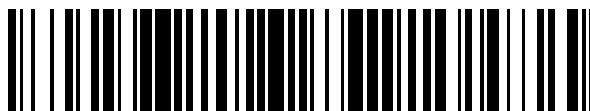


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 398**

51 Int. Cl.:

A61K 33/00 (2006.01)

A61P 11/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2013 PCT/IL2013/050215**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13132500**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2013 E 13757959 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2822564**

54 Título: **Inhalación de óxido nítrico para el tratamiento de enfermedades respiratorias**

30 Prioridad:

07.03.2012 US 201261607686 P

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

20.11.2018

73 Titular/es:

**ADVANCED INHALATION THERAPIES (AIT) LTD.
(100.0%)**

**Ilan Ramon 2, Science Park
7403635 Ness Ziona, IL**

72 Inventor/es:

**AV-GAY, YOSSEF;
MILLER, CHRISTOPHER C. y
GREENBERG, DAVID**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E
INVENCIONES, SLP**

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 690 398 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhalación de óxido nítrico para el tratamiento de enfermedades respiratorias

5 Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a la terapia y, más en particular, pero no exclusivamente, a métodos y dispositivos para el tratamiento de enfermedades respiratorias por inhalación de óxido nítrico gaseoso.

10 El óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) es una molécula de señalización lipófila pequeña con un radio de Stokes pequeño y un peso molecular de 30 gramos/mol que le permite atravesar la membrana plasmática celular glucolípídica hacia el citosol de manera fácil y rápida. El NO tiene un electrón no apareado disponible en su órbita exterior que lo caracteriza como un radical libre. Se ha demostrado que el NO desempeña un papel crítico en
15 diversas funciones corporales, incluyendo la vasodilatación del músculo liso, la neurotransmisión, la regulación de la cicatrización de heridas y las respuestas inmunitarias a infecciones tales como las provocadas por la acción bactericida dirigida a diversos organismos. Se ha demostrado que el NO desempeña un papel importante en la cicatrización de heridas a través de la vasodilatación, la angiogénesis, la acción antiinflamatoria y antimicrobiana.

20 El NO es un contaminante común del aire y está presente en concentraciones de 150-650 ppm en el humo de cigarrillo y de hasta 1200 ppm en el humo de puro y de pipa. El Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA, por sus siglas en inglés) y la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. han proporcionado un valor límite de umbral (VLU) de inhalación como un promedio ponderado en el tiempo (PPT) de 25 ppm para el NO. El
25 VLU-PPT es la concentración a la que el sistema respiratorio de una persona puede estar expuesto de forma continua durante una semana laboral normal sin efectos adversos y, cuando se representa en unidades de ppm por hora, se calcula para que sea de 200 ppm por hora. Este nivel es un promedio ponderado en el tiempo, es decir, el nivel promedio de NO debe ser inferior a 25 ppm; sin embargo, se permiten exposiciones breves a concentraciones más altas.

30 El NO es producido por la respuesta inmunitaria innata en los órganos y las células expuestas a infecciones víricas y bacterianas. Éstos incluyen, entre otros, la vía aérea nasofaríngea, los pulmones y los neutrófilos y macrófagos circulantes. El NO es también un radical libre microbicida altamente reactivo que posee actividad antimicrobiana contra una amplia gama de bacterias, parásitos, hongos y virus. El diámetro de los poros en las paredes celulares de los microorganismos a través de los cuales debe pasar la molécula de NO para afectar a estos patógenos es
35 aproximadamente cinco veces más ancho, por lo que hay pocas barreras a la penetración del NO en las células. Por tanto, el NO es una parte esencial de la respuesta inmunitaria innata. Además, el NO es una de las moléculas de señalización biológica más pequeñas y más importantes de los mamíferos.

40 Además de ser un agente antimicrobiano directo bien establecido, se ha planteado la hipótesis de que las propiedades antimicrobianas y reguladoras de mensajería celular del NO, administrado en forma gaseosa exógena, podrían ingresar fácilmente al medio pulmonar y ser útiles en la optimización del tratamiento de la enfermedad pulmonar no controlada con acciones específicas dirigidas a reducir la carga bacteriana, reducir la inflamación y mejorar los síntomas clínicos.

45 Algunos trastornos respiratorios y afecciones fisiológicas pueden tratarse por inhalación de óxido nítrico gaseoso (gNO, por sus siglas en inglés). El uso de gNO por inhalación puede prevenir, revertir o limitar la progresión de trastornos tales como vasoconstricción pulmonar aguda, lesión traumática, lesión por aspiración o inhalación, embolia grasa en el pulmón, acidosis, inflamación del pulmón, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, edema pulmonar agudo, mal de montaña agudo, post cirugía cardíaca, hipertensión pulmonar aguda, hipertensión pulmonar
50 persistente de un recién nacido, síndrome de aspiración perinatal, enfermedad de la membrana hialina, tromboembolia pulmonar aguda, reacciones a la heparina-protamina, sepsis, asma y estado asmático o hipoxia. El gNO inhalado también puede usarse para tratar la fibrosis quística (FQ), la hipertensión pulmonar crónica, la displasia broncopulmonar, la tromboembolia pulmonar crónica y la hipertensión pulmonar idiopática o primaria o la hipoxia crónica.

55 Desde el aspecto toxicológico, el NO tiene una semivida en el cuerpo de menos de 6 segundos y un radio de acción de aproximadamente 200 micrómetros desde su sitio de origen, más allá del cual se inactiva a través de la unión a grupos sulfhidrilo de tioles celulares o por nitrosilación de los restos hemo de la hemoglobina para formar metahemoglobina (MetHb). La MetHb reductasa reduce el NO a nitratos en el suero sanguíneo. El nitrato se ha
60 identificado como el metabolito predominante del óxido nítrico que se excreta en la orina, representando más del 70 % de la dosis de óxido nítrico inhalada. El riñón aclara el nitrato del plasma a velocidades cercanas a la tasa de filtración glomerular. Los niveles sanguíneos de MetHb en seres humanos sanos son normalmente inferiores al 2 %.

65 Los posibles efectos secundarios del tratamiento con dosis altas de NO incluyen, por tanto, la unión del NO a la hemoglobina y la formación de MetHb, lo que podría conducir a una disminución del transporte de oxígeno y la capacidad del NO para actuar como un agente de nitrosilación en proteínas y otros constituyentes celulares. La

formación de MetHb y los niveles aumentados de la misma se han observado en estudios previos de inhalación de gNO por individuos humanos sanos, en los que se ha notificado que la inhalación de gNO a 128 ppm durante 3 horas y a 512 ppm durante 55 minutos impulsa los niveles de MetHb por encima del umbral seguro del 5 % [Borgese N. et al., *J. Clin. Invest.*, 1987, 80, 1296-1302; Young J.D. et al., *Intensive Care Med.*, 1994, 20, 581-4 y Young J.D. et al., *Brit. J. Anaesthesia*, 1996, 76, 652-656].

Por tanto, se han planteado preocupaciones con respecto al uso potencial de NO como agente terapéutico en diversos escenarios clínicos. Hasta la fecha, los estudios indican que la lesión pulmonar aguda, el edema pulmonar, la hemorragia, los cambios en la tensión superficial del surfactante, la reducción de los números alveolares y la sensibilidad de las vías respiratorias pueden ser provocados por los altos niveles en las vías respiratorias de NO, NO₂ y otros óxidos de nitrógeno [Hurford W., *Resp. Care*, 2005, 50, 1428-9].

Se publicaron varios estudios en animales realizados con el fin de evaluar la ventana de seguridad para la exposición a gNO en la Revisión Médica Primaria de NDA 20-845 (gas de óxido nítrico INOmax). En estos informes se incluye el estudio denominado RDR-0087-DS, en el que grupos de 10 ratas se expusieron a aire ambiental o a 80, 200, 300, 400 o 500 ppm de gNO durante 6 horas continuas por día durante hasta 7 días. Se publica que todos los animales murieron en el primer día de exposición a 400 y 500 ppm de gNO con niveles de MetHb de 72,5 y 67 por ciento respectivamente. Seis de los animales tratados con 300 ppm de gNO murieron durante los primeros 1-2 días. Todas las muertes se atribuyeron a metahemoglobinemia.

En estudios adicionales, las ratas se expusieron de forma continua a aire ambiental, 40, 80, 160, 200 y 250 ppm de gNO durante 6 horas/día durante 28 días. No se produjeron muertes a concentraciones de gNO por debajo de 200 ppm.

En la actualidad, la inhalación de óxido nítrico gaseoso (gNO) como un vasodilatador selectivo de acción corta está aprobada solo a 80 ppm para su uso en lactantes a término con insuficiencia respiratoria hipóxica asociada a hipertensión pulmonar. Sin embargo, otros estudios han demostrado que a una concentración tan baja de gNO inhalado, el tratamiento de enfermedades respiratorias en adultos está limitado y el uso de dosis más altas de gNO para el tratamiento de diversas afecciones médicas por inhalación requiere estudios de seguridad en profundidad en seres humanos.

Miller et. al. publicaron el efecto de 1.600 ppm por hora de gNO contra cinco especies planctónicas (suspendidas en un líquido) de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM). También se usó un modelo de biopelícula de SARM *in vitro* para comparar gNO con el antibiótico vancomicina como agente antibacteriano. Para el experimento de la biopelícula, se usó un reactor de flujo por goteo para cultivar una biopelícula de SARM que después se expuso durante ocho horas a lactato de Ringer, 200 ppm de gNO (1.600 ppm por hora), aire o vancomicina (100 veces el nivel de CIM). Se observó una reducción en la población de las cinco cepas planctónicas de SARM después de la exposición a 1.600 ppm por hora de gNO. En el experimento de la biopelícula también se demostró que gNO reduce el SARM.

Estudios en animales adicionales han demostrado que el gNO a 160-200 ppm puede ejercer potentes efectos antimicrobianos contra una amplia gama de microbios *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales [Kelly T.J. et al., *J. Clin. Invest.*, 1998, 102, 1200-7; McMullin B. et al., *Resp. Care.*, 2005, 50, 1451-6; Ghaffari A. et al., *Nitric Oxide*, 2005, 12, 129-40; Ghaffari A. et al., *Wound Repair Regen.*, 2007, 15, 368-77; Miller C.C. et al., *J. Cutan. Med. Surg.*, 2004, 8, 233-8; Miller C.C. et al., *Nitric Oxide*, 2009, 20, 16-23], sugiriendo adicionalmente su uso como agente antimicrobiano en concentraciones apropiadas.

Los estudios realizados en un modelo en ratas de neumonía por *Pseudomonas aeruginosa* sometieron a ensayo el efecto antimicrobiano de una pauta de entrega inhalada de gNO de exposiciones intermitentes de 30 minutos a 160-200 ppm de gNO y revelaron que 160 ppm de gNO en esa pauta son eficaces para reducir la carga biológica pulmonar y la infiltración de leucocitos [Hergott C.A. et al., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 2006, 173, A135]. También se demostró que este tratamiento disminuye los síntomas clínicos de la enfermedad respiratoria bovina en el ganado [Schaefer A.L. et al., *Online J. Vet. Res.*, 2006, 10, 7-16].

Miller, C.C. et al. [*J. Cutan Med. Surg.*, 2004, 8 (4), 233-8] publicaron acerca del tratamiento tópico de un sujeto que tenía una herida crónica que no cicatrizaba y la presencia de una biopelícula recurrente con gNO en una concentración de tratamiento de 200 ppm durante dos semanas. Dentro de los primeros tres días de tratamiento, la biopelícula del sujeto ya no estaba visiblemente presente y, en una semana, el tamaño de la herida se redujo en un 42 %. La úlcera del sujeto continuó cicatrizándose tras el cese de la exposición al óxido nítrico.

El documento WO 2005/110441 enseña un método y un dispositivo correspondiente para combatir microbios e infecciones mediante la entrega de dosis altas intermitentes de 160-400 ppm de gNO a un mamífero durante un período de tiempo entre ciclos de concentración alta y baja de gas de óxido nítrico. La pauta consiste en la entrega de 160 ppm de gNO durante 30 minutos cada cuatro horas, con 0-20 ppm entregados durante las 3,5 horas entre las entregas de mayor concentración. No se presentan datos experimentales en esta publicación.

La Patente de los EE.UU. N.º 7.122.018 enseña la exposición tópica intermitente a una alta concentración de óxido nítrico que varía entre 160 y 400 ppm, para el tratamiento de heridas infectadas e infecciones respiratorias mediante una pauta de sesiones de 4 horas interrumpidas por 1 hora de descanso mientras se monitorizan los niveles sanguíneos de metahemoglobina.

La Patente de los EE.UU. N.º 7.516.742 enseña la dosificación alta-baja intermitente por inhalación de gNO para superar la toxicidad relacionada con gNO, en la que la concentración alta de gNO varía de 80 a 300 ppm y la concentración baja varía de 0 a 80 ppm, mientras que el régimen puede ser 160 ppm durante 30 minutos cada cuatro horas con 20 ppm entregados durante las 3,5 horas entre las entregas de mayor concentración monitorizando al mismo tiempo la concentración de O₂, NO y NO₂.

La Patente de los EE.UU. N.º 7.520.866 enseña la exposición tópica de heridas a gNO a una concentración alta que varía entre 160-400 ppm con una pauta de dos sesiones de 4 horas, interrumpidas por 1 hora de descanso, en la que después de un primer período de tratamiento con una concentración alta de gNO, puede proporcionarse un segundo período de tratamiento a una concentración más baja de 5-20 ppm para restablecer el equilibrio de óxido nítrico e inducir la expresión de colágeno para ayudar al cierre de la herida.

La Patente de los EE.UU. N.º 7.955.294 enseña un método y un dispositivo correspondiente para la entrega intermitente vía tópica e inhalada de dosis altas-bajas de gNO durante un período de tiempo con ciclos entre concentración alta y baja, con una pauta de ciclos de ejemplo de 160-200 ppm durante 30 minutos, seguida de 0-80 ppm 3,5 horas en la que la pauta de ciclos puede abarcar 1-3 días.

Los antecedentes de la técnica adicionales incluyen las Patentes de los EE.UU. N.º 8.083.997, 8.079.998, 8.066.904, 8.057.742, 7.531.133, 6.432.077, las Solicitudes de Patente de los EE.UU. N.º 2011/0262335, 2011/0259325, 2011/0240019, 2011/0220103 y 2010/0331405, 2011/0112468, 2008/028786, 2007/0116785, 2007/0088316, 2007/0065473, 2007/0014688, 2006/0207594, 2005/0191372 y los documentos WO 2006/071957, WO 2006/110923, WO 2006/110923, WO 2007/057763, WO 2007/057763, WO 2000/30659 y EP 0692984; Miller C.C. et al., *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2007, 51 (9), 3364-3366; y Miller C.C. et al., [*Resp Care*, 2008, 53 (11), 1530].

Otras publicaciones incluyen:

El documento WO 2007/057763

El documento WO 2005/110441

El documento US 2006/0207594

MILLER C ET AL, "Gaseous nitric oxide bactericidal activity retained during intermittent high-dose short duration exposure", *NITRIC OXIDE: BIOLOGY AND CHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL*, vol. 20, n.º 1, doi:10.1016/J.NIOX.2008.08.002, ISSN 1089-8603, (20090201), páginas 16 – 23

MILLER CHRISTOPHER C ET AL, "Inhaled nitric oxide decreases the bacterial load in a rat model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia", *JOURNAL OF CYSTIC FIBROSIS: OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN CYSTIC FIBROSIS SOCIETY*, DICIEMBRE DE 2013, (201312), vol. 12, n.º 6, ISSN 1873-5010, PÁGINAS 817 – 820

JACOBS B R ET AL, "Aerosolized soluble nitric oxide donor improves oxygenation and pulmonary hypertension in acute lung injury", *AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE*, NOVIEMBRE 1998, (199811), vol. 158, n.º 5, Parte 1, ISSN 1073-449X, páginas 1536 – 1542

JOHANNA ALBERT ET AL, "Prolonged exposure to inhaled nitric oxide does not affect haemostasis in piglets", *INTENSIVE CARE MEDICINE*, SPRINGER, BERLIN, ALEMANIA, (20070512), vol. 33, n.º 9, doi:10.1007/S00134-007-0666-3, ISSN 1432-1238, páginas 1594 – 1601

DIBLASI R M ET AL, "Evidence-based clinical practice guideline: Inhaled nitric oxide for neonates with acute hypoxic respiratory failure", *RESPIRATORY CARE, DAEDALUS ENTERPRISES, IRVING, TEXAS*, (20101201), vol. 55, n.º 12, ISSN 0020-1324, páginas 1717 – 1745

El documento US 2007/144515

PATEL ET AL., "Effect of inhaled nitric oxide on respiratory mechanics in ventilated infants with RSV bronchiolitis", *INTENSIVE CARE MEDICINE*, (1999), vol. 25, páginas 81 – 87

El documento US 2005/069595

ADATIA ET AL., "Inhaled Nitric Oxide and Hemodynamic Evaluation of Patients With Pulmonary Hypertension Before Transplantation", *JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY*, (199506), vol. 25, n.º 7, páginas 1656 – 1664

El documento US 2007/116785

El documento US 5427797

El documento US 5823180

El documento WO 02/41924

BOTHA ET AL., "Inhaled Nitric Oxide for Modulation of Ischemia-Reperfusion Injury in Lung Transplantation", *THE JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION*, (2007), vol. 26, n.º 11, páginas 1199 – 1205

WESTFELT ET AL., "Conversion of inhaled nitric oxide to nitrate in man", *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, (1995), vol. 114, páginas 1621 – 1624

El documento US 2004/028753

CANNON III ET AL., "Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery", *THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION*, (2001), vol. 108, n.º 2, páginas 279 – 287

El documento US 2007/275100

Finer N, Barrington KJ. *Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term*. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Entrega 4. Art. N.º: CD000399. DOI: 10.1002/14651858.CD000399.pub2

Heal, C. y Spencer, S. (1995), *Methaemoglobinaemia with high-dose nitric oxide administration*. *Acta Paediatrica*, 84: 1318-1319. doi: 10.1111/j.1651-2227.1995.tb13558.x

El documento US 2007/0144515 (Stenzler) desvela (Resumen) "Se describen un método y el dispositivo correspondiente para combatir microbios e infecciones mediante la entrega de dosis altas intermitentes de óxido nítrico a un mamífero durante un período de tiempo y con ciclos entre la concentración alta y baja de gas de óxido nítrico". Patel (1999, citado anteriormente) desvela el tratamiento de lactantes con gNO. El documento US 2005/0069595 (Chen) desvela el tratamiento de la inflamación infecciosa en un mamífero usando óxido nítrico en combinación con un glucocorticoide. Adatia (1995; citado anteriormente) desvela el tratamiento de pacientes con gNO. El documento US 2007/116785 (Miller) desvela el óxido nítrico como agente antivirico, vacuna y adyuvante de vacuna. El documento US5427797 (Frostell) desvela el óxido nítrico para la prevención o el tratamiento de la agregación plaquetaria sistémica, la embolia pulmonar, la angina de pecho y el síndrome de dificultad respiratoria aguda, la agregación plaquetaria sistémica, la embolia pulmonar, la angina de pecho y el síndrome de dificultad respiratoria aguda. El documento US 5823180 (Zapol) desvela métodos para el tratamiento de la vasoconstricción pulmonar y el asma usando óxido nítrico gaseoso. El documento WO 02/41924 (van Heerden) desvela (Resumen) "El uso de compuestos donadores de óxido nítrico en la preparación de un medicamento para la inhibición de factores de crecimiento en la vasculatura pulmonar de un mamífero, mejorando la tolerancia al esfuerzo en seres humanos que padecen una lesión pulmonar inducida por el hábito de fumar y procesos de enfermedad cardíaca que dan como resultado hipertensión pulmonar, la prevención y/o el tratamiento de la remodelación de la vasculatura pulmonar y/o el corazón derecho de un mamífero". Botha (2007, citado anteriormente) desvela el uso de óxido nítrico inhalado para la modulación de la lesión por isquemia-reperfusión en el trasplante de pulmón. Westfelt (1995, citado anteriormente) desvela la conversión de óxido nítrico inhalado en nitrato en el ser humano. El documento US 2004/028753 (Henedstierna) desvela el uso de óxido nítrico gaseoso inhalable (NO) en combinación con un inhibidor de la ciclooxigenasa para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la vasoconstricción pulmonar o la constricción de las vías respiratorias en un mamífero. Cannon III (2001, citado anteriormente) informa que los efectos del óxido nítrico inhalado en el flujo sanguíneo regional son coherentes con la entrega de óxido nítrico intravascular. El documento US 2007/0275100 (Miller) desvela el uso de óxido nítrico gaseoso como agente antineoplásico. Cada una de las publicaciones anteriores no dice nada acerca del uso de gNO para el tratamiento de lactantes con bronquiolitis usando la pauta de tratamiento de la presente invención.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han estudiado el efecto de la inhalación intermitente de óxido nítrico gaseoso a una concentración de 160 ppm o más en sujetos humanos y han demostrado que dicho protocolo de inhalación intermitente no produce cambios sustanciales en diversos parámetros fisiológicos del sujeto humano. Son ejemplos de dichos parámetros aquellos que pueden obtenerse en el sitio en tiempo real, tales como el nivel de metahemoglobina, el nivel de CO₂ al final de la espiración y la oxigenación, y parámetros que pueden obtenerse fuera del sitio en el laboratorio, tales como el nivel de nitrato en sangre, el nivel de nitrato en orina y el nivel de marcadores inflamatorios. Los presentes inventores han demostrado, por tanto, que un método de este tipo puede efectuarse de forma segura. Las realizaciones de la presente invención se refieren, por tanto, a métodos de administración de óxido nítrico gaseoso a sujetos humanos que lo necesitan, mientras que estos parámetros permanecen sustancialmente sin cambios.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona NO gaseoso (gNO) a una concentración de al menos 160 ppm, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que padece una enfermedad o trastorno que se manifiesta en las vías respiratorias o una enfermedad o trastorno que puede tratarse a través de las vías respiratorias, en el que el sujeto humano es un lactante, la enfermedad o trastorno es bronquiolitis y el gNO se administra al sujeto humano intermitentemente, en el que la inhalación intermitente comprende al menos un ciclo de inhalación continua de dicho gNO para un primer período de tiempo, seguido de la inhalación de nada de gNO durante un segundo período de tiempo.

