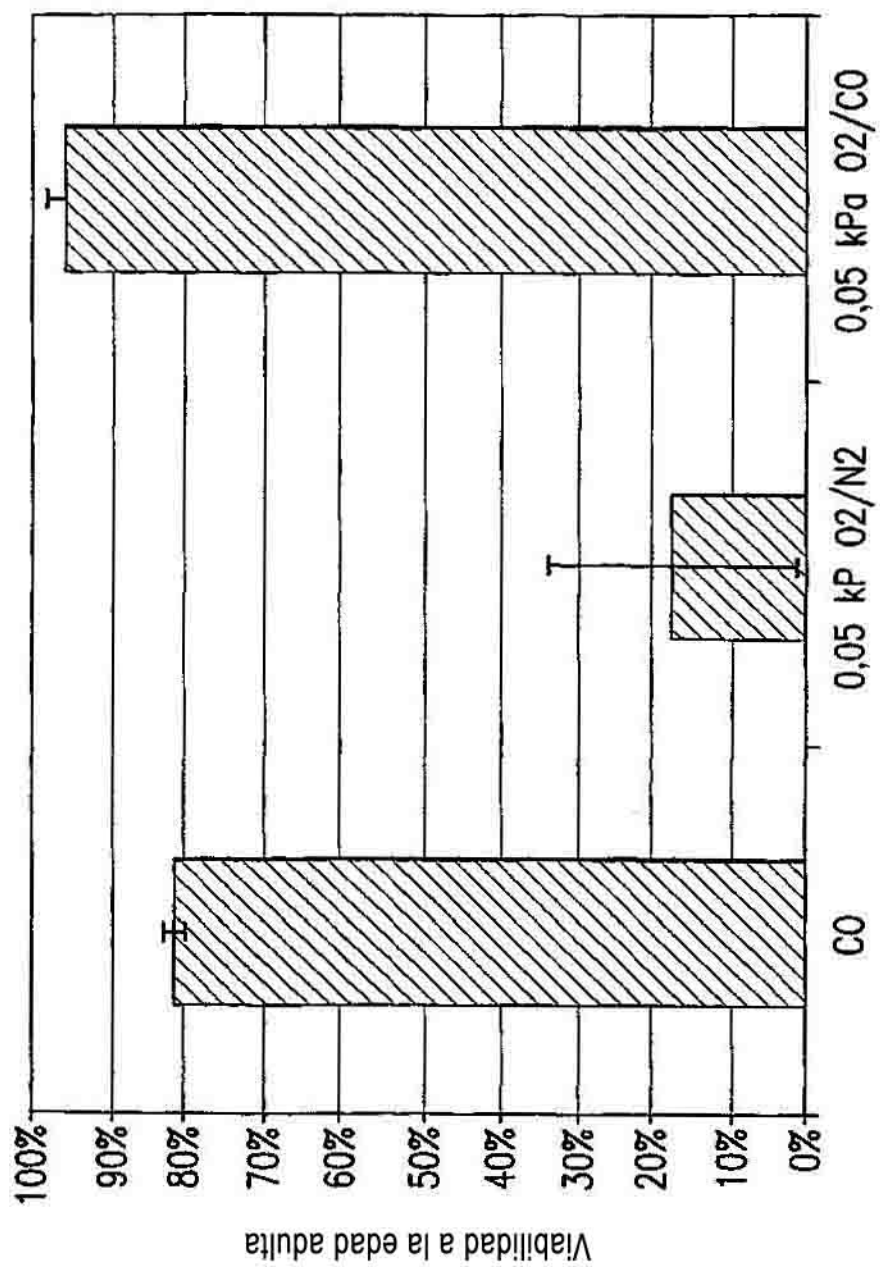


FIG.3

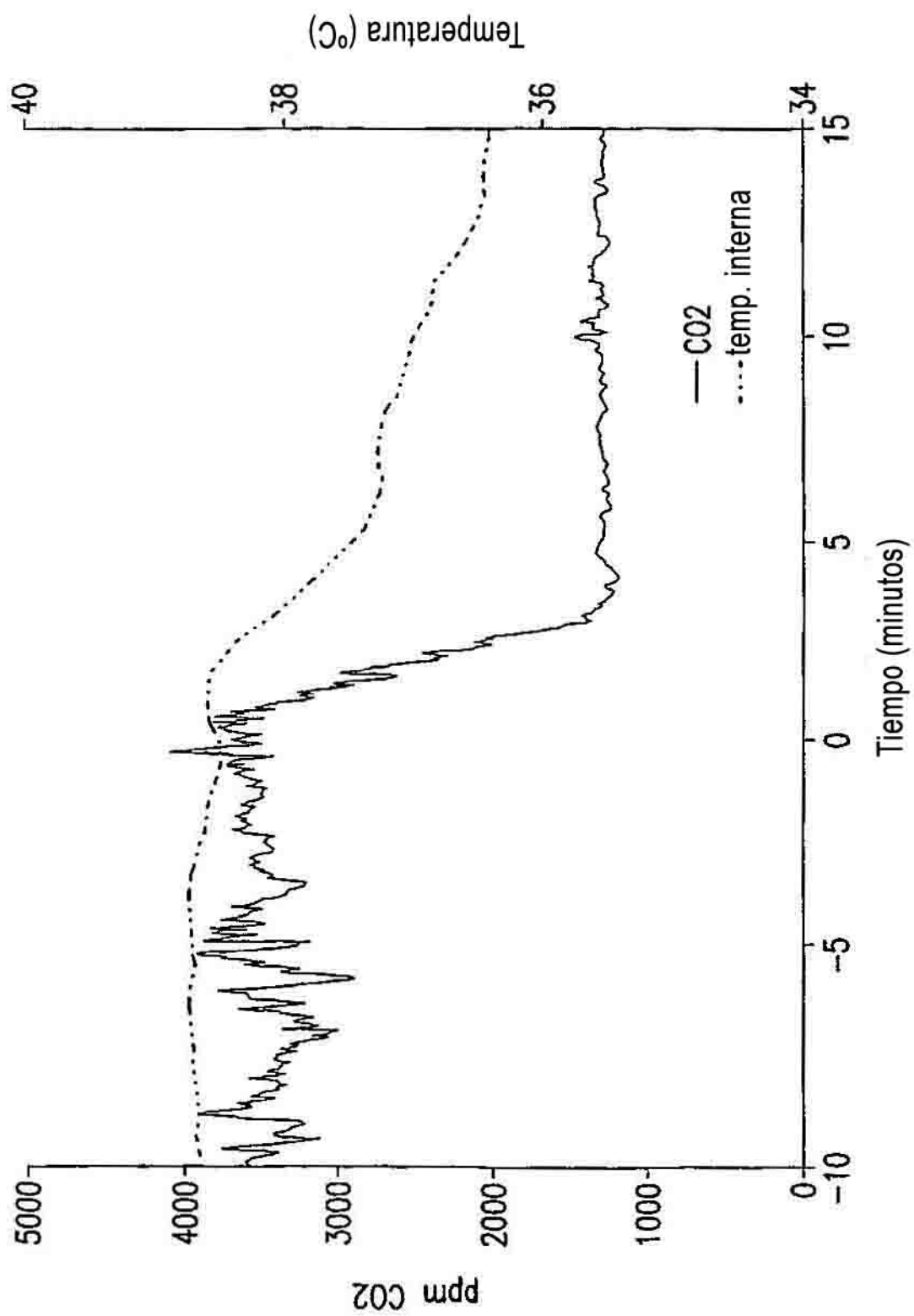


FIG.4A

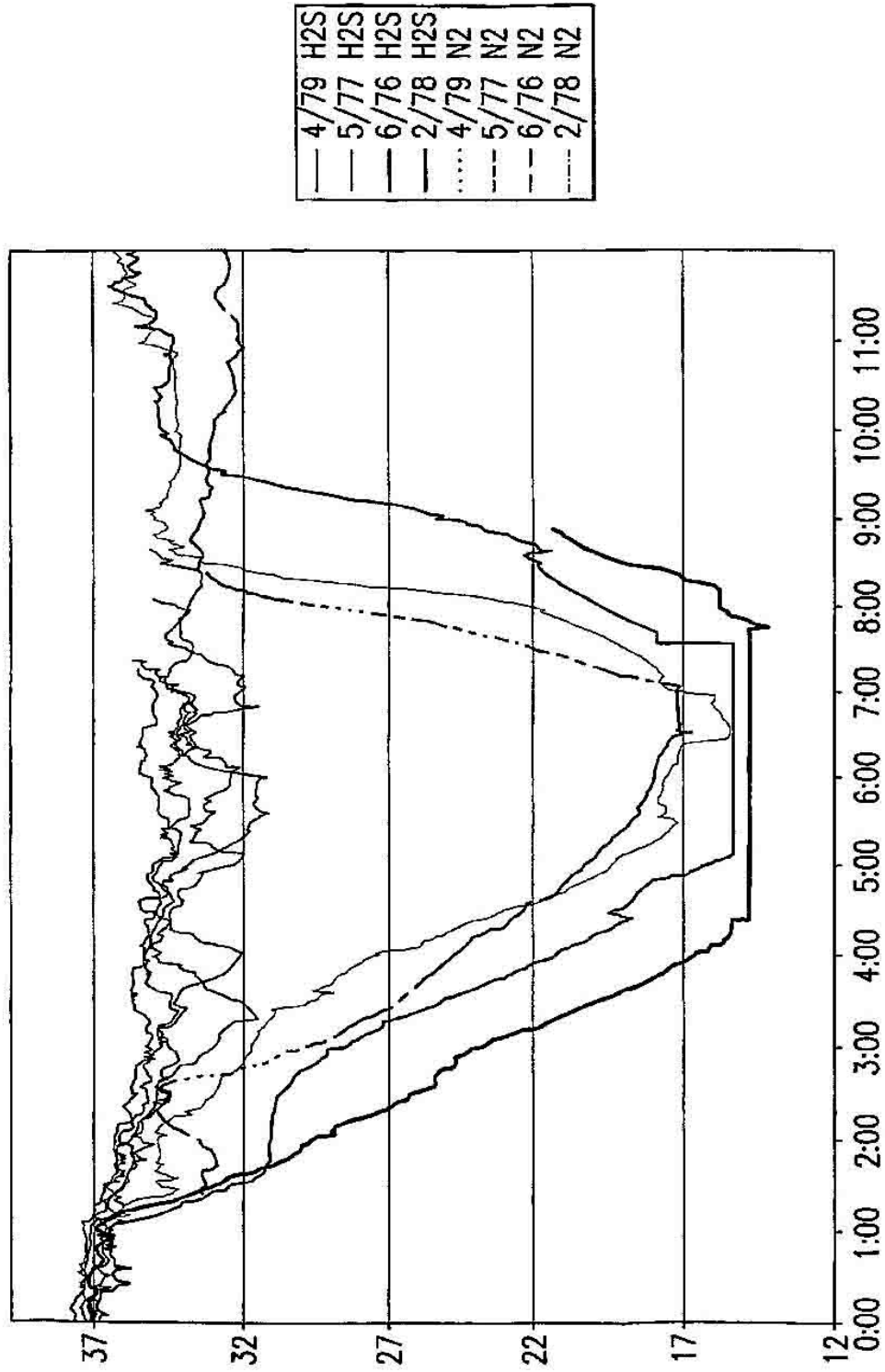


FIG.4B

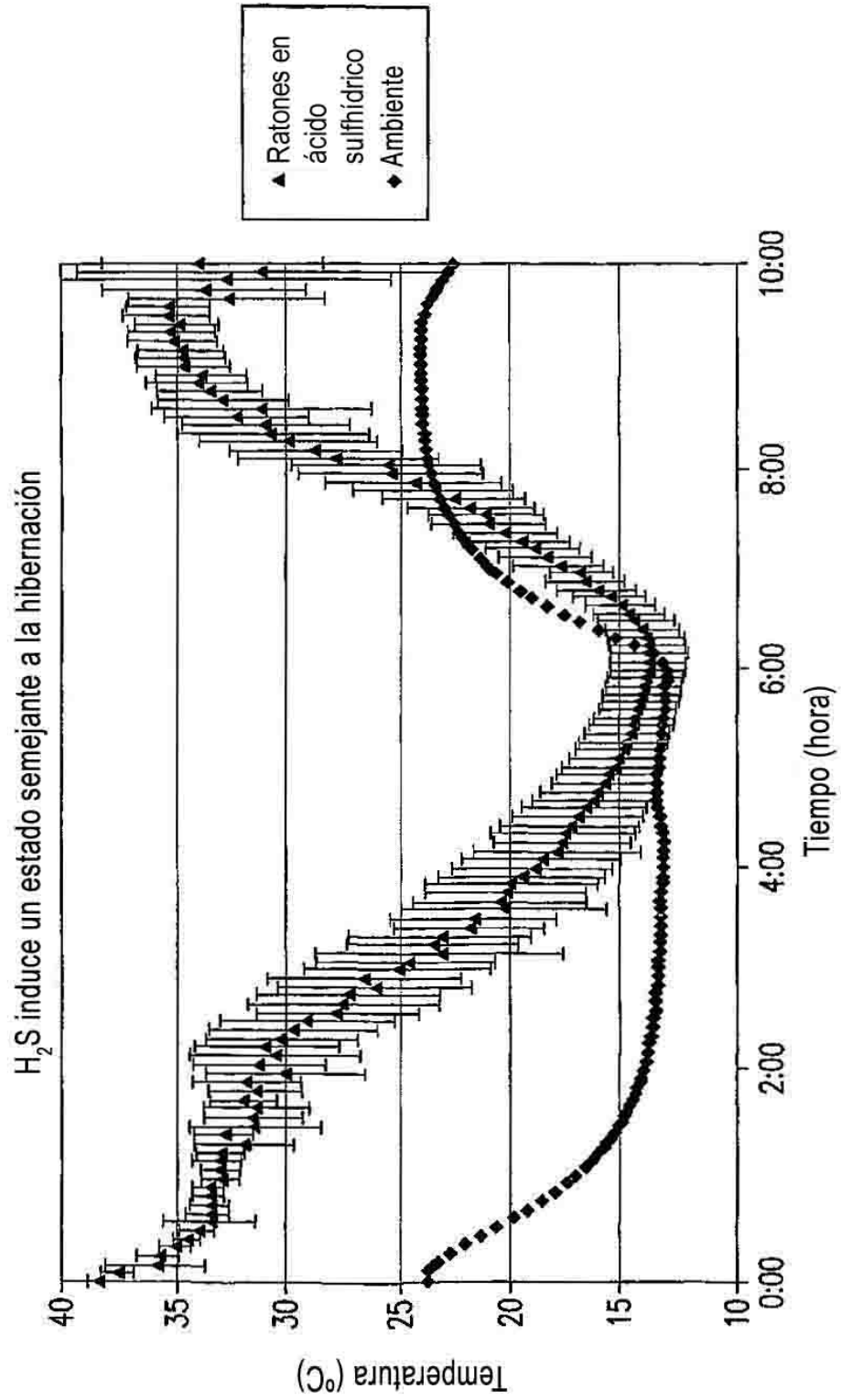


FIG.5

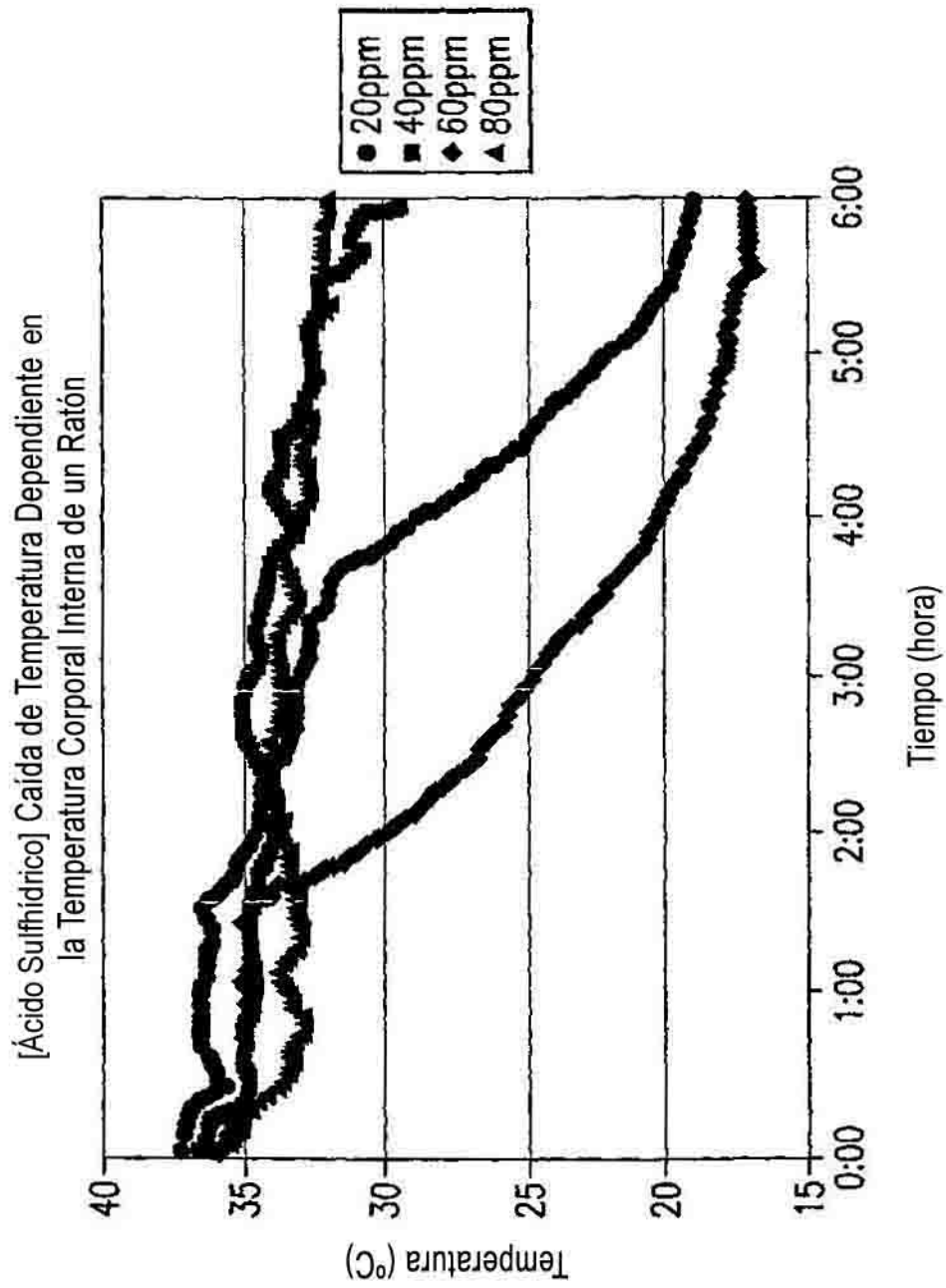


FIG.6

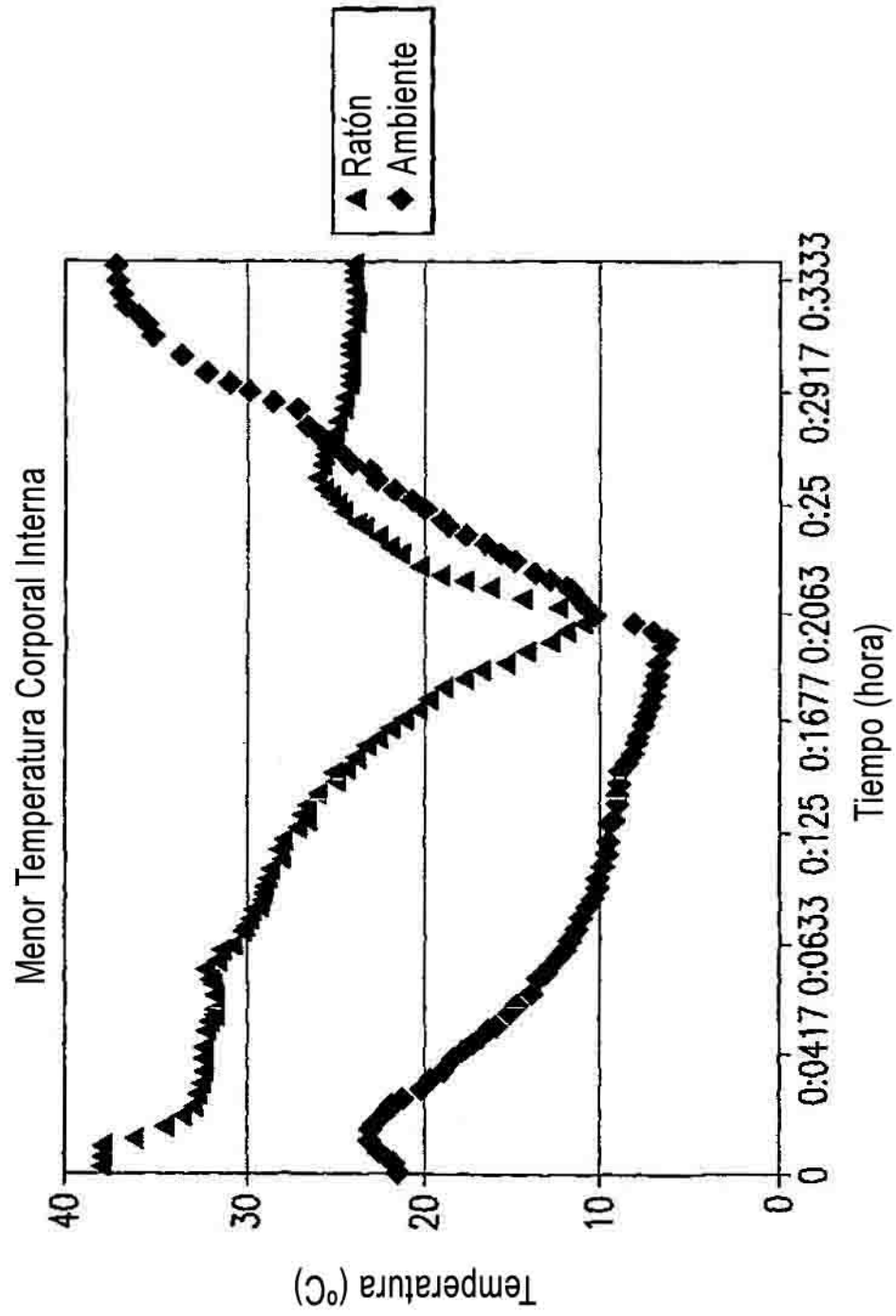


