

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 554 108**

51 Int. Cl.:

**A61K 33/00** (2006.01)

**A61K 47/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2003 E 03719698 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 1499328**

54 Título: **Métodos de tratamiento de la enterocolitis necrosante**

30 Prioridad:

**15.04.2002 US 372599 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.12.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF PITTSBURGH OF THE  
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER  
EDUCATION (100.0%)  
200 GARDNER STEEL CONFERENCE CENTER  
PITTSBURGH, PA 15260, US**

72 Inventor/es:

**OTTERBEIN, LEO, E. y  
ZUCKERBRAUN, BRIAN**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 554 108 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

Métodos de tratamiento de la enterocolitis necrosante

### 5 Declaración en cuanto a investigación patrocinada por el gobierno federal

La presente invención se realizó con el apoyo gubernamental con las subvenciones de los Institutos Nacionales de la Salud n.º HL55330, HL60234 y AI42365. El gobierno ostenta ciertos derechos sobre esta invención.

### 10 Campo técnico

La presente invención se refiere al tratamiento de trastornos gastrointestinales.

#### Antecedentes

15

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

20

La enterocolitis necrosante (ECN) es una enfermedad de recién nacidos caracterizada por insuficiencia de la barrera intestinal, necrosis intestinal, sepsis e insuficiencia multiorgánica (véase, por ejemplo, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). El documento WO98/13058 desvela el uso de monóxido de carbono para el tratamiento de trastornos isquémicos. El documento WO98/13058 no menciona el uso de monóxido de carbono para tratar/prevenir enterocolitis necrosante.

25

### 30 Resumen

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración de CO puede proteger contra el desarrollo de ECN.

35

Por consiguiente, la presente invención presenta un método de tratamiento, prevención o reducción del riesgo de enterocolitis necrosante en un paciente. El método incluye identificar un paciente que padece o en riesgo de enterocolitis necrosante y administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad de CO eficaz para tratar enterocolitis necrosante en el paciente. El método puede incluir la etapa adicional de monitorizar el estado de ECN del paciente y/o determinar si el estado del paciente ha mejorado o el riesgo de ECN se ha reducido.

40

La composición farmacéutica puede ser administrada al paciente mediante cualquier método conocido en la técnica para administrar gases, líquidos y/o sólidos a pacientes, por ejemplo, por inhalación, insuflado, infusión, inyección y/o ingestión. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica es administrada al paciente por inhalación. En otra realización, la composición farmacéutica es administrada al paciente por vía oral. En otra realización más, la composición farmacéutica es administrada directamente a la cavidad abdominal del paciente. En aún otra realización, la composición farmacéutica es administrada mediante un dispositivo extracorpóreo de intercambio de gases a través de una membrana o un pulmón artificial.

45

El paciente puede ser un lactante, por ejemplo, un lactante nacido a término, un lactante prematuro y/o un lactante que muestra bajo peso al nacer. El lactante puede ser un recién nacido o puede ser, por ejemplo, de hasta un año de edad (por ejemplo, hasta seis meses, cuatro meses, tres meses o dos meses de edad). El lactante puede tener menos de seis semanas de edad, por ejemplo, menos de cuatro semanas de edad. La ECN puede ser el resultado de cualquiera de una serie de factores, por ejemplo, hipoxia, hipotermia, hipotensión, hiperviscosidad de la sangre, y/o acidosis, y/o donde el paciente ha recibido una exanguinotransfusión, al menos una alimentación hiperosmolar, una transfusión de concentrado de eritrocitos y/o una sobredosis de antagonistas de calcio. Además, la ECN puede ser el resultado de una situación en la que el paciente padece isquemia mesentérica y/o infección bacteriana de la pared intestinal (véase, por ejemplo, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). Como alternativa, la ECN puede ser el resultado de una intervención quirúrgica, por ejemplo, donde el paciente se ha sometido, está a punto de someterse, o se está sometiendo a una intervención quirúrgica. La composición farmacéutica puede estar en cualquier forma, por ejemplo, forma gaseosa o líquida.

50

55

60

La invención también presenta un método de tratamiento o prevención de enterocolitis necrosante en un paciente, que incluye identificar a un paciente que padece o en riesgo de enterocolitis necrosante, proporcionar un recipiente que contiene un gas presurizado que comprende CO gaseoso, liberar el gas presurizado del recipiente para formar una atmósfera que comprende CO gaseoso, y exponer al paciente a la atmósfera, en el que la cantidad de CO en la

65

atmósfera es suficiente para tratar enterocolitis necrosante en el paciente.

En otro aspecto, la invención presenta un método de realización de una intervención quirúrgica abdominal en un paciente (por ejemplo, un lactante), que incluye identificar a un paciente que necesita una intervención quirúrgica abdominal, en el que la enterocolitis necrosante es un riesgo significativo de la intervención quirúrgica abdominal; realizar una intervención quirúrgica abdominal en el paciente y antes, durante o después de la etapa de realización, hacer que el paciente inhale una cantidad de CO gaseoso suficiente para reducir el riesgo de enterocolitis necrosante en el paciente.

10 En la invención también se incluye un método de tratamiento de enterocolitis necrosante en un paciente, que incluye: (a) identificar a un paciente que padece enterocolitis necrosante; (b) realizar una intervención quirúrgica en el paciente para extirpar una parte afectada del intestino del paciente; y (c) administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad de monóxido de carbono eficaz para tratar enterocolitis necrosante en el paciente después de la etapa (a) y antes, durante o después de la etapa (b).

15 En otro aspecto, la invención proporciona un recipiente que comprende CO gaseoso comprimido de calidad médica. El recipiente puede llevar una etiqueta que indica que el gas puede usarse para tratar ECN en un paciente, por ejemplo, un lactante. El CO gaseoso puede estar mezclado con nitrógeno gaseoso, con óxido nítrico y nitrógeno gaseoso, o con un gas que contiene oxígeno. El CO gaseoso puede estar presente en la mezcla a una concentración de al menos aproximadamente el 0,025 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,05 %, 0,10 %, 0,50 %, 1,0 %, 2,0 %, 10 %, 50 % o 90 %.

En otro aspecto más, la invención proporciona un método de tratamiento de ECN en un paciente, que incluye identificar a un paciente que padece o en riesgo de ECN y administrar al paciente al menos uno de los siguientes tratamientos junto con tratamiento con CO: inducir HO-1 o ferritina en el paciente; expresar HO-1 recombinante o ferritina en el paciente; y administrar una composición farmacéutica que comprende HO-1, bilirrubina, biliverdina, ferritina o apoferritina, hierro, desferoxamina o dextrano de hierro al paciente. También está contemplado el uso de CO y cualquiera de los agentes enumerados anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de ECN.

30 Además, la invención proporciona un método de tratamiento ECN en un paciente, que incluye identificar a un paciente que padece o en riesgo de ECN y administrar al menos uno de los siguientes tratamientos junto con tratamiento con CO: alimentación intravenosa; hidratación intravenosa; agentes antimicrobianos; realizar descompresión nasogástrica en el paciente, realizar una intervención quirúrgica en el paciente; y drenar la cavidad peritoneal del paciente.

También está dentro de la invención el uso de CO en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de ECN. El medicamento puede usarse en un método para tratar ECN en un paciente que padece o en riesgo de ECN de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. El medicamento puede estar en cualquier forma descrita en el presente documento, por ejemplo, una composición de CO líquida o gaseosa.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Los métodos y materiales adecuados se describen a continuación, aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o ensayos de la presente invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

50 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se describen en la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones.

### Descripción de los dibujos

55 La figura 1A es una foto de una transferencia de Western que ilustra que la expresión de HO-1 se incrementa en muestras intestinales de recién nacidos humanos que padecen ECN (ECN) en comparación con pacientes sin ECN (control) (n = 3).

60 La figura 1B es una foto de una transferencia de Western que ilustra la proteína HO-1 ileal se incrementa el día cuatro en ratas recién nacidas sometidas a hipoxia intermitente y alimentación con la fórmula (ECN) en comparación con ratas de control amamantadas (control) (n=4).

65 La figura 2A es una microfotografía (40 aumentos) de una preparación compleja ileal teñida con hematoxilina y eosina que ilustra el efecto de la lactancia materna en una rata recién nacida. La muestra se obtuvo el día cuatro.

La figura 2B es una microfotografía (40 aumentos) de una preparación compleja ileal teñida con hematoxilina y eosina que ilustra el efecto de la lactancia materna y la exposición a CO en una rata recién nacida. La muestra se obtuvo el día cuatro.

5 La figura 2C es una microfotografía (40 aumentos) de una preparación compleja ileal teñida con hematoxilina y eosina que ilustra el efecto de la alimentación con la fórmula más exposición a hipoxia en una rata recién nacida. La muestra se obtuvo el día cuatro. Pueden observarse cambios arquitectónicos que incluyen atrofia de las vellosidades y vacuolización celular.

10 La figura 2D es una microfotografía (40 aumentos) de una preparación compleja ileal teñida con hematoxilina y eosina que ilustra el efecto de la alimentación con la fórmula, más exposición a hipoxia y exposición a CO en una rata recién nacida. Se producen menos cambios arquitectónicos en comparación con la muestra mostrada en la figura 2C. La muestra se obtuvo el día cuatro.

15 La figura 3A es una microfotografía (60 aumentos) de una preparación compleja ileal teñida mediante marcado del extremo libre con dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) que ilustra el efecto de la lactancia materna en una rata recién nacida. La muestra se obtuvo el día cuatro.

La figura 3B es una microfotografía (60 aumentos) de una preparación compleja ileal teñida mediante TUNEL que  
20 ilustra el efecto de la lactancia materna y exposición a CO en una rata recién nacida. La muestra se obtuvo el día cuatro.