De acuerdo con algunas realizaciones, dicha enfermedad o trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en una bronquiolitis bacteriana, bronquiolitis vírica y/o bronquiolitis fúngica.

De acuerdo con algunas realizaciones, dicha enfermedad o trastorno se asocia a un microorganismo patógeno.

De acuerdo con algunas realizaciones, dicha bronquiolitis se asocia a un virus. Preferentemente, dicho virus se selecciona entre el grupo que consiste en un virus sincitial respiratorio (VSR), un rinovirus, un coronavirus, un enterovirus, un virus de la gripe A y/o B, un virus paragripal 1, 2 y/o 3, un bocavirus, un metapneumovirus humano, SARS (síndrome respiratorio agudo grave, por sus siglas en inglés) y un adenovirus.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el primer período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el segundo período de tiempo varía de 3 a 5 horas.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la inhalación comprende de 1 a 6 de los ciclos por día.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la inhalación comprende 5 de los ciclos por día.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, durante el primer período de tiempo, la concentración de gNO en la mezcla se desvía de la concentración de al menos 160 ppm en menos del 10 %.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, durante el primer período de tiempo, una concentración de NO₂ en la mezcla es inferior a 5 ppm.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, durante el primer período de tiempo, una concentración de O₂ en la mezcla varía del 20 % al 25 %.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, durante el primer período de tiempo, una fracción de nivel de oxígeno inspirado (FOi₂) en la mezcla varía del 21 % al 100 %.

De acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento, la inhalación intermitente de gNO se efectúa durante un período de tiempo que varía de 1 a 7 días.

De acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento, el tratamiento se efectúa mediante un dispositivo de inhalación seleccionado entre el grupo que consiste en un dispositivo de inhalación estacionario, un inhalador portátil, un inhalador de dosis medida, un recinto controlado atmosféricamente y un inhalador intubado.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que se refiere la invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o en el ensayo de realizaciones de la invención, se describen a continuación métodos y/o materiales de ejemplo. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones.

Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

Breve descripción de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Ahora, con referencia específica a los dibujos en detalle, se subraya que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la materia cómo pueden ponerse en práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

las FIG. 1A-B presentan gráficos de barras de la técnica anterior que muestran la curva de dosificación de gNO medida para *S. aureus* (FIG. 1A) y *P. aeruginosa* (FIG. 1B) cultivados en medios sólidos, en los que el porcentaje relativo de crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) a 50, 80, 120 y 160 partes por millón (ppm) de óxido nítrico gaseoso (gNO) en comparación con el crecimiento de UFC en aire medicinal (100 %);

las FIG. 2A-C presentan gráficos comparativos de la técnica anterior que muestran la formación de placa vírica en el tejido en función del tiempo medida para viriones de gripe A/victoria/H3N2 después de la exposición a óxido nítrico 160 ppm y 800 ppm de forma continua durante 4 horas (FIG. 2A), los mismos viriones después de haber estado expuestos a una dosis de gNO durante 30 minutos en comparación con tres tratamientos de 30 minutos Q4h (FIG. 2B) y el efecto de la exposición continua a gNO a una concentración de 160 ppm durante 3 horas de la gripe aviar H7N3 altamente patógena (como se presenta el documento en US 2007/0116785);

las FIG. 3A-D presentan imágenes que muestran muestras de cultivos tisulares que albergan rgVSR30 humano, un virus de pulmón vírico común y el agente causante de la bronquiolitis, acoplado a una proteína fluorescente de color verde y que tiene un nivel vírico inicial de 2000 UFP (FIG. 3A), 1000 UFP (FIG. 3B) y 500 UFP (FIG. 3C), tras la exposición a 160 ppm de gNO durante 30 minutos, y un gráfico de barras comparativo que presenta la reducción de la placa en las muestras sometidas a ensayo para controlar las muestras expuestas al aire ambiental;

las FIG. 4A-B presentan los datos obtenidos al monitorizar los niveles de metahemoglobina (MetHb) antes, durante y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, que se sometieron a 5 ciclos de administración de gNO por inhalación diaria, cada uno de 30 minutos, durante 5 días

consecutivos, mientras que los niveles de metahemoglobina se midieron usando un oxímetro de pulso, en las que la FIG. 4A es un gráfico de los niveles de metahemoglobina en porcentajes en función del tiempo medidos anteriormente (punto temporal 0), durante 250 ciclos individuales de administración de gNO de 30 minutos (intervalo de tiempo de 0 a 30 minutos), después de los ciclos (intervalo de tiempo de 30 a 60 minutos) y 120 minutos, 180 minutos y 240 minutos después de que se suspendiera la administración de gNO, y la FIG. 4B es un gráfico de los niveles de metahemoglobina en porcentajes en función del tiempo, medidos al comienzo y al final de los ciclos de administración de gNO de 30 minutos proporcionados en el transcurso de 5 días y después de 8, 12 y 26 días después de que se suspendiera la administración de gNO;

las FIG. 5A-F presentan los datos obtenidos mientras se monitorizaba la función pulmonar antes, durante y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, en las que los valores basales de los ensayos de función pulmonar se obtuvieron en los 7 días previos a la administración de gNO y se obtuvieron valores durante la administración de gNO el día 2 del tratamiento de 5 días y se obtuvieron otros datos después de la administración final de gNO el día 5 y los días 8, 12 y 26, en las que la FIG. 5A presenta el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (VEF₁) en porcentajes (VEF₁), la FIG. 5B presenta el flujo espiratorio medio máximo (FEMM), la FIG. 5C presenta la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DPCO), la FIG. 5D presenta la capacidad vital forzada (CVF), la FIG. 5E presenta la capacidad pulmonar total (CPT) y la FIG. 5F presenta un volumen residual (VR), mientras que todos los datos se presentan como medias de los diez sujetos y diferencias absolutas en comparación con el valor basal antes de la administración de gNO, y se evaluaron las diferencias estadísticas mediante el ensayo de Mann-Whitney;

las FIG. 6A-F presentan concentraciones sanguíneas de diversas citocinas antes y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, medidas a partir de muestras de sangre extraídas dentro de los 7 días anteriores a la administración de gNO, cada día durante el tratamiento y 8, 12 y 26 días después, en las que la FIG. 6A presenta los niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral (TNF) α , los datos de interleucina (IL)-1 β se presentan en la FIG. 6B, IL-6 en la FIG. 6C, IL-8 en la FIG. 6D, IL-10 en la FIG. 6E e IL-12p70 en la FIG. 6F, determinados mediante una serie de perlas citométricas mientras que las diferencias estadísticas se comparan mediante mediciones repetidas de ANOVA con el ensayo posterior de Bonferroni para datos paramétricos (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70) o ensayo de Friedman con el ensayo posterior de Dunn para datos no paramétricos (TNF e IL-1b); y

las FIG. 7A-C presentan niveles plasmáticos de angiopoyetina (Ang)-1 y Ang-2 antes y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, medidos en una muestra de sangre recogida en los 7 días antes de la inhalación de gNO, cada día durante la administración de gNO y 8, 12 y 26 días a partir de entonces, en las que se muestran niveles plasmáticos de Ang 1 en la FIG. 7A, Ang-2 en la FIG. 7B y las relaciones Ang-2/Ang-1 en la FIG. 7C, determinados mediante el uso de una serie de perlas citométricas mientras que las diferencias estadísticas se evaluaron en comparación con el ensayo de Friedman con el ensayo posterior de Dunn.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere al tratamiento médico de enfermedades respiratorias en sujetos humanos y, más en particular, pero no exclusivamente, a procedimientos médicos basados en la inhalación de óxido nítrico gaseoso y dispositivos para efectuar la mismo.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a las figuras y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, ha de entenderse que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de ponerse en práctica o realizarse de diversas maneras. Además, ha de entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento tienen fines de descripción y no han de considerarse limitantes.

Como se ha analizado anteriormente, se ha demostrado que la inhalación de óxido nítrico gaseoso (gNO) es una terapia antimicrobiana de amplio espectro altamente eficaz; sin embargo, a una concentración antimicrobiana eficaz, el gNO puede presentar efectos adversos graves en los seres humanos. Como se ha demostrado en estudios anteriores, la dosis aprobada actualmente de 80 ppm de gNO es probablemente demasiado baja para ejercer suficientes efectos antimicrobianos.

Como se ha analizado adicionalmente anteriormente en el presente documento, se ha sugerido la dosificación y la entrega intermitentes por inhalación de gNO, con ciclos entre altas concentraciones de gNO durante un período relativamente corto de tiempo y períodos más largos de ninguna concentración o concentración baja de gNO para superar los problemas de toxicidad del NO. Se ha sugerido que la concentración alta de gNO, administrada de acuerdo con una pauta intermitente, sería eficaz para desbordar los mecanismos de defensa frente al óxido nítrico de los patógenos.

Se ha sugerido adicionalmente en la técnica que la concentración alta de gNO puede entregarse a una concentración de entre 80 ppm a 300 ppm y que los períodos de tiempo para entregar la concentración alta deberían

permitir una entrega diaria de 600 a 1000 ppm por hora.

Sin embargo, hasta la fecha, no se ha aplicado en seres humanos una pauta de inhalación intermitente de gNO, con ciclos entre concentraciones altas de gNO durante un período de tiempo relativamente corto y períodos más largos de ninguna concentración o concentración baja de gNO. Nunca se han realizado estudios que demostraran la seguridad y la eficacia de dichos protocolos en sujetos humanos y no se proporcionó ningún protocolo para monitorizar los parámetros de seguridad y/o para el tratamiento de pacientes humanos que necesiten la inhalación de gNO por encima de la dosis aprobada de 80 ppm.

En el curso de la concepción y la práctica de nuevos métodos para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas, víricas y protozoarias, los presentes inventores han realizado estudios en sujetos humanos y han compilado protocolos adecuados para el tratamiento seguro y eficaz de un sujeto humano mediante la inhalación intermitente de altas concentraciones de gNO. Los presentes inventores han demostrado que duraciones cortas de altas concentraciones de gNO no provocan lesiones pulmonares u otros signos de efectos adversos en seres humanos e incluso mejoran algunos efectos vitales tales como la función pulmonar y la frecuencia cardíaca.

Específicamente, los presentes inventores han realizado un estudio de seguridad abierto de fase I prospectivo en adultos sanos, que inhalaban 160 ppm de gNO durante 30 minutos, cinco veces al día, durante cinco días consecutivos. No se han producido acontecimientos adversos significativos ni acontecimientos adversos atribuibles a la inhalación de gNO y todos los individuos toleraron bien los ciclos de tratamiento con gNO. El porcentaje de volumen espiratorio forzado en 1 segundo (VEF 1) y otros parámetros de la función pulmonar mejoraron y los niveles séricos de nitritos/nitratos, protrombina, citocinas proinflamatorias y quimiocinas no difirieron entre el valor basal y el día 5, mientras que los niveles de metahemoglobina aumentaron durante el período de estudio a un nivel tolerado y aceptado del 0,9 %. De este modo se demostró que la inhalación de 160 ppm de gNO o más durante 30 minutos, aproximadamente 5 veces al día, durante 2-7 días consecutivos, es segura y bien tolerada en individuos sanos.

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, proporciona, por tanto, métodos de tratamiento de sujetos humanos mediante la inhalación intermitente de una concentración alta de gNO. En algunas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento se efectúan mientras se monitorizan diversos parámetros relevantes para mantener la dosis y la pauta deseados, relevantes para la seguridad del procedimiento y relevantes para la eficacia del tratamiento.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, someter al sujeto humano a la inhalación intermitente de gNO se efectúa sometiendo intermitentemente al sujeto humano a una mezcla gaseosa que contiene gNO a la concentración indicada (una mezcla gaseosa que contiene gNO).

El sujeto humano puede someterse a la inhalación por medios activos o pasivos.

Por "medios activos" se entiende que la mezcla gaseosa se administra o se entrega a las vías respiratorias del sujeto humano. Esto puede efectuarse, por ejemplo, por medio de un dispositivo de inhalación que tiene una interfaz de entrega adaptada a los órganos respiratorios humanos. Por ejemplo, la interfaz de entrega puede situarse intermitentemente en los órganos respiratorios del sujeto humano, por lo que cuando se retira, el sujeto respira aire ambiental o cualquier otra mezcla gaseosa desprovista de gNO, como se define en el presente documento.

Por "medios pasivos" se entiende que el sujeto humano inhala una mezcla gaseosa que contiene la dosis indicada de gNO sin dispositivos para entregar la mezcla gaseosa a las vías respiratorias.

Por ejemplo, el sujeto puede someterse a 160 ppm o más de gNO en una pauta intermitente entrando y saliendo de un recinto controlado atmosféricamente lleno con la mezcla de gases que contiene gNO analizada en el presente documento, o llenando y evacuando un recinto controlado atmosféricamente que está en contacto con las vías respiratorias de un sujeto.

El término "intermitente" se usa en el presente documento y en la técnica como antónimo de "continuo" y significa iniciar y cesar una acción y/o realizar una acción en intervalos.

Por "inhalación intermitente" se entiende que el sujeto se somete a una mezcla gaseosa que contiene la concentración indicada de gNO intermitentemente y, por tanto, inhala una mezcla gaseosa que contiene gNO de este tipo dos o más veces con intervalos entre cada inhalación. Por tanto, el sujeto inhala la mezcla gaseosa que contiene gNO, después deja de inhalar una mezcla gaseosa que contiene gNO y, en su lugar, inhala una mezcla gaseosa que no contiene la concentración indicada de gNO (por ejemplo, aire), después inhala nuevamente la mezcla gaseosa que contiene gNO y así sucesivamente.

En todo el presente documento, se usa "una mezcla gaseosa que contiene gNO", por simplicidad, para describir una mezcla gaseosa que contiene al menos 160 ppm de gNO. La mezcla que contiene gNO puede comprender 160 ppm, 170 ppm, 180 ppm, 190 ppm, 200 ppm e incluso concentraciones más altas de gNO. Otras mezclas gaseosas mencionadas en el presente documento incluyen menos de 160 ppm de gNO o están esencialmente

desprovistas de gNO, como se define en el presente documento.

Por "esencialmente desprovisto de gNO" se entiende no más de 50 ppm, no más de 40 ppm, no más de 30 ppm, no más de 20 ppm, no más de 10 ppm, no más de 5 ppm, no más de 1 ppm y no más de ppb, incluyendo absolutamente nada de gNO.

En algunas realizaciones, el método se realiza mientras se mantiene una mezcla controlada de gases inhalados y exhalados por medios convencionales para monitorizar y controlar, in situ, el contenido y/o el flujo de la mezcla a la que se somete el sujeto, o la que se entrega a través de una interfaz de entrega y/o mientras se monitorizan los gases exhalados en el sitio y se controla la captación mediante retroalimentación en tiempo real. En algunas realizaciones, el método se realiza mientras se monitoriza la concentración de gNO, FO₂/O₂, CO₂CF y NO₂ en la mezcla gaseosa a la que se expone el sujeto o mediante la monitorización de otros sistemas corporales de manera no invasiva, tales como la saturación sanguínea de oxígeno (SpO₂/SaO₂/DO) y la presencia de metahemoglobina en la sangre (SpMet).

En algunas realizaciones, la concentración de gNO en la mezcla gaseosa que contiene gNO se controla para que no se desvíe de una concentración predeterminada en más del 10 %. Por ejemplo, el método se realiza mientras que la concentración de gNO, establecida en 160 ppm, no exceda de los márgenes de 144 ppm a 176 ppm.

De manera similar, el contenido de NO₂ en una mezcla gaseosa que contiene gNO se controla de manera que la concentración de NO₂ se mantenga por debajo de 5 ppm.

Adicionalmente, el nivel de oxígeno en la mezcla gaseosa que contiene gNO se controla de manera que la concentración de O₂ en la mezcla varíe de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 25 %.

Como alternativa, o adicionalmente, el nivel de oxígeno en la mezcla gaseosa que contiene gNO se controla de manera que la fracción de oxígeno inspirado (FO₂) varíe entre aproximadamente el 20 % y aproximadamente el 100 %.

La frase "fracción de oxígeno inspirado" o "FO₂", como se usa en el presente documento, se refiere a la fracción o porcentaje de oxígeno en una muestra de gas dada. Por ejemplo, el aire ambiental al nivel del mar incluye un 20,9 % de oxígeno, que es equivalente a una FO₂ de 0,21. El aire enriquecido con oxígeno tiene una FO₂ superior a 0,21, de hasta 1,00, lo que significa un 100 % de oxígeno. En el contexto de realizaciones de la presente invención, la FO₂ se mantiene por debajo de 1 (menos del 100 % de oxígeno).