FIG.7

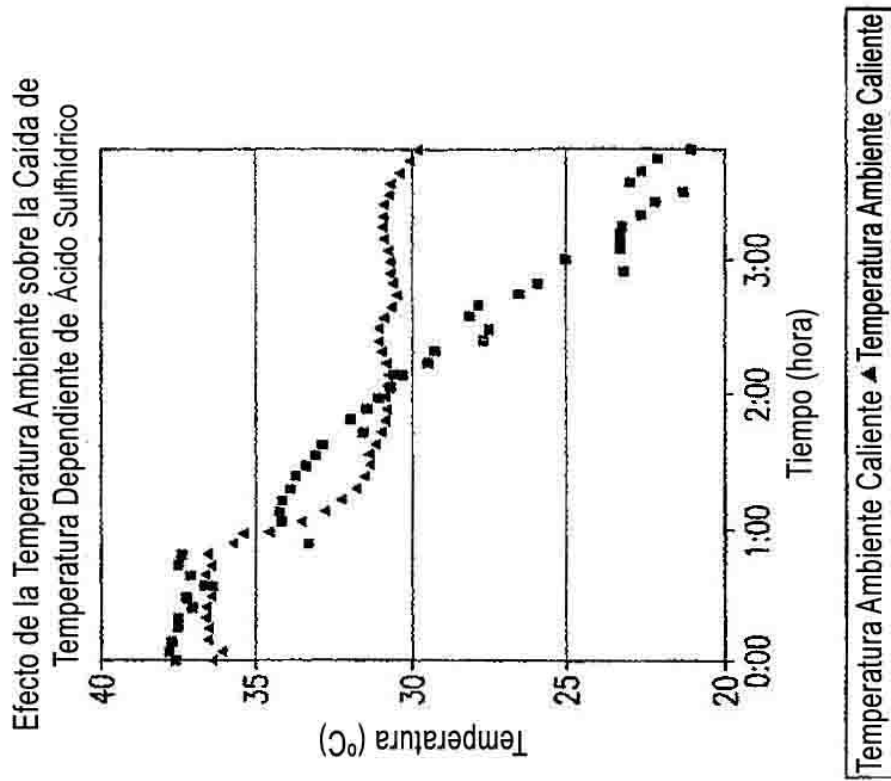


FIG.8B

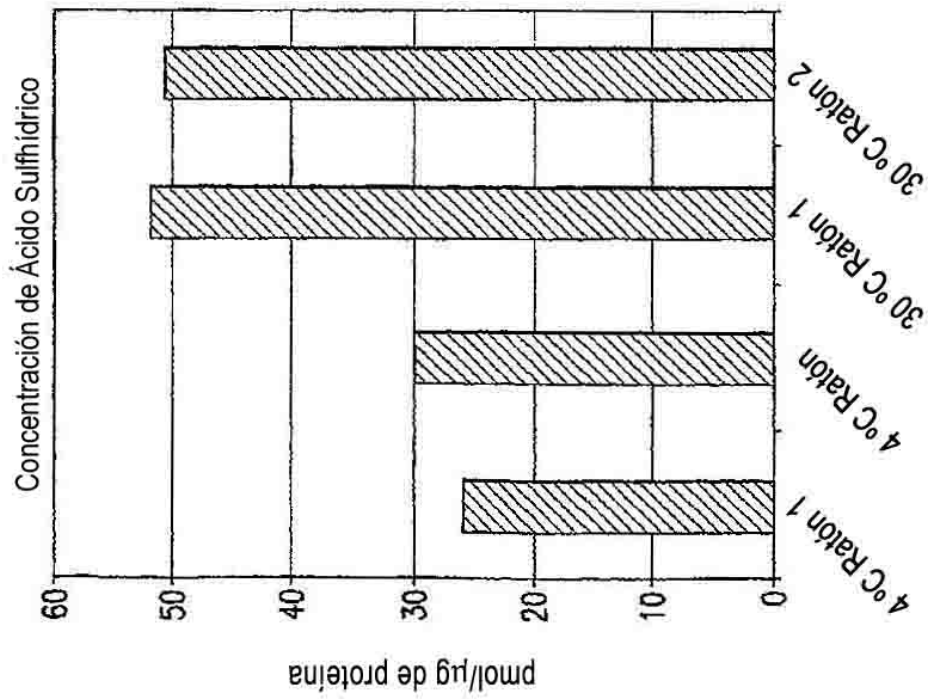


FIG.8A

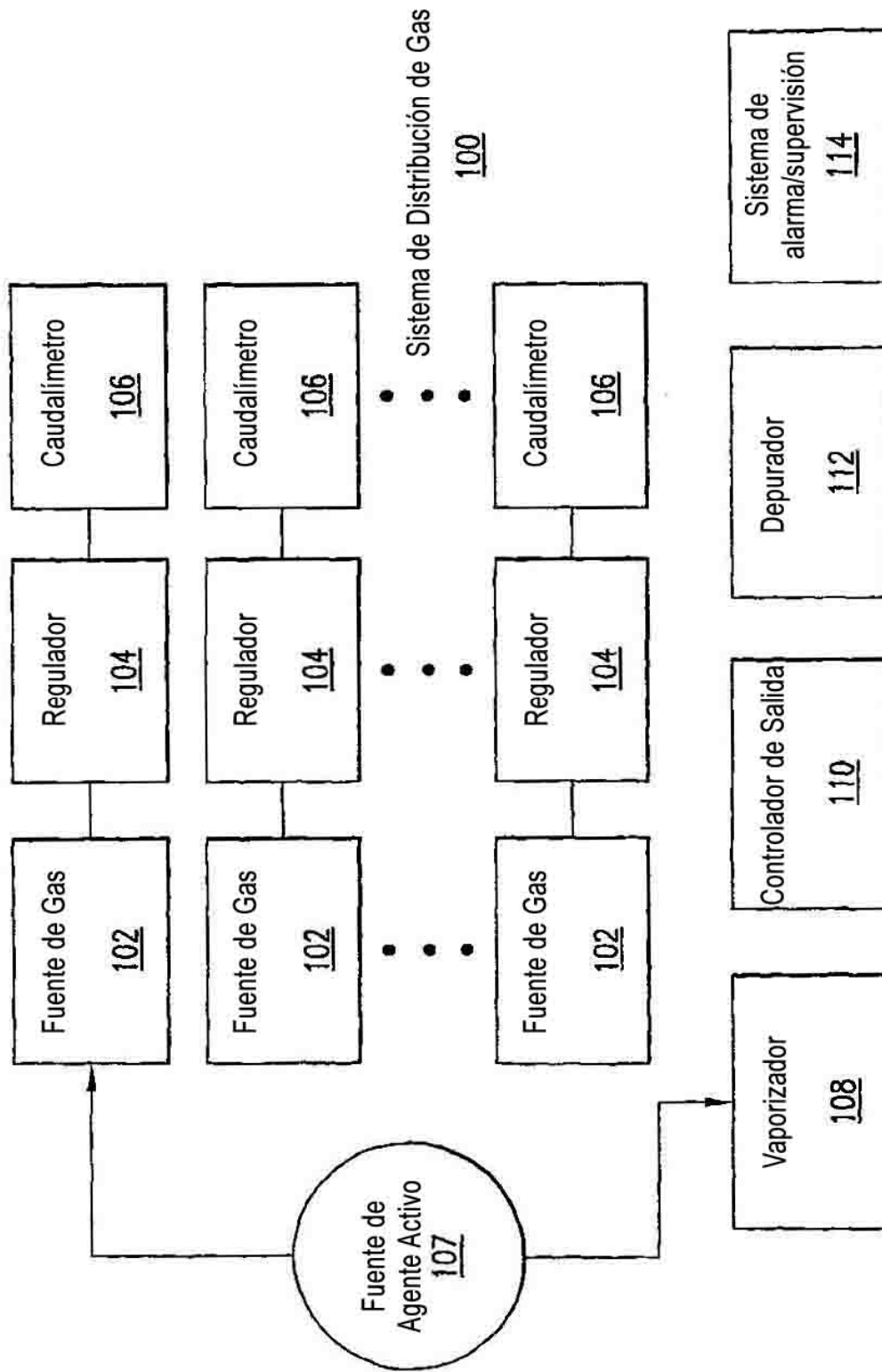


FIG.9

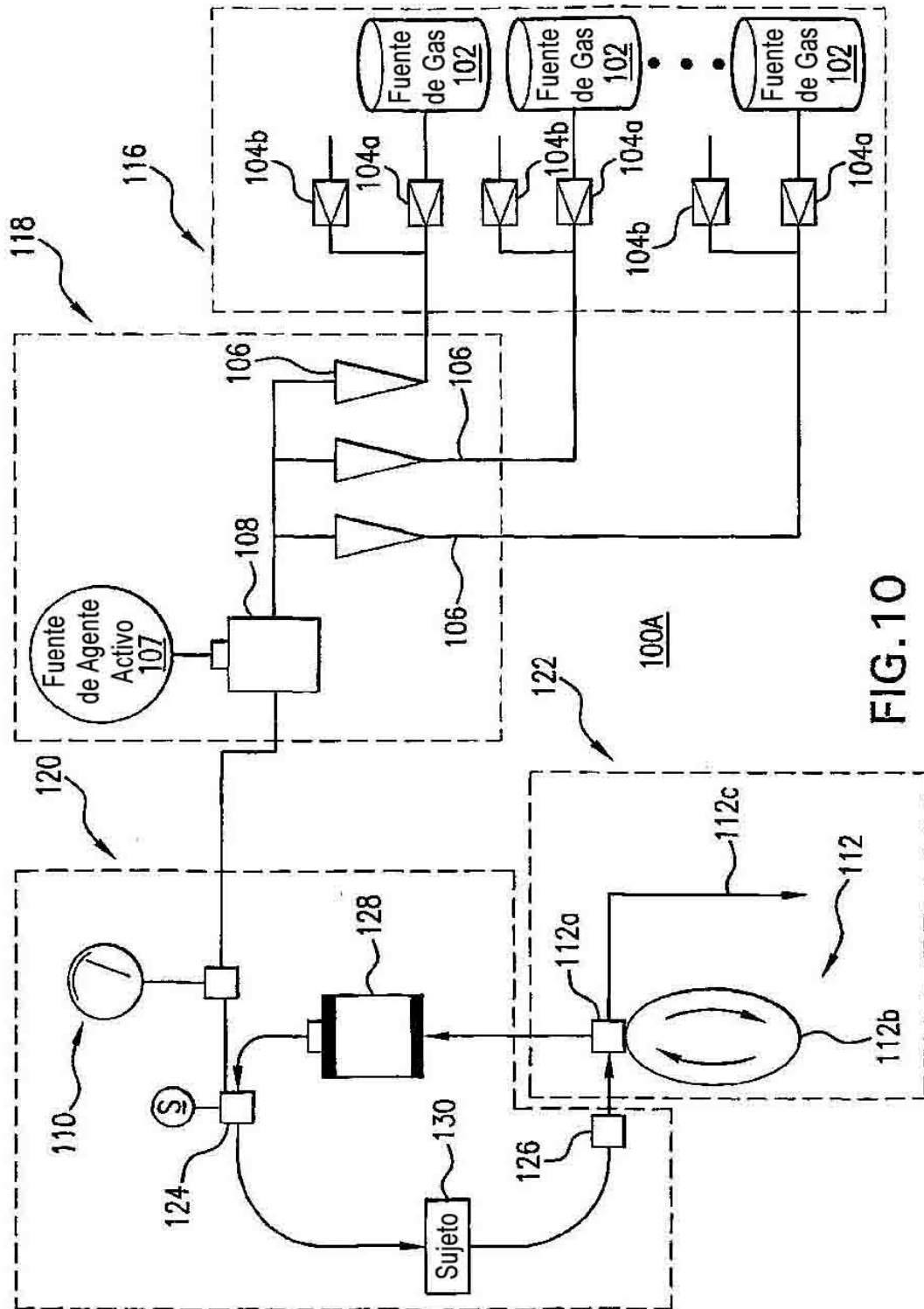


FIG. 10

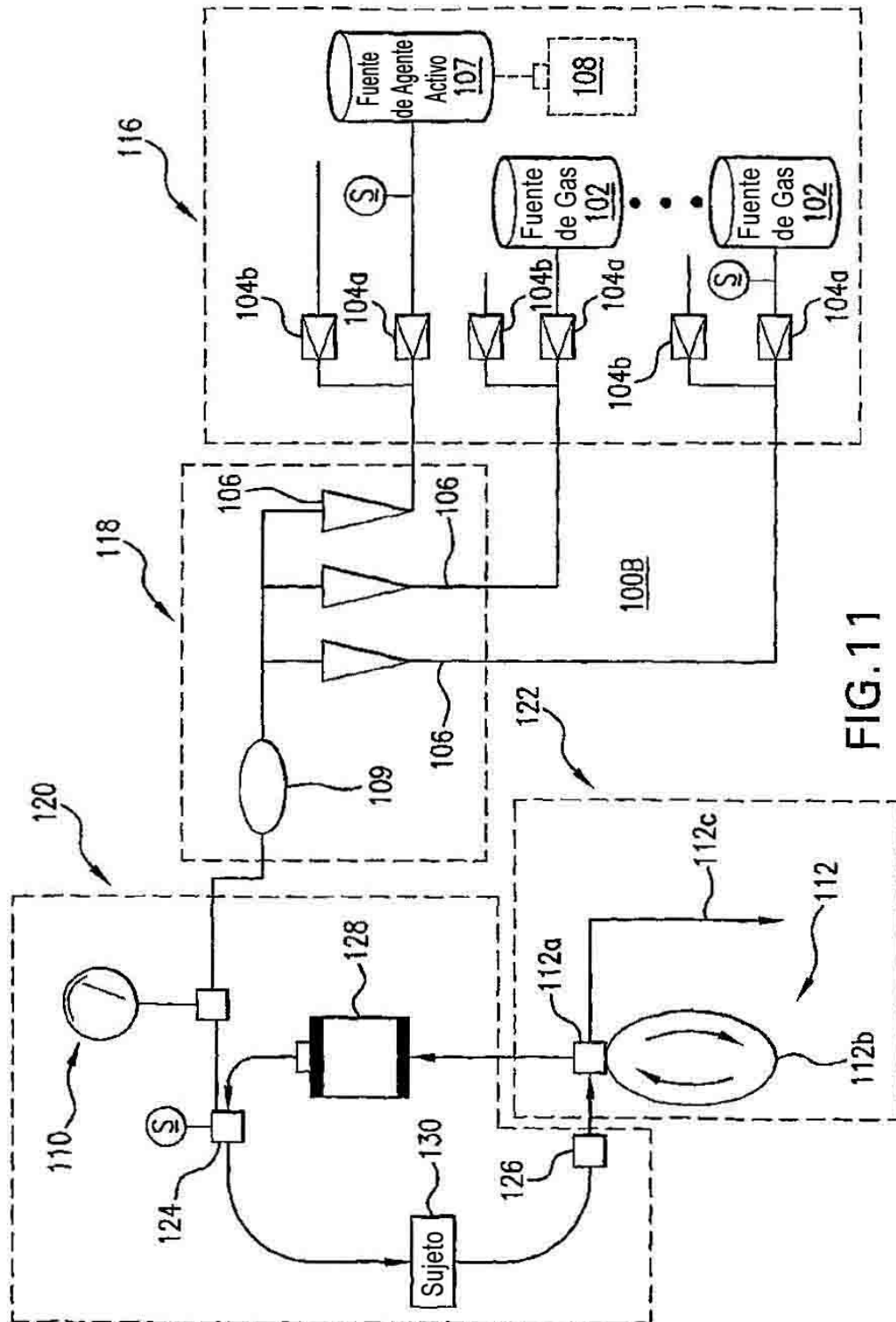


FIG. 11

