



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **87438** (13) **C2**
(51) МПК (2009)
A61K 33/00
A61K 9/08
A61K 9/72
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ АБО ПРОФІЛАКТИКИ РАКУ, СПОСІБ ПРОВЕДЕННЯ ХІРУРГІЧНОЇ ОПЕРАЦІЇ ПО ВИДАЛЕННЮ РАКУ ТА ЗАСТОСУВАННЯ МОНООКИСУ ВУГЛЕЦЮ

1

2

(21) a200500061
(22) 05.06.2003
(24) 27.07.2009
(86) PCT/US03/17731, 05.06.2003
(31) 60/386,561
(32) 05.06.2002
(33) US
(46) 27.07.2009, Бюл.№ 14, 2009 р.
(72) ОТТЕРБАЙН ЛЕО Е., US, ЧОІ ОГАСТІН М.К., US
(73) ЙЄЙЛ ЮНІВЕРСІТІ, US, ЮНІВЕРСІТІ ОФ ПІТ-ТСБУРГ ОФ ДЗЕ КОММОНВЕЛТ СІСТЕМ ОФ ХАЙЕР ЕДЬЮКЕЙШН, US
(56) US 6069132 A 30.05.2000
WO 9947512 A1, 23.09.1999
WO 9808523 A1, 05.03.1998
OTTERBEIN L.E. ET AL. / Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway // NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US. - vol. 6, no. 4. - April 2000 (2000-04), P. 422-428
SUGANUMA M. ET AL. / A new process of cancer prevention mediated through inhibition of tumor necrosis factor alpha expression // CANCER RESEARCH/ - vol. 56, no. 16. - 1996. - P. 3711-3715
LIU YUXIANG; CHRISTOU HELEN; MORITA TOSHISUKE; LAUGHNER ERIK; SEMENZA GREGG L; KOUREMBANAS STELLA / Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer // JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY/ - vol. 273, no. 24. - 12 June 1998 (1998-06-12). - P. 15257-15262
GOLDBERG MARK A., SCHNEIDER THOMAS J. / Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin // JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. - vol. 269, no. 6. - 11 February 1994 (1994-02-11). - P. 4355-4359
JADWIGA JOSKO, BOLESŁAW GWOZDZ, HALINA JEDRZEJOWSKA-SZYPULKA, STANISŁAW HENDRYK / Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis // MEDICAL

SCIENCE MONITOR. - vol. 6, no. 5. - 2000. - P. 1047-1052
HARMEY JUDITH H., BOUCHIER-HAYES DAVID / Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: Implications for anti-angiogenic therapy // BIOESSAYS. - vol. 24, no. 3. - March 2002 (2002-03). - P. 280-283
(57) 1. Спосіб лікування або профілактики раку, що природно виникає, у пацієнта, який включає в себе:
введення пацієнту, у якого діагностовано рак, який природно виник, або який має ризик його розвитку, терапевтично ефективної кількості композиції, яка містить моноокис вуглецю.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що композиція має газоподібну форму і вводиться пацієнту шляхом інгаляції.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що композиція має газоподібну форму і вводиться пацієнту місцево в орган, відмінний від легень пацієнта.
4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що композиція має газоподібну форму і вводиться в черевну порожнину пацієнта.
5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що композиція має рідку форму і вводиться пацієнту перорально.
6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що композиція має рідку форму і вводиться місцево у той або інший орган пацієнта.
7. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що композиція має рідку форму і вводиться в черевну порожнину пацієнта.
8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що пацієнт раніше зазнавав хірургічної операції по видаленню ракової тканини.
9. Спосіб за п. 1, який додатково включає в себе проведення хірургічної операції по видаленню у пацієнта ракової тканини.
10. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що введення відбувається під час хірургічної операції по видаленню ракової тканини.

(19) **UA** (11) **87438** (13) **C2**

11. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що пацієнт раніше зазнавав хіміотерапії або променевої терапії.

12. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що додатково включає в себе проведення хіміотерапії або променевої терапії пацієнту для лікування раку.

13. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що введення відбувається під час хіміотерапії або променевої терапії для лікування раку.

14. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що пацієнтом є людина.

15. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що рак являє собою рак, що природно виникає в частині організму пацієнта, вибраній з групи, яка складається зі шлунка, ободової кишки, прямої кишки, рота/глотки, стравоходу, гортані, печінки, підшлункової залози, легені, молочної залози, шийки матки, матки, яєчників, передміхурової залози, яєчок, сечового міхура, шкіри, кістки, нирки, мозку/центральної нервової системи, голови, шиї та горла.

16. Спосіб проведення хірургічної операції по видаленню раку, що природно виник у пацієнта, який включає в себе:

(a) ідентифікацію у пацієнта щонайменше одного органа, який має ракову тканину, що природно виникла;

(b) проведення хірургічної операції по видаленню у пацієнта щонайменше частини ракової тканини; і

(c) перед, під час або після стадії (b) введення пацієнту терапевтично ефективної кількості композиції, яка містить моноокис вуглецю.

17. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що композицію вводять перед стадією (b).

18. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що композицію вводять під час стадії (b).

19. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що композицію вводять після стадії (b).

20. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що композицію вводять перед, під час і після стадії (b).

21. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що композиція має газоподібну форму і вводиться пацієнту шляхом інгаляції.

22. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що композиція має газоподібну форму і вводиться місцево в ділянку, піддану хірургічній операції.

23. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що композиція має рідку форму і вводиться пацієнту перорально.

24. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що композиція має рідку форму і вводиться місцево в той або інший орган пацієнта.

25. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що рак являє собою рак, що природно виникає в частині організму пацієнта, вибраній з групи, яка складається зі шлунка, ободової кишки, прямої кишки, рота/глотки, стравоходу, гортані, печінки, підшлункової залози, легені, молочної залози, шийки матки, матки, яєчників, передміхурової залози, яєчок, сечового міхура, шкіри, кістки, нирки, мозку/центральної нервової системи, голови, шиї та горла.

26. Спосіб лікування або профілактики раку, що природно виник, у пацієнта, який включає в себе:

(a) ідентифікацію пацієнта, який страждає від раку, що природно виник, або має ризик його розвитку;

(b) підведення резервуара, який містить газ, що знаходиться під тиском, який містить газоподібний моноокис вуглецю;

(c) вивільнення газу, що знаходиться під тиском, з резервуара зі створенням атмосфери, яка містить газоподібний моноокис вуглецю; і

(d) вміщення пацієнта в атмосферу, в якій міститься кількість моноокису вуглецю, достатня для лікування або профілактики раку у пацієнта.

27. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що пацієнта піддають впливу атмосфери безперервно щонайменше протягом однієї години.

28. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що пацієнта піддають впливу атмосфери безперервно щонайменше протягом шести годин.

29. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що пацієнта піддають впливу атмосфери безперервно щонайменше протягом 24 годин.

30. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що пацієнта піддають впливу вказаної атмосфери безперервно щонайменше протягом трьох днів.

31. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що пацієнта піддають впливу вказаної атмосфери безперервно або в переміжному режимі протягом періоду щонайменше в один тиждень.

32. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що пацієнта піддають впливу вказаної атмосфери безперервно або в переміжному режимі протягом періоду щонайменше в чотири тижні.

33. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що пацієнта піддають впливу вказаної атмосфери безперервно або в переміжному режимі протягом періоду щонайменше в один рік.

34. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що рак являє собою рак, що природно виникає в частині організму пацієнта, вибраній з групи, яка складається з шлунка, ободової кишки, прямої кишки, рота/глотки, стравоходу, гортані, печінки, підшлункової залози, легені, молочної залози, шийки матки, матки, яєчників, передміхурової залози, яєчок, сечового міхура, шкіри, нирки, мозку/центральної нервової системи, голови, шиї та горла.

35. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що концентрація моноокису вуглецю в атмосфері складає приблизно від 0,01 мас. % і приблизно до 0,22 мас. %.

36. Спосіб за п. 26, який **відрізняється** тим, що пацієнтом є людина.

37. Спосіб лікування або профілактики раку у пацієнта, який включає в себе введення пацієнту, у якого діагностовано рак, що природно виник, або який має ризик його розвитку, терапевтично ефективної кількості композиції, яка містить моноокис вуглецю, де пацієнт не є представником гризунів.

38. Спосіб лікування або профілактики раку у людини, який включає в себе введення людині, у якої діагностовано рак, що природно виник, або яка має ризик його розвитку, терапевтично ефективної кількості композиції, яка містить моноокис вуглецю.

39. Спосіб лікування раку у пацієнта, який включає в себе визначення того, чи експресують ракові клітини пацієнта p21, і введення пацієнту терапев-

тично ефективної кількості композиції, яка містить моноокис вуглецю, якщо ракові клітини експресують p21.

40. Застосування моноокису вуглецю для одержання фармацевтичної композиції для лікування або профілактики раку, який природно виникає у пацієнта.

41. Застосування за п. 40, яке **відрізняється** тим, що композиція має газоподібну форму.

42. Застосування за п. 40, яке **відрізняється** тим, що композиція має рідку форму.

43. Застосування за п. 40, яке **відрізняється** тим, що пацієнт раніше піддавався хірургічній операції по видаленню ракової тканини.

44. Застосування за п. 40, яке **відрізняється** тим, що пацієнт раніше піддавався хіміотерапії або променевій терапії.

45. Застосування за п. 40, яке **відрізняється** тим, що рак являє собою рак, який природно виникає у частині організму пацієнта, вибраній з групи, яка складається зі шлунка, ободової кишки, прямої кишки, рота/глотки, стравоходу, гортані, печінки, підшлункової залози, легені, молочної залози, шийки матки, матки, яєчників, передміхурової залози, яєчок, сечового міхура, шкіри, кістки, нирки, мозку/центральної нервової системи, голови, ший і горла.

46. Застосування за будь-яким з пп. 40-45, яке **відрізняється** тим, що пацієнтом є людина.

У даній заявці заявляється пріоритет за попередньою заявкою на патент США No. 60/386561, поданою 5 червня 2002 року, яка включена у даний опис як посилання в усій своїй повноті.

Даний винахід одержаний на основі результатів досліджень, проведених при фінансовій підтримці уряду, в рамках грантів Національного Інституту Охорони здоров'я No. HL 55330, HL 60234 та AI 42365. Уряд має певні права на даний винахід.

Даний винахід відноситься в основному до лікування раку та ангіогенезу.

Газоподібний моноокис вуглецю у високих концентраціях отруйний. Однак у наш час він розглядається як важлива сигнальна молекула [Verma et al., Science 259:381-384, 1993]. У зв'язку з цим було висловлене припущення, що моноокис вуглецю діє як молекула нейронального переносника в мозку (Id.) і як нейроендокринний модулятор у гіпоталамусі [Pozzoli et al., Endocrinology 735: 2314-2317, 1994]. Як і окис азоту (NO), моноокис вуглецю являє собою релаксant гладких м'язів [Utz et al., Biochem Pharmacol. 47:195-201, 1991; Christodoulides et al., Circulation 97:2306-9, 1995] і інгібує агрегацію тромбоцитів [Mansouri et al., Thromb Haemost. 48:286-8, 1982]. На деяких моделях було показано, що вдихання невеликих кількостей моноокису вуглецю (CO) надає протизапального впливу.

Рак являє собою захворювання, що характеризується проліферацією клітин, яка порушує системи клітинної регуляції. Порушення систем клітинної регуляції може призвести до нерегульованого росту клітин, втрати клітинного диференціювання, локальної інвазії клітин в тканини і до метастазів. Лікування пухлин, що вже є, і ракових клітин (метастазів), що поширюються, являє собою фундаментальну проблему клінічної медицини.