La frase "CO₂ al final de la espiración" o "CO₂FE", como se usa en el presente documento, se refiere a la presión parcial o la concentración máxima de carbono dióxido (CO₂) al final de una respiración exhalada, que se expresa como un porcentaje de CO₂ o la unidad de presión mmHg. Los valores normales para los seres humanos varían del 5 % al 6 % de CO₂, que es equivalente a 35-45 mmHg. Puesto que el CO₂ difunde fuera de los pulmones hacia el aire exhalado, los valores de CO₂FE reflejan el gasto cardíaco (GC) y el flujo sanguíneo pulmonar cuando el gas es transportado por el sistema venoso hacia el lado derecho del corazón y después se bombea a los pulmones por el ventrículo derecho. Un dispositivo denominado capnómetro mide la presión parcial o la concentración máxima de CO₂ al final de la exhalación. En el contexto de realizaciones de la presente invención, se usa un capnómetro y los niveles de CO₂FE se monitorizan de manera que se proporcione una retroalimentación de advertencia cuando el CO₂FE sea superior a 60 mmHg.

Los niveles de NO, NO₂ y los niveles de concentración de O₂ respiratorios (tanto inhalados como exhalados; gases inspiratorios y espiratorios) se monitorizan de forma continua mediante el muestreo desde un orificio de muestra de la boquilla ubicado en una mascarilla de inhalación de NO, NO₂ y O₂ equipada con un analizador electroquímico. En el contexto de las realizaciones de la presente invención, las consideraciones de seguridad requieren la minimización absoluta del número de ocasiones en el que los niveles de NO₂ superan 5 ppm, superando las variaciones de concentración de gNO el 10 % y cayendo los niveles de FO₂/O₂ por debajo del 20 % durante la administración de gNO.

De acuerdo con la presente invención, la inhalación intermitente incluye uno o más ciclos, comprendiendo cada ciclo la inhalación continua de una mezcla gaseosa que contiene gNO a la concentración alta especificada (por ejemplo, al menos 160 ppm) durante un primer período de tiempo, seguida de la inhalación de una mezcla gaseosa que no contiene nada de gNO durante un segundo período de tiempo. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, durante el segundo período de tiempo, el sujeto puede inhalar aire ambiental o una mezcla controlada de gases que está esencialmente desprovista de gNO, como se define en el presente documento.

En algunas realizaciones, el primer período de tiempo se extiende de 10 a 45 minutos o de 20 a 45 minutos o de 20 a 40 minutos y, de acuerdo con algunas realizaciones, se extiende aproximadamente 30 minutos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el segundo período de tiempo varía de 3 a 5 horas o de 3 a 4 horas y, de acuerdo con algunas realizaciones, el segundo período de tiempo abarca aproximadamente 3,5

horas.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, esta pauta de inhalación se repite 1-6 veces durante 24 horas, dependiendo de la duración del primer y el segundo período de tiempo.

5 En algunas realizaciones, se repite de 1 a 6 veces al día un ciclo de entrega intermitente de gNO, por ejemplo, 160 ppm durante 30 minutos, seguido de 3,5 horas de no respirar nada de gNO. De acuerdo con algunas realizaciones, los ciclos se repiten 5 veces al día.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el régimen de 1 a 5 ciclos por día se realiza durante 1 a 7 días o de 2 a 7 días o de 3 a 7 días. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la inhalación intermitente se efectúa durante un período de tiempo de 5 días. Sin embargo, también se contemplan períodos de tiempo más largos de administración intermitente de gNO como se describe en el presente documento.

15 En algunas realizaciones, el método se efectúa mientras se monitorizan uno o más parámetros fisiológicos en el sujeto y mientras se asegura que no se efectúa ningún cambio sustancial en los parámetros monitorizados (como se demuestra en el presente documento).

20 En algunas realizaciones, la monitorización de uno o más parámetros fisiológicos se efectúa mediante mediciones no invasivas y/o mediciones levemente invasivas.

25 En algunas realizaciones, la monitorización del parámetro o los parámetros fisiológicos en el sujeto se efectúa mediante la medición en el sitio y técnicas de análisis basadas en muestras obtenidas de forma esporádica, continua o periódica del sujeto en el sitio, en tiempo real, junto a la cama del sujeto, y/o medición fuera del sitio y técnicas de análisis basadas en muestras tomadas esporádicamente o periódicamente del sujeto que se envían para su procesamiento en un sitio externo que proporciona los resultados y análisis en un momento posterior.

30 En el contexto de algunas realizaciones de la presente invención, la frase "análisis en el sitio y técnicas de medición" o "técnicas en el sitio", se refiere a las técnicas de monitorización que informan al facultativo de un parámetro fisiológico dado del sujeto en tiempo real, sin la necesidad de enviar la muestra o los datos sin procesar a una instalación fuera del sitio para su análisis. Las técnicas en el sitio con frecuencia no son invasivas, sin embargo, algunas se basan en el muestreo con un dispositivo médico invasivo tal como un tubo respiratorio, un tubo de drenaje, un catéter intravenoso o un puerto subcutáneo o cualquier otra sonda implantable. Por tanto, la frase "parámetros en el sitio", como se usa en el presente documento, se refiere a parámetros fisiológicos que pueden obtenerse mediante técnicas en línea.

35 Además de la ventaja insignificante de la determinación en el sitio en tiempo real de parámetros fisiológicos, expresada principalmente en la capacidad de un facultativo para responder inmediata y manualmente a cualquier cambio crítico de los mismos, los datos resultantes de la determinación en línea en tiempo real de los parámetros fisiológicos pueden alimentarse en la maquinaria y pueden usarse para el control de la retroalimentación en tiempo real de la maquinaria. En el contexto de las realizaciones de la presente invención, la expresión "tiempo real" también se refiere a sistemas que actualizan la información y responden a la misma sustancialmente a la misma velocidad a la que reciben la información. Dicha retroalimentación en tiempo real puede usarse para adherirse a la pauta de tratamiento y/o para actuar de forma inmediata y automática en respuesta a cualquier desviación crítica de los parámetros aceptables como medida de seguridad.

40 Por tanto, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, la expresión "parámetro en el sitio" se refiere a datos fisiológicos y/o mecánicos y/o químicos que pueden obtenerse y pueden usarse o tenerse en cuenta en el sitio del sujeto o cerca de él (por ejemplo, junto a la cama) en un período de tiempo relativamente corto, es decir, que el período de tiempo que abarca las etapas de muestreo, ensayo, procesamiento y visualización/uso de los datos es relativamente corto. Puede obtenerse un "parámetro en el sitio", por ejemplo, en menos de 30 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos, menos de 1 minuto, menos de 0,5 minutos, menos de 20 segundos, menos de 10 segundos, menos de 5 segundos o menos de 1 segundo desde el muestreo hasta su uso. Por ejemplo, el período de tiempo requerido para obtener parámetros en el sitio mediante una técnica conocida como oximetría de pulso es casi instantáneo; una vez que el dispositivo está en su lugar y configurado, los datos relativos a, por ejemplo, la saturación de oxígeno en la periferia de un sujeto, están disponibles en menos de 1 segundo desde el muestreo hasta su uso.

55 En el contexto de algunas realizaciones de la presente invención, la frase "técnicas de medición y análisis fuera del sitio" o "técnicas fuera del sitio", se refieren a técnicas que proporcionan información con respecto a un parámetro fisiológico dado del sujeto después de enviar una muestra o datos sin procesar a una instalación fuera de línea y, normalmente, fuera del sitio, y recibir el análisis fuera de línea, a veces horas o días después de la obtención de la muestra. Las técnicas fuera del sitio con frecuencia se basan en muestras recogidas mediante técnicas levemente invasivas, tales como la extracción de sangre para monitorizar el nivel plasmático de citocinas inflamatorias, y técnicas invasivas, tales como biopsias, catéteres o tubos de drenaje, sin embargo, algunas técnicas fuera del sitio se basan en el muestreo no invasivo tal como la química de la orina y las heces fuera de línea y el análisis fuera del

sitio. La frase "parámetros fuera del sitio", como se usa en el presente documento, se refiere a parámetros fisiológicos que pueden obtenerse mediante técnicas de laboratorio fuera del sitio.

Por tanto, de acuerdo con realizaciones de la presente invención, la expresión "parámetro externo" se refiere a datos fisiológicos y/o mecánicos y/o químicos que se obtienen y pueden usarse o tenerse en cuenta en un período de tiempo relativamente largo, en concreto, a que el período de tiempo que abarca las etapas de muestreo, ensayo, procesamiento y visualización/uso de los datos es largo en comparación con los parámetros en el sitio. Por tanto, puede obtenerse un "parámetro fuera del sitio" en más de 1 día, más de 12 horas, más de 1 hora, más de 30 minutos, más de 10 minutos o más de 5 minutos desde el muestreo hasta el uso.

Un "parámetro fuera del sitio" puede obtenerse normalmente tras someter una muestra a procedimientos químicos, biológicos, mecánicos u otros, que normalmente se realizan en un laboratorio y, por tanto, no se realizan "en el sitio", es decir, en o cerca del sitio del sujeto.

Las medidas no invasivas para monitorizar diversos parámetros fisiológicos incluyen, sin limitación, la oximetría de pulso, el análisis respiratorio no intubado y/o la capnometría. Las medidas levemente invasivas para monitorizar diversos parámetros fisiológicos incluyen, sin limitación, extracción de sangre, análisis continuo de gases en sangre y metabolitos y, en algunas realizaciones, análisis respiratorios intubados y medidas de monitorización transcutáneas.

La expresión "oximetría de pulso" se refiere a una tecnología no invasiva y en el sitio que mide parámetros fisiológicos relacionados con la respiración mediante el seguimiento de características de absorción de luz de la hemoglobina a través de la piel (dedo, lóbulo de la oreja, etc.) y a las diferencias espectroscópicas observadas en especies oxigenadas y desoxigenadas de hemoglobina, así como especies de hemoglobina unidas a otras moléculas, tales como monóxido de carbono (CO) y metahemoglobina en las que el hierro en el grupo hemo está en el estado Fe^{3+} (férico). Los parámetros fisiológicos que pueden determinarse mediante oximetría de pulso incluyen SpO_2 , SpMet y SpCO .

La frase "análisis respiratorio no intubado", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de tecnologías no invasivas y en el sitio, tales como la espirometría y la capnografía, que proporcionan mediciones de la mecánica pulmonar fisiológica y la química gaseosa respiratoria mediante muestreo del flujo de aire inhalado/exhalado o mediante la dirección de la respiración del sujeto hacia un detector, todo esto sin entrar en las vías respiratorias u otros orificios, ni penetrar en la piel en ninguna etapa.

El término "espirometría", como se usa en el presente documento, se refiere a la batería de mediciones de los parámetros relacionados con la respiración y las funciones pulmonares por medio de un espirómetro no invasivo y en el sitio. Los siguientes son ejemplos de parámetros de espirometría que pueden usarse en el contexto de algunas realizaciones de la presente invención:

El parámetro espirométrico volumen corriente (VC) es la cantidad de aire inhalado y exhalado normalmente en reposo, en el que los valores normales se basan en el peso corporal ideal de la persona.

El parámetro espirométrico de la Capacidad Pulmonar Total (CPT) es el volumen máximo de aire presente en los pulmones.

El parámetro espirométrico de la Capacidad Vital (CV) es la cantidad máxima de aire que puede expulsarse de los pulmones después de la inhalación máxima y es igual a la suma del volumen inspiratorio de reserva, el volumen corriente y el volumen espiratorio de reserva.

El parámetro espirométrico Capacidad Vital Lenta (CVL) es la cantidad de aire que se inhala lo más profundamente posible y después se exhala por completo, que mide la profundidad con la que una persona puede respirar.

El parámetro espirométrico Capacidad Vital Forzada (CVF) es el volumen de aire medido en litros, que puede expulsarse forzosamente después de la inspiración completa y constituye la maniobra más básica en los ensayos de espirometría.

El parámetro espirométrico Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo (VEF1) es el volumen de aire que puede expulsarse forzosamente en un segundo, después de la inspiración completa. Los valores promedio de VEF1 en personas sanas dependen principalmente del sexo y la edad, mientras que los valores que se encuentran entre el 80 % y el 120 % del valor promedio se consideran normales. Los valores normales previstos para VEF1 pueden calcularse en el sitio y dependen de la edad, el sexo, la altura, el peso y el origen étnico, así como del estudio de investigación en el que se basan.

El parámetro espirométrico relación VEF1/CVF (VEF1 %) es la relación de VEF1 con respecto a CVF, que en adultos sanos debe ser aproximadamente del 75-80 %. El VEF1 % previsto se define como el VEF1 % del paciente dividido por el VEF1 % promedio en la población apropiada para esa persona.

El parámetro espirométrico Flujo Espiratorio Forzado (FEF) es el flujo (o velocidad) del aire que sale del pulmón durante la porción media de una espiración forzada. Puede proporcionarse en momentos discretos, generalmente definidos por la fracción que queda de la capacidad vital forzada (CVF), en concreto, el 25 % del CVF (FEF25), el 50 % del CVF (FEF50) o el 75 % del CVF (FEF75). También puede proporcionarse como una media del flujo durante un intervalo, también generalmente delimitada cuando quedan fracciones específicas de CVF, por lo general el 25-75 % (FEF25-75 %). Los valores medidos que varían desde el 50-60 % hasta el 130 % del promedio se consideran normales, mientras que los valores normales previstos para FEF pueden calcularse en el sitio y dependen de la edad, el sexo, la altura, el peso y el origen étnico, así como del estudio de investigación en el que se basan. Investigaciones recientes sugieren que el FEF25-75 % o el FEF25-50 % puede ser un parámetro más sensible que el VEF1 en la detección de la enfermedad obstructiva de las vías respiratorias pequeñas. Sin embargo, en ausencia de cambios concomitantes en los marcadores convencionales, las discrepancias en el flujo espiratorio de intervalo medio pueden no ser lo suficientemente específicas para ser útiles y las directrices de práctica actuales recomiendan seguir usando VEF1, CV y VEF1/CV como indicadores de enfermedad obstructiva.

El parámetro espirométrico Fuerza de inspiración negativa (FIN) es la mayor fuerza que los músculos del pecho pueden tomar aire, en la que los valores indican el estado de los músculos respiratorios.

El parámetro espirométrico FEMM o FEM se refiere al flujo espiratorio (medio) máximo y es el pico del flujo espiratorio tomado de la curva de flujo-volumen y medido en litros por segundo. El FEMM está relacionada con el flujo espiratorio máximo (FEP), que generalmente se mide con un medidor de flujo máximo y se da en litros por minuto.

El parámetro espirométrico de flujo espiratorio pico (FEP) se refiere al flujo (o velocidad) máximo alcanzado durante la espiración máxima forzada iniciada con inspiración completa, medida en litros por minuto.

El parámetro espirométrico capacidad de difusión de monóxido de carbono (D_{pCO}) se refiere a la captación de monóxido de carbono a partir de una sola inspiración en un tiempo convencional (generalmente 10 segundos). Hay calculadoras en el sitio disponibles para corregir la D_{pCO} para los niveles de hemoglobina, anemia, hemorragia pulmonar y altitud y/o presión atmosférica donde se tomó la medición.

El parámetro espirométrico Ventilación Voluntaria Máxima (VVM) es una medida de la cantidad máxima de aire que puede inhalarse y exhalarse en un minuto. Normalmente, este parámetro se determina durante un período de tiempo de 15 segundos antes de extrapolarse a un valor de un minuto expresado en litros/minuto. Los valores promedio para hombres y mujeres son de 140-180 y 80-120 litros por minuto, respectivamente.

El parámetro espirométrico distensibilidad pulmonar estática ($Dest$) se refiere al cambio en el volumen pulmonar para cualquier presión aplicada dada. La distensibilidad pulmonar estática es quizás el parámetro más sensible para la detección de mecanismos pulmonares anormales. La $Dest$ se considera normal si es del 60 % al 140 % del valor promedio de una población conmensurable.

El parámetro espirométrico Tiempo Espiratorio Forzado (TEF) mide la duración de la expiración en segundos.

El parámetro espirométrico Capacidad Vital Lenta (CVL) es el volumen máximo de aire que puede exhalarse lentamente después de una inhalación lenta y máxima.

La presión al final de la espiración positiva intrínseca estática (PFEPi estática) se mide como una presión de apertura de la vía aérea de meseta durante la oclusión de la vía aérea.

El parámetro espirométrico Presión Inspiratoria Máxima (PIM) es el valor que representa el nivel más alto de presión negativa que una persona puede generar por sí sola durante una inhalación, que se expresa en centímetros de presión de agua (cmH₂O) y se mide con un manómetro y sirve como indicador de la resistencia del diafragma y un parámetro de diagnóstico independiente.

El término "capnografía" se refiere a una tecnología para monitorizar la concentración o presión parcial de dióxido de carbono (CO₂) en los gases respiratorios. El CO₂ al final de la expiración o CO₂FE, es el parámetro que puede determinarse mediante capnografía.

La tecnología de detección de gases está integrada en muchos dispositivos médicos y otros dispositivos industriales y permite la determinación cuantitativa de la composición química de una muestra gaseosa que fluye o que de otro modo se captura en los mismos. En el contexto de realizaciones de la presente invención, dicha determinación química de los gases forma parte de la batería de ensayos, no invasiva, en el sitio, de la actividad monitorizada y supervisada de los métodos presentados en el presente documento. Se usan detectores de gas, así como mezcladores y reguladores de gas, para determinar y controlar parámetros tales como la fracción del nivel de oxígeno inspirado (FOi₂) y la concentración de óxido nítrico en la mezcla de gas inhalado.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la medición de signos vitales, tales como la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la temperatura corporal, se considera parte de una batería de mediciones in situ y no invasivas.

- 5 La frase "índice pulmonar integrado" o IPI, se refiere a un índice pulmonar del paciente que usa información sobre los gases inhalados/exhalados de la capnografía y sobre los gases disueltos en la sangre de la oximetría de pulso para proporcionar un valor único que describe el estado respiratorio del paciente. El IPI, que se obtiene mediante técnicas en el sitio y no invasivas, integra cuatro parámetros fisiológicos principales proporcionados por un monitor del paciente (el CO₂ al final de la espiración y la frecuencia respiratoria medida por capnografía y la velocidad de pulso y la oxigenación de la sangre SpO₂ medida por oximetría de pulso), usando esta información junto con un algoritmo para producir la puntuación de IPI. El IPI proporciona una indicación simple en tiempo real (en el sitio) del estado ventilatorio general del paciente como un número entero (puntuación) que varía de 1 a 10. La puntuación del IPI no reemplaza los parámetros respiratorios actuales del paciente, pero se usa para evaluar el estado respiratorio del paciente rápidamente de manera de determinar la necesidad de una evaluación o intervención clínica adicional.