La figura 3C es una microfotografía (60 aumentos) de una preparación compleja ileal teñida mediante TUNEL que  
25 ilustra el efecto de la alimentación con la fórmula más exposición a hipoxia en una rata recién nacida. La muestra se obtuvo el día cuatro. El ileon de ratas tratadas con hipoxia/alimentadas con la fórmula muestra tinción mediante TUNEL incrementada en comparación con la de animales amamantados.

La figura 3D es una microfotografía (60 aumentos) de una preparación compleja ileal teñida mediante TUNEL que  
30 ilustra el efecto de la alimentación con la fórmula más exposición a hipoxia y exposición a CO en una rata recién nacida. La muestra se obtuvo el día cuatro. Puede observarse disminución de células positivas para TUNEL.

La figura 4A es un histograma que ilustra que el tratamiento con CO previene un incremento de la concentración sérica de EL-1 $\beta$  en ratas recién nacidas expuestas a hipoxia y alimentadas con la fórmula en comparación con  
35 controles ( $P < 0,05$ ). Los datos se generaron usando un ensayo ELISA. Barras negras = ratas expuestas al aire; barras grises = ratas expuestas a CO.

La figura 4B es un histograma que ilustra que el tratamiento con CO previene un incremento de la concentración sérica de TNF- $\alpha$  en ratas recién nacidas expuestas a hipoxia y alimentadas con la fórmula en comparación con  
40 controles ( $P < 0,05$ ). Los datos se generaron usando un ensayo ELISA. Barras negras = ratas expuestas al aire; barras grises = ratas expuestas a CO.

La figura 5 es una foto de una transferencia de Western que ilustra que el tratamiento con CO reduce la expresión ileal de COX-2 e IL-1 $\beta$  en ratas recién nacidas expuestas a hipoxia y alimentadas con la fórmula, en comparación  
45 con controles. La presencia (+) o ausencia (-) de cada tratamiento (lactancia materna (BF), alimentación con la fórmula más exposición a hipoxia (FF/Hipoxia) y exposición a CO (CO)) se indica debajo de cada carril de la transferencia de Western. La transferencia demuestra 3-4 animales por grupo y es representativa de todos los animales en el estudio.

La figura 6 es una foto de una transferencia de Western que ilustra que la exposición a CO suprime la expresión de  
50 iNOS ileal y la nitración de proteínas inducida por ECN experimental en ratas recién nacidas. La presencia (+) o ausencia (-) de cada tratamiento (lactancia materna (BF), alimentación con la fórmula más exposición a hipoxia (FF/Hipoxia) y exposición a CO (CO)) se indica debajo de cada carril de la transferencia de Western.

La figura 7 es un histograma que ilustra que la exposición a CO y la inducción de HO-1 disminuye la muerte de  
55 células IEC-6 inducida por TNF- $\alpha$ /Actinomicina D (TNF/ActD). La viabilidad de las células IEC-6 tratadas con TNF- $\alpha$  (TNF; 10 ng/ml)/Actinomicina D (ActD; 200 ng/ml) se ensayó después de 18 horas midiendo el contenido celular de ATP. El tratamiento con CO (CO; barras grises; 250 ppm) se inició 1 hora antes de la administración de TNF- $\alpha$ /ActD y se mantuvo durante toda la duración del experimento. Barras rayadas = células expuestas a protoporfirina de cobalto (CoPP) 16 horas antes de la exposición a TNF- $\alpha$ /ActD. Barras negras = células expuestas al aire. Tanto CO  
60 como CoPP redujeron significativamente la muerte de células IEC-6 inducida por TNF- $\alpha$ /ActD ( $P < 0,05$ ). Los resultados son la media  $\pm$  el error típico de 3 estudios independientes realizados por triplicado.

La figura 8A es una foto de una transferencia de Western que ilustra (a las 24 horas) que la expresión de proteína  
65 iNOS es inhibida en células IEC-6 tratadas con lipopolisacáridos (LPS) y/o hipoxia (oxígeno al 1 %). El tratamiento con CO (250 ppm) se inició 1 hora antes de la adición de LPS/hipoxia y se mantuvo durante todo el experimento. La

combinación de LPS (10 o 100 ng/ml) más hipoxia incrementaba la expresión de proteína iNOS, un efecto que fue inhibido por CO. La presencia (+) o ausencia (-) de cada tratamiento (lipopolisacárido (Lps), exposición a hipoxia (hipoxia) y exposición a CO (CO)) se indica debajo de cada carril de la transferencia de Western.

5 Fig. 8B es un histograma que ilustra que la actividad promotora de iNOS de rata en células IEC-6 tratadas con LPS (100 ng/ml)/hipoxia (oxígeno al 1%; Lps/hipoxia está limitada por la exposición a CO. Se ensayó la actividad luciferasa de las células. La combinación de LPS más hipoxia dio como resultado un incremento de  $4,9 \pm 0,3$  veces en la activación transcripcional del promotor de iNOS ( $P < 0,05$ ). El CO limitaba esta activación transcripcional a un incremento de  $1,7 \pm 0,2$  veces ( $P < 0,05$ ). Los resultados son la media  $\pm$  el error típico de 3 estudios independientes  
10 realizados por triplicado.

La figura 8C es una foto de una transferencia de Western que ilustra que la expresión de la proteína iNOS inducida por citoquinas es inhibida en células IEC-6 mediante la inducción de HO-1 o el tratamiento con CO. Las células IEC-6 fueron tratadas con una mezcla de citoquinas (CM) que contenía TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (500 U/ml) e IFN- $\gamma$  (1000  
15 U/ml) durante 24 horas. El tratamiento con CO (250 ppm) se inició 1 hora antes de la administración de CM y se mantuvo durante toda la duración del experimento. La protoporfirina de cobalto (CoPP) se administró 16 horas antes del tratamiento con CM. Las CM incrementaban la proteína iNOS en células IEC-6. Tanto CO como CoPP inhibían el incremento inducido por citoquinas de proteína iNOS. La presencia (+) o ausencia (-) de cada tratamiento (mezcla de citoquinas (CM), exposición a CO (CO), y exposición de protoporfirina de cobalto (CoPP)) se indica debajo de cada  
20 carril de la transferencia de Western.

La figura 8D es un histograma que ilustra que las concentraciones de nitrito en sobrenadantes de células IEC-6 que son expuestas a CM y CO o CoPP son menores que los de células IEC-6 expuestas a CM y aire (según lo determinado mediante ensayo de Griess). La estimulación con citoquinas incrementaba el nitrito a  $17,2 \pm 0,9$   $\mu$ M en  
25 comparación con  $1,4 \pm 0,3$   $\mu$ M en controles no estimulados ( $P < 0,01$ ). CO y CoPP inhibían significativamente el efecto de las citoquinas dando como resultado concentraciones de nitrito de  $9,8 \pm 0,7$  y  $10,4 \pm 1,0$ , respectivamente ( $P < 0,05$  en comparación con células estimuladas con CM). Barras negras = células expuestas al aire; barras grises = células expuestas a CO; y barras rayadas = células expuestas a CoPP.

### 30 Descripción detallada

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

40 Las expresiones "cantidad eficaz" y "eficaz para tratar", tal como se usan en el presente documento, se refieren a una cantidad o concentración de CO utilizada durante un periodo de tiempo (incluyendo la administración aguda o crónica y la administración periódica o continua) que es eficaz dentro del contexto de su administración para producir un efecto o resultado fisiológico deseado en un paciente. Las cantidades eficaces de CO para uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, cantidades que reducen los síntomas de ECN en un paciente, o mejoran el  
45 resultado.

Para los gases, las cantidades eficaces de CO generalmente están dentro del intervalo de aproximadamente el 0,000001 % a aproximadamente el 0,3 % en peso, por ejemplo, del 0,0001 % a aproximadamente el 0,25 % en peso, preferentemente al menos aproximadamente el 0,001 %, por ejemplo, al menos el 0,005 %, 0,010 %, 0,02 %, 50 0,025 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,08 %, 0,10 %, 0,15 %, 0,20 %, 0,22 % o 0,24 % en peso de CO. Para soluciones líquidas de CO, las cantidades eficaces generalmente están dentro del intervalo de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,0044 g de CO/100 g de líquido, por ejemplo, al menos 0,0001, 0,0002, 0,0004, 0,0006, 0,0008, 0,0010, 0,0013, 0,0014, 0,0015, 0,0016, 0,0018, 0,0020, 0,0021, 0,0022, 0,0024, 0,0026, 0,0028, 0,0030, 0,0032, 0,0035, 0,0037, 0,0040 o 0,0042 g de CO/100 g de solución acuosa. Los intervalos preferidos incluyen, por  
55 ejemplo, de aproximadamente 0,0010 a aproximadamente 0,0030 g de CO/100 g de líquido, de aproximadamente 0,0015 a aproximadamente 0,0026 g de CO/100 g de líquido, o de aproximadamente 0,0018 a aproximadamente 0,0024 g de CO/100 g de líquido. Un experto en la materia apreciará que pueden usarse cantidades fuera de estos intervalos, dependiendo de la aplicación.

60 El término "paciente" se usa durante toda la memoria descriptiva para describir un animal, humano o no humano, al que se le proporciona el tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente invención. La presente invención contempla claramente aplicaciones veterinarias. El término incluye, aunque sin limitación, mamíferos, por ejemplo, seres humanos, otros primates, cerdos, roedores tales como ratones y ratas, conejos, cobayas, hámsteres, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras. El término "tratar/tratamiento" se usa en el presente documento para  
65 describir el retraso del inicio, la inhibición o el alivio de los efectos de una afección, por ejemplo ECN, en un

paciente.