Ангіогенез означає утворення нових капілярів в кровоносній системі і є важливим компонентом патологічних процесів, таких як хронічне запалення, деякі імунні реакції і рак. Ангіогенез представлений також в нормальних процесах, таких як ембріональний розвиток та загоєння ран.

Даний винахід оснований частково на відкритті того факту, що введення CO може інгібувати ріст пухлинних клітин in vitro і суцільних пухлин in vivo.

Крім того, було показано, що введення CO може приглушувати ангіогенез. Даний винахід відноситься, наприклад, до способів лікування пухлин і метастазів з використанням фармацевтичних композицій, які містять CO.

Відповідно, даний винахід відноситься до способу лікування раку, профілактики раку або зниження ризику розвитку раку, наприклад, раку, що природно виникає у пацієнта. Даний спосіб включає в себе введення (і/або призначення) певному пацієнту (тобто пацієнту з встановленим діагнозом), який страждає від раку (або має підвищений ризик розвитку раку) терапевтично ефективною кількістю композиції, яка містить моноокис вуглецю.

Фармацевтична композиція, яка використовується в такому або будь-яких інших способах лікування, описаних нижче, може мати газоподібну або рідку форму і може бути введена пацієнту будь-яким відомим у даній галузі способом, що застосовується для введення газів та рідин пацієнтам, наприклад, шляхом інгаляції, інсуфляції, інфузії, ін'єкції і/або проковтування. В одному варіанті здійснення даного винаходу фармацевтична композиція має газоподібну або рідку форму (наприклад, має вигляд аерозолі або будь-якого іншого розчину, який розпилюється або розбризкується) і вводиться пацієнту шляхом інгаляції. У рідкій формі фармацевтична композиція може також вводитися пацієнту перорально. В іншому варіанті здійснення даного винаходу фармацевтична композиція має газоподібну і/або рідку форму і вводиться місцево в той або інший орган пацієнта. У ще одному варіанті здійснення даного винаходу фармацевтична композиція має газоподібну і/або рідку форму і вводиться безпосередньо в черевну порожнину пацієнта. Фармацевтична композиція може також вводитися пацієнту за допомогою пристрою для здійснення газообміну, що функціонує на основі екстракорпоральної мембрани або за допомогою штучної легені.

Способи, що розглядаються, можуть використовуватися самі по собі або в поєднанні з іншими способами лікування раку у пацієнтів. Відповідно, в рамках іншого варіанту, наведені у даному описі способи можуть включати в себе лікування пацієнта хірургічним шляхом (наприклад, з метою видалення пухлини або її частини), методами хіміоте-

рапії, імунотерапії, генної терапії і/або променевої терапії. Описана фармацевтична композиція, яка містить моноокис вуглецю, може бути введена пацієнту в будь-який час, наприклад, до, під час або після хірургічного втручання, хіміотерапії, імунотерапії, генної терапії і/або променевої терапії.

Пацієнт, що розглядається, може являти собою тварину, а саме, людину або відмінну від людини тварину, може бути представником гризунів або відмінною від гризунів твариною. Наприклад, пацієнт, що розглядається, може бути будь-яким ссавцем, наприклад, людиною, іншим представником приматів, свинею, гризуном, таким як пацюк або миша, кроликом, морською свинкою, хом'ячком, коровою, конем, кішкою, собакою, вівцею або козою або твариною, відмінною від ссавця, такою як птах. Рак може являти собою результат розвитку множини факторів, наприклад, канцерогенезу, інфекцій, наприклад, вірусних інфекцій, опромінення і/або може характеризуватися розвитком спадкової схильності або може являти собою варіант проміжного походження. Фармацевтична композиція може мати будь-яку форму, наприклад, газоподібну або рідку форму.

Наведені у даному описі способи можуть здійснюватися в поєднанні щонайменше з одним з наведених варіантів лікування: індукцією НО-1 або феритину у пацієнта; експресією НО-1 або феритину у пацієнта; і введенням пацієнту фармацевтичної композиції, яка включає в себе НО-1, білірубін, білівердин, феритин, залізо, десфераксамін, декстран заліза і/або апоферитин.

Даний винахід також відноситься до способу лікування раку у пацієнта, який включає в себе визначення для даного пацієнта того, чи експресують його ракові клітини p21, і потім введення вказаному пацієнту терапевтично ефективної кількості композиції, яка містить моноокис вуглецю, якщо ракові клітини експресують p21. Спосіб може необов'язково включати в себе стадію ідентифікації (наприклад, діагностики) пацієнта, хворого раком.

Даний винахід також включає в себе спосіб проведення пацієнту курсу хіміотерапії, імунотерапії, генної терапії і/або променевої терапії. Спосіб включає в себе проведення хіміотерапії, імунотерапії, генної терапії і/або променевої терапії пацієнту. Спосіб може необов'язково включати в себе стадію ідентифікації (наприклад, діагностики) пацієнта як пацієнта, який потребує хіміотерапії, імунотерапії, генної терапії і/або променевої терапії.

Даний винахід також відноситься до способу проведення хірургічної операції для видалення раку, наприклад, раку, що природно виник у пацієнта. Спосіб включає в себе ідентифікацію пацієнта, який потребує проведення хірургічної операції для видалення у нього раку, і/або ідентифікацію у пацієнта щонайменше одного органу, що містить ракову тканину, проведення хірургічної операції

пацієнту для видалення ракової тканини і введення пацієнту (або системно (наприклад, шляхом інгаляції), або локально, в осередку, розрізаному під час хірургічного втручання) терапевтично ефективної кількості композиції, яка містить моноокис вуглецю. Композиція може бути введена в будь-якій часовій точці здійснення даної процедури, наприклад, перед і/або під час і/або після проведення хірургічної операції пацієнту.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до способу лікування або здійснення профілактики (наприклад, зниження ризику розвитку) раку у пацієнта, який включає в себе ідентифікацію пацієнта, який страждає від раку або має ризик розвитку раку, шляхом підведення резервуара, який містить газ, що знаходиться під підвищеним тиском, який містить газоподібний моноокис вуглецю, з подальшим вивільненням стиснутого газу з вказаного резервуара, з утворенням атмосфери, яка містить газоподібний моноокис вуглецю, і поміщення пацієнта в дану атмосферу, де кількість моноокису вуглецю в атмосфері є достатньою для лікування або зниження ризику розвитку раку.

Пацієнт може зазнавати впливу фармацевтичної композиції або СО-вмісної атмосфери протягом будь-якого періоду часу, включаючи невизначений період часу. Переважні періоди часу включають в себе щонайменше одну годину, наприклад, щонайменше шість годин, щонайменше один день, щонайменше один тиждень, два тижні, чотири тижні, шість тижнів, вісім тижнів, десять тижнів або дванадцять тижнів; щонайменше один рік, щонайменше два роки і щонайменше п'ять років. Пацієнт може зазнавати впливу даної атмосфери постійно або з перервами протягом таких періодів.

В описаних у даному описі способах рак може являти собою рак, виявлений в будь-якій(их) ділянці(ях) організму пацієнта, наприклад, рак шлунку, рак тонкої кишки, ободової кишки, прямої кишки, рота/глотки, стравоходу, гортані, печінки, підшлункової залози, легені, молочної залози, шийки матки, матки, яєчників, передміхурової залози, яєчок, сечового міхура, шкіри, нирок, мозку/центральної нервової системи, голови, шиї, горла або їх будь-якого поєднання.

Концентрація моноокису вуглецю у будь-якому газі, що вдихується, може являти собою будь-яку концентрацію, наведену у даному описі, зокрема, приблизно від 0,0001мас.% приблизно до 0,25мас.%. У переважних варіантах здійснення даного винаходу концентрація моноокису вуглецю у газі, що вдихується, складає приблизно від 0,005мас.% до 0,24мас.%, або приблизно від 0,01мас.% до 0,22мас.%. Більш переважно концентрація моноокису вуглецю у газі, що вдихується, складає приблизно від 0,025мас.% до 0,1мас.%.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до способу лікування небажаного ангіогенезу у пацієнта. Даний спосіб включає в себе введення пацієнту, якому встановлений діагноз небажаного ангіогенезу або який має ризик його розвитку, терапевтично ефективної кількості композиції, яка містить моноокис вуглецю. Спосіб може необов'язково включати в себе стадію ідентифікації (наприклад, встановлення діагнозу) пацієнта як пацієнта,

який страждає від небажаного ангіогенезу або має ризик його розвитку.

Композиція може мати газоподібну форму і може бути введена пацієнту шляхом інгаляції, місцево в той або інший орган пацієнта і/або в черевну порожнину пацієнта. В іншому варіанті здійснення даного винаходу композиція може мати рідку форму і вводиться пацієнту перорально, місцево, в той або інший орган пацієнта і/або в черевну порожнину пацієнта.

У ще одному аспекті даний винахід відноситься до способу лікування стану, асоційованого з небажаним ангіогенезом. Спосіб включає в себе введення пацієнту, у якого діагностований стан, пов'язаний з небажаним ангіогенезом, або який має ризик його розвитку, терапевтично ефективної кількості композиції, яка містить моноокис вуглецю, де вказаний стан, пов'язаний з небажаним ангіогенезом, не є раком. Спосіб може необов'язково включати в себе стадію ідентифікації (наприклад, діагностування) пацієнта як пацієнта, який страждає від стану, асоційованого з небажаним ангіогенезом, або має ризик його розвитку. У даному варіанті здійснення винаходу вказаний стан являє собою ревматоїдний артрит, вовчак, псоріаз, діабетичну ретинопатію, синдром Террі, дегенерацію жовтої плями, реакцію відторгнення тканини рогівки, нейроvasкулярну глаукому, ретролєтальну фіброплазію, почервоніння, синдром Ослера-Вебера, ангіогенез міокарда, реваскуляризацію бляшок, телеангієктазію або ангіофіброму або будь-яке їх поєднання.

В іншому аспекті даний винахід відноситься до резервуара, який містить медично чистий газоподібний CO, що знаходиться під підвищеним тиском. Даний резервуар може мати етикетку, що вказує на те, що газ може використовуватися для лікування раку у людини. Альтернативно або в доповнення, резервуар може мати етикетку, що вказує на те, що газ може бути введений пацієнту для лікування у пацієнта (наприклад, з метою профілактики або зниження вираженості патології) небажаного ангіогенезу або стану, асоційованого з небажаним ангіогенезом. Газоподібний CO може подаватися для використання в суміші з газоподібним азотом, газоподібним окисом азоту і газоподібним азотом або з газом, що містить кисень. Газоподібний CO може бути присутнім в суміші в концентрації, що складає щонайменше приблизно 0,025%, включаючи концентрацію, що складає щонайменше приблизно 0,05%, 0,10%, 0,50%, 1,0%, 2,0%, 10%, 50% або 90%.

Даний винахід відноситься також до застосування CO при виробництві лікарського засобу, призначеного для лікування або профілактики стану, описаного у даному винаході, наприклад, раку, небажаного ангіогенезу і/або стану (наприклад, відмінного від раку), асоційованого з небажаним ангіогенезом. Вказаний лікарський засіб може використовуватися в способі лікування раку, наприклад, для профілактики ангіогенезу і/або для лікування стану, асоційованого з небажаним ангіогенезом, відповідно до способу, наведеного у даному описі. Лікарський засіб може бути представлений у будь-якій формі, описаній у даному

винаході, наприклад, у вигляді рідкої або газоподібної композиції, яка містить CO.

