

Q.T.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

04-04713

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO Métodos de tratamiento de enfermedades
Vascular

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K33/00.

71. SOLICITANTE 1. Beth Israel Deaconess Medical Center, Inc.
2. University of Pittsburgh of the Commonwealth
system of Higher Education

DOMICILIO 1. Boston, MA, USA 2. Pittsburgh, PA, USA

74. APODERADO Dilia Maria Rodriguez D'Alema

22. BOGOTA, D.C., Agosto 27, 2004.

SS

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)		Nombre: 1. BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC. 2. UNIVERISTY OF PITTSBURG OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION Dirección: 1. One Deaconess Road, Boston, MA 02115 USA 2. 200 Gardener Steel Conference Center, Pittsburg, PA 15260 USA Nacionalidad o domicilio: 1. Boston, MA, Estados Unidos; 2. Pittsburg, PA, USA Lugar de constitución: 1. Boston, MA, Estados Unidos; 2. Pittsburg, PA, USA	
		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO Cual _____	
		Teléfono: Fax: E. Mail:	
3) REPRESENTANTE O APODERADO		Nombre: DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 93-43 Of. 404 Santafé de Bogotá D.C. Teléfono: 6350835 Fax: 6350824 E. Mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co	
		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ	
4) INVENTOR (ES) (72)		Nombre: 1. OTTERBEIN, Leo, E. ; 2. CHOI, Augustine, M., K.; 3. BACH, Fritz, H.; 4. ZUCKERBRAUN, Brian Dirección: Todos los anteriores: : 1. 910 Normandy Drive, New Kensington, PA 15068 USA; 2. 43 Long Meadow Dr. Pittsburg, PA 15238 USA; 3. 8 Blossom Lane, Manchester-by-the-Sea MA 01944 USA; 4. 108 Maple Heights Road Pittsburg, PA 15232 USA Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores Estadounidenses	
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US03/04665 Fecha: Febrero 13, 2003 Publicación Internacional No. WO 03/072024 A2 Fecha: Sept. 4, 2003			
6) Título (54) MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD VASCULAR			
7) Clasificación Internacional: A61K // A61K33/00			
8) PRIORIDAD		33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐		Estados Unidos	Feb. 13, 2002
9) Comprobante de pago N°. 04-65,501 Fecha: Agosto 19, 2004			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina			

v

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicacion : 04004713 00000000 Folios: 186

Fecha (HH): 2004-08-30 17:15:04

Tramite : 011 PCT-PATENT 370 FASE INCI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NTT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 65,501
FECHA : AGOSTO 19 DE 2004

COMBICOMACION

DEPOSITANTE	TIPO PASO	BANCO	CUENTA	No. PASO	FECHA PASO	Vr. PASO
CLARTE NOBET Y CD. COLOMB	COMBICOMACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	23291513	19/08/2004	2,883,000.00

CONCEPTO

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 30003-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.
	TOTAL :	422,000.00

SOM: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

7572

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP-20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta página

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



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

(43) International Publication Date
4 September 2003 (04.09.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/072024 A2

- (51) International Patent Classification²: A61K (74) Agent: FRASER, Janis, K.; Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US03/04665
- (22) International Filing Date: 13 February 2003 (13.02.2003)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
648356, 718 13 February 2002 (13.02.2002) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC. [US/US]; One Deaconess Road, Boston, MA 02115 (US); UNIVERSITY OF PITTSBURGH OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION [US/US]; 200 Gardener Steel Conference Center, Pittsburgh, PA 15260 (US).
- (72) Inventors; and
- (73) Inventors/Applicants (for US only): OTTERBEIN, Leo, E. [US/US]; 910 Normandy Drive, New Kensington, PA 15068 (US); CHOI, Augustine, M., K. [US/US]; 43 Long Meadow Dr, Pittsburgh, PA 15238 (US); BACH, Fritz, H. [US/US]; 8 Blossom Lane, Manchester-by-the-Sea, MA 01941 (US); ZUCKERBRAUN, Brian [US/US]; 108 Maple Heights Road, Pittsburgh, PA 15232 (US).
- (84) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SI, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/072024 A2

(54) Title: METHODS OF TREATING VASCULAR DISEASE

(57) Abstract: The present invention relates to a method of treating patients suffering from, or at risk for, intimal hyperplasia and/or arteriosclerosis. The treatment includes administering a pharmaceutical composition that includes carbon monoxide to the patient.

METHODS OF TREATING VASCULAR DISEASE

Cross-Reference to Related Applications

This application claims priority to U.S. Provisional Application No. 60/356,718 filed February 13, 2002, which is incorporated herein by reference in its entirety.

5

Statement as to Federally Sponsored Research

This invention was made with Government support under National Institutes of Health Grant Nos. HL55330, HL60234, HL67040, HL58688, HL53458, HL60234, HL5785405, and AI42365. The Government has certain rights in this invention.

10

Technical Field

This invention generally relates to treating vascular disease.

Background

Heme oxygenase-1 (HO-1) catalyzes the first step in the degradation of heme. HO-1 cleaves the α -meso carbon bridge of b-type heme molecules by oxidation to yield
15 equimolar quantities of biliverdin IX α , carbon monoxide (CO), and free iron. Subsequently, biliverdin is converted to bilirubin via biliverdin reductase, and the free iron is sequestered into ferritin (the production of which is induced by the free iron).

CO is recognized as an important signaling molecule (Verma *et al.*, Science 259:381-384, 1993). It has been suggested that carbon monoxide acts as a neuronal
20 messenger molecule in the brain (*Id.*) and as a neuro-endocrine modulator in the hypothalamus (Pozzoli *et al.*, Endocrinology 735:2314-2317, 1994). Like nitric oxide, CO is a smooth muscle relaxant (Utz *et al.*, Biochem Pharmacol. 47:195-201, 1991; Christodoulides *et al.*, Circulation 97:2306-9, 1995) and inhibits platelet aggregation (Mansouri *et al.*, Thromb Haemost. 48:286-8, 1982). Inhalation of low levels of CO
25 has been shown to have anti-inflammatory effects in some models.

Intimal hyperplasia, a thickening of the inner layer of the blood vessel, is a pathological process that arises from vascular injury subsequent to procedures such as angioplasty, bypass surgery or organ transplantation. Intimal hyperplasia continues to limit the success of these therapeutic interventions.

Summary

The present invention is based, in part, on the discoveries that CO prevents arteriosclerotic lesions and intimal hyperplasia following aortic transplant and carotid artery balloon injury in animals.

5 Accordingly, in one aspect, the invention provides a method of treating intimal hyperplasia in a patient. The method includes identifying a patient suffering from or at risk for intimal hyperplasia (e.g., intimal hyperplasia resulting from an angioplasty procedure or a transplant procedure, or resulting from a procedure or condition other than a transplant procedure), and administering to the patient a pharmaceutical
10 composition comprising an amount of carbon monoxide effective to treat intimal hyperplasia in the patient.

 The invention also provides a method of performing angioplasty in a patient. The method includes performing angioplasty in the patient, and before, during, and/or after performing angioplasty, administering to the patient a pharmaceutical composition
15 comprising an amount of CO effective to treat intimal hyperplasia in the patient. The angioplasty can be any angioplasty procedure, e.g., balloon angioplasty; laser angioplasty; atherectomy, e.g., directional atherectomy, rotational atherectomy, or extraction atherectomy; and/or any angioplasty procedure using a stent, or any combination of such procedures.

20 The invention also provides a method of treating (e.g., preventing or decreasing) restenosis in a patient. The method includes providing a vessel containing a pressurized gas comprising carbon monoxide gas, identifying a patient suffering from or at risk for restenosis, releasing the pressurized gas from the vessel to form an atmosphere comprising carbon monoxide gas, and exposing the patient to the
25 atmosphere, wherein the amount of carbon monoxide in the atmosphere is sufficient to treat restenosis in the patient.

 In another aspect, the invention provides a method of treating restenosis in a patient. The method includes identifying a patient suffering from or at risk for restenosis and administering to the patient a pharmaceutical composition comprising an
30 amount of carbon monoxide effective to treat restenosis in the patient. Restenosis can result from any angioplasty procedure, e.g., balloon angioplasty; laser angioplasty; atherectomy, e.g., directional atherectomy, rotational atherectomy, or extraction

6

atherectomy; and/or any angioplasty procedure using a stent, or any combination of such procedures.

The invention also provides a method for performing vascular surgery, e.g., a transplant procedure, on a patient. The method includes: (a) performing vascular surgery (e.g., a transplant procedure) on a patient, and (b) before during and/or after (a), administering to the patient a pharmaceutical composition comprising an amount of CO effective to treat arteriosclerosis (e.g., intimal hyperplasia) in the patient.

In another aspect, the invention provides a method of inhibiting smooth muscle cell proliferation. The method includes providing a smooth muscle cell(s), and administering to the smooth muscle cell(s) an amount of CO effective to inhibit proliferation of the smooth muscle cell(s). This can be carried out *in vivo* or *in vitro*.

A method of performing angioplasty in a patient is also provided, which includes providing an angioplasty device (e.g., a device described herein) capable of administering carbon monoxide to a patient, positioning the device in a blood vessel in need of angioplasty, performing angioplasty using the device, and before, during and/or after performing angioplasty, administering CO to the blood vessel using the device in an amount sufficient to treat intimal hyperplasia, to thereby perform angioplasty in the patient. The device can be any device capable of use in an angioplasty procedure, e.g., a device described herein. Alternatively or in addition, the device can be coated with a CO-releasing agent, e.g., a hydrogel, oil, or ointment, that releases CO or a CO-releasing compound.

In another aspect, the invention provides a vessel comprising medical grade compressed CO gas. The vessel can bear a label indicating that the gas can be used to reduce restenosis, arteriosclerosis, and/or intimal hyperplasia in a patient (e.g., a human patient), and/or that it can be used in an angioplasty procedure. The CO gas can be in an admixture with nitrogen gas, with nitric oxide and nitrogen gas, or with an oxygen-containing gas. The CO gas can be present in the admixture at a concentration of at least about 0.025%, e.g., at least about 0.05%, 0.10%, 0.50%, 1.0%, 2.0%, 10%, 50%, or 90%.

The invention also provides a kit that includes an angioplasty device (e.g., a balloon angioplasty device; a laser angioplasty device; an atherectomy device; and/or a stent) and a vessel containing CO (e.g., a liquid and/or gaseous CO composition). The

angioplasty device is capable of administering carbon monoxide to a patient. The kit can further include instructions for use of the carbon monoxide composition in a method for performing angioplasty in a patient.

In another aspect, the invention provides angioplasty devices (e.g., balloon
5 angioplasty devices, laser angioplasty devices, atherectomy devices, and stents, e.g., a device described herein) capable of administering CO to a patient and/or a blood vessel immediately before, during, and/or after an angioplasty procedure. In one embodiment, the angioplasty device comprises a CO composition. In another embodiment, the
10 device is a balloon angioplasty device that includes an inflatable member (e.g., a balloon) having a plurality of apertures, and a reservoir containing CO (e.g., a liquid or gaseous CO composition) connected to the inflatable member, such that CO can be delivered from the reservoir through the inflatable member and to the blood vessel.

Also within the invention is the use of CO in the manufacture of a medicament for treatment or prevention of a condition described herein, e.g., intimal hyperplasia,
15 restenosis, and/or arteriosclerosis. The medicament can also be used in a method for performing an angioplasty procedure and/or a transplantation procedure. The medicament can be in any form as described herein, e.g., a liquid or gaseous CO composition.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the
20 same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Suitable methods and materials are described below, although methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention. All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their
25 entirety. In case of conflict, the present specification, including definitions, will control. The materials, methods, and examples are illustrative only and not intended to be limiting.

Other features and advantages of the invention will be apparent from the following detailed description, and from the claims.

30 Brief Description of the Drawings

Fig. 1A is a photomicrograph (50X magnification) of a syngeneically transplanted aortic graft illustrating the effect of syngeneic transplantation on the graft.

Fig. 1B is a photomicrograph (50X magnification) of an allogeneically transplanted aortic graft illustrating the effect of allogeneic transplantation on the graft.

Fig. 1C is a photomicrograph (50X magnification) of an allogeneically transplanted aortic graft illustrating the effect of allogeneic transplantation on the graft
5 when the recipient is exposed to CO.

Fig. 1D is a photomicrograph (200X magnification) of a syngeneically transplanted aortic graft illustrating the effect of syngeneic transplantation on the graft.

Fig. 1E is a photomicrograph (200X magnification) of an allogeneically transplanted aortic graft illustrating the effect of allogeneic transplantation on the graft.

10 Fig. 1F is a photomicrograph (200X magnification) of an allogeneically transplanted aortic graft illustrating the effect of allogeneic transplantation on the graft when the recipient is exposed to CO.

Fig. 1G is a bar graph illustrating the mean relative areas (in arbitrary units) of the intima of aortic grafts transplanted syngeneically into air-exposed recipients
15 (Syng.), allogeneically into air-exposed recipients (Allo.), and allogeneically into CO-exposed recipients (Allo. + CO).

Fig. 1H is a bar graph illustrating the mean relative areas (in arbitrary units) of the media of aortic grafts transplanted syngeneically into air-exposed recipients (Syng.), allogeneically into air-exposed recipients (Allo.), and allogeneically into CO-
20 exposed recipients (Allo. + CO).

Fig. 1I is a bar graph illustrating the intima/media area ratio of aortic grafts transplanted syngeneically into air-exposed recipients (Syng.), allogeneically into air-exposed recipients (Allo.), and allogeneically into CO-exposed recipients (Allo. + CO).

Fig. 2A is a bar graph illustrating accumulation of activated leukocytes
25 (measured by counting total nuclei) in the adventitia of aortic grafts transplanted syngeneically into air-exposed recipients (Syngeneic), allogeneically into air-exposed recipients (Allogeneic) and allogeneically into recipients exposed to various concentrations of CO (CO 250 ppm; CO 500 ppm; and CO 750-1000 ppm).

Fig. 2B is a set of bar graphs illustrating accumulation of CD45, ED1, MHCII,
30 and CD54 positive cells in the adventitia of aortic grafts transplanted syngeneically into air-exposed recipients (Syng.), allogeneically into air-exposed recipients (Allog.), and allogeneically into CO-exposed recipients (Allo. + CO).

Fig. 2C is a set of bar graphs illustrating accumulation of CD3, CD4, and CD8 positive cells in the adventitia of aortic grafts transplanted syngeneically into air-exposed recipients (Syng.), allogeneically into air-exposed recipients (Allog.), and allogeneically into CO-exposed recipients (Allo. + CO).

5 Fig. 3A is a photomicrograph (10X magnification) of a carotid artery sample illustrating the effect of balloon angioplasty on the artery.

Fig. 3B is a photomicrograph (10X magnification) of a carotid artery sample illustrating the effect of balloon angioplasty on the artery when the subject is pre-exposed to CO.

10 Fig 3C is a photomicrograph of a carotid artery sample illustrating the effect of balloon angioplasty on the artery.

Fig. 3D is a photomicrograph of a carotid artery sample illustrating the effect of balloon angioplasty on the artery when the subject is pre-exposed to CO.

15 Fig. 3E is a bar graph illustrating the mean relative areas (in arbitrary units) of the intima of carotid arteries subjected to balloon angioplasty when the subject animal is pre-exposed either to air (Control) or 250 ppm CO (CO).

Fig. 3F is a bar graph illustrating the mean relative areas (in arbitrary units) of the media of carotid arteries subjected to balloon angioplasty when the subject animal is pre-exposed either to air (Control) or 250 ppm CO (CO).

20 Fig. 3G is a bar graph illustrating the intima/media area ratio of carotid arteries subjected to balloon angioplasty when the subject animal is pre-exposed either to air (Control) or 250 ppm CO (CO).

Fig. 4A is a line graph illustrating proliferation of rat SMC that were non-transduced (○; Medium), transduced with LacZ recombinant adenovirus (□; LacZ Rec. Ad.) or transduced with HO-1 recombinant adenovirus (●; HO-1 rec. Ad.).

Fig. 4B is a line graph illustrating proliferation of rat SMC in the presence (●; 1000 ppm) or absence (□) of CO.

Fig. 4C is a bar graph illustrating proliferation of SMC isolated from wild type (WT) or HO-1 deficient (*ho-1*^{-/-}) mice in the presence (CO) and absence (Air) of CO.

30 Fig. 4D is a Western blot illustrating the effect of CO exposure (for 0, 4, 5, 16, and 24 hours) on p21 and β-actin protein expression in mouse SMC.

Fig. 4E is a bar graph illustrating the effect of CO on proliferation of mouse SMC isolated from wild type (wt), p21Cip1 (*p21*^{-/-}) and p53 (*p53*^{-/-}) deficient mice.

Gray bars indicate cells exposed to room air and black bars cells exposed to CO (250 ppm).

Fig. 4F is a bar graph illustrating the intima/media area ratio of balloon-injured carotid arteries from wild type (C57/B16/S129; wt) and $p21^{Cip1}$ mice exposed to air (Air) or carbon monoxide (CO).

Fig. 5A is a bar graph illustrating the effect of air (Air) and CO (250 ppm for 8 h or 16 h) exposure on the mean cellular cGMP content of mouse SMCs.

Fig. 5B is a bar graph illustrating [3 H]thymidine uptake by mouse SMCs exposed to air (Air), CO (250 ppm) and CO plus the guanylate cyclase inhibitor 1H(1,2,4) Oxadiazolo(4,3-a) Quinoxalin-1 (CO/ODQ).

Fig. 5C is a composite picture of a Western blot illustrating the effect of 8-Bromoguanosine 3'-5'-cyclic monophosphate sodium salt (8-Br-cGMP) on $p21^{Cip1}$ expression.

Fig. 5D is a bar graph illustrating [3 H]thymidine uptake by SMC isolated from wild type (wt) and $p21^{Cip1}$ ($p21^{-/-}$) deficient mice in the presence (8Br-cGMP; 8Br-cGMP ($p21^{-/-}$)) and absence (Air) of the cGMP analogue 8Br-cGMP.

Fig. 5E is a composite picture of a Western blot illustrating the effect of CO (250 ppm) on expression of phosphorylated p38 MAPK (p-p38), ATF-2 (p-ATF-2), JNK (p-JNK) and ERK (p-ERK) as compared to total p38 MAPK, ATF-2, JNK, and ERK in SMC.

Fig. 5F is a bar graph illustrating [3 H]thymidine uptake by mouse SMC exposed air (Air) 250 ppm CO (CO) and CO plus the p38 MAPK inhibitor SB203580 (CO/SB).

Fig. 5G is a composite picture of a Western blot illustrating the effect of air (Air), CO (250 ppm; CO)), SB203580, and DMSO on expression of $p21^{Cip1}$ in mouse SMC.

Fig. 6A is a composite picture of a Western blot illustrating the effect of 8-Br-cGMP on expression of p38 MAPK in mouse SMC.

Fig. 6B is a bar graph illustrating [3 H]thymidine uptake by mouse SMC exposed to air (Air), CO plus 8-Br-cGMP (8-Br-cGMP), and CO plus 8-Br-cGMP plus SB203580 (8-Br-cGMP + SB203580).

Fig. 7A is a flow cytometry plot illustrating the effect of air (Air) and CO (250 ppm) exposure on the cell cycle of rat aortic SMC.

Fig. 7B is a line graph illustrating the effect of air ($\square$) and CO ($\blacksquare$) on SMC proliferation.

Fig. 8 is a bar graph illustrating [^3H]thymidine uptake by wild type (wt), $p21^{-/-}$, and $p53^{-/-}$ mouse SMC exposed to either air (gray bars) or to CO (250 ppm; black bars) for 24 hours.

Fig. 9A is a photomicrograph (20x magnification) of a carotid artery section from a wild type mouse 14 days after wire injury. The subject animal was exposed to room air for 1 h prior to wire injury.

Fig. 9B is a photomicrograph (20x magnification) of a carotid artery section from a wild type mouse 14 days after wire injury. The subject animal was exposed to CO (250 ppm) for 1 h prior to wire injury.

Fig. 9C is a photomicrograph (20x magnification) of a carotid artery section from a $p21^{-/-}$ mouse 14 days after wire injury. The subject animal was exposed to room air for 1 h prior to wire injury.

Fig. 9D is a photomicrograph (20x magnification) of a carotid artery section from a $p21^{-/-}$ mouse 14 days after being subjected to wire injury. The subject animal was exposed to CO (250 ppm) for 1 h prior to wire injury.

Fig. 9E is a bar graph illustrating the mean relative areas (in arbitrary units) of the intima of wire-injured carotid arteries from wild type (wt) and $p21^{-/-}$ mice exposed to either air (Control) or 250 ppm CO (CO).

Fig. 9F is a bar graph illustrating the mean relative areas (in arbitrary units) of the media of wire-injured carotid arteries from wild type (wt) and $p21^{-/-}$ mice exposed to either air (Control) or 250 ppm CO (CO).

Fig. 9G is a bar graph illustrating the intima/media area ratio of wire-injured carotid arteries from wild type (wt) and $p21^{-/-}$ mice exposed to either air (Control) or 250 ppm CO (CO).

Fig. 10 is a bar graph illustrating [^3H]thymidine uptake by $p21^{-/-}$ mouse-derived SMC treated with air (Air), CO (250 ppm; CO) and CO plus SB203580 (CO/SB).

Fig. 11A is a bar graph illustrating [^3H]thymidine uptake by wild type (wt), $enos^{-/-}$, and $inos^{-/-}$ deficient mouse-derived SMC exposed to air (Air) or CO (250 ppm; CO).

Fig. 11B is a bar graph illustrating the mean intimal and media areas, and the intima/media area ratios, of carotid arteries from Sprague-Dawley rats exposed to room air (white bars) or NO (Black bars; 1 hour; 250 ppm) prior to balloon injury of the carotid artery.

5 Fig. 12A is a composite picture of a Western blot illustrating PAI-1 expression in SMC treated with and without serum (Serum and No Serum, respectively) and with and without CO (Air and CO, respectively) for 24 or 48 hours. Liver = whole cell lysates from rat liver homogenates treated without endotoxin (LPS). Liver + LPS = whole cell lysates from rat liver homogenates treated with endotoxin (LPS). TNF- α =
10 control wherein TNF- α was added to the cell culture to stimulate expression of PAI-1.

Fig. 12B is a picture of a Western blot illustrating PAI-1 expression in untransplanted (control), transplanted (Allo. + Air), and CO-treated transplanted (Allo. + CO) aortas 56 days after transplantation.

Fig. 12C is a picture of a Commassie blue stained polyacrylamide gel used for
15 the Western blot of Fig. 12B, which illustrates PAI-expression in untransplanted (control), transplanted (Allo. + Air), and CO-treated transplanted (Allo. + CO) aortas 56 days after transplantation.

Figs. 13A-13B illustrate an example of balloon angioplasty device capable of administering CO to a patient during an angioplasty procedure, at various stages of
20 operation.

Figs. 13C-13D illustrate alternative embodiments of the balloon angioplasty device.

Figs. 14A-14B illustrate an example of a stent capable of administering CO to a patient during an angioplasty procedure, at various stages of operation.

25 Fig. 15 illustrates an example of balloon angioplasty device with multiple balloons designed to administer CO to a patient during an angioplasty procedure.

Fig 16 illustrates an example of an atherectomy device capable of administering CO to a patient during an angioplasty procedure.

30

Detailed Description

The term "carbon monoxide" (or "CO") as used herein describes molecular carbon monoxide in its gaseous state, compressed into liquid form, or dissolved in

aqueous solution. The term "carbon monoxide composition" or "pharmaceutical composition comprising carbon monoxide" is used throughout the specification to describe a gaseous or liquid composition containing carbon monoxide that can be administered to a patient and/or a blood vessel, e.g., a patient (or blood vessel) subjected to angioplasty, bypass surgery, transplant, or any other procedure that may/will result in intimal hyperplasia and/or arteriosclerosis. A skilled practitioner will recognize which form of the pharmaceutical composition, e.g., gaseous, liquid, or both gaseous and liquid forms, is preferred for a given application.

The term "intimal hyperplasia" is an art-recognized term and is used herein to refer to proliferation of cells, e.g., smooth muscle cells, within the intima of a blood vessel. The skilled practitioner will appreciate that intimal hyperplasia can be caused by any number of factors, e.g., mechanical, chemical and/or immunological damage to the intima. Intimal hyperplasia can often be observed in patients, for example, following balloon angioplasty or vascular surgery, e.g., vascular surgery involving vein grafts (e.g., transplant surgery). "Arteriosclerosis," "arteriosclerotic lesion," "arteriosclerotic plaque," and "arteriosclerotic condition" are also art recognized term terms, and are used herein to describe a thickening and hardening of the arterial wall. The term "vasculature" as used herein refers to the vascular system (or any part thereof) of a body, human or non-human, and includes blood vessels, e.g., arteries, arterioles, veins, venules, and capillaries. The term "restenosis" refers to re-narrowing of an artery following angioplasty.

The term "angioplasty" is an art-recognized term and refers to any procedure, singly or in combination, involving remodeling of a blood vessel, e.g., dilating a stenotic region in a patient's vasculature to restore adequate blood flow beyond the stenosis. Such procedures include percutaneous transluminal angioplasty (PTA), which employs a catheter having an expansible distal end, i.e., an inflatable balloon (known as "balloon angioplasty"); laser angioplasty; extraction atherectomy; directional atherectomy; rotational atherectomy; stenting; and any other procedure for remodeling a blood vessel, e.g., an artery.

The terms "effective amount" and "effective to treat," as used herein, refer to an amount or a concentration of carbon monoxide utilized for a period of time (including acute or chronic administration and periodic or continuous administration) that is effective within the context of its administration for causing an intended effect or

physiological outcome. Effective amounts of carbon monoxide for use in the present invention include, for example, amounts that prevent or reduce intimal hyperplasia following a procedure, e.g., angioplasty. Effective amounts of carbon monoxide also include amounts that prevent or reduce arteriosclerosis in a patient, e.g., a transplant
5 patient. The term "treat(ment)" is used herein to describe delaying the onset of, inhibiting, or alleviating the detrimental effects of a condition, e.g., intimal hyperplasia and/or arteriosclerosis.

For gases, effective amounts of CO generally fall within the range of about 0.0000001% to about 0.3% by weight, e.g., 0.0001% to about 0.25% by weight,
10 preferably at least about 0.001%, e.g., at least about 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%, or 0.24% by weight of CO. Preferred ranges of CO include 0.002% to about 0.24%, about 0.005% to about 0.22%, about 0.01% to about 0.20%, and about 0.02% to about 0.1% by weight. For liquid solutions of CO, effective amounts generally fall within the range of
15 about 0.0001 to about 0.0044 g CO/100 g liquid, e.g., at least about 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, or 0.0042 g CO/100 g aqueous solution. Preferred ranges include, e.g., about 0.0010 to about 0.0030 g CO/100 g liquid, about 0.0015 to about 0.0026 g CO/100 g liquid, or
20 about 0.0018 to about 0.0024 g CO/100 g liquid. A skilled practitioner will appreciate that amounts outside of these ranges may be used depending upon the application.

The term "patient" is used throughout the specification to describe an animal, human or non-human, to whom treatment according to the methods of the present invention is provided. Veterinary and non-veterinary applications are contemplated by
25 the present invention. The term includes but is not limited to mammals, e.g., humans, other primates, pigs, rodents such as mice and rats, rabbits, guinea pigs, hamsters, cows, horses, cats, dogs, sheep and goats.

The term "transplantation" is used throughout the specification as a general term to describe the process of transferring an organ or tissue into a patient. The term
30 "transplantation" is defined in the art as the transfer of living tissues or cells from a donor to a recipient, with the intention of maintaining the functional integrity of the transplanted tissue or cells in the recipient (see, e.g., *The Merck Manual*, Berkow, Fletcher, and Beers, Eds., Merck Research Laboratories, Rahway, N.J., 1992). The

term includes all categories of transplants known in the art. Transplants are categorized by site and genetic relationship between donor and recipient. The term includes, *e.g.*, autotransplantation (removal and transfer of cells or tissue from one location on a patient to the same or another location on the same patient), allotransplantation
5 (transplantation between members of the same species), and xenotransplantation (transplantations between members of different species).

The term "donor" or "donor patient" as used herein refers to an animal (human or non-human) from whom an organ or tissue can be obtained for the purposes of transplantation to a recipient patient. The term "recipient" or "recipient patient" refers
10 to an animal (human or non-human) into which an organ or tissue can be transferred.

The terms "organ rejection", "transplant rejection" and "rejection" are art-recognized and are used throughout the specification as general terms to describe the process of rejection of an organ, tissues, or cells in a recipient. Included within the definition are, for example, three main patterns of rejection that are typically identified
15 in clinical practice: hyperacute rejection, acute rejection, and chronic rejection (see, *e.g.*, *Oxford Textbook of Surgery*, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)).

The term "organ(s)" is used throughout the specification as a general term to describe any anatomical part or member having a specific function in the animal.
20 Further included within the meaning of this term are substantial portions of organs, *e.g.*, cohesive tissues obtained from an organ. Such organs include but are not limited to kidney, liver, heart, intestine, *e.g.*, large or small intestine, pancreas, and lungs. Also included in this definition is vasculature, *e.g.*, veins and arteries, and bones.

Individuals considered at risk for developing intimal hyperplasia or
25 arteriosclerosis may benefit particularly from the invention, primarily because prophylactic CO treatment can be administered before a procedure is performed on a patient or before there is any evidence of intimal hyperplasia or an arteriosclerotic plaque. Individuals "at risk" include, *e.g.*, patients that have or will have any type of mechanical, chemical and/or immunological damage to the intima, *e.g.*, patients that
30 will or have undergone transplant surgery and/or angioplasty. Skilled practitioners will appreciate that a patient can be determined to be at risk for intimal hyperplasia or arteriosclerosis by any method known in the art, *e.g.*, by a physician's diagnosis.

Preparation of Gaseous Compositions

A CO composition may be a gaseous composition. Compressed or pressurized gas useful in the methods of the invention can be obtained from any commercial source, and in any type of vessel appropriate for storing compressed gas. For example, compressed or pressurized gases can be obtained from any source that supplies compressed gases, such as oxygen, for medical use. The term "medical grade" gas, as used herein, refers to gas suitable for administration to patients as defined herein. The pressurized gas including CO used in the methods of the present invention can be provided such that all gases of the desired final composition (e.g., CO, He, NO, CO₂, O₂, N₂) are in the same vessel, except that NO and O₂ cannot be stored together. Optionally, the methods of the present invention can be performed using multiple vessels containing individual gases. For example, a single vessel can be provided that contains carbon monoxide, with or without other gases, the contents of which can be optionally mixed with the contents of other vessels, e.g., vessels containing oxygen, nitrogen, carbon dioxide, compressed air, or any other suitable gas or mixtures thereof.

Gaseous compositions administered to a patient according to the present invention typically contain 0% to about 79% by weight nitrogen, about 21% to about 100% by weight oxygen and about 0.0000001% to about 0.3% by weight (corresponding to about 1 ppb or 0.001 ppm to about 3,000 ppm) CO. Preferably, the amount of nitrogen in the gaseous composition is about 79% by weight, the amount of oxygen is about 21% by weight and the amount of CO is about 0.0001% to about 0.25% by weight. The amount of CO is preferably at least about 0.001%, e.g., at least about 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.025%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.08%, 0.10%, 0.15%, 0.20%, 0.22%, or 0.24% by weight. Preferred ranges of CO include 0.005% to about 0.24%, about 0.01% to about 0.22%, about 0.015% to about 0.20%, and about 0.025% to about 0.1% by weight. It is noted that gaseous CO compositions having concentrations of CO greater than 0.3% (such as 1% or greater) may be used for short periods (e.g., one or a few breaths), depending upon the application.

A gaseous CO composition may be used to create an atmosphere that comprises CO gas. An atmosphere that includes appropriate levels of CO gas can be created, for example, by providing a vessel containing a pressurized gas comprising CO gas, and releasing the pressurized gas from the vessel into a chamber or space to form an atmosphere that includes the CO gas inside the chamber or space. Alternatively, the

gases can be released into an apparatus that culminates in a breathing mask or breathing tube, thereby creating an atmosphere comprising CO gas in the breathing mask or breathing tube, ensuring the patient is the only person in the room exposed to significant levels of CO.

5 CO levels in an atmosphere can be measured or monitored using any method known in the art. Such methods include electrochemical detection, gas chromatography, radioisotope counting, infrared absorption, colorimetry, and electrochemical methods based on selective membranes (see, e.g., Sunderman *et al.*, Clin. Chem. 28:2026-2032, 1982; Ingi *et al.*, Neuron 16:835-842, 1996). Sub-parts per
10 million CO levels can be detected by, e.g., gas chromatography and radioisotope counting. Further, it is known in the art that CO levels in the sub-ppm range can be measured in biological tissue by a midinfrared gas sensor (see, e.g., Morimoto *et al.*, Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol 280:H482-H488, 2001). CO sensors and gas detection devices are widely available from many commercial sources.

15

Preparation of Liquid Compositions

A pharmaceutical composition comprising CO may also be a liquid composition. A liquid can be made into a pharmaceutical composition comprising CO by any method known in the art for causing gases to become dissolved in liquids. For
20 example, the liquid can be placed in a so-called "CO₂ incubator" and exposed to a continuous flow of CO, preferably balanced with carbon dioxide, until a desired concentration of CO is reached in the liquid. As another example, CO gas can be "bubbled" directly into the liquid until the desired concentration of CO in the liquid is reached. The amount of CO that can be dissolved in a given aqueous solution increases
25 with decreasing temperature. As still another example, an appropriate liquid may be passed through tubing that allows gas diffusion, where the tubing runs through an atmosphere comprising CO (e.g., utilizing a device such as an extracorporeal membrane oxygenator). The CO diffuses into the liquid to create a liquid CO composition.

30 It is likely that such a liquid composition intended to be introduced into a living animal will be at or about 37°C at the time it is introduced into the animal.

The liquid can be any liquid known to those of skill in the art to be suitable for administration to patients (see, for example, Oxford Textbook of Surgery, Morris and

Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). In general, the liquid will be an aqueous solution. Examples of solutions include Phosphate Buffered Saline (PBS), Celsior™, Perfadex™, Collins solution, citrate solution, and University of Wisconsin (UW) solution (Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press
5 (1994)). In one embodiment of the present invention, the liquid is Ringer's Solution, e.g., lactated Ringer's Solution, or any other liquid that can be used infused into a patient. In another embodiment, the liquid includes blood, e.g., whole blood.

Any suitable liquid can be saturated to a set concentration of CO via gas diffusers. Alternatively, pre-made solutions that have been quality controlled to
10 contain set levels of CO can be used. Accurate control of dose can be achieved via measurements with a gas permeable, liquid impermeable membrane connected to a CO analyzer. Solutions can be saturated to desired effective concentrations and maintained at these levels.

15 Treatment of Patients and Vasculature with CO Compositions

The present invention contemplates administering CO compositions to patients and/or portions of their vasculature before, during, and/or after the patient undergoes angioplasty, transplant surgery, vascular surgery, or any other procedure that causes/increases the risk of intimal hyperplasia, restenosis, and/or arteriosclerosis in the
20 patient. A patient can be treated systemically with gaseous and/or liquid CO compositions by any method known in the art for administering gases and/or liquids to patients, e.g., by inhalation of the gas and intravenous or intraarterial administration of the liquid. With systemic treatment, substantially all of the patient's vasculature can be treated with CO. A portion of a patient's vasculature, e.g., a specific vein or artery, can
25 be treated by administering a gaseous or liquid CO composition directly to the vein or artery. Although the present invention is not limited to any particular mode for administering CO compositions to patients and/or portions of their vasculature, various treatments are discussed in detail below.

30 Systemic Delivery of Gaseous CO

Gaseous CO compositions can be delivered systemically to a patient, e.g., a patient suffering from or at risk for intimal hyperplasia (e.g., restenosis and/or arteriosclerosis). Gaseous CO compositions are typically administered by inhalation

through the mouth or nasal passages to the lungs, where the CO is readily absorbed into the patient's bloodstream. The concentration of active compound (CO) utilized in the therapeutic gaseous composition will depend on absorption, distribution, inactivation, and excretion (generally, through respiration) rates of the CO as well as other factors known to those of skill in the art. It is to be further understood that for any particular subject, specific dosage regimens should be adjusted over time according to the individual need and the professional judgment of the person administering or supervising the administration of the compositions, and that the concentration ranges set forth herein are exemplary only and are not intended to limit the scope or practice of the claimed composition. Acute, sub-acute and chronic administration of CO are contemplated by the present invention. CO can be delivered to the patient for a time (including indefinitely) sufficient to treat the condition and exert the intended pharmacological or biological effect.

The following are examples of some methods and devices that can be utilized to administer gaseous CO compositions to patients.

Ventilators

Medical grade CO (concentrations can vary) can be purchased mixed with air or another oxygen-containing gas in a standard tank of compressed gas (e.g., 21% O₂, 79% N₂). It is non-reactive, and the concentrations that are required for the methods of the present invention are well below the combustible range (10% in air). In a hospital setting, the gas presumably will be delivered to the bedside where it will be mixed with oxygen or house air in a blender to a desired concentration in ppm (parts per million). The patient will inhale the gas mixture through a ventilator, which will be set to a flow rate based on patient comfort and needs. This is determined by pulmonary graphics (i.e., respiratory rate, tidal volumes etc.). Fail-safe mechanism(s) to prevent the patient from unnecessarily receiving greater than desired amounts of carbon monoxide can be designed into the delivery system. The patient's CO level can be monitored by studying (1) carboxyhemoglobin (COHb), which can be measured in venous blood, and (2) exhaled CO collected from a side port of the ventilator. CO exposure can be adjusted based upon the patient's health status and on the basis of the markers. If necessary, CO can be washed out of the patient by switching to 100% O₂ inhalation. CO is not metabolized; thus, whatever is inhaled will ultimately be exhaled except for a

very small percentage that is converted to CO₂. CO can also be mixed with any level of O₂ to provide therapeutic delivery of CO without consequential hypoxic conditions.

Face Mask and Tent

5 A CO-containing gas mixture is prepared as above to allow passive inhalation by the patient using a facemask or tent. The concentration inhaled can be changed and can be washed out by simply switching over to 100% O₂. Monitoring of CO levels would occur at or near the mask or tent with a fail-safe mechanism that would prevent too high of a concentration of CO from being inhaled.