La expresión “enterocolitis necrosante” o “ECN” es una expresión reconocida en la técnica y se usa en el presente documento para hacer referencia a una enfermedad de pacientes, particularmente lactantes prematuros y nacidos a 5 término recién nacidos, que se caracteriza por insuficiencia de la barrera intestinal, necrosis intestinal, sepsis e insuficiencia multiorgánica (Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). La ECN puede afectar a cualquier parte del intestino, por ejemplo, la parte inferior del intestino delgado (íleo), el colon y/o el intestino delgado superior. El riesgo de desarrollar enterocolitis necrosante está asociado con muchos factores, por ejemplo, bajo peso al nacer, hipoxia, hipotermia, hipotensión, hiperviscosidad, acidosis o la presencia 10 de radicales de oxígeno libres (*Id.*). Otros factores de riesgo incluyen cánula en la arteria umbilical, exanguinotransfusión, alimentaciones hiperosmolares, transfusión de concentrado de eritrocitos o sobredosis con antagonistas de calcio (*Id.*). Dichos factores pueden causar isquemia mesentérica, que pueden permitir infección bacteriana de la pared intestinal, que da como resultado necrosis del tejido infectado y/o perforación de la pared intestinal y septicemia (*Id.*). La ECN también puede producirse en recién nacidos después de una intervención 15 quirúrgica para afecciones gastrointestinales u otras (*Id.*).

Los expertos en la materia apreciarán que a un paciente se le puede diagnosticar que padece ECN mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante diagnóstico por parte de un facultativo (por ejemplo, usando técnicas de imagenología tales como ultrasonografía, rayos X y/o análisis de sangre).

Los individuos considerados en riesgo de desarrollar ECN pueden beneficiarse particularmente de la invención, principalmente porque el tratamiento profiláctico puede comenzar antes de que haya cualquier indicio de ECN. Los individuos “en riesgo” incluyen, por ejemplo, lactantes prematuros y recién nacidos, o individuos que padecen cualquiera de las afecciones o que presentan los factores de riesgo descritos anteriormente. Los expertos en la 20 materia apreciarán que a un paciente se le puede diagnosticar que está en riesgo de ECN mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante diagnóstico por parte de un facultativo (por ejemplo, mediante la valoración por parte de un facultativo de los factores de riesgo de un paciente).

#### Preparación de composiciones gaseosas

Una composición de CO puede ser una composición gaseosa de CO. El gas comprimido o presurizado útil en los métodos de la invención puede obtenerse a partir de cualquier fuente comercial y en cualquier tipo de recipiente apropiado para el almacenamiento de gas comprimido. Por ejemplo, pueden obtenerse gases comprimidos o presurizados a partir de cualquier fuente que suministre gases comprimidos, tales como oxígeno, para uso médico. 30 La expresión gas de “calidad médica”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un gas adecuado para administración a los pacientes, tal como se define en el presente documento. El gas presurizado, incluyendo el CO usado en los métodos de la presente invención, puede proporcionarse de modo que todos los gases de la composición final deseada (por ejemplo, CO, He, NO, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) estén en el mismo recipiente, con la excepción de que el NO y O<sub>2</sub> no pueden almacenarse juntos. Opcionalmente, los métodos de la presente invención pueden 40 realizarse usando múltiples recipientes que contienen gases individuales. Por ejemplo, puede proporcionarse un solo recipiente que contiene CO, con o sin otros gases, cuyo contenido opcionalmente puede mezclarse con aire ambiental o con los contenidos de otros recipientes, por ejemplo, recipientes que contienen oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono, aire comprimido o cualquier otro gas adecuado o mezclas de los mismos.

Las composiciones gaseosas administradas a un paciente de acuerdo con la presente invención típicamente contienen del 0 % a aproximadamente el 79 % en peso de nitrógeno, de aproximadamente el 21 % a aproximadamente el 100 % en peso de oxígeno y de aproximadamente el 0,000001 % a aproximadamente el 0,3 % en peso (correspondiente a aproximadamente 1 ppb o 0,001 ppm a aproximadamente 3.000 ppm) de CO. Preferentemente, la cantidad de nitrógeno en la composición gaseosa es de aproximadamente el 79 % en peso, la 50 cantidad de oxígeno es de aproximadamente el 21 % en peso y la cantidad de CO es de aproximadamente el 0,0001 % a aproximadamente el 0,25 % en peso. La cantidad de CO es preferentemente al menos aproximadamente el 0,001 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,005 %, 0,010 %, 0,02 %, 0,025 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,08 %, 0,10 %, 0,15 %, 0,20 %, 0,22 % o 0,24 % en peso. Los intervalos preferidos incluyen de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,24 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 55 0,22 %, de aproximadamente el 0,015 % a aproximadamente el 0,20 %, de aproximadamente el 0,08 % a aproximadamente el 0,20 %, y aproximadamente el 0,025 % a aproximadamente el 0,1 % en peso. Se observa que las composiciones de CO gaseosas que tienen concentraciones de CO mayores del 0,3 % (tales como del 1 % o mayor) puede usarse durante cortos periodos (por ejemplo, una o unas pocas respiraciones), dependiendo de la aplicación.

Puede usarse una composición gaseosa de CO para crear una atmósfera que comprenda CO gaseoso. Puede crearse una atmósfera que incluya niveles apropiados de CO gaseoso, por ejemplo, proporcionando un recipiente que contenga un gas presurizado que comprende CO gaseoso, y liberando el gas presurizado desde el recipiente a una cámara o espacio para formar una atmósfera que incluya CO gaseoso dentro de la cámara o espacio. Como 60 alternativa, los gases pueden liberarse en un aparato que culmine en una máscara de respiración o tubo de

respiración, creando de esta manera una atmósfera que comprende CO gaseoso en la máscara de respiración o tubo de respiración, garantizando que el paciente es la única persona en la sala expuesta a niveles significativos de CO.

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

#### 15 Preparación de composiciones líquidas

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

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

- 30 El líquido puede ser cualquier líquido conocido por los expertos en la materia y adecuado para la administración a pacientes (véase, por ejemplo, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). En general, el líquido será una solución acuosa. Los ejemplos de soluciones incluyen Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS), Celsior™, Perfadex™, solución de Collins, solución de citrato y solución de la Universidad de
- 35 Wisconsin (UW) (Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). En una realización de la presente invención, el líquido es solución de Ringer, por ejemplo, Solución de Ringer con lactato, o cualquier otro líquido que pueda usarse infundido en un paciente. En otra realización, el líquido incluye sangre, por ejemplo, sangre completa.
- 40 Cualquier líquido adecuado puede saturarse a una concentración establecida de CO a través de difusores de gas. Como alternativa, pueden usarse soluciones prefabricadas que se han sometido a control de calidad para contener niveles establecidos de CO. El control preciso de la dosis puede conseguirse mediante mediciones con una membrana impermeable a líquidos y permeable a gases conectada a un analizador de CO. Las soluciones pueden saturarse a concentraciones eficaces deseadas y mantenerse a esos niveles.

#### 45 Tratamiento de pacientes con composiciones de monóxido de carbono

- Un paciente puede tratarse con una composición de CO mediante cualquier método conocido en la técnica de administración de gases y/o líquidos a pacientes. Las composiciones de CO pueden administrarse a un paciente al
- 50 que se le ha diagnosticado, o al que se ha determinado que está en riesgo de ECN, por ejemplo, lactantes recién nacidos o prematuros. La presente invención contempla la administración sistémica de composiciones líquidas o gaseosas de CO a pacientes (por ejemplo, mediante inhalación y/o ingestión), y la administración tópica de las composiciones al tracto gastrointestinal del paciente (por ejemplo, mediante ingestión, insuflado y/o introducción en la cavidad abdominal).

#### 55 Administración sistémica de monóxido de carbono

- Las composiciones gaseosas de CO pueden administrarse sistémicamente a un paciente, por ejemplo, un paciente al que se le ha diagnosticado o que se ha determinado que está en riesgo de ECN. Las composiciones gaseosas de
- 60 CO típicamente se administran mediante inhalación a través de la boca o las vías nasales a los pulmones, donde el CO se absorbe fácilmente al torrente sanguíneo del paciente. La concentración de compuesto activo (CO) utilizada en la composición gaseosa terapéutica dependerá de las velocidades de absorción, distribución, inactivación y excreción (generalmente, mediante la respiración) del CO, así como de otros factores conocidos por los expertos en la materia. Se entenderá adicionalmente que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación
- 65 específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con las necesidades individuales y el criterio

profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración descritos en el presente documento son sólo ejemplares y no deben considerarse limitantes del alcance o práctica de la composición reivindicada. La presente invención contempla la administración aguda, subaguda y crónica del CO, dependiendo, por ejemplo, de la gravedad o persistencia de ECN en el paciente. El CO puede administrarse al paciente durante un tiempo (incluyendo indefinidamente) suficiente para tratar la afección y ejercer el efecto farmacológico o biológico deseado.

A continuación se proporcionan ejemplos de algunos métodos y dispositivos que pueden utilizarse para administrar composiciones gaseosas de CO a pacientes.

#### 10 *Respiradores*

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

#### 30 *Máscara facial y tienda*

Se prepara una mezcla de gas que contiene CO tal como se ha indicado anteriormente para permitir la inhalación pasiva por el paciente usando una máscara facial o tienda. La concentración inhalada puede cambiarse y eliminarse simplemente cambiando al 100 % de O<sub>2</sub>. La supervisión de los niveles de CO se produciría en o cerca de la máscara o tienda con un mecanismo a prueba de fallos que impediría que se inhalara una concentración demasiado elevada de CO.

#### *Inhalador portátil*

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

#### *Pulmón artificial intravenoso*

Puede usarse un pulmón artificial (un dispositivo de catéter para el intercambio de gas en la sangre) diseñado para la administración de O<sub>2</sub> y la eliminación de CO<sub>2</sub>, para la administración de monóxido de carbono. El catéter, cuando se implanta, reside en una de las venas grandes y podría suministrar CO a concentraciones dadas para la administración sistémica o en un sitio local. La administración puede ser una administración local de una alta concentración de monóxido de carbono durante un corto periodo de tiempo en el sitio del procedimiento, por ejemplo, en las inmediaciones del intestino delgado (esta alta concentración se diluiría rápidamente en el torrente sanguíneo), o una exposición relativamente más prolongada a una menor concentración de CO (véase, por ejemplo, Hattler et al., *Artif. 45 Organs* 18(11): 806-812 (1994); y Golob et al., *ASAIO J.*, 47(5): 432-437 (2001)).