Якщо особливо не обумовлено інше, всі технічні і наукові терміни, що використовуються у даному описі, мають значення, загальноприйняте в тій галузі техніки, до якої відноситься даний винахід. Незважаючи на те, що в практиці здійснення або тестування даного винаходу можуть використовуватися способи і матеріали, аналогічні або еквівалентні описаним у даному винаході, нижче наведений ряд відповідних способів та матеріалів. Всі публікації, патентні заявки, патенти та інші матеріали, що цитуються у даному описі, наведені як посилання у всій їх повноті. У неоднозначних випадках у даний опис включені визначення таких термінів для адекватного контролю їх значення. Матеріали, способи та приклади подані лише для ілюстрації, але не з метою обмеження обсягу даного винаходу.

Деталі одного або більше варіантів здійснення даного винаходу наведені нижче в описі і в супроводжуючих його малюнках. Інші особливості, об'єкти та переваги даного винаходу будуть очевидні з наведеного опису і малюнків, а також з прикладної формули винаходу.

Фіг.1 являє собою графік, який ілюструє той факт, що CO інгібує проліферацію клітин мезотеліоми мишей (A549). Зачорнені кружки позначають клітини, що зазнали впливу повітря. Зачорнені квадратики позначають клітини, що зазнали впливу CO. Стрілки вказують часові точки, в яких клітини видаляють з атмосфери, яка містить CO.

Фіг.2 являє собою діаграму, яка показує, що клітини аденокарциноми людини (A549), які були трансфіковані геном HO-1 (який викликає у клітинах надекспресію білка HO-1), демонструють зниження об'єму пухлини у мишей. Wt=клітини дикого типу A549 (контроль); NEO=клітини A549, трансфіковані тільки вектором (контроль); клони A5 та L1 HO-1=дві різних лінії клітин A549, трансфікованих геном HO-1.

Фіг.3 являє собою графік, який показує, що вплив CO подовжує виживаність мишей, яким зробили ін'єкцію летальної кількості клітин мезотеліоми. Зачорненими кружками показані миші, що зазнали впливу повітря. Зачорненими квадратами позначають мишей, що зазнали впливу CO. Стрілка вказує на часову точку, в якій половина мишей, що зазнали CO, була видалена з камери, яка містить CO.

Фіг.4 являє собою графік, який ілюструє той факт, що вплив CO збільшує виживаність мишей, яким були зроблені ін'єкції летальної кількості клітин мезотеліоми, в тому випадку, коли експозиція CO почалася через один тиждень після ін'єкції. Зачорненими кружками показані миші, що зазнали впливу повітря. Зачорненими квадратами означають мишей, що зазнали впливу CO.

Фіг.5 являє собою діаграму, яка показує, що індукована впливом CO зупинка росту клітин A549 залежить від cGMP. Клітини піддають in vitro впливу: повітря; CO; CO+1H-[1,2,4]оксадіазоло[4,3-a]хіноксалін-1-он (ODQ) або CO+Rp-8-бром-cGMP (Rp8-Br).

Фіг.6 являє собою діаграму, яка показує, що індукована впливом CO зупинка росту клітин мен-

ше виражена в клітинах раку ободової кишки людини (НТС), які характеризуються дефіцитом p21. Wt=клітини НТС дикого типу; Wt+CO=клітини дикого типу, що зазнали впливу CO; p21-/-=клітини НТС, дефіцитні по p21; p21 -/+CO=НТС-клітини, дефіцитні по p21, що зазнали впливу CO.

Фіг.7 являє собою діаграму, яка показує, що CO інгібує утворення клітинами A549 фактора росту ендотелію судин (VEGF). Повітря=клітини A549, що зазнали впливу повітря; CO=клітини A549, що зазнали впливу CO.

Фіг.8 являє собою діаграму, яка показує, що об'єм пухлини знижується у мишей, яким були зроблені ін'єкції клітинами A549 і які зазнали впливу CO+повітря (CO), в порівнянні з мишами, яким були зроблені ін'єкції клітинами A549 і які зазнавали впливу тільки повітря (повітря).

Фіг.9А являє собою об'єднану картину імунних блотів, яка показує, що вплив CO на клітини A549 протягом 24-часового періоду викликає зміни експресії p21, p27, проліферації антигену клітинних ядер (PCNA), Cdc25b і цикліну D1. Лінія 1=клітини, що зазнали впливу CO протягом 0 годин, лінія 2=клітини, що зазнали впливу CO протягом 24 годин.

Фіг.9В являє собою картину імунних блотів, яка показує, що вплив CO на клітини A549 протягом періоду часу, що становить 4, 8 і 24 години, викликає зміни в експресії p21.

Термін "моноокис вуглецю" (або CO) в контексті даного опису означає молекулярний моноокис вуглецю в газоподібному стані, стиснутий до рідкої форми або розчинений у водному розчині. Терміни "композиція моноокису вуглецю" та "фармацевтична композиція, яка містить моноокис вуглецю" використовуються у даному описі як указання на газоподібну або рідку композицію, яка містить моноокис вуглецю, яка може бути введена в організм пацієнта і/або в орган, наприклад, в орган, уражений раком. Фахівець, що практикує у даній галузі, може визначити, яка форма фармацевтичної композиції, тобто газоподібна, рідка або поєднання газоподібної або рідкої форм, переважні для даного варіанту застосування.

Терміни "ефективна кількість" та "ефективна для лікування" в контексті даного опису відносяться до кількості або до концентрації моноокису вуглецю, що використовуються протягом певного періоду часу (включаючи гостре або хронічне введення, а також періодичне або безперервне введення), які характеризуються ефективністю при їх введенні з метою індукції запланованого ефекту або фізіологічного результату. Ефективні кількості моноокису вуглецю, призначені для використання у даному винаході, включають в себе, наприклад, такі кількості, які приглушують ріст раку, наприклад, пухлин і/або пухлинних клітин, для поліпшення стану пацієнта, який страждає від раку або має ризик розвитку раку, а також з метою поліпшення результатів інших видів лікування.

Ефективні кількості моноокису вуглецю можуть включати в себе, наприклад, кількості, які успішно впливають на ангіогенез, на утворення фактора росту ендотеліальних клітин судин і/або будь-які клітинні механізми, що беруть участь в приглушенні росту пухлини, наведені у даному винаході.

У випадку газів, ефективні кількості моноокису вуглецю в композиції загалом укладаються в діапазон, що складає приблизно від 0,0000001мас.% приблизно до 0,3мас.%, наприклад, приблизно від 0,0001мас.% до 0,25мас.%, переважно щонайменше приблизно 0,001мас.%, наприклад щонайменше 0,005мас.%, 0,010мас.%, 0,02мас.%, 0,025мас.%, 0,03мас.%, 0,04мас.%, 0,05мас.%, 0,06мас.%, 0,08мас.%, 0,10мас.%, 0,15мас.%, 0,20мас.%, 0,22мас.% або 0,24мас.% моноокису вуглецю. Переважні діапазони включають в себе, наприклад, приблизно від 0,001мас.% до 0,24мас.%, приблизно від 0,005мас.% до 0,22мас.%, приблизно від 0,005мас.% до 0,05мас.%, приблизно від 0,010мас.% до 0,20мас.%, приблизно від 0,02мас.% до 0,15мас.%, приблизно від 0,025мас.% до 0,10мас.%, приблизно від 0,03мас.% до 0,08мас.% або приблизно від 0,04мас.% до 0,06. У випадку рідких розчинів CO, ефективні кількості в основному укладаються в інтервал, що складає приблизно від 0,0001 до 0,0044г CO/100г рідини, наприклад, щонайменше 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 або 0,0042г CO/100г рідкого розчину. Переважні діапазони включають в себе, зокрема, приблизно від 0,0010 до 0,0030г CO/100г рідини, приблизно від 0,0015 до 0,0026г CO/100г рідини або приблизно від 0,0018 до 0,0024г CO/100г рідини. Практикуючий фахівець у даній галузі може оцінити ситуацію, при якій можуть використовуватися кількості, що виходять за межі даного діапазону, в залежності від напрямку застосування.

Термін "пацієнт" в контексті даного опису включає в себе тварину, людину або відмінну від людини тварину, відносно якої можна провести лікування за способом згідно з винаходом. Ветеринарні напрямки застосування також відповідають обсягу даного винаходу. Даний термін включає в себе, але, не обмежується перерахунком, птахів, плазунів, земноводних та ссавців, наприклад, людину та інших представників приматів, свиней, гризунів, таких як миші та пацюки, кроликів, морських свинок, хом'ячків, корів, коней, кішок, собак, овець або кіз. Переважні суб'єкти включають в себе людину, сільськогосподарських тварин та домашніх тварин, таких як кішки та собаки. Термін "лікування" в контексті даного опису означає досягнення приглушення, ослаблення ефекту або подовження життя пацієнта, який страждає від певного стану, наприклад, від раку.

Приклади розладів механізмів проліферації і/або диференціювання клітини включають в себе рак, наприклад, карциному, саркому, утворення метастазів і неопластичні захворювання крові, наприклад, лейкоз.

Метастазуюча пухлина може виникати на основі множини первинних типів пухлин, включаючи, але, не обмежуючись перерахунком, метастази, що походять з клітин простати, ободової кишки, легені, молочної залози, кісток та печінки. Метастази розвиваються, наприклад, в тих випадках, коли пухлинні клітини, що поширюються з первинної пухлини, прикріплюються до ендотелію судин,

проникають в оточуючі тканини і ростуть з утворенням незалежних пухлин в місцях, відділених від первинних пухлин.

Термін "рак" відноситься до клітин, що мають здатність до автономного росту. Приклади таких клітин включають в себе клітини, що характеризуються аномальним станом або умовами, при яких відбувається швидка проліферація зростаючих клітин. У контексті даного опису термін включає в себе раковий ріст, наприклад, пухлини, онкогенні процеси, метастатичні тканини і трансформовані злоякісним процесом клітини, тканини і органи, незалежно від типу гістопатології або стадії інвазивності. Даний термін також включає в себе злоякісні новоутворення систем різних органів, таких як дихальна, серцево-судинна, ниркова, репродуктивна, гематологічна, нервова, печінкова, шлунково-кишкова та ендокринна системи, а також аденокарциноми, які включають в себе злоякісні новоутворення, такі як найбільш поширені види раку ободової кишки, карцинома ниркових клітин, рак передміхурової залози і/або пухлини яєчок, недрібноклітинний рак легень, рак тонкої кишки та рак стравоходу. Рак, який відноситься до природно виникаючого виду, включає в себе рак, який не викликаний експериментально шляхом імплантації ракових клітин суб'єкту, і включає в себе, наприклад, спонтанно виникаючий рак, рак, викликаний впливом на пацієнта канцерогену(ів), рак, виникаючий після вбудування трансгенного онкогену або виключення супресорного гена пухлини, і рак, викликаний інфекціями, наприклад, вірусними інфекціями. Термін "карцинома" відомий фахівцям у даній галузі і відноситься до злоякісних новоутворень епітеліальних або ендокринних тканин. Термін також включає в себе карциносаркоми, які відносяться до злоякісних пухлин, що складаються з карциноматозних та саркоматозних тканин. Термін "аденокарцинома" відноситься до карциноми, виникаючої із залозистої тканини, або тканини, в якій пухлинні клітини утворюють чітко розпізнавані залозисті структури.