10

Portable inhaler

Compressed CO can be packaged into a portable inhaler device and inhaled in a metered dose, for example, to permit intermittent treatment of a recipient who is not in a hospital setting. Different concentrations of CO could be packaged in the containers.

15 The device could be as simple as a small tank (e.g., under 5 kg) of appropriately diluted CO with an on-off valve and a tube from which the patient takes a whiff of CO according to a standard regimen or as needed.

Intravenous Artificial Lung

20 An artificial lung (a catheter device for gas exchange in the blood) designed for O₂ delivery and CO₂ removal can be used for CO delivery. The catheter, when implanted, resides in one of the large veins and would be able to deliver CO at desired concentrations either for systemic delivery or at a local site. The delivery can be a local delivery of a high concentration of CO for a short period of time at the site of an

25 angioplastic procedure (this high concentration would rapidly be diluted out in the bloodstream), or a relatively longer exposure to a lower concentration of CO. Examples of an artificial lungs are described, e.g., in Hattler *et al.*, *Artif. Organs* 18(11):806-812 (1994); and Golob *et al.*, *ASAIO J.*, 47(5):432-437 (2001). As used herein, the term "intravessel carbon monoxide delivery device" refers to a catheter

30 device, e.g., an artificial lung (or modified version thereof) capable of residing in a blood vessel for extended periods of time (including indefinitely) and delivering CO to the patient systemically and/or locally.

Normobaric chamber

In certain instances, it would be desirable to expose the whole patient to CO. The patient would be inside an airtight chamber that would be flooded with CO at a level that does not endanger the patient, or at a level that poses an acceptable risk without the risk of bystanders' being exposed. Upon completion of the exposure, the chamber could be flushed with air (e.g., 21% O₂, 79% N₂) and samples could be analyzed by CO analyzers to ensure no CO remains before allowing the patient to exit the exposure system.

10 Systemic Delivery of Liquid CO Compositions

The present invention further contemplates that liquid CO compositions can be created for systemic delivery to a patient, e.g., by intravenous or intraarterial infusion into a patient. For example, liquid CO compositions, such as CO-saturated Ringer's Solution, can be infused into a patient before, during, and/or after an angioplastic or transplant procedure. Alternatively or in addition, CO-partially or completely saturated whole (or partial) blood can be infused into the patient. The present invention also contemplates that agents capable of delivering doses of CO gas or liquids can be utilized (e.g., CO releasing gums, creams, ointments or patches).

20 Delivery of CO to Portions of the Vasculature

In Situ Treatment

Alternatively or in addition to systemic treatment, carbon monoxide compositions can be applied directly to any portion of a patient's vasculature that has or is at risk for intimal hyperplasia and/or arteriosclerosis. A gaseous composition can be applied directly to a portion of a patient's vasculature, e.g., to an affected artery, by any method known in the art for administering gases into a patient's vasculature. For example, CO can be delivered to an artery before, during, and/or after an angioplastic (e.g., balloon angioplasty) or surgical (e.g., transplant) procedure through a device similar to the intravenous artificial lung described above. As another example, any device used for performing an angioplastic procedure can be modified to administer CO to a patient's vasculature through the instrument while angioplasty is being performed. Such devices are discussed in further detail below.

Liquid CO compositions can also be applied directly to a portion of a patient's vasculature. Liquid CO compositions can be administered by any method known in the art for administering liquids to the vasculature of a patient. For example, a liquid CO composition can be administered to a specific vein (e.g., by intravenous injection) or artery (e.g., by intraarterial injection) before, during, and/or after a procedure. As another example, as described above, any instrument used in angioplastic procedures can be modified to administer to a vein or artery a liquid CO composition while an angioplastic procedure is being performed.

10

Ex Vivo Treatment

The present invention further contemplates use of CO compositions to prevent or reduce intimal hyperplasia and/or arteriosclerosis in transplanted vasculature, e.g., individual blood vessels (e.g., vein or aortic transplants) or blood vessels that remain associated with a transplantable organ (e.g., kidney, liver, heart, or lung). Alternative or in addition to the *in situ* exposures described above, exposure of vasculature to CO compositions can occur *ex vivo*. For example, prior to transplanting individual blood vessels or an organ with its associated vasculature into a recipient patient, the vasculature may be exposed to an atmosphere comprising carbon monoxide gas, to a liquid carbon monoxide composition, e.g., a liquid perfusate, storage solution, or wash solution having carbon monoxide dissolved therein, or both.

Exposure of vasculature to gaseous CO compositions *ex vivo* can be performed in any chamber or area suitable for creating an atmosphere that includes appropriate levels of CO gas. Such chambers include, for example, incubators and chambers built for the purpose of accommodating an organ in a preservation solution. As another example, an appropriate chamber may be a chamber wherein only the gases fed into the chamber are present in the internal atmosphere, such that the concentration of carbon monoxide can be established and maintained at a given concentration and purity, e.g., where the chamber is airtight. For example, a CO₂ incubator may be used to expose vasculature to a carbon monoxide composition, wherein carbon monoxide gas is supplied in a continuous flow from a vessel that contains the gas.

Exposure of vasculature to liquid CO compositions *ex vivo* may be performed in any chamber or space having sufficient volume for submerging the vasculature,

completely or partially, in a liquid CO composition. Vasculature can also be exposed to such compositions by placing the vasculature in any suitable container, and causing a liquid CO composition to "wash over" or through the vasculature, such that the vasculature is exposed to a continuous flow of the CO composition. As yet another
5 example, the vasculature may be submerged in a medium or solution that does not include CO, and placed in a chamber such that the medium or solution can be made into a CO composition via exposure to a CO-containing atmosphere as described herein. As still another example, the vasculature may be submerged in a liquid that does not include CO, and CO can be "bubbled" into the liquid.

10

Devices

The present invention contemplates administering CO to a patient's vasculature using a device that is capable of being used for both performing an angioplasty procedure and administering CO to a patient's vasculature. CO can be administered
15 through and/or by the instrument, or by a CO-delivering coating thereon, while angioplasty is being performed (e.g., immediately before, during, and/or immediately after angioplasty is performed). Such devices include devices used for balloon angioplasty ("balloon angioplasty devices"), laser angioplasty ("laser angioplasty devices"), and devices used for atherectomy ("atherectomy devices"), e.g., extraction
20 atherectomy; directional atherectomy; rotational atherectomy; and stents. As used herein, an "angioplasty device" is any device that can be used to perform angioplasty on a patient.

Referring to Figs. 13A to 13D, examples of a catheter device with an inflatable member (e.g., a balloon) designed to administer CO (e.g., a liquid or gaseous CO
25 composition) to a patient during angioplasty are shown. In Fig. 13A, the catheter 1303 is shown in position within a stenotic region 1302 of blood vessel 1301. The inflatable member 1304 is shown in the deflated state. The inflatable member includes at least one aperture 1305, through which CO can be administered to the vessel during the procedure. CO can be provided to the inflatable member (e.g., to inflate the inflatable
30 member) from a reservoir (not shown) containing CO, e.g., a pharmaceutical composition comprising carbon monoxide. The device can optionally be guided to the intended site by a guide wire 1306.

In Fig. 13B, the catheter 1303 is shown with the inflatable member 1304 in an inflated state. CO can be administered through the aperture(s) 1305 to the vessel 1301. In one embodiment, the inflatable member is inflated with CO, or a mixture of gases including CO, such that an amount of the CO sufficient to treat intimal hyperplasia flows out of the aperture(s) 1305 and is delivered to the blood vessel 1301 during and/or after inflation of the inflatable member 1304.

Fig. 13C illustrates another embodiment of the catheter device, wherein the catheter 1303 includes at least one lumen 1307 for delivering CO to the blood vessel 1301 during the angioplasty procedure. Still another embodiment is shown in Fig. 13D, wherein a central lumen 1307 delivers CO to a plurality of sites in the blood vessel 1301. A reservoir containing CO (not shown) can be connected to the lumen 1307, such that a dose of CO is administered from the reservoir through the lumen 1307 to the blood vessel.

Alternatively or in addition, the inflatable member 1304 can be coated with a CO-releasing coating, e.g., a hydrogel containing a CO composition, such that CO is delivered to the stenotic region 1302, e.g., upon contact with the inflatable member 1304.

Referring to Figs. 14A to 14B, an example of a stent designed to administer CO to a patient is shown. The term "stent" is an art-recognized term and refers to a mesh tube, typically made of wire, used to maintain a blood vessel in an open position, e.g., a blood vessel that has recently been remodeled during angioplasty. In Fig. 14A, a stent 1402 is shown in a collapsed state. The stent covers a balloon catheter 1404, shown in Fig. 14A in a deflated state. In Fig. 14B, the stent 1402 and balloon catheter 1404 are shown in an expanded/inflated state. Upon inflation of the balloon catheter 1404, the stent 1402 expands, locks in place, and forms a scaffold as shown in Fig. 14B, thereby holding the blood vessel in an open position. In one embodiment of the present invention, the stent 1402 is coated with a CO-releasing coating, e.g., a hydrogel that releases CO, such that an amount of CO sufficient to treat intimal hyperplasia is delivered to the blood vessel for an appropriate amount of time, e.g., for as long as the stent remains in place.

Referring to Fig. 15, a catheter 1502 with two inflatable members 1504 is shown. The inflatable members 1504 can be used to isolate a stenotic region 1506, such that CO can be administered to the stenotic region 1506 between the inflatable

members 1504. The catheter 1502 is inserted into the blood vessel 1508 prior to inflation of the inflatable members 1504. The inflatable members 1504 are then inflated using an inflation/deflation tube 1510 housed within the catheter 1502. The inflatable members 1504 in their inflated state obstruct the flow of blood to the region
5 of the blood vessel undergoing treatment. Intake ducts 1512 on the proximal end of the catheter allow blood to flow into and through the catheter 1502 to outlet ducts 1514 located on the distal end of the catheter. This allows the blood to continue flowing to the rest of the artery 1508 while the local site of the artery 1506 is treated. CO can be introduced to the isolated region through an administering supply tube 1516. The
10 inflated inflatable members 1504 provide an isolated treatment area within which appropriate levels of CO can be administered to the vessel. In addition, fiber probes (not shown) can be secured to the casing of the catheter 1502, and the site can be exposed to electromagnetic radiation through the fiber probes. CO can be administered to the site before, during, and/or after treatment of the site with electromagnetic
15 radiation.

Referring to Fig. 16, an example of an instrument capable of administering CO to a patient while performing atherectomy is shown. Atherectomy involves cutting away and removing plaque 1602 from blood vessel walls 1604. The catheter 1606 is positioned within the artery 1604. A flexible guide 1608 is used to move the
20 instrument through the region of treatment 1610. Rotating cutting blades 1612 are then extended beyond the catheter 1606. The rotating cutting blades 1612 follow the flexible guide 1608 and cut through the plaque 1602. The rotating cutting blades 1612 draw the removed particles of plaque into and towards the proximal end of the catheter 1606. CO can be introduced to the treated region through an administering tube 1614
25 within the catheter 1606. An administering tube 1614 can be secured to the guide 1608. CO can be administered through the catheter 1606 through a least one pore 1616 on the distal end of the administering tube 1614. Alternatively or in addition to supplying CO through an administering tube 1614, ducts 1620 and 1622 can be housed within the walls of the cutting blades 1612. Carbon monoxide can be supplied through
30 an outlet duct 1620. At the conclusion of treatment an inlet duct 1622 can remove the CO. CO can be administered before, during, and/or after removal of plaques.

In addition to the above, a skilled practitioner will appreciate that any device known in the art for performing angioplasty procedures can be modified to administer

CO to a patient's vasculature during use. Examples of such devices can be found, e.g., in U.S. Patent Nos. 6,409,716, 5,985,307, 6,508,787, 5,709,875 and 6,450,989.

Further, a skilled practitioner will recognize that any such devices can be coated with a CO-delivering agent, e.g., an oil, ointment or hydrogel, capable of releasing effective
5 doses of CO, such that the CO is delivered to blood vessel upon contact with the instrument/coating.

Use of Hemoxygenase-1 and Other Compounds

10 Also contemplated by the present invention is the induction or expression of hemoxygenase-1 (HO-1) in conjunction with administration of carbon monoxide. HO-1 can be provided to a patient by inducing or expressing HO-1 in the patient, or by administering exogenous HO-1 directly to the patient. As used herein, the term "induce(d)" means to cause increased production of a protein, e.g., HO-1, in isolated
15 cells or the cells of a tissue, organ or animal using the cells' own endogenous (e.g., non-recombinant) gene that encodes the protein.

HO-1 can be induced in a patient by any method known in the art. For example, production of HO-1 can be induced by hemin, by iron protoporphyrin, or by cobalt protoporphyrin. A variety of non-heme agents including heavy metals, cytokines,
20 hormones, nitric oxide, COCl₂, endotoxin and heat shock are also strong inducers of HO-1 expression (Otterbein *et al.*, Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279:L1029-L1037, 2000; Choi *et al.*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15:9-19, 1996; Maines, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37:517-554, 1997; and Tenhunen *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 75:410-421, 1970). HO-1 is also highly induced by a variety of agents and conditions
25 that create oxidative stress, including hydrogen peroxide, glutathione depletors, UV irradiation and hyperoxia (Choi *et al.*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15: 9-19, 1996; Maines, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37:517-554, 1997; and Keyse *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:99-103, 1989). A "pharmaceutical composition comprising an inducer of HO-1" means a pharmaceutical composition containing any agent capable
30 of inducing HO-1 in a patient, e.g., any of the agents described above, e.g., hemin, iron protoporphyrin, and/or cobalt protoporphyrin.

HO-1 expression in a cell can be increased via gene transfer. As used herein, the term "express(ed)" means to cause increased production of a protein, e.g., HO-1 or

ferritin, in isolated cells or the cells of a tissue, organ or animal using an exogenously administered gene (e.g., a recombinant gene). The HO-1 or ferritin is preferably of the same species (e.g., human, mouse, rat, etc.) as the recipient, in order to minimize any immune reaction. Expression could be driven by a constitutive promoter (e.g.,
5 cytomagalovirus promoters) or a tissue-specific promoter (e.g., milk whey promoter for mammary cells or albumin promoter for liver cells). An appropriate gene therapy vector (e.g., retrovirus, adenovirus, adeno associated virus (AAV), pox (e.g., vaccinia) virus, human immunodeficiency virus (HIV), the minute virus of mice, hepatitis B virus, influenza virus, Herpes Simplex Virus-1, and lentivirus) encoding HO-1 or
10 ferritin would be administered to the patient orally, by inhalation, or by injection at a location appropriate for treatment intimal hyperplasia. Similarly, plasmid vectors encoding HO-1 or apo-ferritin can be administered, e.g., as naked DNA, in liposomes, or in microparticles.

Further, exogenous HO-1 protein can be directly administered to a patient by
15 any method known in the art. Exogenous HO-1 can be directly administered in addition to, or as an alternative, to the induction or expression of HO-1 in the patient as described above. The HO-1 protein can be delivered to a patient, for example, in liposomes, and/or as a fusion protein, e.g., as a TAT-fusion protein (see, e.g., Becker-Hapak *et al.*, Methods 24:247-256, 2001).

20 Alternatively or in addition, any of the products of metabolism by HO-1, e.g., bilirubin, biliverdin, iron, and/or ferritin, can be administered to a patient in conjunction with, or instead of, carbon monoxide in order to prevent or treat intimal hyperplasia. Further, the present invention contemplates that iron-binding molecules other than ferritin, e.g., desferoxamine (DFO), iron dextran, and/or apoferritin, can be
25 administered to the patient. Further still, the present invention contemplates that enzymes (e.g., biliverdin reductase) that catalyze the breakdown any of these products can be inhibited to create/enhance the desired effect.

The present invention contemplates that compounds that release CO into the body after administration of the compound (e.g., CO-releasing compounds), e.g.,
30 dimanganese decacarbonyl, tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer, and methylene chloride (e.g., at a dose of between 400 to 600 mg/kg, e.g., about 500mg/kg) can also be used in the methods of the present invention, as can carboxyhemoglobin and CO-donating hemoglobin substitutes, and .

Administration any of the above can be administered to a patient in any way, e.g., by oral, intravenous, or intraarterial administration. Any of the above compounds can be administered to the patient locally and/or systemically, and in any combination.

The invention is illustrated in part by the following examples, which are not to
5 be taken as limiting the invention in any way.

Example 1. CO Suppresses Arteriosclerosis. Development of Intimal Hyperplasia and SMC Proliferation

10 **Animals.** Male (250-350g) Brown Norway rats (RT1⁺) were used as aortic graft donors and male (250-350g) Lewis rats (RT1⁺) as recipients. Dawley (400-450g) rats were used in the balloon injury model. Adult male C57BL/6, C57/S129, *p21*^{-/-} and *p53*^{-/-} null mice were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). *mkk3*^{-/-} null mice were generated as described Lu et al. (*EMBO*. 18:1845-1857 (1999)). The *inos*^{-/-} and
15 *enos*^{-/-} mice were bred at the University of Pittsburgh.

Aortic transplant model. Aortic transplantation was performed as described in Shimizu et al. (*Nat Med*. 7:738-741 (2001)). Briefly, 3 to 4 cm of descending aorta was harvested from the donor and implanted between the renal arteries and the aortic
20 bifurcation of the recipient. Both edges of the native abdominal aorta were ligated.

Balloon injury model. Balloon angioplasty was carried out as described in Murakami et al. (*Atherosclerosis* 157:361-368 (2001)). Briefly, a 2 Fr. arterial embolectomy catheter (Baxter, Chicago, IL) was inserted into the common carotid artery, and injury
25 was created by inflating the balloon to 5 atmospheres of pressure for 5 minutes. The arteries were flushed and the external carotid artery was ligated, ensuring return of blood flow through the common and internal carotid arteries. Injury of the vessel wall and subsequent pathological analysis was made in a manner that was blinded to the treatment group.

30 **CO exposure.** CO was delivered to animals as described in Otterbein et al. (*Nat Med*. 6:422-428 (2000)). Graft donors and recipients were exposed to CO (250 ppm) for two days before transplantation and for 56 days immediately following transplantation. In

the balloon injury model, rats received either no pretreatment or were exposed to CO (250 ppm) for one hour prior to injury. Following surgery rats were housed in room air for two weeks.

- 5 **Cells.** Primary mouse and rat smooth muscle cells (SMC) were isolated and cultured as described in Laubach et al. (*Proc Natl Acad Sci USA* 92:10688-9 (1995)). Mouse SMC isolated from HO-1^{-/-} mice were obtained as described in Duckers et al. (*Nat Med.* 7:693-698 (2001)).
- 10 **Cell treatment and reagents.** Guanylate cyclase inhibitor 1H(1,2,4) oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1 (ODQ; Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA; 10–100 μ M) and p38 MAPK inhibitor pyridinyl imidazol SB203580 (Calbiochem; 5-20 μ M) were dissolved in DMSO. The cGMP analogue 8-bromo-cGMP sodium salt (8-Br-cGMP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 10–100 μ M) and the PKG inhibitor (10-100 μ M; Alexis
- 15 Biochemicals) were dissolved in water.

- Cell counts and [³H] thymidine incorporation.** Rat and mouse SMC were isolated and cultured as described in Peyton et al. (*Blood* 99:4443-4448 (2002)). Proliferation assays were carried out as described in Petkova et al. (*J Biol. Chem.* 276:7932-7936
- 20 (2001)). For [³H] thymidine incorporation studies, cells were serum-starved overnight and then stimulated with 10% serum containing 5 μ Ci/ml [³H] thymidine (New England Nuclear, Boston MA). [³H]thymidine incorporation was measured by scintillation spectroscopy and presented as mean counts/min/well.

- 25 **Histomorphometric analysis.** Aortic grafts and carotid arteries were harvested at 56 and 14 days respectively. Vessels were fixed, embedded, and serially sectioned (5 μ) *in toto*. Every third slide was stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) for histomorphometric analyses. In both models, one or two images per slide at a resolution of 1520 x 1080 pixels were captured at a magnification of 25X with a Zeiss
- 30 microscope (Axioskop, Iowa City, Iowa), RT color SPOT (Diagnostic Instrument, Inc., Saint Joseph, MI) and Windows NT (Compaq Computer) using Adobe Photoshop version 5.5 software. Areas from eight to ten captured images were calculated using digital imaging software as number of pixels corresponding to those areas. Twenty-

four to forty-eight sections from each group were statistically analyzed with SPSS software version 10.

Immunostaining and cell population histomorphometric analysis. Grafts were harvested 56 days after transplantation. Rat leukocyte populations were detected using anti-rat leukocyte common antigen (LCA, CD45; OX-1) (Serotec, Harlan Bioproducts, Indianapolis, IN); CD3 (G4.18), CD4 (OX-35), CD8 (OX-8), macrophage (CD68, ED-1), ICAM-1 (CD54; 1A29), and major histocompatibility class II (OX-6) were all obtained from Becton Dickinson Biosciences, (San Diego, CA). Anti-PAI-1 mAb was obtained from America Diagnostica (Greenwich, CT). Eight to ten images were captured from each transplanted aorta and analyzed as detailed above.

Cell extracts and Western Blot Analysis. Cellular protein extracts were electrophoresed (10-12.5% polyacrylamide gels) and transferred onto nitrocellulose (BioRad, Hercules, CA). Total and phosphorylated forms of ERK, JNK and p38 MAPK as well as ATF-2 were detected using rabbit polyclonal antibodies (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA). Anti α -actin (Sigma; St. Louis, MO). p21^{Cip1} was detected using a rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA). Primary antibodies were detected as described in supplementary methods.

20

Statistical Analysis. The significance of difference was determined using analysis of variance (ANOVA).

Nitric Oxide (NO) exposure. Rats were exposed to 250 ppm or 500 ppm NO for 1 hour. NO gas (1% in N₂) was mixed with air in the same exposure apparatus as used in the CO experiments. Concentrations in the chamber were monitored with an NO analyzer (Interscan). Following exposure, balloon angioplasty was carried out as described above. Control animals were exposed to air. The surgeon inflicting the balloon injury was blinded to the rats being manipulated. Analyses of carotid arteries was performed 2 weeks after the procedure as described above.

30

Mouse arterial injury. The dissection was similar to that described by Lindner et al. (*Circ Res.* 73:792-796 (1993)), and was performed using a 0.018 inch guide wire

(Cook, Bloomington, IN), inserted through an external carotid arteriotomy into the common carotid, rotated 360 degrees three times and removed a total of three consecutive times.

- 5 **cGMP immunoassays.** Cellular levels of cGMP were quantified using an EIA (Biomol, Plymouth Meeting, PA). SMC were incubated in the presence or absence of CO (250 ppm) and cell lysates were analyzed for cGMP content, as suggested by the vendor.
- 10 **Cell Counts.** Cells were seeded at 5×10^3 cells/well and cultured overnight in high glucose DMEM containing 10% FCS, penicillin, and gentamicin (Life Technologies). Cells were serum starved for an additional 48 hours (0% serum) and where indicated exposed to CO (250 ppm for rat and mouse SMC) before induction of cell proliferation (10% FCS; Life Technology). Cells were counted daily using a Neubauer
- 15 hemocytometer. Viability was assessed with trypan blue.

- Recombinant adenovirus.** Recombinant β -galactosidase adenovirus was obtained from the University of Texas Southwest Medical Center, Dallas, TX. Recombinant HO-1 adenovirus expressing the rat HO-1 cDNA has been described in Brouard et al. (*J*
- 20 *Exp Med.* 192:1015-1026 (2000)). Rat SMC were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 400 plaque forming units per cell (PFU/cell), as described in Brouard et al. (*Id.*).

- Flow Cytometry.** Rat aortic SMC were harvested by trypsin digestion (0.025% Trypsin/ 0.01%EDTA)(Life Technology), washed in phosphate buffered saline (PBS,
- 25 pH 7.2) with 0.5% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich Co), and incubated with Propidium iodide (1 μ g/ml, 1h, RT). Fluorescent labeling was evaluated using a FACsort equipped with Cell Quest Software (Becton Dickinson, Palo Alto, CA). Experiments were carried out in triplicate.

- 30 **Histomorphometric analyses.** In the transplant model, grafts were harvested 56 days after transplantation. Aortas were fixed in 10 % formalin, embedded in paraffin and serially sectioned (5 μ) *in toto*. Ten samples from every three sections were placed per

slide in a total of about twenty-four to thirty slides. Every third slide was stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) for histomorphometric analysis. In the balloon injury model, animals were euthanized 14 days following injury and arteries were collected for morphometric analysis. Rat carotid arteries were perfused and fixed *in situ* with
5 PBS and paraformaldehyde (2%). Vessels were fixed for 2 hours in 2% paraformaldehyde at 4°C and cryoprotected in 30% sucrose overnight at 4°C. Vessels were quick-frozen in 2-methylbutane and 7µm cryosections were cut.

Primary Antibody Detection for Immunoblotting. Primary antibodies were detected
10 using horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (Pierce, Rockford, IL, USA). Peroxidase was visualized using the Enhanced ChemiLuminescence assay (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL, USA). according to manufacturer's instructions and stored in the form of photoradiographs (BiomaxTMMS, Eastman Kodak, Rochester, NY). Where indicated, membranes were
15 stripped (62.5 mM Tris.HCl pH 6.8, 2% SDS and 100 mM β-mercaptoethanol, 30 minutes, 50 °C). Phosphorylated p38 were normalized to the total amount of p38, detected in the same membrane.

Miscellaneous Reagents. Mouse iNOS and eNOS were detected using rabbit anti-
20 mouse polyclonal antibodies against iNOS and eNOS (Becton Dickinson, Biosciences, San Diego, CA).

CO suppresses the development of transplant-associated arteriosclerosis.

Figs. 1A-1I illustrate that CO treatment suppresses intimal hyperplasia normally
25 associated with chronic graft rejection. Figs. 1A-1F are photomicrographs of samples of various aortic grafts 56 days after transplantation. To generate these data, Brown Norway aortas were transplanted into Brown Norway rats (Figs 1A and 1D), Lewis rats exposed to air (Figs. 1B and 1E), and Lewis rats exposed to CO (250 ppm; Figs. 1C and 1F). Samples were harvested 56 days after transplantation and stained by a modified
30 elastic tissue-masson trichrome (elastic; Figs. 1A-1C) or by hematoxylin and eosin (H&E; Figs. 1D-1E). Elastic stainings are magnified 50x (Figs. 1A-1C) and H&E stainings are magnified 200x (Figs. 1D-1E). Samples shown are representative of 3-6 animals analyzed per group. Figs. 1G-1I are bar graphs illustrating the mean (±

standard deviation) relative areas corresponding to the intima and media regions, calculated from samples harvested from Brown Norway aortas transplanted into Brown Norway rats (Syng.; n=6), Lewis rats exposed to air (Allo.; n=6) or CO (250 ppm)(Allo. + CO; n=3). * $P < 0.001$ versus Allo.+CO.

5 Brown Norway aortic segments transplanted into Lewis rats developed arteriosclerotic lesions consistent with chronic graft rejection (Figs. 1B and 1E). The lesions appeared 20-30 days after transplantation but were significantly more pronounced by 50-60 days; all analyses were carried out 56 days following transplantation. The lesions were characterized by intimal hyperplasia, loss of medial
10 SMC, and leukocyte accumulation in the adventitia (Figs. 1B and 1E). These characteristics were not observed in vessels of the recipient, and the lesions were not observed in syngeneic grafts (Figs. 1A and 1D). Intimal hyperplasia was significantly ($p < 0.001$) inhibited ($61.4 \pm 2.9\%$ reduction versus control) in aortas transplanted into recipients exposed to CO (250 ppm) immediately after transplantation (and for 56 days
15 thereafter), as compared to those transplanted into air-exposed recipients (Figs. 1C, 1F, 1G, 1H, and 1I).

Figs. 2A-C are bar graphs illustrating that CO suppresses graft infiltration by activated leukocytes. To generate the data in Figs. 2A-2C, immunocytochemical analyses were performed on aortic grafts 56 days after transplantation. Brown Norway
20 rat aortas were transplanted into Brown Norway rats (syngeneic), untreated Lewis rats (allogeneic) or Lewis rats exposed to CO (250-1000 ppm). Samples were harvested 56 days after transplantation. Fig. 2A illustrates the mean ($\pm$ standard deviation (n=3-6)) number of nuclei in the adventitia from Brown Norway aortas transplanted into Brown Norway recipients (Syngeneic), untreated Lewis recipients (Allogeneic), and Lewis
25 recipients exposed to various concentrations of CO (CO 250 ppm, CO 500 ppm, and CO 750-1000 ppm) (* = $P < 0.001$ versus Allo.). Fig. 2B illustrates the mean ($\pm$ standard deviation (n=6)) number of CD45 (* $P < 0.002$ versus Allo.), CD68 (M ϕ /ED1; * $P < 0.001$ versus Allo.), MHC II, and CD54 (ICAM-1) positive cells (* $P < 0.001$ versus Allo.) in the adventitia from Brown Norway rat aortas transplanted into Brown Norway
30 rat recipients (Syng.), untreated Lewis rat recipients (Allo.), and Lewis rat recipients exposed to CO (Allo. + CO). Fig. 2C illustrates the mean ($\pm$ standard deviation (n=6)) number of CD3, CD4, and CD8 positive cells (* $P < 0.02, 0.001, 0.096$ respectively versus Allo.) in the adventitia from Brown Norway aortas transplanted into Brown

20

Norway recipients (Syng.), untreated Lewis recipients (Allo.), and Lewis recipients exposed to CO (CO 250 ppm).

Accumulation of leukocytes in the adventitia of transplanted aortas was inhibited in CO-exposed recipients (see Figs. 2A-2C). Leukocyte accumulation was not observed in syngeneic grafts. The ability of CO to suppress graft infiltration by activated leukocytes (CD45+) was dose dependent with increasing levels of CO (250-1000 ppm) resulting in decreased leukocyte infiltration; a maximal effect was observed at 700 to 1000 ppm of CO (52 ± 20 % inhibition versus air treated controls Fig. 2A). CO significantly suppressed the accumulation of CD45+/CD68+ monocyte/macrophages (M ϕ) (65 ± 24 % inhibition versus air treated controls) as well as CD45+/CD3+ T cells (57 ± 22 % inhibition versus air treated controls), including both CD4+ ("helper") and CD8+ ("cytotoxic") cells (Fig. 2C). CO also inhibited expression of pro-inflammatory genes associated with M ϕ activation including the major histocompatibility class II (MHC II) antigens and the intracellular adhesion molecule 1 (CD54/ICAM-1) (Fig. 2B).

CO suppresses development of intimal hyperplasia after balloon injury.

Figs 3A-3G illustrate that CO suppresses the development of vascular lesions associated with balloon injury. Figs. 3A-3D are photomicrographs (10x magnification) of immunocytochemically stained carotid arteries analyzed 14 days after balloon angioplasty. To generate the data in Figs. 3A-3D, rats were exposed to room air (Figs. 3A and 3C) or to CO (1 hour, 250 ppm; Figs. 3B and 3D) prior to balloon injury. All animals were exposed to room air following balloon injury. Two weeks after balloon injury, samples were stained with hemotoxylin and eosin (H&E). Samples from room air (Figs. 3A and 3C) and CO pretreated rats (Figs. 3B and 3D) are shown. Fig. 3E, 3F, and 3G are bar graphs illustrating the mean ($\pm$ standard deviation ($n=8$; * $P<0.001$ versus control)) relative areas of the intima and media regions of samples analyzed in Figs. 3A-3D.

Rat carotid arteries developed intimal hyperplasia 14 days after balloon injury (Figs. 3A and 3C; and Figs. 3E-3G). Intimal hyperplasia in rats exposed to CO (250 ppm) for one hour prior to balloon injury (after which CO exposure was discontinued) was suppressed by 74 ± 8 % as compared to control animals exposed to air ($n=8-10$; $p<0.001$) (Figs. 3B and 3D and Figs. 3E-3G).

CO suppresses SMC proliferation.

Figs 4A-4F illustrate that CO blocks SMC proliferation and that p21^{Cip1} is involved in the anti-proliferative effect of CO *in vitro*. Fig. 4A is a line graph illustrating proliferation of rat SMC that were non-transduced (○; Medium), or transduced with Lac.Z (□; LacZ Rec. Ad.) or HO-1 (●; HO-1 rec. Ad.) recombinant adenovirus. Results shown are mean ± standard deviation of n=3 wells per group (* P<0.001 versus LacZ and non-transduced). Fig. 4B is a line graph illustrating proliferation of rat SMC growth in the presence or absence of CO (●; 1000 ppm). Results shown are mean ± standard deviation (n=3 wells per group; P< 0.001 versus air, □). Fig. 4C is a bar graph illustrating proliferation of SMC isolated from wild type (WT) or HO-1 deficient (*ho-1*^{-/-}) mice in the presence and absence of CO (250 ppm) (n=6 wells/group; # P<0.006 versus air, * P<0.001). Fig. 4D is a Western blot illustrating p21 and β-actin protein expression in mouse SMC following exposure to CO (250 ppm). Fig. 4E is a bar graph illustrating proliferation of mouse SMC isolated from wild type (wt), p21^{Cip1} (*p21*^{-/-}) or p53 (*p53*^{-/-}) deficient mice. Gray bars indicate cells exposed to room air and black bars indicate cells exposed to CO (250 ppm). Results shown are the mean ± standard deviation (n=3 * P<0.001 versus air) in one out of 6 independent experiments. Fig. 4F is a bar graph illustrating that endogenous expression of p21^{Cip1} plays a critical role in controlling the extent of intimal hyperplasia following arterial injury in mice. Wild type (C57/Bl6/S129) or *p21*^{-/-} mice were exposed to room air or CO (1 hour; 250 ppm) before carotid artery injury and exposed to room air thereafter. Samples were harvested and analyzed two weeks after injury. Mean ± standard deviation (n=4) of the ratio between the relative area of the intima and media is expressed in arbitrary units (* P<0.001 versus air).

Figs. 7A-7B further illustrate that CO blocks SMC proliferation. Fig. 7A is a cell cycle analysis of rat aortic SMC in standard incubation (Air) versus CO (250 ppm) after 24 hours of treatment. Results shown are representative of 3 independent experiments. Fig. 7B is a line graph illustrating SMC proliferation in the presence (■; CO, 250 ppm) or absence (□; air) of CO for 6 days. SMC were serum stimulated on day 3 of the experiment. Proliferation increased in CO-treated SMC after CO exposure was discontinued on day 6. Results shown are representative of 3 independent experiments, each performed in triplicate (* P< 0.01 vs Air).

Fig. 8 is a bar graph illustrating that CO blocks SMC proliferation from wild type (wt) and p53^{-/-} mice but not from p21^{-/-} mice. The figure presents the results of a [³H]thymidine incorporation assay used to assess cellular proliferation (counts per minute; cpm) in wild type (wt), p21^{-/-}, and p53^{-/-} mouse SMCs exposed to air (gray bars) or to CO (250 ppm; black bars) for 24 hours. Results shown are the mean ± standard deviation (n=3; *P<0.05 versus air).

Figs. 9A-9G illustrate that CO suppresses the development of vascular lesions associated with wire injury in *wild type* (C57/B16/S129) and *p21*^{-/-} mice. Figs. 9A-9D are photomicrographs (20x magnification) of immunocytochemically stained carotid arteries 14 days following wire injury. Mice were exposed to room air (Figs. 9A and 9C) or CO (1 hour; 250 ppm; Figs. 9B and 9D) prior to wire injury. All animals were exposed to room air following injury. Two weeks after wire injury, samples were stained with hemotoxylin and eosin (H&E). Samples from wild type (Figs. 9A and 9B) and *p21*^{-/-} (Figs. 9C and 9D) mice are shown. Figs. 9E, 9F, and 9G are bar graphs illustrating the Mean (± standard deviation (n=4 * P<0.001 versus control)) relative areas corresponding to the intima and media regions, as well as intima:media ratios, from the photomicrographs shown in Figs. 9A-9D.

CO suppresses SMC proliferation in vitro

An in vitro system was used to evaluate SMC growth in the presence or absence of CO to delineate the mechanism by which CO inhibited intimal hyperplasia. Serum starved SMC proliferated upon re-addition of serum to culture medium (Fig. 7B); control SMC not exposed to serum exhibited minimal proliferation during the five days of the experiment. Expression of a HO-1 recombinant adenovirus or exposure to CO suppressed SMC proliferation (Figs. 4A and 4B). In a similar system, "scavenging" of CO by hemoglobin suppressed the anti-proliferative effect of HO-1, suggesting that CO generated by HO-1 likely accounts for the anti-proliferative effect of HO-1. Cell cycle analysis revealed that SMC treated with CO accumulated in the G0/G1 phase (Fig. 7A). SMC from mice that lack HO-1 (*ho-1*^{-/-}) proliferated significantly more rapidly when exposed to serum than did SMC from wild type mice (Fig. 4C), indicating that endogenous HO-1 expression in SMC exposed to serum suppresses smooth muscle cell proliferation. CO significantly inhibited proliferation of SMC from *ho-1*^{-/-} mice, suggesting that CO accounts in large measure for the anti-proliferative action of HO-1.

Inhibition of SMC proliferation was not associated with cell death as assessed by trypan blue and propidium iodide exclusion analyses. The anti-proliferative effects of CO were reversible, as cessation of CO exposure allowed SMC to begin to proliferate again (Fig. 7B).

5

The in vitro anti-proliferative effect of CO depends on p21^{Cip1}.

SMC exposed to CO up-regulated p21^{Cip1} protein expression (Fig. 4D), similar to SMC that overexpressed HO-1. This effect was transitory in that p21^{Cip1} expression increased significantly by 4 hours, was maximal by 16 hours and returned to basal levels at 24 hours after CO exposure (Fig. 4D). Proliferation of SMC from p21^{Cip1} deficient mice (p21^{-/-}) was not suppressed by CO (Fig. 4E), indicating that p21^{Cip1} expression is required for the anti-proliferative effect of CO. Despite the established role of p53 in regulation of p21^{Cip1} expression, CO induced p21^{Cip1} expression and inhibited proliferation of SMC derived from p53^{-/-} or from wild type mice to a similar extent (Fig. 4E and Fig. 8). Thus, the anti-proliferative effect of CO in vitro is dependent on p21^{Cip1} expression, which does not involve p53.