- 15 De acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento, los parámetros fisiológicos o químicos monitorizados incluyen uno o más de los siguientes parámetros:

- 20 un nivel de metahemoglobina (SpMet) (un parámetro en línea);
un nivel de CO₂ al final de la espiración (CO₂FE) (un parámetro en línea);
un nivel de oxigenación/FOI2 o nivel de saturación de oxígeno (SpO₂) (un parámetro en línea);
un nivel plasmático de citocinas inflamatorias (un parámetro fuera de línea); y
un nivel de nitrito/nitrato en suero (NO₂/NO₃⁻) (un parámetro fuera de línea);

- 25 De acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento, los parámetros fisiológicos o químicos monitorizados incluyen adicionalmente uno o más de los siguientes parámetros:

- un nivel en orina de dióxido de nitrógeno (nivel de nitrito en orina) (un parámetro fuera de línea);
un signo vital seleccionado entre el grupo que consiste en una frecuencia cardíaca, una presión arterial, una frecuencia respiratoria y una temperatura corporal (un parámetro en línea);
30 una función pulmonar (parámetro espirométrico) (un parámetro en línea) tal como, pero no limitado a, volumen espiratorio forzado (VEF₁), flujo espiratorio medio máximo (FEMM), capacidad de difusión del pulmón para monóxido de carbono (D_PCO), capacidad vital forzada (CVF), capacidad pulmonar total (CPT) y volumen residual (VR);
35 un marcador hematológico (un parámetro fuera de línea), tal como, pero no limitado a, un nivel de hemoglobina, una relación de hematocrito, un recuento de glóbulos rojos, un recuento de glóbulos blancos, un diferencial de glóbulos blancos y un recuento de plaquetas;
un parámetro de coagulación (un parámetro fuera de línea) tal como, pero no limitado a, un tiempo de protrombina (TP), una relación de protrombina (RP) y una relación normalizada internacional (RNI);
40 un nivel de creatinina en suero (un parámetro fuera de línea);
un marcador de función hepática (un parámetro fuera de línea) seleccionado entre el grupo que consiste en un nivel de aspartato aminotransferasa (AST, por sus siglas en inglés), un nivel de glutámico oxaloacético transaminasa sérica (SGOT, por sus siglas en inglés), un nivel de fosfatasa alcalina y un nivel de gammaglutamil transferasa (GGT);
45 un factor de activación endotelial vascular (un parámetro fuera de línea) seleccionado entre el grupo que consiste en Ang-1, Ang-2 y la relación Ang-2/Ang-1.

Los ejemplos no limitantes de citocinas inflamatorias incluyen (TNF) α , (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70.

- 50 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el método como se desvela en el presente documento es de manera que no se observa ningún cambio sustancial en al menos uno de los parámetros monitorizados.

- En el contexto de las presentes realizaciones, un cambio en un parámetro se considera sustancial cuando un valor de una observación (medición, resultado del ensayo, lectura, resultado calculado y similares) o un grupo de observaciones cae notablemente lejos de un nivel normal, por ejemplo, es aproximadamente el doble del límite superior de un nivel normal.

- Un nivel "normal" de un parámetro se denomina en el presente documento valores basales o simplemente "valor basal". En el contexto de las presentes realizaciones, el término "valor basal" se define como un intervalo de valores que se han determinado estadísticamente a partir de un gran número de observaciones y/o mediciones que se han recopilado durante años de práctica médica con respecto a la población humana general, un subconjunto específico de la misma (cohorte) o en algunos casos con respecto a una persona específica. Un valor basal es un valor específico del parámetro que se acepta en general médicamente en la técnica como normal para un sujeto en ciertas condiciones físicas. Estos valores de referencia o "normales" y los medios para determinar estos valores normales, son conocidos en la técnica. Como alternativa, puede determinarse un valor de referencia a partir de o en

un sujeto específico antes de efectuar el método descrito en el presente documento usando métodos, procedimientos y medios técnicos bien conocidos y aceptados. Por tanto, un valor basal se asocia a un intervalo de valores tolerados o tolerancia, que se han determinado junto con la medición de un parámetro. En otras palabras, un valor basal es un intervalo de valores aceptables que limitan el intervalo de observaciones que se consideran "normales". La amplitud del valor basal o la diferencia entre los límites superior e inferior del mismo se denomina "intervalo de referencia", la diferencia desde el centro del intervalo se denomina en el presente documento la "unidad de desviación aceptable" o UDA. Por ejemplo, un valor basal de 4 a 8 tiene un intervalo de valores basales de 4 y una unidad de desviación aceptable de 2.

En el contexto de las presentes realizaciones, un cambio significativo en una observación referida a un parámetro dado es uno que cae a más de 2 unidades de desviación aceptable (2 UDA) desde un valor basal predeterminado. Por ejemplo, una observación de 10, referida a un valor basal de 4 a 8 (caracterizado por un intervalo de valores basales de 4 y una unidad de desviación aceptable de 2), cae a una unidad de desviación aceptable o 1 UDA desde el valor basal. Como alternativa, un cambio se considera sustancial cuando es de más de 1,5 UDA, más de 1 UDA o más de 0,5 UDA.

En el contexto de las presentes realizaciones, una "observación estadísticamente significativa" o una "desviación estadísticamente significativa de un valor basal" es de manera que es poco probable que haya ocurrido como resultado de un factor aleatorio, error o posibilidad.

Se observa que, en algunos parámetros o grupos de parámetros, la significancia de un cambio de los mismos puede depender del contexto, del sistema biológico, del caso médico, del sujeto humano e incluso del mecanismo de medición, en concreto, un parámetro particular puede requerir o dictar criterios más estrictos o menos estrictos para determinar si una lectura de los mismos ha de considerarse significativa. Se señala en el presente documento que en casos específicos algunos parámetros pueden no ser medibles debido al estado del paciente, a la edad u otras razones. En dichos casos, el método se efectúa mientras se monitorizan los otros parámetros.

Por tanto, una desviación de un valor basal, por tanto, se define como un cambio estadísticamente significativo en el valor del parámetro medido durante y/o después de un término completo o un término parcial de administración del régimen que se describe en el presente documento, en comparación con el valor basal correspondiente del parámetro. En el presente documento se señala que las observaciones de algunos parámetros pueden fluctuar por varios motivos, y la determinación de un cambio significativo en ellos debería tener en cuenta dichos acontecimientos y corregir el valor basal correspondiente en consecuencia.

La monitorización de la metahemoglobina y los niveles de nitrito en suero se han aceptado en la técnica como un requisito para monitorizar la seguridad de la inhalación de gNO en un sujeto. Sin embargo, hasta la fecha, no hay una indicación clara de que la metahemoglobina y los niveles de nitrito en suero permanezcan sustancialmente sin cambios tras la inhalación de gNO por un sujeto humano.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el método comprende monitorizar al menos uno de los parámetros descritos anteriormente en el presente documento.

De acuerdo con algunas realizaciones, el parámetro monitorizado es el nivel de metahemoglobina.

Como los niveles de metahemoglobina pueden medirse usando medidas no invasivas, el parámetro de porcentaje de saturación en la periferia de la metahemoglobina (SpMet) se usa para monitorizar la estabilidad, seguridad y eficacia del método que se presenta en el presente documento. Por tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el parámetro seguido es SpMet y durante, y después de la administración, el nivel de SpMet no supera el 5 % y preferentemente no supera el 1 %. Como se demuestra en la sección de ejemplos a continuación, un nivel de SpMet de sujetos que se someten al método que se describe en el presente documento no supera el 1 %.

De acuerdo con algunas realizaciones, el parámetro monitorizado es el nivel de nitrato/nitrito en suero.

Los niveles altos de nitrito y nitrato en el suero de un sujeto se asocian a toxicidad por NO y, por tanto, los niveles séricos de nitrito/nitrato se usan para detectar los efectos adversos del método que se presenta en el presente documento. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el parámetro sometido a ensayo es el nitrito/nitrato en suero, que se monitoriza durante y después del tratamiento y el nivel aceptable de nitrito en suero es inferior a 2,5 micromoles/litro y el nitrato en suero es inferior a 25 micromoles/litro.

De acuerdo con algunas realizaciones, el parámetro monitorizado es el nivel de marcadores inflamatorios.

Una elevación de los marcadores inflamatorios se asocia a un fenómeno denominado "tormenta de citocinas", que se ha observado en sujetos que se someten a un tratamiento de inhalación de gNO.

La monitorización de marcadores inflamatorios mientras se realiza el método que se describe en el presente documento nunca se ha enseñado hasta ahora. Además, los métodos que implican la inhalación de gNO en una pauta en la que no se observa ningún cambio significativo en los marcadores inflamatorios nunca se han enseñado hasta ahora.

5 De acuerdo con algunas realizaciones, el método comprende monitorizar al menos dos de los parámetros mencionados anteriormente.

10 En algunas de estas realizaciones, los parámetros monitorizados son dos de entre el nivel de metahemoglobina, el nivel de nitrito en suero y los marcadores inflamatorios, o todos ellos.

Aunque se observan cambios en el nivel de metahemoglobina, el nivel de nitrito en suero y los marcadores inflamatorios normalmente en sujetos sometidos a inhalación de gNO, los hallazgos de que no se ha observado ningún cambio sustancial en estos parámetros en sujetos humanos sometidos a la pauta descrita son sorprendentes.

15 Por tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el método que se describe en el presente documento se realiza mientras se monitoriza el nivel de metahemoglobina (SpMet), el nivel de nitrito en suero (NO₂⁻) y el nivel plasmático de un grupo de citocinas inflamatorias, tales como, pero no limitadas a (TNF) α , (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70 en suero en el sujeto, en el que un cambio en al menos uno de estos parámetros es inferior a 2 unidades de desviación aceptables a partir de un valor basal.

20 De acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento, el método se efectúa mientras se monitoriza al menos uno, al menos dos o todos los parámetros en el sitio que incluyen SpMet, SpO₂ y CO₂FE, y/o se monitoriza al menos uno o todos los parámetros fuera del sitio que incluyen el nivel de nitrito/nitrato en suero y citocinas inflamatorias en el plasma.

25 Por ejemplo, el método se efectúa mientras se monitoriza el SpMet como un parámetro en el sitio. Como alternativa, el método se efectúa mientras se monitorizan SpMet y CO₂FE como parámetros en el sitio. Como alternativa, el método se efectúa mientras se monitorizan SpMet, CO₂FE y SpO₂ como parámetros en el sitio.

30 Adicionalmente, como alternativa, el método se realiza mientras se monitoriza SpMet como un parámetro en el sitio y las citocinas inflamatorias en el plasma como un parámetro fuera del sitio. Como alternativa, el método se efectúa mientras se monitorizan SpMet y CO₂FE como parámetros en el sitio y el nivel de nitrito/nitrato en suero como un parámetro fuera del sitio. Como alternativa, el método se efectúa mientras se monitoriza SpMet como un parámetro en el sitio y las citocinas inflamatorias en el plasma y el nivel de nitrito/nitrato en suero como parámetros fuera del sitio. Como alternativa, el método se efectúa mientras se monitoriza CO₂FE como un parámetro en el sitio y las citocinas inflamatorias en el plasma y el nivel de nitrito/nitrato en suero como parámetros fuera del sitio. Como alternativa, el método se efectúa mientras se monitoriza SpO₂ como un parámetro en el sitio y las citocinas inflamatorias en el plasma y el nivel de nitrito/nitrato en suero como parámetros fuera del sitio.

35 Adicionalmente como alternativa, el método se efectúa mientras se monitorizan SpMet, CO₂FE y SpO₂ como parámetros en el sitio y las citocinas inflamatorias en el plasma y el nivel de nitrito/nitrato en suero como parámetros fuera del sitio.

40 De acuerdo con algunas de las realizaciones que se describen en el presente documento, el método se efectúa mientras se monitoriza al menos uno, al menos dos o todos los parámetros en el sitio que incluyen SpMet, SpO₂ y CO₂FE, y/o se monitoriza al menos uno o todos los parámetros fuera del sitio que incluyen el nivel de nitrito/nitrato en suero y las citocinas inflamatorias en el plasma, monitorizando adicionalmente uno o más y en cualquier combinación de:

45 un nivel de NO₂ en orina (un parámetro fuera de línea);
un signo vital (un parámetro en línea);
una función pulmonar (un parámetro en línea);
50 un marcador hematológico (un parámetro fuera de línea);
un parámetro de coagulación (un parámetro fuera de línea);
un nivel de creatinina en suero (un parámetro fuera de línea);
un marcador de función hepática (un parámetro fuera de línea);
un factor de activación endotelial vascular (un parámetro fuera de línea).

60 De acuerdo con algunas de las realizaciones descritas en el presente documento, el método se efectúa mientras se monitorizan al menos uno, al menos dos o todos los parámetros químicos en el sitio en la mezcla de gases inhalada, tales como la FOi₂ y el NO₂.

65 Se señala en el presente documento que, para cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, el método se efectúa mientras no se observa ningún cambio sustancial en uno o más de uno o todos los parámetros

monitorizados que se describen en el presente documento.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el método se efectúa mientras se monitorizan los niveles de nitrito en orina, de manera que el nivel de nitrito en orina permanece sustancialmente sin cambios durante la realización y después de realizar el método que se presenta en el presente documento. En el presente documento se señala que los niveles de nitrito en orina pueden fluctuar por varios motivos conocidos y la determinación de un cambio significativo debería tener en cuenta estos acontecimientos y corregir el valor basal correspondiente en consecuencia.

Se observa que el nivel de nitrito en orina es indicativo de la seguridad de la inhalación de gNO, sin embargo, nunca se ha monitorizado hasta ahora en el contexto de la inhalación de gNO en general y en el contexto de la inhalación intermitente de gNO como se describe en el presente documento.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, los marcadores hematológicos, tales como el nivel de hemoglobina, la relación de hematocrito, el recuento de glóbulos rojos, el recuento de glóbulos blancos, el diferencial de glóbulos blancos y el recuento de plaquetas, permanecen sustancialmente sin cambios durante la realización y después de realizar el método como se presenta en el presente documento.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, los factores de activación endotelial vascular, tales como Ang-1, Ang-2 y la relación Ang-2/Ang-1, así como el nivel de creatinina en suero y diversos marcadores de la función hepática, tales como la aspartato aminotransferasa (AST), el nivel en suero de glutámico oxaloacético transaminasa (SGOT), el nivel de fosfatasa alcalina y el nivel de gamma-glutamyl transferasa (GGT) se mantienen sustancialmente sin cambios durante la realización y después de realizar el método como se presenta en el presente documento.

La oxigenación del sujeto puede evaluarse midiendo la saturación del sujeto de oxígeno periférico (SpO_2). Este parámetro es una estimación del nivel de saturación de oxígeno y normalmente se mide usando medidas no invasivas, tales como un dispositivo de oxímetro de pulso. Por tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el parámetro seguido durante y después de la administración es SpO_2 y el nivel de SpO_2 es superior a aproximadamente el 89 %.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, diversos signos vitales, tales como la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea, la frecuencia respiratoria y la temperatura corporal; y/o diversas funciones pulmonares (parámetro espirométrico), tales como el volumen espiratorio forzado (VEF_1), el flujo espiratorio medio máximo (FEMM), la capacidad de difusión del pulmón para el monóxido de carbono (D_pCO), la capacidad vital forzada (CVF), la capacidad pulmonar total (CPT) y el volumen residual (VR); y diversos parámetros de coagulación, tales como el tiempo de protrombina (TP), la relación de protrombina (RP) y la relación internacional normalizada (RIN), se mantienen sustancialmente sin cambios durante la realización y después de realizar el método como se presenta en el presente documento. Se observa que estos parámetros se consideran una indicación de que la salud general del sujeto no se está deteriorando como resultado de la afección médica y/o del tratamiento.

De acuerdo con algunas realizaciones, los indicadores generales de salud mencionados anteriormente muestran una mejora durante la realización y después de realizar el método como se presenta en el presente documento, indicando que el tratamiento es beneficioso para el sujeto.

Por tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el método que se desvela en el presente documento se efectúa de manera que los indicadores generales de salud que se describen en el presente documento permanezcan sin cambios o mejoren.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, un sujeto humano que necesita la inhalación de gNO es un sujeto humano que necesita un tratamiento de anticipación, preventivo y profiláctico de una enfermedad o trastorno como se describe en el presente documento. Por tanto, un sujeto que no padece ninguna enfermedad actual o manifestada, y/o un sujeto que se sospecha que está expuesto a un patógeno, y/o un sujeto que padece una enfermedad, se trata mediante el método o los métodos presentados en el presente documento con el fin de prevenir la aparición de otra enfermedad o trastorno.

Como se presenta en la sección de Ejemplos que sigue a continuación, los presentes inventores han contemplado el tratamiento de la bronquiolitis ya que esta afección se define a continuación.

Se señala en el presente documento que la bronquiolitis tratable, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, puede asociarse a un microorganismo patógeno o no asociarse a él. Por tanto, se observa que el método que se presenta en el presente documento puede usarse para el tratamiento de la bronquiolitis idiopática, la bronquiolitis inducida por bacterias y/o virus y/o la bronquiolitis asociada a otras afecciones médicas tales como, pero no limitadas a, la deficiencia inmunitaria.

En algunas realizaciones, la bronquiolitis es una bronquiolitis inducida por virus. Las infecciones víricas de ejemplo que se sabe que se manifiestan mediante bronquiolitis incluyen, pero no se limitan a, virus respiratorios sincitiales (VSR), rinovirus, coronavirus, enterovirus, virus de la gripe A y/o B, virus paragripales 1, 2 y/o 3, bocavirus, metaneumovirus humanos, SARS y adenovirus. Sin embargo, también se contemplan infecciones provocadas por cualquier otro virus.

Los hallazgos de que la concentración alta de gNO inhalado, que se demostró que presenta un efecto terapéutico contra una diversidad de afecciones asociadas a microorganismos patógenos, puede usarse de manera segura en sujetos humanos indican que la inhalación intermitente de gNO desvelada puede utilizarse de manera eficiente para tratar dichas afecciones, así como cualquier otra afección que pueda tratarse mediante gNO cuando entra en contacto con las vías respiratorias.

Se señala en el presente documento que cualquiera de los métodos descritos en el presente documento puede usarse de manera beneficiosa para tratar la bronquiolitis, que se produce en lactantes y niños. La administración por inhalación se considera un método preferido para pacientes jóvenes y más cuando se evitan técnicas invasivas.

Por tanto, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, los métodos presentados en el presente documento pueden usarse para prevenir el estado de portador, la transmisión y la infección por bacterias patógenas y microorganismos patógenos resistentes a antibióticos.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, cualquiera de los métodos de tratamiento presentados en el presente documento incluye adicionalmente la monitorización, durante y después de la administración de gNO, de uno o más de los parámetros como se describen en cualquiera de las realizaciones anteriores.

En algunas realizaciones, los métodos se efectúan mientras se monitoriza uno, dos, etc. o todos de:

- un nivel de metahemoglobina (SpMet) (un parámetro en línea);
- un nivel de CO₂ al final de la espiración (CO₂FE) (un parámetro en línea);
- un nivel de oxigenación o nivel de saturación de oxígeno (SpO₂) (un parámetro en línea);
- un nivel plasmático de citocinas inflamatorias (un parámetro fuera de línea); y
- un nivel de nitrato/nitrato en suero (NO₂/NO₃⁻) (un parámetro fuera de línea).

En algunas realizaciones, no se muestra ninguna desviación significativa del valor basal, como se describe en el presente documento, en al menos uno, dos, tres, cuatro o todos los parámetros anteriores, cuando se monitorizan, como se describe en el presente documento.

También pueden monitorizarse otros parámetros y marcadores, como que se ha presentado en el presente documento anteriormente, mientras que muestra una desviación significativa de un valor basal, y diversos indicadores generales de salud no muestran ningún cambio a peor, o una mejora, como se ha presentado anteriormente.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, en cualquiera de los métodos de tratamiento presentados en el presente documento, la administración de gNO puede efectuarse mediante un dispositivo de inhalación que incluye, sin limitación, un dispositivo de inhalación estacionario, un inhalador portátil, un inhalador de dosis medida y un inhalador intubado.