Термін "саркома" відомий у даній галузі і відноситься до злоякісних пухлин мезенхімного походження. Термін "гематопоетичні неопластичні розлади" означає захворювання, які включають гіперпластичні/неопластичні клітини гематопоетичного походження. Гематопоетичний неопластичний розлад може виникати з ліній мієлоїдних, лімфоїдних або еритроїдних клітин або їх клітин-попередників.

Види раку, які можуть зазнавати лікування з використанням способів і композицій згідно з винаходом, включають в себе, наприклад, рак шлунку, ободової кишки, прямої кишки, рота/глотки, стравоходу, гортані, печінки, підшлункової залози, легені, молочної залози, шийки матки, матки, яєчників, передміхурової залози, яєчок, сечового пузиря, шкіри, кістки, нирки, мозку/центральної нервової системи, шиї та горла, хвороби Ходжкіна, неходжкінський лейкоз, саркоми, хоріокарциному та лімфому, в числі інших видів раку.

Індивідууми, які розглядаються як такі, що мають ризик розвитку раку, можуть одержати користь від даного винаходу головним чином в зв'язку з тим, що профілактичне лікування може початися

раніше, ніж виникають будь-які ознаки захворювання. Індивідууми, які мають ризик розвитку захворювання, включають в себе, наприклад, тих, які зазнають впливу канцерогенів, наприклад, шляхом вживання їх, зокрема, шляхом інгаляції і/або прийому всередину, в кількостях, які, як випливає з статистичних даних, прискорюють розвиток раку у чутливих індивідуумів. В їх число включаються також індивідууми, що мають ризик розвитку захворювання в зв'язку з тим, що вони зазнають впливу ультрафіолетового опромінення або відповідного оточення в зв'язку з особливостями їх професійної діяльності або за спадковими ознаками, а також індивідууми, що мають ознаки передракового стану, такі як поліпи. Аналогічно, індивідууми на дуже ранніх стадіях раку або розвитку метастазів (наприклад, якщо в організмі індивідуума або у певному місці тканини індивідуума є одна або декілька абераційних клітин) можуть одержати користь від такого профілактичного лікування.

Досвідчені фахівці, що практикують у даній галузі, можуть визначити пацієнта, який діагностований лікарем (або ветеринаром, при використанні відповідних умов для діагностики пацієнтів) як страждаючий від захворювання, описаного у даному винаході, або який має ризик його розвитку, наприклад, раку, за допомогою відомого у даній галузі способу, наприклад, шляхом аналізу історії хвороби пацієнта, проведення діагностичних тестів і/або при використанні різних методик одержання зображення органів.

Фахівці, що практикують у даній галузі, можуть також визначити, що композиції монооксиду вуглецю необов'язково повинні вводитися пацієнту тією самою особою, яка встановила діагноз (або призначила пацієнту застосування композиції монооксиду вуглецю). Композиції монооксиду вуглецю можуть вводитися (і/або введення може контролюватися), наприклад, особою, яка встановила діагноз і/або призначила лікування і/або будь-яким іншим індивідуумом, включаючи самого(саму) пацієнта (в тому випадку, наприклад, коли пацієнт здатний здійснювати введення самостійно).

Способи згідно з винаходом можуть також використовуватися для інгібування небажаного (наприклад, шкідливого) ангіогенезу у пацієнта і для лікування станів, залежних від ангіогенезу або пов'язаних з ним. У контексті даного опису термін "ангіогенез" означає утворення нових кровоносних судин в тканинах або органах. Термін "стан, залежний від ангіогенезу або пов'язаний з ним" включає в себе будь-який процес або стан, який залежить або пов'язаний з ангіогенезом. Термін означає стани, які включають в себе рак, а також стани, відмінні від раку. Стани, залежні від ангіогенезу або пов'язані з ним, можуть бути пов'язані з небажаним ангіогенезом (наприклад, виникати на його основі), а також з бажаним ангіогенезом (наприклад, у випадку сприятливого процесу). Термін включає в себе, наприклад, солідні пухлини, метастази пухлин, доброякісні пухлини, наприклад, гемангіоми, акустичні невриноми, нейрофіброми, трахоми і піогенні гранульоми, ревматоїдний артрит, вовчак та інші розлади з'єднувальної тканини, псоріаз, рожеві вугри, ангіогенні захворювання очей, наприклад, діабетичну ретинопатію, ретино-

патію недоношеності, дегенерацію жовтої плями, реакцію відторгнення тканини рогівки, нейроваскулярну глаукому, ретrolентальну фіброплазію, червоність шкіри, синдром Ослер-Вебера, ангіогенез міокарда, реваскуляризацію бляшок, телеангіоектазію, гемофілічну артропатію, ангіофіброму та утворення грануляційної тканини в ранах. Інші процеси, в які залучений ангіогенез, включає в себе репродукцію та загоєння ран. У зв'язку з властивими анти-VEGF-властивостями, СО може бути також корисний при лікуванні захворювань, що характеризуються надмірною або аномальною стимуляцією ендотеліальних клітин. Такі захворювання включають в себе, наприклад, спайки в області кишечника, атеросклероз, склеродерму, гіпертрофічні рубці, наприклад, келоїдні рубці, а також ті види раку ендотеліальних клітин, які чутливі до стимуляції VEGF.

Кількості СО, ефективні для лікування раку, станів, залежних від ангіогенезу або пов'язаних з ним (наприклад, станів відмінних від раку), для інгібування небажаного ангіогенезу у пацієнта, можуть вводитися (або призначатися) пацієнту, наприклад, лікарем або ветеринаром в день діагностування даного пацієнта як пацієнта, що має будь-який з вказаних розладів або станів або як пацієнта, що має фактор ризику, що визначає підвищену імовірність того, що у пацієнта може розвинути такий(і) розлад(и) або стан(и) (наприклад, у випадку пацієнта, який в недавньому зазнавав або зазнає впливу канцерогену(ів)). Пацієнти можуть вдихати СО в концентраціях, в діапазоні від 10ч/млн. до 1000ч/млн., зокрема, приблизно від 100ч/млн. до 800ч/млн., приблизно від 150ч/млн. до 600ч/млн. або приблизно від 200ч/млн. до 500ч/млн. Переважні концентрації включають в себе, зокрема, приблизно 30ч/млн., 50ч/млн., 75ч/млн., 100ч/млн., 125ч/млн., 200ч/млн., 250ч/млн., 500ч/млн., 750ч/млн. або приблизно 1000ч/млн. СО може бути введений пацієнту в переміжному режимі або безперервно. СО може бути введений протягом щонайменше приблизно 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 або 20 днів або більш 20 днів, наприклад, протягом 1, 2, 3, 5, або 6 місяців, або до того часу, коли у пацієнта більше не виявляються симптоми стану або захворювання, або до того моменту, коли пацієнт більше не діагностується як пацієнт, що має ризик розвитку вказаного стану або розладу. У кожний даний день СО може бути введений безперервно протягом всього дня або в переміжному режимі, наприклад, шляхом одноразового пропускання порції СО в день (коли використовується висока концентрація) або протягом періоду часу до 23 годин в день, наприклад, до 20, 15, 12, 10, 6, 3 або 2 годин, або до однієї години на день.

Якщо пацієнт потребує проведення курсу хіміотерапії, променевої терапії, імунотерапії, генної терапії або хірургічного втручання (наприклад, відповідно до призначення, зробленого лікарем або ветеринаром), то пацієнт може зазнавати лікування СО (наприклад, газоподібною композицією СО) до, під час і/або після проведення хіміотерапії, променевої терапії і/або хірургічної операції. Так, наприклад, що стосується хіміотерапії, імунотерапії, генної терапії та променевої терапії, то СО

може бути введений пацієнту в переміжному режимі або безперервно, починаючи з періоду часу від 0 до 20 днів до початку хіміотерапії, імунотерапії, генної терапії або променевої терапії (і в тому випадку, коли призначають множинні дози перед введенням кожної індивідуальної дози), наприклад, починаючи щонайменше приблизно за 30 хвилин, зокрема, приблизно за 1, 2, 3, 5, 7 або 10 годин, або приблизно за 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 або 20 днів або більше 20 днів, до початку лікування. Альтернативно або в доповнення, СО може бути введений пацієнту одночасно з проведенням хіміотерапії, імунотерапії, генної терапії або променевої терапії. Альтернативно або в доповнення, СО може бути введений пацієнту після проведення хіміотерапії, імунотерапії, генної терапії або променевої терапії, наприклад, починаючи відразу після введення, і продовжуватися в переміжному режимі або безперервно протягом приблизно 1, 2, 3, 5, 7 або 10 годин або приблизно 1, 2, 5, 8, 10, 20, 30, 50 або 60 днів, одного року, протягом невідзначеного часу або до того часу, коли лікар визначить, що введення СО більше не є обов'язковим.

В тому, що стосується хірургічних процедур, СО може бути введений системно або місцево пацієнту до, під час і/або після проведення хірургічної операції. Пацієнти можуть вдихати СО в концентраціях, в інтервалі приблизно від 10ч/млн. до 1000ч/млн., зокрема, приблизно від 100ч/млн. до 800ч/млн., приблизно від 150ч/млн. до 600ч/млн. або приблизно від 200ч/млн. до 500ч/млн. Переважні концентрації включають в себе, зокрема, приблизно 30ч/млн., 50ч/млн., 75ч/млн., 100ч/млн., 125ч/млн., 200ч/млн., 250ч/млн., 500ч/млн., 750ч/млн. або приблизно 1000ч/млн. СО може бути введений пацієнту в переміжному режимі або безперервно протягом 1 години, 2 годин, 3 годин, 4 годин, 6 годин, 12 годин або приблизно протягом 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 або 20 днів або більш 20 днів, до проведення операції. Газ може бути введений в період часу, який безпосередньо передуює хірургічній операції, і необов'язково продовжуватися під час операції або вказане введення може припинитися щонайменше за 15 хвилин до початку операції (наприклад, щонайменше за 30 хвилин, 1 година, 2 години, 3 години, 6 годин або 24 години до початку операції). Альтернативно або в доповнення, СО може бути введений пацієнту під час операції, наприклад, шляхом інгаляції і/або шляхом місцевого введення. Альтернативно або в доповнення, СО може бути введений пацієнту після проведення операції, наприклад, починаючи відразу після завершення операції, і продовжуватися протягом приблизно 1, 2, 3, 5, 7 або 10 годин або приблизно протягом 1, 2, 5, 8, 10, 20, 30, 50 або 60 днів, 1 року, протягом невідзначеного періоду часу або до того моменту після завершення операції, коли пацієнт вже більше не буде уражений раком або не буде мати ризик його розвитку.

Одержання газоподібних композицій

Композиція монооксиду вуглецю може являти собою газоподібну композицію монооксиду вуглецю. Стиснутий газ або газ, що знаходиться під тиском, який використовується в способах згідно з винаходом, може бути одержаний з будь-якого комерційного джерела і знаходитися в резервуарі будь-

якого типу, придатного для зберігання стиснутого газу. Так, наприклад, стиснуті гази або гази, що знаходяться під тиском, можуть бути одержані з будь-якого джерела, яке займається постачанням стиснутих газів, таких як кисень, для медичного застосування. Термін "медично чистий газ" в контексті даного опису, відноситься до газу, придатного для введення пацієнтам, відповідно до даного винаходу. Газ, що знаходиться під тиском, який містить CO, що використовується в способах згідно з винаходом, може постачатися таким чином, що всі гази в необхідній готовій композиції (наприклад, CO, He, NO, CO₂, O₂, N₂) будуть знаходитися в одному і тому самому резервуарі, за винятком того, що NO і O₂ не можуть зберігатися разом. Необов'язково способи згідно з винаходом можуть здійснюватися з використанням множинних контейнерів, що містять індивідуальні гази. Так, наприклад, один резервуар може використовуватися для зберігання моноокису вуглецю, при наявності або за відсутності в ньому інших газів, вміст якого може бути обов'язково перемішаний з кімнатним повітрям або з вмістом інших резервуарів, наприклад, резервуарів, які містять кисень, азот, двоокис вуглецю, стиснуте повітря або будь-який інший прийнятний газ або їх суміші.