15

Involvement of p21^{Cip1} in the in vivo anti-proliferative effect of CO

p21^{Cip1} is expressed following vascular wall injury, likely functioning to regulate SMC proliferation and the development of intimal hyperplasia. The role of endogenous p21^{Cip1} expression on development of intimal hyperplasia following arterial injury in mice was investigated. Intimal hyperplasia was three times more pronounced in air treated p21^{-/-} mice than in wild-type mice (n=4; 314 ± 41.8%, p<0.001), showing that endogenous expression of p21^{Cip1} plays a critical role in controlling the extent of intimal hyperplasia following arterial injury in mice (Fig. 4F). In contrast, one hour of CO (250 ppm) pre-treatment suppressed intimal hyperplasia in both wild-type (C57/S129) and p21^{-/-} (C57/S129) mice by 80.9 ± 7.2% (n=4, p<0.001) and 86.2 ± 14% (n=4, p<0.001), respectively, versus air treated controls (Fig. 4F; Figs. 9A-9G). Thus, in this in vivo mouse model, CO suppresses intimal hyperplasia via a mechanism that is not dependent on the expression of p21^{Cip1}.

25

30

The anti-proliferative effect of CO requires activation of guanylate cyclase and generation of cGMP, and is exerted via activation of p38 MAPK.

22

Figs. 5A-5G illustrate that CO blocks SMC proliferation via generation of cGMP and activation of p38 MAPK. Fig. 5A is a bar graph illustrating the mean ($\pm$ standard deviation ($n=3$)) cellular cGMP content in mouse SMC exposed to air or CO (250 ppm for 8 h or 16h). Fig. 5B is a bar graph illustrating the results of a

5 [3H]thymidine incorporation assay used to assess cellular proliferation (counts per minute; cpm) in mouse SMC exposed to CO (250 ppm) in the presence or absence of the guanylate cyclase inhibitor ODQ. Results shown are the mean $\pm$ standard deviation ($n=3$; * $P<0.05$ versus air and CO/ODQ). Fig. 5C is a picture of a Western blot of p21^{Cip1} mouse SMC exposed to the cGMP analogue 8Br-cGMP. Membranes were

10 subsequently probed for β -actin to assure equal loading. Results shown are representative of 3 independent experiments. Fig. 5D is a bar graph illustrating [3H]thymidine incorporation of SMC isolated from wild type (wt) and p21^{Cip1} (p21^{-/-}) deficient mice in the presence and absence of the cGMP analogue 8Br-cGMP. Results shown are the mean $\pm$ standard deviation ($n=4$; * $P<0.05$ versus air and 8Br-cGMP).

15 Fig. 5E is a composite picture of a Western blot of phosphorylated p38 MAPK (p-p38), ATF-2 (p-ATF-2), JNK (p-JNK) and ERK (p-ERK) of SMC exposed to CO (250 ppm). Membranes were subsequently probed with an antibody against total p38 MAPK, ATF-2, JNK and ERK to assure equal loading. Blots are representative of 3 independent experiments. Fig. 5F is a bar graph illustrating [3H]thymidine incorporation in mouse

20 SMC exposed to CO (250 ppm) in the presence and absence of the p38 MAPK inhibitor SB203580. Results shown are the mean $\pm$ standard deviation from 4 independent experiments ($p<0.005$; versus air and CO/SB treated cells). Fig. 5G is a composite picture of a Western blot of p21^{Cip1} from mouse SMC exposed to CO (250 ppm) in the presence and absence of the p38 MAPK inhibitor SB203580 or DMSO,

25 used as a vehicle. The same membrane was probed with an antibody against β -actin to assure equal loading. Results shown are representative of 3 independent experiments.

Figs. 6A-6B illustrate that CO activates p38 MAPK through a mechanism that requires the generation of cGMP. Fig. 6A is a composite picture of a Western blot of phosphorylated p38 MAPK from mouse SMC exposed to the cGMP analogue

30 8Br-cGMP. Membranes were subsequently probed with an antibody against total p38 to assure equal loading. The composite blot shown in Fig. 6A is representative of 3 independent experiments. Fig. 6B is a bar graph illustrating [3H]thymidine incorporation in mouse SMC exposed to CO (250 ppm) in the presence and absence of

the cGMP analog 8-BrcGMP. Results shown are the mean $\pm$ standard deviation from 4 independent experiments.

Fig. 10 is a bar graph illustrating that CO does not suppress proliferation in SMC from $p21^{-/-}$ mice. The bar graph presents the results of a [3 H]thymidine incorporation assay to assess cellular proliferation (counts per minute; cpm) in SMC derived from $p21^{-/-}$ mice treated with CO (250 ppm) in the presence and absence of the p38 MAPK inhibitor SB203580 (SB).

Exposure of SMC to CO increased intracellular cGMP levels (Fig. 5A). The ability of CO to suppress SMC proliferation and to up-regulate $p21^{Cip1}$ expression was impaired under inhibition of guanylate cyclase activity by 1H(1,2,4) Oxadiazolo(4,3-a) Quinoxalin-1 (ODQ) (Fig. 5B). The non-degradable cGMP analogue 8-Bromoguanosine 3'-5'-cyclic monophosphate sodium salt (8-Br-cGMP) suppressed SMC proliferation (Fig. 5D) and increased expression of $p21^{Cip1}$ comparably to CO (Fig. 5C). Suppression of proliferation by 8-Br-cGMP was impaired in SMC derived from $p21^{-/-}$ mice (Fig. 5D). It thus appears that the anti-proliferative effect of CO is mediated via activation of guanylate cyclase, accumulation of cGMP and expression/activation of $p21^{Cip1}$. Activation of cGMP dependent kinases (PKG α and β) seems to be required for CO to suppress SMC proliferation since an inhibitor of PKG abrogated the anti-proliferative effect of CO.

Whether the anti-proliferative effect of CO in SMC involved the activation of the p38 MAPK signal transduction pathway was investigated. CO activated p38 MAPK in SMC (Fig. 5E), as it does in endothelial cells and monocytes/macrophages. p38 MAPK phosphorylation/activation peaked four hours after exposure to CO and returned to basal levels thereafter (Fig. 5E). Exposure of SMC to CO was also associated with the activation of ATF-2, a transcription factor most often activated through the p38 MAPK signal transduction pathway (Fig. 5E). Inhibition of p38 MAPK activation by the pyridinyl imidazol SB203580, a selective inhibitor of the p38 α and β isoforms, blocked the ability of CO to up-regulate expression of $p21^{Cip1}$ (Fig. 5G) and suppressed the anti-proliferative effect of CO (Fig. 5F). Additionally, CO did not inhibit proliferation in cells isolated from mice deficient in mitogen activated protein kinase kinase 3 ($mkk3^{-/-}$), the upstream kinase that activates p38 α and p38 β . SB203580 did not modulate the effects of CO on proliferation of SMC from $p21^{-/-}$

1 mice (Fig. 10). These data indicate that p38 MAPK activation is critical for
upregulation of p21^{Cip1} and inhibition of SMC proliferation by CO. CO did not
modulate activation of extra-cellular regulated kinases 1 and 2 (ERK-1 and -2) (Fig.
5E), indicating that this signal transduction pathway is not involved in the anti-
5 proliferative effect of CO. CO induced activation of jun-activated kinases 1 and 2
(JNK-1 and -2) (Fig. 5E).

Given that CO induces the generation of cGMP (Fig. 5A) and activation of p38
MAPK (Fig. 5E) in SMC, the interrelationship between these two signal transduction
pathways was investigated. Activation of p38 MAPK by CO was abolished when the
10 generation of cGMP was blocked by ODQ. Exposure of SMC to 8-bromo-cGMP
activated p38 MAPK (Fig. 6A) and the anti-proliferative effect of 8Br-cGMP was
abrogated in the presence of SB203580 (Fig. 6B). Consistent with these findings, the
ability of 8Br-cGMP to up-regulate the expression of p21^{Cip1} was suppressed by
SB203580.

15

*The anti-proliferative effect of CO does not require expression of nitric oxide
synthases.*

Figs. 11A-11B illustrate that NO is not involved with the anti-proliferative
effect of CO. Fig. 11A is a bar graph illustrating [³H]thymidine incorporation in mouse
20 SMC isolated from wild type (wt) and *enos*^{-/-} and *inos*^{-/-} deficient mice in the presence
and absence of CO (250 ppm). Results shown are the mean ± standard deviation (n=6-
8, * P<0.001 versus wt). Fig. 11B is a bar graph illustrating the mean intimal and
media areas of carotid arteries from Sprague-Dawley rats exposed to room air (white
bars) or NO (Black bars; 1 hour; 250 ppm) before balloon injury of the carotid artery.
25 All animals were exposed to room air following injury. Two weeks after injury carotid
arteries were removed, sectioned and stained with hematoxylin and eosin (H&E).
Areas corresponding to the intimal and media regions were calculated. Results are the
mean ± standard deviation from representative 40 sections taken from 3 rats per
treatment group.

30 SMC exposed to CO (250 or 10,000 ppm) for varying amounts of time showed
no induction of either NOS isoform by western blotting. SMC from mice deficient for
the constitutive/endothelial isoform of nitric oxide synthase (eNOS/NOS-3; *nos-3*^{-/-}) or
the inducible isoform (iNOS/NOS-2; *nos-2*^{-/-}) showed a significantly greater uptake of

thymidine when exposed to serum as compared to SMC derived from wild type mice (Fig. 11A). Exposure to CO significantly inhibited proliferation of SMC derived from wild type, *nos-2^{-/-}* or *nos-3^{-/-}* mice ($51 \pm 12.9\%$ and $51 \pm 25\%$ and $54 \pm 11\%$ inhibition respectively; $p < 0.001$ versus air treated controls) (Fig. 11A). These data indicate that

the anti-proliferative effect of CO can occur in the absence of iNOS or eNOS. Similarly, under similar conditions to the ones used for CO (250 ppm; one hour pre-treatment), NO did not modulate intimal thickening triggered by balloon injury. NO administered at 500 ppm was lethal.

CO does not inhibit the expression of the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) in SMC.

Figs. 12A, 12B and 12C illustrate that CO increases PAI-1 protein expression levels. Fig. 12A is a composite picture of a Western blot analysis for PAI-1 in SMC treated with and without CO (250 ppm) for 24 or 48 hours. Whole cell lysates from rat liver homogenates treated with and without endotoxin (LPS) were used as controls. α -actin was used to assay protein loading. Fig. 12B is a composite picture of a Western blot analysis for PAI-1 in untransplanted (control), transplanted (Allo. + Air), and CO-treated transplanted (Allo. + CO) aortas after 56 days. Fig. 12C is the Commassie blue-stained polyacrylamide gel used to create the Western blot of Fig. 12B, and illustrates that the same amount of protein is loaded in each lane.

CO suppresses expression of PAI-1 in M ϕ , which is key to the protective effect of CO in preventing lung ischemia reperfusion injury in mice. Exposure of SMC to serum did not alter expression of PAI-1 by western blot (Fig. 12A). CO treatment slightly increased PAI-1 protein, suggesting that the anti-proliferative effect of CO does not involve down-regulation of PAI-1. Similarly, PAI-1 protein expression in allogeneic aortas transplanted under CO treatment was similar to that of allogeneic aortas transplanted in the absence of CO as tested by immunohistology and Western blot (Fig. 12B). This suggests that the ability of CO to modulate vascular injury associated with chronic graft rejection might not be directly linked to the expression of PAI-1.

CO is generated physiologically in most cell types through the catabolism of heme by

enzymes of the heme oxygenase family. Expression of the inducible enzyme, HO-1, is a protective response to injury that limits the deleterious effects associated with inflammatory reactions. The protective effects of HO-1 are wide-ranging, including inhibition of the development of atherogenesis and intimal hyperplasia, and can in many instances be mimicked by CO. The present studies demonstrate that CO possesses direct vasoprotective properties. Continuous exposure to low concentration of CO (250 ppm) suppresses development of intimal hyperplasia and graft infiltration by activated leukocytes (Figs. 1A-1I and 2A-2C) associated with transplant arteriosclerosis (Fig. 1A-1I). Exposure to CO (250 ppm) for just one hour prior to injury suppresses the intimal hyperplasia associated with carotid artery angioplasty injury in rats (Figs. 3A-3G).

The physiologic relevance of the anti-proliferative effect of HO-1 in SMC, originally described in pulmonary epithelial cells, is supported by the observation that SMC from HO-1 deficient mice proliferate more rapidly *in vitro* and *in vivo* than wild type SMC. The present data demonstrate that CO suppresses SMC proliferation in a manner similar to HO-1.

Generation of cGMP and the expression of p21^{Cip1} are essential for the effects of CO, and are interrelated. The ability of CO to up-regulate p21^{Cip1} expression and suppress SMC proliferation is dependent on activation of guanylate cyclase (Figs. 5A-5G). CO up-regulates p21^{Cip1} (Figs. 4A-4F) and the anti-proliferative effect of CO is dependent on the expression of p21^{Cip1} as this effect is abrogated in p21^{Cip1}^{-/-} SMC (Figs. 6A-6B). The ability of 8-Br-cGMP to suppress SMC proliferation was impaired in SMC derived from p21^{Cip1} deficient mice (Figs. 5A-5G), suggesting that cGMP suppresses SMC proliferation *in vitro* via the up-regulation of p21^{Cip1}.

The individual contribution of cGMP and p38 MAPK to the effects of CO seems to be cell type specific. The present data demonstrate that the anti-proliferative effect of CO in SMC is dependent on both signal transduction pathways (Figs. 5A-5G). CO requires cGMP for activation of p38 MAPK, which is needed for CO to up-regulate p21^{Cip1} and suppress SMC proliferation. It is suggested that CO, like NO, activates p38 MAPK via cGMP and activation of cGMP dependent protein kinases, consistent with the observation that inhibition of PKG α and/or β suppresses the anti-proliferative effect of CO. The present data suggest that the anti-proliferative effect of CO is distinct from

and can act independently of NO. It should be noted that the link between cGMP, p38 MAPK and p21^{Cip1} has not been reported in cells exposed to HO-1 or CO.

SMC express p21^{Cip1} upon vascular injury and recombinant adenovirus mediated p21^{Cip1} expression in SMC suppresses intimal hyperplasia following vascular injury. The present data show that physiological expression of p21^{Cip1} is involved in intimal hyperplasia: following arterial injury, intimal hyperplasia in *p21*^{-/-} mice is three times higher as wild type controls (Fig. 4F), strongly supporting the notion that CO induction of p21^{Cip1} expression in SMC (Fig. 5D) contributes to suppress intimal hyperplasia following vascular injury.

p21^{-/-} mice were used to assess the role of p21^{Cip1} expression on the ability of CO to suppress intimal hyperplasia following arterial injury, *p21*^{-/-} mice. One hour of CO pretreatment was sufficient to suppress by more than 80% the development of intimal hyperplasia in *p21*^{-/-} mice or wild-type mice, as compared with their respective air-treated controls (Fig. 4F). One interpretation of these data is that the ability of CO to suppress neointimal proliferation in vivo acts independently of p21^{Cip1} in SMC. In mice, in contrast with rats, there is a significant inflammatory/thrombotic process that presumably leads to intimal proliferation. Given the potent anti-inflammatory effects of CO, it also seems possible that CO suppresses intimal hyperplasia in mice by inhibiting inflammation, a process that is almost certainly independent of p21^{Cip1}.

Given the known suppression of PAI-1 by CO in monocyte-macrophages and the importance of PAI-1 in the pathogenesis of intimal hyperplasia following vascular injury in some studies, whether a similar suppression of PAI-1 occurred in the present system was investigated. No decrease in the level of PAI-1 protein expression at 56 days after transplantation was observed (Fig. 12B).

Example 2. Protocols for the Treatment of Patients During Angioplasty and Transplantation Procedures.

The following example illustrates protocols for treating patients during angioplasty procedures and for treating a donor, organ, and/or recipient with carbon monoxide during a transplantation procedure. Any one or more of the following procedures may be used in a given transplantation procedure.

25

Angioplasty

CO can be administered systemically or locally to a patient prior to, during, and/or after an angioplasty procedure is performed in the patient. Treatment can be administered at doses varying from 10 ppm to 1000 ppm (e.g., about 100 ppm to about 800 ppm, about 150 ppm to about 600 ppm (e.g., about 150 ppm), or about 200 ppm to about 500 ppm (e.g., about 250 ppm or about 500 ppm)). For example, CO can be administered to the patient, intermittently or continuously, starting 0 to 20 days before the procedure is performed, e.g., starting at least about 30 minutes, e.g., about 1, 2, 3, 5, 7, or 10 hours, or about 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, or 20 days, or greater than 20 days, before the procedure. Alternatively or in addition, CO can be administered to the patient during the procedure, e.g., through an instrument used to perform the angioplasty and/or by inhalation. Alternatively or in addition, CO can be administered to the patient after the procedure, e.g., starting immediately after completion of the procedure, and continuing for about 1, 2, 3, 5, 7, or 10 hours, or about 1, 2, 5, 8, 10, 20, 30, 50, or 60 days, or indefinitely, after the completion of the procedure.

Transplantation

Treatment of a Donor

Prior to harvesting an organ or tissue, the donor can be treated with inhaled carbon monoxide (250 ppm) for one hour. Treatment can be administered at doses varying from 10 ppm to 1000 ppm for times varying from one hour to six hours, or for the entire period from the moment when it becomes possible to treat a brain-dead (cadaver) donor to the time the organ is removed. Treatment should start as soon as possible following the declaration that brain death is present. In some applications, it may be desirable to begin treatment before brain death.

For non-human animals (e.g., pigs) to be used as xenotransplantation donors, the live animal can be treated with relatively high levels of inhaled carbon monoxide, as desired, so long as the carboxyhemoglobin so produced does not compromise the viability and function of the organ to be transplanted. For example, one could use levels greater than 500 ppm (e.g., 1000 ppm or higher, and up to 10,000 ppm, particularly for brief times).

Treatment of the organ in situ

Before an organ is harvested from a donor, it can be flushed with a solution, e.g., a buffer or medium, without red blood cells while it is still in the donor. The intent is to flush the organ with a solution saturated with carbon monoxide and maintained in a carbon monoxide atmosphere so that the carbon monoxide content remains at saturation. Flushing can take place for a time period of at least 10 minutes, e.g., 1 hour, several hours, or longer. The solution should ideally deliver the highest concentration of carbon monoxide possible to the vasculature of the organ.

Treatment of an Organ or Tissue

The organ or tissue can be preserved in a medium that includes carbon monoxide from the time it is removed from the donor to the time it is transplanted to the recipient. This can be performed by maintaining the organ or tissue in the medium comprising CO, or by perfusing it with such a medium. Since this occurs ex vivo rather than in an animal, very high concentrations of CO gas can be used (e.g., 10,000 ppm) to keep the medium saturated with CO.

Treatment of a Recipient

The recipient can be treated with carbon monoxide. Treatment can begin on any day before the transplantation procedure, e.g., on the day of the transplantation procedure at least one hour before surgery begins. Alternatively, it could begin at least 30 minutes before re-perfusion of the organ in the recipient. It can be continued for at least 30 minutes, e.g., 1 hour. Carbon monoxide doses between 10 ppm and 3000 ppm can be delivered for varying times, e.g., minutes or hours, and can be administered on the day of and on days following transplantation. For example, a recipient can inhale a concentration of carbon monoxide, e.g., 3000 ppm, for three consecutive 10 second breath holds. Alternatively, the recipient can inhale, say 200 ppm for an extended time, such as 20 days. Carboxyhemoglobin concentrations can be utilized as a guide for appropriate administration of carbon monoxide to a patient. Usually, treatments for recipients should not raise carboxyhemoglobin levels above those considered to pose an acceptable risk for a patient in need of a transplant.

A number of embodiments of the invention have been described. Nevertheless, it will be understood that various modifications may be made without departing from

23

the spirit and scope of the invention. Accordingly, other embodiments are within the scope of the following claims.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method of performing angioplasty in a patient, the method comprising:
 - (a) performing angioplasty on the patient; and
 - (b) before, during, or after (a), administering to the patient a pharmaceutical
- 5 composition comprising an amount of carbon monoxide effective to treat intimal hyperplasia in the patient.
2. The method of claim 1, wherein the angioplasty comprises balloon angioplasty.
- 10 3. The method of claim 1, wherein the angioplasty comprises laser angioplasty.
4. The method of claim 1, wherein the angioplasty comprises directional atherectomy.
5. The method of claim 1, wherein the angioplasty comprises rotational atherectomy.
- 15 6. The method of claim 1, wherein the angioplasty comprises extraction atherectomy.
7. The method of claim 1, wherein the angioplasty comprises a stenting procedure.
- 20 8. The method of claim 1, wherein the angioplasty comprises balloon angioplasty and a stenting procedure.
9. A method of treating restenosis in a patient, the method comprising:
 - (a) providing a vessel containing a pressurized gas comprising carbon monoxide
- 25 gas;
- (b) identifying a patient suffering from or at risk for restenosis;
- (c) releasing the pressurized gas from the vessel, to form an atmosphere comprising carbon monoxide gas; and
- (d) exposing the patient to the atmosphere, wherein the amount of carbon monoxide in the atmosphere is sufficient to treat restenosis in the patient.

27

10. A vessel comprising medical grade compressed carbon monoxide gas, the vessel bearing a label indicating that the gas can be used to reduce restenosis in a patient.

11. The vessel of claim 10, wherein the carbon monoxide gas is in admixture with an
5 oxygen-containing gas.

12. The vessel of claim 11, wherein the carbon monoxide gas is present in the admixture at a concentration of at least about 0.025%.

10 13. The vessel of claim 11, wherein the carbon monoxide gas is present in the admixture at a concentration of at least about 0.05%.

14. The vessel of claim 11, wherein the carbon monoxide gas is present in the admixture at a concentration of at least about 0.10%.

15

15. The vessel of claim 11, wherein the carbon monoxide gas is present in the admixture at a concentration of at least about 1.0%.

16. The vessel of claim 11, wherein the carbon monoxide gas is present in the
20 admixture at a concentration of at least about 2.0%.

17. A vessel comprising medical grade compressed carbon monoxide gas, the vessel bearing a label indicating that the gas can be used to reduce arteriosclerosis in a patient.

25 18. The vessel of claim 17, wherein the carbon monoxide gas is present in the admixture at a concentration of at least about 0.025%.

19. The vessel of claim 17, wherein the carbon monoxide gas is present in the admixture at a concentration of at least about 0.05%.

30

20. The vessel of claim 17, wherein the carbon monoxide gas is present in the admixture at a concentration of at least about 0.10%.

21. The vessel of claim 17, wherein the carbon monoxide gas is present in the admixture at a concentration of at least about 1.0%.

22. The vessel of claim 17, wherein the carbon monoxide gas is present in the
5 admixture at a concentration of at least about 2.0%.

23. A vessel comprising medical grade compressed carbon monoxide gas, the vessel bearing a label indicating that the gas can be used in conjunction with an angioplasty procedure in a patient.

10

24. The vessel of claim 23, wherein the carbon monoxide gas is present in the admixture at a concentration of at least about 0.025%.

25. The vessel of claim 23, wherein the carbon monoxide gas is present in the
15 admixture at a concentration of at least about 0.05%.

26. The vessel of claim 23, wherein the carbon monoxide gas is present in the admixture at a concentration of at least about 0.10%.

20 27. The vessel of claim 23, wherein the carbon monoxide gas is present in the admixture at a concentration of at least about 1.0%.

28. The vessel of claim 23, wherein the carbon monoxide gas is present in the
25 admixture at a concentration of at least about 2.0%.

29. A method of treating restenosis in a patient, comprising:

- (a) identifying a patient suffering from or at risk for restenosis; and
- (b) administering to the patient a pharmaceutical composition comprising an amount of carbon monoxide effective to treat restenosis in the patient.

30

30. The method of claim 29, wherein the restenosis results from balloon angioplasty.

31. The method of claim 29, wherein the restenosis results from laser angioplasty.

20

32. The method of claim 29, wherein the restenosis results from directional atherectomy.

33. The method of claim 29, wherein the restenosis results from rotational
5 atherectomy.

34. The method of claim 29, wherein the restenosis results from extraction atherectomy.

10 35. The method of claim 29, wherein the restenosis results from a stenting procedure.

36. A method of treating intimal hyperplasia in a patient, comprising:

(a) identifying a patient suffering from or at risk for intimal hyperplasia not resulting from a transplant procedure; and

15 (b) administering to the patient a pharmaceutical composition comprising an amount of carbon monoxide effective to treat intimal hyperplasia in the patient.

37. The method of claim 36, wherein the intimal hyperplasia results from balloon angioplasty.

20

38. The method of claim 36, wherein the intimal hyperplasia results from laser angioplasty.

39. The method of claim 36, wherein the intimal hyperplasia results from directional
25 atherectomy.

40. The method of claim 36, wherein the intimal hyperplasia results from rotational atherectomy.

30 41. The method of claim 36, wherein the intimal hyperplasia results from extraction atherectomy.

42. The method of claim 36, wherein the intimal hyperplasia results from a stenting procedure.

43. A method of performing angioplasty in a patient, comprising:

(a) providing an angioplasty device capable of administering carbon monoxide to a patient;

(b) positioning the device in a blood vessel in need of angioplasty;

5 (c) performing angioplasty using the device; and

(d) before, during or after (c), using the device to administer carbon monoxide to the blood vessel in an amount sufficient to treat intimal hyperplasia.

44. A kit comprising:

10 (a) an angioplasty device; and

(b) a vessel containing a carbon monoxide composition.

45. The kit of claim 44, wherein the angioplasty device is capable of administering carbon monoxide to a patient.

15

46. The kit of claim 44, further comprising:

(c) instructions for use of the carbon monoxide composition in a method for performing angioplasty in a patient.

20 47. The kit of claim 44, wherein the carbon monoxide composition is a liquid composition.

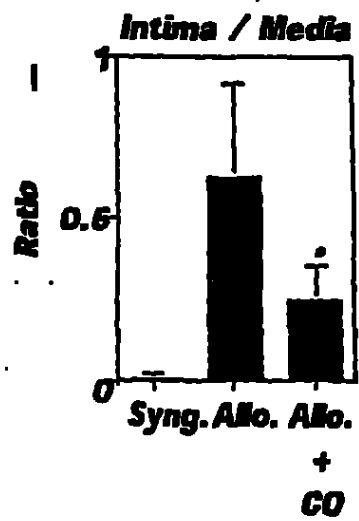
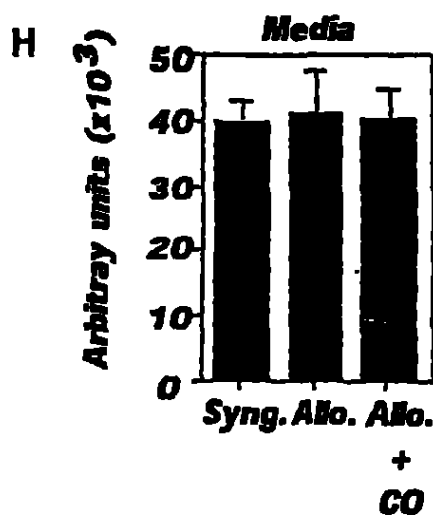
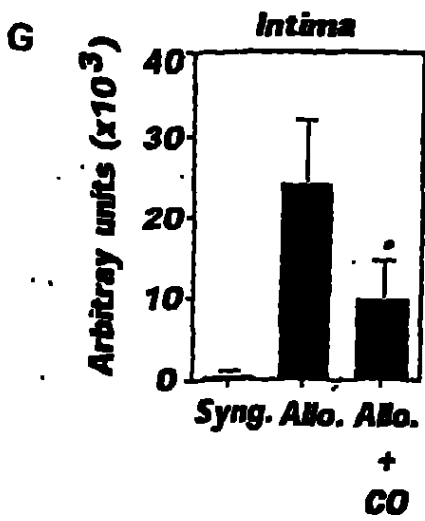
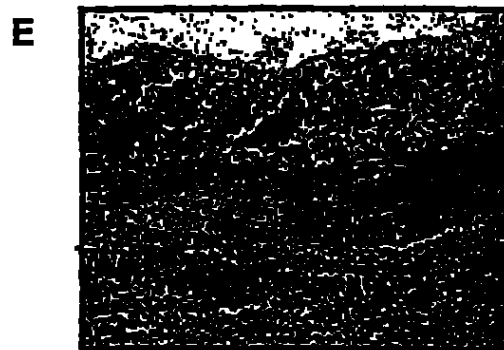
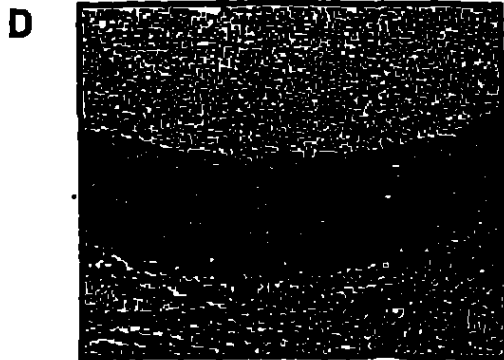
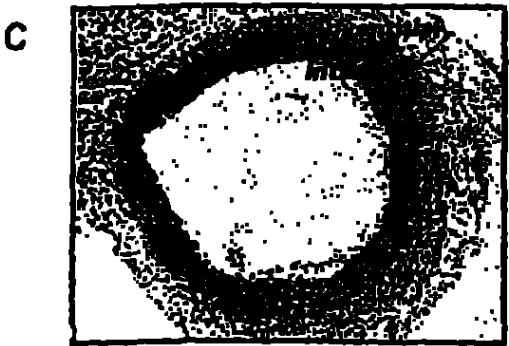
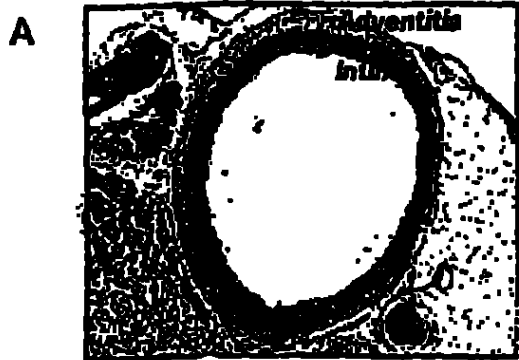
48. The kit of claim 44, wherein the carbon monoxide composition is a gaseous composition.

25

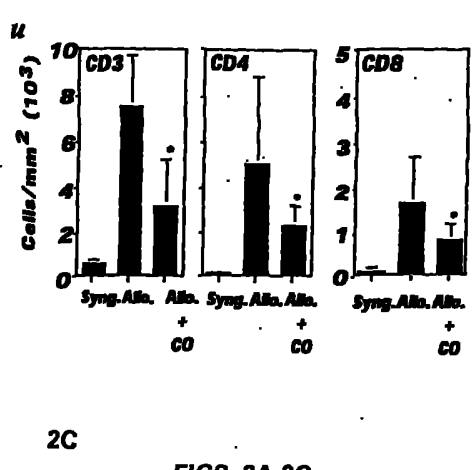
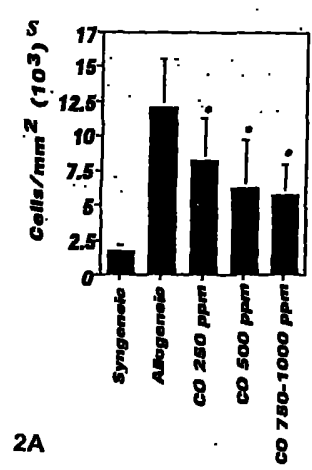
49. An angioplasty device comprising:

an inflatable member comprising a plurality of apertures; and

a reservoir comprising carbon monoxide gas and connected to the inflatable member, whereby the gas is provided to the inflatable member during inflation of the
30 inflatable member.

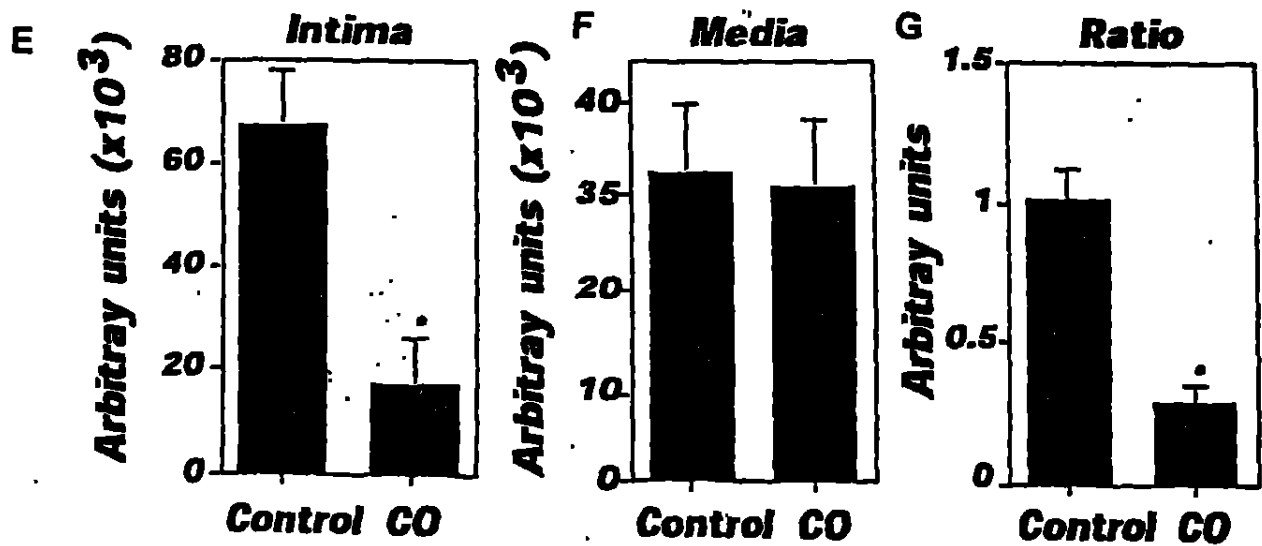
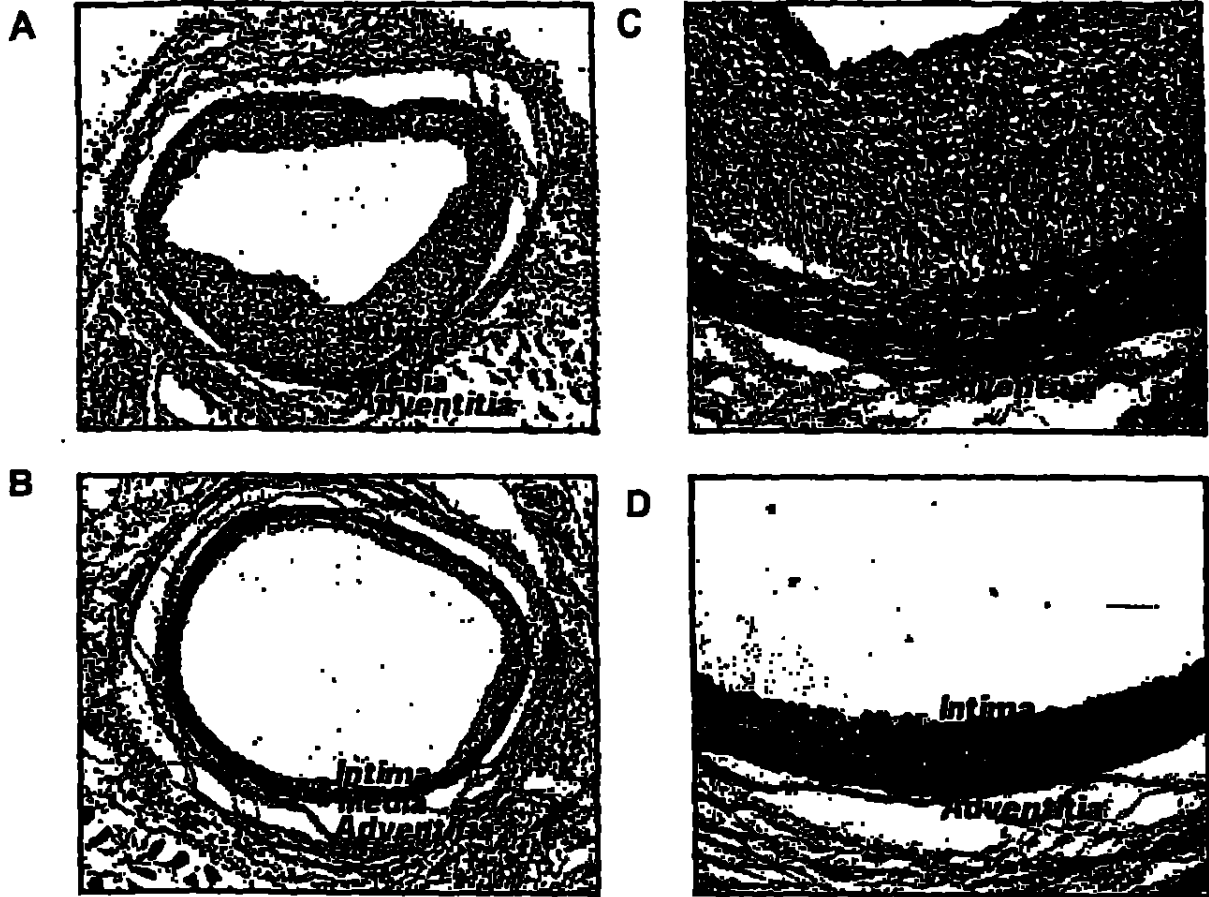