Un inhalador, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, puede generar datos de espirometría y ajustar el tratamiento en consecuencia a lo largo del tiempo como se proporciona, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 5.724.986 y el documento WO 2005/046426. El inhalador puede modular la forma de onda de inhalación del sujeto para dirigirse a sitios específicos del pulmón. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, un inhalador portátil puede administrar dosis tanto de rescate como de mantenimiento de gNO de acuerdo a la selección del sujeto o automáticamente de acuerdo con una pauta específica.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, un dispositivo de inhalación de ejemplo puede incluir una interfaz de administración adaptable para inhalación por un sujeto humano.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la interfaz de entrega incluye una mascarilla o una boquilla para la entrega de la mezcla de gases que contiene gNO a un órgano respiratorio del sujeto.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo de inhalación incluye adicionalmente un analizador de gNO colocado cerca de la interfaz de entrega para medir la concentración de gNO, oxígeno y dióxido de nitrógeno que fluye a la interfaz de entrega, en el que el analizador está en comunicación con el controlador.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, someter el sujeto al método descrito en el presente documento se realiza mediante el uso de un dispositivo de inhalación que puede ser cualquier dispositivo que pueda entregar la mezcla de gases que contienen gNO a un órgano respiratorio del sujeto. Un dispositivo de inhalación, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, incluye, sin limitación, un dispositivo de inhalación estacionario que comprende tanques, medidores, tubos, una mascarilla, controladores, valores y similares; un inhalador portátil (incluidos los componentes mencionados anteriormente), un inhalador de dosis medida, un recinto controlado atmosféricamente, una máquina/sistema de respiración y una máquina/sistema de inhalación/respiración intubados. Un recinto controlado atmosféricamente incluye, sin limitación, un recinto de cabeza (burbuja), un recinto de cuerpo completo o una habitación, en el que la atmósfera que llena el recinto puede controlarse por flujo, por un intercambio de contenido continuo o intermitente o cualquier otra forma de control de la mezcla gaseosa de su contenido.

Se espera que, durante la vigencia de una patente con vencimiento a partir de la presente solicitud, se desarrollen muchos procedimientos médicos relevantes que impliquen la inhalación de gNO y el alcance del término tratamiento por inhalación de gNO tiene por objeto incluir todas estas nuevas tecnologías a priori.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm$ el 10 %.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye, pero no se limita a".

La expresión "consiste en medios" que incluyen y se limitan a".

La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes adicionales, etapas y/o partes no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, el método o la estructura reivindicados.

Como se usa en el presente documento, la forma singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

En toda la presente solicitud, pueden presentarse diversas realizaciones de la presente invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por comodidad y brevedad y no ha de interpretarse como una limitación inflexible en el alcance de la invención. En consecuencia, ha de considerarse que la descripción de un intervalo desvela específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, ha de considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 ha desvelado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, tiene por objeto incluir cualquier número citado (fraccionario o integral) dentro del intervalo indicado. Las frases "intervalo/intervalo entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en el presente documento indistintamente y se pretende que incluyan el primer y el segundo número indicado y todos los números fraccionarios e integrales entre ellos.

Como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea dada, incluyendo, sin limitación, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos de los profesionales de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento" incluye anular, inhibir sustancialmente, retardar o invertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección y prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección, en concreto, un tratamiento de anticipación, preventivo y profiláctico.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, con fines claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, también pueden proporcionarse diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no han de considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea inoperante sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han esbozado anteriormente en el presente documento y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación, encuentran soporte experimental o

calculado en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

- 5 Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitante.

EJEMPLO 1 (ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA)

10 **Determinación del nivel antimicrobiano eficaz de gNO**

El efecto directo de gNO en bacterias se estudió mediante la determinación de la concentración de gNO que es letal para los microbios. Una vez que se estimó la dosis óptima, se realizó un estudio de tiempo para optimizar la duración de la exposición de los microbios a gNO.

- 15 Para estos estudios iniciales, se inocularon inóculos altamente densos de suspensiones de *P. aeruginosa* y *S. aureus* (10^8 cebos) en placas de agar. Estas placas se expusieron después a diversas concentraciones de gNO en un dispositivo de exposición para evaluar el efecto sobre el crecimiento de colonias.

- 20 Las figuras 1A-B presentan un gráfico de barras que muestra la curva de dosificación de gNO como se mide para *S. aureus* (FIG. 1A) y *P. aeruginosa* (FIG. 1B) cultivadas en medios sólidos, en la que el porcentaje relativo de crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) es de 50, 80, 120 y 160 partes por millón (ppm) de óxido nítrico gaseoso (gNO) en comparación con el crecimiento de UFC en aire medicinal (100 %).

- 25 Como puede verse en las figuras 1A-B, los resultados confirmaron que el gNO tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Los datos proporcionaron pruebas preliminares de que había una tendencia de relación de tiempo y dosis, con la cantidad de actividad bactericida (antibiótica) aumentando con el aumento del tiempo de exposición y la concentración de gNO. A medida que aumentaba la concentración de gNO, disminuía el número de colonias que crecían en las placas. Aunque hubo una tendencia bactericida descendente hacia la supervivencia del 5-10 %, ninguno de los datos mostró un efecto bactericida del 100 %. Algunas bacterias pueden haber sobrevivido porque los materiales y los productos químicos en el agar pueden haber reaccionado con el gNO y amortiguado el efecto.

- 35 Se observa que las colonias bacterianas permanecieron iguales en tamaño y número después de transferirse a una incubadora convencional durante 24 horas, mientras que los controles aumentaron en número y tamaño en la medida en que no se pudieron contar. Esta observación sugirió que la exposición a gNO evitó el crecimiento de las bacterias y puede haber destruido las bacterias en algún momento durante la exposición a gNO.

- 40 Estos resultados demostraron que el gNO tenía un efecto bacteriostático en ambas cepas bacterianas y, como resultado, se diseñaron estudios posteriores para estudiar adicionalmente los efectos bactericidas del gNO. Los estudios demostraron que los niveles de gNO superiores a 120 ppm redujeron la formación de colonias en más del 90 %. Después siguieron estudios que indicaron que el tiempo requerido para conseguir este efecto es de entre 8 y 12 horas.

- 45 Se usó un procedimiento similar para determinar el tiempo requerido para inducir un efecto bactericida eficaz con 200 partes por millón de gNO, una concentración justo por encima de la dosis utilizada en el estudio de intervalo de dosis presentado anteriormente en el presente documento, en una colección representativa de cepas grampositivas y cepas gramnegativas resistentes a fármacos de bacterias asociadas a la infección clínica.

- 50 Un efecto bactericida satisfactorio se definió como una disminución de las bacterias superior a 3 log₁₀ UFC/ml. Además, también se incluyeron *C. albicans*, *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), una cepa particularmente resistente de *P. aeruginosa* de un paciente con fibrosis quística, *Streptococcus* del Grupo B y *M. smegmatis* para evaluar si las levaduras, una cepa de bacterias resistente a múltiples fármacos y los actinomicetos tienen una respuesta similar. Estas bacterias representan una amplia diversidad de patógenos bacterianos resistentes a los fármacos que contribuyen a infecciones tanto respiratorias como de heridas. Los resultados de estos estudios sentaron las bases para el uso de gNO a una concentración superior a 160 ppm como agente antibacteriano, específicamente para su uso contra bacterias asociadas a infecciones clínicas.

- 60 Para este estudio, se seleccionó la solución salina como medio de suspensión porque no enmascararía el efecto directo de gNO como bactericida, mientras que el medio de crecimiento completamente complementado podría introducir variables externas (por ejemplo, un tamponar o reaccionar con gNO). Otros medios también pueden proporcionar metabolitos y reponer nutrientes que produzcan enzimas que protejan a las bacterias del daño oxidativo y nitrosante, ocultando de este modo el efecto de gNO. Además, se ha sugerido que un ambiente salino representa mejor el ambiente hostil al que las bacterias normalmente se exponen *in vivo*. En solución salina, las colonias eran estáticas, pero permanecían viables. Estas condiciones son similares al enfoque utilizado anteriormente en modelos animales.

La Tabla 1 presenta los resultados de este estudio del efecto de 200 ppm de gNO en una diversidad de microbios.

Tabla 1

Bacterias	Tinción Gram	Periodo latente (horas)	-2,5 Log ₁₀ (horas)	DL ₁₀₀ (horas)
<i>S. aureus</i> (ATCC)	Positivo	3	3,3	4
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC)	Negativo	1	2,1	3
SARM	Positivo	3	4,2	5
<i>Serratia</i> sp.	Negativo	4	4,9	6
<i>S. aureus</i> (Clínico)	Positivo	3	3,7	4
<i>Klebsiella</i> sp. n.º 1	Negativo	3	3,5	6
<i>Klebsiella</i> sp. n.º 2	Negativo	2	4,1	5
<i>Klebsiella</i> sp. n.º 3	Negativo	3	5,1	6
<i>S. maltophilia</i>	Negativo	2	2,8	4
<i>Enterobacter</i> sp.	Negativo	4	5,3	6
<i>Acinetobacter</i> sp.	Negativo	4	5	6
<i>E. Coli</i>	Negativo	3	4,2	5
<i>Streptococos</i> del grupo B	Positivo	1	1,5	2
<i>Micobacteria</i>	Positivo	7	9,2	10
Promedio		2,77	3,82	4,77
DT		1,01	1,17	1,3

- 5 Como puede verse en la Tabla 1, este estudio demostró que gNO a 200 ppm tenía un efecto bactericida en todos los microorganismos sometidos a ensayo. Sin excepción, cada bacteria estimulada con 200 ppm de gNO tuvo al menos una reducción de 3 log₁₀ en UFC/ml. Además, cada ensayo dio como resultado una muerte celular completa y total de todas las bacterias. Estos resultados se caracterizaron por un período de latencia en el que parecía que las bacterias no se vieron afectadas por la exposición a gNO. Al período latente le siguió una muerte abrupta de todas las células; bacterias gramnegativas y grampositivas, las cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, las levaduras y las micobacterias fueron susceptibles a 200 ppm de gNO. Se observa que las dos cepas de bacterias resistentes a fármacos también fueron susceptibles de tratamiento con gNO a 200 ppm.

- 15 Estos resultados indican una diferencia significativa en el período de retraso para las micobacterias en comparación con todos los demás organismos. El período de retraso sugiere que las micobacterias pueden tener un mecanismo que protege a la célula de la citotoxicidad de gNO durante un período más largo que otras bacterias.

EJEMPLO 2 (EJEMPLO DE REFERENCIA)

20 Determinación del nivel antivírico eficaz de gNO

- Se ha estudiado la eficacia del tratamiento de la gripe humana A con gNO. Se estudiaron dos cepas (H3N2 y H7N3) del virus y mostraron que el tratamiento de viriones de gripe o células incubadas con 160 ppm de gNO exógeno redujo no solo la replicación vírica, sino también su infectividad en un modelo de infección de riñón canino Madin-Darby (MDCK, por sus siglas en inglés). El gNO se ha demostrado como un agente antivírico eficaz tanto en la gripe A humana como en la gripe aviar altamente patógena.

- Los virus utilizados para los siguientes experimentos provinieron de congeladores que contenían 1x10⁶ - 1x10⁷ ufc/ml.

- 30 Se usó un ensayo de placa convencional para el estudio. Las soluciones de reserva congeladas de viriones se diluyeron 1:10 en PBS y se colocaron 3 ml en cada pocillo de seis bandejas de pocillos. Las muestras se expusieron a 160 ppm de gNO o aire medicinal a 37 °C. Después de la exposición, se inocularon 0,5 ml en células MDCK confluentes, se cultivaron en bandejas de seis pocillos y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después, se retiraron los inóculos y se añadió a cada pocillo una mezcla 1:1 de DMEM 2X y agar, con tripsina al 2 % y después se incubaron a 37 °C. Después de 2 días, las bandejas se fijaron con formaldehído al 3,7 % y el agar se retiró de cada pocillo. Después, los pocillos se tiñeron con cristal violeta revelando las placas.

- 40 Se usó un ensayo de placa convencional para un ensayo de hemaglutinación. Las reservas congeladas de viriones se diluyeron 1:10 en PBS y se colocaron 3 ml en cada pocillo de seis bandejas de pocillos. Las muestras se expusieron a 160-20,000 ppm de gNO o aire medicinal a 37 °C. Para medir el efecto de gNO en el pH, cuando se añade una gran concentración de NO a la solución salina, el pH cae, por tanto, se usaron un tampón ácido/base convencional para hacer coincidir el pH del control con el de las muestras tratadas. Después de la exposición, las muestras se diluyeron 1:2 en bandejas de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadieron glóbulos rojos de cobaya y se midió la aglutinación de acuerdo con procedimientos convencionales.

Las figuras 2A-C presentan un gráfico del crecimiento vírico en función del tiempo medido para los viriones de gripe A/Victoria/H3N2 después de la exposición a óxido nítrico de 160 ppm y 800 ppm de forma continua durante 4 horas (Figura 2A), después de haberse expuesto los mismos viriones a una dosis de gNO durante 30 minutos en comparación con tres tratamientos de 30 minutos Q4h (Figura 2B) y el efecto de la exposición continua a gNO a una concentración de 160 ppm durante 3 horas de la gripe aviar H7N3 altamente patógena.

Como puede observarse en las Figuras 2A-C, se ha demostrado que el gNO puede reducir la infectividad de 2 cepas de los virus de gripe humana A/Victoria/H3N2 y HPAI/H7N2 y que el efecto antivírico de la exposición a 160 ppm de gNO es más evidente en la forma de exposición intermitente.

La eficacia del tratamiento de la infección vírica por el virus sincitial respiratorio mediante los métodos presentados en el presente documento se sometió a ensayo mediante la exposición durante 30 minutos del virus sincitial respiratorio humano (rgRSV30) a una mezcla de gases que contenía 160 ppm de óxido nítrico, utilizando un ensayo de placa convencional como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Las Figuras 3A-D presentan los datos obtenidos en el experimento usando muestras de cultivo de tejidos que albergan rgRSV30 humano, acopladas a una proteína fluorescente verde, en los que el experimento de control de las muestras se expuso a un aire ambiental (datos no mostrados) y las muestras analizadas tienen un nivel vírico inicial de 2000 UFP (Figura 3A), 1000 UFP (Figura 3B) y 500 UFP (Figura 3C), se expuso a 160 ppm de gNO durante 30 minutos, mientras que la Figura 3D presenta un gráfico de barras comparativo que compara el control con los resultados del ensayo.

Como puede observarse en las Figuras 3A-D, cuando la unidad de formación de placa (UFP) inicial de VSR era de 2000 y 1000 UFP, una exposición única de 30 minutos a 160 ppm de gNO redujo la viabilidad del virus en un factor de aproximadamente 10 y a un nivel inicial de 500 UFP, la viabilidad vírica se anuló sustancialmente.

EJEMPLO 3 (EJEMPLO DE REFERENCIA)

Administración de gNO a sujetos humanos sanos

Cohorte: Se inscribieron 10 sujetos adultos sanos voluntarios (5 varones, 5 mujeres), de 20 a 62 años de edad, en el estudio después de seleccionar su historial médico, un examen físico, ensayos de función pulmonar y valores sanguíneos. Los criterios de exclusión incluyeron a individuos menores de 19 años, mujeres embarazadas y que no estaban dispuestas a practicar el control de la natalidad durante el estudio, diagnosticados con enfermedad pulmonar, epistaxis, hemoptisis, metahemoglobinemia, receptor de trasplante de órganos o que recibían tratamiento con antibióticos.

Régimen y tratamiento posterior: Después de obtener el consentimiento informado, el tratamiento se inició dentro de los 5 días desde la inscripción. Los sujetos se alojaron en una sala de hospital y recibieron 160 ppm de gNO durante 30 minutos cada cuatro horas (P4h), cinco veces al día, durante cinco días consecutivos por inhalación. Los sujetos regresaron para las evaluaciones de seguimiento 3, 7 y 21 días después de la administración final de gNO. La seguridad del sujeto se determinó mediante el control de los signos vitales, los niveles de metahemoglobina, la función pulmonar, la química de la sangre, la hematología, el tiempo de protrombina, los niveles de citocinas/quimiocinas inflamatorias y la activación endotelial. Estos parámetros se compararon con el valor basal y en diversos puntos temporales durante y después de la administración de gNO.

Dispositivo: A los sujetos se les administró gNO a través de una boquilla desechable modificada para maximizar la mezcla. La inspiración fue iniciada espontáneamente por el sujeto a partir de un respirador de respiración de presión positiva intermitente convencional (Mark-7, Carefusion, EE.UU.) en modo de flujo fijo que administra 48 litros por minuto (LPM). Los flujos de gas se verificaron con un medidor de flujo de masa calibrado (TSI, EE.UU.). Se tituló óxido nítrico gaseoso (gNO, obtenido en INOmax, Ikaria, EE.UU.) a una concentración de 800 ppm administrado a un flujo de 12 LPM en un puerto de entrega distal en la boquilla conectada al respirador solamente durante la fase inspiratoria (interruptor de presión). El respirador Mark 7 se proporcionó por un mezclador de aire/oxígeno (Bird Sentry, Carefusion, EE.UU.) configurado para suministrar un 26 % de oxígeno.

Todos los componentes del sistema de administración de gNO fueron aprobados por la Dirección de Productos Terapéuticos de Salud de Canadá.

Monitorización de parámetros químicos y fisiológicos durante la administración:

Los niveles de gNO, NO₂, O₂ y metahemoglobina se monitorizaron durante la administración de gNO. La mezcla de gas objetivo era de 160 ppm de gNO con un nivel de dióxido de nitrógeno (NO₂) inferior a 5 ppm y un nivel de (O₂) que varía del 21 % al 25 % de oxígeno. Los niveles inspiratorios de NO, NO₂ y O₂ se monitorizaron de forma continua mediante el muestreo del puerto de muestra de la boquilla ubicado a unos 6 milímetros desde la boca del sujeto con un analizador electroquímico de NO, NO₂ y O₂ de AeroNOx (Pulmonox, AB, Canadá). La seguridad de la entrega se determinó por el número de ocasiones en las que el NO₂ superó las 5 ppm, el gNO superó el 10 % de

variación y el O₂ cayó por debajo del 20 % durante la administración del gNO. Se usó un oxímetro de pulso no invasivo disponible en el mercado (Rad 57, Masimo Corporation, EE.UU.) para medir los niveles de saturación en la periferia de la metahemoglobina (SpMet).

- 5 Estos parámetros se midieron de forma continua durante cada ciclo de administración de gNO y durante 3,5 horas después del primer tratamiento del día. Se recogieron muestras diarias de suero y se congelaron a -80 °C y se midió el nivel de nitrato/nitrito en suero usando el reactivo de Griess.

- 10 Los sujetos se sometieron a ensayos de función pulmonar (EFP) completos, incluyendo la capacidad de difusión pulmonar (DPCO, por sus siglas en inglés) por un técnico capacitado que usó un sistema calibrado de función pulmonar (Jaeger MasterScreen, VIASYS Healthcare, EE.UU.) en el ensayo de detección y los días 2, 8, 12 y 26. Se realizó un ensayo de espirometría (Microloop por Micro Medical, Inglaterra) en los días 1, 3 y 4. El efecto de gNO en la función pulmonar y DPCO se determinó por cambios a partir del valor basal, los días de tratamiento y los días de seguimiento.

- 15 Se realizaron exámenes médicos generales por un médico pulmonar en la selección y en los días 8, 12 y 26 para obtener la oxigenación y las mediciones de los signos vitales. El examen físico abreviado por una enfermera registrada se realizó cada día antes del inicio de los tratamientos en los días 1 a 5. La oxigenación se midió con un oxímetro de pulso (Rad 57, Masimo Corporation, EE.UU.) que se usó de acuerdo con las pautas del fabricante para medir la saturación de oxígeno funcional de la hemoglobina arterial (SpO₂) y la frecuencia cardíaca. Estos parámetros se midieron de forma continua durante cada administración de gNO y durante 3,5 horas después del primer tratamiento del día. El estado cardiovascular se determinó mediante la monitorización de la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la temperatura. Los valores se registraron antes del inicio de cada administración de gNO, después de un descanso de 5 minutos. Durante los tratamientos, también se realizaron mediciones de signos vitales (excepto la temperatura) 15 minutos después del inicio del tratamiento y al final de la administración de gNO y se registraron. Después del primer tratamiento cada día, se registraron los signos vitales cada 30 minutos hasta el inicio de la segunda administración de gNO del día.