#### *Cámara normobárica*

En ciertos casos, sería deseable exponer a todo el paciente a CO. El paciente estaría dentro de una cámara hermética inundada con CO (a un nivel que no ponga en peligro al paciente, o a un nivel que suponga un riesgo aceptable para el paciente sin exponer a riesgos a los espectadores. Una vez completada la exposición, la cámara podría inundarse con aire (por ejemplo 21% de O<sub>2</sub> y 79% de N<sub>2</sub>) y podrían analizarse muestras con analizadores de CO para asegurarse de que no queda CO antes de permitir que el paciente salga del sistema de exposición.

60



Administración sistémica de composiciones líquidas de CO

La presente invención contempla, además, que pueden crearse composiciones líquidas de CO para la administración sistémica a un paciente, por ejemplo, por infusión en el paciente. Por ejemplo, pueden infundirse composiciones líquidas de CO, tales como Solución de Ringer saturada con CO, en un paciente que padece o en riesgo de padecer ECN. Como alternativa o además, en el paciente puede infundirse sangre completa (o parcial), parcial o completamente saturada con CO. La presente invención también contempla que pueden utilizarse agentes capaces de administrar dosis de composiciones gaseosas de CO o composiciones líquidas de CO (por ejemplo, gomas de liberación de CO, cremas, pomadas o parches).

10

Tratamiento tópico del tracto gastrointestinal con monóxido de carbono

Como alternativa o además, pueden aplicarse composiciones de CO directamente en el tracto gastrointestinal, por ejemplo, en el interior y/o exterior de todo el tracto gastrointestinal o en cualquier parte del mismo. Una composición gaseosa puede aplicarse directamente al tracto gastrointestinal de un paciente, por ejemplo un lactante prematuro o recién nacido, mediante cualquier método conocido en la técnica para insuflar gases en un paciente. Por ejemplo, con frecuencia se insuflan gases, por ejemplo dióxido de carbono, en el tracto gastrointestinal y la cavidad abdominal de pacientes para facilitar el examen durante procedimientos endoscópicos y laparoscópicos (véase, por ejemplo, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). El experto en la materia apreciará que podrían usarse procedimientos similares para administrar composiciones de CO directamente al tracto gastrointestinal de un paciente. También se contempla que la presente invención pueda aplicarse para ayudar a prevenir ECN que resulta de laparoscopia y endoscopia, por ejemplo, colonoscopia y esofagogastroduodenoscopia.

15

20

25

30

35

También pueden administrarse por vía tópica composiciones acuosas de CO al tracto gastrointestinal de un paciente. Pueden administrarse formas acuosas de las composiciones mediante cualquier método conocido en la técnica para administrar líquidos a pacientes. Como ocurre con las composiciones gaseosas, las composiciones acuosas pueden aplicarse directamente al interior y/o exterior del tracto gastrointestinal. Por ejemplo, la forma acuosa puede administrarse por vía oral, por ejemplo haciendo que el paciente ingiera una dosis encapsulada o sin encapsular de la composición acuosa de CO. Como otro ejemplo, pueden inyectarse líquidos, por ejemplo soluciones salinas que contienen CO disuelto, en el tracto gastrointestinal y la cavidad abdominal de pacientes durante procedimientos endoscópicos y laparoscópicos, respectivamente. Además, puede realizarse una exposición in situ lavando el tracto gastrointestinal o una parte del mismo con una composición líquida de CO (véase Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)).

Uso de hemoxigenasa-1, otros compuestos y otros tratamientos para ECN

También se contempla por la presente invención la inducción o expresión de la hemoxigenasa-1 (HO-1) junto con la administración de CO. Por ejemplo, la HO-1 puede inducirse en un paciente que padece o en riesgo de padecer ECN. Tal como se usa en el presente documento, el término "inducir/inducido" significa producir una mayor producción de proteína, por ejemplo HO-1, en células aisladas o las células de un tejido, órgano o animal usando el gen endógeno de las propias células (por ejemplo, no recombinante) que codifica la proteína.

40

45

50

55

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

La expresión de HO-1 en una célula puede aumentarse mediante transferencia génica. Tal como se usa en el presente documento, el término "expresar/expresado" significa producir una mayor producción de una proteína, por ejemplo HO-1 o ferritina, en células aisladas o las células de un tejido, órgano o animal usando un gen administrado exógenamente (por ejemplo, un gen recombinante). La HO-1 o ferritina preferentemente es de la misma especie (por ejemplo, ser humano, ratón, rata, etc.) que el receptor, para minimizar cualquier reacción inmunitaria. La expresión podría estar dirigida por un promotor constitutivo (por ejemplo, promotores de citomegalovirus) o un promotor específico de tejido (por ejemplo, promotor del suero de leche para células de mamífero o promotor de albúmina para células hepáticas). Un vector de terapia génica apropiado (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado (VAA), poxvirus (por ejemplo, vaccinia), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus

60

diminuto de ratón, el virus de la hepatitis B, virus de la gripe, Virus Herpes Simplex-1 y lentivirus) que codifica HO-1 o ferritina se administraría a un paciente que padece o en riesgo de padecer ECN, a través de la boca, mediante inhalación o inyección en el la pared intestinal, la luz intestinal o la cavidad abdominal. De forma similar, pueden administrarse vectores plasmídicos que codifican HO-1 o apoferritina, por ejemplo, como ADN desnudo, en liposomas, o en micropartículas.

Además, puede administrarse proteína HO-1 exógena directamente a un paciente mediante cualquier método conocido en la técnica. La HO-1 exógena puede administrarse directamente además, o como alternativa, a la inducción o expresión de HO-1 en el paciente tal como se ha descrito anteriormente. La proteína HO-1 puede administrarse a un paciente, por ejemplo, en liposomas, y/o como una proteína de fusión, por ejemplo, como una proteína de fusión con TAT (véase, por ejemplo, Becker-Hapak et al., Methods 24: 247-256, 2001).

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

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

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

La presente invención contempla además tratar ECN administrando CO al paciente en combinación con cualesquiera otros métodos o compuestos conocidos para tratar ECN, por ejemplo, cese o reducción de la velocidad de alimentación por la boca, por ejemplo, durante al menos 1 día, por ejemplo, al menos 2, 3, 5 o 10 días, o más); administrar hidratación y/o nutrición intravenosa, descompresión nasogástrica o agentes antimicrobianos al paciente; intervención quirúrgica; y/o drenar la cavidad peritoneal del paciente. Las intervenciones quirúrgicas incluyen, por ejemplo, extirpar la parte afectada del intestino. También se contempla el tratamiento preventivo de pacientes en riesgo de ECN administrando CO al paciente en combinación con cualesquiera otros métodos conocidos para prevenir ECN, por ejemplo, cambiar la dieta del paciente.

La invención se ilustra, en parte, mediante los siguientes ejemplos, que no deben considerarse limitantes de la invención de forma alguna.

#### 45 Ejemplo 1. El CO atenúa el desarrollo de ECN

##### **Recogida de muestras intestinales humanas**

Se recogieron muestras intestinales humanas y se congelaron instantáneamente en el momento de la operación.

##### **Modelo animal de enterocolitis necrosante**

A ratas Sprague-Dawley con fecha y hora embarazadas se les provocó el parto usando inyección subcutánea de Pitocina (1 U). Inmediatamente después del parto (día cero), los recién nacidos se pesaron y se asignaron aleatoriamente a dos grupos principales. Los animales se dejaron con sus madres y de este modo fueron amamantados, o se separaron de sus madres, se alojaron en una incubadora (Ohio Medical Products, Madison, WI), se alimentaron con sonda con una fórmula especial para roedores dos veces al día, y se sometieron a 10 minutos de hipoxia (5 % de O<sub>2</sub>, 95 % de N<sub>2</sub>; PraxAir, Pittsburgh, PA) antes de cada alimentación. La fórmula constaba de 15 g de Similac® 60/40 (Ross Pediatrics, Columbus, OH) en 75 ml de sustituto de leche para perros Esbilac® (Pet-Ag Inc., Hampshire, IL). Ratras de cada grupo fueron asignadas aleatoriamente adicionalmente para no recibir ningún tratamiento adicional o tratamiento con CO una hora al día (250 partes por millón; ppm, días 1-3). El CO se administró tal como se describe a continuación. Las ratas recién nacidas se sacrificaron el día cuatro. Los intestinos fueron inspeccionados en busca de cambios necróticos macroscópicos y neumatosis intestinal. Los últimos 2 cm de ileon terminal se recogieron para estudios morfológicos, y se recogieron raspados mucosales para detección de proteína.

**Exposición a CO**

Los animales se expusieron a CO a una concentración de 250 ppm. En resumen, CO al 1 % en aire se mezcló con aire (21 % de oxígeno) en un cilindro mezclador de acero inoxidable y a continuación se dirigieron al interior de una cámara de exposición de vidrio de 3,70 pies<sup>3</sup> a un caudal de 12 l/min. Se usó un analizador de CO (Interscan, Chatsworth, CA) para medir los niveles de CO de forma continua en la cámara. Las concentraciones de CO se mantuvieron a 250 ppm en todo momento. Las ratas se introdujeron en la cámara de exposición según se requirió.

**Estudios morfológicos**

Se recogieron muestras intestinales tal como se ha descrito anteriormente. Se prepararon portaobjetos con hematoxilina y eosina (H&E) según el protocolo estándar y se examinaron mediante microscopía óptica. La presencia de cambios morfológicos en el epitelio intestinal, incluyendo la separación del núcleo veloso, edema submucoso, y desprendimiento epitelial, fueron determinados por un patólogo de manera enmascarada.