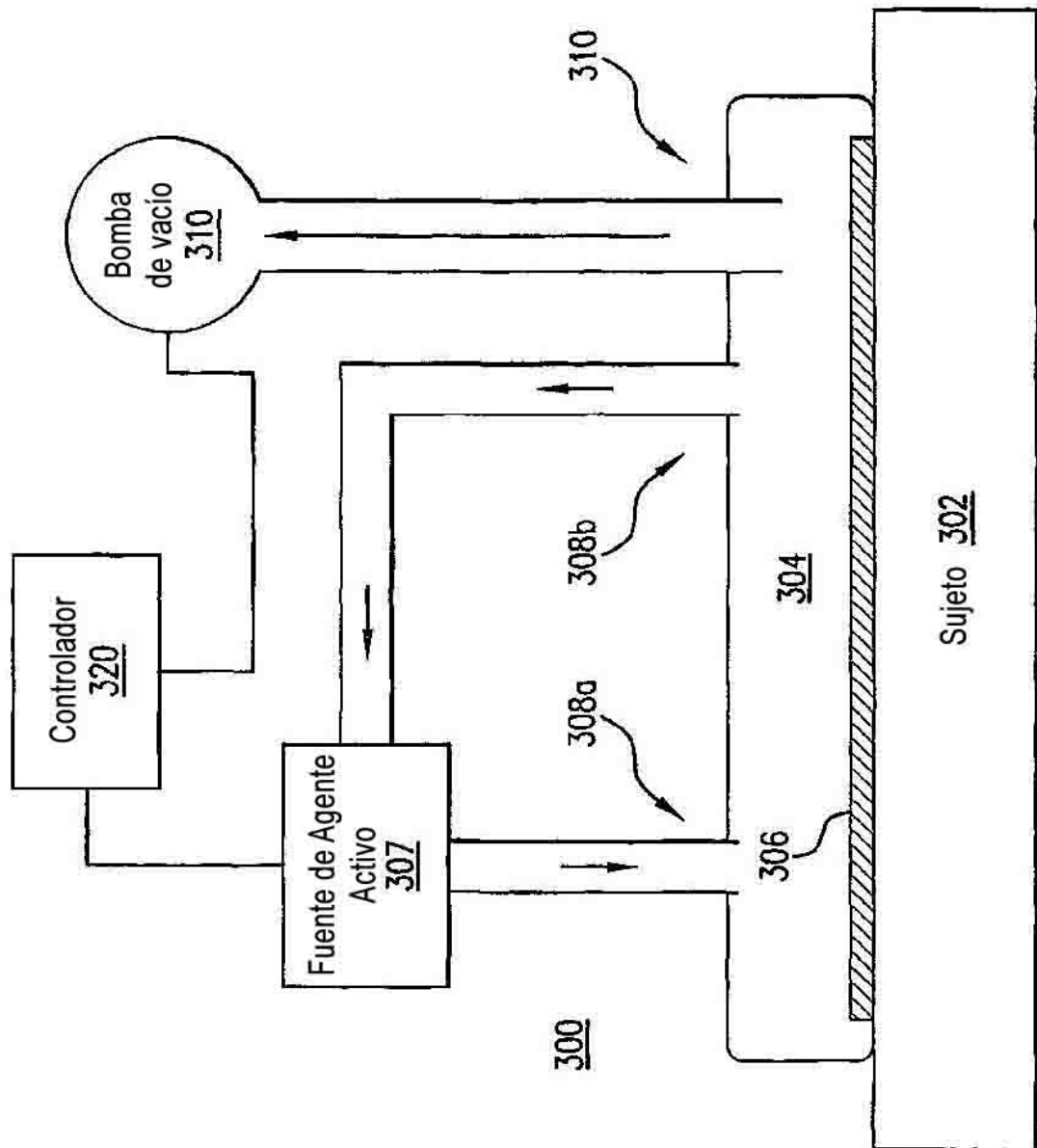


FIG.12

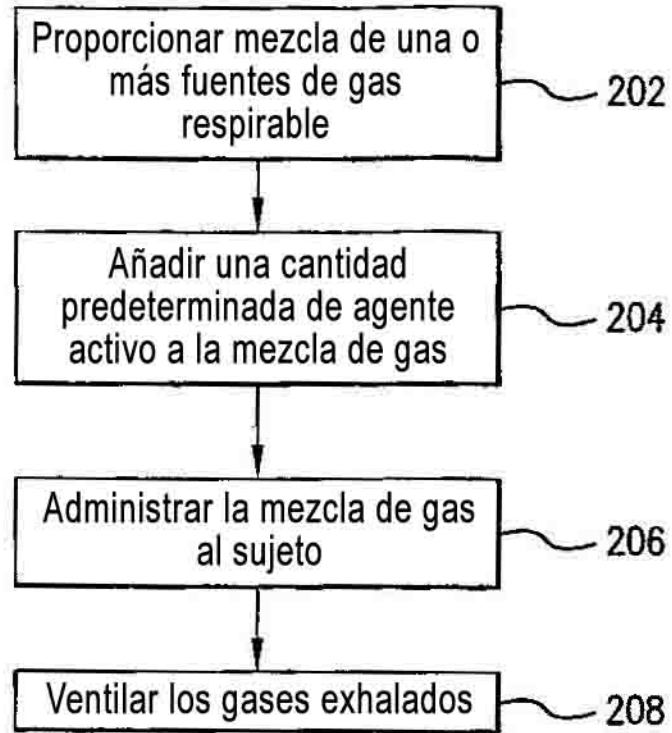


FIG. 13

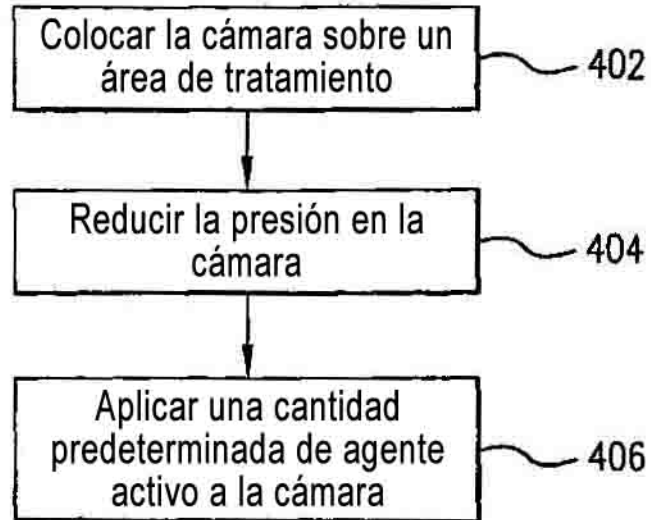


FIG.14

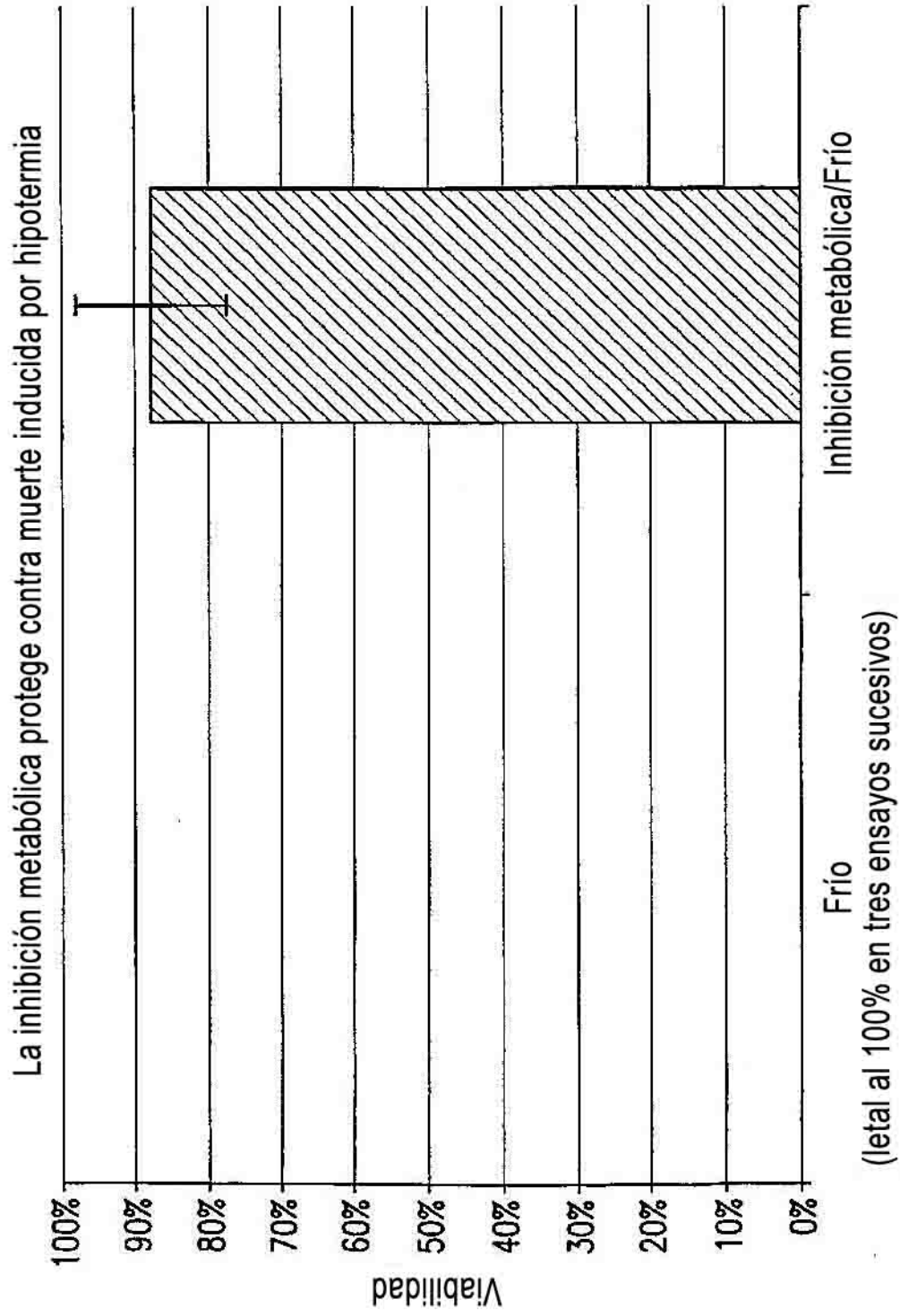


FIG.15

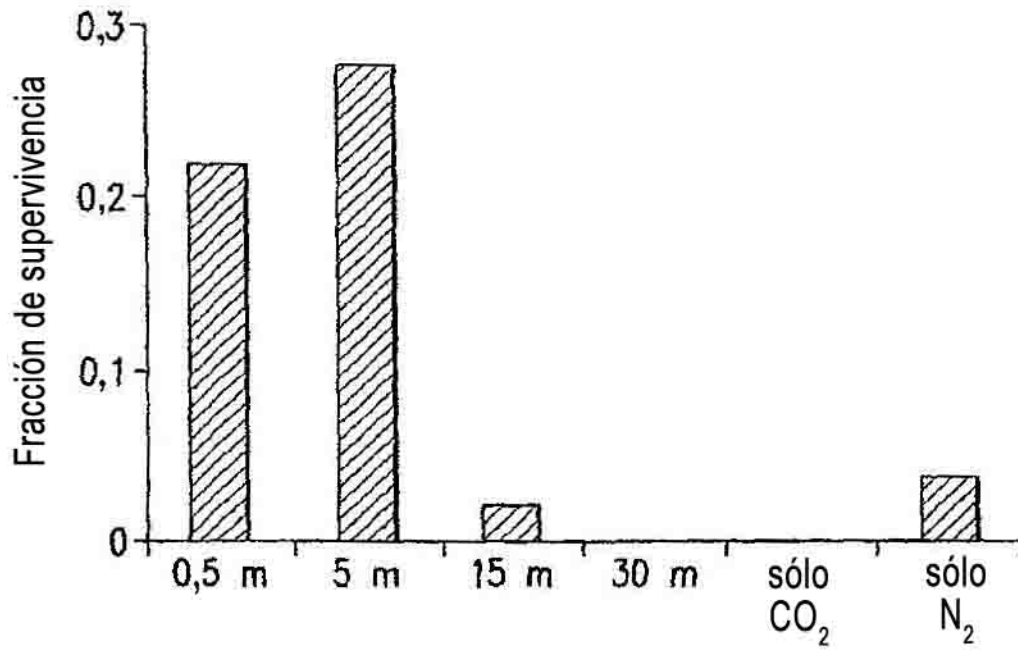


FIG.16

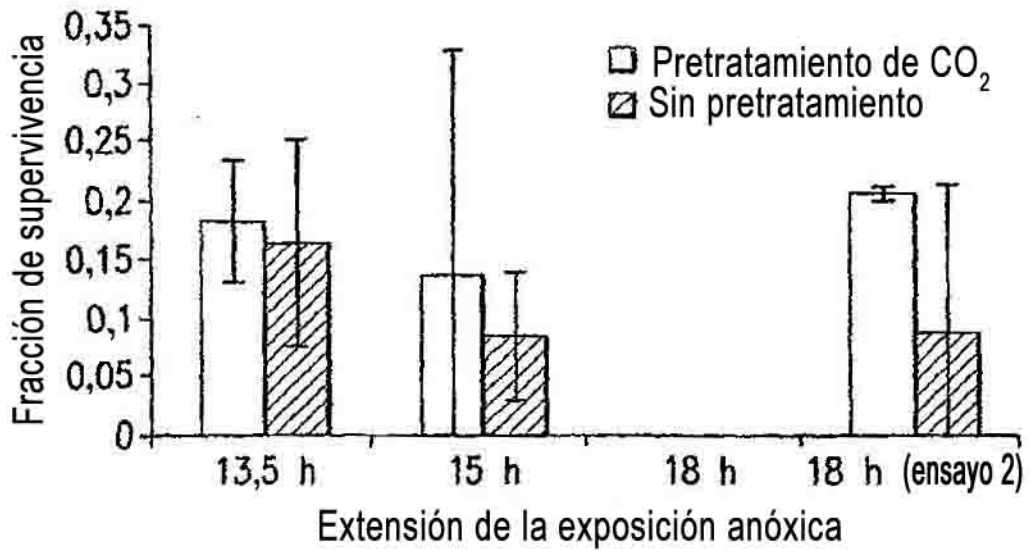