FIGS. 1A-1I

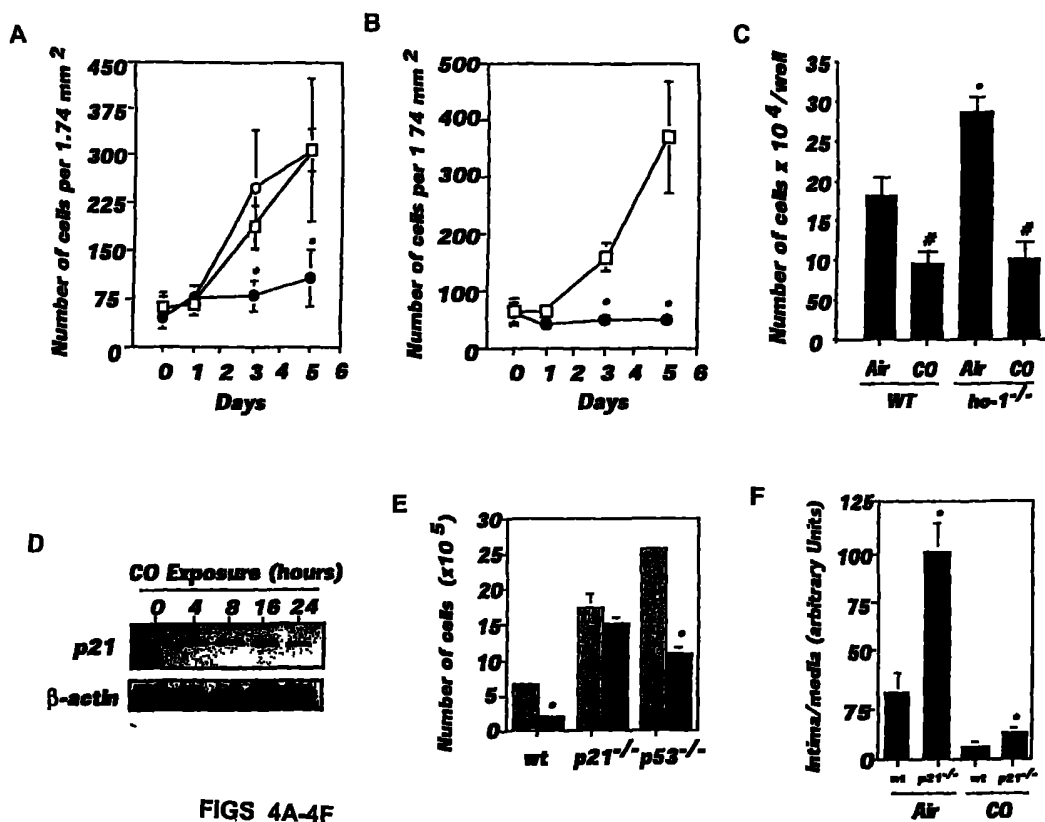


FIGS. 2A-2C

12



FIGS. 3A-3G



FIGS 4A-4F

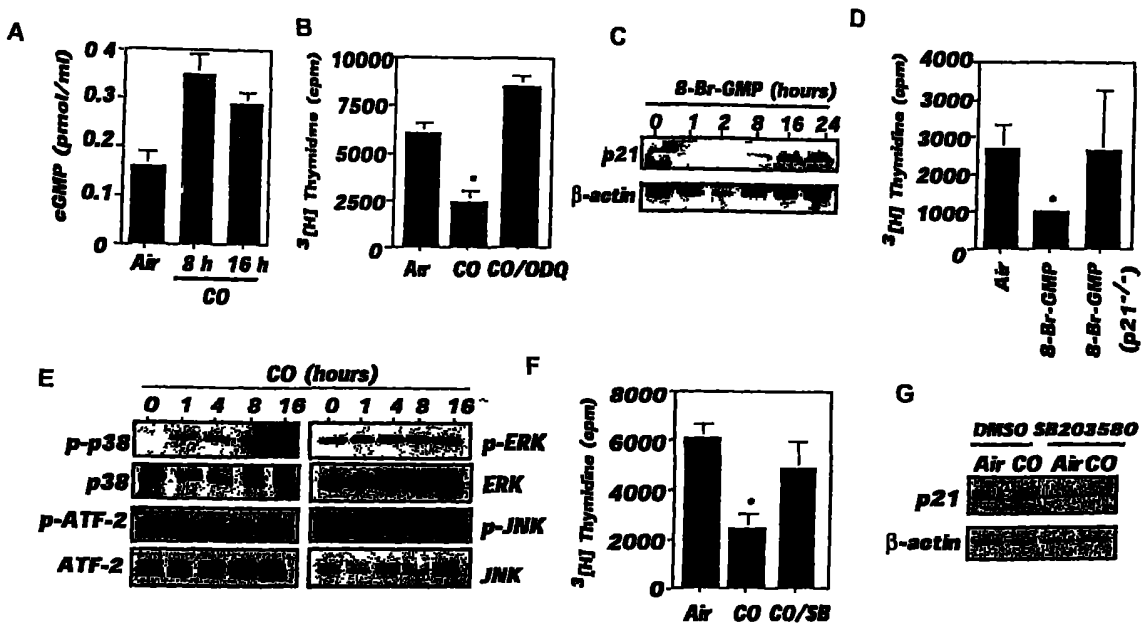
WO 03/072024

4/18

PCT/US03/04665

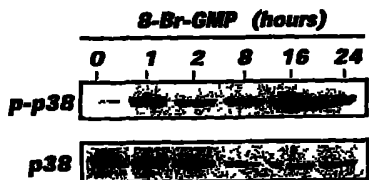
72

47

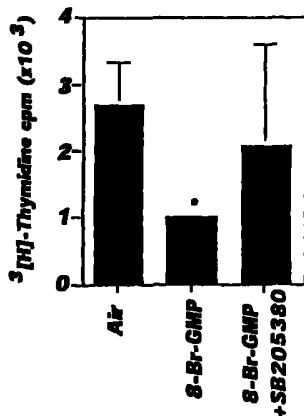


FIGS 5A-5G

A



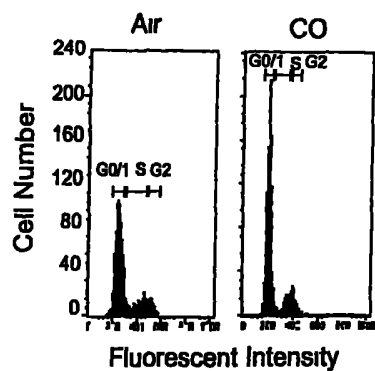
B



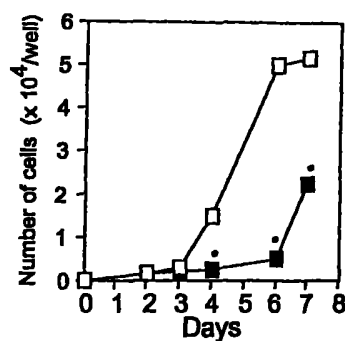
FIGS 6A-6B

sp

A



B



FIGS 7A-7B

4

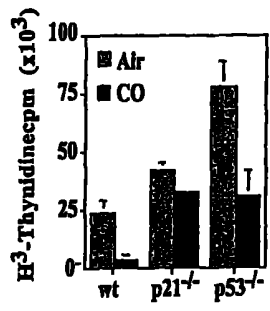


FIG 8

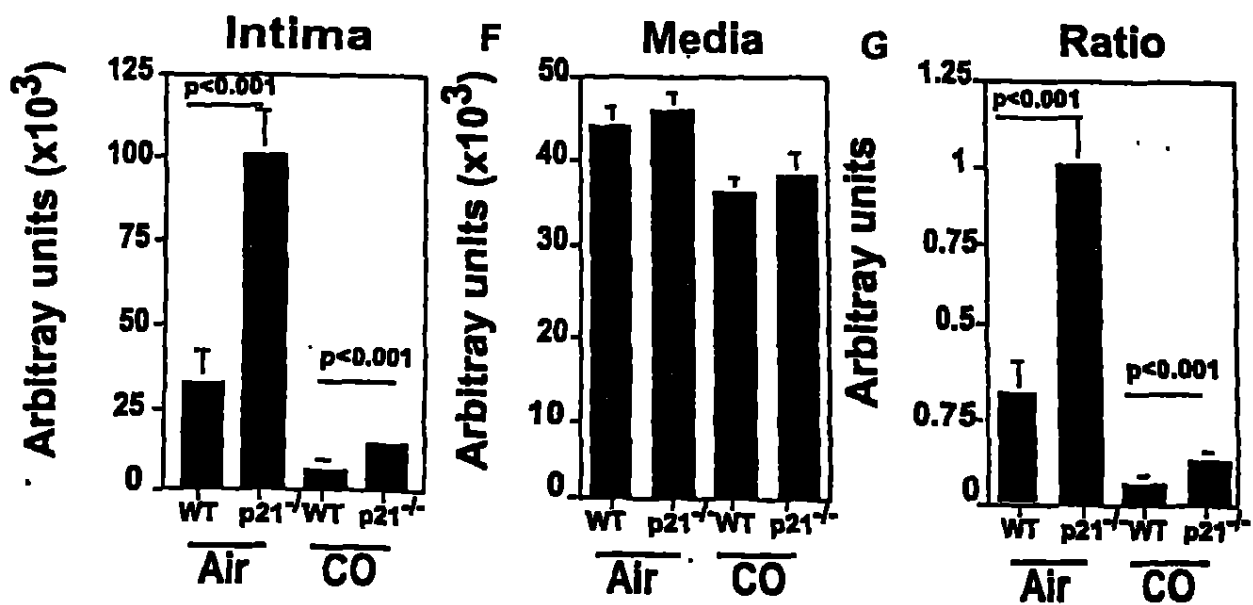
[Handwritten signature]

Wild type

p21-1-

Air

8

E

FIGS. 9A-9G

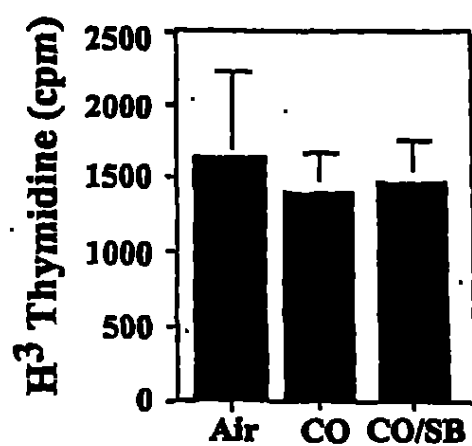
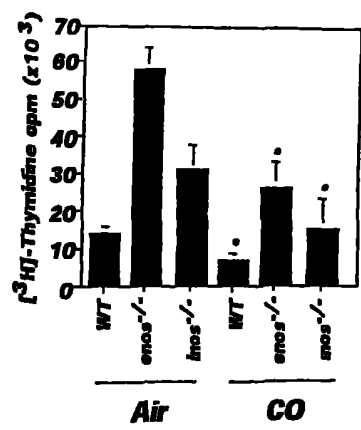
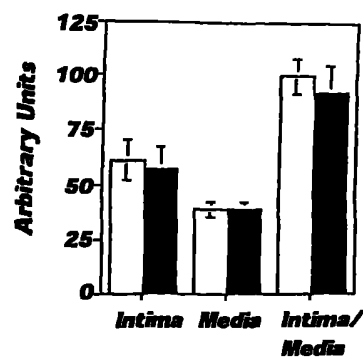


FIG. 10

A

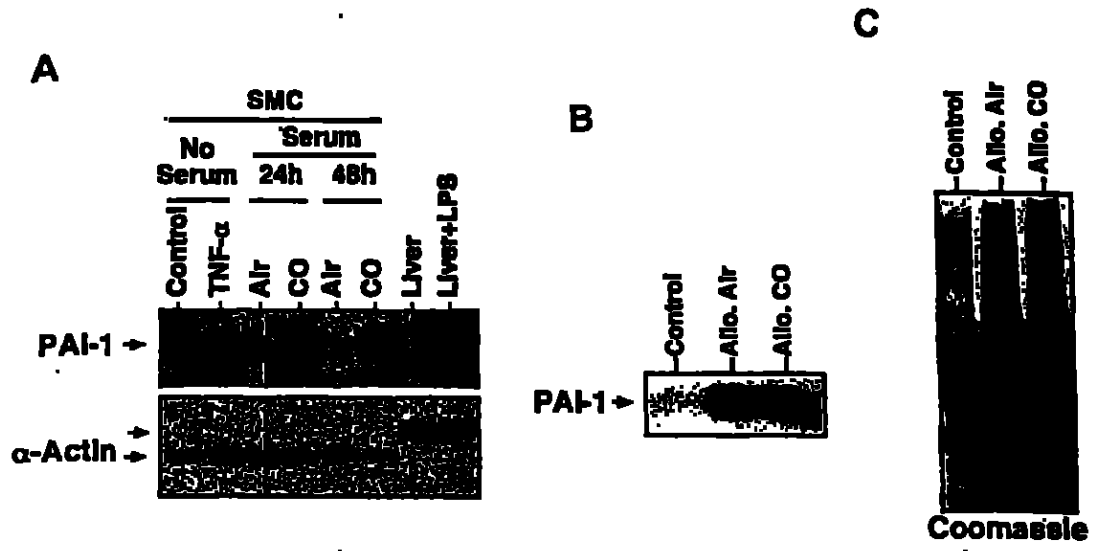


B



FIGS 11A-11B

56



FIGS. 12A-12C

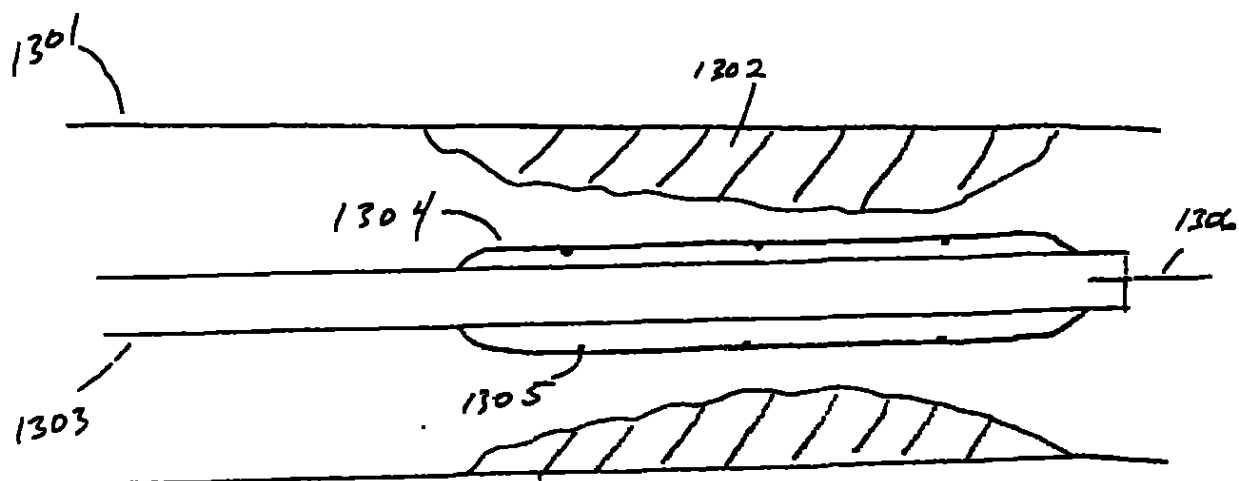


FIG. 13A

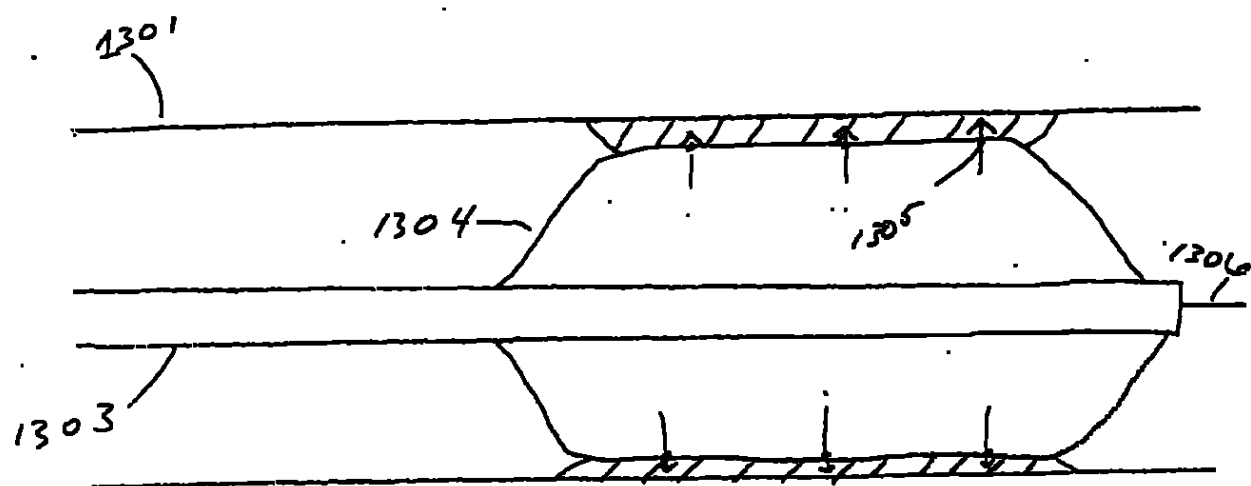


FIG 13B

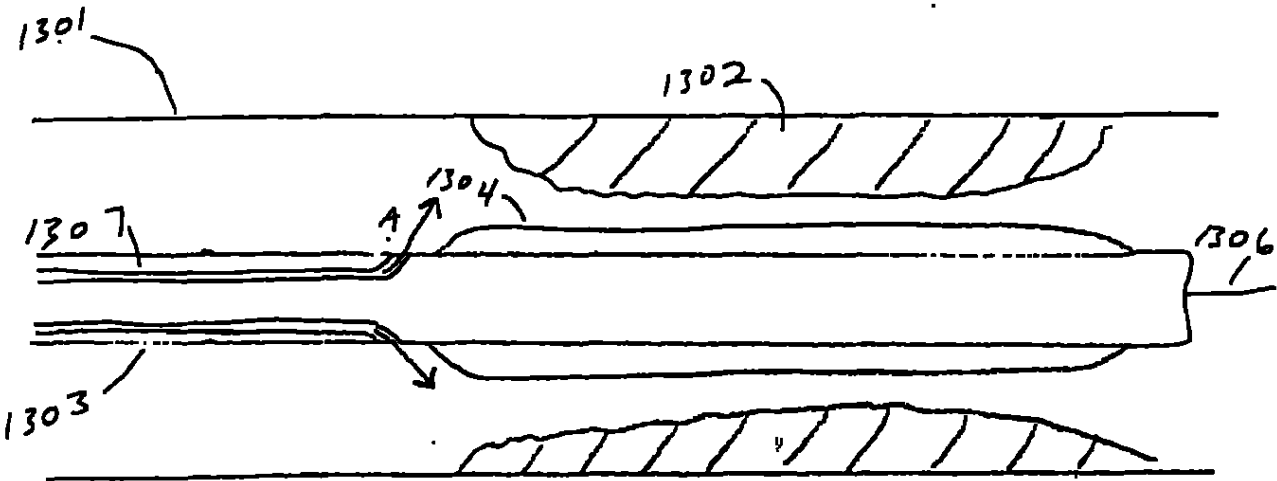


FIG. 13C

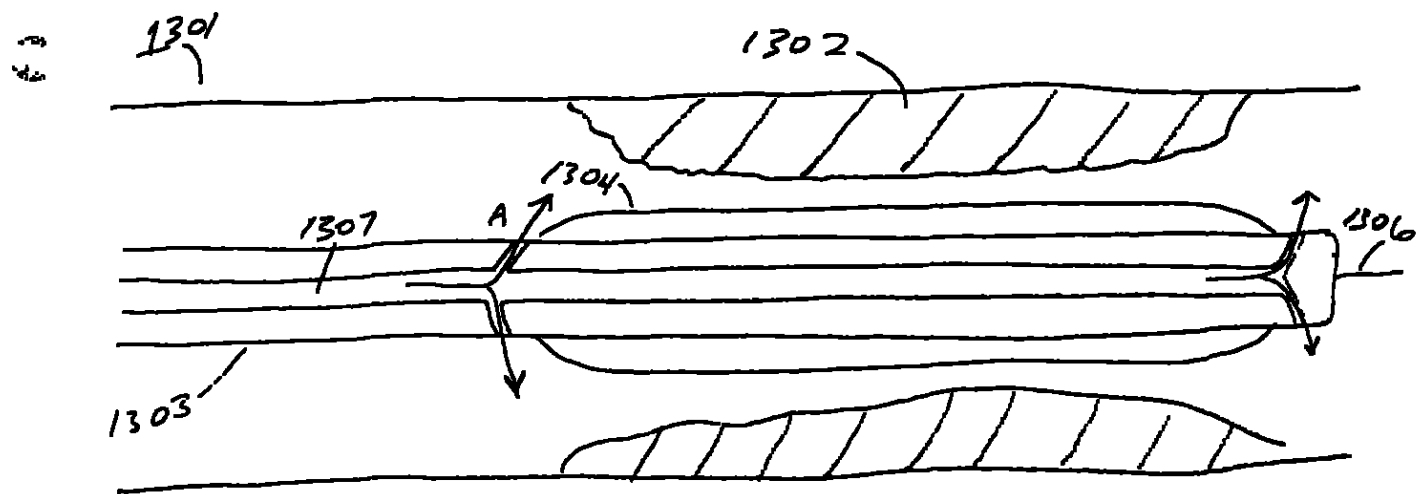


FIG 13D

Figure 14a

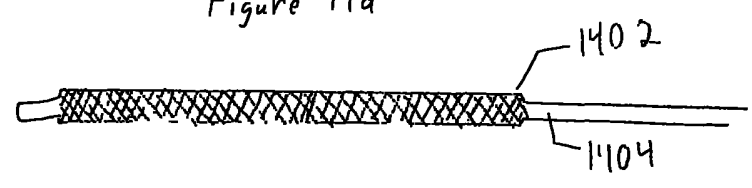


Figure 14b

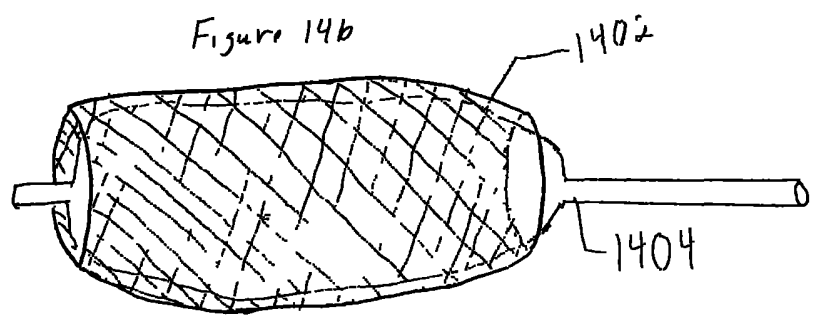
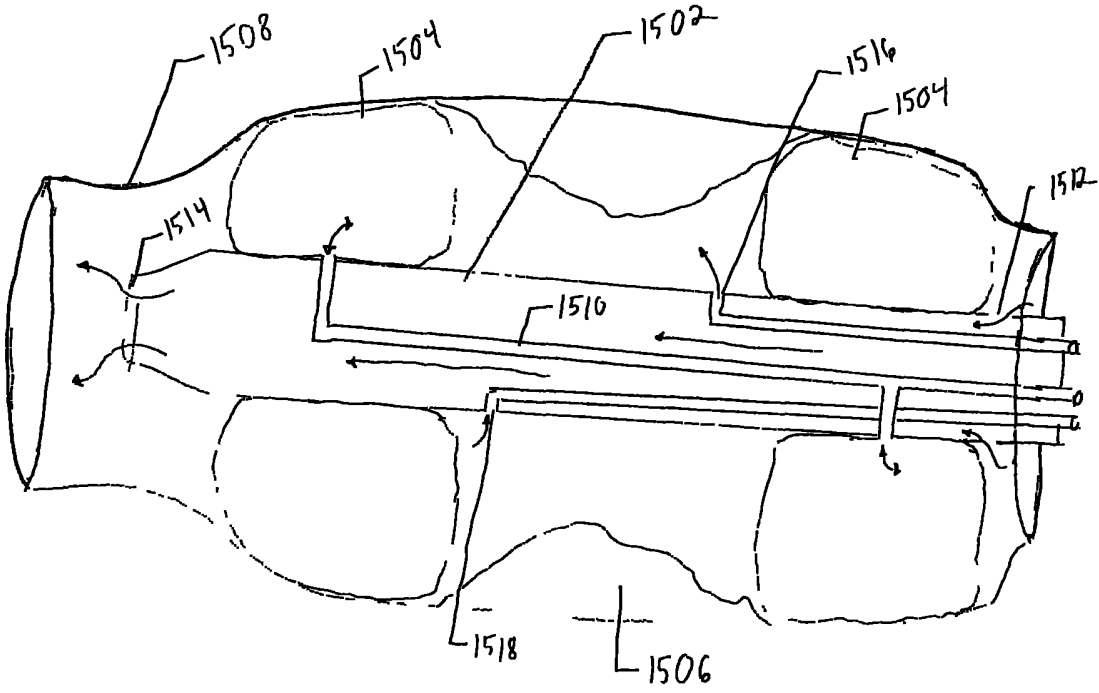


Figure 15



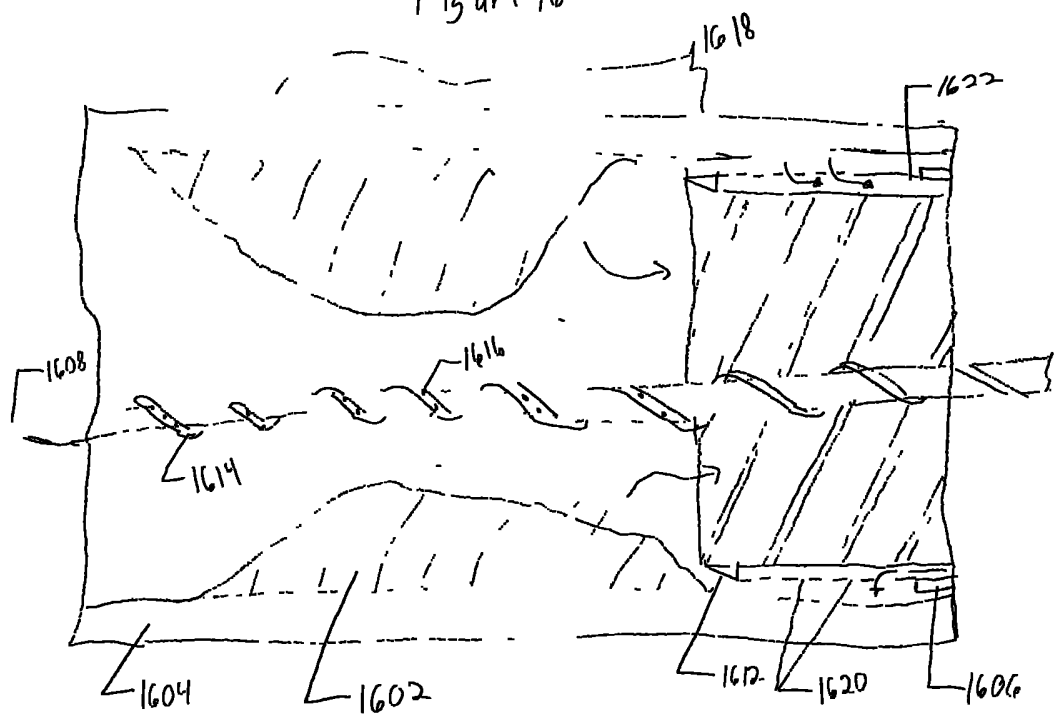
WO 2017/2024

18/18

PCT/US2016/000000

46

Figure 16



**(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE
COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)**

**(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual**

Oficina Internacional

**(43) Fecha de Publicación Internacional
4 de Septiembre de 2003 (04.09.2003)**



**(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/072024 A2**

**(51) Clasificación Internacional de Patente⁷:
A61K**

**(21) Número de Solicitud Internacional:
PCT/US03/04665**

**(22) Fecha de Presentación Internacional:
13 de Febrero 2003 (13.02.2003)**

(25) Idioma de Presentación: Inglés

A

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos de Prioridad:

60/356,718 13 de Febrero de 2002 (13.02.2002) US

(71) Solicitante (Para todos los Estados designados excepto US): **BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.** [US/US]; One Deaconess Rod, Boston, MA 02115 (US), **UNIVERSITY OF PITTSBURG OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION** [US/US]; 200 Gardner Steel Conference Center, pittsburg, PA 15260 (US).

(72) Inventores; y

(75) Inventor/Solicitante (solo para US): **OTTERBEIN, Leo, F.**, [US/US]; 910 Normandy Drive, New Kensington, PA15068 (US), **CHOI, Augustine, M., K.** [US/US]; 43 Long Meadow Dr. Pittsburg, PA 15238 (US), **BACK, Fritz, E.** [US/US]; 8 Blossom Lane, Manchester-by-the-Sea. MA 01994 (US), **ZUCKERBRAUN, Brian** [US/US]; 108 Maple Heights Road, Pittsburg, PA 15232 (US).

(74) Agente: **FRASER, Janis, K.:** Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston MA 02110 (US).

(81) Estados Designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ; OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- Sin el reporte de búsqueda internacional y para ser republicado una vez se reciba tal reporte

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, referirse a las notas guía sobre los códigos y abreviaturas" que aparecen al inicio de cada emisión regular de la gaceta PCT.

(54) Título: MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE
ENFERMEDAD VASCULAR

(57) Resumen:

La presente invención se relaciona con un método para tratar pacientes que sufren de, o en riesgo de sufrir de, hiperplasia y/o arterosclerosis. El tratamiento incluye administrar una composición farmacéutica que incluye monóxido de carbono al paciente.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD VASCULAR

Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional Estadounidense No. 60/356,718 presentada en Febrero 13, 2002, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Declaración de Investigación

Federalmente Patrocinada

Esta invención fue hecha con el apoyo del Gobierno de acuerdo con las Subvenciones de los Institutos Nacionales de Salud Nos. HL55330, HL60234, HL67040, HL58688, HL53458, HL60234, HL5785405, y AI42365. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

Campo Técnico

Esta invención se relaciona de manera general con el tratamiento de enfermedad vascular.

51

Antecedentes

La Hemo oxigenasa-1 (HO-1) cataliza la primera etapa en la degradación del heme. El HO-1 rompe el puente de carbono α -meso de las moléculas heme tipo-b mediante la oxidación para producir cantidades equimolares de biliverdina IXa, monóxido de carbono (CO), y hierro libre. Subsecuentemente, la biliverdina es convertida a bilirrubina por vía de la biliverdina reductasa, y el hierro libre es secuestrado en ferritina (cuya producción se induce mediante el hierro libre).

El CO es reconocido como una molécula de señalización importante (Verma et al., Science 259: 381-384, 1993). Se ha sugerido que el monóxido de carbono actúa como una molécula mensajera neuronal en el cerebro (Id.) y como un modulador neuro-endocrino en el hipotálamo (Pozzoli et al., Endocrinology 735:2314-2317, 1994). Como el óxido nítrico, el CO es un relajante del músculo de fibra lisa (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). La inhalación de bajos

52

niveles de CO han mostrados tener efectos anti-inflamatorios en algunos modelos.

La hiperplasia íntima, un engrosamiento de la capa interna del vaso sanguíneo, es un proceso patológico que surge del daño vascular subsecuente a procedimientos tales como angioplastia, cirugía de bypass o transplante de órgano. La hiperplasia íntima continúa limitando el éxito de estas intervenciones terapéuticas.

Resumen

La presente invención está basada, en parte, en los descubrimientos de que el CO evita las lesiones arterioescleróticas y la hiperplasia íntima luego de transplante aórtico y daño de globo de la arteria carótida en animales.

De acuerdo con esto, en un aspecto, la invención suministro un método para tratar hiperplasia íntima en un paciente. El método incluye identificar un paciente que sufre o está en riesgo de sufrir hiperplasia íntima (por ejemplo, hiperplasia íntima que resulta de un procedimiento de angioplastia o de un procedimiento de

transplante, o que resulta de un procedimiento o condición diferente a un procedimiento o transplante), y administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de monóxido de carbono para tratar la hiperplasia íntima en el paciente.

La invención también suministra un método para desarrollar angioplastia en un paciente. El método incluye desarrollar la angioplastia en el paciente, y antes, durante, y/o después de desarrollar la angioplastia, administrarle al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad de CO efectivo para tratar la hiperplasia íntima en el paciente. La angioplastia puede ser cualquier procedimiento de angioplastia, por ejemplo, angioplastia de globo; angioplastia con láser; aterectomía, por ejemplo, aterectomía direccional, aterectomía rotacional, o aterectomía de extracción; y/o cualquier procedimiento de angioplastia utilizando un stent, o cualquier combinación de tales procedimientos.

La invención también suministra un método para tratar (por ejemplo, evitar o hacer disminuir) la restenosis en un paciente. El método incluye suministrar un vaso que

contiene un gas presurizado que comprende gas de monóxido de carbono, que identifica un paciente que sufre o está en riesgo de restenosis, liberar el gas presurizado proveniente del vaso para formar una atmósfera que comprende gas de monóxido de carbono, y exponer al paciente a la atmósfera, en donde la cantidad de monóxido de carbono en la atmósfera es suficiente para tratar la restenosis en el paciente.

En otro aspecto, la invención suministra un método para tratar restenosis en un paciente. El método incluye identificar un paciente que sufre o está en riesgo de restenosis y administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad de monóxido de carbono efectiva para tratar la restenosis en el paciente. La restenosis puede resultar de cualquier procedimiento de angioplastia, por ejemplo, angioplastia de globo; angioplastia por láser; aterectomía, por ejemplo, aterectomía direccional, aterectomía rotacional, o aterectomía por extracción; y/o cualquier procedimiento de angioplastia que utiliza un stent, o cualquier combinación de tales procedimientos.

5

La invención también suministra un método para desarrollar cirugía vascular, por ejemplo, un procedimiento de trasplante, en un paciente. El método incluye: (a) desarrollar cirugía vascular (por ejemplo, un procedimiento de trasplante) en un paciente, y (b) antes durante y/o después (a), administrarle al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad de CO efectiva para tratar la arteriosclerosis (por ejemplo, hiperplasia íntima) en un paciente.

En otro aspecto, la invención suministra un método para inhibir la proliferación de células de músculo de fibras lisas. El método incluye suministrar una o unas células de músculo de fibra lisa y administrarle a la célula o células de músculo de fibra lisa una cantidad de CO efectiva para inhibir la proliferación de la o las células de músculo de fibra lisa. Esto se puede llevar a cabo *in vivo* o *in vitro*.

Un método para desarrollar angioplastia en un paciente también se suministra, que incluye suministrar un dispositivo de angioplastia (por ejemplo, un dispositivo descrito aquí) capaz de administrar monóxido de carbono a un paciente, ubicar el dispositivo en un vaso sanguíneo

necesitado de angioplastia, desarrollar la angioplastia utilizando el dispositivo, y antes, durante y/o después de desarrollar la angioplastia, administrar CO al vaso sanguíneo utilizando el dispositivo en una cantidad suficiente para tratar la hiperplasia íntima, para desarrollar de esta manera la angioplastia en el paciente. El dispositivo puede ser cualquier dispositivo capaz de utilizarse en un procedimiento de angioplastia, por ejemplo, un dispositivo descrito aquí. Alternativamente o además, el dispositivo puede estar recubierto con un agente de liberación de CO, por ejemplo, un hidrogel, aceite, o ungüento, que libera CO o un compuesto de liberación de CO.

En otro aspecto, la invención suministra un vaso que comprende gas CO comprimido grado médico. El vaso puede llevar una etiqueta que indica que el gas se puede utilizar para reducir restenosis, arteriosclerosis, y/o hiperplasia íntima en un paciente (por ejemplo, un paciente humano), y/o que este se puede utilizar en un procedimiento de angioplastia. El gas CO puede estar en una mezcla con gas nitrógeno, con óxido nítrico y gas nitrógeno, o con un gas que contiene oxígeno. El gas CO puede estar presente en la mezcla en una concentración de

al menos aproximadamente 0,025%, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,05%, 0,10%, 0,50%, 1,0%, 2,0%, 10%, 50%, o 90%.

La invención también suministra un kit que incluye un dispositivo de angioplastia (por ejemplo, un dispositivo de angioplastia de globo; un dispositivo de angioplastia láser; un dispositivo de aterectomía; y/o un stent) y un vaso que contiene CO (por ejemplo, una composición de CO líquida y/o gaseosa). El dispositivo de angioplastia es capaz de administrar monóxido de carbono al paciente. El kit puede incluir adicionalmente instrucciones para utilizar la composición de monóxido de carbono en un método para desarrollar angioplastia en un paciente.

En otro aspecto, la invención suministra dispositivos de angioplastia (por ejemplo, dispositivos de angioplastia de globo, dispositivos de angioplastia láser, dispositivos de aterectomía, y stents, por ejemplo, un dispositivo descrito aquí) capaz de administrar CO a un paciente y/o un vaso sanguíneo inmediatamente antes, durante, y/o después de un procedimiento de angioplastia. En una modalidad, el dispositivo de angioplastia comprende una composición de CO. En otra modalidad, el

50

dispositivo es un dispositivo de angioplastia de globo que incluye un miembro inflable (por ejemplo, un globo) que tiene una pluralidad de aberturas, y un reservorio que contiene CO (por ejemplo, una composición de CO líquido o gaseoso) conectada al miembro inflable, de tal forma que el CO se pueda liberar del reservorio a través del miembro inflable y al vaso sanguíneo.

También dentro de la invención está el uso de CO en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o prevención de la condición descrita aquí, por ejemplo, hiperplasia íntima, restenosis, y/o arterosclerosis. El medicamento también se puede utilizar en un método para desarrollar un procedimiento de angioplastia y/o un procedimiento de trasplante. El medicamento puede estar en cualquier forma como se describió aquí, por ejemplo, de una composición de CO líquida o gaseosa.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que comúnmente se entiende por aquella persona medianamente versada en la materia técnica a cual corresponde esta invención. Los métodos y materiales adecuados son descritos adelante, aunque métodos y

materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas aquí se incorporan mediante referencia en su totalidad. En caso de conflicto, tendrá preponderancia la presente especificación, incluyendo las definiciones. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve Descripción de los Dibujos

La fig. 1A es una fotomicrografía (ampliación 50X) de un injerto aórtico singénicamente transplantado que ilustra el efecto del trasplante singénico sobre el injerto.

La fig. 1B es una fotomicrografía (ampliación 50X) de un injerto aórtico alogénicamente transplantado que ilustra el efecto del trasplante alogénico sobre el injerto.