- 30 La evaluación hematológica incluyó un hemograma completo y se obtuvieron diferenciales (diferencial de hemoglobina, hematocrito, glóbulos rojos, glóbulos blancos, glóbulos blancos y recuento de plaquetas) con el fin de monitorizar la química sanguínea, hematología e inflamación. El perfil químico de la sangre incluyó creatinina en suero y ensayos de función hepática como aspartato aminotransferasa (AST), glutámico oxaloacético transaminasa (SGOT) sérica, fosfatasa alcalina y gamma-glutamyl transferasa (GGT). El efecto de gNO en la coagulación se determinó por el tiempo de protrombina (TP) y sus medidas derivadas de la relación de protrombina (RP) y la relación internacional normalizada (RIN). El plasma heparinizado se recogió al inicio del estudio y en los días 1, 2, 4 y 5 de la administración de gNO y en los días de seguimiento 3, 7 y 21 y se congeló a -80 °C. Los niveles de citocinas en plasma se evaluaron usando el kit de una serie de perlas de citocinas de inflamación humana (BD Bioscience, Canadá). Los niveles plasmáticos de angiopoyetina Ang-1 y Ang-2 se determinaron mediante ELISA (R&D Systems, EE.UU.).

- 40 Se registró un total de 750 mediciones de gNO durante el estudio. El promedio de gNO inspirado fue de 163,3 ppm (DT = 4,0). La mayor concentración de gNO registrada fue de 177 ppm. El nivel más alto de NO₂ registrado durante los tratamientos fue de 2,8 ppm (media: 2,32; nivel de confianza del 95 %: 2,17-2,47 ppm) y ninguno de los sujetos experimentó un nivel de NO₂ superior a 5 ppm. Esto fue coherente con las especificaciones de rendimiento proporcionadas por el fabricante del aparato de 1,56 ppm (DT = 0.3). De los 300 valores de oxígeno registrados, el nivel de oxígeno promedio fue del 22,0 % (DT = 0,22 %).

Análisis de los datos:

- 50 Las características estadísticas descriptivas de los sujetos antes, durante y al final del estudio se tabularon y expresaron como media $\pm$ desviación típica (DT). Las diferencias en las variables continuas (metahemoglobina, nitritos/nitratos en suero y niveles de SpO₂) en el transcurso del estudio se analizaron usando análisis de varianza de medidas repetidas. Se determinaron acontecimientos categóricos (número de sujetos con un acontecimiento adverso particular) mediante la construcción de límites de confianza del 95 % para su incidencia. Las diferencias entre las variables continuas en dos momentos específicos se evaluaron con el ensayo t de muestras relacionadas. Los acontecimientos categóricos, como la función pulmonar clínica y los cambios en la difusión pulmonar, los cambios en los marcadores inflamatorios séricos, la hematología, la química clínica y la incidencia de acontecimientos adversos se analizaron mediante la construcción de límites de confianza del 95 % para su incidencia.

- 60 Los datos se analizaron usando el ensayo de Mann-Whitney de muestras no relacionadas para la comparación entre cualquiera de los dos grupos y ANOVA para medidas repetidas de varianza. Las comparaciones iniciales se analizaron mediante medidas repetidas de ANOVA con Bonferroni después del ensayo para datos paramétricos o el ensayo de Friedman con el ensayo posterior de Dunn para datos no paramétricos.

65

El análisis de los datos y la presentación gráfica se realizaron usando un paquete de estadística comercial (Graphpad-Prism V 3.0, GraphPad Software Inc., EE.UU.).

A menos que se especifique lo contrario, $p < 0,05$ indicó una significación estadística. Los resultados se representaron mediante la media $\pm$ desviación típica de al menos tres mediciones independientes.

Resultados de los estudios de seguridad:

La observación médica de los efectos adversos y los problemas generales de seguridad, relacionados con la entrega repetida de gNO a una concentración de 160 ppm en las vías respiratorias de 10 individuos adultos sanos, se realizó mediante la monitorización de los niveles excesivos de NO₂, mientras se mantenía una saturación de oxígeno (SpO₂) de hemoglobina arterial aceptable. Se realizó un total de 250 procedimientos de administración de gNO a 10 sujetos durante el período de estudio. Todos los tratamientos fueron bien tolerados y no se observaron acontecimientos adversos significativos. Se informaron tres acontecimientos adversos menores: un sujeto informó hematomas en el brazo por múltiples intentos de extraer sangre con éxito, mientras que otros dos informaron una sensación de adormecimiento de la lengua durante la administración de gNO. Esto se resolvió indicando al sujeto que se relaje y vuelva a colocar la boquilla.

Durante y después de la administración de gNO, todos los signos vitales permanecieron dentro de los límites normales para la edad y con respecto a los valores de referencia. Específicamente, no hubo ninguna caída en la presión arterial (lo que podría ocurrir debido al efecto vasodilatador de la administración de gNO) durante o después de la administración de gNO. No hubo incidencias repentinas de hipoxemia (se observó un SpO₂ del 85 %) durante o después de la administración de gNO. La SpO₂ más baja observada fue del 93 %. Los niveles de SpO₂ a lo largo del tiempo disminuyeron ligeramente entre el tratamiento previo y el tratamiento posterior, pero ninguno difirió de forma significativa ni estadística ni clínica. El análisis ANOVA descartó que esta disminución se asociara a las cinco exposiciones repetidas a gNO en el transcurso del mismo día.

Las Figuras 4A-B presentan los resultados de la monitorización de los niveles de metahemoglobina antes, durante y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, que se sometieron a 5 ciclos diarios de administración de gNO, cada uno de 30 minutos, durante 5 días consecutivos, mientras que los niveles de metahemoglobina se midieron usando un oxímetro de pulso, en las que la Figura 4A es un gráfico de los niveles de metahemoglobina en porcentajes en función del tiempo medido anteriormente (punto temporal 0), durante 250 ciclos individuales de administración de gNO de 30 minutos (intervalo de tiempo de 0 a 30 minutos), después de los ciclos (intervalo de tiempo de 30 a 60 minutos) y 120 minutos, 180 minutos y 240 minutos después de que se suspendiera la administración de gNO, y la Figura 4B es un gráfico de los niveles de metahemoglobina en porcentaje en función del tiempo como se midió al principio y al final de los ciclos de administración de gNO de 30 minutos proporcionados en el transcurso de 5 días y siguieron 8, 12 y 26 días después de que se suspendiera la administración de gNO.

Como puede observarse en la Figura 4A, los 930 niveles en porcentaje registrados de metahemoglobina (SpMet) se mantuvieron por debajo del nivel máximo aceptable del 5 %. El valor basal inicial de SpMet era de 0,16 (DT = 0,10) por ciento. El SpMet más alto se observó al final del tratamiento de 30 minutos y fue del 2,5 % con un aumento promedio del 0,9 % (DT = 0,08). SpMet aumentó de acuerdo con lo previsto aproximadamente un 1 % entre el tratamiento previo y el tratamiento posterior ($p < 0,001$) y volvió al valor basal después de 3,5 horas antes de la siguiente administración de gNO.

Como puede observarse en la Figura 4B, el análisis ANOVA descartó que este aumento se asociara a tratamientos repetidos el mismo día, ya que no hubo ningún efecto acumulativo o persistente en SpMet después de cinco tratamientos diarios durante cinco días consecutivos. Las medidas de seguimiento de SpMet en 3, 7 y 21 días después de la exposición final a gNO el día 5 no mostraron ningún aumento residual de SpMet.

La metahemoglobina se reduce por una reductasa enzimática que da como resultado teóricamente un aumento en los niveles de nitrito/nitrato en sangre. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de suero de nitrito/nitrato con respecto al valor basal durante el ensayo. Un sujeto tuvo valores máximos de nitrito y nitrato significativamente más altos ($p < 0,001$), que también fue ligeramente diferente al inicio ($p = 0,038$) en comparación con los otros sujetos.

No hubo cambios ni estadísticamente ni clínicamente significativos en los parámetros de coagulación sanguínea, química clínica y hematológicos desde el inicio hasta la finalización del día 5. Aunque el número de células eosinófilas disminuyó durante el estudio (valor inicial 0,15 giga/l; DT = 0,12; final del estudio: 0,19 giga/l (DT = 0,19), esta diferencia no fue significativa ($p = 0,104$). Se descubrió un aumento del 1 % en el número de células de neutrófilos desde un valor basal de cero a 0,01 giga/l al final del estudio, que tampoco alcanzó significación ni estadística ni clínica ($p = 0,169$).

Las Figuras 5A-F presentan diversos resultados de control de la función pulmonar antes, durante y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, en los que los valores de

referencia de los ensayos de función pulmonar se obtuvieron en los 7 días anteriores a la administración de gNO y los valores durante la administración de gNO se obtuvieron el día 2 del tratamiento de 5 días y se obtuvieron otros datos después de la administración final de gNO el día 5 y los días 8, 12 y 26, en los que la Figura 5A presenta un volumen espiratorio forzado en 1 segundo en porcentaje (VEF₁), La Figura 5B presenta el flujo espiratorio medio máximo (FEMM), la Figura 5C presenta capacidad de difusión de monóxido de carbono (DPCO), la Figura 5D presenta la capacidad vital forzada (CVF), la Figura 5E presenta la capacidad pulmonar total (CPT) y la Figura 5F presenta el volumen residual (VR), mientras que todos los datos se presentan como medias de los diez sujetos y las diferencias absolutas en comparación con el valor basal antes de la administración de gNO, y se evaluaron las diferencias estadísticas mediante el ensayo de Mann-Whitney.

Como puede observarse en las Figuras 5A-F, los ensayos de función pulmonar no revelaron anomalías en ningún sujeto durante y después de los tratamientos de administración de gNO. Específicamente, el flujo de aire medido por VEF₁ y el flujo espiratorio medio máximo (FEMM) no difirió del valor basal durante el transcurso del estudio. Otras mediciones de la función pulmonar, como la DPCO, la capacidad vital forzada (CVF), la capacidad pulmonar total (CPT) y el volumen residual (VR) tampoco cambiaron con respecto a la medición basal.

Para evaluar si la inhalación de gNO puede provocar inflamación o activación del endotelio, las citocinas y los factores de activación del endotelio vascular Ang-1 y Ang-2 se cuantificaron en plasma periférico en el momento basal en diversos puntos temporales posteriores.

Las Figuras 6A-F presentan concentraciones sanguíneas de diversas citocinas antes y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, medidas a partir de muestras de sangre recogidas en los 7 días anteriores a la administración de gNO, cada día durante el tratamiento y 8, 12 y 26 días después, en las que la Figura 6A presenta los niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral (TNF) α , los datos de interleucina (IL)-1 β se presentan en la Figura 6B, IL-6 en la Figura 6C, IL-8 en la Figura 6D, IL-10 en la Figura 6E e IL-12p70 en la Figura 6F, determinados mediante una serie de perlas citométricas, mientras que las diferencias estadísticas se comparan mediante ANOVA de medidas repetidas con Bonferroni después del ensayo para datos paramétricos (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70) o ensayo de Friedman con el ensayo posterior de Dunn para datos no paramétricos (TNF e IL-1b).

Como puede observarse en las Figuras 6A-F, los niveles de citocinas de TNF, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1b e IL12p70 no se vieron afectados por la inhalación de gNO en comparación con el valor basal. Las comparaciones entre los niveles de citocinas de referencia y los niveles en cada uno de los puntos temporales de muestreo para los 10 participantes humanos no arrojaron diferencias significativas, en comparación con ANOVA de medidas repetidas con Bonferroni después del ensayo para datos paramétricos o el ensayo de Friedman con el ensayo posterior de Dunn para datos no paramétricos.

Las Figuras 7A-C presentan niveles plasmáticos de las angiopoyetinas Ang-1 y Ang-2 antes y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, medidos en una muestra de sangre recogida en los 7 días anteriores a la inhalación de gNO, cada día durante la administración de gNO y 8, 12 y 26 días después, en los que los niveles plasmáticos de Ang-1 se muestran en la Figura 7A, Ang-2 en la Figura 7B y las relaciones Ang-2/Ang-1 en la Figura 7C, determinados mediante el uso de una serie de perlas citométricas mientras que las diferencias estadísticas se evaluaron en comparación con el ensayo de Friedman con el ensayo posterior de Dunn.

Como puede observarse en las Figuras 7A-C, Ang-2 y las relaciones de Ang-2/Ang-1 no se vieron afectadas en este estudio. Los datos de valores atípicos en las Figuras 4A-C no mostraron ninguna correlación con los cambios en ninguno de los demás parámetros y, por tanto, parecen ser hallazgos aislados de importancia desconocida.

Conclusiones:

La seguridad de un tratamiento de seres humanos por inhalación de gNO a una concentración de 160 ppm, se ha demostrado y se ha presentado en el presente documento. Se ha demostrado en el presente documento que 160 ppm de gNO pueden administrarse de manera segura a pulmones humanos sanos por pulsos durante cinco días consecutivos, sin que se produzcan acontecimientos adversos significativos. Todos los signos vitales permanecieron bien dentro de los márgenes clínicos aceptables durante y varios días después de la administración de gNO a 160 ppm.

Al menos en lo que respecta a losmetahemoglobina y NO₂ niveles de, los hallazgos presentados en el presente documento son superiores a los hallazgos obtenidos para la inhalación continua de 80 ppm de gNO, que es la dosis de gNO aprobada actualmente para su uso inhalada en lactantes a término, probablemente debido a la estrategia de dosificación intermitente utilizado en el presente documento. Si bien se ha informado que el suministro continuo de 80 ppm de gNO causa al menos un 5 % de aumento de los niveles de SpMet, con un 35 % de los sujetos que exceden el 7 %, los resultados presentados anteriormente (todos los 930 niveles registrados de SpMet) permanecieron por debajo del 5 %.

Mientras que el aumento esperado en los niveles de metahemoglobina durante un curso de tratamiento se estimó en el 1 %, el aumento promedio observado de metahemoglobina al 0,9 % para los diez individuos en un curso de tratamiento único fue coherente con las estimaciones del modelo de farmacocinética de primer orden, considerando la precisión absoluta de ± 1 % del oxímetro de pulso. El estudio estableció que el período interino de 3,5 horas

5 permitió que la concentración de metahemoglobina volviera al valor basal, lo que permitió cinco ciclos diarios durante cinco días sin un aumento clínico significativo en las concentraciones de metahemoglobina. Tomados en conjunto, se ha demostrado en el presente documento que la estrategia de dosificación de gNO intermitente es segura para los seres humanos con respecto a la producción de metahemoglobina y la carga metabólica.

10 De manera similar, las concentraciones máximas medias de nivel de NO₂ mostradas anteriormente (2.8 ppm) son comparables con las observadas durante la entrega continua de 80 ppm (2,6 ppm) de los estudios anteriores. Las limitaciones de este y otros estudios con respecto a la administración de gNO son que los niveles de NO y NO₂ solo se conocen en el punto de entrada en las vías respiratorias de los sujetos y se desconocen los niveles reales de óxidos de nitrógeno en el pulmón. A pesar de esta resistencia al estrés nitrosante, puede ser prudente en estudios

15 futuros examinar los sujetos para detectar deficiencias de tiol y metahemoglobina reductasa.

El estudio presentado anteriormente también demostró que 160 ppm de gNO, entregados como se ha esbozado, tienen un impacto mínimo en la función pulmonar y que la inflamación aguda de las vías respiratorias, medida mediante la determinación de las tasas de flujo, no fue detectable. Posiblemente, la reactividad de la vía aérea

20 potencialmente perjudicial podría enmascarse o prevenirse mediante la relajación del músculo liso que mejora y que se sabe que ejerce el gNO. En pacientes con infección pulmonar, una entrega alta de NO puede provocar un aumento en la reactividad de las vías respiratorias. Sin embargo, la actividad vasodilatadora de NO puede beneficiar al paciente además de la actividad antimicrobiana de NO.

25 La entrega de 160 ppm de NO a seres humanos que se muestra en el presente documento no provocó daño parenquimatoso pulmonar, medido por diferentes parámetros de la función pulmonar. Análogamente, los niveles de citocinas inflamatorias en plasma, las respuestas más tempranas del hospedador a la lesión pulmonar y los niveles de eosinófilos y neutrófilos permanecieron constantes durante y días después de la inhalación de gNO. Además, los factores de activación endotelial vascular Ang-1, Ang-2 y la relación Ang-2/Ang-1 no se vieron afectados por la

30 administración de gNO por inhalación.

La mecánica de la función pulmonar y los marcadores inflamatorios se mantuvieron sin cambios en comparación con los valores basales en las mediciones tres días y 28 días después del tratamiento mediante la administración de gNO. Aunque no puede excluirse que pueda ocurrir algún cambio a largo plazo en la función pulmonar, la ausencia de cualquier signo de inflamación en el período posterior al tratamiento mostrada anteriormente en el presente

35 documento hace que esto sea poco probable. Si los marcadores inflamatorios séricos pueden resultar insensibles para medir cambios agudos o incluso crónicos en los pulmones, se podrían tomar muestras de los marcadores inflamatorios de los fluidos de lavado broncoalveolar (LBA).

40 **EJEMPLO 4**

TRATAMIENTO DE LA BRONQUIOLITIS EN LACTANTES USANDO gNO

45 El siguiente es un protocolo para el ensayo de la eficacia y para el tratamiento de lactantes que padecen bronquioltis vírica. Cada paciente se inscribe por el médico investigador y se obtiene la firma del consentimiento informado de los padres en un documento oficial. El médico llena un cuestionario detallado y se obtienen muestras de sangre y nasofaringe para detectar virus respiratorios.

Indicación y pronóstico:

50 La bronquioltis se define como una infección de las vías respiratorias pequeñas. También es una de las manifestaciones más comunes de infección aguda del sistema respiratorio inferior en la infancia temprana y es la principal causa de mortalidad infantil global. En 2005, se estimó que entre 2,8 y 4,3 millones de niños pequeños en todo el mundo desarrollaron una IRAI grave asociada al VSR que requería ingreso hospitalario. La hospitalización

55 por bronquioltis es costosa, ya que solamente los cargos hospitalarios de los EE.UU. superaron los 1.000 millones de dólares en 2006. Estos cargos reflejan, en parte, la duración de la estancia (DLE) en el hospital. La media de DLE para la bronquioltis en los Estados Unidos es de 3,3 días.

60 La bronquioltis, que incluye afecciones asociadas a virus patógenos, bacterias, hongos u otros agentes irritantes, es actualmente la causa más común de ingreso hospitalario pediátrico en los Estados Unidos y representa casi el 20 % de las hospitalizaciones infantiles por todas las causas. La etiología vírica es la causa principal y, entre los virus respiratorios, se cree que el virus sincitial respiratorio (VSR) es el patógeno vírico más importante que provoca una infección respiratoria aguda inferior (IRAI) en niños pequeños. Se estima que entre 60.000 y 199.000 niños menores de 5 años mueren anualmente por IRAI asociada al VSR, produciéndose el 99 % de estas muertes en países en desarrollo. La enfermedad es común principalmente en el primer año de vida. Los signos y síntomas clínicos son

65 coherentes con hipoxia, dificultad para respirar, coriza, mala alimentación, tos, sibilancias y crepitaciones en la

auscultación y, en algunos casos, insuficiencia respiratoria.