FIG.17

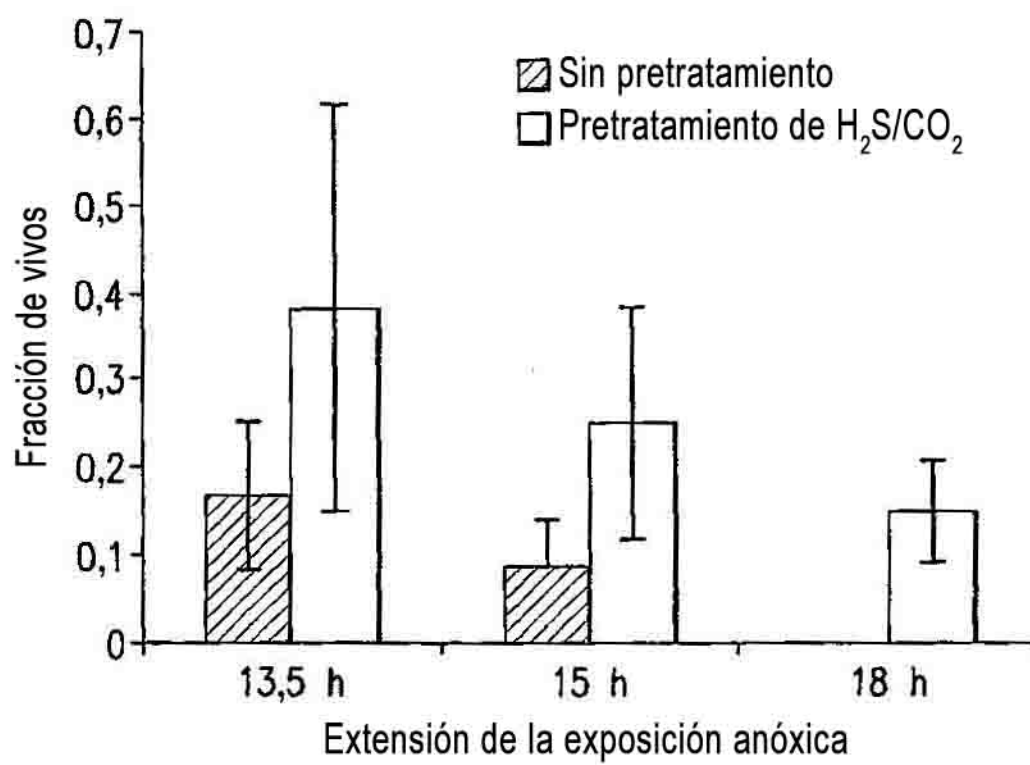


FIG.18

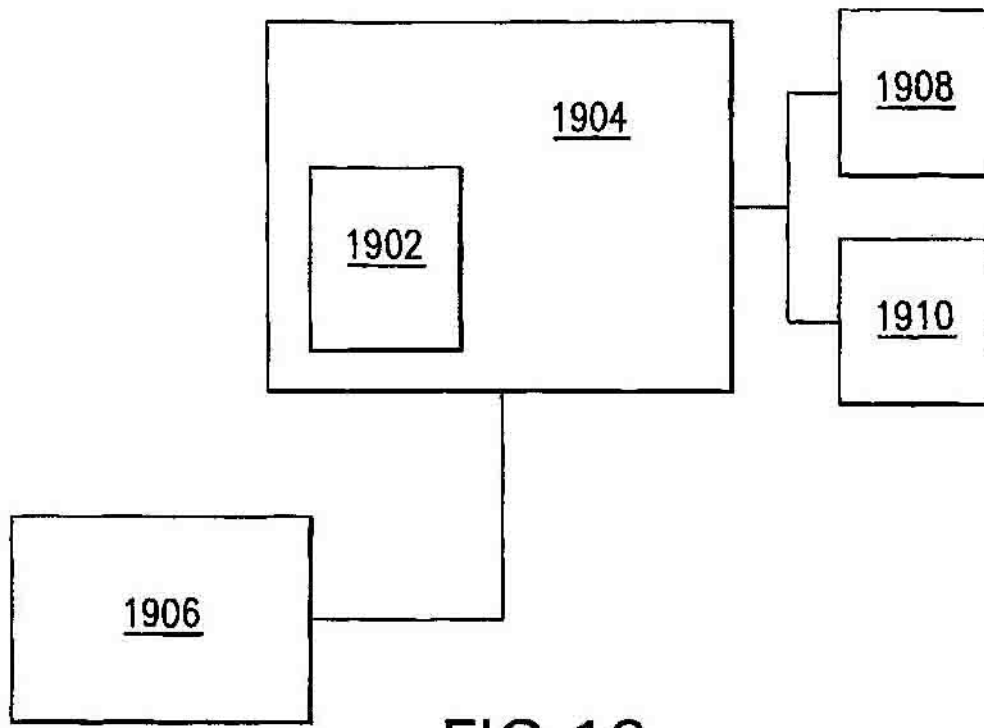


FIG.19

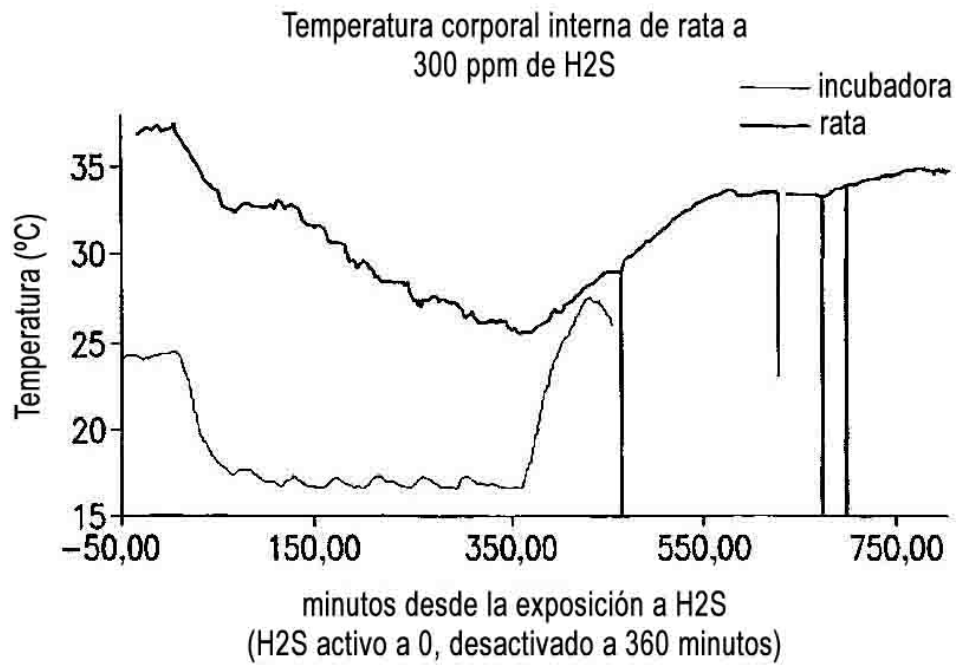


FIG.20A

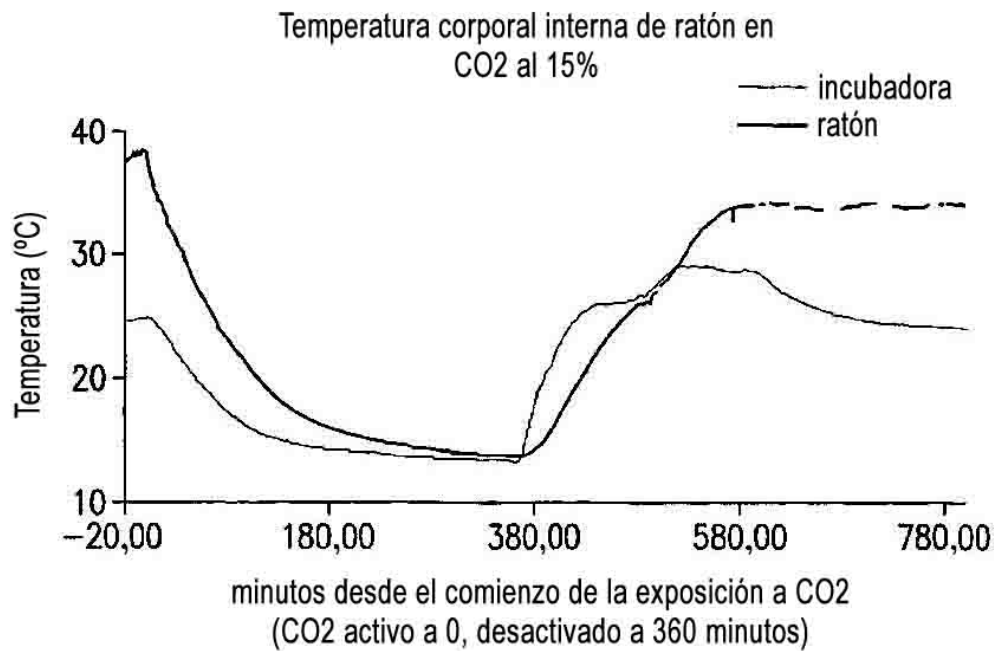


FIG.20B

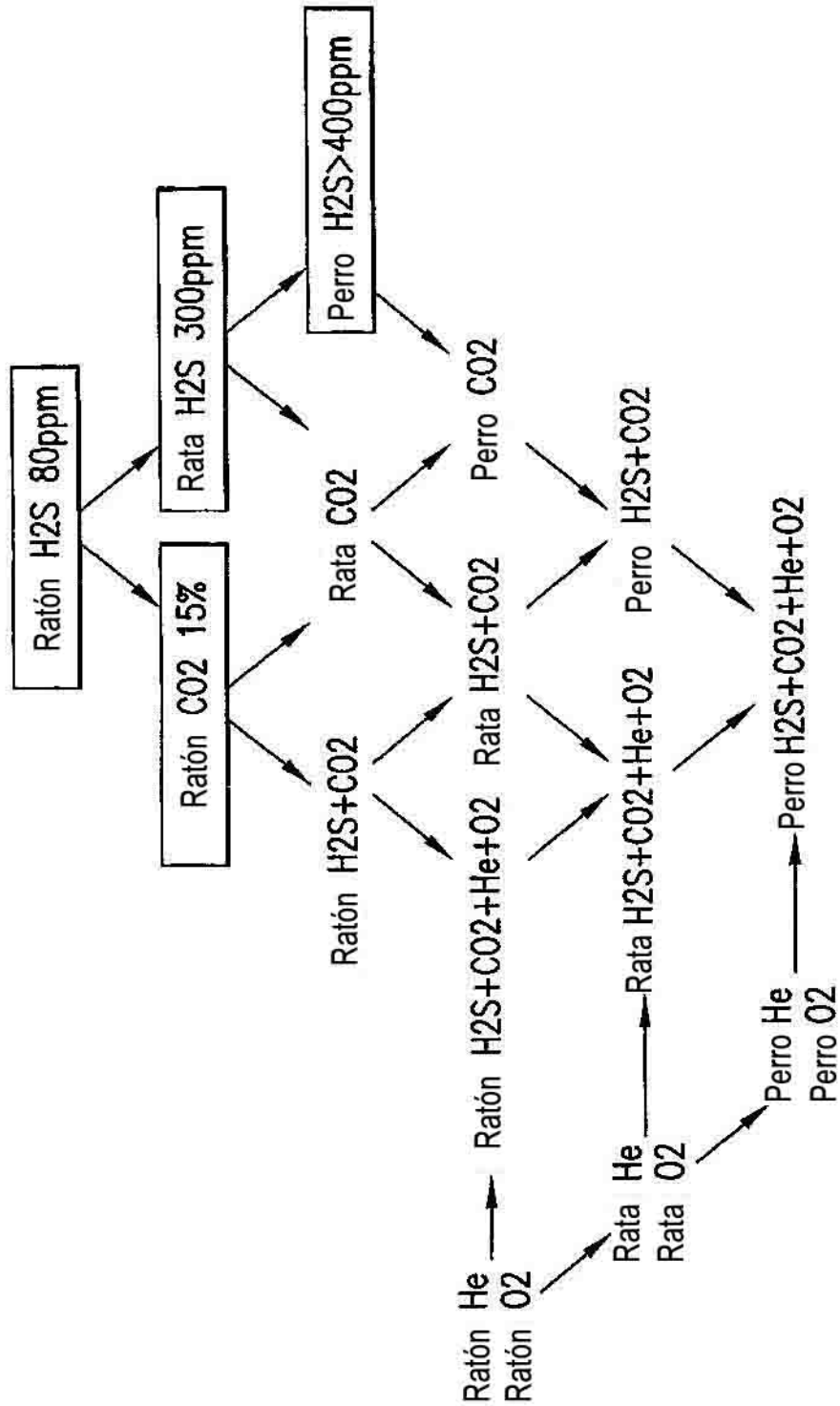


FIG.21

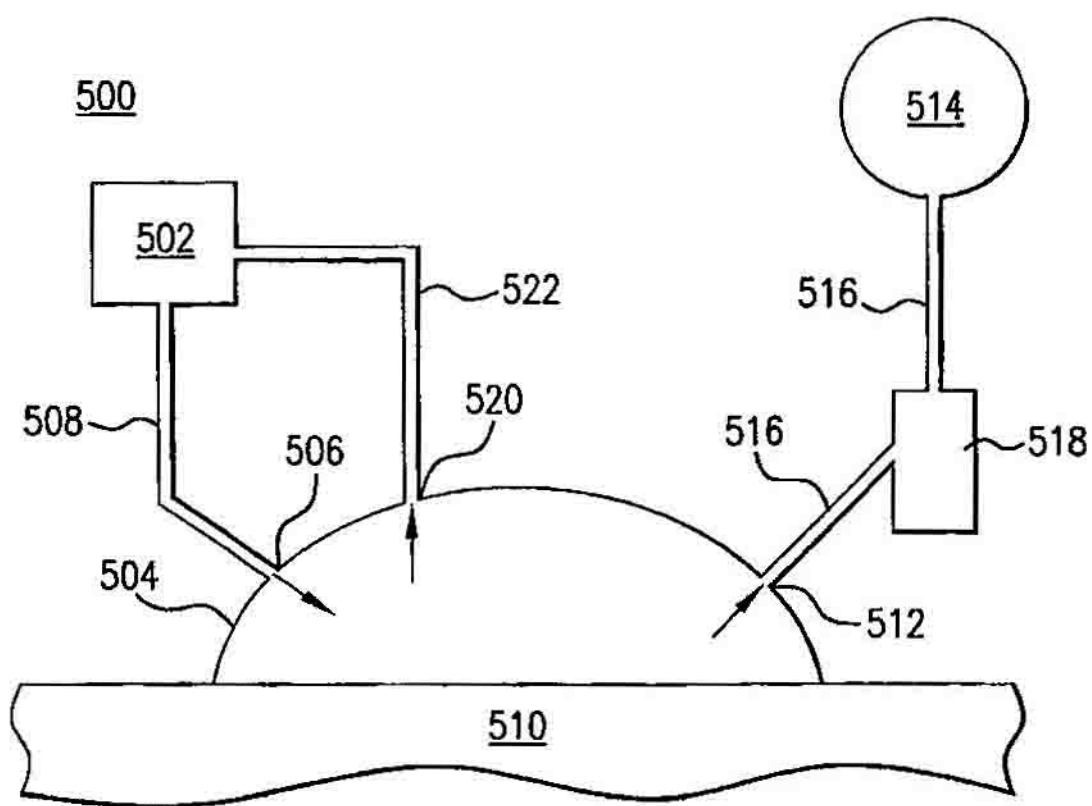