Газоподібні композиції, що вводяться пацієнту, згідно з винаходом в типовому випадку містять від 0мас.% приблизно до 79мас.% азоту, приблизно від 21мас.% і приблизно до 100мас.% кисню, і приблизно від 0,0000001мас.% до 0,3мас.% (що відповідає приблизно від 1млрд.д. або 0,001ч/млн. і приблизно до 3000ч/млн.) моноокису вуглецю. Переважно кількість азоту в газоподібній композиції складає приблизно 79мас.%, кількість кисню складає приблизно 21мас.% і кількість моноокису вуглецю складає приблизно від 0,0001мас.% до 0,25мас.%, переважно щонайменше приблизно 0,001мас.%, зокрема, щонайменше приблизно 0,005мас.%, 0,01мас.%, 0,02мас.%, 0,025мас.%, 0,03мас.%, 0,04мас.%, 0,05мас.%, 0,06мас.%, 0,08мас.%, 0,10мас.%, 0,15мас.%, 0,20мас.%, 0,22мас.% або 0,24мас.%. Переважні діапазони вмісту моноокису вуглецю включають в себе приблизно від 0,005мас.% до 0,24мас.%, приблизно від 0,01мас.% і приблизно до 0,22мас.%, приблизно від 0,015мас.% приблизно до 0,20мас.%, приблизно від 0,08мас.% приблизно до 0,20мас.% і приблизно від 0,025мас.% приблизно до 0,1мас.%. Потрібно зазначити, що газоподібні композиції моноокису вуглецю, які містять моноокис вуглецю в концентрації вище ніж 0,3% (наприклад 1% або вище), можуть використовуватися лише протягом короткострокових періодів часу (наприклад, протягом одного або декількох вдихів), в залежності від напрямку застосування.

Газоподібна композиція моноокису вуглецю може використовуватися для створення атмосфери, яка містить газоподібний моноокис вуглецю. Атмосфера, яка містить відповідні рівні моноокису вуглецю, може бути створена, наприклад, шляхом підведення резервуара, який містить газ, що знаходиться під тиском, який включає в себе газоподібний моноокис вуглецю, і вивільнення газу, що знаходиться під тиском, з резервуара в камеру або певний простір, із створенням атмосфери, яка

включає в себе газоподібний моноокис вуглецю всередині даної камери або простору. Альтернативно, вказані гази можуть вивільнятися всередину апарату, який з'єднаний з маскою для дихання або з дихальною трубкою, за допомогою чого створюється атмосфера, яка містить газоподібний моноокис вуглецю в масці для дихання або в дихальній трубці, що гарантує те, що пацієнт буде єдиною людиною, яка зазнає впливу значних кількостей моноокису вуглецю.

Рівні моноокису вуглецю в атмосфері або у вентиляційному контурі можуть бути виміряні або можуть зазнавати контролю з використанням способів, відомих у даній галузі техніки. Такі способи включають в себе методи електрохімічного визначення, газової хроматографії, радіоізотопного підрахунку, методи вимірювання інфрачервоного поглинання, колориметричний та електрохімічні методи, основані на використанні селективних мембран [див., наприклад, Simderraan et al., Clin. Chem. 28: 2026-2032, 1982; Ingi et al., Neuron 16: 835-842, 1996]. Вміст моноокису вуглецю в діапазоні концентрацій меншому ч/млн. може бути визначений, наприклад, методами газової хроматографії та радіоізотопного підрахунку. Крім того, у даній галузі відомо, що рівні моноокису вуглецю в діапазоні концентрацій меншому ч/млн. можуть бути виміряні в біологічній тканині за допомогою газового сенсора, який працює в середньому діапазоні інфрачервоних променів [див., наприклад, Morimoto et al., Am. J. Physiol. Hert. Circ. Physiol 280: H482-H488, 2001]. Сенсори моноокису вуглецю і пристрою для виявлення відповідного газу широко доступні з багатьох комерційних джерел.

Одержання рідких композицій

Композиції моноокису вуглецю можуть бути також представлені у вигляді рідкої композиції моноокису вуглецю. Рідка форма композиції моноокису вуглецю може бути одержана шляхом обробки будь-яким відомим у даній галузі способом, який спричиняє розчинення газів в рідині. Наприклад, рідина може бути вміщена в так званий "інкубатор CO₂" і далі може бути піддана впливу безперервного потоку моноокису вуглецю, переважно збалансованого відповідною кількістю двоокису вуглецю, до досягнення бажаної концентрації моноокису вуглецю в рідині. Як інший приклад можна вказати спосіб, відповідно до якого газоподібним моноокисом вуглецю безпосередньо "барботують" рідину до досягнення в ній бажаної концентрації моноокису вуглецю. Кількість моноокису вуглецю, яка може бути розчинена у даному водному розчині, підвищується при зниженні температури. Як інший приклад можна вказати спосіб пропускання відповідної рідини через трубку, яка дозволяє здійснювати дифузію газу, де трубка проходить через атмосферу, яка містить моноокис вуглецю (наприклад, з використанням пристрою, такого як оксигенатор, що містить екстракорпоральну мембрану). Моноокис вуглецю дифундує в рідину з утворенням рідкої композиції моноокису вуглецю.

Зрозуміло, що така рідка композиція, призначена для введення в живий організм тварини, повинна в момент введення в організм тварини мати температуру 37°C або близько того.

Вказана рідина може являти собою будь-яку рідину, відому фахівцям у даній галузі, яка придатна для введення пацієнтам [див., наприклад, інструкцію Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. В основному рідина може являти собою водний розчин. Приклади розчинів включають в себе забуферений фосфатом фізіологічний розчин (PBS), Celsior™, Perfadex™, розчин Колінса, цитратний розчин і розчин, що одержується за методикою Університету Вісконсин (UW) [Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. В одному варіанті здійснення даного винаходу рідина являє собою розчин Рінгера, наприклад, розчин Рінгера з вмістом лактату, або будь-яку іншу рідину, яка може використовуватися для інфузії пацієнту. В іншому варіанті рідина включає в себе кров, наприклад, суцільну кров. При цьому кров може бути повністю або частково насичена монооксидом вуглецю.

Будь-яка відповідна рідина може бути до певної концентрації насичена монооксидом вуглецю за допомогою газових дифузорів. Альтернативно, можуть використовуватися заздалегідь приготовані розчини, які, за результатами контролю якості, містять задані рівні монооксиду вуглецю. Точний контроль дози може бути досягнутий шляхом вимірювання з використанням проникної для газу і не проникної для рідини мембрани, з'єднаної з аналізатором монооксиду вуглецю. Розчини можуть бути насичені до бажаних ефективних концентрацій і підтримуватися на таких рівнях.

Лікування пацієнтів з використанням композицій монооксиду вуглецю

Пацієнт може бути підданий лікуванню композицією монооксиду вуглецю будь-яким способом, відомим у даній галузі, який включає в себе введення пацієнтам газу і/або рідини. Композиції монооксиду вуглецю можуть бути призначені і/або введені пацієнту, якому встановлений діагноз, наприклад, рак, або відносно якого відомо, що він має ризик розвитку раку. Даний винахід включає в себе системне введення рідких або газоподібних композицій монооксиду вуглецю пацієнтам (наприклад, шляхом інгаляції і/або введення всередину) і місцеве введення композицій в органи пацієнта *in situ* (наприклад шляхом, проковтування, інсуфляції і/або введення в черевну порожнину). Композиції можуть вводитися і/або їх введення може контролюватися будь-якою особою (наприклад, медичним працівником, ветеринаром або людиною, що здійснює догляд, наприклад, власником тварини (наприклад, собаки або кішки)), в залежності від виду пацієнта, що підлягає лікуванню, і/або самим пацієнтом, якщо пацієнт здатний здійснювати таку процедуру.

Системна доставки монооксиду вуглецю

Газоподібні композиції монооксиду вуглецю можуть доставлятися системно пацієнту, наприклад, пацієнту, у якого діагностований рак або відносно якого відомо, що він має ризик розвитку раку. Газоподібні композиції монооксиду вуглецю в типовому випадку вводяться шляхом вдихання через рот або носові проходи в легені, де монооксид вуглецю швидко поглинається в кровотік пацієнта. Концентрація активної сполуки (CO), що використовується

в терапевтичній газоподібній композиції, залежить від рівня поглинання, рівня розподілу, рівня інактивації і виділення (в основному через дихання) монооксиду вуглецю, а також від ряду інших факторів, відомих фахівцям у даній галузі. Потрібно також розуміти, що у випадку будь-якого конкретного суб'єкта підбираються конкретні схеми дозування протягом часу, який відповідає потребам даного індивідуума, і на основі висновку фахівця, що здійснює введення або контроль введення композиції, і що встановлені діапазони концентрації є лише прикладами і не обмежують обсяг і практику здійснення даного винаходу. Курс лікування може контролюватися і дозування CO можуть коректувати для цілей гарантії оптимального лікування пацієнта. Даний винахід відноситься до гострого, підгострого та хронічного введення монооксиду вуглецю, що визначається, наприклад, тяжкістю або персистенцією захворювання у пацієнта. Монооксид вуглецю може доставлятися пацієнту протягом часу (включаючи невизначений період часу), достатнього для лікування стану і для досягнення заданого фармакологічного або біологічного ефекту.

Наведені нижче приклади описують способи та пристрої, які можуть використовуватися для введення газоподібних композицій монооксиду вуглецю пацієнтам.

Вентилятори

Монооксид вуглецю медичної якості (концентрації можуть варіюватися) може постачатися в суміші з повітрям або іншим кисневмісним газом в стандартному резервуарі, який містить стиснутий газ (наприклад, який містить 21% O₂, 79% N₂). Газ не має реактивності і концентрація, яка потрібна для здійснення способів згідно з винаходом, істотно нижче межі запалення (10% в повітрі). У лікарнях газ переважно підводять до ліжок пацієнтів, де його перемішують з киснем або кімнатним повітрям за допомогою змішувача до досягнення бажаної концентрації в ч/млн. (частин на мільйон). Пацієнт вдихає суміш повітря за допомогою вентилятора, який встановлений на швидкість подачі, що відповідає потребам і комфортним відчуттям пацієнта. Рівень визначається за дихальним графіком (тобто за швидкістю дихання, об'єму вдику-видику і т.п.). В дану систему доставки можуть бути також введені один або більша кількість запобіжних механізмів для запобігання ситуації, при якій пацієнт може одержати більшу, ніж потрібно, кількість монооксиду вуглецю. Рівень монооксиду вуглецю, необхідний для пацієнта, відстежується при аналізі (1) рівня карбоксигемоглобіну (Cob), що вимірюється у венозній крові, і (2) за рівнем монооксиду вуглецю, що видихається, в боковому порту вентилятора. Вплив монооксиду вуглецю може бути скоректований відповідно до стану здоров'я пацієнта і за оцінкою визначених маркерів. При необхідності, монооксид вуглецю може бути вимитий у пацієнта шляхом переключення на вдихання 100% O₂. Монооксид вуглецю не метаболізується, таким чином все, що пацієнт вдихає, буде в кінцевому результаті видихатися, за винятком дуже невеликого відсотка, який перетворюється в CO₂. Монооксид вуглецю може бути також змішаний з будь-якою кількістю O₂ для забезпечення терапев-

тичної доставки моноокису вуглецю без розвитку згодом стану гіпоксії.