Tratamiento actual de la bronquiolitis aguda:

- 5 Hasta la fecha no se dispone de un tratamiento específico para la infección vírica y hasta la fecha solo se está usando un tratamiento de apoyo tal como el oxígeno y las inhalaciones de solución salina hipertónica o esteroides con o sin fármacos beta agonistas.

- 10 Los lactantes con hipoxemia son admitidos para recibir complementación con oxígeno y tratamiento de apoyo. La administración de oxígeno y fluidos es la piedra angular del tratamiento de la bronquiolitis vírica aguda. Hasta la fecha, no se ha demostrado que todas las demás intervenciones, incluyendo los broncodilatadores inhalados, los corticoesteroides, la fisioterapia torácica, los agentes antivíricos y los antibióticos sean eficaces, y no se recomiendan de forma habitual para el tratamiento de la bronquiolitis vírica aguda.

15 **Afecciones relacionadas con la enfermedad:**

- Los virus respiratorios con frecuencia son responsables de la manifestación de la bronquiolitis, que es provocada, se exagera de este modo o se asocia de otro modo a ellos. Entre ellos, los más comunes son el virus sincitial respiratorio (VSR), el rinovirus, el coronavirus, el enterovirus, la gripe A y B, el virus paragripal 1, 2 y 3, el bocavirus, el metaneumovirus humano, el SARS y el adenovirus. Sin embargo, otros virus y otros patógenos con frecuencia provocan infecciones que se manifiestan por bronquiolitis y, además, puede producirse bronquiolitis como resultado de afecciones que no se asocian a ningún patógeno (por ejemplo, complicaciones de la fibrosis quística, inmunosupresión relacionada con el cáncer y diversas enfermedades pulmonares, etc.).

25 **Seguridad y efectos adversos:**

Los objetivos observacionales del tratamiento con gNO de los lactantes de 2 a 12 meses de edad que padecen bronquiolitis incluyen:

- 30 La evaluación de los resultados clínicos;
La evaluación de parámetros fuera del sitio tales como el recuento de glóbulos blancos; y
La evaluación de la carga vírica respiratoria en la nasofaringe.

- 35 Se documenta cualquier acontecimiento adverso y los acontecimientos adversos graves se abordan de acuerdo con los protocolos establecidos, el tratamiento con gNO se detiene y el acontecimiento se notifica a la parte interesada pertinente.

Definición de cohorte:

- 40 La definición de cohorte (caso) cumple con los siguientes criterios:

Lactantes de 2 a 12 meses de edad;

- 45 Diagnosticados con bronquiolitis (dificultad respiratoria con hipoxia);

No hay enfermedades concomitantes tales como neumonía u otitis media;

No se ha prescrito ni se ha necesitado ningún tratamiento antibiótico;

- 50 Puntuación clínica entre 6-10 (véase la descripción detallada a continuación en el presente documento);

No hay enfermedades subyacentes; y

Consentimiento parental informado documentado.

- 55 Una enfermedad subyacente es una tal como trastornos genéticos o enfermedades pulmonares crónicas.

Pauta:

- 60 Se someten lactantes de 2 a 12 meses de edad que se admiten en la sala pediátrica debido a una bronquiolitis a un tratamiento con gNO de acuerdo con la pauta descrita anteriormente en el Ejemplo 3, en concreto, la inhalación de 163,3 ppm (DT de 4,0) gNO durante 30 minutos, 5 veces al día, durante 5 días consecutivos o hasta el alta, lo que ocurra primero.

- 65 Los lactantes inscritos pueden aleatorizarse en una relación de 1:1 o 1:2 para recibir gNO con O₂ o Placebo (aire) con O₂.

Puntuación clínica:

La Tabla 3 presenta los diversos criterios y puntuaciones atribuidos a cada observación, que después se resumen para obtener una puntuación clínica.

5

Tabla 3

Puntuación	< 6 meses	≥ 6 meses	Sibilancias	SaO ₂ (aire ambiental)	Uso del músculo accesorio
0	40	30	Ninguna	≥ 95 %	
1	41-55	31-45	Final de la espiración audible mediante estetoscopio	92-94 %	+
2	56-70	46-60	Inspiración y espiración audible mediante estetoscopio	90-92 %	++
3	> 70	> 60	Audible sin estetoscopio ²	≤ 89 %	+++

La puntuación clínica se considera leve si es ≤ 5; moderada a 6-7; y graves a 11-12. Si las sibilancias no son audibles debido a una entrada de aire mínima, se le atribuye una puntuación de 3.

10

Parámetros monitorizados:

La monitorización clínica se realiza mediante el registro de una puntuación clínica por un médico dos veces al día. La saturación de oxígeno en el aire ambiental se registra tres veces al día.

15

La monitorización de laboratorio fuera del sitio se realiza antes y durante el tratamiento e incluye niveles sanguíneos de metahemoglobina, nitritos/nitratos en suero, protrombina, citocinas proinflamatorias y 18 quimiocinas.

La Tabla 4 presenta el calendario para varias actividades de protocolo.

20

Tabla 4

	Recuento de días de tratamiento									
Actividad	0	1	2	3	4	5	6	10	30	
Inscripción y consentimiento informado	+									
Cuestionario	+							+		
Pauta de inhalación de gNO	+	+	+	+	+	+				
Ensayos en sangre para el recuento de leucocitos, PCR, nitritos/nitratos en suero y protrombina,	+		+					+	+	
Niveles sanguíneos de metahemoglobina	+	+	+	+	+	+		+	+	
Lavado nasofaríngeo para virus respiratorios	+		+							
Niveles sanguíneos para citocinas proinflamatorias y quimiocinas	+		+					+	+	
Evaluación de la puntuación clínica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Criterios de eficacia:

El tratamiento se evalúa mediante la determinación de la tasa de mejoría de la puntuación clínica, la reducción de la duración de la hospitalización, la tasa de mejoría de la saturación de O₂ y la tasa de derivación a una unidad de cuidados intensivos pediátricos.

Además, se usa una reducción de la carga vírica en la nasofaringe, determinada por PCR-TI, para evaluar la eficacia.

30

EJEMPLO 5**TRATAMIENTO DE LA BRONQUIOLITIS EN LACTANTES USANDO gNO - PROTOCOLO DE ESTUDIO CLÍNICO**

35

El siguiente es un protocolo de ejemplo para estudios clínicos basado en los métodos de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, cuyo objetivo es el tratamiento de la bronquioltis en seres humanos. Específicamente, el tema del estudio es una evaluación aleatoria con doble ocultación de la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad del óxido nítrico administrado de forma intermitente por inhalación a sujetos con bronquioltis.

40

Los objetivos del estudio incluyen la evaluación de la seguridad y la tolerabilidad del tratamiento con inhalación intermitente de gNO en niños de 2 a 12 meses de edad que padecen bronquioltis. Otros objetivos incluyen la

evaluación de la eficacia del tratamiento de inhalación intermitente con gNO en comparación con el tratamiento convencional que usa O₂ en un grupo de sujetos similares.

Equipo:

5 Un dispositivo de inhalación improvisado se basa en el equipo convencional del hospital y en la fuente de oxígeno del hospital. Por ejemplo, el oxígeno se suministra desde el sistema principal de oxígeno del hospital a través de un mezclador de oxígeno, tal como, por ejemplo, el modelo Bird 03800, seguido del medidor de flujo de masa de oxígeno del hospital. El aire rico en oxígeno se monitoriza para alcanzar una concentración final máxima de
10 aproximadamente el 40 % de O₂. El aire/oxígeno mezclado se suministra al sujeto a través de un conector en forma de Y conectado junto a una mascarilla convencional del hospital tal como, por ejemplo, una mascarilla Hospitak de Unomedical Inc.

15 El flujo de gNO, extraído de un tanque que contenía 800 ppm de óxido nítrico en N₂ con una pureza del 99,999 %, suministrado por un proveedor de gas autorizado en, por ejemplo, contenedores de 50 o 30 litros con 120 bar (12 MPa) o 150 bar (15 MPa) respectivamente, se ajusta pasando a través de un regulador convencional del hospital, tal como, por ejemplo CareFusion™ modelo 400 y el medidor de flujo de masa del hospital, tal como CareFusion™ modelo 77063.

20 No puede verificarse directamente la responsabilidad del NO, puesto que varios sujetos pueden recibir NO del mismo recipiente, y la cantidad neta de NO utilizada para cada inhalación es mínima en comparación con el peso total del recipiente. Por tanto, la cantidad de NO administrada por tratamiento se evalúa de acuerdo con los cambios de presión en el recipiente (una evaluación aproximada).

25 El flujo de gNO se ajusta antes de cada ciclo de inhalación en función de la concentración de gNO detectada en la mascarilla del sujeto. Después de una nueva calibración del sistema, el regulador y el medidor de flujo de masa se ajustan para entregar 160 ppm de gNO de 5 a 15 litros por minuto. El gNO se suministra al sujeto a través de la segunda rama del conector en forma de Y (especificado anteriormente) que se encuentra junto a la mascarilla facial. La mascarilla y puertos de tubos se usan para monitorizar de forma continua las concentraciones de gNO y NO₂ y
30 los valores de FOi₂ entregados al sujeto.

El hálito (exhalación) se monitoriza, por ejemplo, mediante el CO₂ al final de la espiración (EtCO₂). EtCO₂ se monitoriza usando un equipo convencional tal como el Monitor de Capnografía Portátil Microcap®, N.º del catálogo CS04179 de Oridion, Israel, con puntas nasales tales como (Infant Neonate N.º del catálogo 008179 de Oridion, Israel.
35

La metahemoglobina (SpMet) y la saturación de oxígeno o el oxígeno disuelto (niveles de SpO₂) se monitorizan de forma continua usando un monitor dedicado tal como, por ejemplo, RAD 57 de Masimo.

Cohorte:

La población para el estudio es de 44 niños de 2 a 12 meses de edad diagnosticados con bronquiolitis, que requerían hospitalización (la tasa de abandono esperada es del 10 %). La población se divide en dos grupos: el Grupo 1, denominado grupo de tratamiento recibe una inhalación intermitente (5 x 30 minutos, un día) de 160 ppm
45 de gNO además del tratamiento convencional de administración de O₂, durante hasta 5 días. Entre inhalaciones de gNO, los sujetos continúan recibiendo el tratamiento de inhalación convencional (O₂). El grupo 2, denominado grupo de control recibe una inhalación continua del tratamiento convencional (O₂).

La Tabla 5 presenta el cálculo de la puntuación clínica, en el que una puntuación inferior a 5 es leve; de 6-10 es moderada y de 11-12 es grave, 11-12. En una puntuación de 2, si las sibilancias no son audibles debido a una entrada de aire mínima, se considera una puntuación de 3.
50

Tabla 5

Puntuación	< 6 meses	≥ 6 meses	Sibilancias	SaO ₂ (aire ambiental)	Uso de músculos accesorios
0	40	30	Ninguna	≥ 95 %	Ninguno
1	41-55	31-45	Espiración final con estetoscopio	92-94 %	+
2	56-70	46-60	Insp. y espiración con estetoscopio	90-92 %	++
3	> 70	> 60	Audible sin estetoscopio	≤ 89 %	+++

Los criterios de inclusión se definen como hombres o mujeres de 2 a 12 meses de edad, diagnosticados con bronquiolitis en una puntuación clínica de menos de 10 (véase a continuación) y el consentimiento informado de los progenitores/tutor legal.

- Los criterios de exclusión incluyen: el diagnóstico de enfermedades concomitantes tales como neumonía, infección de las vías respiratorias u otitis media; prematuridad de menos de 36 semanas de edad gestacional; sujeto que recibe profilaxis con inmunoglobulina de VSR; diagnóstico de metahemoglobinemia, enfermedad pulmonar crónica, inmunodeficiencia o enfermedad cardíaca; sujeto que usa un fármaco en investigación en los 30 días anteriores a la inscripción y que no se espera que participe en un nuevo estudio en 30 días; historial de epistaxis frecuentes de más de 1 episodio por mes; hemoptisis significativa en 30 días de más de 5 ml de sangre en un episodio de tos o más de 30 ml de sangre en un período de 24 horas; metahemoglobina de más del 3 % en la selección; incapacidad para cumplir con el diseño del estudio; presencia de una afección o anomalía que, en opinión del investigador, comprometería la seguridad del sujeto o la calidad de los datos; enfermedades subyacentes, tales como trastornos genéticos, tales como la fibrosis quística o el síndrome de Down o enfermedades pulmonares crónicas tales como la displasia broncopulmonar, la discinesia ciliar primaria, la bronquiolitis obliterante, la hipotonía o la cardiopatía congénita.

Pauta, vía y forma de dosificación de administración:

- La duración del estudio para cada sujeto es de 30 (+5) días a partir de la admisión en el departamento, a través del tratamiento, incluyendo el período de seguimiento. Todos los sujetos se presentan para visitas de seguimiento el día 14 (+5 días) y se contacta con ellos el día 30 (+5 días) desde el día de ingreso.

- La Tabla 6 presenta un programa de actividades de evaluación de un estudio de ejemplo, en el que (*) indica el tratamiento durante 5 días o hasta el momento del alta del sujeto (lo que ocurra primero), (**) denota el tratamiento en el día 5 o en el momento del alta del sujeto (lo que ocurra primero), en la mañana, (***) denota el tratamiento por un médico con doble ocultación y (****) denota el tratamiento en caso de que el quinto día de tratamiento sea el sexto día desde la admisión al estudio.

Tabla 6

	Día 1-	Día 1 - 1 ^{er} Estudio de inhalación	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día **** 6	Día 14 (+5)	Día 21 (+5)	Día 30 (+5)
Admisión	+	+	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *			
Selección, firma de consentimiento informado e inscripción	Dentro de las 4 horas posteriores a la admisión									
Aleatorización	+									
Examen físico ***	+		+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+	+	
Evaluación de puntuación clínica (dos veces al día mañana + tarde) ***	+	+	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+	+	
Signos vitales (una vez por turno)	+	+	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+	+	
Tratamiento de estudio (NO/control)		+	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *			
Ensayos de sangre: % de metahemoglobina en; % de oxihemoglobina en; Frecuencia cardíaca (cada tratamiento de inhalación x5/24 horas) *	+	+	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *			
Niveles de NO, NO ₂ , FO ₂ de la mascarilla	+	+	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *			
Nivel de CO ₂ FE de las puntas nasales ubicadas en la fosa nasal del sujeto	+	+	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *			
Torundas nasofaríngea y orofaríngea 1 para <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	+		+	+	+	+	+	+	+	
Lavado nasal para virus respiratorios + PCR	+									

	Día 1-	Día 1 - 1 ^{er} Estudio de inhalación	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día **** 6	Día 14 (+5)	Día 21 (+5)	Día 30 (+5)
Cuestionario para todos los efectos adversos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ /teléfono
Medicamentos concomitantes	+	+	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+	+	+
Documentar todos los ensayos de laboratorio realizados por motivos médicos	+	+	+ *	+ *	+ *	+ *	+ *	+	+	+

La tabla 7 presenta el programa de administración y evaluación de gNO, en el que (*) denota actividad en la primera inhalación el primer día de tratamiento.

5

Tabla 7

	Pretratamiento	Inicio del tratamiento de estudio	Durante el tratamiento de estudio	Tratamiento del estudio					
Tiempo		0 min		30 min	60 * min	90 * min	120 * min	180 * min	210 * min
Elegibilidad del sujeto	+								
Presión del cilindro de NO		+		+					
Tratamiento de O ₂ convencional	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tratamiento con NO (Grupo 1)		Inicio	En curso	Fin					
Medición de OxiHem + MetaHem - %	+	+	En curso, registre el valor observado en caso de que supere el intervalo aprobado	+	+	+	+	+	+
Frecuencia cardíaca		+	15 min después del inicio del tratamiento	+	+	+	+	+	+
NO + NO ₂ , FOi2, niveles tomados de la mascarilla	+	+	En curso, registre el valor observado en caso de que supere el intervalo aprobado	+					
Nivel de CO ₂ FE tomado de las puntas nasales ubicadas en la fosa nasal del sujeto	+			+					
Todos los efectos adversos	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Medicamentos concomitantes	+	+	+	+	+	+	+	+	+

La ocultación del tratamiento se mantiene separando los miembros del equipo que no tienen ocultación que proporcionan el tratamiento real y los miembros del equipo sometidos a ocultación, y ocultando el recipiente/fuente de NO y todo el equipo de estudio relacionado detrás de una cortina.

10

El grupo 1 (grupo de tratamiento) recibe el tratamiento convencional (O₂) combinado con la inhalación a través de una mascarilla de óxido nítrico gaseoso al 0,08 % (gNO, 800 ppm) administrado durante 30 minutos cada cuatro horas, manteniendo un mínimo de 3 horas entre cada final de un ciclo de inhalación de gNO y el comienzo del ciclo siguiente, cinco veces al día durante cinco días consecutivos o hasta que se decida suspender el tratamiento. La

exposición máxima acumulativa al óxido nítrico se estima en 2.000 ppm por hora.

El grupo 2 (grupo de control) recibe un tratamiento convencional de inhalación de O₂ con el equipo idéntico al utilizado para administrar gNO a los miembros del grupo 1.

- 5 El final del tratamiento de estudio para ambos grupos es evaluado por un médico del estudio "ocultado" basado en la evaluación clínica. La mejora del sujeto puede conducir a una decisión de alta del sujeto del estudio.

Considerando una tasa de deserción esperada de aproximadamente el 10 %, se reclutaron 44 sujetos, con el fin de tener un tamaño de muestra de al menos 40 (20 por grupo) sujetos que completaron el estudio.

10

Criterios de valoración del estudio:

Los criterios de valoración primarios de seguridad incluyen determinar el porcentaje de metahemoglobina (MetHb) asociado al gNO inhalado y determinar los acontecimientos adversos asociados al gNO inhalado.

15

Los criterios de valoración de tolerancia primarios incluyen la relación (%) de sujetos que suspendieron el estudio prematuramente por cualquier motivo y la relación (%) de sujetos que interrumpieron el estudio prematuramente debido a efectos adversos.

20

Los criterios de valoración de eficacia secundarios incluyen la comparación de la duración de la estancia hospitalaria (DEH) en días de sujetos de 10-12 meses diagnosticados con bronquiolitis que fueron tratados con gNO y tratamiento convencional frente sujetos tratados con tratamiento convencional; la comparación de la tasa de mejora de la puntuación clínica de los sujetos de 2 a 12 meses de edad con diagnóstico de bronquiolitis que fueron tratados con gNO y el tratamiento convencional frente a los sujetos tratados con tratamiento convencional; y la comparación de la duración del tratamiento con oxígeno en horas de sujetos de 2 a 12 meses de edad diagnosticados con bronquiolitis que fueron tratados con gNO y tratamiento convencional frente a sujetos tratados con tratamiento convencional.

25

Los criterios de valoración de observación incluyen la observación del número de sujetos con un nivel de MetHb superior a aproximadamente el 5 % en cualquier momento; la observación del cambio en los recuentos medios de neutrófilos y eosinófilos de sujetos de 2 a 12 meses de edad tratados con gNO por bronquiolitis frente a sujetos tratados con tratamiento convencional, la observación del número de sujetos con sangrado relacionado con el fármaco de estudio en cualquier momento; la observación de la reducción del estado de portador bacteriano en la nasofaringe de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. Aureus* y la evaluación del resultado clínico durante 21 días desde el ingreso en el estudio de sujetos de 2 a 12 meses de edad tratados con gNO por bronquiolitis; y la evaluación de parámetros fuera del sitio tal como el recuento de glóbulos blancos en sujetos de entre 2 y 12 meses de edad tratados con gNO para bronquiolitis frente a sujetos tratados con tratamiento convencional.