La fig. 1C es una fotomicrografía (ampliación 50X) de un injerto aórtico alogénicamente transplantado que ilustra el efecto del transplante alogénico sobre el injerto cuando el receptor es expuesto a CO.

La fig. 1D es una fotomicrografía (ampliación 200X) de un injerto aórtico singénicamente transplantado que ilustra el efecto del transplante singénico sobre el injerto.

La fig. 1E es una fotomicrografía (ampliación 200X) de un injerto aórtico alogénicamente transplantado que ilustra el efecto del transplante alogénico sobre el injerto.

La fig. 1F es una fotomicrografía (ampliación 200X) de un injerto aórtico alogénicamente transplantado que ilustra el efecto del transplante alogénico sobre el injerto cuando el receptor es expuesto a CO.

La fig. 1G es una gráfica de barras que ilustra las áreas relativas medias (en unidades arbitrarias) de los íntimos de los injertos aórticos singénicamente transplantados en receptores expuestos al aire (Sing.), alogénicamente en receptores expuestos al aire (Alo.), y alogénicamente en receptores expuestos a CO (Alo. + CO).

La fig. 1H es una gráfica de barras que ilustra las áreas relativas medias (en unidades arbitrarias) de los medios de los injertos aórticos singénicamente transplantados en receptores expuestos al aire (Sing.), alogénicamente en receptores expuestos al aire (Alo.), y alogénicamente en receptores expuestos a CO (Alo. + CO).

La fig. 1I es una gráfica de barras que ilustra el índice del área íntima/media de los injertos aórticos singénicamente transplantados en receptores expuestos al aire (Sing.), alogénicamente en receptores expuestos al aire (Alo.), y alogénicamente en receptores expuestos a CO (Alo. + CO).

La fig. 2A es una gráfica de barras que ilustra la acumulación de leucocitos activados (medidos mediante conteo de núcleos totales) en los adventicios de los injertos aórticos singénicamente transplantados en receptores expuestos al aire (Singénico), alogénicamente en receptores expuestos al aire (Alogénico), y alogénicamente en receptores expuestos a varias concentraciones de CO (CO 250 ppm; CO 500 ppm; y 750-1000 ppm).

La fig. 2B es un conjunto de gráficas de barras que ilustran la acumulación de células positivas CD45, ED1, MHCII, y CD54 en los adventicios de los injertos aórticos singénicamente transplantados en receptores expuestos al aire (sing.), alogeneicamenmte en receptores expuestos al aire (Alog.), y alogénicamente en receptores expuestos a CO (Alo. + CO).

La fig. 2C es un conjunto de gráficas de barras que ilustran la acumulación de células positivas CD3, CD4, y CD8 en los adventicios de los injertos singénicamente transplantados en receptores expuestos al aire (sing.), alogénicamente en receptores expuestos al aire (Alog.), y alogénicamente en receptores expuestos a CO (Alo. + CO).

La fig. 3A es un fotomicrografía (ampliación 10X) de una muestra de arteria carótida que ilustra el efecto de la angioplastia de globo sobre la arteria.

La fig. 3B es un fotomicrografía (ampliación 10X) de una muestra de arteria carótida que ilustra el efecto de la angioplastia de globo sobre la arteria cuando el sujeto está preexpuesto a CO.

La fig. 3C es una fotomicrografía de una muestra de arteria carótida que ilustra el efecto de la angioplastia de globo sobre la arteria.

La fig. 3D es una fotomicrografía de una muestra de arteria carótida que ilustra el efecto de la angioplastia de globo sobre la arteria cuando el sujeto es preexpuesto al CO.

La fig. 3E es una gráfica de barras que ilustra las áreas relativas medias (en unidades arbitrarias) de los íntimos de las arterias carótidas sometidos a angioplastia de globo cuando el animal sujeto es preexpuesto a aire (Control) o 250 ppm de CO (CO).

La fig. 3F es una gráfica de barras que ilustra las áreas relativas medias (en unidades arbitrarias) de las medias de las arterias carótidas sometidas a angioplastia de globo cuando el animal sujeto es preexpuesto a aire (Control) o 250 ppm de CO (CO).

La fig. 3G es una gráfica de barras que ilustra el índice de área íntima/media de las arterias carótidas sometidas

a angioplastia de globo cuando el animal sujeto es preexpuesto a aire (Control) o 250 ppm de CO (CO).

La fig. 4A es una gráfica de línea que ilustra la proliferación de SMC de rata que no fueron transducidas (○, Medio), transducida con adenovirus recombinante Lac.Z (□; LacZ Rec. Ad.) o transducidas con adenovirus recombinante HO-1 (●; HO-1 rec. Ad.).

La fig. 4B es una gráfica de línea que ilustra la proliferación de SMC de rata en la presencia (●; 1000 ppm) o ausencia (□) de CO.

La fig. 4C es una gráfica de barras que ilustra la proliferación de SMC aislado del tipo silvestre (ts) o ratones (*ho-1^{-/-}*) deficientes en HO-1 en la presencia (CO) y ausencia (Aire) de CO.

La fig. 4D es una transferencia Western que ilustra el efecto de exposición a CO (durante 0, 4, 5, 16, y 24 horas) sobre expresión de proteína p21 y β -actina en SMC de ratón.

La fig. 4E es una gráfica de barras que ilustra el efecto de CO sobre la proliferación de SMC de ratón aislado de ratones deficientes en (ts) tipo silvestre, p21Cip1 ($p21^{-/-}$) y p53 ($p53^{-/-}$). Las barras grises indican células expuestas a aire ambiente y las barras negras células expuestas a CO (250 ppm).

La fig. 4F es una gráfica de barras que ilustra el índice de área íntima/media de las arterias carótidas dañadas con globo provenientes de ratones (C57/B16/S129; ts) tipo silvestre y $p21^{-/-}$ expuestas al aire (Aire) o monóxido de carbono (CO).

La fig. 5A es una gráfica de barras que ilustra el efecto del aire (Aire) y CO (250 ppm durante 8 h o 16 h) expuestos al contenido cGMP celular medio de los SMC de ratón.

La fig. 5B es una gráfica de barras que ilustra la toma de [3 H] timidina por los SMC de ratón expuestos al aire (Aire), CO (250 ppm) y CO más el inhibidor de guanilato ciclasa 1H(1,2,4)Oxadiazolo(4,3-a)Quinoxalin-1(CO/ODQ).

b

La fig. 5C es una foto compuesta de una transferencia Western que ilustra el efecto de la sal de monofosfato sódico de 8-Bromoguanosina 3'-5'-cíclica (8-Br-cGMP) sobre la expresión de p21^{Cip1}.

La fig. 5D es una gráfica de barras que ilustra la toma de [³H] timidina mediante SMC aislado de ratones deficientes tipo silvestre (ts) y p21^{Cip1} (p21^{-/-}) en la presencia (8Br-cGMP; 8Br-cGMP(p21^{-/-})) y ausencia (Aire) de análogo de cGMP 8Br-cGMP.

La fig. 5E es una foto compuesta de una transferencia Western que ilustra el efecto de CO (250 ppm) sobre la expresión de p38 MAPK fosforilado (p-p38), ATF-2 (p-ATF-2), JNK (p-JNK) y ERK (p-ERK) comparado con el p38 MAPK total, ATF-2, JNK, y ERK en SMC.

La fig. 5F es una gráfica de barras que ilustra la toma de [³H] timidina mediante SMC de ratón expuesto al aire (Aire) 250 ppm CO (CO) y CO más el inhibidor p38 MAPK SB203580 (CO/SB).

La fig. 5G es una foto compuesta de una transferencia Western que ilustra el efecto del aire (Aire), CO (250

ppm; (CO)), SB203580, y DMSO sobre la expresión de p21^{Cip1} en SMC de ratón.

La fig. 6A es una foto compuesta de una transferencia Western que ilustra el efecto de 8-Br-cGMP sobre la expresión de p38 MAPK en SMC de ratón.

La fig. 6B es una gráfica de barras que ilustra la toma de [³H] timidina mediante SMC de ratón expuesto a aire (Aire), CO más 8-Br-cGMP (8-Br-cGMP), y CO más 8-Br-cGMP más SB203580 (8-Br-cGMP + SB203580).

La fig. 7A es una gráfica de citometría de flujo que ilustra el efecto del aire (Aire) y CO (250 ppm) expuestos al ciclo de célula de SMC aórtico de rata.

La fig. 7B es una gráfica de línea que ilustra el efecto del aire (□) y CO (■) sobre la proliferación de SMC.

La fig. 8 es una gráfica de barras que ilustra la toma de [³H] timidina por el SMC de ratón tipo silvestre (ts), p21^{-/-}, y p53^{-/-} expuesto a aire (barras grises) o a CO (250 ppm; barras negras) durante 24 horas.

La fig. 9A es una fotomicrografía (ampliación 20X) de una sección de la arteria carótida de un ratón tipo silvestre 14 días después de daño con alambre. El animal objeto fue expuesto a aire ambiente durante 1 h antes del daño con alambre.

La fig. 9B es una fotomicrografía (ampliación 20X) de una sección de la arteria carótida proveniente de un ratón tipo silvestre 14 días después del daño con alambre. El animal objeto fue expuesto a CO (250 ppm) durante 1 h antes del daño con alambre.

La fig. 9C es una fotomicrografía (ampliación 20X) de una sección de la arteria carótida proveniente de un ratón p21^{-/-} 14 días después del daño con alambre. El animal objeto fue expuesto a aire ambiente durante 1 h antes del daño con alambre.

La fig. 9D es una fotomicrografía (ampliación 20X) de una sección de la arteria carótida proveniente de un ratón p21^{-/-} 14 días después de ser sometido a daño con alambre. El animal objeto fue expuesto a CO (250 ppm) durante 1 h antes del daño con alambre.

La fig. 9E es una gráfica de barras que ilustra las áreas relativas medias (en unidades arbitrarias) de los íntimos de las arterias carótidas dañadas con alambre provenientes de ratones tipo silvestre (ts) y p21^{-/-} expuestos a aire (Control) o 250 ppm CO (CO).

La fig. 9F es una gráfica de barras que ilustra las áreas relativas medias (en unidades arbitrarias) de la media de arterias carótidas dañadas con alambre provenientes de ratones tipo silvestre (ts) y p21^{-/-} expuestos a aire (Control) o 250 ppm CO (CO).

La fig. 9G es una gráfica de barras que ilustra el índice del área íntima/media de las arterias carótidas dañadas con alambre provenientes de ratones tipo silvestre (ts) y p21^{-/-} expuestos a aire (Control) o 250 ppm CO (CO).

La fig. 10 es una gráfica de barras que ilustra la toma de [³H] timidina por SMC derivado de ratón p21^{-/-} tratado con aire (Aire), CO (250 ppm; CO) y CO más SB203580 (CO/SB).

La fig. 11A es una gráfica de barras que ilustra la toma de [³H] timidina por SMC derivado de ratón deficiente

tipo silvestre (ts), $enos^{-/-}$, y $inos^{-/-}$ expuesto a aire (Aire) o CO (250 ppm; CO).

La fig. 11B es una gráfica de barras que ilustra las áreas íntima y media, y los índices de área íntima/media, de las arterias carótidas provenientes de ratas Sprague-Dawley expuestas a aire ambiente (barras blancas) o NO (barras negras; 1 hora; 250 ppm) antes de daño con globo de la arteria carótida.

La fig. 12A es una fotografía compuesta de una transferencia Western que ilustra la expresión de PAI-1 en SMC tratado con y sin suero (Suero y Sin Suero, respectivamente) y con y sin CO (Aire y CO, respectivamente) durante 24 o 48 horas. Hígado = lisados de célula completa provenientes de homogenatos de hígado de rata tratados con endotoxina (LPS). Hígado + LPS = lisados de célula completa provenientes de homogenatos de hígado de rata tratados con endotoxina (LPS). TNF- α = control en donde TNF- α se agregó al cultivo de células para estimular la expresión de PAI-1.

La fig. 12B es una fotografía de una transferencia Western que ilustra la expresión de PAI-1 en aortas no transplantadas (control), transplantadas (Alo. + Aire), y transplantadas tratadas con CO (Alo. + CO) 56 días después del trasplante.

La fig. 12C es una fotografía de un gel de poliacrilamida teñido con azul Commassie utilizado para transferencia Western de la fig. 12B, que ilustra la expresión de PAI en aortas no transplantadas (control), transplantadas (Alo. + Aire), y transplantadas tratadas con CO (Alo. + CO) 56 días después del trasplante.

Las figs. 13A-13B ilustra un ejemplo de un dispositivo de angioplastia de globo capaz de administrar CO a un paciente durante un procedimiento de angioplastia, en varias etapas de la operación.

Las figs. 13C-13D ilustran modalidades alternativas del dispositivo de angioplastia de globo.

Las figs. 14A^a-14B ilustran un ejemplo de un stent capaz de administrar CO a un paciente durante un procedimiento de angioplastia, en varias etapas de la operación.

La fig. 15 ilustra un ejemplo del dispositivo de angioplastia de globo con múltiples globos diseñados para administrar CO a un paciente durante un procedimiento de angioplastia.

La fig. 16 ilustra un ejemplo de un dispositivo de aterectomía capaz de administrar CO a un paciente durante un procedimiento de angioplastia.

Descripción Detallada

El término "monóxido de carbono" (o "CO") como se utiliza aquí describe monóxido de carbono molecular en su estado gaseoso, comprimido en forma líquida, o disuelto en solución acuosa. El término "composición de monóxido de carbono" o "composición farmacéutica que comprende monóxido de carbono" se utiliza a lo largo de la especificación para describir una composición líquida o gaseosa que contiene monóxido de carbono que se puede administrar a un paciente y/o un vaso sanguíneo, por ejemplo, un paciente (o vaso sanguíneo) sometido a angioplastia, cirugía de bypass, transplante, o cualquier otro procedimiento que pueda/resultará en hiperplasia

íntima y/o arterosclerosis. El practicante hábil reconocerá que forma de composición farmacéutica, por ejemplo, forma gaseosa, líquida o ambas gaseosa y líquida, es preferida para una aplicación dada.

El término "hiperplasia íntima" es un término reconocido en el arte y que se utiliza aquí para referirse a la proliferación de células, por ejemplo, células musculares de fibra lisa, dentro de la íntima de un vaso sanguíneo. El practicante hábil apreciará que la hiperplasia íntima puede ser originada por cualquier número de factores, por ejemplo, mecánico, químico y/o daño inmunológico a la íntima. La hiperplasia íntima puede a menudo ser observada en pacientes, por ejemplo, luego de angioplastia de globo o cirugía vascular, por ejemplo, cirugía vascular que involucra injertos de vena (por ejemplo, cirugía de transplantes). "Arterosclerosis", "lesión arterioesclerótica", "placa arterioesclerótica" y "condición arterioesclerótica" son también términos reconocidos en la técnica, y son utilizadas aquí para describir el engrosamiento y endurecimiento de la pared arterial. El término "vasculatura" como se utiliza aquí se refiere al sistema vascular (o cualquier parte de éste) de un cuerpo humano o no humano, y que incluya

vasos sanguíneos, por ejemplo, arterias, arteriolas, venas, vénulas, y capilares. El término "restenosis" se refiere al re-angostamiento de una arteria luego de angioplastia.

El término "angioplastia" es un término reconocido en el arte y que se refiere a cualquier procedimiento, simple o en combinación, que involucra la remodelación de un vaso sanguíneo, por ejemplo, dilatar una región estenótica en la vasculatura de un paciente para reestablecer el flujo sanguíneo adecuado más allá de la estenosis. Tal procedimiento incluye la angioplastia transluminal percutánea (PTA), que emplea un catéter que tiene un extremo distante expandible, es decir, un globo inflable (conocido como angioplastia de globo); angioplastia láser; aterectomía de extracción; aterectomía direccional; aterectomía rotacional; trabajos con stent; y otros procedimientos para remodelar un vaso sanguíneo, por ejemplo, una arteria.

El término "cantidad efectiva" y "efectiva para tratar", como se utiliza aquí, se refiere a una cantidad o a una concentración de monóxido de carbono utilizado durante un periodo de tiempo (que incluye administración aguda o

crónica y administración periódica o continua) que es efectiva dentro del contexto de su administración para originar un efecto pretendido o el resultado fisiológico. Las cantidades efectivas de monóxido de carbono para uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, cantidades que evitan o reducen la hiperplasia íntima luego de un procedimiento, por ejemplo, angioplastia. Las cantidades efectivas de monóxido de carbono también incluyen cantidades que evitan o reducen la arterosclerosis en un paciente, por ejemplo, un paciente de transplante. El término "tratar o tratamiento" se utiliza aquí para describir el retraso de la arremetida de, inhibición, o alivio de los efectos de detrimento de una condición, por ejemplo, hiperplasia íntima y/o arterosclerosis.

Para los gases, las cantidades efectivas de CO generalmente caen dentro del rango de aproximadamente 0,0000001% a aproximadamente 0,3% en peso, por ejemplo, 0,0001% a aproximadamente 0,25% en peso, preferiblemente al menos aproximadamente 0,001%, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,005%, 0,010%, 0,02%, 0,025%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,08%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,22%, o 0,24% en peso de CO. Los rangos preferidos de CO incluyen

0,002% a aproximadamente 0,24%, aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,22%, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,20%, y aproximadamente 0,02% a aproximadamente 0,1% en peso. Para las soluciones líquidas de CO, las cantidades efectivas generalmente caen dentro del rango de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,0044 g de CO/100 g líquido, por ejemplo, al menos aproximadamente 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 rangos preferidos incluyen, por ejemplo, aproximadamente 0,0010 a aproximadamente 0,0030 g de CO/100 g de líquido, aproximadamente 0,0015 a aproximadamente 0,0026 g de CO/100 g de líquido, o aproximadamente 0,0018 a aproximadamente 0,0024 g de CO/100 g de líquido. El practicante habilidoso apreciará que las cantidades por fuera de estos rangos se pueden utilizar dependiendo de la aplicación.

El término "paciente" se utiliza a lo largo de la especificación para describir un animal, humano o no humano, a quien el tratamiento de acuerdo con los métodos de la presente invención se suministra. Las aplicaciones

A

veterinarias y no veterinarias se contemplan en la presente invención. El término incluye pero no está limitada a mamíferos, por ejemplo, humanos, otros primates, cerdos, roedores tales como ratones y ratas, conejos, cerdos de guinea, hámsteres, vacas, caballos, gatos, perros, ovejas y cabras.

El término "transplante" se utiliza a lo largo de la especificación como un término general para describir el proceso de transferir un órgano o tejido a un paciente. El término "transplante" se define en la técnica como la transferencia de tejidos o células vivas de un donador a un receptor, con la intención de mantener la integridad funcional del tejido o las células transplantadas en el receptor (ver, por ejemplo, *The Merck Manual*, Berkow, Fletcher, y Beers, Eds., Merck Research Laboratories, Rahway, N.J., 1992). El término incluye todas las categorías de transplante conocidas en la técnica. Los transplantes están categorizados por sitio y relación genérica entre el donador y el receptor. El término incluye, por ejemplo, autotransplante, (remoción y transferencia de células o tejidos provenientes de un sitio de un paciente al mismo o a otro sitio en el mismo paciente), alotransplante (transplante entre miembros de

la misma especie), y xenotransplante (transplante entre miembros de diferente especie).

El término "donador" o "paciente donador" como se utiliza aquí se refiere a un animal (humano o no humano) de quien se puede obtener un órgano o un tejido para los propósitos del transplante a un paciente receptor. El término "receptor" o "paciente receptor" se refiere a un animal (humano o no humano) dentro del cual puede ser transferido un órgano o un tejido.

El término "rechazo de órgano", "rechazo de transplante" y "rechazo" son reconocidos en la técnica y se utilizan a lo largo de la especificación como términos generales para describir el proceso de rechazo de un órgano, tejidos, o células en un receptor. Incluido dentro de la definición están, por ejemplo, tres patrones principales de rechazo que están típicamente identificados en la práctica clínica: rechazo hiperagudo, rechazo agudo, y rechazo crónico (ver, por ejemplo, *Oxford Textbook of Surgery*, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)).

El término "órgano(s)" se utiliza a lo largo de la especificación como un término general para describir cualquier parte o miembro anatómico que tiene una función específica en el animal. Adicionalmente incluido dentro del significado de este término están las porciones sustanciales de órganos, por ejemplo, los tejidos cohesivos obtenidos de un órgano. Tales órganos incluyen pero no están limitados a riñón, hígado, corazón, intestino, por ejemplo, intestino grueso o delgado, páncreas, y pulmones. También incluida en esta definición se encuentra la vasculatura, por ejemplo, venas y arterias, y huesos.

Los individuos considerados en riesgo para el desarrollo de hiperplasia íntima o arterosclerosis se pueden beneficiar particularmente de las invenciones, primariamente porque el tratamiento profiláctico con CO se puede administrar antes de que el procedimiento se desarrolle en un paciente o antes de que haya cualquier evidencia de una hiperplasia íntima o placa arterioesclerótica. Los individuos "en riesgo" incluyen, por ejemplo, pacientes que tienen o tendrán cualquier tipo de daño mecánico, químico y/o inmunológico a la íntima, por ejemplo, pacientes que sufrirán o han sufrido

cirugía de trasplante y/o angioplastia. Los practicantes habilitados apreciarán que un paciente puede ser determinado como en riesgo para hiperplasia íntima o arterosclerosis mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante el diagnóstico de un médico.

Preparación de Composiciones Gaseosas

Una composición de CO puede ser una composición gaseosa. El gas comprimido o presurizado útil en los métodos de la invención puede ser obtenido de cualquier fuente comercial, y en cualquier tipo de recipiente apropiado para el almacenamiento de gas comprimido. Por ejemplo, los gases comprimidos o presurizados se pueden obtener de cualquier fuente que suministre gases comprimidos, tales como oxígeno para uso médico. El término gas "de grado médico", como se utiliza aquí, se refiere a un gas adecuado para la administración a pacientes como se definió aquí. El gas presurizado que incluye CO utilizado en los métodos de la presente invención se puede suministrar de tal forma que todos los gases de la composición final deseada (por ejemplo, CO, He, NO, CO₂, O₂, N₂) están en el mismo recipiente, excepto que NO y O₂

no pueden ser almacenados juntos. Opcionalmente, los métodos de la presente invención se pueden desarrollar utilizando recipientes múltiples que contienen gases individuales. Por ejemplo, un recipiente simple se puede suministrar que contenga monóxido de carbono, con o sin otros gases, cuyos contenidos pueden ser opcionalmente mezclados 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 estos.

Las composiciones gaseosas administradas a un paciente de acuerdo con la presente invención contienen típicamente 0% a aproximadamente 79% en peso de nitrógeno, aproximadamente 21% a aproximadamente 100% en peso de oxígeno y aproximadamente 0,0000001% a aproximadamente 0,3% en peso (que corresponde a aproximadamente 1 ppb o 0,001 ppm a aproximadamente 3000 ppm) de CO. Preferiblemente, la cantidad de nitrógeno en la composición gaseosa es aproximadamente 79% en peso, la cantidad de oxígeno es aproximadamente 21% en peso y la cantidad de CO es aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 0,25% en peso. La cantidad de CO es preferiblemente al menos aproximadamente 0,001%, por

B2

ejemplo, al menos aproximadamente 0,005%, 0,01%, 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 rangos preferidos de CO incluyen 0,005% a aproximadamente 0,24%, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,22%, aproximadamente 0,015% a aproximadamente 0,20%, y aproximadamente 0,025% a aproximadamente 0,1% en peso. Se nota que las composiciones de CO gaseosas que tienen concentraciones de CO mayores que 0,3% (tales como 1% o más) se pueden utilizar para periodos cortos (por ejemplo, una o pocas aspiraciones), dependiendo de la aplicación.

Una composición de CO gaseosa se puede utilizar para crear una atmósfera que comprende gas CO. Una atmósfera que incluye niveles apropiados de gas CO se puede crear, por ejemplo, al suministrar un recipiente que contiene un gas presurizado que comprende el gas CO, y que libera el gas presurizado del recipiente a una cámara o espacio para formar una atmósfera que incluye el gas CO dentro de la cámara o espacio. Alternativamente, los gases se pueden liberar en un aparato que culmina en una máscara de respiración o un tubo de respiración, creando de esta manera una atmósfera que comprende gas CO en la máscara de respiración o un tubo de respiración, asegurando que

el paciente es la única persona en la habitación expuesta a niveles significativos de CO.

Los niveles de CO en la atmósfera se pueden medir o monitorear utilizando cualquier método conocido en el arte. Tales métodos incluyen detección electroquímica, cromatografía de gas, conteo de radioisótopos, absorción infrarroja, colorimetría, y métodos electroquímicos basados en membranas selectivas (ver, por ejemplo, Sunderman et al., Clin. Chem. 28: 2026-2032, 1982; Ingi et al., Neuron 16: 835-842, 1996). Las sub-partes por millón de niveles de CO se pueden detectar mediante, por ejemplo, cromatografía de gas y conteo de radioisótopos. Adicionalmente, es conocido en la técnica que los niveles de CO en el rango de sub-ppm se pueden medir en tejido biológico mediante un sensor de gas infrarrojo medio (ver, por ejemplo, Morimoto et al., Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 280: H482-H488, 2001). Los sensores de CO y dispositivos de detección de gas están ampliamente disponibles de muchas fuentes comerciales.

Preparación de las Composiciones Líquidas

et

Una composición farmacéutica que comprende CO puede ser una composición líquida. Un líquido puede ser hecho en una composición farmacéutica que comprende CO mediante cualquier método conocido en la técnica para originar que los gases se disuelvan en los líquidos. Por ejemplo, el líquido se puede ubicar en la así llamada "incubadora de CO₂" y expuesta a un flujo continuo de CO, preferiblemente balanceada con dióxido de carbono, hasta que se alcance la concentración deseada de CO en el líquido. Como otro ejemplo, el gas CO se puede "burbujear" directamente dentro del líquido hasta que se alcance la concentración deseada de CO en el líquido. La cantidad de CO que se puede disolver en cualquier solución acuosa dada se incrementa con la disminución de la temperatura. Aún otro ejemplo, un líquido apropiado puede ser pasado a través de un tubo que permita la difusión de gas, donde el tubo corre a través de una atmósfera que comprende CO (por ejemplo, utilizando un dispositivo tal como un oxigenador de membrana extracorpóreo). El CO se difunde en el líquido para crear una composición de CO líquida.

Es probablemente que tal composición líquida destinada a ser introducida dentro de un animal vivo estará en o

aproximadamente en 37° C en el momento en que es introducida dentro del animal.

El líquido puede ser cualquier líquido conocido por aquellos expertos en la técnica por ser adecuado para la administración a pacientes (ver, por ejemplo, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). En general, el líquido será una solución acuosa. Ejemplos de soluciones incluyen solución Salina Amortiguada de Fosfato (PBS), Celsior™, Perfadex™, solución Collins, solución de citrato, y solución de la Universidad de Wisconsin (UW) (Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)). En una modalidad de la presente invención, el líquido es solución de Ringer, por ejemplo, Solución de Ringer lactada, o cualquier otro líquido que se pueda usar mediante infusión en un paciente. En otra modalidad, el líquido incluye sangre, por ejemplo, sangre completa.

Cualquier líquido adecuado se puede saturar a una concentración determinada de CO por vía difusores de gas. Alternativamente, se pueden utilizar soluciones pre-elaboradas que han tenido control de calidad que

contengan niveles determinados de CO. El control preciso de la dosis se puede lograr por vía de las mediciones con un gas permeable, una membrana impermeable a líquido conectada a un analizador de CO. Las soluciones se pueden saturar a concentraciones efectivas deseadas y mantenidas en estos niveles.

Tratamiento de Pacientes y Vasculatura con Composiciones de CO

La presente invención contempla administrar composiciones de CO a pacientes y/o porciones de su vasculatura antes, durante, y/o después de que el paciente sufra angioplastia, cirugía de transplante, cirugía vascular, o cualquier otro procedimiento que origine, incrementa el riesgo de hiperplasia íntima, restenosis y/o arterosclerosis en el paciente. Un paciente puede ser tratado sistémicamente con composiciones de CO gaseosas y/o líquidas mediante cualquier método conocido en la técnica para administrar gases y/o líquidos a los pacientes, por ejemplo, mediante inhalación del gas y administración intravenosa o intraarterial del líquido. Con tratamiento sistémico, sustancialmente toda la vasculatura del paciente puede ser tratada con CO. Una

porción de la vasculatura del paciente, por ejemplo, una vena o arteria específica, puede ser tratada mediante la administración de una composición de CO gaseosa o líquida directamente a la vena o la arteria. Aunque la presente invención no está limitada a ningún modo particular para administrar las composiciones de CO a los pacientes y/o las porciones de su vasculatura, varios tratamientos son discutidos en detalle adelante.

Suministro Sistémico de CO Gaseoso

Las composiciones de CO gaseoso se pueden suministrar sistémicamente en el paciente, por ejemplo, un paciente que sufre de o está en riesgo de hiperplasia íntima (por ejemplo, restenosis y/o arterosclerosis). Las composiciones de CO gaseoso son típicamente administradas mediante la inhalación a través de la boca o pasajes nasales a los pulmones, donde el CO es fácilmente absorbido en el torrente sanguíneo del paciente. La concentración del compuesto activo (CO) utilizado en la composición gaseosa terapéutica dependerá del índice de absorción, distribución, inactivación, y excreción (generalmente, a través de la respiración) del CO así como también otros factores conocidos por aquellos



expertos en la técnica. Debe ser adicionalmente entendido que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosis específicos deben ser ajustados durante el tiempo de acuerdo a la necesidad individual y el juzgamiento profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de concentración establecidos aquí sean ejemplos solamente y que no están destinados a limitar el alcance de la práctica de la composición reivindicada. La administración aguda, sub-aguda y crónica de CO se contempla mediante la presente invención. El CO se puede suministrar al paciente durante un tiempo (incluyendo indefinidamente) suficiente para tratar la condición y ejercer el efecto farmacológico o biológico pretendido.

Los siguientes ejemplos de algunos métodos y dispositivos pueden ser utilizados para administrar composición de CO gaseoso a pacientes.

Ventiladores

El CO grado médico (las concentraciones pueden variar) puede ser comprado mezclado con aire u otro gas que contenga oxígeno en un tanque estándar de gas comprimido

(por ejemplo, 21% de O_2 , 79% de N_2). Este no es reactivo, y las concentraciones que se requieren para los métodos de la presente invención están bien por debajo del rango combustible (10% en el aire). En un establecimiento hospitalario, el gas presumiblemente será suministrado al sitio de cama donde este se mezclará con oxígeno o aire del sitio en un mezclador a una concentración deseada en ppm (partes por millón). El paciente inhalará la mezcla de gas a través de un ventilador, el cual se ajustará a un índice de flujo con base en la comodidad y necesidades del paciente. Esto se determina mediante gráficas pulmonares (es decir, índice respiratorio, volúmenes periódicos etc.). El o los mecanismos de falla-seguridad para evitar que el paciente reciba innecesariamente más de las cantidades deseadas de monóxido de carbono se pueden diseñar dentro del sistema de suministro. El nivel de CO del paciente se puede monitorear al estudiar (1) la carboxihemoglobina (COHb), que se puede medir en la sangre venosa, y (2) el CO exhalado recolectado de un puerto lateral del ventilador. La exposición a CO se puede ajustar con base en el estado de salud del paciente y sobre la base de los marcadores. Si es necesario, el CO se puede lavar del paciente al conmutar al 100% de inhalación de O_2 . El CO no es metabolizado; así, lo que

se inhala será finalmente exhalado excepto cantidades muy pequeñas que son convertidas a CO_2 . El CO se puede mezclar con cualquier nivel de O_2 para proporcionar suministro terapéutico de CO sin condiciones hipóxicas consecuenciales.

Máscara preparada de cara

Una mezcla de gas que contiene CO se prepara como anteriormente para permitir la inhalación pasiva por el paciente utilizando una máscara de cara o pabellón. La concentración inhalada se puede cambiar y se puede lavar mediante una simple conmutación al 100% de O_2 . El monitoreo de los niveles de CO ocurrirá en o cerca de la máscara o pabellón con un mecanismo de falla-seguridad que evitará que sea inhalada una concentración demasiado alta de CO.

Inhalador portátil

El CO comprimido se puede empacar en un dispositivo inhalador portátil e inhalar en una dosis medida, por ejemplo, para permitir el tratamiento intermitente de un receptor que no esté en un establecimiento hospitalario.

Las diferentes concentraciones de CO podrían ser empacadas en recipientes. El dispositivo podría ser tan simple como un tanque pequeño (por ejemplo, por debajo de 5 kg) de CO apropiadamente diluido con una válvula de encendido-apagado y un tubo desde el cual el paciente toma un poco de CO de acuerdo con el régimen estándar o según la necesite.

Pulmón Artificial Intravenoso

Un pulmón artificial (o dispositivo de catéter para intercambio de gas en la sangre) diseñado para el suministro de O₂ y la remoción de CO₂ se puede utilizar para el suministro de CO. El catéter, cuando se implanta, reside en una de las venas largas y sería capaz de suministrar CO a las concentraciones deseadas para suministro sistémico o en un sitio local. El suministro puede ser un suministro local de una concentración alta de CO durante un corto periodo de tiempo en el sitio de un procedimiento angioplástico (esta alta concentración rápidamente sería diluida en el torrente sanguíneo), o una exposición relativamente mayor a una concentración inferior de CO. Los ejemplos de pulmones artificiales son descritos, por ejemplo, en Alter et al., Artif. Organs



18(11): 806-812 (1994); y Golob et al., ASAIO J., 47(5): 432-437 (2001). Como se utiliza aquí el término "dispositivo de suministro de monóxido de carbono intravaso" se refiere a un dispositivo de catéter, por ejemplo, un pulmón artificial (o una versión modificada de éste) capaz de residir en un vaso sanguíneo durante periodos extendidos de tiempo (incluyendo indefinidamente) y suministrar CO al paciente sistémicamente y/o localmente.

Cámara Normobárica

En ciertos casos, sería deseable exponer el paciente completo a CO. El paciente estaría dentro de una cámara hermética que sería fluida con CO a un nivel que no implique peligro para el paciente, o a un nivel que posea un riesgo aceptable sin el riesgo de que sean espectadores. Después de completar la exposición, la cámara podría ser fluida con aire (por ejemplo, 21% de O₂, 79% de N₂) y las muestras se podrían analizar mediante analizadores de CO para asegurar que no permanece CO antes de permitirle al paciente salir al sistema de exposición.

Suministro Sistémico de Composición Líquida de CO

La presente invención contempla además que las composiciones de CO se puedan crear para el suministro sistémico a un paciente, por ejemplo, mediante infusión intravenosa o intraarterial al paciente. Por ejemplo, las composiciones de CO líquidas, tal como la Solución de Ringer saturada con CO, puede ser infundida dentro del paciente antes, durante, y/o después de un procedimiento angioplástico o de transplante. Alternativamente o adicionalmente, la sangre total parcialmente o completamente saturada de CO puede ser infundida dentro del paciente. La presente invención también contempla que los agentes capaces de suministro de dosis de gas o líquidos de CO puedan ser utilizados (por ejemplo, gomas de liberación de CO, cremas, ungüentos o parches).

Suministro de CO a Porciones de la Vasculatura**Tratamiento In Situ**

Alternativamente o adicionalmente al tratamiento sistémico, las composiciones de monóxido de carbono pueden ser aplicadas directamente a cualquier porción de

94

una vasculatura de paciente que tenga o esté en riesgo de hiperplasia íntima y/o arterosclerosis. Una composición gaseosa puede ser aplicada directamente a una porción de una vasculatura del paciente, por ejemplo, a una arteria afectada, mediante cualquier método conocido en la técnica para administrar gases dentro de la vasculatura de los pacientes. Por ejemplo, el CO puede ser suministrado a una arteria antes, durante, y/o después de la angioplastia (por ejemplo, angioplastia de globo) o procedimiento quirúrgico (por ejemplo, transplantes) a través de un dispositivo similar al pulmón artificial intravenoso descrito anteriormente. Otro ejemplo, cualquier dispositivo utilizado para desarrollar un procedimiento angioplástico se puede modificar para administrar CO a la vasculatura del paciente a través del instrumento mientras está siendo desarrollada la angioplastia. Tales dispositivos son discutidos con detalle adicional adelante.

Las composiciones de CO líquidas pueden ser aplicadas directamente a una porción de la vasculatura del paciente. Las composiciones de CO líquidas se pueden administrar mediante cualquier método conocido en la técnica para administrar líquidos a la vasculatura de un paciente. Por

ejemplo, una composición de CO líquido se puede administrar a una vena específica (por ejemplo, mediante inyección intravenosa) o arteria (por ejemplo, mediante inyección intraarterial) antes, durante, y/o después de un procedimiento. Como otro ejemplo, como se describió anteriormente, cualquier instrumento utilizado en procedimientos angioplásticos puede ser modificado para administrar a una vena o arteria una composición líquida de CO aunque esté siendo desarrollado un procedimiento angioplástico.

Tratamiento Ex Vivo

La presente invención contempla adicionalmente el uso de composiciones de CO para evitar o reducir la hiperplasia íntima y/o la arteriosclerosis en vasculatura transplantada, por ejemplo, vasos sanguíneos individuales (por ejemplo, vena o trasplante aórtico) o vasos sanguíneos que permanezcan asociados con un órgano transplantable (por ejemplo, riñón, hígado, corazón, o pulmón). Alternativamente, o adicionalmente a la exposición *in situ* descrita anteriormente, la exposición de la vasculatura a las composiciones de CO puede ocurrir *ex vivo*. Por ejemplo, antes de transplantar vasos

sanguíneos individuales o un órgano con su vasculatura asociada a un paciente receptor, la vasculatura puede ser expuesta a una atmósfera que comprenda gas de monóxido de carbono, a una composición de monóxido de carbono líquido, por ejemplo, un líquido perfundido, una solución de almacenamiento, o una solución de lavado que tenga monóxido de carbono disuelto en éste, o ambos.