FIG.22A

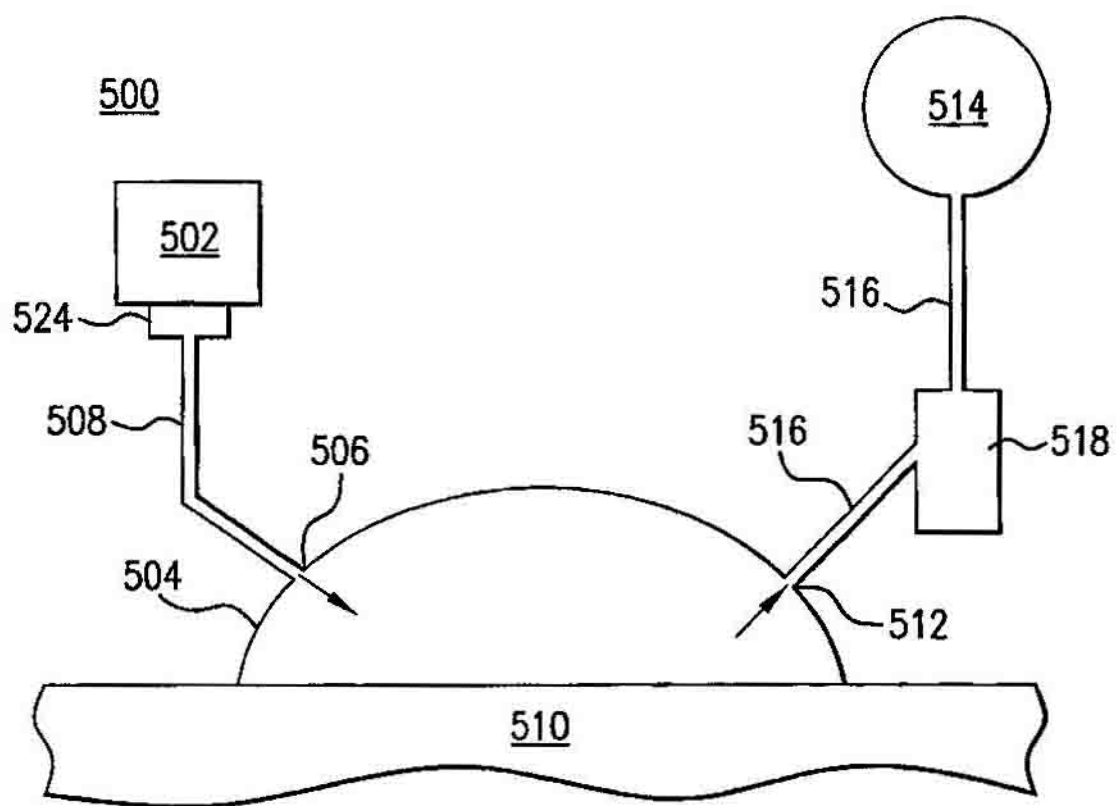


FIG.22B

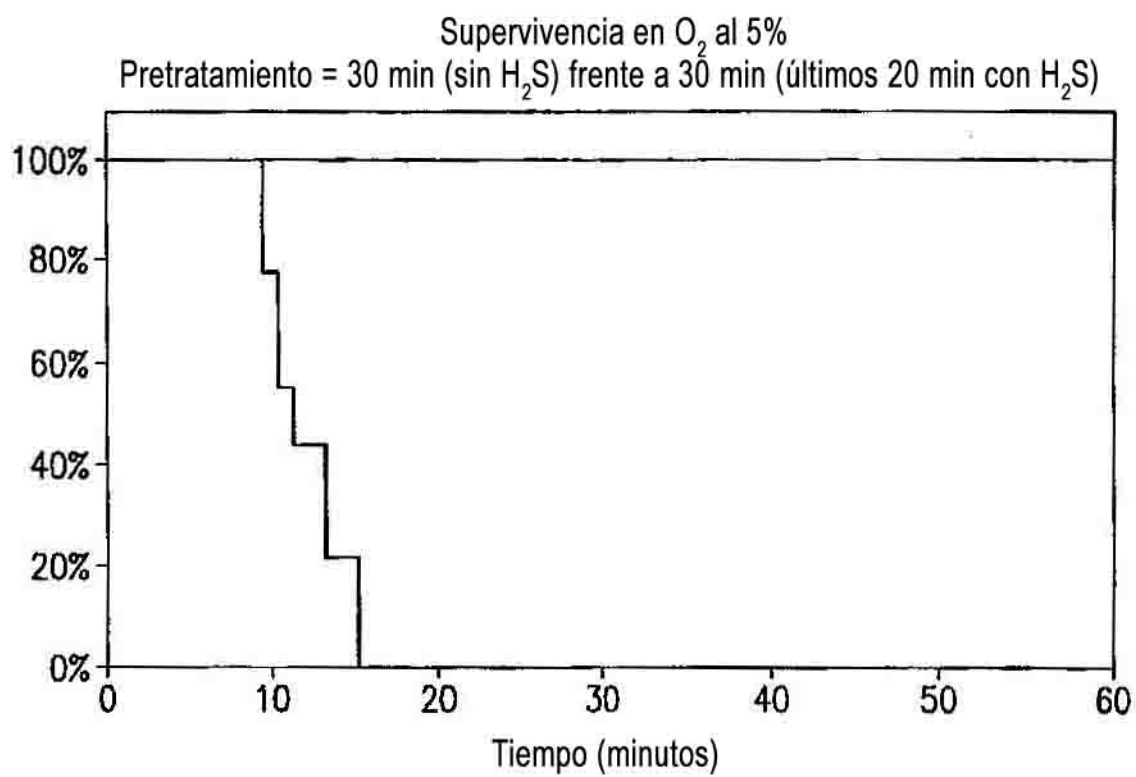


FIG.23

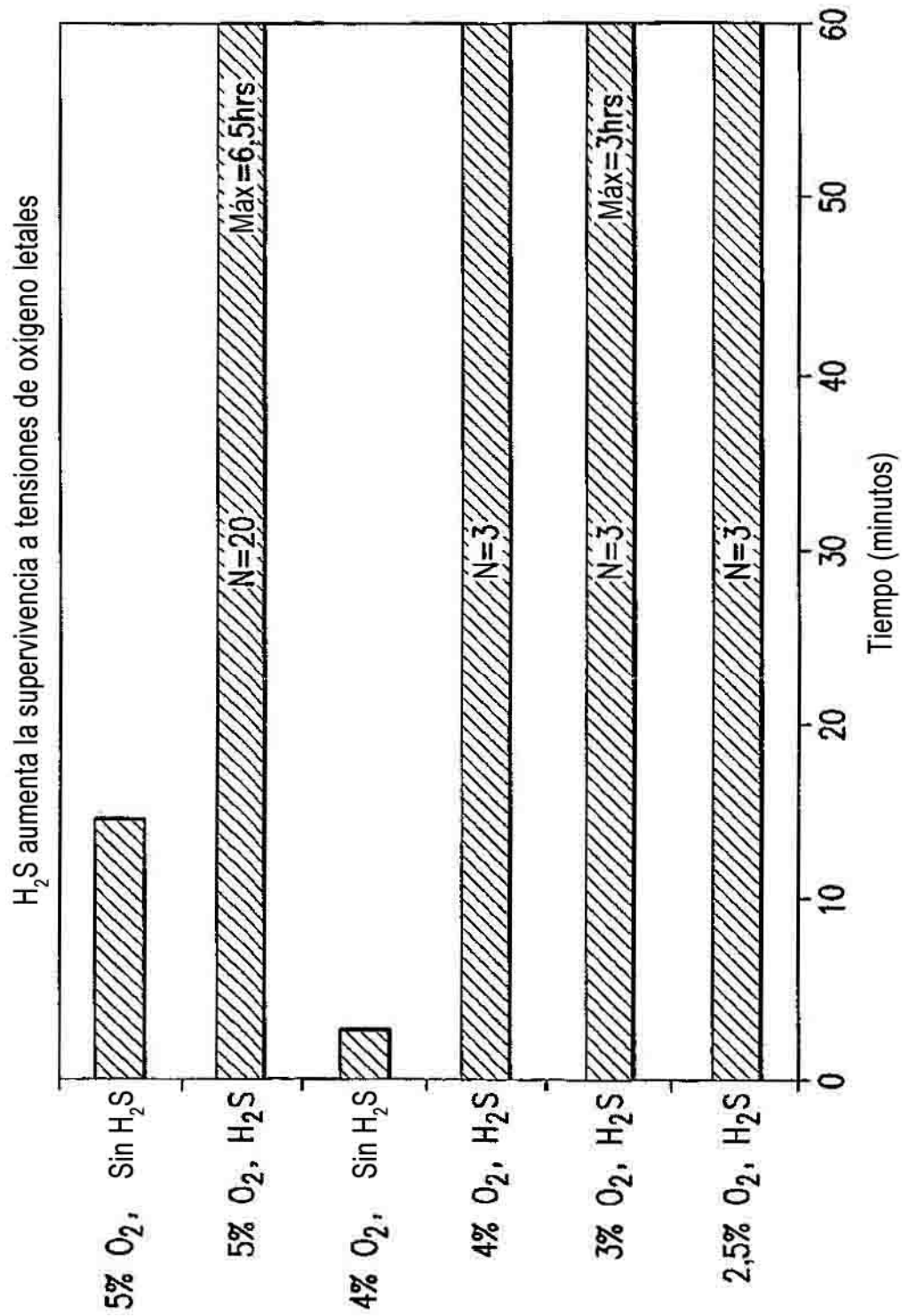


FIG.24

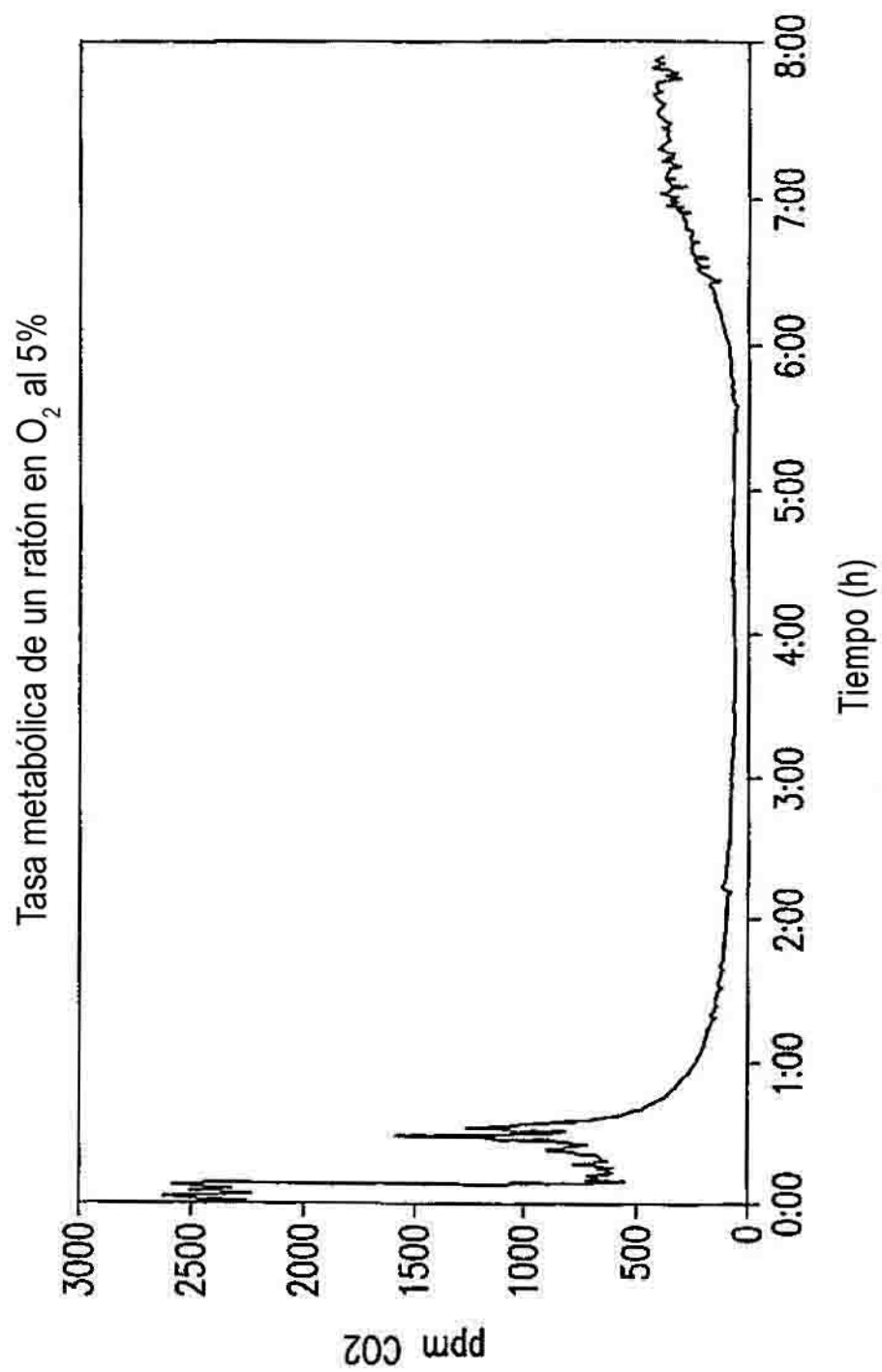


FIG.25

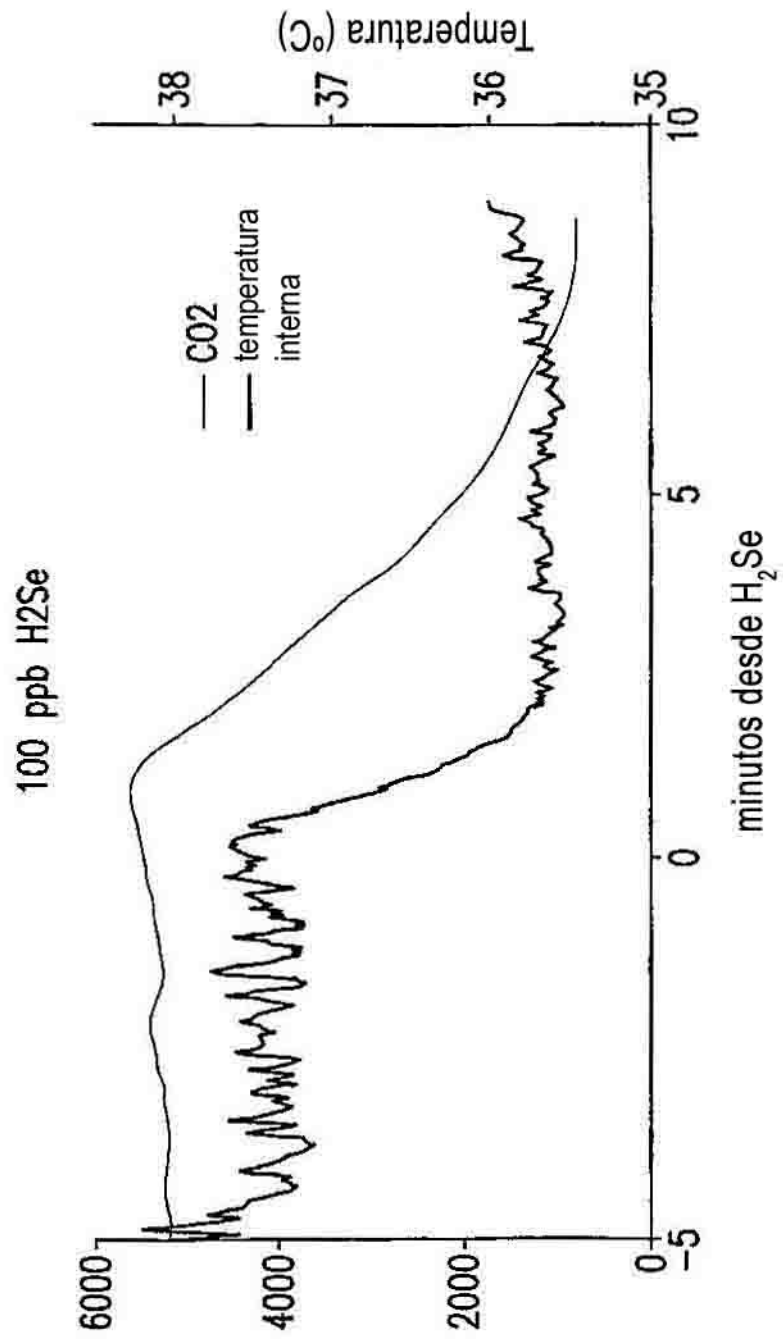


FIG.26