Маска для обличчя і намет

Газову суміш, яка містить моноокис вуглецю, одержують відповідно до вказаного вище опису, для використання її пацієнтом шляхом інгаляції за допомогою маски для обличчя або намету. Концентрація у газі, що вдихується, може бути змінена або видалена за рахунок вимивання шляхом простого переключення на подачу 100% O₂. Моніторинг рівнів моноокису вуглецю здійснюється в або в безпосередній близькості від маски або намету за допомогою пристрою безвідмовно працюючого механізму, який перешкоджає проникненню до складу газу, що вдихується, дуже великої концентрації моноокису вуглецю.

Переносний інгалятор

Стиснутий моноокис вуглецю може бути введений в переносний пристрій для інгаляції та використаний для інгаляції в дозі, що відмірюється, наприклад, для здійснення лікування в переміжному режимі реципієнта, який не знаходиться в лікарняних умовах. У контейнери можуть бути введені різні концентрації моноокису вуглецю. Пристрій може бути простим і являти собою невеликий резервуар (наприклад, до 5кг), який містить відповідним чином розбавлений СО і забезпечений регулюючим клапаном і трубою, з якої пацієнт відбирає порцію СО відповідно до стандартного режиму або згідно з встановленою потребою.

Внутрішньовенна штучна легеня

Штучна легеня (комп'ютерний пристрій для здійснення газообміну в крові), призначена для доставки O₂ і видалення CO₂, може використовуватися для доставки моноокису вуглецю. Катетер при її імплантації залишається у великих венах і може використовуватися для доставки моноокису вуглецю в заданих концентраціях або шляхом системної доставки, або шляхом введення в локальну ділянку. Доставка може являти собою місцеву доставку високої концентрації моноокису вуглецю протягом короткого періоду часу в дану ділянку пухлини (вказана висока концентрація буде швидко розбавлятися в кровотоці) або може забезпечувати відносно тривалу експозицію меншою концентрацією моноокису вуглецю [див., наприклад, Hattler et al., *Artif. Organs* 18(11): 806-812, 1994; and Golob et al., *ASAIO J.* 47(5): 432-437, 2001].

Нормобарична камера

У деяких випадках буває бажано піддавати всього пацієнта впливу моноокису вуглецю. При цьому пацієнт може знаходитися всередині герметичної камери, через яку пропускають моноокис вуглецю (до досягнення рівня, який нешкідливий для пацієнта, або до рівня, який характеризується прийнятним ступенем ризику для пацієнта без ризику впливу на оточуючих). Після завершення сеансу впливу камера може бути заповнена повністю повітрям (наприклад, яке містить 21% O₂ і 79% N₂) і проби можуть бути аналізовані за допомогою аналізаторів моноокису вуглецю, для гарантії того, що в камері не залишилося моноокису вуглецю, після чого пацієнту дозволяють покинути систему, в якій він зазнавав впливу газу.

Системна доставка рідких композицій СО

Даний винахід також відноситься до водних розчинів, які містять моноокис вуглецю, які можуть використовуватися для системної доставки пацієнту, наприклад, шляхом пероральної доставки і/або шляхом інфузії пацієнту, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньоартеріально, внутрішньочеревинно і/або підшкірно. Наприклад, рідкі композиції СО, такі як розчин Рінгера, насичений СО, можуть бути введені шляхом інфузії пацієнту, який страждає від раку або який має ризик розвитку раку. Альтернативно або в доповнення, пацієнту може бути шляхом інфузії введена кров, частково або повністю насичена СО.

Даний винахід також відноситься до тих засобів, які здатні здійснювати доставку доз газоподібних композицій СО або рідких композицій СО (наприклад, СО-вивільняючі камеді, креми, мазі, пастилки або бляшки).

Місцеве лікування органів з використанням моноокису вуглецю

Альтернативно або в доповнення, композиції моноокису вуглецю можуть наноситися безпосередньо на органи, наприклад, на шкіру та внутрішні органи. Газоподібні композиції можуть наноситися безпосередньо на внутрішню або зовнішню частину організму пацієнта для лікування органів пацієнта. Газоподібні композиції можуть наноситися безпосередньо на внутрішні органи пацієнта за допомогою будь-якого способу, відомого у даній галузі для інсуфляції газів пацієнту. Так, наприклад, гази, зокрема, двоокис вуглецю, часто піддувають в черевну порожнину пацієнта для полегшення огляду органів в процедурах лапароскопії [див., наприклад, *Oxford Textbook of Surgery*, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. Фахівці, що практикують у даній галузі, розуміють, що аналогічні процедури можуть використовуватися для введення композицій моноокису вуглецю безпосередньо у внутрішній орган пацієнта. Шкіру можна піддати місцевому лікуванню з використанням газоподібної композиції, наприклад, шляхом впливу на уражену шкіру газоподібною композицією в нормобарометричній камері (описаній вище) і/або шляхом видування композиції моноокису вуглецю безпосередньо на шкіру. Якщо пацієнт не вдихає газ, концентрація СО в газоподібній композиції може бути досить високою, наприклад, понад 0,25% і приблизно аж до 100%.

Рідкі композиції моноокису вуглецю також можуть вводитися місцево в органи пацієнта. Рідкі форми композиції можуть вводитися будь-яким способом, відомим у даній галузі, який застосовується для введення рідин пацієнтам. Як і у випадку газоподібних композицій, рідкі композиції можуть застосовуватися безпосередньо для нанесення на внутрішню і/або зовнішню частину тіла для лікування органів пацієнта. Так, наприклад, рідкі композиції можуть вводитися перорально, наприклад, шляхом проковтування інкапсульованої або неінкапсульованої дози водної композиції моноокису вуглецю. Як інший приклад, рідина, наприклад, сольовими розчинами, які містять розчинний СО, можуть бути зроблені ін'єкції безпосередньо в черевну порожнину пацієнта в ході лапароскопічних процедур. Альтернативно або в доповнення, вплив *in situ* або на органи може бути здійснено за

допомогою будь-якого відомого у даній галузі методу, наприклад, шляхом наповнення *in situ* органу рідкою композицією монооксиду вуглецю під час хірургічної операції [див., наприклад, Oxford Textbook of Surgery, Morris and Malt, Eds., Oxford University Press (1994)]. Шкіру можна піддати місцевому лікуванню рідкою композицією, наприклад, шляхом ін'єкції рідкої композиції в шкіру. Як ще один приклад, шкіру можна піддати місцевому лікуванню шляхом нанесення рідкої композиції безпосередньо на поверхню шкіри, наприклад, шляхом протирання або збризкування шкіри даною рідиною і/або шляхом занурення шкіри в рідку композицію. Інші доступні для зовнішнього впливу поверхні, такі як поверхні очей, рота, горла, піхви, шийки матки, сечових шляхів, ободової кишки та ануса, можуть бути аналогічним чином піддані місцевому лікуванню рідкими композиціями.

Застосування гемоксигенази-1 та інших сполук

В обсяг даного винаходу також входять індукція, експресія і/або ведення гемоксигенази-1 (НО-1) в поєднанні з введенням монооксиду вуглецю. Наявність НО-1 може бути забезпечена у пацієнта шляхом індукції експресії НО-1 у пацієнта або шляхом введення екзогенного НО-1 безпосередньо пацієнту. У контексті даного опису термін "індукція" означає спосіб викликати підвищене утворення білка, наприклад НО-1, у виділених клітинах або клітинах тканини, органу або тварини з використанням власного клітинного ендогенного (наприклад, нереконбінантного) гена, який кодує білок.

НО-1 може бути індукований у пацієнта будь-яким відомим у даній галузі способом, наприклад, утворення НО-1 може бути індуковане геміном, залізовмісним протопорфірином або кобальтвмісним протопорфірином. Множина негемових засобів, включаючи важкі метали, цитокіни, гормони, закис азоту (NO), COCl₂, ендотоксини та тепловий шок є також сильними індукторами експресії НО-1 [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; i Tenhunen et al, *J. Lab. Clin. Med.* 75: 410-421, 1970]. НО-1 також індукується у високій мірі множиною засобів та умов, які створюють окислювальний стрес, включаючи пероксид водню, засоби, що призводять до виснаження глутатіону, УФ-опромінення і гіпероксію [Choi et al., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 9-19, 1996; Maines, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 517-554, 1997; i Keyse et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:99-103, 1989]. Фраза "фармацевтична композиція, яка містить індуктор НО-1" означає фармацевтичну композицію, яка містить будь-який засіб, здатний індукувати НО-1 у пацієнта, наприклад, будь-який засіб, з числа, описаних вище, наприклад, NO, гемін, залізовмісний протопорфірин і/або кобальтвмісний протопорфірин.

Експресія НО-1 в клітині може бути підвищена шляхом перенесення гена. У контексті даного опису термін "експресується" означає, що причиною, яка спричиняє підвищення утворення білка, наприклад, НО-1 або феритину, у виділених клітинах або в клітинах тканини, органу або тварини, є ви-

користання екзогенно введеного гена (наприклад, реконбінантного гена). НО-1 або феритин переважно беруть з організму того самого виду (наприклад, людини, миші, пацюка і т.п.), до якого належить даний пацієнт, з метою мінімізації яких-небудь імунних реакцій. Експресія може бути здійснена за допомогою конститутивного промотору (наприклад, промоторів цитомегаловірусів) або тканиноспецифічного промотору (наприклад, промотору молочної сироватки, у випадку клітин молочної залози, або промотору альбуміну для клітин печінки). Відповідний вектор для проведення генної терапії (наприклад, ретровіруси, аденовіруси, аденоасоційовані віруси (AAV), віруси віспи (наприклад, вірус вісповакцини), вірус імунodefіциту людини (ВІЛ), "мінут-вірус" миші, вірус гепатиту В, вірус грипу, вірус-1 простого герпесу і лентівіруси), що кодує НО-1 або феритин, вводиться пацієнту перорально, інгаляцією або ін'єкцією локально в місце, призначене для лікування описаного розладу або стану. Особливо переважним є локальне введення безпосередньо в ділянку локалізації даного патологічного стану, наприклад, в пухлину і/або орган, що містить пухлину, або в якому починає розвиватися пухлина. Аналогічно можуть вводитися плазмідні вектори, що кодують НО-1 або апоферитин, наприклад, у вигляді "оголеної" ДНК, ліпосом або в складі мікрочастинок.

Крім того, екзогенний білок НО-1 "може бути введений безпосередньо пацієнту будь-якими відомими у даній галузі способами. Екзогенний НО-1 може бути введений безпосередньо, в доповнення або альтернативно, до індукції або експресії НО-1 у пацієнта, як описано вище. Білок НО-1 може бути доставлений пацієнту, наприклад, в складі ліпосом і/або у вигляді білка злиття, наприклад, білка злиття ТАТ [див., наприклад, Becker-Narak et al., *Methods* 24, 247-256 (2001)].