La exposición de la vasculatura a las composiciones gaseosas ex vivo se puede desarrollar en cualquier cámara o área adecuada para crear una atmósfera que incluye niveles apropiados de gas CO. Tales cámaras incluyen, por ejemplo, incubadoras y cámaras construidas para el propósito de acomodar un órgano en una solución de preservación. Como otro ejemplo, una cámara apropiada puede ser una cámara en donde solamente los gases alimentados dentro de la cámara están presentes en la atmósfera interna, de tal forma que la concentración del monóxido de carbono se pueda establecer y mantener a una concentración y pureza dadas, por ejemplo, cuando la cámara es hermética. Por ejemplo, una incubadora con CO₂ se puede utilizar para exponer la vasculatura a una composición de monóxido de carbono, en donde el gas de

monóxido de carbono es suministrado en un flujo continuo desde un vaso que contenga el gas.

La exposición de la vasculatura a las composiciones de CO líquidas ex vivo se pueden desarrollar en cualquier cámara o espacio que tenga el volumen suficiente para sumergir la vasculatura, completa o parcialmente, en una composición líquida de CO. La vasculatura puede ser expuesta a tales composiciones al ubicar la vasculatura en cualquier recipiente adecuado, y hacer que la composición líquida de CO "lave sobre" o a través de la vasculatura, de tal forma que la vasculatura sea expuesta a un flujo continuo de la composición de CO. Como aún otro ejemplo, la vasculatura puede ser sumergida en un medio o solución que no incluya CO, y esté ubicada en una cámara tal que el medio o la solución puedan ser hechas en una composición de CO por vía de la exposición a una atmósfera que contenga CO como se describió aquí. Como aún otro ejemplo, la vasculatura puede ser sumergida en un líquido que no incluya CO, y el CO puede ser "burbujeado" dentro del líquido.

Dispositivos

La presente invención contempla administrar CO a la vasculatura de un paciente utilizando un dispositivo que es capaz de ser utilizado tanto para desarrollar un procedimiento de angioplastia como administrar CO a la vasculatura del paciente. El CO puede ser administrado a través y/o mediante el instrumento, o mediante un recubrimiento de suministro de CO sobre éste, mientras está siendo desarrollada la angioplastia (por ejemplo, inmediatamente antes, durante, y/o inmediatamente después de que se desarrolla la angioplastia). Tales dispositivos incluyen dispositivos utilizados para angioplastia de globo ("dispositivos de angioplastia de globo"), angioplastia láser ("dispositivos de angioplastia láser"), y dispositivos utilizados para aterectomía ("dispositivos de aterectomía"), por ejemplo, aterectomía de extracción; aterectomía direccional; aterectomía rotacional; y stents. Como se utiliza aquí, cualquier "dispositivo de angioplastia" es cualquier dispositivo que se puede utilizar para desarrollar la angioplastia a un paciente.

En relación a las figs. 13A a 13D, los ejemplos de un dispositivo de catéter con un miembro inflable (por

ejemplo, un globo) diseñado para administrar CO (por ejemplo, una composición de CO líquido o gaseoso) a un paciente durante la angioplastia son mostrados. En la fig. 13^a, el catéter 1303 es mostrado en posición dentro de la región estenótica 1302 del vaso sanguíneo 1301. El miembro inflable 1304 es mostrado en el estado inflable. El miembro inflable incluye al menos una abertura 1305, a través de la cual el CO puede ser administrado al vaso durante el procedimiento. El CO puede ser suministrado a un miembro inflable (por ejemplo, para inflar el miembro inflable) proveniente de un reservorio (no mostrado) que contiene CO, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende monóxido de carbono. EL dispositivo puede ser opcionalmente guiado al sitio pretendido mediante un alambre guía 1306.

En la fig. 13B, el catéter 1303 es mostrado con el miembro inflable 1304 en un estado inflado. El CO puede ser administrado a través de la o las aperturas 1305 al vaso 1301. En una modalidad, el miembro inflable es inflado con CO o una mezcla de gases que incluyen CO, de tal manera que una cantidad de CO suficiente para tratar la hiperplasia íntima fluye hacia fuera de la o las aberturas 1305 y es suministrado al vaso sanguíneo 1301

durante y/o después del inflamiento del miembro inflable 1304.

La fig. 13C ilustra otra modalidad del dispositivo de catéter, en donde el catéter 1303 incluye al menos un lumen 1307 para el suministro de CO al vaso sanguíneo 1301 durante el procedimiento de angioplastia. Aún otra modalidad es mostrada en la fig. 13D, en donde el lumen central 1307 suministra CO a una pluralidad de sitios en el vaso sanguíneo 1301. Un reservorio que contiene CO (no mostrado) puede ser conectado al lumen 1307, de tal forma que la dosis de CO es administrada desde el reservorio a través del lumen 1307 al vaso sanguíneo.

Alternativamente o adicionalmente, el miembro inflable 1304 puede ser recubierto con un recubrimiento de liberación de CO, por ejemplo, un hidrogel que contiene una composición de CO, de tal forma que el CO es suministrado a la región estenótica 1302, por ejemplo, luego del contacto con el miembro inflable 1304.

Con referencia a las figs. 14A a 14B, se muestra un ejemplo de un stent diseñado para administrar CO a un paciente. El término "stent" es un término conocido en el

arte y se refiere a un tubo de malla, típicamente hecho de alambre, utilizado para mantener el vaso sanguíneo en una posición abierta, por ejemplo, un vaso sanguíneo que haya sido recientemente remodelado durante angioplastia. En la fig. 14A, un stent 1402 es mostrado en un estado colapsado. El stent cubre un catéter de globo 1404, mostrado en la fig. 14A en un estado desinflado. En la fig. 14B, el stent 1402 y el catéter de globo 1404 son mostrados en el estado expandido/inflado. Luego del inflamiento del catéter de globo 1404, el stent 1402 se expande, se asegura en su lugar, y forma un andamio como el mostrado en la fig. 14B, manteniendo de esta manera el vaso sanguíneo en una posición abierta. En una modalidad de la presente invención, el stent 1402 es recubierto con un recubrimiento liberador de CO, por ejemplo, un hidrogel que libera CO, de tal forma que se suministra una cantidad suficiente de CO para tratar la hiperplasia íntima al vaso sanguíneo durante una cantidad de tiempo apropiada, por ejemplo, tanto tiempo como el stent permanezca en su lugar.

En relación a la fig. 15, un catéter 1502 con dos miembros inflables 1504 se muestra. Los miembros inflables 1504 pueden ser utilizados para aislar una

región estenótica 1506, de tal forma que el CO pueda ser administrado a la región estenótica 1506 entre los miembros inflables 1504. El catéter 1502 es insertado dentro del vaso sanguíneo 1508 antes del inflamiento de los miembros inflables 1504. Los miembros inflables 1504 son entonces inflados utilizando un tubo de inflamiento/desinflamiento 1510 guardado dentro del catéter 1502. Los miembros inflables 1504 en su estado inflado obstruyen el flujo de sangre a la región del vaso sanguíneo que sufre el tratamiento. Los conductos de toma 1512 sobre el extremo próximo del catéter le permiten a la sangre fluir dentro y a través del catéter 1502 a los conductos exteriores 1514 localizados en un extremo distante del catéter. Esto le permite a la sangre continuar fluyendo al resto de la arteria 1508 aunque el sitio local de la arteria 1506 es tratado. El CO puede ser introducido a la región aislada a través de un tubo de suministro administrante. Los miembros inflables inflados 1504 suministran un área de tratamiento aislada dentro de la cual los niveles apropiados de CO pueden ser administrados al vaso. Además, las sondas de fibra (no mostradas) se pueden asegurar a la cubierta del catéter 1502, y el sitio se puede exponer a radiación electromagnética a través de las sondas de fibra. El CO

puede ser administrado al sitio antes, durante, y/o después del tratamiento del sitio con radiación electromagnética.

En relación a la fig. 16, se muestra un ejemplo de un instrumento capaz de administrar CO a un paciente aunque desarrollando aterectomía. La aterectomía involucra el corte y la remoción de placa 1602 de las paredes del vaso sanguíneo 1604. El catéter 1606 es ubicado dentro de la arteria 1604. Una guía flexible 1608 es utilizada para mover el instrumento a través de la región de tratamiento 1610. Las hojas de corte rotantes 1612 son entonces extendidas más allá del catéter 1606. Las hojas de corte rotantes 1612 sigue la guía flexible 1608 y cortan a través de la placa 1602. Las hojas de corte rotantes 1612 dirigen las partículas removidas de placa dentro y hacia el extremo próximo del catéter 1606. El CO es entonces introducido a la región tratada a través de un tubo de administración 1614 dentro del catéter 1606. El tubo de administración 1614 se puede asegurar a la guía 1608. El CO se puede administrar a través del catéter 1606 a través de al menos un poro 1616 sobre el extremo distante del tubo de administración 1614. Alternativamente o en adición al CO de suministro a través de un tubo de

122

administración 1614, los conductos 1620 y 1622 se pueden guardar dentro de las paredes de las hojas de corte 1612. El monóxido de carbono puede ser suministrado a través de un conducto de salida 1620. En la conclusión del tratamiento un conducto de entrada 1622 puede remover el CO. El CO se puede administrar antes, durante, y/o después de la remoción de las placas.

Además de lo anterior, el practicante habilidoso apreciará que cualquier dispositivo conocido en el arte para desarrollar procedimientos de angioplastia puede ser modificado para administrar CO a la vasculatura del paciente durante uso. Ejemplos de tales dispositivos pueden ser encontrados, por ejemplo, en la Patente Estadounidense Nos. 6,409,716, 5,985,307, 6,508,787, 5,709,875 y 6,450,989. Adicionalmente, el practicante habilidoso reconocerá que cualquiera de tales dispositivos puede ser recubierto con un agente de suministro de CO, por ejemplo, un aceite, ungüento o hidrogel, capaz de liberar dosis efectivas de CO, de tal forma que el CO sea liberado al vaso sanguíneo luego del contacto con el instrumento/recubrimiento.

105

Uso de Hemoxigenasa-1 y Otros Compuestos

También se contempla por medio de la presente invención la inducción o expresión de hemoxigenasa-1 (HO-1) en conjunto con la administración de monóxido de carbono. El HO-1 se puede suministrar a un paciente al inducir o expresar HO-1 en el paciente, o mediante la administración exógena de HO-1 directamente al paciente. Como se utiliza aquí, el término "inducir o inducido" significa originar la producción incrementada de una proteína, por ejemplo, HO-1, en células aisladas o las células de un tejido, órgano o animal que utilice el gen endógeno propio de las células (por ejemplo, no recombinante) que codifica la proteína.

El HO-1 se puede inducir en un paciente mediante cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, la producción de HO-1 se puede inducir mediante hemina, mediante protoporfirina de hierro, o mediante protoporfirina de cobalto. Una variedad de agentes no-heme que incluyen metales pesados, citoquinas, hormonas, óxido nítrico, COCl_2 , endotoxina y choque de calor son también fuertes inductores de expresión de HO-1 (Otterbein et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.

PC

279: L1029-L1037, 2000; 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). El HO-1 también es altamente inducido mediante una variedad de agentes y condiciones que crean tensión oxidativa, incluyendo peróxido de hidrógeno, consumidores de glutatión, irradiación UV 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 HO-1 en una célula se puede incrementar por vía de transferencia de gen. Como se utiliza aquí, el término "expresar o expresado" significa originar la producción incrementada de una proteína, por ejemplo, HO-1 o ferritina, en células aisladas o en células de un tejido, órgano o animal que utiliza un gen administrado

exógenamente (por ejemplo, un gen recombinante). El HO-1 o la ferritina son preferiblemente de la misma especie (por ejemplo, humano, ratón, rata, etc.) como el receptor, con el fin de minimizar cualquier reacción inmune. La expresión podría ser manejada mediante un promotor constitutivo (por ejemplo, promotores de citomegalovirus) o un promotor específico de tejido (por ejemplo, un promotor de suero de leche para células mamarias o un promotor de albúmina para células de hígado). Un vector de terapia de gen apropiado (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus asociado a adeno(AAV), virus pox (por ejemplo, vaccinia), virus de inmunodeficiencia humana (HIV), el virus diminuto del ratón, virus de la hepatitis B, el virus de la influenza, el Virus-1 del Herpes Simple, y el lentivirus) que codifican el HO-1 o ferritina serían administrados al paciente oralmente, mediante inhalación, o mediante inyección en un sitio apropiado para el tratamiento de hiperplasia íntima. Similarmente, los vectores de plasmido que codifican HO-1 o la apo-ferritina se pueden administrar, por ejemplo, como ADN desnudo, en liposomas, o en micropartículas.

Adicionalmente, la proteína de HO-1 exógena se puede administrar directamente a un paciente mediante cualquier

método conocido en el arte. El HO-1 exógeno se puede administrar directamente además de, o como una alternativa, a la inducción o expresión de HO-1 en un paciente como se describió anteriormente. La proteína de HO-1 se puede suministrar a un paciente, por ejemplo, en liposomas, y/o como una proteína de fusión, por ejemplo, como una proteína de fusión TAT (ver, por ejemplo, Becker-Hapak *et al.*, *Methods* 24: 247-256, 2001).

Alternativamente o en adición, cualquiera de los productos del metabolismo mediante HO-1, por ejemplo, bilirrubina, biliverdina, hierro, y/o ferritina, se pueden administrar a un paciente en conjunto con, o en lugar de, monóxido de carbono con el fin de prevenir o tratar la hiperplasia íntima. Adicionalmente, la presente invención contempla que las moléculas que se unen al hierro diferentes de ferritina, por ejemplo, desferoxamina (DFO), dextrano de hierro, y/o apoferritina, se pueden administrar al paciente. Aún adicionalmente, la presente invención contempla que las enzimas (por ejemplo, la reductasa de biliverdina) que catalizan la ruptura de cualquiera de estos productos puede ser inhibida para crear/mejorar el efecto deseado.

La presente invención contempla que los compuestos que liberan CO en el cuerpo después de administración de los compuestos (por ejemplo, compuestos de liberación de CO), por ejemplo, decacarbonil dimanganeso, dímero de tricarbonildiclororutenio (II), y cloruro de metileno (por ejemplo, a una dosis de entre 400 a 600 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 500 mg/kg) también se pueden utilizar en los métodos de la presente invención, como lo puede la carboxihemoglobina y los sustitutos de hemoglobina donantes de CO, y.

La administración de cualquiera de los anteriores se puede administrar a un paciente de cualquier manera. Por ejemplo, mediante administración oral, intravenosa o intraarterial. Cualquiera de los compuestos anteriores se puede administrar al paciente localmente y/o sistémicamente, en una combinación cualquiera.

La invención se ilustra en parte, mediante los siguientes ejemplos, que no deben ser tomados como limitantes de la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1. CO suprime arterosclerosis. Desarrollo de hiperplasia íntima y proliferación de SMC.

110

Animales. Se utilizaron ratas machos Norway Brown (250-350g) (RT1ⁿ) como donadores de injerto aórtico y ratas machos Lewis (250-350g) (RT1₁) como receptores. Se utilizaron ratas Dawley (400-450g) en el modelo de lesión de globo. Los ratones adultos machos nulos C57BL/6, C57/S129, *p21*^{-/-} y *p53*^{-/-} fueron comprados en el Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones nulos *mk3*^(-/-) se generaron como lo describió Lu et al (EMBO. 18:1845-1857 (1999)). Los ratones *inos*^{-/-} y *enos*^{-/-} fueron criados en la universidad de Pittsburg.

Modelo de Transplante Aórtico. El transplante aórtico se desarrolló como se describió en Shimizu et al. (Nat Med. 7:738-741 (2001)). Brevemente 3 a 4 cm de aorta descendente se recolectó a partir del donador y se implantó entre las arterias renales y la bifurcación aórtica del receptor. Ambos bordes de la aorta abdominal nativa se ligaron.

Modelo de Lesión de Globo. Se llevó a cabo la angioplastia por globo como lo describió Murakami et al. (Atherosclerosis 157: 361-368 (2001)). Brevemente, un catéter de embolectomía arterial 2 Fr. (Baxter, Chicago,

II) se insertó en la arteria carótida común, y se creó una lesión al inflar el globo a 5 atmósferas de presión durante 5 minutos. Las arterias se brotaron y la arteria carótida externa se ligó, asegurando el retorno del flujo sanguíneo a través de las arterias carótidas internas y comunes. La lesión de las paredes del vaso y el análisis y el posterior análisis patológico se hizo en una forma que fue cegada al grupo de tratamiento.

Exposición al CO. Se distribuyó CO a los animales como lo describió Otterbein et al. (Nat Med. 6: 422-428 (2000)). Se expusieron los donadores de injertos y receptores al CO (250 ppm) durante dos días antes de transplante y durante 56 días inmediatamente luego del transplante. En el modelo de lesión de globo, las ratas recibieron cualquiera de los dos, ningún pretratamiento o fueron expuestas a CO 250 ppm) durante una hora antes de la lesión. Luego las ratas operadas fueron alojadas en una habitación con aire ambiente durante dos semanas.

Células. Células primarias de músculo liso de rata y ratón (SMC) se aislaron y se cultivaron como se describió en Laubach et al. (Proc Natl Acad Sci USA 92:10688-9 (1995)). Ratones SMC aislados del HO-1^{-/-} se obtuvieron

como lo describió duches et al. (Nat Med. 7: 693-698 (2001)).

Tratamiento de células y reactivos. Se disolvió en DMSO inhibidor de guanilato ciclasa 1H(1,2,4) oxadiazol(4,3-a)quinoxalin-1 (ODQ; Calbiochem-Novabiochem, SanDiego, CA: 10-100 μ M) y P38 MAPK inhibidor imidazol piridinilo SB203580 (Calbiochem; 5-20 μ M). Se disolvió en agua la sal de sodio 8-bromo-cGMP análogo cGMP (8-Br-cGMP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 10-100 μ M) y el inhibidor PKG (10-100 μ M; Alexis Biochemicals).

Conteo de células e incorporación de timidina [3 H]. Ratas y ratones SMC se aislaron y cultivaron como se describió en Peyton et al. (Blood 99: 4443-4448 (2002)). Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo como se describió en Petkova et al. (J. Biol. Chem. 276: 7932-7936 (2001)). Para estudios de incorporación de la timidina [3 H], a las células no se les suministró suero durante la noche y luego se estimuló con 10% de suero que contiene 5 μ Ci/ml timidina [3 H] (New England Nuclear, Boston MA). La incorporación de timidina [3 H] se midió por

espectroscopia de centelleos y presentada como conteos medios/min/pozo.

Análisis Histomorfométrico. Se recolectaron injertos aórticos y arterias carótidas en 56 y 14 días respectivamente. Los vasos se fijaron, se embebieron, y se seccionaron serialmente (5 μ) en su totalidad. Cada tercer platina fue coloreada con Hematoxolina y Eosina (H&E) para análisis histomorfométrico. En ambos modelos, una o dos imágenes por platina en una resolución de 1520 x 1080 píxeles fueron capturados en una amplificación de 25X con un microscopio Zeiss (Axioskope, Iowa), RT olor SPOT (Diagnostic Instrument, Inc., Saint Joseph, MI) y Windows NT (Compaq Computer) utilizando el software Adobe Photoshop versión 5.5. Las áreas de ocho a diez imágenes capturadas se calcularon utilizando software de imagen digital del número de píxeles que corresponde a esas áreas. Veinticuatro a veintiocho secciones de cada grupo se analizaron estadísticamente con el software SPSS versión 10.

Análisis histomorfométrico de población celular e Inmunocoloración. Los injertos fueron recolectados 56

días después de transplante. Se detectó la población de leucocitos de ratas utilizando un antígeno común leucocito anti - rata (LCA, CD45; OX-1) (Serotec, Harlan Bioproducts, Indianapolis, IN); CD3 (G4.18), CD4 (OX-35), CD8 (OX-8), macrófago (CD68, ED- 1), ICAM-1 (CD54; 1A29), y mayor histocompatibilidad clase II (OX-6) todas se obtuvieron de Becton Dickinson Biosciences, (San Diego, CA). Se obtuvo Anti-PAI-1 mAb de America Diagnostica (Greenwich, CT). Se capturaron ocho a diez imágenes de cada aorta transplantada y analizadas como se detalló anteriormente.

Análisis Western Blot y extractos de células. Se hizo electrofóresis (10-12,5% de geles de poliacrilamida) en extractos de proteína celular y se transfirieron en nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA).

Se detectaron formas totales y fosforiladas de ERK, JNK y p38 MAPK así como también ATF-2 utilizando anticuerpos policlonales de conejo (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA). Anti α -actina (Sigma; St. Louis, MO). Se detectó p21C^{ip1} utilizando anticuerpo policlonal de conejo (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA). Se detectaron

anticuerpos primarios como se describió en métodos complementarios.

Análisis Estadístico. La significancia o diferencia se determinó utilizando análisis de varianza (ANOVA)-

Exposición al Óxido Nítrico (NO). Las ratas fueron expuestas a 350 ppm o 500 ppm de NO durante 1 hora. Gas de NO (1% en N₂) se mezcló con aire en el mismo aparato de exposición como se utilizó en los experimentos CO. Las concentraciones en la cámara se monitorearon con un analizador de NO (Iterscan). Siguiendo a la exposición, se llevó a cabo la angioplastia por globo como se describió anteriormente. Los animales de control se expusieron al aire. El cirujano que inflinge la lesión por globo desconocía que las ratas estaban siendo manipuladas. Análisis de las arterias carótidas se desarrolló 2 semanas después del procedimiento descrito anteriormente.

Lesión arterial de ratón. La disección fue similar a aquella descrita por Lindler et al. (Circ Res. 73: 792-796 (1993)), y se desarrolló utilizando un alambre guía de 0,018 pulgadas (Cook, Bloomington, IN), insertado a

través de la arteriotomía carótida externa dentro de la carótida común, rotada 360 grados tres veces y removida un total de tres veces consecutivas.

Immunoensayos cGMP. Se cuantificaron los niveles de cGMP celulares utilizando un EIA (Biomol, Plymouth Meeting, PA). Los SMC fueron incubados en la presencia o ausencia de CO (250 ppm) y los lisatos de células se analizaron para el contenido cGMP, como lo sugiere el proveedor.

Conteo de células. Las células fueron sembradas en 5×10^3 células/pozo y cultivadas durante la noche en glucosa de alto DMEM que contiene 10% FCS, penicilina, y gentamicina (Life Technologies). Las células fueron alimentadas con suero durante 48 horas adicionales (0% suero) y donde se indica expuestas a CO (250 ppm para rata y ratón SMC) antes de la inducción de la proliferación de la célula (10% FCS; Life Technology). Las Células fueron contadas diariamente utilizando un hemocitómetro Neubauer. La viabilidad fue evaluada con trypan blue.

Adenovirus recombinante. Se obtuvo adenovirus β -galactosidada recombinante del Southwest Medical Center, de la Universidad de Texas, Dallas, TX. El adenovirus recombinante HO-1 que expresa el cADN HO-1 de rata se ha descrito en Brouard et al. (*J Exp Med.* 192: 1015-1026 (2000)). Las ratas SMC se infectaron con una multiplicidad de infecciones (MOI) de placa 400 que forman unidades por célula (PFU/célula), como se describió en Brouard et al. (*Id.*).

Citometría de flujo. Aortas de ratas SMC se recolectaron por digestión de tripsina (0,025% Tripsina/0,01% EDTA) (Life Technology), lavada en salina amortiguada de fosfato (PBS, pH 7.2) con albúmina de suero bovino 0,5% (BSA; Sigma-Aldrich Co), e incubadas con yoduro de propidio (1 μ g/ml, 1h, RT). Se evaluó el etiquetado fluorescente utilizando un FACsort equipado con el software Cell Quest (Becton Dickinson, Palo Alto, CA). Los experimentos se llevaron a cabo en triplicado.

Análisis histomorfométrico. En el modelo trasplante, los injertos fueron recolectados 56 días después de trasplante. Las aortas se fijaron en 10% de formalina,

embebidas en parafina y seccionadas serialmente (5 μ) en su totalidad. Diez muestras de cada tres secciones se colocaron por platina en un total de aproximadamente veinticuatro a treinta platinas. Cada tercer platina se coloreada con Hematoxolina y Eosina (H&E) para análisis histomorfométrico. En el modelo de lesión de globo, a los animales se les aplicó la eutanasia 14 días luego la lesión y las arterias se recolectaron para análisis morfométrico. Las arterias carótidas de la rata fueron inundadas y fijadas *in situ* con PBS y paraformaldehído (2%). Los vasos se fijaron durante 2 horas en 2% de paraformaldehído a 4° C y crioprotegido en 30% de sucrosa durante la noche a 4° C. los vasos se congelaron rápidamente en 2-metilbutano y se cortó en criosecciones de 7 μ m.

Detección de Anticuerpo Primarios para Immunotransferencia. Los anticuerpos fueron detectados utilizando anticuerpos secundarios IgG anti-conejo conjugado peroxidasa de rábano (Pierce, Rockford, IL, USA). La peroxidasa se visualizó utilizando el ensayo Enhanced Chemiluminescence (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL, USA), de acuerdo con las

119
119

instrucciones del fabricante, y almacenado en la forma de fotoradiografías. (BiomaxTMMS, Eastman Kodak, Rochester, NY). En donde se indica, las membranas fueron peladas ((62,5 mM Tris. HCl pH 6,8, 2% SDS y 100 mM β -mercaptoetanol, 30 minutos, 50 °C). el p30 fosforilado se normalizó a la cantidad total de p38, detectada en la misma membrana.

Reactivos Misceláneos. Ratones iNOS y eNOS se detectaron utilizando anticuerpos policlonales anti - ratón de conejo contra iNOS y eNOS (Becton Dickinson, Biosciences, San Diego, CA).

El CO suprime el desarrollo de la arteriosclerosis asociada con trasplante.

Las figuras 1A-1I ilustran que los tratamientos con CO suprimen la hiperplasia íntima normalmente asociada con rechazo de injerto crónico. La Figuras 1A.1F son fotomicrografías de muestras de varios injertos aórticos 56 días después del trasplante. Para generar estos datos, la aortas Norway Brown se trasplantaron en ratas Norway Brown (Figuras 1A y 1D), ratas Lewis expuestas al aire

(Figuras 1B y 1E), y ratas Lewis expuestas a CO (250 ppm; figuras 1C y 1F). Las muestras fueron recolectadas 56 días después de transplante y coloreadas mediante un tricromo de tejido masson elástico modificado (elástico; Figuras. 1A-1C) o por hematoxilina y eosina (H&E; figuras 1D-1E). Los elásticos coloreados se amplifican 50x (figuras 1A-1C) y los H&E coloreados se amplifican 200x (figuras 1D-1E). Las muestras exhibidas son representativas de 3-6 animales analizados por grupo. Las figuras 1G-1I son gráficos de barras que ilustran las áreas relativas medias ($\pm$ la desviación estándar) que corresponden a las regiones íntima y media, calculadas a partir de las muestras recogidas de las aortas Norway Brown transplantadas en ratas Norway Brown (Sing.; n=6), ratas Lewis expuestas al aire (Alo.; n=6) o CO (250 ppm) (Alo. + CO; n=3). * $P < 0,001$ versus Alo.+CO.

Los segmentos aórticos Norway Brown transplantados en las ratas Lewis desarrollaron lesiones arterioscleróticas consistentes con el rechazo al injerto crónico (las figuras 1B y 1E). Las lesiones aparecieron 20-30 días después del transplante pero se pronunciaron más significativamente por 50-60 días; todos los análisis se

121

llevaron a cabo 56 días luego del transplante. Las lesiones se caracterizaron por hiperplasia íntima, pérdida de SMC media, y acumulación de leucocitos en la adventicia (figuras 1B y 1E). Estas características no se observaron en los vasos del receptor, y no se observaron lesiones en los injertos singénicos (figuras 1A y 1D). La hiperplasia íntima fue significativamente inhibida ($p < 0,001$) ($61,4 \pm 2,9\%$ de reducción versus control) en aortas transplantadas en receptores expuestos a CO (250 ppm) inmediatamente después de transplante (y por 56 días de aquí en adelante), como se comparó con aquellos receptores transplantados expuestos al aire (figuras 1C, 1F, 1G, 1H, y 1I).

Las figuras 2A-C son gráficos de barras que ilustran que el CO suprime la infiltración del injerto mediante leucocitos activados. Para generar los datos en las figuras 2A-2C, se desarrolló análisis inmunocitoquímico en injertos aórticos en injertos aórticos 56 días después de transplante. Aortas de rata Norway Brown se transplantaron en ratas Norway Brown (singénicas), ratas Lewis no tratadas (alogénicas) o ratas Lewis expuestas al CO (250-1000 ppm). Las muestras fueron recogidas 56 días

después de transplante. La figura 2A ilustra el número medio ($\pm$ desviación estándar ($n=3-6$)) número de núcleos en la adventicia de aortas Norway Brown trasplantadas en receptores Norway Brown (Singénico), receptores Lewis no tratados (Alogénicos), y receptores Lewis expuestos a varias concentraciones de CO (CO 250 ppm, CO 500 ppm, y CO 750-1000 ppm) ($*p<0,001$ versus Alo.). La figura 2B ilustra el medio ($\pm$ desviación estándar ($n=6$)) número de CD45 ($*P<0,002$ versus Alo.), CD68 (MØ/ED1; $*P<0,001$ versus Alo.), MHCII, y células positivas CD54 (ICAM-1) ($*P<0,001$ versus Allo). En la adventicia de aortas de ratas Norway Brown transplantadas en receptores de rata Norway Brown Trasplantadas (Sing.), los receptores de rata Lewis no tratados (Alo.), y los receptores de rata Lewis expuestos a CO (Alo. + CO). La figura 2 ilustra el medio ($\pm$ desviación estándar ($n=6$)) número de células positivas CD3, CD4 y CD8 ($*P<0,02, 0,001, 0,96$ respectivamente versus Alo.) en la adventicia de aortas Norway Brown transplantadas en receptores Norway (Sing.), receptores Lewis no tratados (Alo.), y receptores Lewis expuesto a CO (CO 250 ppm).

La acumulación de leucocitos en la adventicia de aortas transplantadas se inhibió en receptores expuestos al CO (ver figuras 2A-2C). No se observó acumulación de leucocitos en injertos singénicos. La habilidad del CO de suprimir la infiltración de injertos mediante leucocitos activados (CD45+) se dosificó dependiendo de los niveles de incrementos de CO (250-1000 ppm) que resulta en el decrecimiento de infiltración de leucocitos; se observó un efecto máximo en 700 a 1000 ppm de CO ($52 \pm 20\%$ de inhibición versus controles tratados por aire figura 2A). El CO suprime en forma significativa la acumulación de CD45+/CD68+monocito/macrófagos (MØ) ($65 \pm 24\%$ versus inhibición de controles tratados por aire), que incluyen ambas células CD4⁺ ("auxiliar") y CD8⁺ ("citotóxicas") (figura 2C). El CO también inhibe la expresión de genes pro-inflamatorios asociados con la activación de MØ que incluyen los antígenos (HMC II) clase II de histocompatibilidad mayor y la molécula 1 de adhesión intracelular (CD54/ICAM-1) (figura 2B).

El CO suprime el desarrollo de la hiperplasia íntima después de la lesión por globo.

Las figuras 3A-3G ilustra que el CO suprime el desarrollo de lesiones vasculares asociadas con lesiones de globo. Las figuras 3A-3D son fotomicrografías (amplificación 10x) de arterias carótidas inmunocitoquímicamente analizadas 14 días después de angioplastia por globo. Para generar los datos en las figuras 3A-3D las ratas fueron expuestas a aire ambiente (figuras 3A y 3C) o a CO (1 hora; 250 ppm; figuras 3B y 3D) antes de la lesión de globo. Todos los animales fueron expuestos a aire ambiente luego de la lesión de globo. Dos semanas después de la lesión de globo, las muestras se colorearon con hemotoxilina y eosina (H&E). Se exhiben las muestras de aire ambiente (figuras 3A y 3C) y ratas pretratadas con CO (figuras 3B y 3D). Las figuras 3E, 3F, y 3G son gráficos de barras que ilustran las áreas relativas medias ($\pm$ desviación estándar (n=8; * $P<0,001$ versus control)) de las regiones íntima y media de las muestras analizadas en las figuras 3A-3D.

Las arterias carótidas de rata desarrollaron hiperplasia íntima 14 días después de lesión de globo (figuras 3A y 3C; y figuras 3E-3G). La hiperplasia íntima en ratas expuestas a CO (250 ppm) durante una hora antes de la

125

lesión por balón (después que se discontinuó la exposición al CO) se suprimió por $74 \pm 8\%$ como se comparó a los animales de control expuestos al aire ($n=8-10$; $p<0,001$) (figuras 3B y 3D y figuras 3E-3G).

El CO suprime la proliferación de SMC.

Las figuras 4A-4F ilustran que el CO bloquea la proliferación de SMC y que el p21^{Cip1} se involucra en el efecto antiproliferativo del CO *in vitro*. La figura 4 es un gráfico de líneas que ilustran la proliferación de SMC de rata que no se transduce (o; Medio), o transducida con Lac.Z ($\square$ LacZ Rec. Ad.) o HO-1 ($\bullet$; HO-1 rec. Ad.) adenovirus recombinante. Los resultados mostrados son la media $\pm$ la desviación estándar de $n = 3$ pozos por grupo (* $P<0,001$ versus LacZ y no transducida). La figura 4B es una gráfico de líneas que ilustra la proliferación de crecimiento de SMC en ratas en la presencia o ausencia de CO ($\bullet$; 1000 ppm). Los resultados mostrados son la media $\pm$ la desviación estándar ($n = 3$ pozos por grupo; $P<0,001$ versus aire, $\square$). La figura 4C es una gráfica de barras que ilustra la proliferación de SMC aislado del tipo silvestre (TS) o HO-1 deficiente ($ho-1^{-/-}$) de ratón en la

presencia o ausencia de CO (250 ppm) ($n = 6$ pozos/grupo; $P < 0,006$ versus aire, $*P < 0,001$). La figura 4D es una transferencia Western que ilustra la transferencia de proteína p21 y β -actina en ratones SMC luego de la exposición al CO (250 ppm). La figura 4E es una gráfica de barras que ilustra la proliferación de SMC de ratón aislado de tipo silvestre (ts), p21^{clp1} (P21-/-) o p53 (p53-/-) ratón deficiente. Las barras grises indican células expuestas al aire ambiente y las barras negras indican las células expuestas a CO (250 ppm). Los resultados mostrados son la media $\pm$ la desviación estándar ($n = 3$ * $P < 0,001$ versus aire) en uno de 6 experimentos independientes. La figura 4F es una gráfica de barras que ilustra que la expresión endógena de p21^{clp1} juega un rol crítico en el control en el control del alcance de la hiperplasia íntima luego de la lesión arterial en ratones. Los ratones de tipo Silvestre (C57/B16/S129) o p21-/- se expusieron a aire ambiente o CO (1 hora; 250 ppm) antes de la lesión de la arteria carótida y expuestas a aire ambiente de aquí en adelante. Las muestras se recogieron y analizaron dos semanas después de la lesión. La media $\pm$ la desviación estándar ($n = 4$) del índice entre el área relativa de la íntima y

la media se expresa en unidades arbitrarias (* $P < 0,001$ versus aire).

Las figuras 7A y 7B ilustran demás que el CO bloquea la proliferación de SMC. La figura 7A es un análisis de ciclo e célula de SMC aórtico de rata en incubación estándar (Aire) versus CO (250 ppm) después de 24 horas de tratamiento. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. La figura 7B es un gráfico de líneas que ilustra la proliferación de SMC en la presencia (■; CO, 250 ppm) o ausencia (□; aire) de CO durante 6 días. El SMC fue seroestimulado en el día 3 del experimento. La proliferación incrementada en SMC tratada con CO después de la exposición al CO se discontinuó en día 6. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. Cada uno desarrollado por triplicado (* $P < 0,001$ vs Air).

La figura 8 es un gráfico de barras que ilustra que el CO bloquea la proliferación de SMC del tipo silvestre (ts) y ratón p53^{-/-} pero no del ratón p21^{-/-}. La figura presenta los resultados de un ensayo de incorporación de [³H] timidina utilizado para evaluar la proliferación celular

120

(conteos por minuto; cpm) en ratones tipo silvestres (ts), p21^{-/-}, y p53^{-/-} SMC expuestos al aire (barras grises) o a CO (250 ppm; barras negras) durante 24 horas. Los resultados mostrados son la media $\pm$ la desviación estándar (n=3; *P<0,05 versus aire).

Las figuras 9^a-9G ilustran que el CO suprime el desarrollo de lesiones vasculares asociadas con heridas de alambre en ratones tipo silvestre (C57/B16/S129) y p21^{-/-}

Las figura 9A-9D son fotomicrografías (amplificación 20x) de arterias carótidas coloreadas inmunocitoquímicamente 14 días luego de la herida con alambre. Los ratones fueron expuestos a aire ambiente (figuras 9A y 9C) o CO (1 hora; 250 ppm; figuras 9B y 9D) antes de la herida con alambre. Todos los animales fueron expuestos a aire ambiente luego de la lesión. Dos semanas después de la herida con alambre, las muestras se colorearon con hemotoxilina y eosina (H&E). Se exhibieron muestras de ratones tipo silvestre (figuras 9A y 9B) y p21^{-/-} (figuras 9C y 9D). Las figuras 9E, 9F, y 9G son gráficos de barras que ilustran la Media ($\pm$ la desviación estándar

70

($n=4$ * $P<0,001$ versus control)) relativa a las áreas correspondientes a la regiones íntima y media, así como también los índices íntima:media, de las fotomicrografías mostradas en las figuras 9A-9D.