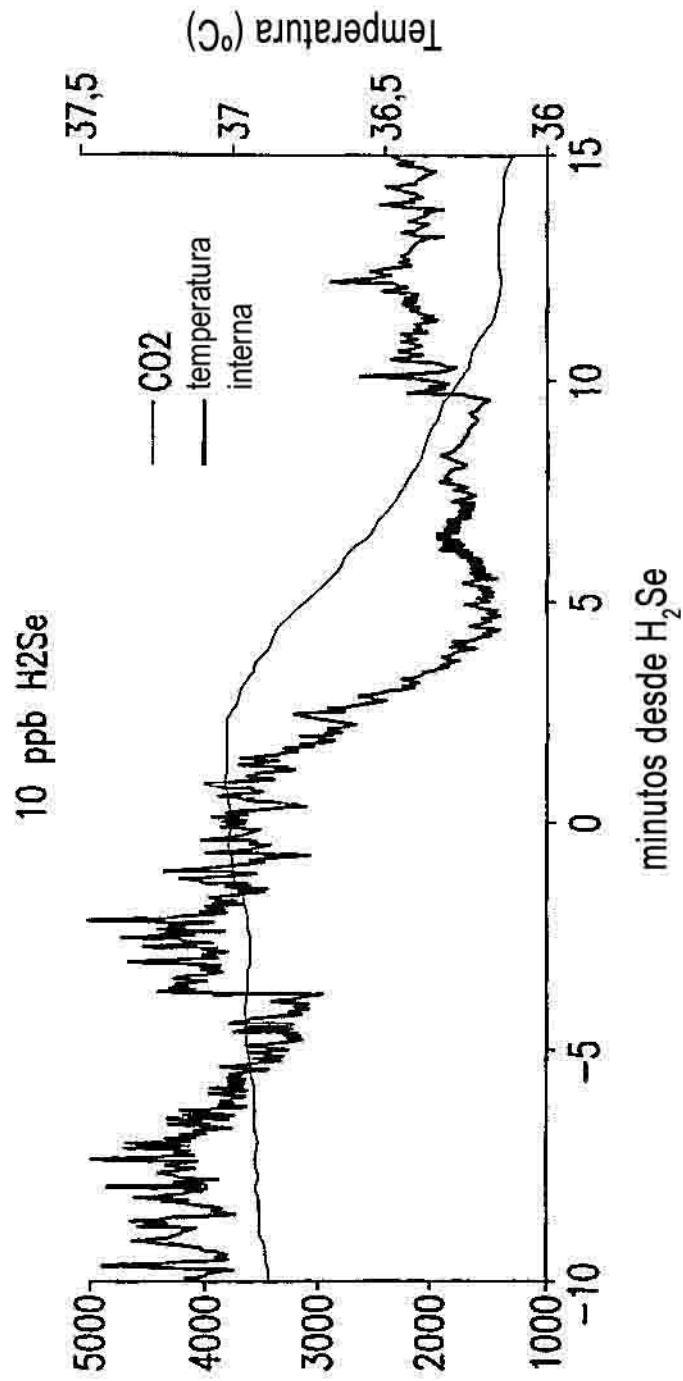


FIG.27

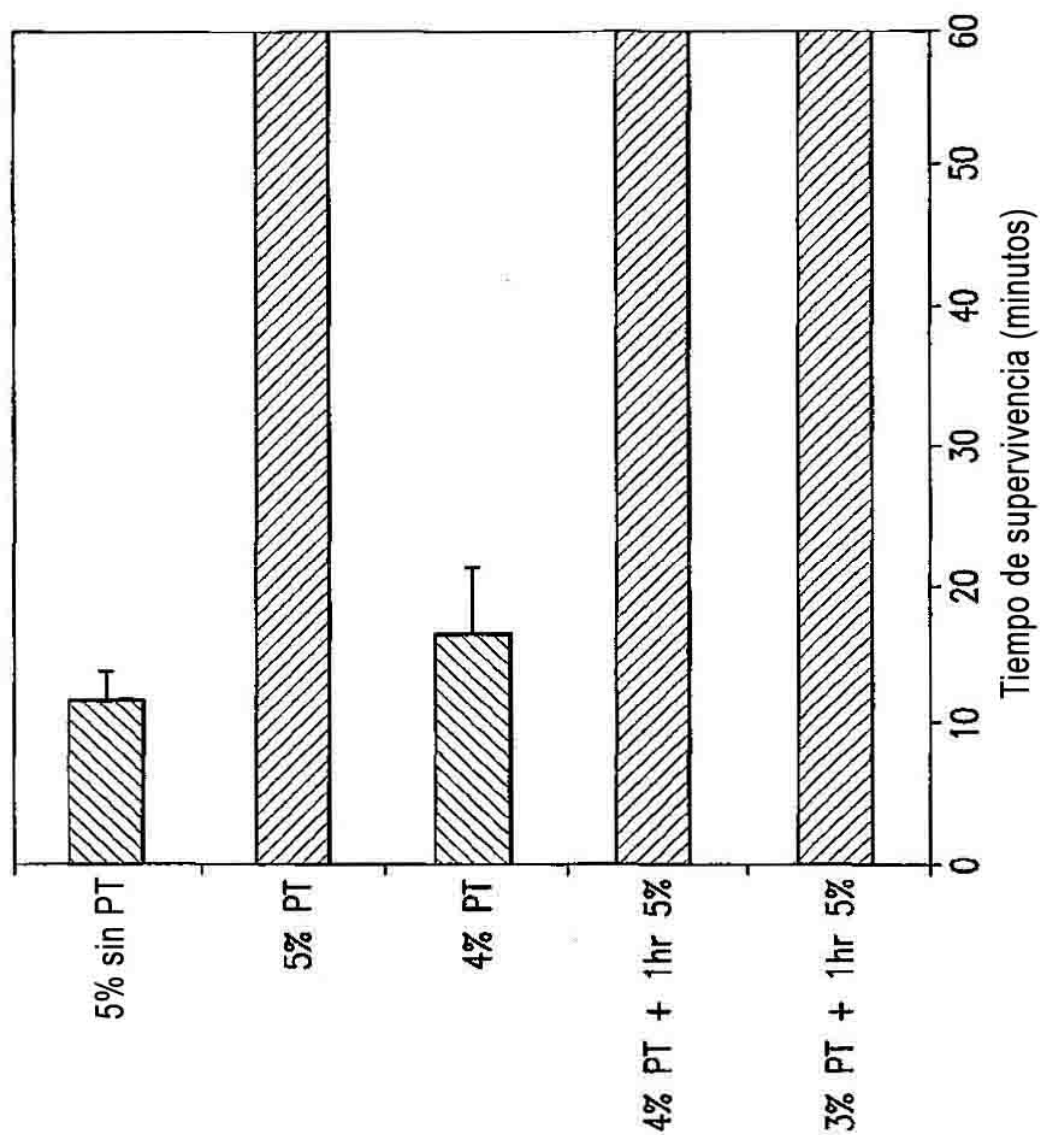


FIG.28

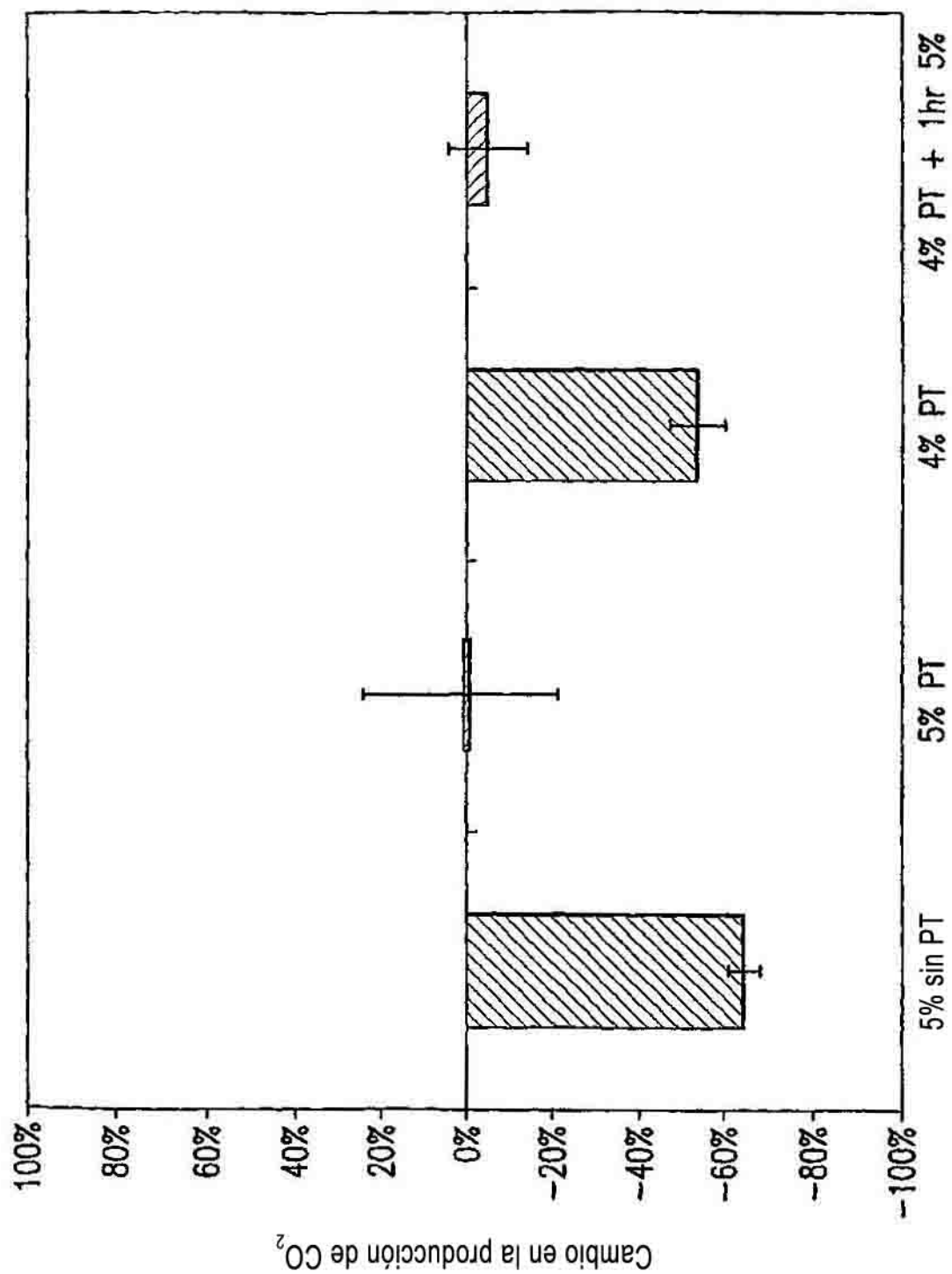


FIG.29

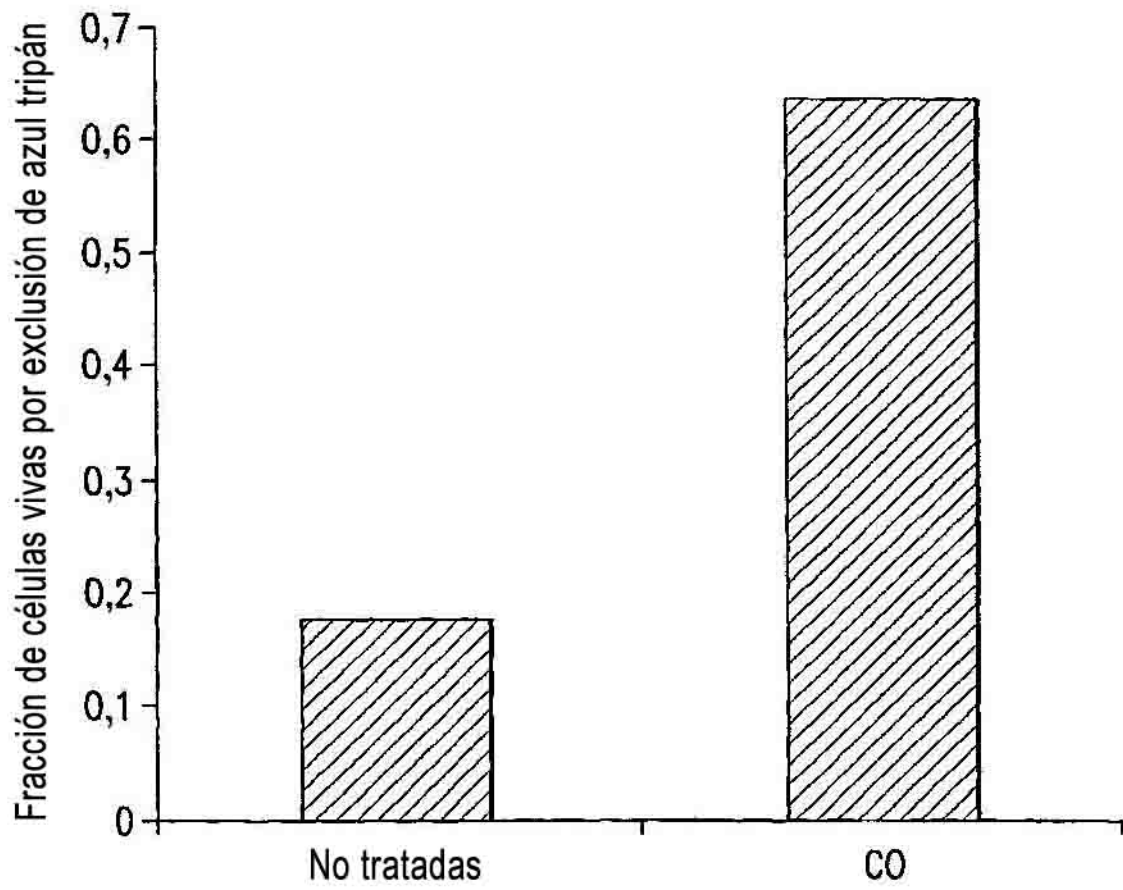


FIG.30

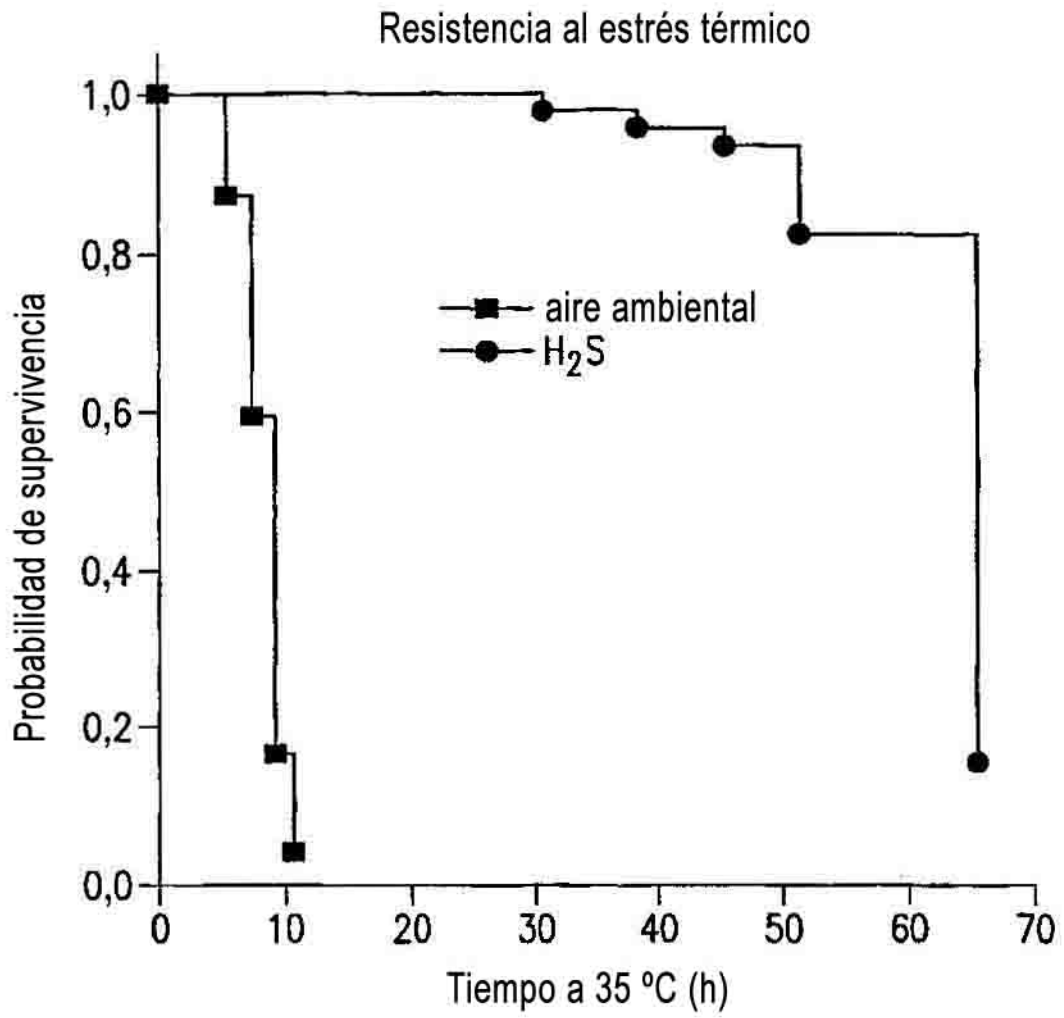


FIG.31

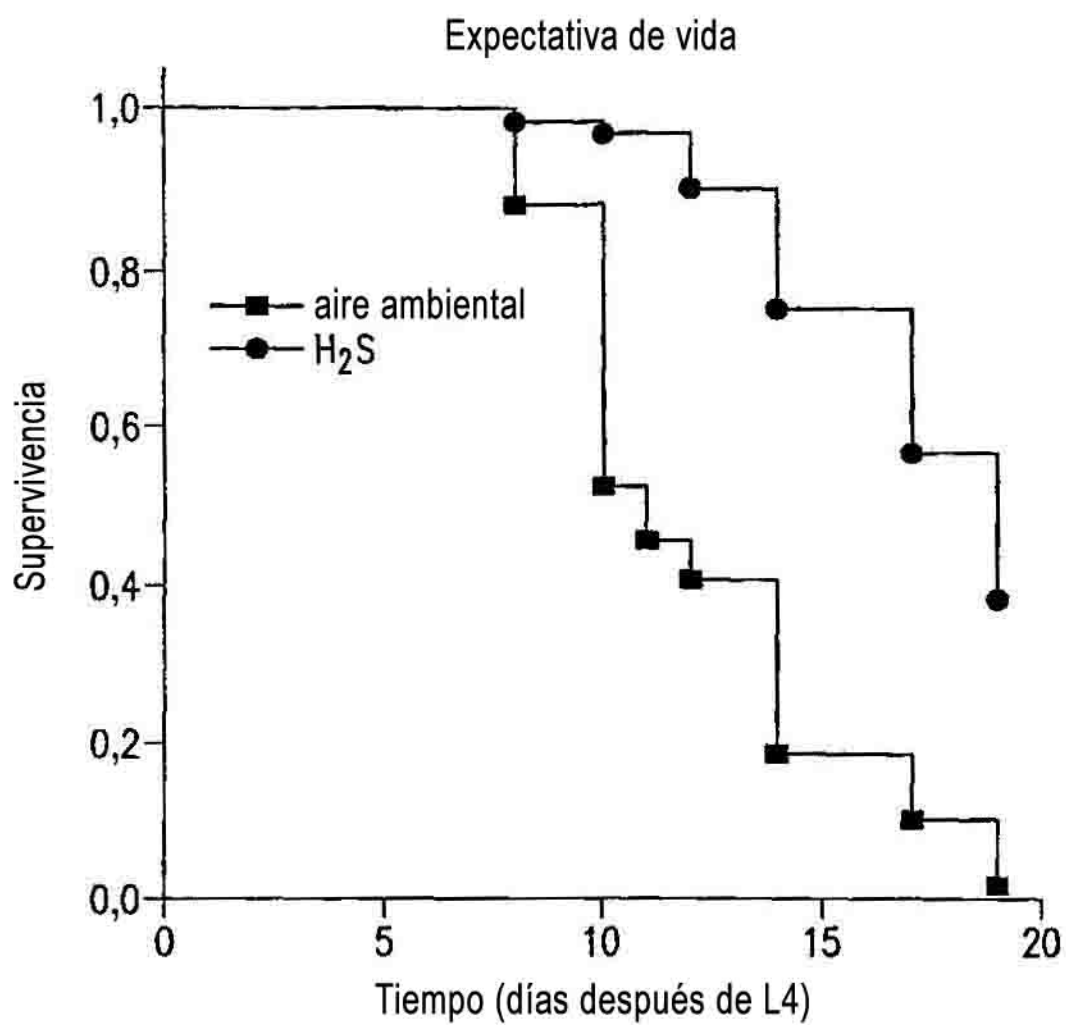