**Determinación de citoquinas séricas**

Se recogió suero para la determinación de los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en rata usando Quantikine® ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Cultivo celular**

La línea celular epitelial del intestino delgado de rata IEC-6 se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo "American Type Culture Collection" (Manassas, VA). Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco con 4,5 g/l de glucosa (Bio-Whittaker, Walkersville, MD) suplementado con suero fetal bovino al 5 %, glutamina 0,02 mM (Gibco, Grand Island, NY), 0,1 U/ml de insulina, y 100 U/ml de penicilina/100  $\mu$ g/ml de estreptomycin a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 10 %. Las células de los pases 3 a 20 se usaron para experimentos.

**Viabilidad**

La viabilidad celular se determinó midiendo los niveles de ATP (CellTiter-Glo™; Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

**Análisis por transferencia de Western**

Se recogieron células IEC-6 o raspados de la mucosa ileal en tampón de lisis que contenía 20 mmol/l de Tris con 100  $\mu$ mol/l de fenilmetilsulfoni fluoruro (Sigma), 1  $\mu$ mol/l de leupeptina (Sigma), y 1  $\mu$ mol/l ortovanadato sódico (Sigma). La proteína se cuantificó mediante ensayo de proteínas con ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL). Los lisados (30  $\mu$ g) se sometieron electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida.

**Ensayo informador**

El informador de luciferasa del promotor iNOS de rata pGL3/2 se construyó tal como se describe en el documento Beck et al., FEBS Lett 435: 35-38 (1998). Células IEC-6 cultivadas en pocillos de 35 mm se transfectaron con 4  $\mu$ l de Lipofectamine2000® (Invitrogen), 0,15  $\mu$ g de ADN de pGL3/2 y 0,5  $\mu$ g de ADN de pIEP-LacZ, que se usó como control para la eficiencia de transfección. Veinticuatro horas después de la transfección, las células fueron tratadas durante 6 horas, a continuación se recogieron lisados y se realizó un ensayo de luciferasa (Promega) con un luminómetro (Berthold, Alemania).

**Determinación de nitrito**

El nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) se midió en el medio de cultivo usando el método de Griess.

**Análisis estadístico**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ETM. Las diferencias entre los grupos se analizaron con análisis de la varianza de una vía con test de Student-Newman-Keuls *post-hoc* para todas las comparaciones emparejadas (SigmaStat; SPSS, Chicago, IL). Se supuso significación estadística cuando P era menor de 0,05.

**La proteína HO-1 intestinal se incrementa en ECN**

Muestras intestinales humanas de pacientes con ECN y muestras intestinales de control de pacientes con afecciones no inflamatorias se analizaron para la expresión de HO-1. Lisados de células completas de muestras con ECN demostraron una mayor expresión de HO-1 en comparación con los controles (figura 1A).

Para determinar si los niveles de proteína HO-1 intestinal se incrementarían en un modelo de ECN experimental, ratas recién nacidas se asignaron aleatoriamente a lactancia materna *ad libitum* o a ser sometidas a hipoxia intermitente y alimentadas con la fórmula (H/F), tal como se ha descrito anteriormente. Todos los animales fueron sacrificados el 4º día de vida y mucosas ileales terminales se recogieron y se analizaron mediante transferencia de Western. La expresión de la proteína HO-1 se incrementó en el grupo de H/F en comparación con los animales de control amamantados (figura 1B). Esto es coherente con descubrimientos previos en el intestino y otros órganos que ilustran la regulación positiva de HO-1 después de diversas lesiones.

#### El CO protege contra el desarrollo de ECN

Ratas recién nacidas de los grupos de lactancia materna y H/F se asignaron aleatoriamente para recibir dosis de una hora de CO (250 ppm) al día los días 1, 2 y 3, o ninguna terapia adicional. Todos los animales fueron sacrificados el 4º día de vida. Las características patológicas macroscópicas incluyendo *neumatosis intestinal* y necrosis (véase la tabla 1, a continuación) así como cambios histológicos coherentes con ECN experimental se identificaron en el grupo de H/F en comparación con controles amamantados (figura 2A, 2B, 2C y 2D). El tratamiento con CO no tenía ningún efecto sobre la evaluación macro o microscópica de animales amamantados y protegía significativamente contra el desarrollo de ECN experimental en ratas en el grupo de H/F. La tinción TUNEL para muerte celular, que se incrementó en el grupo de H/F, disminuyó mediante tratamiento con CO (figura 3A, 3B, 3C y 3D).

**Tabla 1. Cambios patológicos desde el íleon de rata recién nacida el 4º día de vida.**

	Lactancia	Lactancia + CO	Alimentados con la fórmula/Hipoxia	Alimentados con la fórmula /Hipoxia + CO
Número total (n)	7	7	8	8
Cambios macroscópicos (n)				
<i>Necrosis de la pared intestinal</i>	0	0	5	2
<i>Neumatosis intestinal</i>	0	0	5	1
Cambios microscópicos (n)				
<i>Atrofia vellosa</i>	0	0	7	2
<i>Vacuolización</i>	0	1	6	3
<i>Neutrófilos del estroma</i>	0	0	6	1

#### El CO disminuye los marcadores sistémicos de inflamación.

En el momento del sacrificio, se recogió suero para la medición de los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  como marcadores sistémicos de la inflamación tisular. Los niveles tanto de TNF- $\alpha$  como de IL-1 $\beta$  se incrementaron en 33,2 y 18,5 veces en el grupo de H/F en comparación con controles amamantados (figuras 4A y 4B;  $P < 0,05$ ). El CO atenúa significativamente estos incrementos, dando como resultado incrementos de solamente 3 y 2,5 veces de TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , respectivamente ( $P < 0,05$ ). Estos descubrimientos demuestran que el CO exógeno puede suprimir algunas de las consecuencias sistémicas en este modelo animal.

#### El CO disminuye los marcadores intestinales locales de inflamación.

Se realizaron análisis para ciclooxigenasa-2 (COX-2) e interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), ambos de los cuales son marcadores de inflamación intestinal y se había demostrado que están asociados con ECN. Se evaluaron lisados de proteína mucosa ileal mediante análisis por transferencia de Western para COX-2 e IL-1 $\beta$ . En este estudio H/F se asoció con un incremento de los niveles de proteínas COX-2 e IL-1 $\beta$  ileales en aproximadamente la mitad de los animales (figura 5). Coherente con los efectos protectoras sobre la histología y las citoquinas séricas, el tratamiento con CO disminuyó la expresión de ambas de estas proteínas. El CO también disminuía la expresión de HO-1 ileal en este modelo (datos no mostrados), que probablemente representa una disminución de la lesión intestinal y los cambios compensatorios que se producen en respuesta a la lesión.

#### El CO inhibe la generación de óxido nítrico sintasa inducible intestinal (iNOS)

La iNOS se incrementa en muestras intestinales humanas de recién nacidos con ECN así como en los intestinos de ratas en modelos experimentales de ECN. Se cree que la inducción de la generación de iNOS y NO contribuye directamente al daño tisular mediante formación de especies de nitrógeno reactivas. Los análisis por transferencia de Western de muestras mucosas ileales en este estudio demuestran que H/F da como resultado niveles incrementados de iNOS y nitración de proteínas (figura 6). Se cree que la nitración o formación de nitrotirosina está causada por peroxinitrito, el producto tóxico de la interacción de NO y superóxido. Tanto la proteína iNOS como las nitrosotirosinas disminuyeron marcadamente en animales tratados con CO, sugiriendo que el CO puede ser

protector en los intestinos disminuyendo/previniendo la generación de NO.

#### HO-1/CO inhibe la muerte celular de IEC-6

5 Para determinar si HO-1 o CO inhibe la muerte celular *in vitro*, se utilizó la línea celular epitelial intestinal de rata IEC-6. Se indujo la muerte celular tratando estas células con TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) más actinomicina D (ActD; 200 ng/ml). La viabilidad celular se analizó mediante tinción con cristal violeta de células adherentes y valoración del contenido de ATP celular. TNF- $\alpha$ /ActD disminuía la viabilidad celular de IEC-6 hasta el  $24 \pm 2,1$  % el de los controles no tratados (figura 7;  $P < 0,05$ ). El CO inhibía significativamente la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ /ActD dando  
10 como resultado un  $54 \pm 5,6$  % de viabilidad en comparación con controles no tratados ( $P < 0,05$ ). El CO en solitario no presentaba ningún efecto medible sobre la viabilidad de células IEC-6 *in vitro*. La inducción de HO-1 mediante CoPP presentaba efectos protectores similares.

#### El CO previene la regulación positiva de iNOS/generación de NO

15 Se investigó si el CO puede inhibir la regulación positiva de iNOS en células epiteliales intestinales *in vitro*. Los efectos de LPS y/u oxígeno al 1 % (hipoxia) se investigaron sobre la proteína iNOS mediante transferencia de Western. Estos estudios demuestran que LPS/hipoxia incrementaba la proteína iNOS, que es un efecto que fue inhibido por CO (figura 8A). Los efectos de CO sobre la activación transcripcional del promotor de iNOS de rata se  
20 ensayaron en células IEC-6 estimuladas con LPS e hipoxia (figura 8B). La combinación de LPS más hipoxia dio como resultado un incremento de  $4,9 \pm 0,3$  veces de la activación transcripcional del promotor de iNOS utilizando un ensayo de luciferasa ( $P < 0,05$ ). El CO limitaba esta activación transcripcional a solamente un incremento de  $1,7 \pm 0,2$  veces ( $P < 0,05$ ). Adicionalmente, el efecto de CO sobre la generación de NO por células IEC-6 se ensayó midiendo el nitrito. Las células IEC-6 se estimularon con una mezcla de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Interferón- $\gamma$ ) que se sabe  
25 que regula positivamente iNOS. La estimulación con citoquinas incrementaba la proteína iNOS (figura 8C) así como el nitrito a  $17,2 \pm 0,9$   $\mu$ M en comparación con  $1,4 \pm 0,3$   $\mu$ M en controles no estimulados ( $P < 0,01$ ; figura 8D). CO y CoPP inhibían significativamente este efecto sobre las citoquinas que da como resultado los niveles de nitrito de  $9,8 \pm 0,7$  y  $10,4 \pm 1,0$ , respectivamente ( $P < 0,05$ ).