El CO suprime la proliferación de SMC in vitro

Un sistema in vitro se utilizó para evaluar el crecimiento del SMC en la presencia o ausencia de CO para delinear el mecanismo mediante el cual el CO inhibe la hiperplasia íntima. El SMC sin suministro de suero proliferó sobre la re-adición de suero al medio de cultivo (figura 7B); el control SMC no expuso la proliferación mínima exhibida de suero durante cinco días del experimento. La Expresión de un adenovirus recombinante HO-1 o la exposición al CO suprime la proliferación SMC (figuras 4A y 4B). En un sistema similar la "evacuación" de CO por la hemoglobina suprime el efecto anti-proliferativo del HO-1, sugiriendo que el CO generado por HO-1 cuenta de manera similar por el efecto antiproliferativo de HO-1. El análisis del ciclo de la célula revela que el SMC tratado con CO acumulado en la fase G0/G1 (figura 7A). El SMC de ratón que le falta HO-1 ($ho-1^{-/-}$) proliferó más significativamente

130

rápido cuando se expuso al suero que cuando lo hizo el SMC de ratón de tipo silvestre (figura 4C), indicando que la expresión HO-1 endógena en SMC expuesta a suero suprime la proliferación de células de músculo liso. El CO inhibe significativamente la proliferación de SMC de ratón *ho-1^{-/-}*, lo que sugiere que el CO cuenta en gran medida para la acción proliferativa del HO-1.

La inhibición de la proliferación de SMC no se asoció con la muerte celular como lo evaluaron los análisis de yoduro de propidio y "trypan blue". Los efectos antiproliferativos del CO fueron reversibles, ya que la cesación de la exposición al CO permitió al SMC empezar a proliferar de nuevo (Fig. 7B).

El efecto antiproliferativo in vitro del CO depende de p21^{Cip1}.

El SMC expuesto a CO reguló la expresión de proteína p21Cip1 (figura 4D), similar a SMC que sobre expresa HO-1. Este efecto fue transitorio en el que la expresión p21^{Cip1} se incrementó significativamente por 4 horas, fue máximo por 16 horas y regresó a niveles de base en 24 horas después de exposición al CO (figura 4D). La proliferación

de SMC de ratones deficientes $p21^{Cip1}$ ($p21^{-/-}$) no fue suprimida por CO (figura 4E), lo que indica que la expresión $p21^{Cip1}$ se requiere para el efecto antiproliferativo del CO. A pesar del rol establecido del p53 en la regulación de la expresión $p21^{Cip1}$, el CO indujo la expresión $p21^{Cip1}$ e inhibió la proliferación de SMC derivado de $p53^{-/-}$ o de ratón tipo silvestre a un alcance similar (figura 4E y figura 8). Así, el efecto antiproliferativo de CO in vitro es dependiente de la expresión $p21^{Cip1}$, que no involucra al p53.

Participación del $p21^{Cip1}$ en el efecto antiproliferativo in vivo del CO

El $p21^{Cip1}$ se expresa luego de la herida de la pared vascular, que funciona de manera similar para regular la proliferación de SMC y el desarrollo de la hiperplasia íntima. Se investigó el rol de la expresión $p21^{Cip1}$ endógena en el desarrollo de la hiperplasia íntima luego de la lesión en ratón. La hiperplasia íntima fue tres veces más pronunciada en ratones $p21^{-/-}$ tratados con aire que en ratones tipo silvestre ($n=4$; $314 \pm 41,8\%$, $p < 0,001$) que mostraron que la expresión endógena del $p21^{Cip1}$ juega

un papel crítico en el control del alcance de la hiperplasia luego de la lesión arterial en ratones (figura 4F).

En contraste, una hora de pretratamiento de CO (250 ppm) suprimió la hiperplasia íntima en ambos ratones tipo silvestre (C57/S129) y *p21*^{-/-} (C57/S129) por $80,9 \pm 7,2\%$ ($n=4$, $p<0,001$) y $86,2 \pm 14\%$ ($n=4$, $p<0,001$), respectivamente, versus controles tratados con aire (figura 4F; figura 9A-9G). Así, en este modelo de ratón in vivo, el CO suprime la hiperplasia íntima por vía de un mecanismo que no es dependiente de la expresión de *p21*^{Cip1}.

El efecto antiproliferativo de CO requiere activación de ciclase de guanilato y la generación de cGMP, y se ejerce por vía de la activación de MAPK p38.

Las figuras 5A-5G ilustran que el CO bloquea la proliferación de SMC por vía de la regeneración de cGMP y la activación de MAPK p38. La figura 5A es un gráfico de barras que ilustra la media ($\pm$ la desviación estándar ($n = 3$)) del contenido cGMP celular en ratones SMC expuestos

al aire o CO (250 ppm durante 8 h o 16 h). La figura 5B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un ensayo de incorporación de timina [^3H] usado para evaluar la proliferación celular (conteos por minuto; cpm) en ratones SMC expuestos a CO (250 ppm) en la presencia o ausencia del inhibidor de guanilato ciclasa ODQ. Los resultados mostrados son la media $\pm$ la desviación estándar (n=3; *P<0,05 versus aire y CO/ODQ). La figura 5C es una fotografía de una fusión Western SMC de ratón p21^{Cip1} expuesto al 8Br-cGMP análogo cGMP. Las membranas fueron probadas posteriormente para β -actina para asegurar igual carga. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes. La figura 5D es una gráfica de barras que ilustra la incorporación de timidina [^3H] de SMC aislada de ratones tipo silvestre (ts) y p21^{Cip1} (p21^{-/-}) deficientes en la presencia y ausencia del 8Br-cGMP análogo cGMP. Los resultados mostrados son la media $\pm$ la desviación estándar (n=4; * P<0,05 versus aire y 8Br-cGMP). La figura 5E es una fotografía compuesta de una transferencia Western de p38 MAPK (p-p38), ATF-2 (pATF-2), JNK (p-JNK) y ERK (p-ERK) fosforilada de SMC expuesto a CO (250 ppm). Las membranas fueron probadas

posteriormente con un anticuerpo contra el p38 MAPK, ATF-2, JNK y ERK para asegurar igual carga. Las transferencias son representativas de 3 experimentos independientes. La figura 5F es un gráfico de barras que ilustra la incorporación de timidina [³H] en ratones SMC expuestos a CO (250 ppm) en la presencia y ausencia del inhibidor p38 MAPK 203580. Los resultados mostrados son la media $\pm$ la desviación estándar de 4 experimentos independientes ($p < 0,005$; versus aire y células tratadas con CO/SB). La figura 5G es fotografía compuesta de una transferencia Western de p21Cil1 de ratón SMC expuesto a CO (250 ppm) en la presencia y ausencia del inhibidor p38 MAPK SB203580 o DMSO, utilizado como vehículo. La misma membrana se probó con un anticuerpo contra la β -actina para asegurar igual carga. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos independientes.

Las figuras 6A-6B ilustran que el CO activa el p38 MAPK a través de un mecanismo que requiere la generación de cGMP. La figura 6A es una fotografía compuesta de una transferencia Western de p38 MAPK forforilada de ratón SMC expuesto al análogo cGMP 8BrcGMP. Las membranas fueron probadas posteriormente con un anticuerpo contra

135

el p38 total para asegurar igual carga. La transferencia compuesta mostrada en la figura 6A es representativa de 3 experimentos independientes. La figura 6B es un gráfico de barras que ilustra la incorporación de timidina [^3H] en ratones SMC expuestos a CO (250 ppm) en la presencia o ausencia del análogo cGMP 8-BrcGMP. Los resultados mostrados son la media $\pm$ la desviación estándar de 4 experimentos independientes.

La figura 10 es un gráfico de barras que ilustra que el CO no suprime la proliferación en SMC de ratón *p21*^{-/-}. El gráfico de barras representa los resultados de un ensayo de incorporación de timidina [^3H] para evaluar la proliferación celular (conteos por minuto; cpm) en SMC derivado de ratón *p21*^{-/-} tratado con CO (250 ppm) en la presencia o ausencia del inhibidor p38 MAPK SB203580 (SB).

La exposición del SMC al CO incrementa los niveles de cGMP (figura 5A). La habilidad del CO para suprimir la proliferación de SMC y regular la expresión *p21*^{Cip1} que se disminuyó por la inhibición de la actividad del guanilato ciclasa por 1H(1,2,4) Oxadiazolo(4,3-a) Quinoxalin-1 (ODQ) (figura 5B). El análogo no degradable cGMP 8-sal de

sodio monofosfato Bromoguanosina 3'-5'-cíclico (8-Br-cGMP) suprimió la proliferación de SMC (figura 5D) e incrementó la expresión de p21^{Cip1} comparado al CO (figura 5C). La supresión de la proliferación por 8-Br-cGMP se disminuyó en SMC derivado de ratones p21^{-/-} (figura 5D). Este parece que el efecto antiproliferativo de CO se media por vía de la activación de guanilato ciclasa, acumulación de cGMP y la expresión/activación de p21^{Cip1}. La activación de las quinasas cGMP dependientes (PKG α y β) parece ser requerido para que el CO suprima la proliferación de SMC ya que un inhibidor de PKG abrogó el efecto antiproliferativo del CO.

Se investigó si el efecto antiproliferativo del CO en SMC involucró la activación de la senda de transducción de señal p38 MPAK. El CO activó el p38 MPAK en SMC (figura 5E), como este lo hace en las células endoteliales y monocitos/macrófagos. La fosforilación/activación del p38MAPK alcanzó su límite superior cuatro horas después de la exposición al CO y regresó a niveles de base de aquí en adelante (figura 5E). La exposición del SMC al CO también se asoció con la activación del ATF-2, un factor de transcripción activado más a menudo a través de la

senda de transducción de señal p38 MAPK (figura 5E). La inhibición de la activación del p38 MAPK por el imidazol pirimidinilo SB203580, un inhibidor selectivo de las isoformas p38 α y β , bloquea la habilidad del CO para regular la expresión del p21^{Cip1} (figura 5G) y suprimió en efecto antiproliferativo del CO (figura 5F). Adicionalmente, el CO no inhibió la proliferación en células aisladas de ratones deficientes en mitógeno activó la proteína quinasa quinasa 3 (*mkk3*^{-/-}), la quinasa corriente arriba que activa el p38 α y p38 β . El SB203580 no moduló los efectos del CO sobre la proliferación de SMC de ratón *p21*^{-/-} (figura 10). Estos datos indican que la activación del p38 MAPK es crítica para la regulación del p21^{Cip1} y la inhibición de la proliferación SMC por el CO. El CO no moduló la activación de quinasas 1 y 2 reguladas extracelularmente (ERK-1 y -2) (figura 5E), que indica que esta senda de señal de transducción no se involucra en el efecto antiproliferativo del CO. El CO indujo la activación de quinasas jun-activadas 1 y 2 (JNK-1 y -2) (fig 5E).

Dado que el CO induce la generación de cGMP (figura 5A) y la activación de p38 MAPK (figura 5E) en SMC, se

investigó la interrelación entre estas dos sendas de señal de transducción. La activación de p38 MAPK por CO se abolió cuando la generación de cGMP se bloqueó por ODQ. La exposición de SMC al 8-bromo-cGMP activó el p38 MAPK (figura 6A) y el efecto antiproliferativo del 8Br-cGMP se agregó en la presencia de SB203580 (figura 6B). Consistente con estos hallazgos, la habilidad del 8Br.cGMP para regular la expresión de p21^{Cip1} fue suprimido por SB203580.

El efecto antiproliferativo del CO no requiere la expresión del óxido nítrico sintasa

Las figuras 11A-11B ilustran que el NO no está involucrado con el efecto antiproliferativo del CO. La figura 11A es un gráfico de barras que ilustra la incorporación de timidina [³H] en ratones SMC aislados de ratones tipo silvestre (ts) y enos^{-/-} e inos^{-/-} deficientes en la presencia y ausencia de CO (250 ppm). Los resultados mostrados son la media ± la desviación estándar (n=6-8, * P<0.001 versus ts). La figura 11B es un gráfico de barras que ilustra la media íntima y las áreas media de las arterias carótidas de las ratas

Sprague-Dawley expuestas al aire ambiente (barras blancas) o NO (barras negras; 1 hora; 250 ppm) antes de lesión por globo de la arteria carótida. Todos los animales se expusieron a aire ambiente luego de lesión. Dos semanas después las arterias carótidas heridas se removieron, se seccionaron y se colorearon con hematoxilina y eosina (H&E). Las áreas que corresponden a las regiones íntima y media se calcularon. Los resultados son la media $\pm$ la desviación estándar de 40 secciones representativas tomadas de 3 ratas por grupo de tratamiento.

EL SMC expuesto a CO (250 o 10.000 ppm) para variar las cantidades de tiempo no mostró inducción de cualquier isoforma NOS por transferencia Western. El SMC de ratones deficientes para la isoforma constitutiva/endotelial de sintasa de óxido nítrico (eNOS)/NOS-3; *nos-3^{-/-}*) o la isoforma inducible (iNOS)/NOS-2; *nos-2^{-/-}*) mostraron absorción significativamente superior de timidina cuando se expuso a suero como se comparó al SMC derivado de ratones de tipo silvestre. (figura 11A). La exposición al CO inhibe significativamente la proliferación de SMC derivado de ratones de tipo silvestre, *nos-2^{-/-}* o *nos-3^{-/-}*

140

(inhibición de $51 \pm 12,9\%$ y $51 \pm 25\%$ y $54 \pm 11\%$ respectivamente; $p < 0,001$ versus controles tratados con aire) (figura 11A). Estos datos indican que el efecto antiproliferativo del CO puede ocurrir en la ausencia de iNOS o eNOS. Similarmente, bajo condiciones similares a aquellas usadas para CO (250 ppm; una hora de pretratamiento), el NO no disparó la enfermedad íntima modulada por la herida de globo. El NO administrado a 500 ppm fue letal.

El CO no inhibe la expresión del inhibidor activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) en SMC.

Las figuras 12A, 12B y 12C ilustran que el CO incrementa los niveles de expresión de proteína PAI-1. La figura 12A es una foto compuesta de un análisis de transferencia Western para PAI-1 en SMC tratado con y sin CO (250 ppm) durante 24 o 48 horas. Los lisatos de células completas de homogenatos de hígado de rata tratados con o sin endotoxina (LPS) se utilizaron como controles. Se utilizó α -actina para ensayar la carga de proteína. La figura 12B es una fotografía compuesta de un análisis de transferencia Western para PAI-1 en aortas no

141

transplantadas (control), transplantadas (Alo + Aire), y tratadas con CO transplantadas (Alo + CO) después de 56 días. La figura 12C es el gel de poliacrilamida coloreado de azul "Commassie" utilizado para crear la transferencia Western de la figura 12B, e ilustra que la misma cantidad de proteína se carga en cada línea.

El CO suprime la expresión del PAI-1 en Mø, que es la clave para el efecto protector del CO en prevención de la lesión de reperfusión de isquemia de pulmón en ratones. La exposición del SMC al suero no alteró la expresión del PAI-1 por transferencia Western (figura 12A). El tratamiento con CO incrementó ligeramente la proteína PAI-1, sugiriendo que el efecto antiproliferativo del CO no involucra una regulación abajo del PAI-1. De forma similar, la expresión de la proteína PAI-1 en aortas alogénicas transplantadas bajo tratamiento con CO fue similar a aquellas de las aortas alogénicas transplantadas en la ausencia de CO como se probó por inmunohistología y transferencia Western (figura 12B). Esto sugiere que la habilidad del CO para modular la lesión vascular asociada con el rechazo crónico de injerto puede no estar directamente relacionada con la expresión del PAI-1.

El CO se genera fisiológicamente en la mayoría de tipos de células a través del catabolismo del hemo por enzimas de la familia de la hemo oxigenasa. La expresión de la enzima inducible, HO-1, es una respuesta protectora a la lesión que limita los efectos deletéreos asociados con las reacciones inflamatorias. Los efectos protectores del HO-1 son de amplio rango, incluyen la inhibición del desarrollo de la aterogénesis e hiperplasia íntima, y puede en muchos casos ser imitado por el CO. Los presentes estudios demuestran que el CO posee propiedades vasoprotectoras directas. La continua exposición a bajas concentraciones de CO (250 ppm) suprime el desarrollo de la hiperplasia íntima y la infiltración de injerto mediante leucocitos activados (las figuras 1A-1I y 2A-2C) asociadas con arteriosclerosis de transplante (figura 1A-1I). La exposición al CO (250 ppm) por solo una hora antes de la lesión suprime la hiperplasia íntima asociada con lesión de angioplastia de arteria carótida en ratas (figuras 3A-3G).

La importancia fisiológica del efecto antiproliferativo del HO-1 en SMC, descrito originalmente en células epiteliales pulmonares, se apoya mediante la observación

de que el SMC de ratones deficientes HO-1 proliferan más rápidamente *in vitro* e *in vivo* que el SMC de tipo silvestre. Los datos actuales demuestran que el CO suprime la proliferación de SMC en una forma similar a HO-1.

La generación de cGMP y la expresión de p21^{Cip1} son esenciales para los efectos de CO, y se interrelacionan. La habilidad del CO para regular la expresión p21^{Cip1} y suprime la proliferación de SMC es dependiente de la activación de guanilato ciclasa (figuras 5A-5G). El CO regula el p21^{Cip1} (figuras 4A-4F) y el efecto antiproliferativo de CO es dependiente de la expresión de p21^{Cip1} este efecto se abroga en p21^{Cip1}^{-/-} SMC Figuras 6A-6B). La habilidad del 8-Br-c-cGMP para suprimir la proliferación de SMC se debilitó en SCM derivado de ratón deficiente p21^{Cip1} (figuras 5A-5G), que sugiere que el cGMP suprime la proliferación de SMC *in vitro* por vía de la regulación de p21^{Cip1}.

La contribución individual del cGMP y p38 MAPK a los efectos del CO parece ser específico del tipo de célula. Los datos actuales demuestran que el efecto antiproliferativo del CO en SMC es dependiente en ambas

144

sendas de transducción de señal (figura 5A-5G). El CO requiere cGMP para activación de p38 MAPK, que se necesita para regular p21^{Cip1} y suprime la proliferación de SMC. Este sugiere que el CO como el >NO, activa el p38 MAPK por vía del cGMP y la activación de las quinasas de proteína dependiente de cGMP, consistente con la observación que la inhibición de PKG α y/o β suprime el efecto antiproliferativo del CO. Los datos actuales sugieren que el efecto antiproliferativo del CO es distinto de y puede actuar independientemente de NO. Se debe notar que el enlace entre el cGMP, p38 MAPK y p21^{Cip1} no ha sido reportado en células expuestas a HO-1 o CO.

El SMC expresa p21^{Cip1} sobre la lesión vascular y los adenovirus recombinantes mediaron la expresión p21^{Cip1} en SMC suprime la hiperplasia íntima luego de la lesión vascular. Los datos actuales muestran que la expresión fisiológica de p21^{Cip1} se involucra en la hiperplasia íntima: luego de la lesión arterial, la hiperplasia íntima en ratones p21^{-/-} es tres veces más grande como los controles de tipo silvestre (figura 4F), apoyan fuertemente la noción de que la inducción de CO de la expresión p21^{Cip1} en SMC (figura 5D) contribuye a la

supresión de la hiperplasia íntima luego de la lesión vascular.

Los ratones $p21^{-/-}$ fueron utilizados para evaluar el papel de la expresión $p21^{Cip1}$ sobre la habilidad del CO para suprimir la hiperplasia íntima luego de la lesión arterial. Ratones $p21^{-/-}$. Una hora de pretatamiento CO fue suficiente para suprimir por más del 80% el desarrollo de la hiperplasia íntima en ratones $p21^{-/-}$ o ratones tipo silvestre, como se comparó con su respectivos controles tratados con aire (figura 4F). Una interpretación de estos datos es que la habilidad del CO para suprimir la proliferación neointimal en vivo actúa independientemente de $p21^{Cip1}$ en SMC. En ratones, en contraste con las ratas, hay un proceso inflamatorio/trombótico que conduce presumiblemente a la proliferación íntima. Dados los potentes efectos antiinflamatorios del CO, también parece posible que el CO suprima la hiperplasia íntima en ratones mediante la inhibición de la inflamación, un proceso que es casi ciertamente independiente de $p21^{Cip1}$.

Dada la supresión conocida de PAI-1 por el CO en monocitos-macrófagos y la importancia del PAI-1 en la patogénesis de la hiperplasia íntima luego de la lesión

vascular en algunos estudios, se investigó si una supresión similar de PAI-1 ocurrió en el sistema actual. No se observó ningún decrecimiento en el nivel de expresión de la proteína PAI-1 en 56 días después del transplante (figura 12B).

Ejemplo 2. Protocolos para el Tratamiento de Pacientes durante Angioplastia y Procedimientos de Transplante.

Los siguientes ejemplos ilustran los protocolos para el tratamiento de pacientes durante los procedimientos de angioplastia y para tratar un donador, órgano, y/o receptor con monóxido de carbono durante un procedimiento de transplante. Uno cualquiera o más de los siguientes procedimientos pueden ser utilizados en procedimientos de transplantes.

Angioplastia

El CO puede ser administrado sistemáticamente o localmente a un pacientes antes de, durante, y/o después de un procedimiento de angioplastia que se desarrolla en el paciente. El tratamiento puede ser administrado en dosis que varían entre 10 ppm a 1000 ppm (por ejemplo 100

147

ppm a aproximadamente 800 ppm, aproximadamente 150 ppm a aproximadamente 600 ppm (por ejemplo 150 ppm), o aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 500 ppm (por ejemplo, aproximadamente 250 ppm o aproximadamente 500 ppm)). Por ejemplo, el CO puede ser administrado al paciente, intermitentemente o continuamente, partiendo de 0 a 20 días antes que el procedimiento se desarrolle, por ejemplo, partiendo al menos de aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 5, 7, o 10 horas, o aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, o 20 días, o mayor a 20 días, antes del procedimiento. Alternativamente o adicionalmente, el CO puede ser administrado al paciente durante el procedimiento, por ejemplo, a través de un instrumento utilizado para desarrollar la angioplastia y/o por inhalación. Alternativamente o adicionalmente, el CO puede ser administrado al paciente después del procedimiento, y continuando durante aproximadamente 1, 3, 5, 7, o 10 horas, o aproximadamente 1, 2, 5, 8, 10, 20, 30, 50, o 60 días, o indefinidamente, después la terminación del procedimiento.

Transplantes

Tratamiento de un Donador

Antes de recolectar un tejido o un órgano, el donador puede ser tratado con monóxido de carbono inhalado (250 ppm) durante una hora. El tratamiento puede ser administrado en dosis que varían entre 10 ppm a 1000 ppm por tiempos que varían entre una hora a seis horas, o para el periodo completo desde el momento cuando este se hace posible para tratar un donador de muerte cerebral (cadáver) al tiempo en que el órgano se remueve. El tratamiento debe empezar tan pronto como sea posible luego de la declaración de que la muerte cerebral se presenta. En algunas aplicaciones, puede ser deseable comenzar un tratamiento antes de la muerte cerebral.

Para animales no humanos (por ejemplo cerdos) área ser usados como donadores de xenotransplante, el animal vivo puede ser tratado con niveles relativamente altos de de monóxido de carbono inhalado, como se desea, tan extenso como la carboxihemoglobina así producida no compromete la viabilidad de la función del órgano a ser transplantado. Por ejemplo, uno puede usar niveles superiores de 500 ppm

(por ejemplo, 1000 ppm o superiores, y más de 10.000 ppm, particularmente por tiempos breves).

Tratamiento del órgano in situ

Antes que un órgano sea recogido de un donador, este puede ser lavado con una solución, por ejemplo, un amortiguador o medio, sin células sanguíneas rojas mientras ésta está aún en el donador. El propósito es lavar el órgano con una solución saturada con monóxido de carbono y mantenida en una atmósfera de monóxido de carbono de tal forma que el contenido de monóxido de carbono se mantiene en saturación. El lavado puede tomar lugar durante un periodo de tiempo de al menos 10 minutos, por ejemplo 1 hora, varias horas, o superior. La solución idealmente debe suministrar la concentración más grande de monóxido de carbono posible a la vasculatura del órgano.

Tratamiento de un Órgano o Tejido

El órgano o tejido puede ser preservado en un medio que incluye monóxido de carbono desde el tiempo en que este es removido del donador al tiempo en que éste es

transplantado al receptor. Esto puede ser desarrollado para mantener el órgano o tejido en el medio que comprende CO, o por perfusión de éste con tal medio. Ya que esto ocurre ex vivo en forma diferente que en un animal, se pueden usar concentraciones muy altas de gas de CO (por ejemplo, 10.000 ppm) para mantener el medio saturado con CO.

Tratamiento de un Receptor

El receptor puede ser tratado con monóxido de carbono. El tratamiento puede ser un día antes del procedimiento de trasplante, por ejemplo, el día del procedimiento de trasplante al menos una hora antes de que empiece la cirugía. Alternativamente, este puede empezar al menos 30 minutos antes de re-perfusión del órgano en el recipiente. Este puede ser continuo durante al menos 30 minutos, por ejemplo, 1 hora. Las dosis de monóxido de carbono entre 10 ppm y 300 ppm pueden ser administradas durante varios tiempos, por ejemplo, minutos u horas, y puede ser administrado en el día de y en los días luego del trasplante. Por ejemplo, un receptor puede inhalar una concentración de monóxido de carbono, por ejemplo, 3.000 ppm, durante tres inhalaciones consecutivas de 10

25

segundos. Alternativamente, el recipiente puede inhalar, es decir 200 ppm durante un tiempo extendido, tal como 20 días. Las concentraciones de carboxihemoglobina, pueden ser utilizadas como una guía para la administración apropiada de monóxido de carbono a un paciente. Usualmente, tratamientos para receptores no deben elevar no niveles de carboxihemoglobina sobre aquellos considerados que ponen en riesgo a un paciente en necesidad de un trasplante.

Un número de modalidades de la invención se han descrito. Sin embargo, se entenderá que varias modificaciones se pueden hacer sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. De acuerdo con esto, otras modalidades están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

152

Lo que se reivindica es:

1. Un método para desarrollar angioplastia en un paciente, el método comprende:

(a) Desarrollar la angioplastia en el paciente; y

(b) Antes, durante, o después (a), administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad de monóxido de carbono para tratar la hiperplasia íntima en el paciente.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la angioplastia comprende angioplastia de globo.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la angioplastia comprende angioplastia láser.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la angioplastia comprende aterectomía direccional.

5. El método de la reivindicación 1, en donde la angioplastia comprende aterectomía rotacional.

6. El método de la reivindicación 1, en donde la angioplastia comprende aterectomía de extracción.

7. El método de la reivindicación 1, en donde la angioplastia comprende un procedimiento con stent.

8. El método de la reivindicación 1, en donde la angioplastia comprende angioplastia de globo y un procedimiento con stent.

9. Un método de tratar restenosis en un paciente, el método comprende:

(a) suministrar un recipiente que contiene un gas presurizado que comprende gas de monóxido de carbono;

(b) Identificar un paciente que sufre de o en riesgo de restenosis;

(c) Liberar el gas presurizado del recipiente, para formar una atmósfera que comprende gas de monóxido de carbono; y

(d) Exponer al paciente a la atmósfera, en donde la cantidad de monóxido de carbono en la atmósfera es suficiente para tratar restenosis en el paciente.

10. Un recipiente que comprende gas de monóxido de carbono comprimido grado médico, el recipiente trae una etiqueta que indica que el gas puede ser usado para reducir restenosis en un paciente.

11. El recipiente de la reivindicación 10, en donde el gas de monóxido de carbono está en una mezcla con gas que contiene oxígeno.

12. El recipiente de la reivindicación 11, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 0,025%.

13. El recipiente de la reivindicación 11, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 0,05%.

155

14. El recipiente de la reivindicación 11, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 0,10%.
15. El recipiente de la reivindicación 11, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos 1,0%.
16. El recipiente de la reivindicación 11, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 2,0%.
17. Un recipiente que comprende gas de monóxido de carbono comprimido grado médico, el recipiente lleva una etiqueta que indica que el gas puede ser usado para reducir la arteriosclerosis en un paciente.
18. El recipiente de la reivindicación 17, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la

mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 0,025%.

19. El recipiente de la reivindicación 17, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 0,05%.

20. El recipiente de la reivindicación 17, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 0,10%.

21. El recipiente de la reivindicación 17, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 1,0%.

22. El recipiente de la reivindicación 17, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 2,0%.

157

23. Un recipiente que comprende gas de monóxido de carbono comprimido grado médico, el recipiente lleva una etiqueta que indica que el gas puede ser usado en conjunto con un procedimiento de angioplastia en un paciente.
24. El recipiente de la reivindicación 23, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 0,025%.
25. El recipiente de la reivindicación 23, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 0,05%.
26. El recipiente de la reivindicación 23, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 0,10%.
27. El recipiente de la reivindicación 23, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la

mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 1,0%.

28. El recipiente de la reivindicación 23, en donde el gas de monóxido de carbono está presente en la mezcla en una concentración de al menos aproximadamente 2,0%.

29. Un método para tratar restenosis en un paciente, que comprende:

- (a) identificar un paciente que sufre de o en riesgo de restenosis; y
- (b) administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad de monóxido de carbono efectivo para tratar restenosis en el paciente.

30. El método de la reivindicación 29, en donde la restenosis resulta de angioplastia de globo.

31. El método de la reivindicación 29, en donde la restenosis resulta de angioplastia láser..

154

32. El método de la reivindicación 29, en donde la restenosis resulta de aterectomía direccional.

33. El método de la reivindicación 29, en donde la restenosis resulta de aterectomía rotacional.

34. El método de la reivindicación 29, en donde la restenosis resulta de aterectomía de extracción.

35. El método de la reivindicación 29, en donde la restenosis resulta de un procedimiento con stent.

36. Un método para tratar hiperplasia íntima en un paciente, que comprende:

- (a) identificar un paciente que sufre de o en riesgo de hiperplasia íntima que no resulta de un procedimiento de transplante; y
- (b) administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de monóxido de carbono para tratar hiperplasia íntima en el paciente.

37. El método de la reivindicación 36, en donde la hiperplasia íntima resulta de angioplastia de globo.

38. El método de la reivindicación 36, en donde la hiperplasia íntima resulta de angioplastia láser.

39. El método de la reivindicación 36, en donde la hiperplasia íntima resulta de aterectomía direccional.

40. El método de la reivindicación 36, en donde la hiperplasia íntima resulta de la aterectomía rotacional.

41. El método de la reivindicación 36, en donde la hiperplasia íntima resulta de la aterectomía de extracción.

42. El método de la reivindicación 36, en donde la hiperplasia íntima resulta de un procedimiento con stent.

43. Un método de desarrollar angioplastia en un paciente, que comprende:

- (a) suministrar un dispositivo de angioplastia capaz de administrar monóxido de carbono a un paciente;
- (b) posicionar el dispositivo en un vaso sanguíneo en necesidad de angioplastia;
- (c) desarrollar angioplastia utilizando el dispositivo; y
- (d) antes, durante o después (c), utilizar el dispositivo para administrar monóxido de carbono al vaso sanguíneo en una cantidad suficiente para tratar hiperplasia íntima.

44. Un kit que comprende:

- (a) un dispositivo de angioplastia; y
- (b) un recipiente que contiene una composición que contiene monóxido de carbono.

45. El kit de la reivindicación 44, en donde el dispositivo de angioplastia es capaz de administrar monóxido de carbono a un paciente.

46. El kit de la reivindicación 44, que comprende además:

(c) instrucciones para uso de la composición de monóxido de carbono en un método para desarrollar angioplastia en un paciente.

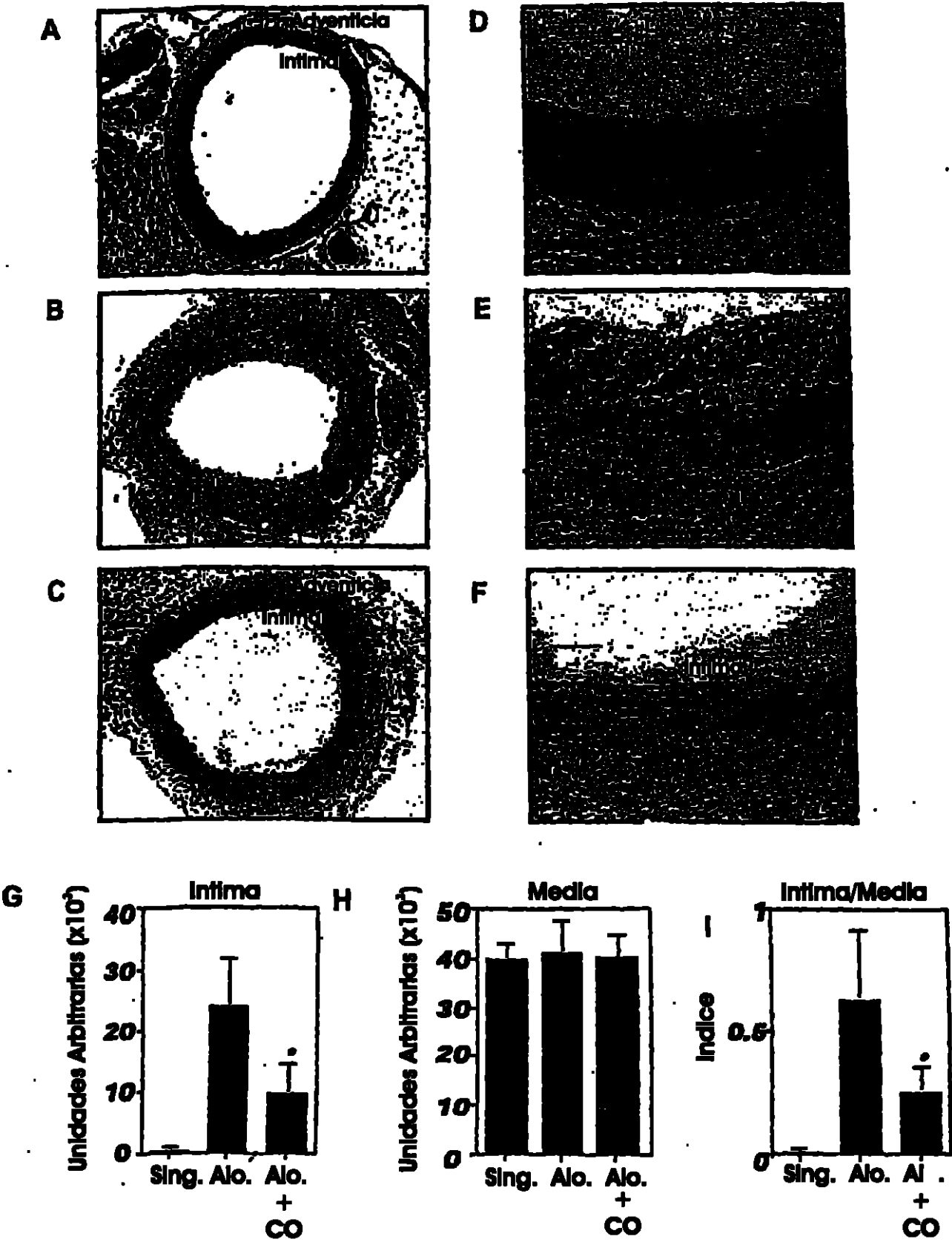
47. El kit de la reivindicación 44, en donde la composición de monóxido de carbono es una composición líquida.

48. El kit de la reivindicación 44, en donde la composición de monóxido de carbono es una composición gaseosa.

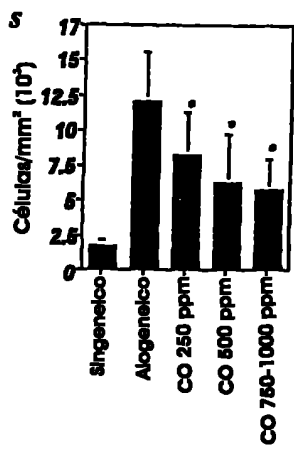
49. Un dispositivo de angioplastia que comprende:

Un miembro inflable que comprende una pluralidad de aberturas; y

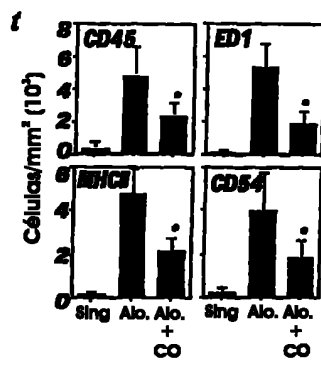
Un reservorio que comprende gas de monóxido de carbono y conectado al miembro inflable durante el inflado del miembro inflable.