FIG.32

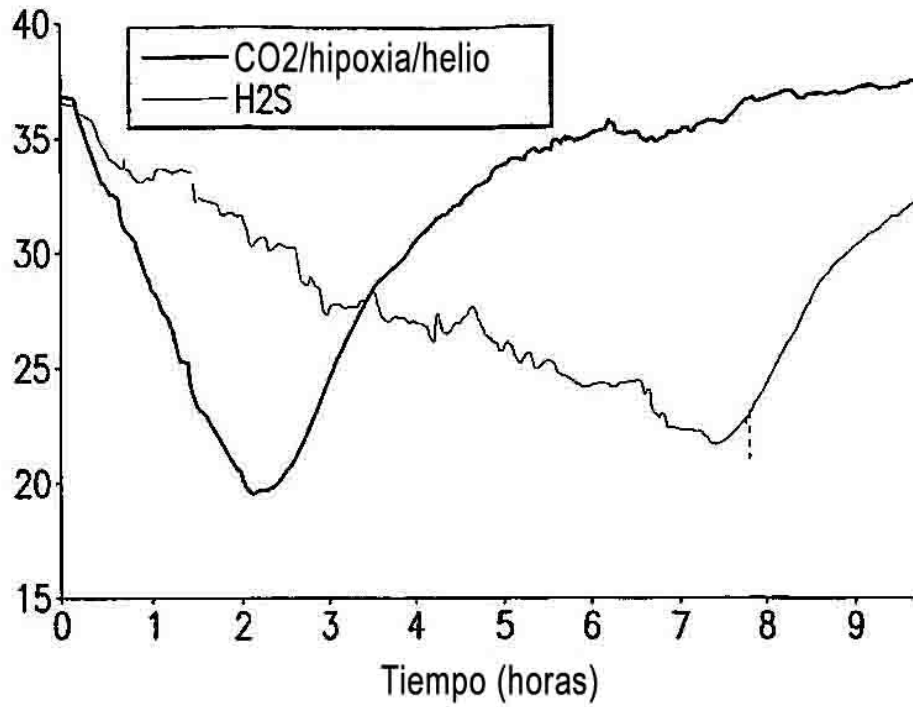


FIG.33

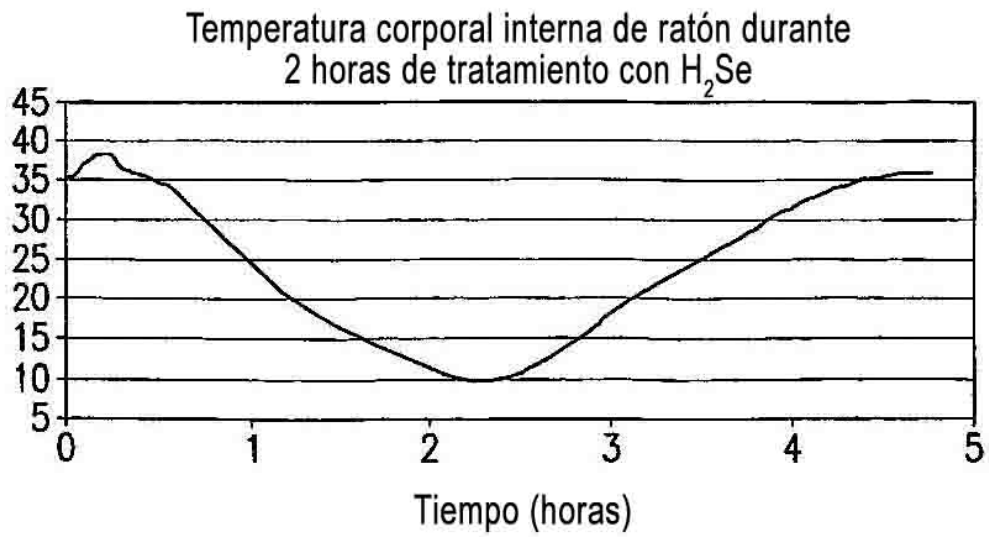


FIG.34

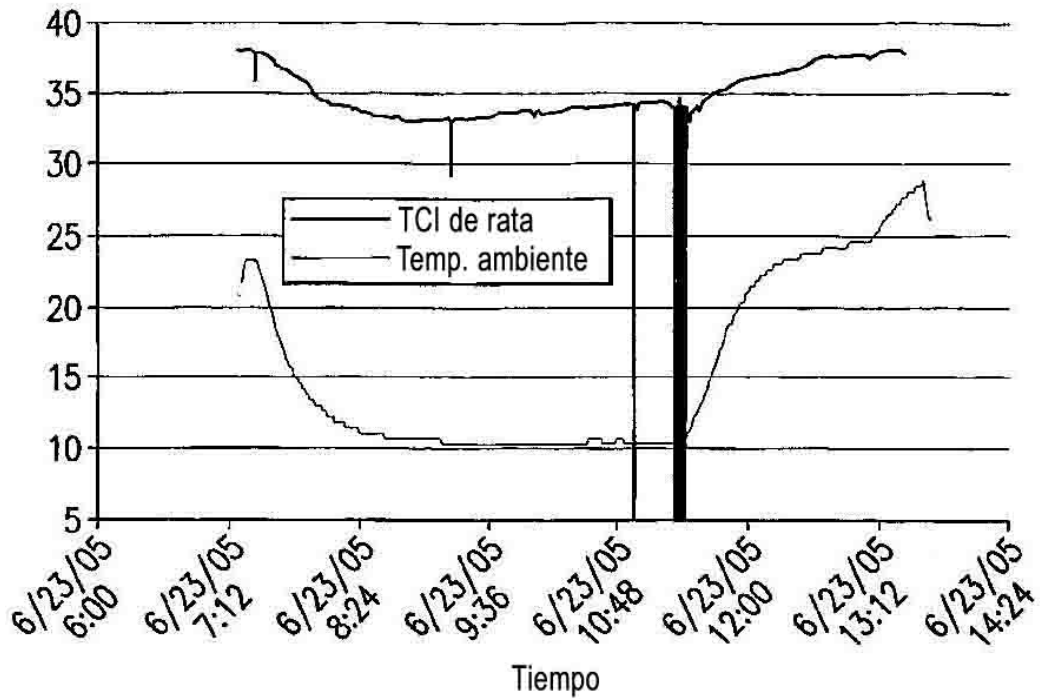


FIG.35

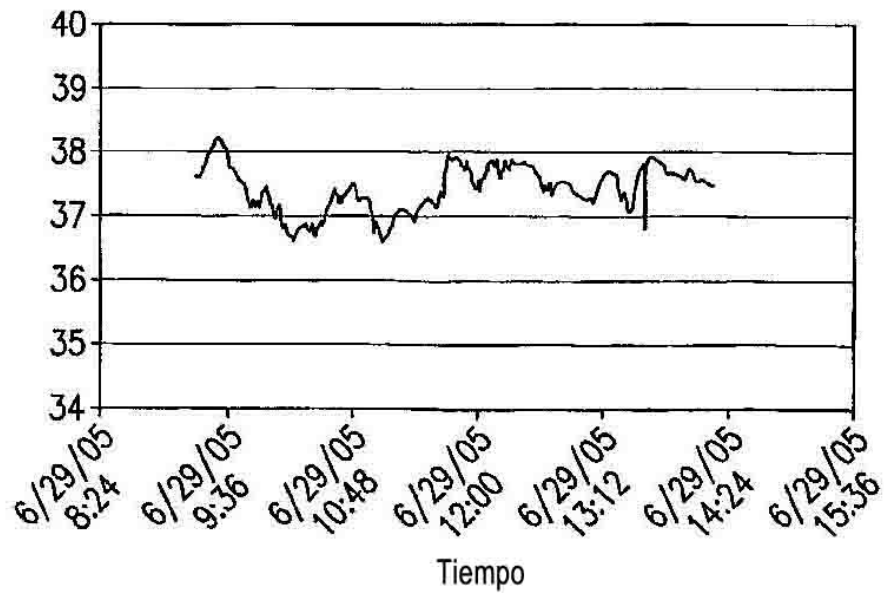


FIG.36

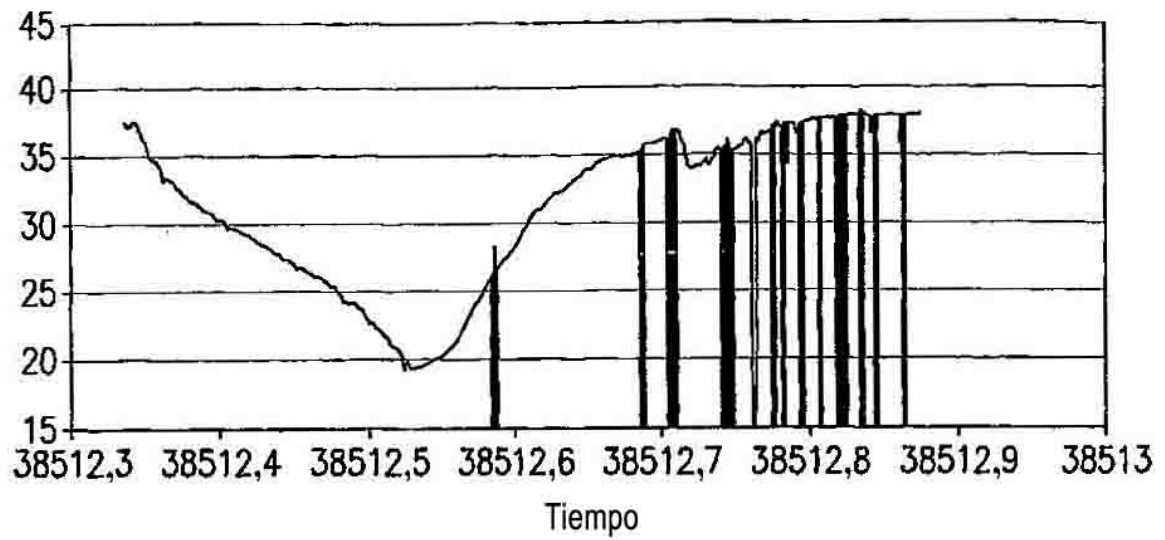


FIG.37