Альтернативно або в доповнення, пацієнту можуть вводитися, в поєднанні з монооксидом вуглецю, будь-які продукти метаболізму НО-1, наприклад, білірубін, білівердин, залізо і/або феритин, для запобігання або лікуванню розвитку стану або розладу. Далі, даний винахід відноситься до молекул, то зв'язують залізо, відмінних від феритину, наприклад, до десфероксаміну (DFO), залізовмісного декстрану і/або апоферитину, які можуть вводитися пацієнту. Крім того, у даному винаході розглядається варіант, згідно з яким ферменти (наприклад, білівердинредуктаза), які каталізують розпад будь-якого з вказаних продуктів, можуть бути інгібовані, що дозволяє створити/посилити бажаний ефект. Будь-який з вказаних продуктів може бути введений, наприклад, перорально, внутрішньовенно, внутрішньочеревинно або місцево.

У даному винаході також розглядається варіант, згідно з яким сполуки, які вивільняють в організмі СО після їх введення в організм (наприклад, СО-вивільнюючі сполуки, наприклад, фотоактивовані СО-вивільнюючі сполуки), наприклад, декакарбоніл димарганцю, димер трикарбонілдиоксиду ртуті (II) і метиленхлорид (наприклад, в дозі від 400 до 600мг/кг, наприклад, в дозі приблизно 500мг/кг) можуть застосовуватися в способах згідно з винаходом як замісники карбоксигемоглобіну і СО-поставляючого гемоглобіну.

Вказані вище сполуки можуть вводитися пацієнту будь-яким способом, наприклад, шляхом перорального, внутрішньочеревинного, внутрішньовенного або внутрішньоартеріального введення. Будь-яка з вказаних вище сполук може бути введена пацієнту локально і/або системно і в будь-якому поєднанні.

Комбінована терапія

У даному винаході також розглядається варіант введення пацієнту СО в поєднанні щонайменше з одним іншим видом лікування, наприклад, в поєднанні з хіміотерапією, променевою терапією, імунотерапією, генною терапією і/або хірургічною операцією, для лікування станів та розладів, наведених у даному описі (наприклад, раку). Наприклад, СО може бути введений пацієнту з використанням будь-якого вказаного вище способу в поєднанні з хірургічною операцією для видалення ракової тканини у пацієнта. Альтернативно або в доповнення, описане лікування може проводитися в поєднанні з хіміотерапією. Хіміотерапія може включати в себе введення будь-якої сполуки з наведених нижче класів: алкілюючі засоби, антиметаболіти, наприклад, антагоністи фолату, пуринові антагоністи і/або піримідинові антагоністи; отрути стадії утворення веретена у клітинному циклі, наприклад, алкалоїди вінки (наприклад, паклітаксел) та подофілотоксини; антибіотики, наприклад, доксорубіцин, блеоміцин і/або мітоміцин; нітрозосечовина; неорганічні іони, наприклад, цисплатина; модифікатори біологічної відповіді, наприклад, фактор некрозу пухлини α (TNF- α) та інтерферон; ферменти, наприклад, аспарагіназа; білкові токсини, кон'юговані з групами-мішенями; антисмислові молекули; і гормони, наприклад, томоксифен, леупролід, флутамід та мегестрол. Альтернативно або в доповнення, описане лікування може проводитися в поєднанні з променевою терапією, наприклад, в поєднанні з використанням γ -опромінення, електронних пучків і/або радіоактивних ізотопів. Альтернативно або в доповнення, описане лікування може проводитися в поєднанні з імунотерапією, наприклад, шляхом введення пацієнту специфічних ефекторних клітин, пухлинних антигенів і/або пухлинних антитіл. Альтернативно або в доповнення, описане лікування може проводитися в поєднанні з генною терапією, наприклад, шляхом введення пацієнтам ДНК, що кодує пухлинні антигени і/або цитокіни. Способи лікування раку, наприклад, хірургічні способи, способи хіміотерапії, імунотерапії і променевої терапії, більш повно описані у відповідній інструкції [The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 17th Edition, Section 11, Chapters 143 and 144], повний зміст якої включений в даний опис як посилання.

Нижче даний винахід частково ілюструється прикладами, які не треба розглядати як такі, що обмежують будь-яким чином даний винахід.

Приклад 1. СО інгібує ріст пухлин та ракових клітин як *in vivo*, так і *in vitro* і приглушує ангіогенез Тварини

Для дослідження пухлин людини самок мишей SCID (масою 20-30г), придбаних від компанії Таконік [Taconic, White Plains, NY], витримують для акліматизації протягом одного тижня перед експериментом. Для дослідження мишачих пухлин і до-

слідження матригелю самців ліній CBA та C57B1/6 мишей (масою 25-30г) від компанії Джексон [Jackson Labs, Bar Harbor, ME] також витримують для акліматизації протягом одного тижня перед експериментом.

Клітинні лінії

В описаних нижче дослідженнях використовують клітинну лінію аденокарциноми людини, що позначається A549, клітинну лінію мезотеліоми мишей AC29 і клітинну лінію клітин раку ободової кишки людини, що позначається HCT.

Вплив СО

Клітинні культури і мишей піддають впливу СО в концентрації 250ч/млн. Стисло, процедура полягає у тому, що повітря з вмістом 1% СО змішують із звичайним повітрям (21% кисню) в циліндрі для перемішування з нержавіючої сталі, і потім суміш направляють в скляну камеру для експозиції об'ємом 3,70фут³ зі швидкістю 12л/хв. У камері безперервно вимірюють вміст СО з використанням аналізатора СО [InterScan, Chatsworth, CA]. Концентрацію СО підтримують на рівні 250ч/млн. протягом всього часу дослідження. Клітинні культури і мишей вміщують в камеру для експозиції.

Основні процедури

Набори ELIZA для визначення рівня VEGF від компанії R&D Systems використовують відповідно до рекомендацій виробника.

Проводять імуноблотинг для виявлення експресії білка стандартними методами, відомими у даній галузі. Антитіла одержують від компанії Santa Cruz, StressGen and Cell Signaling.

Для виявлення включення [³H]-міченого тимідину виснажені по сироватці клітини стимулюють протягом ночі 20% сироваткою, що містить 5мCi/мл [³H]-тимідину [New England Nuclear, Boston, MA]. Включення [³H]-тимідину вимірюють за допомогою сцинтиляційної спектроскопії.

СО приглушує ріст клітин *in vitro*

Клітинні лінії клітин раку людини і мишей використовують в дослідженні ефекту СО на швидкість росту клітин в культурі. Клітини аденокарциноми людини (A549), клітини мезотеліоми мишей (AC29) і клітини A549 та AC29, трансформовані геном гемоксигенази-1 (HO-1) (який викликає надекспресію HO-1), піддають впливу низьких рівнів СО (250ч/млн.) в культурі. Будують криві росту клітин протягом чотирьох днів. Картина росту клітин, що зазнали впливу СО в поєднанні з повітрям, аналогічна картині росту клітин, які здійснюють надекспресію HO-1, тобто спостерігається більш ніж 40% зниження кількості клітин за три дні, в порівнянні з контролями (дані не наведені). Вказане зниження кількості клітин не пов'язане з токсичністю, оскільки поступово досягається злиття клітин, хоча і зі значно зниженою швидкістю.

Фіг.1 являє собою криву шестиденного росту, яка показує, що СО інгібує проліферацію ракових клітин мезотеліоми мишей AC29. На день 5 культури клітин, що зазнали впливу СО, відбирають з атмосфери, яка містить СО, і далі спостерігається їх проліферація з нормальною швидкістю.

СО та HO-1 приглушують пухлинний ріст *in vivo*

Мишачі моделі росту пухлин використовують для оцінки здатності HO-1 та СО приглушувати

ріст пухлини. Використовують три моделі пухлинного росту у мишей.

Перша модель являє собою мезотеліому (AC29), в рамках якої мишам лінії CBA роблять ін'єкцію внутрішньочеревинно 1×10^6 клітин AC29 і відстежують виживання тварин при безперервному впливі звичайного повітря або атмосфери, яка містить 250ч/млн. CO, протягом періоду, що становить шість тижнів. Як показано на Фіг.3, миші, що зазнали впливу CO, прожили довше, ніж миші, що зазнали впливу тільки повітря. Рівень виживання мишей, що зазнали впливу CO, підвищився більш ніж на 90%, в порівнянні з мишами, що зазнали впливу тільки повітря. Стрілкою, показаною на Фіг.3, позначена часова точка, в якій половину мишей, що зазнали впливу CO, видаляють з CO-вмісної камери. Половину мишей видаляють в певний момент часу для визначення того, чи потрібний, при наявності впливу CO на виживаність мишей, додатковий вплив CO. Значна кількість мишей (50%, $p < 0,02$) з числа видалених з CO-вмісної атмосфери залишається в живих до кінця експерименту, тоді як всі миші, що зазнали впливу тільки повітря, вмирають до 36 дня. Кількість мишей в кожній групі складала від 12 до 20 тварин.

В іншому експерименті було показано, що миші, що зазнали впливу CO, виживали більше 65 днів (дані не наведені). Крім того, як показано на Фіг.4, вплив CO подовжує життя мишей навіть в тому випадку, коли обробка CO затримується на один тиждень після ін'єкції клітин мезотеліоми.

Друга модель являє собою модель аденокарциноми (A549), в рамках якої мишам лінії SCID роблять ін'єкцію підшкірно 1×10^6 клітин A549. Вказаних мишей піддають безперервному впливу повітря і CO в кількості 250ч/млн. протягом періоду в шість тижнів. Після шеститижневого періоду вимірюють об'єм розвинених у мишей пухлин. Як показано на Фіг.8, об'єм пухлини значно менший (більше ніж на 50%) у мишей, що зазнали впливу CO, ніж у мишей, що зазнали впливу тільки повітря.

Третя модель також являє собою модель, що використовує клітини A549, в рамках якої мишам роблять ін'єкцію клітин A549, трансформованих з метою надекспресії HO-1 (HO-1-клони A5 та L1). Після шеститижневого періоду вимірюють об'єм розвинених у мишей пухлин. Як показано на Фіг.2, у мишей, яким були зроблені ін'єкції клітин A549 з HO-1, зазначається знижений об'єм пухлини в порівнянні з контролями, яким було зроблено ін'єкцію вектора (Neo) і клітин дикого типу (Wt). Було показано, що інгібуючий ефект надекспресії HO-1 на ріст пухлини є оборотним, і оборотності процесу можна досягнути при введенні мишам дози олововмісного протопорфірину (50мкмоль/кг, підшкірно (п/к)), який є інгібітором HO-1 (дані не наведені). За допомогою вестерн-блотингу було показано, що відносне зниження об'єму корелюють з відносним зниженням експресії цикліну D1, білка, що бере участь в регуляції клітинного росту (дані не наведені). Циклін D1 експресується у високій мірі в зростаючих клітинах і зниження експресії цикліну D1 вказує на пригнічення клітинного росту.