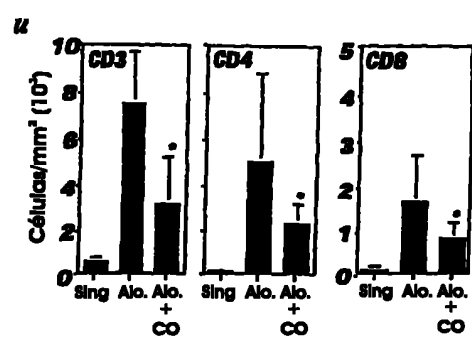
FIGS. 1A-1I



2A



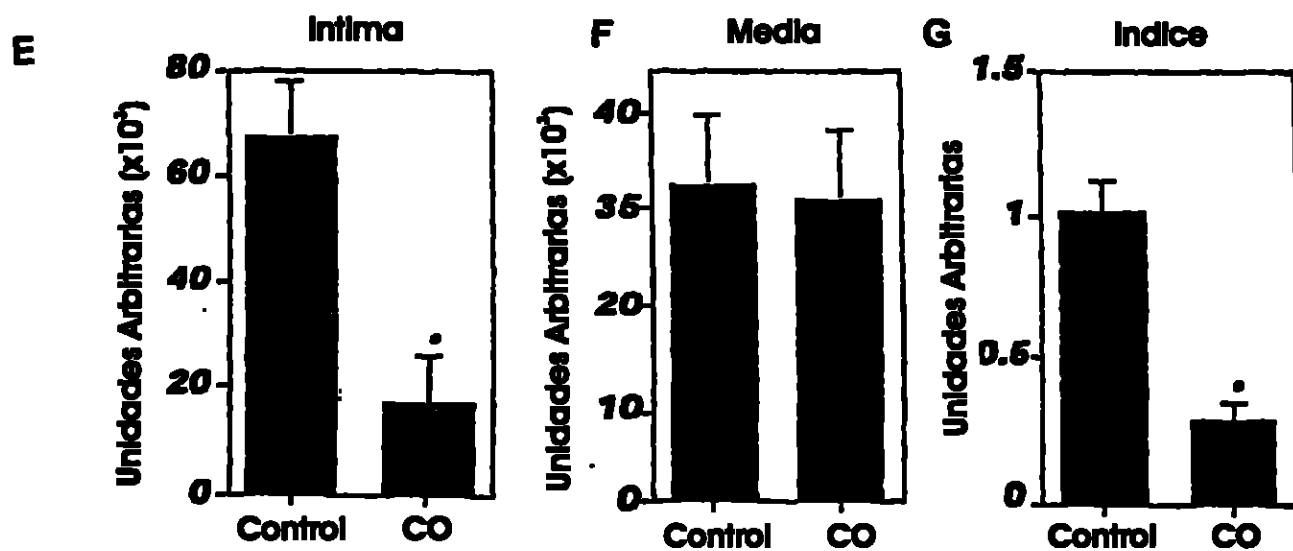
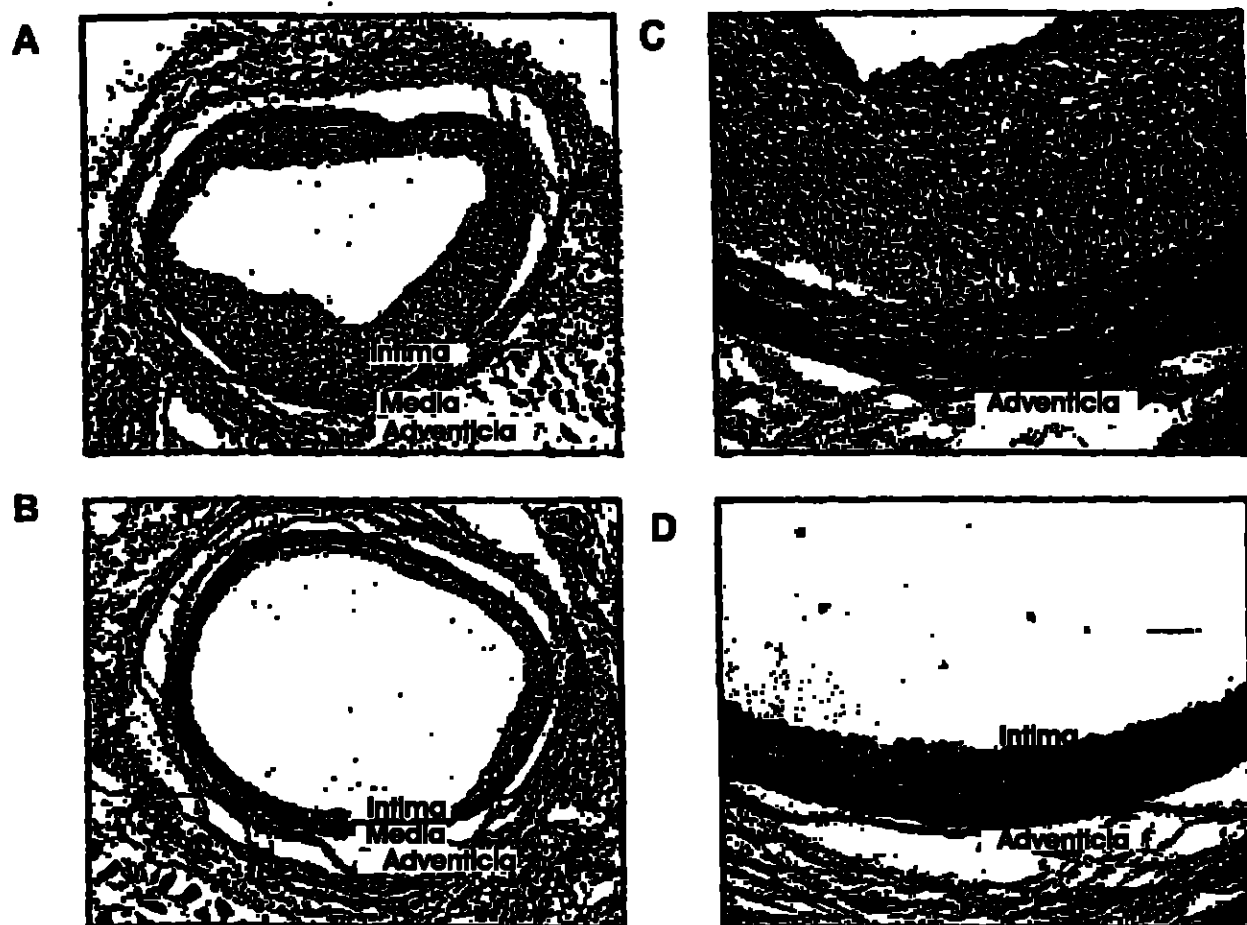
2B



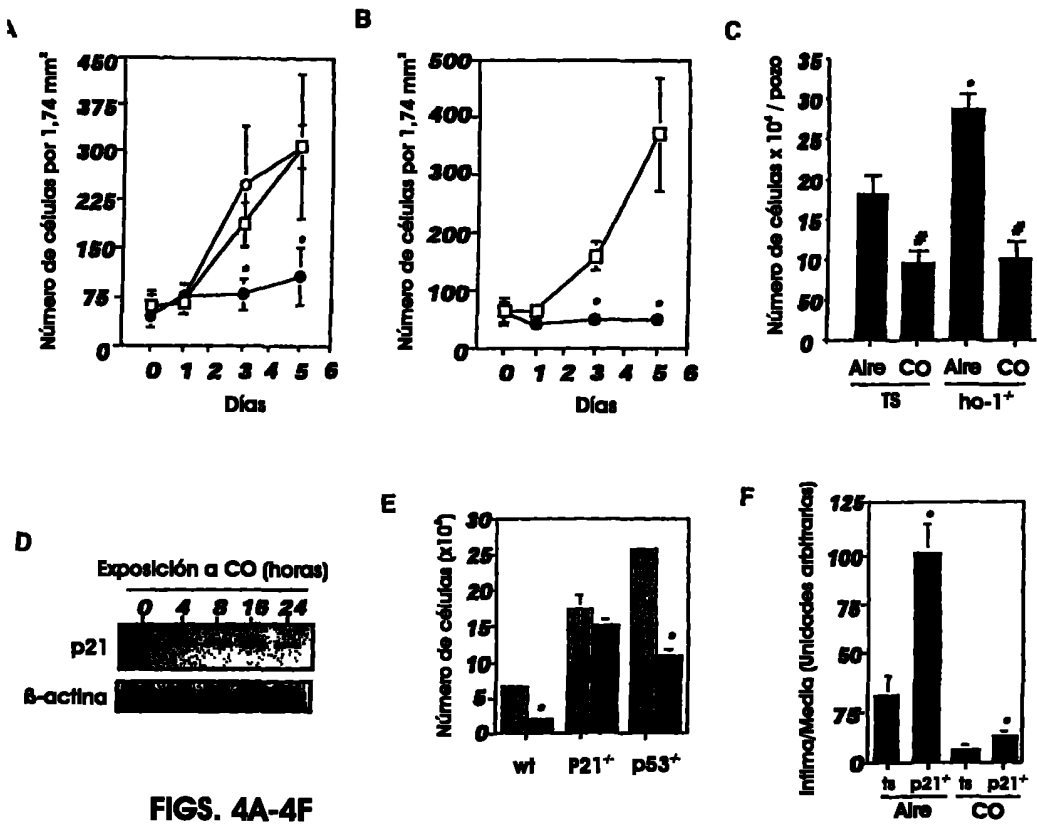
2C

FIGS. 2A-2C

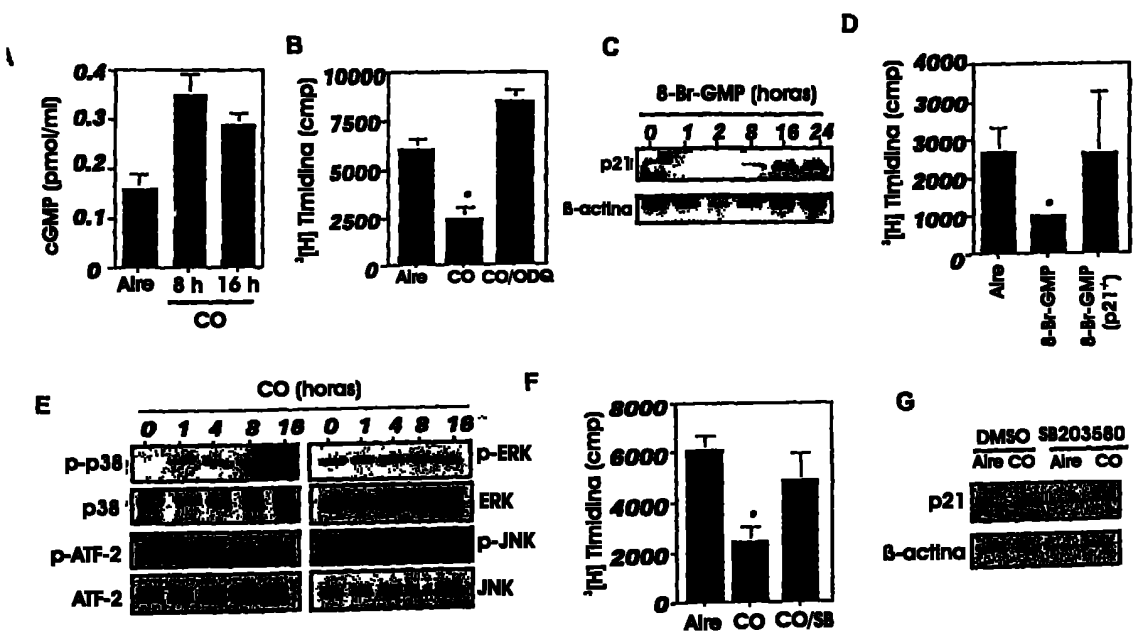
[Handwritten signature]



FIGS. 3A-3G

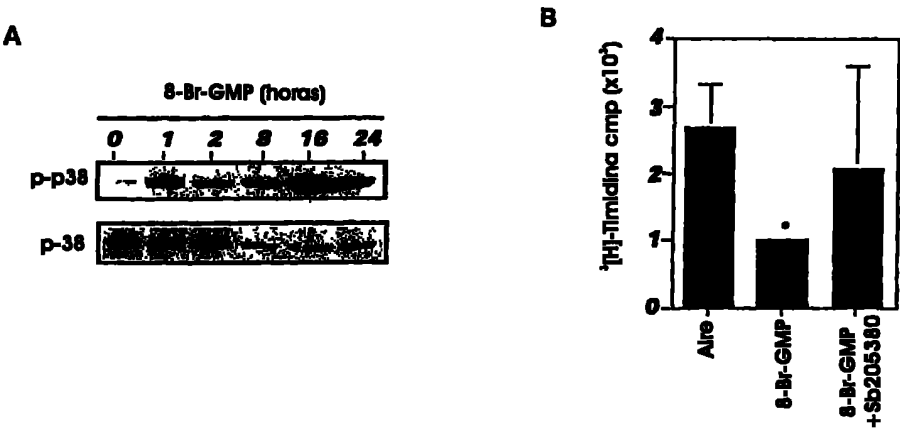


FIGS. 4A-4F



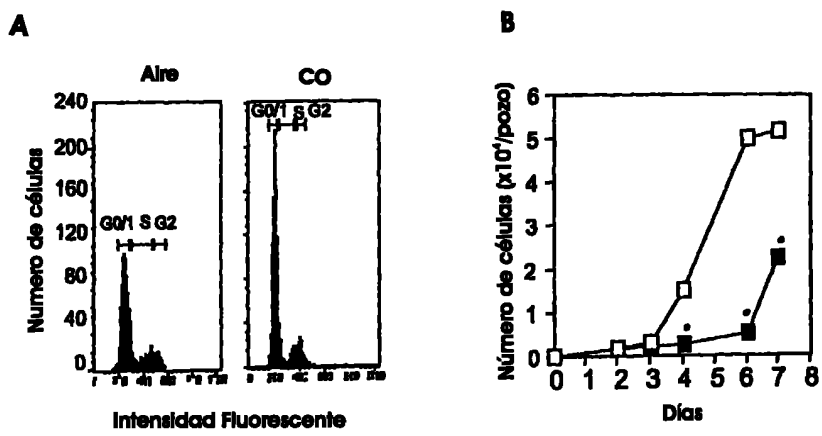
FIGS. 5A-5G

~~169~~



FIGS. 6A-6B

[Handwritten signature]



FIGS. 7A-7B

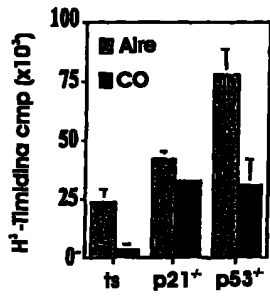


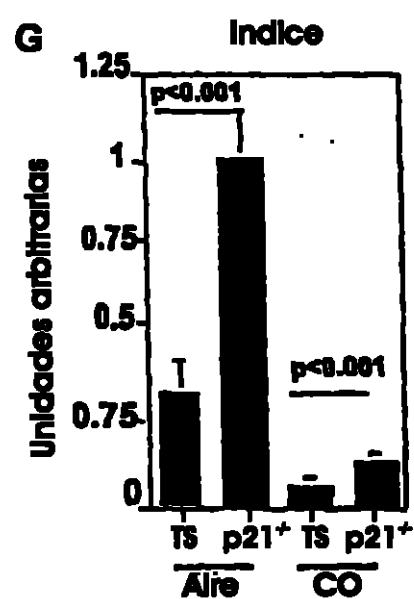
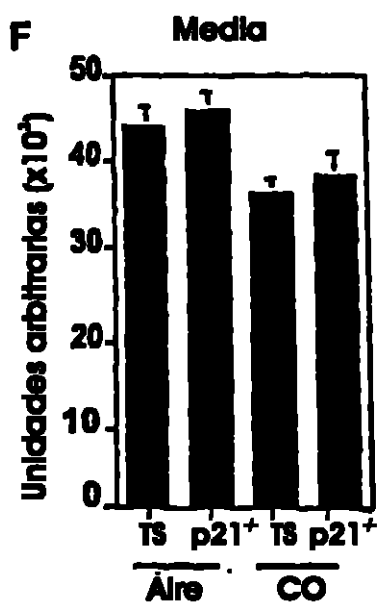
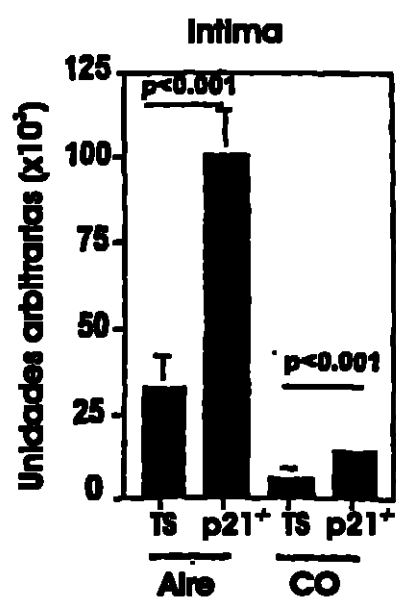
FIG. 8

Tipo silvestre

p21⁺

Alre

8

E

FIGS. 9A-9G

123

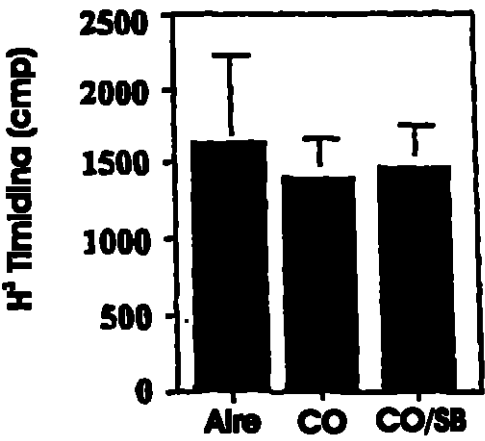
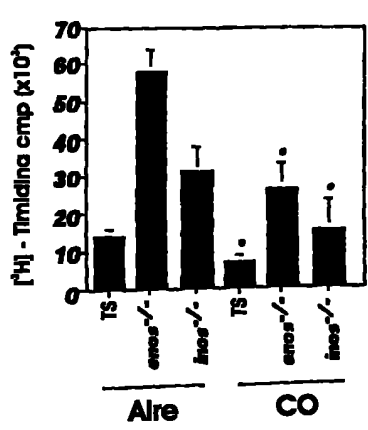
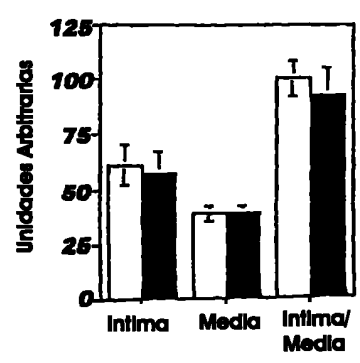


FIG. 10

A

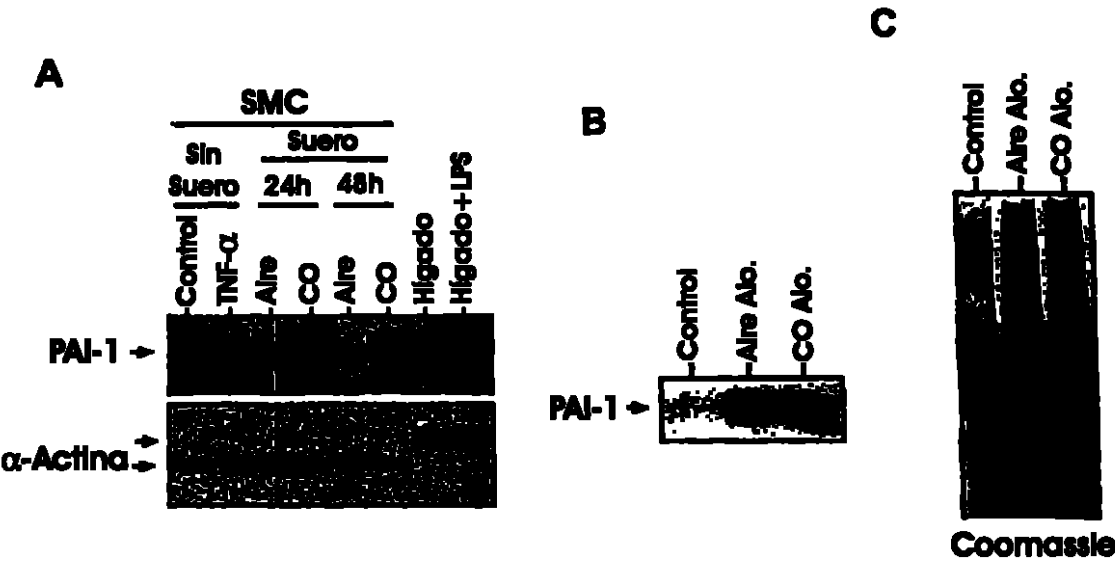


B



FIGS. 11A-11B

725



FIGS. 12A-12C

176

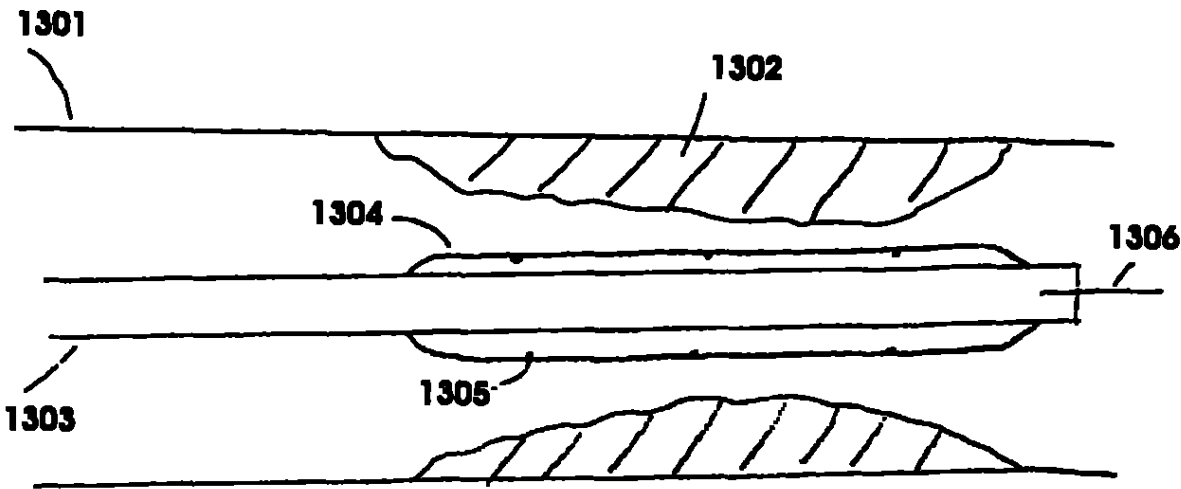


FIG. 13A

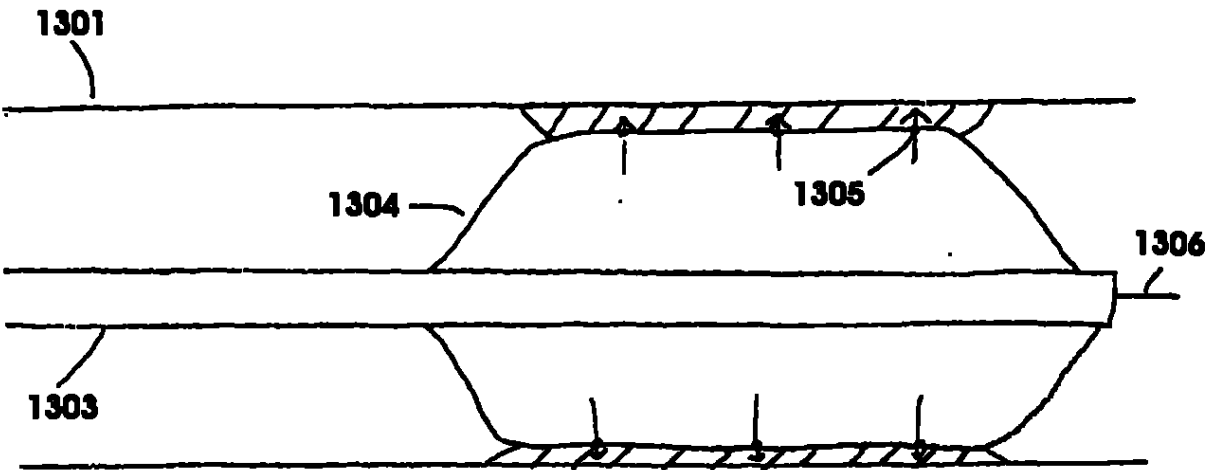


FIG. 13B

123

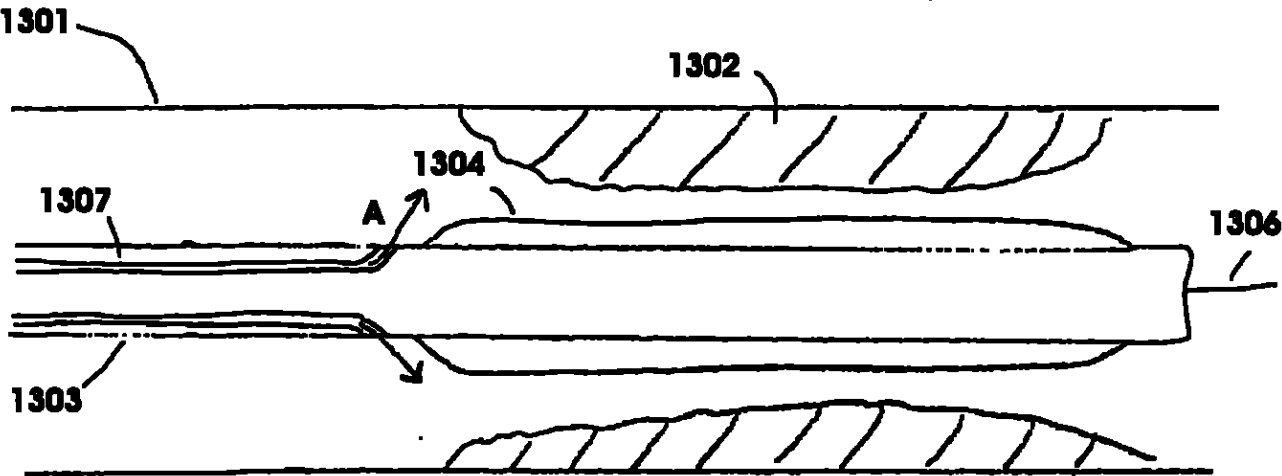


FIG. 13C

128

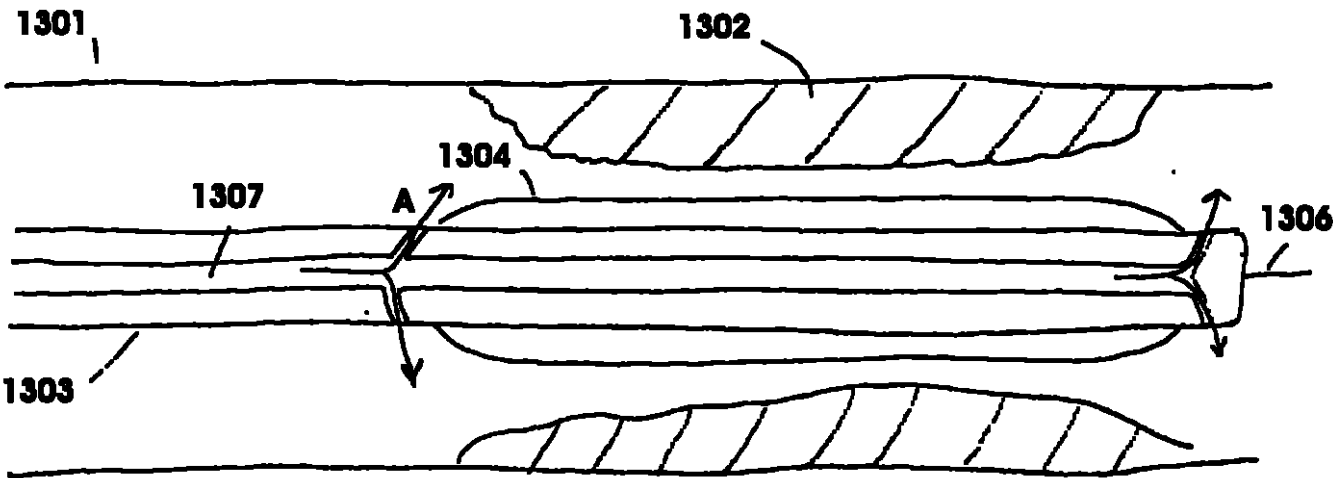


FIG. 13D

FIG. 14A

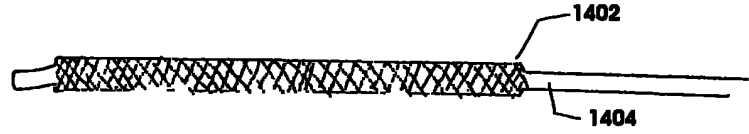


FIG. 14B

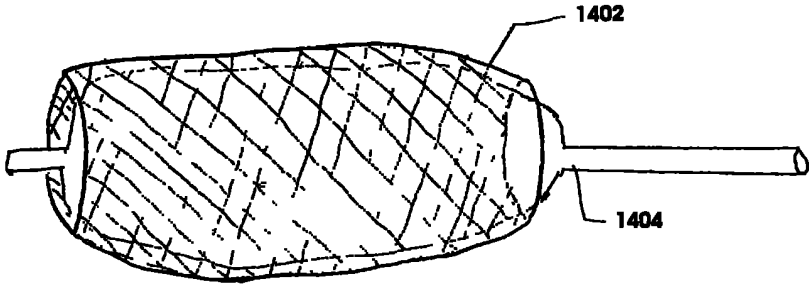
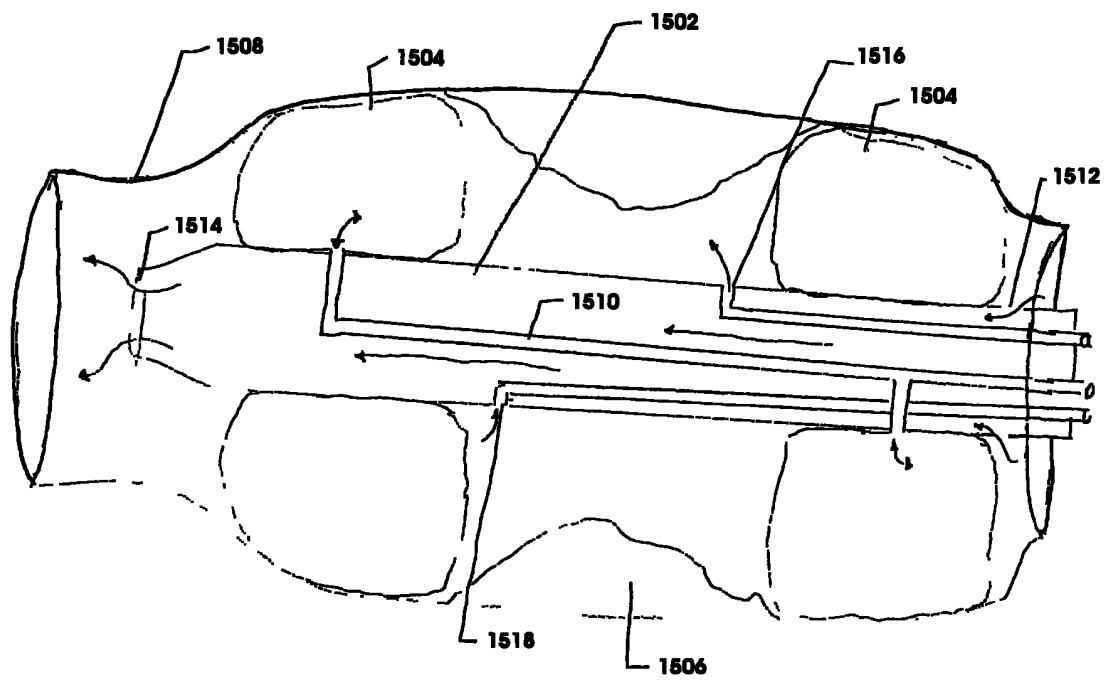
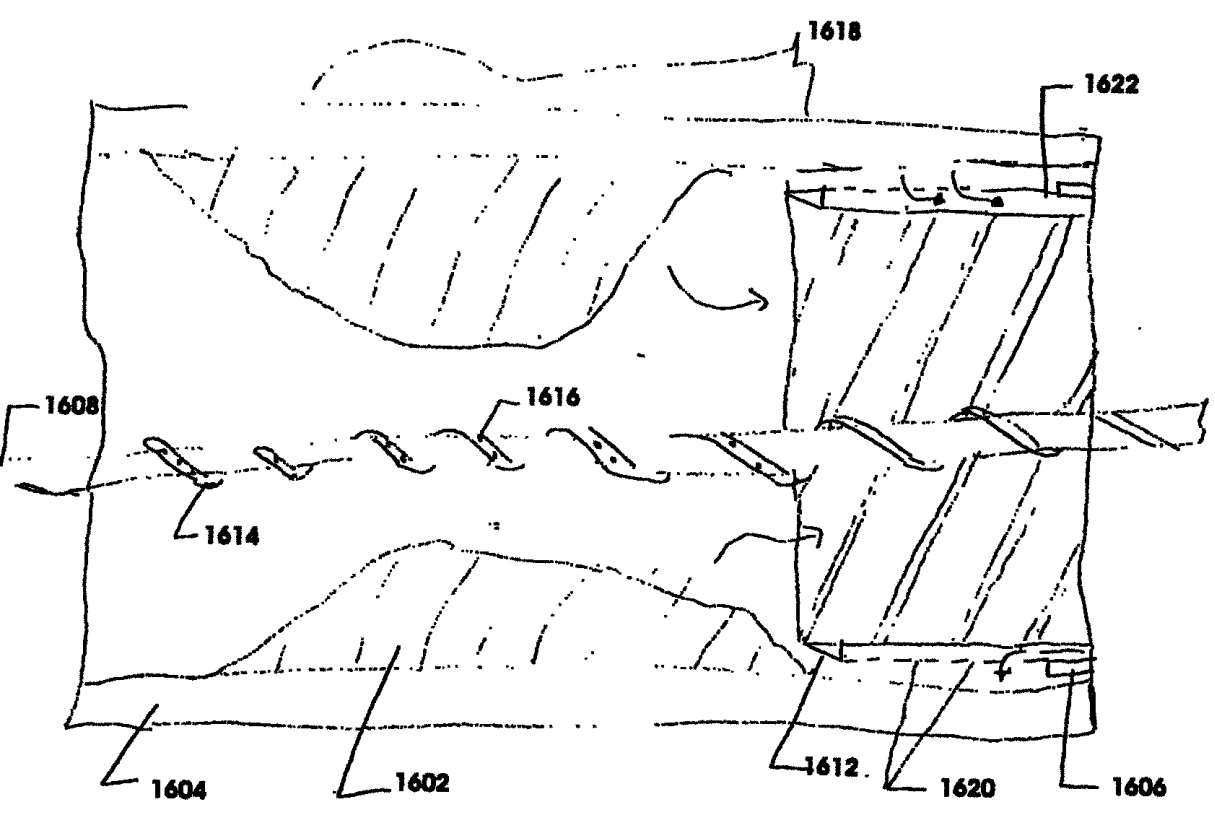


FIG. 15



181

FIG. 16



RECEIVED

AUG 25 2003

182

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

FISH & RICHARDSON, P.C.
BOSTON OFFICE

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

To:
JANIS K. FRASER
FISH & RICHARDSON P.C.
225 FRANKLIN STREET
BOSTON, MA 02110

SEARCHED 1807 10/22/03
Foreign: 646/05021 11/22/03

Date of Mailing
(day/month/year)

Applicant's or agent's file reference
14022-008WO1

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US03/04665

International filing date
(day/month/year)

13 February 2003 (13.02.2003)

Applicant
BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

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

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

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

Docketed By Billing Secretary
Due Date: 10/22/03
Deadline: 11/22/03
Initials: R. D.

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

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

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

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

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

RECEIVED
AUG 27 2003
TODD E. GARCIA
DELLA MAE COLLINS
PARALEL SPECIALIST
TECHNOLOGY CENTER 1000

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer
Raymond J. Henley III
Telephone No. 703-305-4435

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
JANIS K. FRASER
FISH & RICHARDSON P.C.
225 FRANKLIN STREET
BOSTON, MA 02110

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Applicant's or agent's file reference 14022-008WO1	Date of Mailing (day/month/year) 22 AUG 2003
International application No. PCT/US03/04665	International filing date (day/month/year) 13 February 2003 (13.02.2003)
Applicant BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

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

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

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

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

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

- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

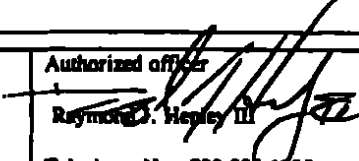
4. **Readers**

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

Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1430 Alexandria, Virginia 22313-1430 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer  Raymond J. Hapley III Telephone No. 703-305-1435
--	---

Form PCT/ISA/220 (April 2002)

DELLA MAE COLLINS
PARALEL SPECIALIST
TECHNOLOGY CENTER 1000
(See notes on accompanying sheet)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 14022-008WO1	FOR FURTHER ACTION	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US03/04665	International filing date (day/month/year) 13 February 2003 (13.02.2003)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 13 February 2002 (13.02.2002)
Applicant BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.		

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

This international search report consists of a total of 2 sheets.



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

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.



the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:



contained in the international application in written form.



filed together with the international application in computer readable form.



furnished subsequently to this Authority in written form.



furnished subsequently to this Authority in computer readable form.



the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.



the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box II).

4. With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



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

5. With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



because the applicant failed to suggest a figure.



because this figure better characterizes the invention.



None of the figures

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/04665¹

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 33/00

US CL : 424/699

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/699

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,180,366 A (WOODS) 19 January 1993 (19.01.93), see the entire document.	1-49
A	US 5,449,665 A (SOLEVI) 12 September 1995 (12.09.95), see the entire document.	1-49

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 June 2003 (09.06.2003)

Date of mailing of the international search report

22 AUG 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US

Commissioner for Patents

P.O. Box 1430

Alexandria, Virginia 22313-1430

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Raymond J. Henley Jr.

Telephone No. 703-308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

DELLA MAE COLLINS
PARALEGAL SPECIALIST
TECHNOLOGY CENTER 1000

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty and of the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the PCT Applicant's Guide, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except when, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only.

What parts of the international application may be amended ?

The claims only.

The description and the drawings may only be amended during international preliminary examination under Chapter II.

When ? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 36 months from the priority date, whichever date first expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where and to file the amendments ?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been filed, see below.

How ? Either by cancelling one or more earlier claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendment, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

What documents must/may accompany the amendments ?

Letter (Section 205(h)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confounded with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statements under Article 19(1)").

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

The statement should be brief, it should not exceed 300 words if in English or if translated into English.

It should not be confounded with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)".

It should not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. References to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report, may be made only in connection with an amendment of that claim.

In what language?

The amendments must be made in the language in which the international application is published. The letter and any statement accompanying the amendments must be in the same language as the international application if that language is English or French; otherwise, it must be in English or French, at the choice of the applicant.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed?

If, at the time of filing any amendments under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the same time of filing the amendments with the International Bureau, also file a copy of such amendments with the International Preliminary Examining Authority (see Rule 62.2(a), first sentence).

Consequences with regard to translation of the international application for entry into the national phase?

The applicant's attention is drawn to the fact that, where upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL
TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable



Fecha

2020
Bogotá D C

Doctor(a) Oficio N° 66481
DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN
Apoderado
BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.
UNIVERSITY OF PITTSBURG OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF
HIGHER EDUCATION 572

ASUNTO:

Radicación N°	04-84713
Solicitud internacional	PCT/US03/04665
Fecha inicio fase nacional	13/09/2004
Trámite	011
Evento	379
Actuación	416
Folios	002

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene copia del documento en que consta la cesión del derecho de patente del inventor al solicitante o a su causante (Art. 26-k) Decisión 486).
- La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando éste fuere una persona jurídica.
- El solicitante debe presentar un nuevo título, que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente (Regla 4.3 PCT, Art. 27, 27 Decisión 486, Circular Única 5.2.9).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Conmutador: 3 820840 Fax: 3 505220
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 3153265 al 69
Fax: 3 505220. Línea 9800-910 165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,

202044