30 Los datos presentados anteriormente indican que HO-1 está regulada positivamente en muestras intestinales de recién nacidos humanos con ECN así como en la mucosa ileal de ratas recién nacidas en un modelo de ECN experimental. Una hora al día de administración de CO exógeno prevenía el desarrollo de ECN. Esto estaba asociado con una disminución de la inflamación sistémica según lo evaluado mediante TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  séricos, e inflamación local según lo ensayado mediante expresión en la mucosa ileal de IL-1 $\beta$  y COX-2. El desarrollo de ECN  
35 también estaba asociado con expresión de iNOS en la mucosa ileal y nitración de proteínas incrementadas. La terapia con CO atenuaba el incremento de iNOS y el estrés nitrosativo. *In vitro*, la inducción de HO-1 o CO es protectora contra la muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ /ActD en células IEC-6. Adicionalmente *in vitro*, el CO prevenía la inducción de iNOS y la generación de NO.

40 HO-1 y sus subproductos catalíticos, incluyendo CO, probablemente desempeñan un papel defensivo después de una lesión intestinal. Los datos presentados anteriormente demuestran que los niveles de proteína HO-1 se incrementan en la mucosa ileal de animales con ECN, lo que es coherente con estudios previos que demuestran HO-1 intestinal incrementada en modelos de isquemia/reperfusión y choque hemorrágico. La inducción de HO-1, mediante pre-acondicionamiento o farmacológicamente, es citoprotectora después del trasplante intestinal e  
45 isquemia/reperfusión. El tratamiento con CO, que es protector contra el desarrollo de ECN, también prevenía la regulación positiva de HO-1. Esta inhibición de la expresión de HO-1 puede deberse a un bucle de retroalimentación negativa directa; sin embargo, esto es probablemente secundario a la protección contra lesión intestinal con la posterior regulación positiva de HO-1.

50 Una hora de terapia por inhalación de CO (250 ppm) al día fue suficiente para prevenir el desarrollo de ECN. Es probable que los efectos protectores de CO en este modelo animal de ECN sean multifactoriales. Los datos presentados anteriormente demuestran que la administración de CO causa una disminución de la apoptosis intestinal según lo ensayado mediante tinción TUNEL *in vivo* y una mejora de la muerte celular de IEC-6 inducida por TNF- $\alpha$ /ActD *in vitro*. La terapia con CO también estaba asociada con una menor elaboración de mediadores tanto  
55 sistémicos como inflamatorios.

iNOS/NO están asociados con daño a la mucosa e insuficiencia de la barrera intestinal en enfermedad intestinal inflamatoria, ileitis experimental, choque endotóxico y ECN. Los datos presentados anteriormente muestran que el CO disminuye la regulación positiva de iNOS *in vitro* e *in vivo*, además de disminuir la formación de nitrosotirosina *in vivo*. El peroxinitrito, que se cree que es la especie de nitrógeno reactiva responsable de la toxicidad y la apoptosis de enterocitos, reacciona con proteínas para dar como resultado la nitración de residuos de tirosina. Se cree que esta especie se forma mediante la interacción de NO y superóxido. La protección de enterocitos mediada por CO puede mediarse mediante la inhibición de la regulación positiva de la proteína iNOS, disminuyendo la posterior  
60 generación de NO y peroxinitrito.

65

La prevención del desarrollo de ECN por CO puede implicar una motilidad gastrointestinal sostenida y prevención de colonización bacteriana inapropiada. Es conocido que la colonización intestinal alterada contribuye al desarrollo de ECN.

- 5 En conclusión, el presente ejemplo demuestra que una hora de terapia con CO al día protegía a ratas recién nacidas alimentadas con la fórmula/hipóxica del desarrollo de ECN experimental. El mecanismo parece implicar la inhibición de la expresión de iNOS y la nitración de proteínas.

Ejemplo 2. Protocolo para el tratamiento de ECN

10

El siguiente ejemplo ilustra protocolos para uso en el tratamiento de un paciente que padece o en riesgo de ECN. El ejemplo también ilustra protocolos para tratar a pacientes antes, durante y/o después de procedimientos quirúrgicos, por ejemplo, un procedimiento quirúrgico para tratar ECN, una intervención quirúrgica en la que se extirpa una parte del intestino. Los expertos en la materia apreciarán que puede adaptarse cualquier protocolo descrito en el presente

- 15 documento basándose en las necesidades individuales del paciente, y puede adaptarse para usarse junto con cualquier otro tratamiento para ECN.

El tratamiento de un paciente con CO puede comenzar el día que al paciente se le diagnostica que padece ECN o cualquier afección asociada con ECN, o que presenta cualquier factor de riesgo asociado con una mayor

20 probabilidad de que el paciente desarrolle ECN. Los pacientes pueden inhalar CO a concentraciones que varían entre 10 ppm y 1000 ppm, por ejemplo, de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 800 ppm, de aproximadamente 150 ppm a aproximadamente 600 ppm, o de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 500 ppm. Las concentraciones preferidas incluyen, por ejemplo, de aproximadamente 30 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, o aproximadamente 1000 ppm. El CO puede administrarse al

25 paciente de forma intermitente o de forma continua. El CO puede administrarse durante aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 o 20 días, o más de 20 días, por ejemplo, 1, 2, 3, 5 o 6 meses, o hasta que el paciente ya no muestra síntomas de ECN, o hasta que al paciente se le ha diagnosticado que ya no está en riesgo de ECN. En un día dado, el CO puede administrarse de forma continua durante todo el día, o intermitentemente, por ejemplo, una única aspiración de CO al día (donde se usa una concentración elevada), o durante hasta 23 horas al día, por ejemplo,

30 hasta 20, 15, 12, 10, 6, 3 o 2 horas al día, o hasta 1 hora al día.

Con respecto a la administración de CO junto con procedimientos quirúrgicos para tratar ECN, el CO puede administrarse de forma sistémica o de forma local a un paciente antes de, durante y/o después de que se ha realizado un procedimiento quirúrgico. Los pacientes pueden inhalar CO a concentraciones que varían de 10 ppm a

35 1000 ppm, por ejemplo, de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 800 ppm, de aproximadamente 150 ppm a aproximadamente 600 ppm, o de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 500 ppm. Las concentraciones preferidas incluyen, por ejemplo, aproximadamente 30 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm o aproximadamente 1000 ppm. El CO puede administrarse al paciente de forma intermitente o de forma continua, durante aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 o 20 días, o más de 20 días,

40 antes del procedimiento. Como alternativa o además, el CO puede administrarse al paciente durante el procedimiento, por ejemplo, por inhalación y/o administración tópica. Como alternativa o además, el CO puede administrarse al paciente después del procedimiento, por ejemplo, empezando inmediatamente después de la compleción del procedimiento, y continuando durante aproximadamente 1, 2, 3, 5, 7 o 10 horas, o aproximadamente

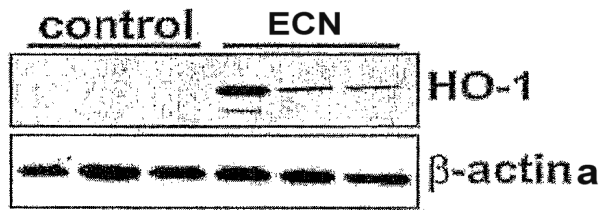
45 1, 2, 5, 8, 10, 20, 30, 50 o 60 días, indefinidamente, o hasta que el paciente ya no padece, o está en riesgo de, ECN después de la compleción del procedimiento.

Se han descrito una serie de realizaciones de la invención que están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Monóxido de carbono para usar en el tratamiento o la prevención de la enterocolitis necrosante en un paciente.
- 5 2. Uso del monóxido de carbono para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o prevenir la enterocolitis necrosante en un paciente.
3. El uso de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la composición farmacéutica se administra al paciente por vía oral, por inhalación o mediante administración directa a la cavidad abdominal del paciente.
- 10 4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el paciente es un lactante, o un lactante prematuro; muestra bajo peso al nacer, hipoxia, hipotermia, hipotensión, hiperviscosidad de la sangre o acidosis; ha recibido una exanguinotransfusión, al menos una alimentación hiperosmolar, una transfusión de concentrado de eritrocitos, o una sobredosis de antagonistas de calcio; padece isquemia mesentérica o una infección bacteriana de la pared
- 15 intestinal; o se ha sometido, está a punto de someterse o se está sometiendo a una intervención quirúrgica.
5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que tratar o prevenir la enterocolitis necrosante comprende, además, administrar al paciente un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en: alimentación intravenosa; hidratación intravenosa; un agente antimicrobiano; y realizar descompresión nasogástrica en el
- 20 paciente.
6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición farmacéutica se administra por un pulmón artificial o un dispositivo extracorpóreo de intercambio de gases a través de una membrana.
- 25 7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la composición farmacéutica se administra antes, durante o después de realizar una intervención quirúrgica en el paciente para extirpar una parte afectada del intestino del paciente.
8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la composición farmacéutica está en forma gaseosa.
- 30 9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la composición farmacéutica está en forma líquida.
10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el tratamiento o prevención de la enterocolitis necrosante comprende
- 35 (a) liberar la composición farmacéutica desde un recipiente que contiene un gas presurizado que comprende monóxido de carbono, para formar una atmósfera que comprende monóxido de carbono gaseoso; y  
(b) exponer al paciente a dicha atmósfera.
- 40 11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el paciente es un ser humano.
12. El uso de la reivindicación 10, en el que el monóxido de carbono gaseoso está presente en el gas presurizado a una concentración de al menos aproximadamente el 0,025 %, al menos aproximadamente el 0,05 %, al menos aproximadamente el 0,10 %, al menos aproximadamente el 1,0 % o al menos aproximadamente el 2,0 %.
- 45 13. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la composición farmacéutica comprende monóxido de carbono a una concentración de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 0,24 %, de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,22 %, de aproximadamente el 0,015 % a aproximadamente el 0,20 %, o de aproximadamente el 0,025 % a aproximadamente el 0,1 %.
- 50

A.