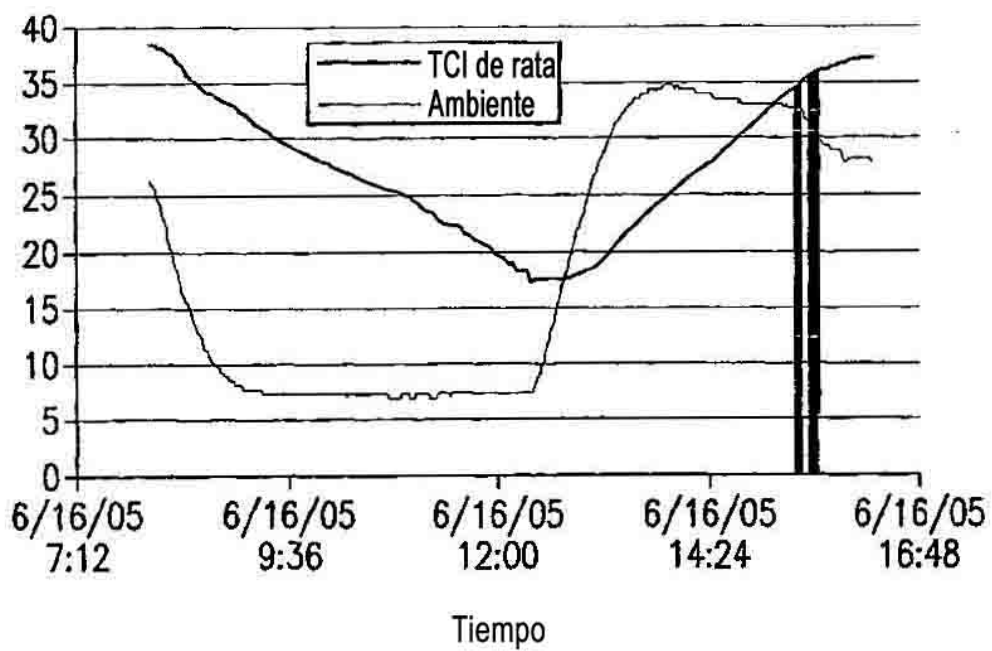


FIG.38

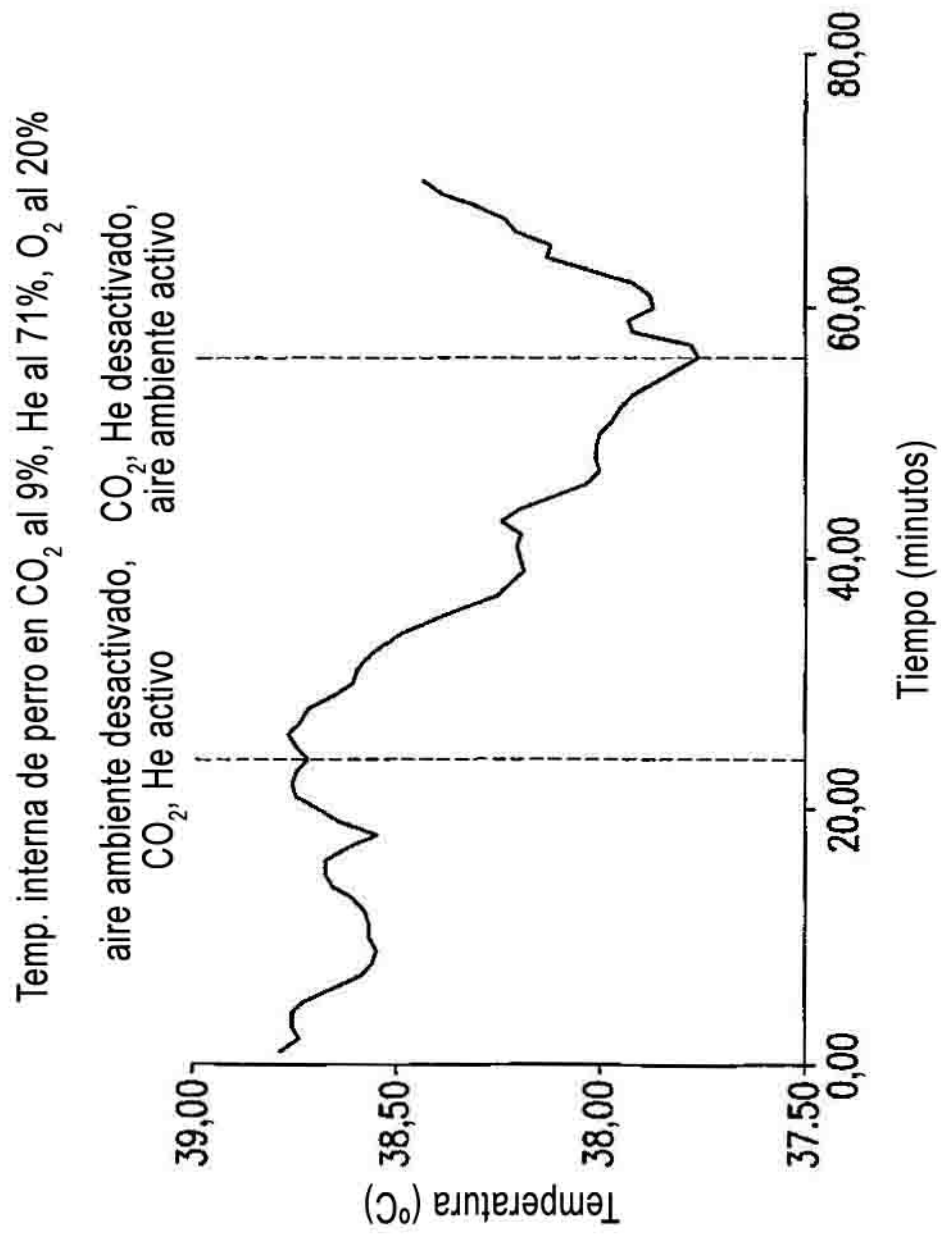


FIG.39

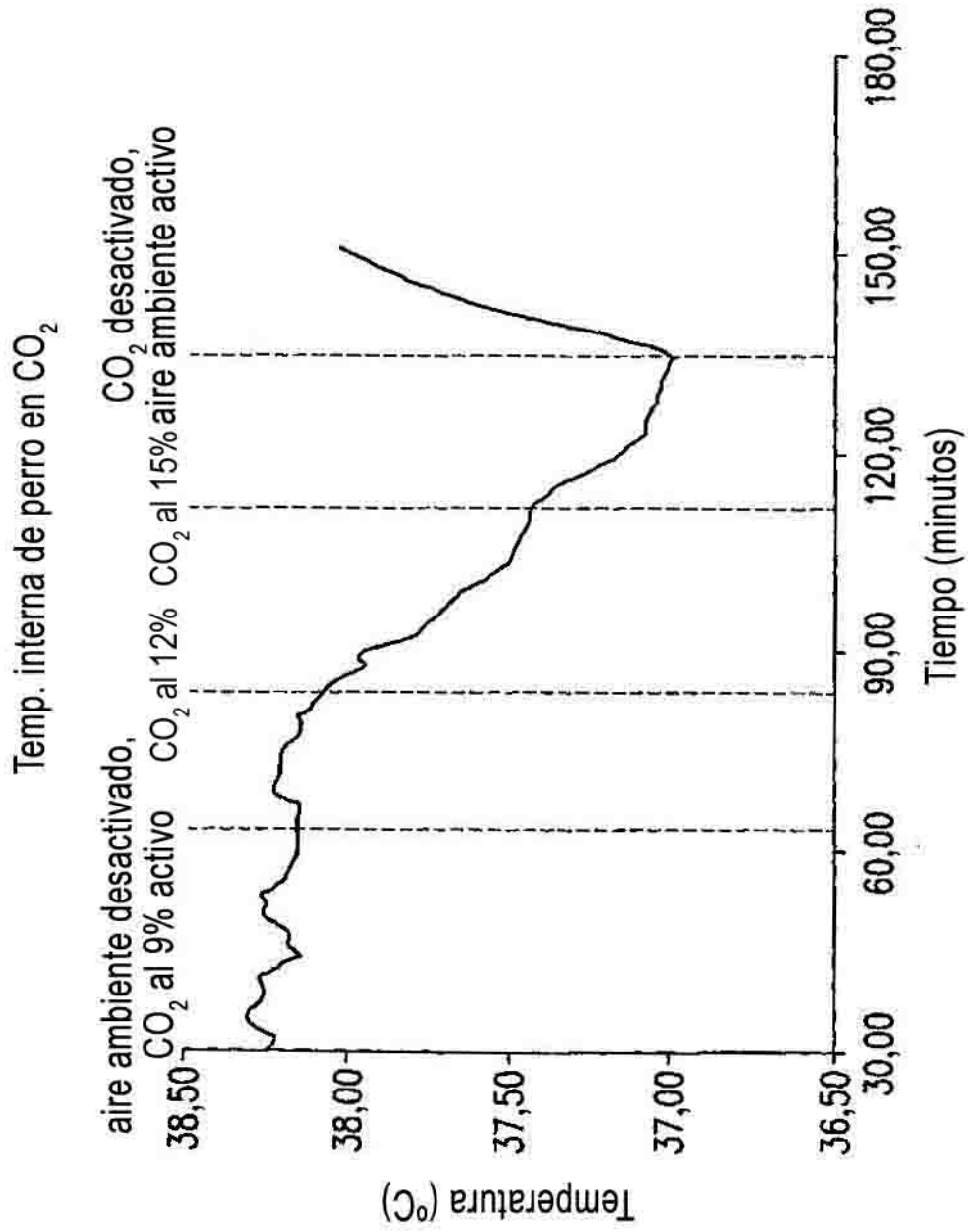


FIG.40

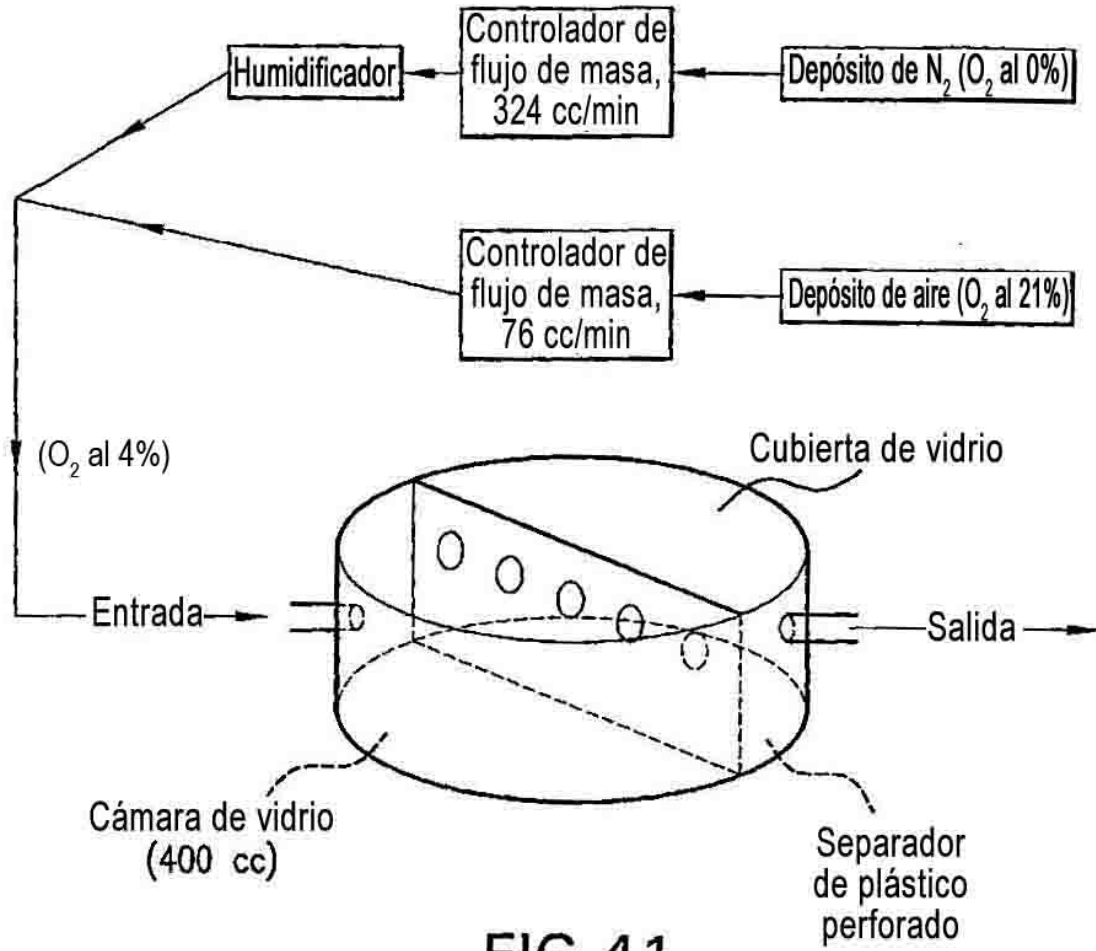


FIG.41

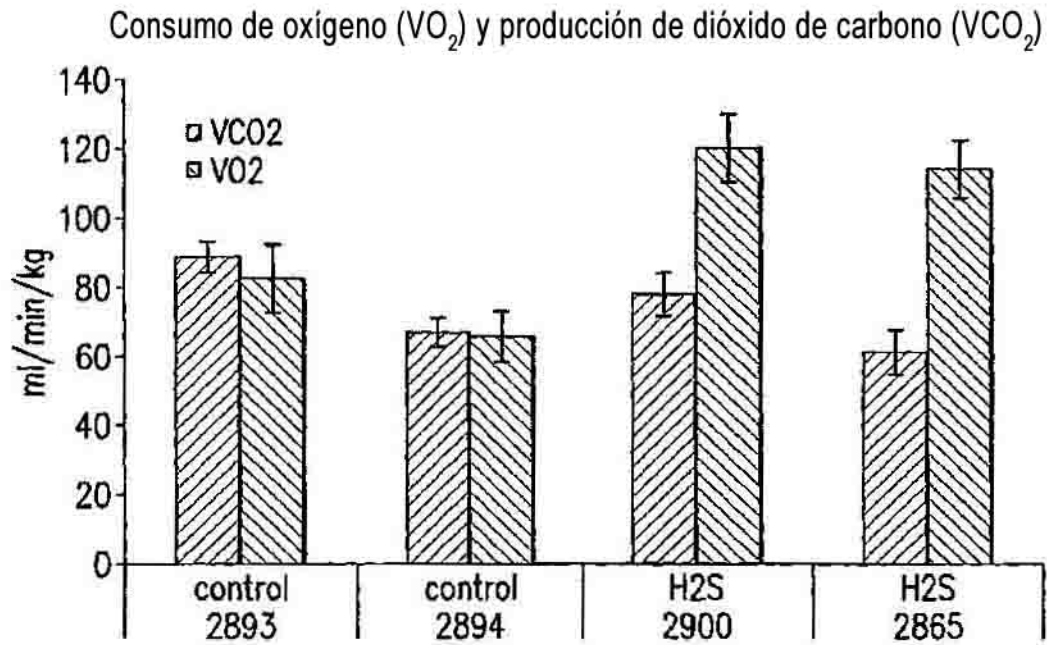


FIG.42

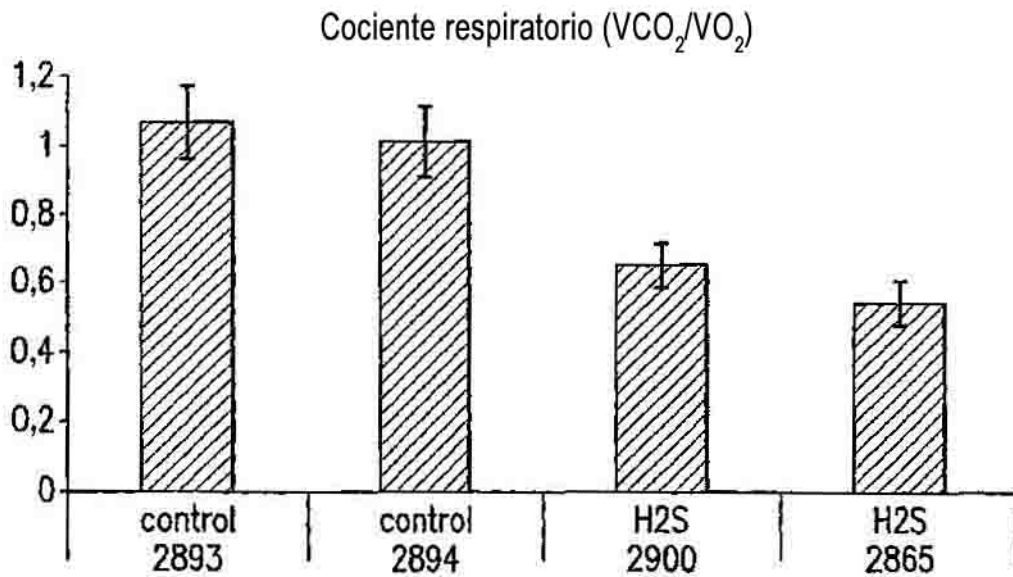


FIG.43