Механізми пригнічення проліферації ракових клітин під дією CO

Були також клітинні механізми, за допомогою яких CO спричиняє вказане пригнічення, досліджені. З метою виявлення того, чи залежить індукована CO зупинка росту від cGMP, клітини A549 були піддані впливу повітря, CO, CO+ODQ або CO+Rp-8-BR. ODQ являє собою сполуку, яка селективно інгібує гуанілатциклазу, а Rp-8-Br являє собою неактивний аналог cGMP, який конкурентно інгібує сигнальний шлях, опосередкований cGMP. Здатність клітин проліферувати визначають по вимірюванню поглинання $[^3\text{H}]$ -тимідину клітинами (Фіг.5). Клітини піддають впливу CO (250ч/млн.) протягом 3 годин перед додаванням сироватки і $[^3\text{H}]$ -тимідину (5мCi/мл). Після додавання сироватки і $[^3\text{H}]$ -тимідину клітини витримують в атмосфері CO протягом 24 годин. Потім клітини промивають, фіксують та аналізують за допомогою скінтіляційної спектроскопії. Як показано на Фіг.5, клітини A549, що зазнали впливу повітря, CO+ODQ або CO+Rp-8-BR, демонструють підвищене поглинання $[^3\text{H}]$ -тимідину в порівнянні з клітинами, що зазнали впливу тільки CO. Наведені дані показують, що CO-індукована зупинка росту є cGMP-залежною.

PTC-клітини дикого типу (Wt) та HTC-клітини, дефіцитні по p21 (p21^{-/-}) гену, який, як відомо, здатний контролювати ріст клітин, піддають впливу повітря або CO для визначення того, чи бере участь p21 в CO-індукованій зупинці росту (Фіг.6). Як видно з рівня поглинання $[^3\text{H}]$ -тимідину, CO-індукована зупинка росту, видимо, менш виражена в HTC-клітинах, ніж в клітинах, дефіцитних по p21.

Для дослідження CO-індукованих змін в експресії різних білків росту/клітинного циклу в ракових клітинах, клітини A549 піддають впливу повітря або CO (250ч/млн.) протягом 24 годин. Після проведення експозиції протягом вказаного періоду часу збирають клітинні лізати з клітин і за допомогою імуноблотингу визначають зміни експресії білка в лізатах. Було показано, що CO викликає зміни в експресії p21, p27, ядерного антигену проліферуючих клітин (PCNA), Cdc25b і цикліну D1, які беруть участь в рості клітин і проліферації (Фіг.9A та 9B).

Видимо, CO інгібує проліферацію клітин в фазі G1/S клітинного циклу, яка є cGMP-залежною. Механізм дії CO, видимо, включає в себе модуляцію сигнальної трансдукції, що визначається p21, p27, цикліном D1, PCNA, Cdc25b та p38 MAP-кіназою, (регуляція проти ходу транскрипції) (дані не показані).

CO інгібує утворення фактора росту ендотеліальних клітин судин (VEGF) і пригнічує ангіогенез

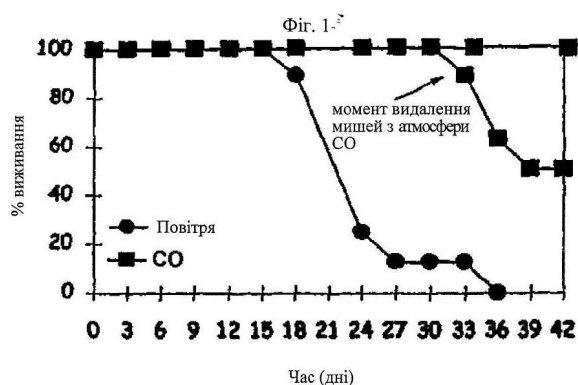
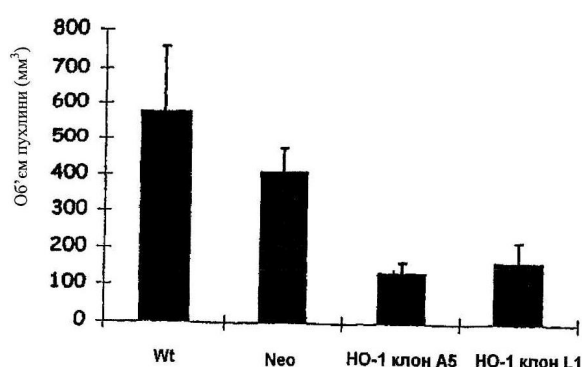
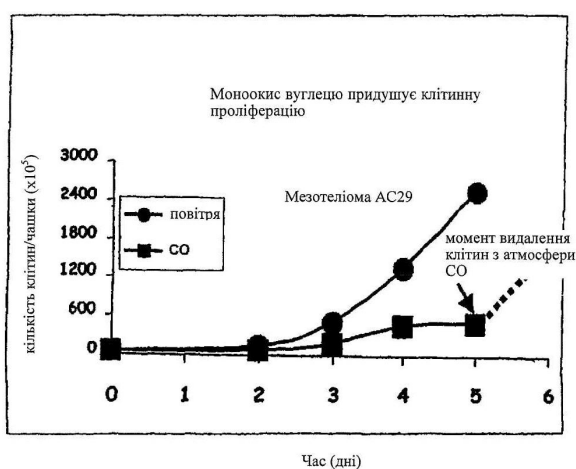
Проводилися дослідження для визначення того, чи інгібує CO утворення VEGF, ростового фактора, який бере участь в ангіогенезі по механізму прискорення росту кровоносних судин. Клітини A549 піддають впливу повітря або CO протягом 24-48 годин *in vitro* і виявляють наявність продукування VEGF клітинами A549 за допомогою імуноферментного твердофазного аналізу (ELISA). Як показано на Фіг.7, клітини, які зазнавали впливу CO плюс повітря, утворюють значно меншу кількість VEGF, ніж клітини, які піддають впливу тільки повітря.

Вплив CO (250ч/млн.) на ангиогенез досліджують в тесті на ангиогенез *in vitro* з використанням Matrigel™. Солюбілізовану мембранну матрицю (Matrigel™), що містить 20нг/мл ростового фактора (FGF) і гепарин, імплантують під шкіру мишам C57/B16. Потім мишей піддають впливу повітря або CO протягом двох тижнів. Після двотижневого періоду видаляють Matrigel™ і оцінюють тварин. Миші, які зазнавали впливу тільки повітря, демонструють початкові ознаки ангиогенезу, тоді як миші, що зазнали впливу CO, демонструють відсутність, росту нових кровоносних судин (дані не наведені).

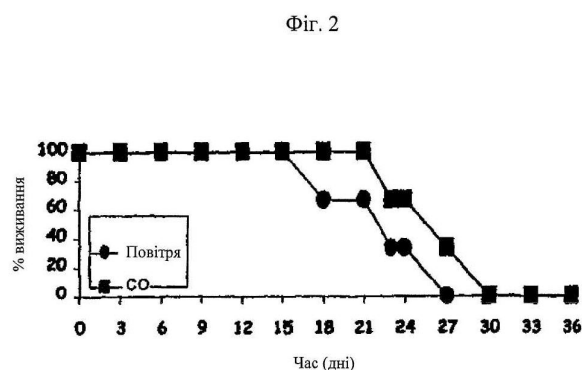
В окремому експерименті шар Matrigel™, що містить 20нг/мл ростового фактора (FGF) і гепарин, імплантують під шкіру мишам C57/B16, і потім мишей піддають впливу повітря або CO (250ч/млн) протягом 21 дня. Одержують мікрофотографії па-

рафінових зрізів, забарвлених гематоксиліном і еозином з вирізаних підшкірних шарів FGF-Matrigel. У відкладеннях у мишей, що зазнали впливу повітря, виявляється виражений ангиогенез, що спостерігається у вигляді організації лінії інфільтруючих судинних клітин в наповнені кров'ю мікрокапіляри (дані не наведені). У відкладеннях у мишей, оброблених CO, не виявляється ангиогенез, і в таких відкладеннях зазначається недостатність клітинності та крові.

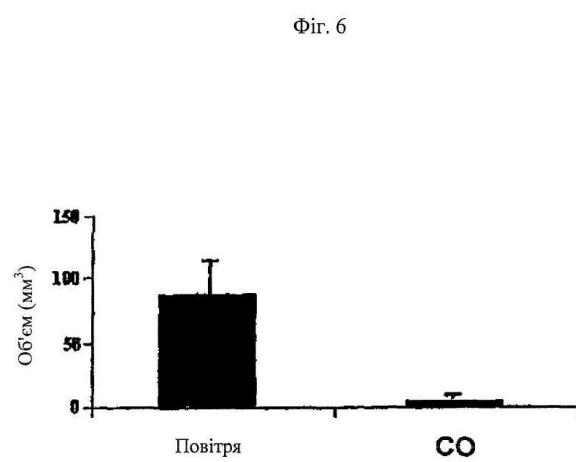
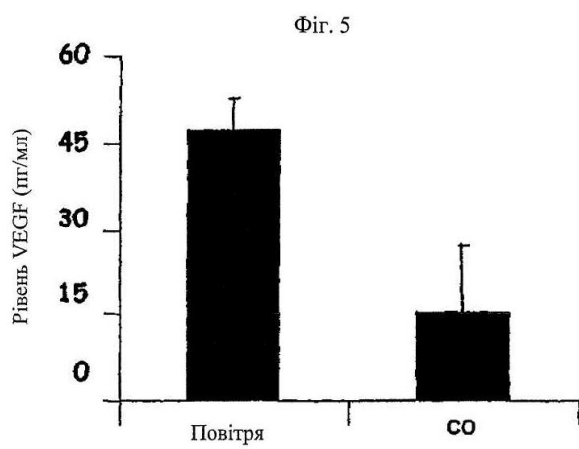
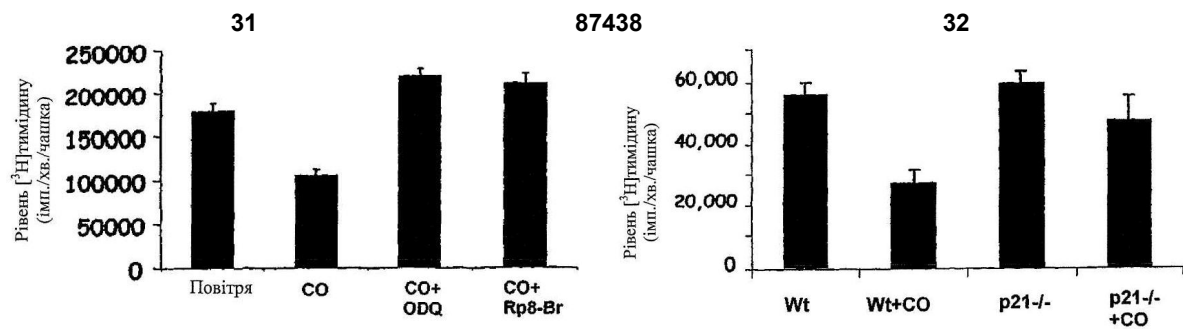
У даному описі наведена множина варіантів здійснення даного винаходу. Проте, потрібно розуміти, що можуть бути введені різні модифікації без відступу від суті та обсягу даного винаходу. Відповідно, інші варіанти визначаються обсягом прикладеної формули винаходу.



Фіг. 3

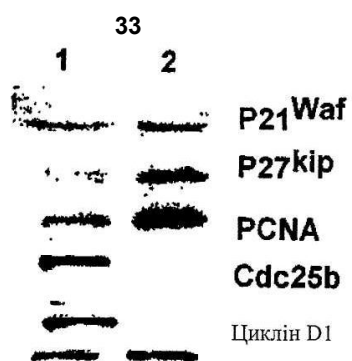


Фіг. 4



Фіг. 7

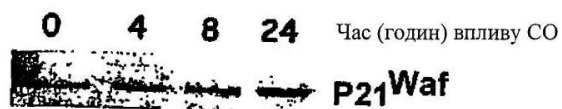
Фіг. 8



Фіг. 9А

87438

34



Фіг. 9В