B.

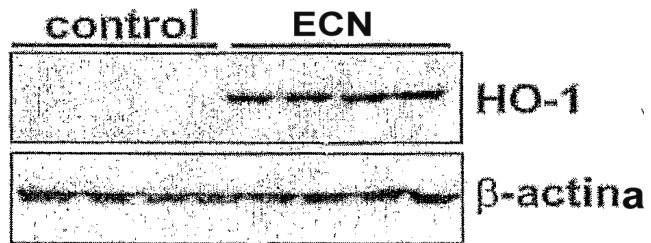


Fig. 1A-1B



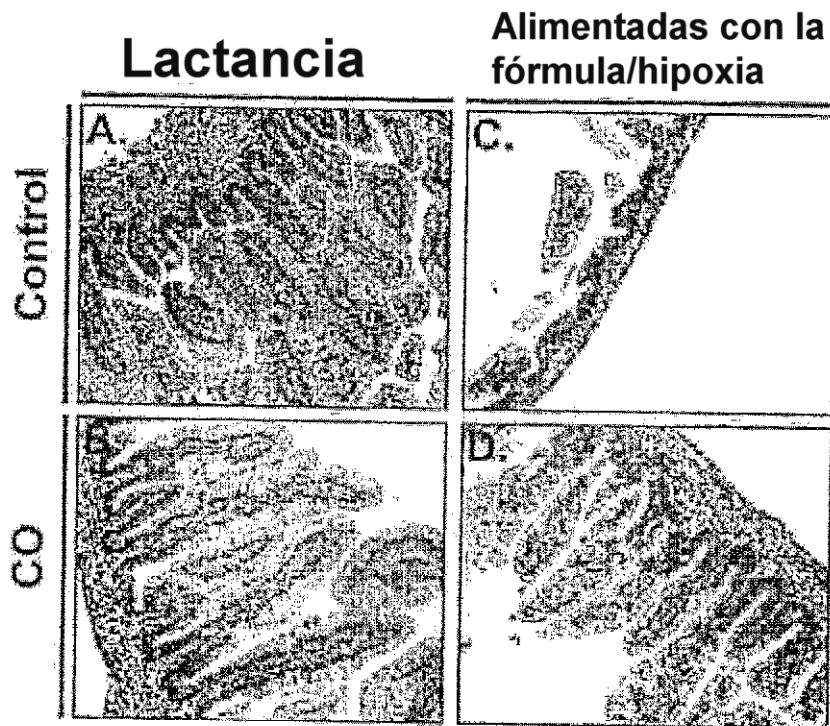
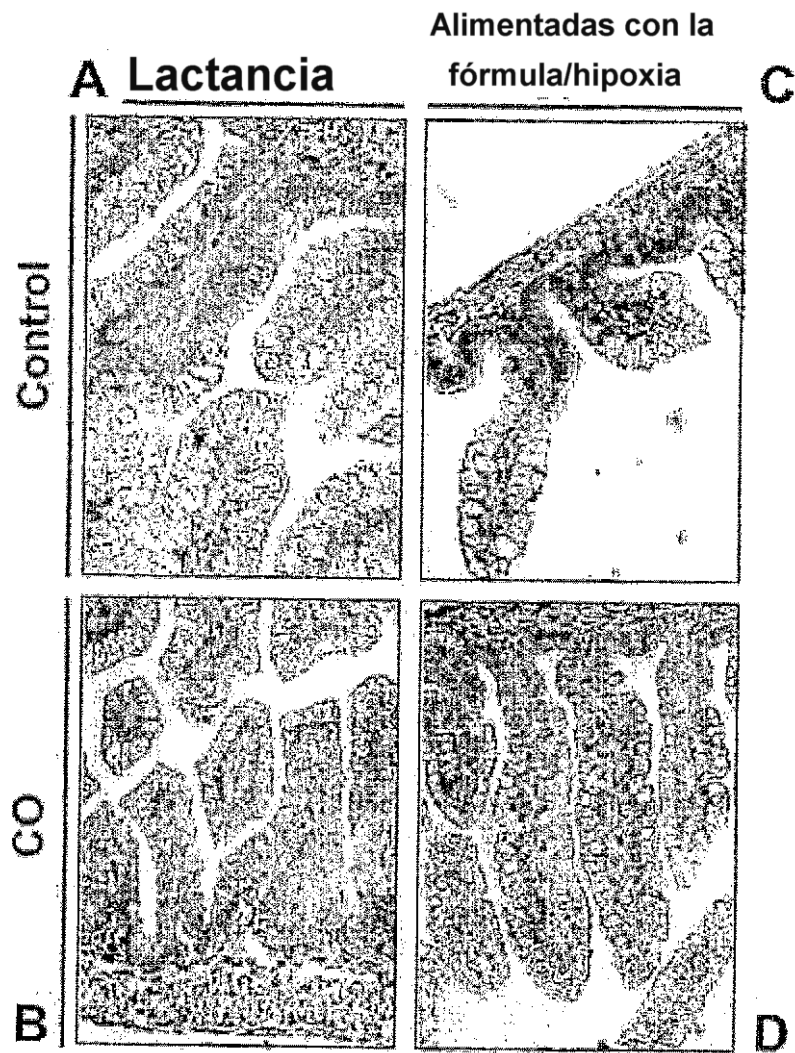
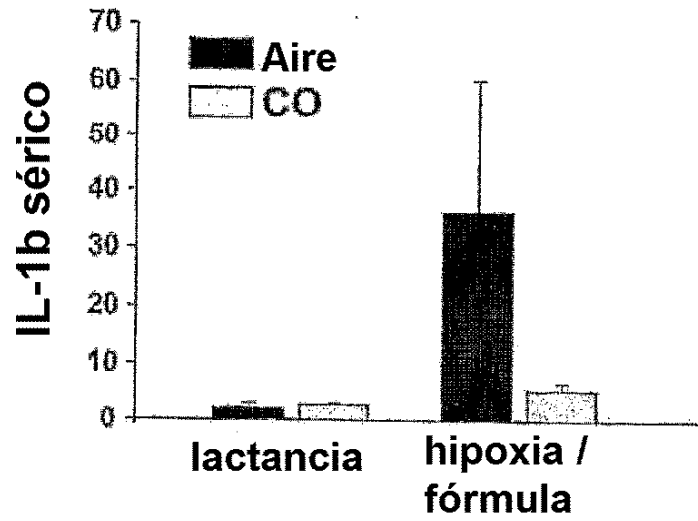


Fig. 2A-2D



**Fig. 3A-3D**

A.



B.

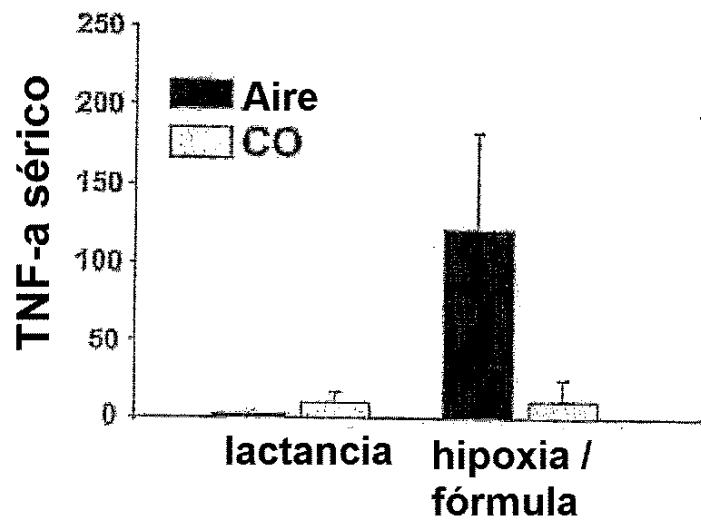


Fig. 4A-4B

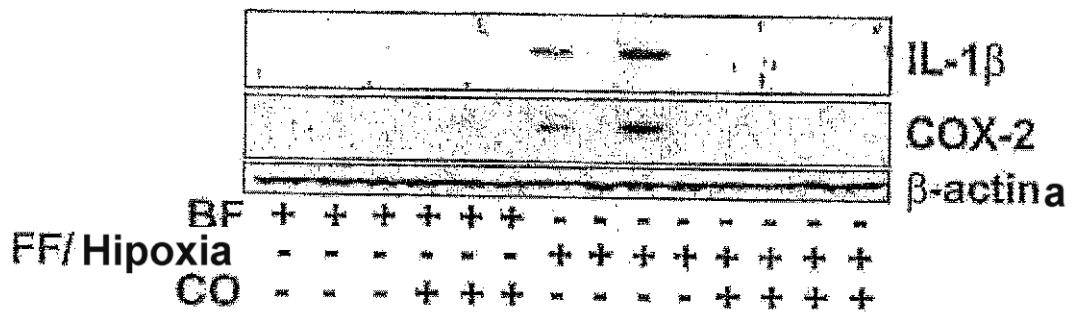


Fig. 5

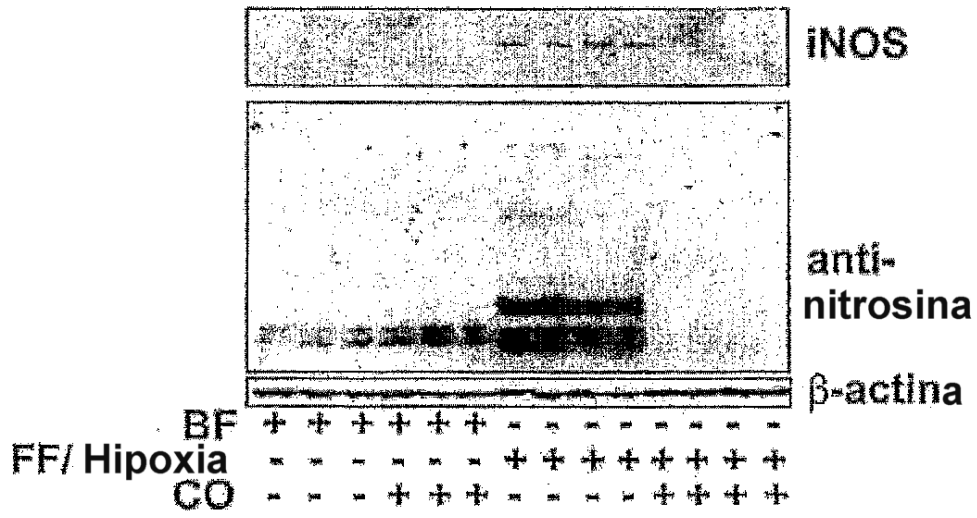


Fig. 6

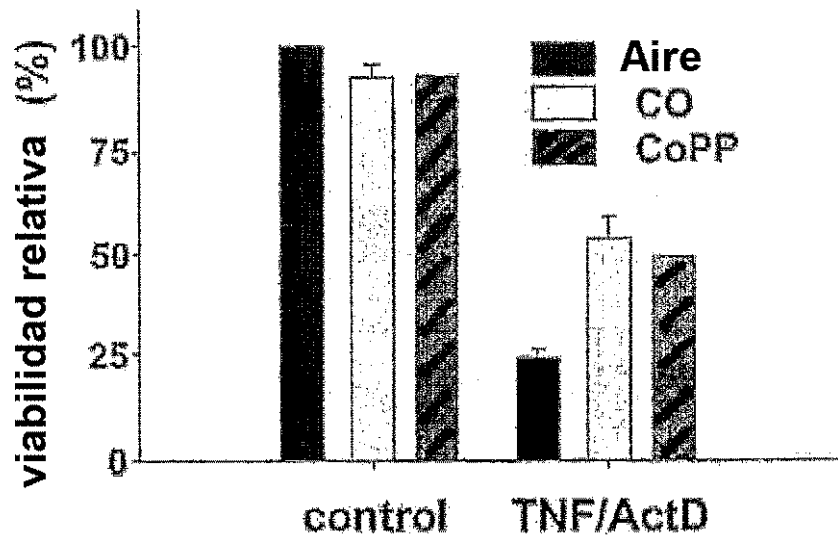
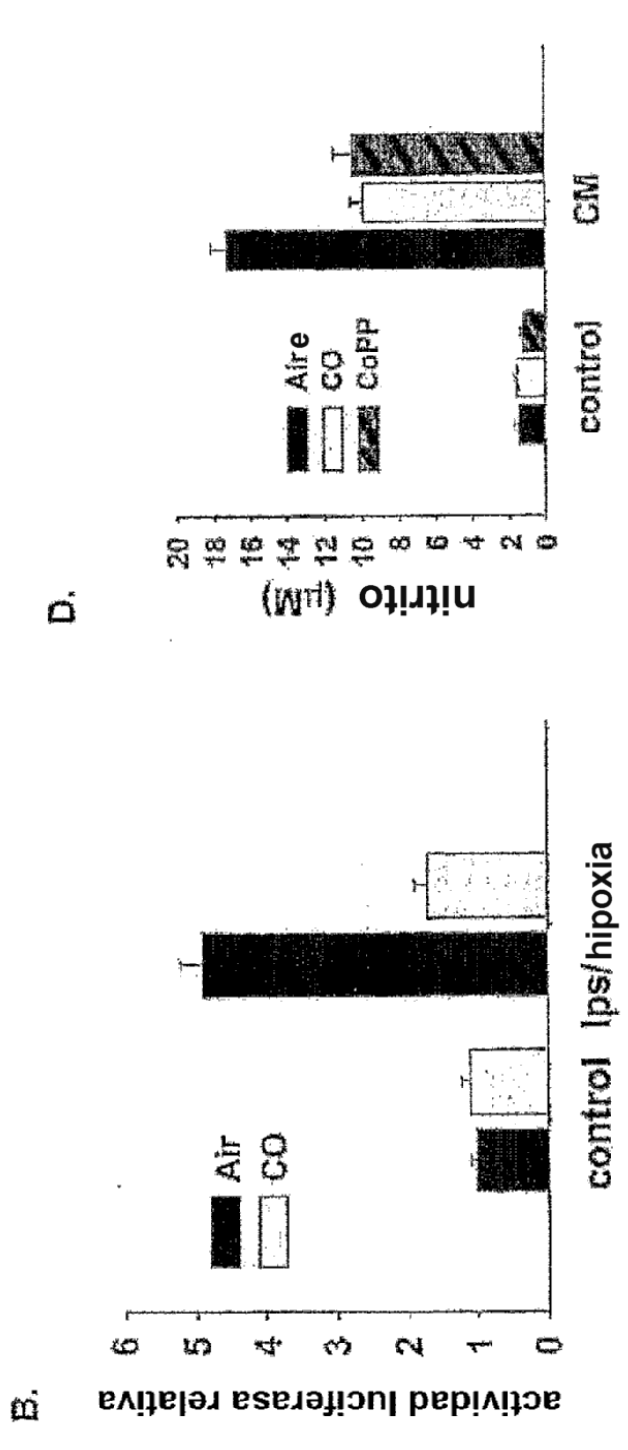
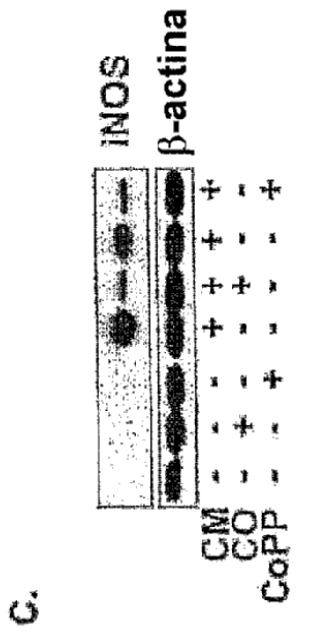
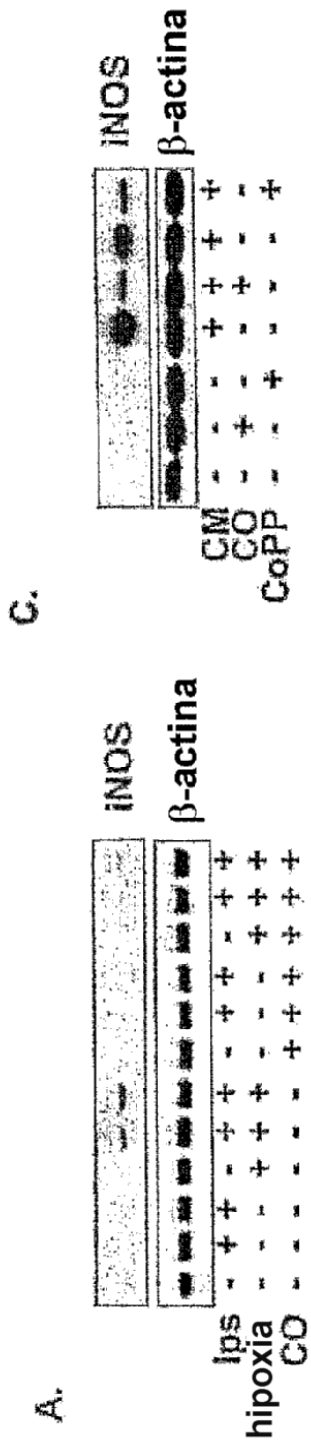


Fig. 7



## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

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

## Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • WO 9813058 A [0004]

## Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 15 • **POZZOLI et al.** *Endocrinology*, 1994, vol. 735, 2314-2317 [0003]
- **UTZ et al.** *Biochem Pharmacol.*, 1991, vol. 47, 195-201 [0003]
- 20 • **CHRISTODOULIDES et al.** *Circulation*, 1995, vol. 97, 2306-9 [0003]
- **MANSOURI et al.** *Thromb Haemost.*, 1982, vol. 48, 286-8 [0003]
- 25 • Oxford Textbook of Surgery. Oxford University Press, 1994 [0004] [0008] [0023] [0033] [0044] [0045]
- **SUNDERMAN et al.** *Clin. Chem.*, 1982, vol. 28, 2026-2032 [0030]
- 30 • **INGI et al.** *Neuron*, 1996, vol. 16, 835-842 [0030]
- **MORIMOTO et al.** *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 2001, vol. 280, H482-H488 [0030]
- **HATTLER et al.** *Artif. Organs*, 1994, vol. 18 (11), 806-812 [0041]
- 35 • **GOLOB et al.** *ASAIO J.*, 2001, vol. 47 (5), 432-437 [0041]
- **CHOI et al.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1996, vol. 15, 9-19 [0047]
- **MAINES.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1997, vol. 37, 517-554 [0047]
- **TENHUNEN et al.** *J. Lab. Clin. Med.*, 1970, vol. 75, 410-421 [0047]
- **MAINES.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1997, vol. 37, 517-554 [0047]
- **KEYSE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 99-103 [0047]
- **BECKER-HAPAK et al.** *Methods*, 2001, vol. 24, 247-256 [0049]
- **BECK et al.** *FEBS Lett*, 1998, vol. 435, 35-38 [0063]