30

35

Los criterios para la finalización del tratamiento debido a la mejora del sujeto se basan en la mejora del sujeto que conduce a una decisión de alta del sujeto del hospital.

40

Los criterios para la interrupción temprana del tratamiento temporal incluyen:

- Metahemoglobina en sangre de más del 5 %;
- El nivel de NO₂ medido cerca de la boca del sujeto de más de 5 ppm;
- SpO₂ durante el tratamiento de más del 90 %;
- CO₂FE de más de 60 mmHg; y
- Efectos adversos que se sospecha que están relacionados con NO, de acuerdo con el criterio del médico.

45

En cualquier caso en el que un parámetro medido supere el nivel aprobado, se detendrá la inhalación del tratamiento de estudio actual. Después, se mide un nivel de repetición 30 minutos más tarde y se registra la medición final. La siguiente inhalación comienza de acuerdo con el protocolo de estudio.

50

Los criterios para la interrupción temprana del tratamiento permanente incluyen:

55

- Un segundo episodio de metahemoglobina en sangre de más del 5 %; y
- Una puntuación clínica de más de 10.

Un sujeto cuyo tratamiento se suspendió por cualquier motivo excepto el retiro voluntario del consentimiento parental/del tutor legal, completa toda la evaluación del estudio, incluyendo las visitas de seguimiento.

60

Los medicamentos concomitantes (es decir, antibióticos o esteroides) proporcionados durante el estudio no se sostienen como una razón para la interrupción temprana del tratamiento.

Los criterios para el retiro temprano del estudio incluyen:

65

Retirada del consentimiento del progenitor/tutor legal del sujeto;

La dirección del estudio solicitó que se retirara el sujeto;

Discreción del investigador;

Violación/incumplimiento del protocolo;

5 Pérdida de seguimiento/falta de retorno;

Acontecimiento adverso o acontecimiento adverso grave; y

La muerte; en cuyo caso el estudio se detiene para todos los miembros de la cohorte para la reevaluación médica.

10 **Procedimientos de tratamiento:**

Día 1:

Hasta 5 inhalaciones, dependiendo de la hora de ingreso.

15 El pretratamiento incluye la monitorización y el registro de los niveles de oxihemoglobina (%), metahemoglobina (%), EtCO₂, FOi₂, NO y NO₂. Se establece un valor basal para el flujo de gas para que coincida con la ventilación por minuto del paciente (5-15 lpm) y el flujo de gNO se valida para conseguir 160 ppm en la mascarilla de inhalación, con una fluctuación que no supera 15 ppm. Si el gNO está fluctuando, el flujo de gas basal aumenta para satisfacer las demandas de ventilación y flujo por minuto del paciente. Al final de la etapa de pretratamiento, la mascarilla se coloca en la cara del sujeto.

Al inicio del tratamiento se registran los siguientes parámetros:

25 Hora de inicio y presión del cilindro;
ritmo cardíaco;
Oxihemoglobina (%) y metahemoglobina (%); y
niveles de FOi₂, NO y NO₂.

30 Durante el tratamiento, se controlan los siguientes parámetros y se registran de manera continua:

Oxihemoglobina (%) y metahemoglobina (%);
Niveles de FOi₂, NO y NO₂ tomados de la mascarilla;
Cualquier forma de efectos adversos; y
35 la frecuencia cardíaca 15 minutos después del inicio del tratamiento.

El tratamiento finaliza 30 minutos después del inicio del tratamiento y se registra lo siguiente:

40 Detención del tiempo de tratamiento y presión del cilindro;
Cualquier forma de efectos adversos;

Niveles de FOi₂, NO y NO₂;

Frecuencia cardíaca;

Niveles de oxihemoglobina (%) y metahemoglobina (%);

45 Solo después de la primera inhalación del primer día para ambos grupos, se registra lo siguiente:

Oxihemoglobina (%), metahemoglobina (%) y frecuencia cardíaca 60, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos después del inicio del tratamiento;

El coordinador del estudio y el médico del estudio completan el cuestionario que incluye todos los efectos adversos y se miden los signos vitales una vez por turno.

50

Días 2-5 (o Día 6):

El último día de tratamiento es el sexto día desde la admisión.

55 El día 5 (o el Día 6, si el quinto día de tratamiento finaliza el sexto día desde el día de ingreso o alta/último día del tratamiento de estudio) hasta 5 inhalaciones, de acuerdo con el estado clínico del sujeto.

Una vez al día en la mañana, se realiza un examen físico que registra los signos vitales (incluyendo la temperatura, el pulso, la frecuencia respiratoria, la presión arterial, etc.); evaluación de la puntuación clínica por un médico con oclutación; y

60 Detección de bacterias por cultivo de torunda nasal (torundas nasofaríngeas y orofaríngeas para *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*)

El coordinador del estudio y el médico del estudio completan el cuestionario de forma rutinaria, incluyendo todos los efectos adversos y el sujeto se observa para que cumpla con los criterios de inclusión y exclusión.

65

El pretratamiento, el inicio del tratamiento, durante el tratamiento y la finalización de los procedimientos del tratamiento se realizan como en el Día 1.

- 5 Las evaluaciones de la finalización del tratamiento se realizan 2-4 horas después del último tratamiento por inhalación e incluyen la puntuación clínica, los signos vitales de un médico con ocultación, oxihemoglobina (%) y metahemoglobina (%), detección de bacterias por cultivo a partir de torunda nasal.

Visitas de seguimiento programadas:

- 10 Días 14+5 y 21+5:

El médico del estudio completa el cuestionario que incluye los efectos adversos;
Revisar y documentar los medicamentos concomitantes;
Examen físico por el médico del estudio;

- 15 Evaluar la puntuación clínica por un médico con ocultación;
Realizar la detección de bacterias por cultivo a partir de torunda nasal;
Registrar en el archivo del estudio del sujeto cualquier ensayo de laboratorio (es decir, análisis de sangre y radiografía de tórax) si se toman por razones clínicas.

- 20 Día 30+5:

El médico del estudio completa el cuestionario que incluye los efectos adversos;
Revisar y documentar los medicamentos concomitantes.

- 25 **Evaluación médica/clínica:**

Se rellena el formulario inicial de demografía/historial médico y se realiza un examen físico. El médico realiza un examen físico el día de la selección y durante las visitas de seguimiento. Los sistemas corporales que se examinan en general incluyen el general, la piel, los ganglios linfáticos, la cabeza, los ojos, los oídos, la nariz y la garganta, el respiratorio, el cardiovascular, el gastrointestinal, el neurológico y el musculoesquelético. Los nuevos hallazgos anormales son documentados y seguidos por un médico en la próxima visita programada.

- 30 Se realiza un examen físico abreviado según lo consideren necesario los investigadores. Además de los signos vitales, los sistemas corporales han de examinarse en su totalidad. Se realizan y se registran tres veces al día las mediciones de los signos vitales después de descansar durante 5 minutos, incluyendo la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la temperatura.

- 40 La saturación de oxígeno (SpO₂) se mide por oximetría de pulso (usando, por ejemplo, RAD 57) durante cada tratamiento y se registra antes, durante y después del tratamiento con NO. En cualquier caso en que el nivel de SpO₂ durante el tratamiento sea inferior a aproximadamente el 89 %, se detiene la inhalación del tratamiento del estudio actual. Se mide un nivel de repetición 30 minutos más tarde y la medición final debe registrarse. La siguiente inhalación comienza de acuerdo con el protocolo de estudio.

- 45 Los niveles de metahemoglobina se miden de forma no invasiva y de forma continua usando un metahemoglobinómetro de pulso durante el tratamiento y se registran antes, durante y después del Día 1 al Día 5. Cualquier nivel de metahemoglobina superior al 5 % requiere una medición repetida 30 minutos más tarde y la medición final se registra. La siguiente inhalación comienza de acuerdo con el protocolo de estudio.

- 50 Se mide el CO₂ al final de la espiración (CO₂FE) usando, por ejemplo, MicroCap Capnograph y se registran antes y después del tratamiento desde el Día 1 hasta el Día 5.

- 55 La información relativa a la aparición de efectos o acontecimientos adversos se documenta durante todo el estudio y hasta que se completa el seguimiento de 30 días de los sujetos. Se registra la duración del acontecimiento (fechas y horas de inicio y finalización), la gravedad, el resultado, el tratamiento y la relación con el medicamento del estudio (causalidad) y si el acontecimiento se considera un acontecimiento adverso grave, en el formulario de informe del caso. El efecto o los acontecimientos adversos se monitorizan hasta la visita/llamada de seguimiento del día 30.

- 60 Los medicamentos concomitantes proporcionados durante el estudio no conducen a la interrupción del tratamiento del estudio. Todos los medicamentos concomitantes y las terapias concurrentes se documentan a lo largo del estudio hasta la visita/llamada de seguimiento del día 30. Se registra la siguiente información: dosis, vía, frecuencia unitaria de administración e indicación (si se considera pertinente) para la administración de medicamentos. El motivo de la administración de medicamentos concomitantes se considera un efecto o acontecimiento adverso, a menos que se haya programado antes del inicio del estudio.

- 65 Se registra cualquier resultado de los ensayos de laboratorio recibido durante la hospitalización del sujeto o el seguimiento del estudio en el archivo del sujeto y se usa para el análisis observacional.

El lavado nasal para la determinación de la supresión vírica se recoge en una copa de muestra de ensayo estéril. Se recoge la torunda nasal (nasofaríngea y orofaríngea) para la determinación de bacterias (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*) en una copa de muestra de ensayo estéril.

5 Efectos o acontecimientos adversos:

Se registran acontecimientos adversos desde la fecha del formulario de consentimiento informado firmado del sujeto y durante todo el estudio, incluido el período de seguimiento. Los acontecimientos adversos deben revisarse y actualizarse en cada visita posterior y durante cualquier contacto telefónico con el sujeto. La intensidad o gravedad del acontecimiento adverso se caracteriza como leve si se tolera fácilmente, moderada si es lo suficientemente incómoda para interferir con la actividad diaria y grave si impide las actividades diarias normales.

La causalidad del acontecimiento adverso se evalúa como:

- 15 No relacionada cuando el acontecimiento adverso es clara e incontrovertiblemente debido a causas extrañas (enfermedad, medio ambiente, etc.);
Poco probablemente relacionada si el acontecimiento adverso cumple al menos dos de los siguientes criterios: no sigue una secuencia temporal razonable desde la administración del fármaco del estudio; fácilmente podría haber sido producido por el estado clínico del sujeto, factores ambientales o tóxicos u otros modos de terapia administrados al sujeto; no sigue un patrón conocido de respuesta al fármaco del estudio y no reaparece ni empeora cuando el fármaco se vuelve a administrar;
- 20 Posiblemente relacionado si el acontecimiento adverso cumple al menos dos de los siguientes criterios: sigue una secuencia temporal razonable desde la administración del fármaco de estudio; no puede excluirse una relación causal con el tratamiento experimental necesaria y razonablemente; y no puede sugerirse razonablemente una explicación alternativa (por ejemplo, un fármaco concomitante o una enfermedad concomitante) como causante del AAG; y sigue un patrón conocido de respuesta al fármaco de estudio;
- 25 Probablemente relacionado si el acontecimiento adverso cumple al menos tres de los siguientes criterios: sigue una secuencia temporal razonable desde la administración del fármaco de estudio; no puede explicarse razonablemente por las características conocidas del estado clínico del sujeto, factores ambientales o tóxicos u otros modos de terapia administrados al sujeto; desaparece o disminuye con el cese o la reducción de la dosis del fármaco y sigue un patrón conocido de respuesta al fármaco de estudio.
- 30

- 35 Los acontecimientos adversos potencialmente relacionados con NO son aquellos que se asocian a una metahemoglobinemia (% de elevación de metahemoglobina) de más del 5 % y una elevación de NO₂ de más de 5 ppm.

Procesamiento de datos y consideraciones estadísticas:

- 40 Para las variables categóricas se crean tablas de resumen que proporcionan el tamaño de la muestra, la frecuencia absoluta y relativa y el intervalo de confianza del 95 % para proporciones por grupo de estudio.

Para las variables continuas se proporcionan tablas de resumen que proporcionan el tamaño de la muestra, la media aritmética, la desviación típica, el coeficiente de variación (si corresponde), la mediana, el mínimo y el máximo, los percentiles y el intervalo de confianza del 95 % por grupo de estudio para las variables.

- 45 El Ensayo de Ji cuadrado o el Ensayo Exacto de Fisher se aplican para evaluar la diferencia en las proporciones entre los grupos de estudio.

- 50 Los acontecimientos adversos se codifican de acuerdo con los diccionarios de codificación tales como el Diccionario Médico para Actividades Regulatorias (MedDRA versión 14.0 o superior) y se presentan en tablas por Clase de Órganos del Sistema (COS) y Término Preferido (TP).

El intervalo de confianza (IC) del 95 % se calcula para la proporción de sujetos que tienen efectos adversos asociados al gNO inhalado.

- 55 El ensayo T para muestras relacionadas o el ensayo de intervalo con signo para dos medias se aplican para analizar los cambios en los parámetros continuos dentro de cada grupo de estudio.

- 60 El ensayo de T de dos muestras o el ensayo de la suma de intervalo de Wilcoxon-Mann-Whitney no paramétrico para muestras independientes se aplican para analizar las diferencias en los parámetros continuos entre los grupos de estudio.

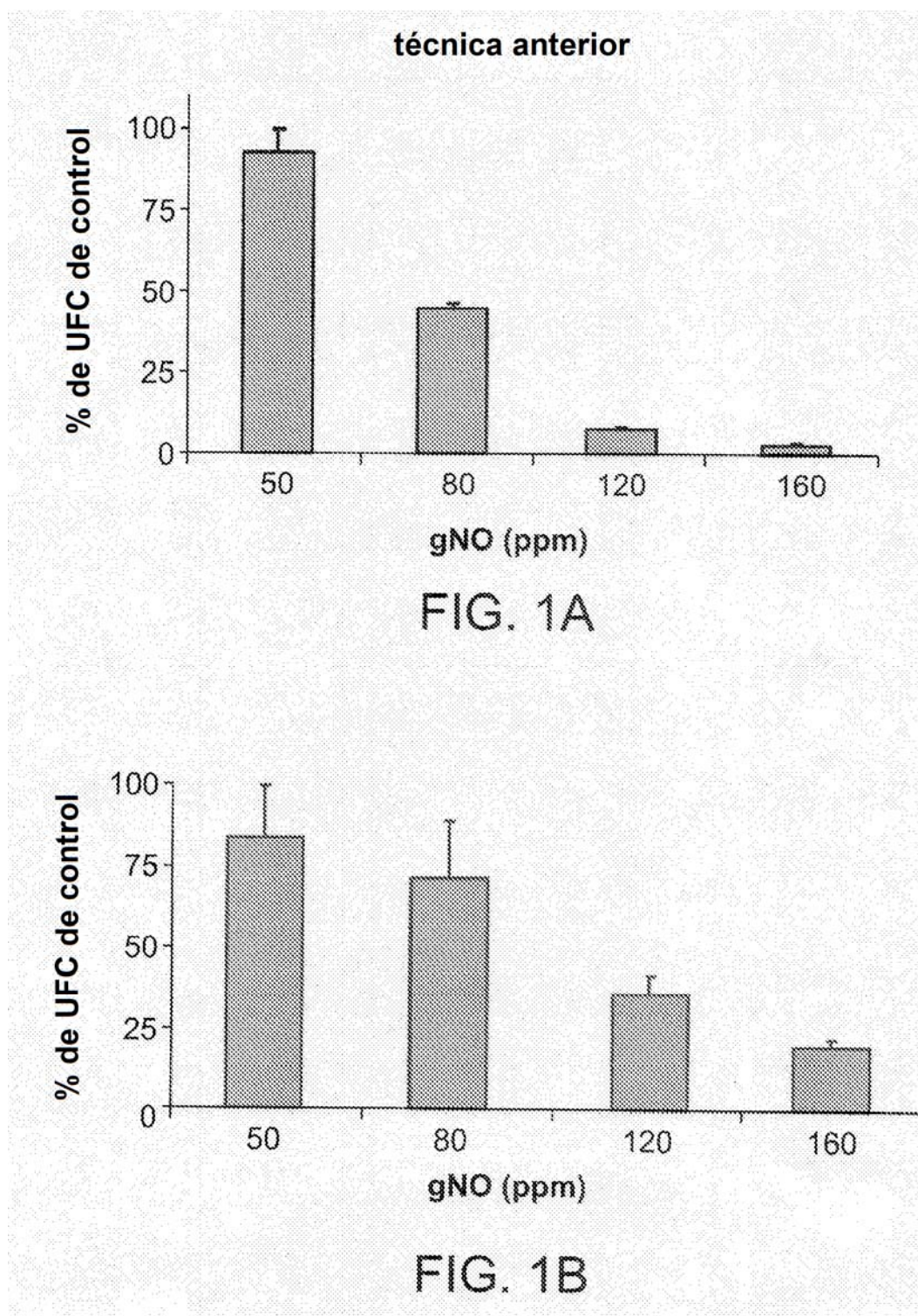
Todos los ensayos son de dos colas y un valor de p del 5 % o menos se considera estadísticamente significativo.

- 65 Los datos se analizan usando un software de procesamiento de datos tal como el SAS® versión 9.1 (SAS Institute, Cary, Carolina del Norte).

Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que serán evidentes para los expertos en la materia muchas alternativas, modificaciones y variaciones. En consecuencia, se pretende abarcar todas las alternativas, modificaciones y variaciones que se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. NO gaseoso (gNO) a una concentración de al menos 160 ppm, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que padece una enfermedad o trastorno que se manifiesta en las vías respiratorias o una enfermedad o trastorno que puede tratarse a través de las vías respiratorias, en el que el sujeto humano es un lactante, la enfermedad o trastorno es la bronquiolitis y el gNO se administra al sujeto humano intermitentemente, en el que la inhalación intermitente comprende al menos un ciclo de inhalación continua de dicho gNO durante un primer período de tiempo, seguido de inhalación de nada de gNO durante un segundo período de tiempo.
2. gNO para su uso en el tratamiento de un sujeto humano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno se selecciona entre el grupo que consiste en una bronquiolitis bacteriana, una bronquiolitis vírica y/o una bronquiolitis fúngica.
3. gNO para su uso en el tratamiento de un sujeto humano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno se asocia a un microorganismo patógeno.
4. gNO para su uso en el tratamiento de un sujeto humano de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha bronquiolitis se asocia a un virus.
5. gNO para su uso en el tratamiento de un sujeto humano de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho virus se selecciona entre el grupo que consiste en un virus sincitial respiratorio (VSR), un rinovirus, un coronavirus, un enterovirus, un virus de la gripe A y/o B, un virus paragripal 1, 2 y/o 3, un bocavirus, un metapneumovirus humano, SARS y un adenovirus.
6. gNO para su uso en el tratamiento de un sujeto humano de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho primer período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos.
7. gNO para su uso en el tratamiento de un sujeto humano de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que dicho segundo período de tiempo varía de 3 a 5 horas.
8. gNO para su uso en el tratamiento de un sujeto humano de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que comprende de 1 a 6 de dichos ciclos por día.
9. gNO para su uso en el tratamiento de un sujeto humano de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende 5 de dichos ciclos por día.
10. gNO para su uso en el tratamiento de un sujeto humano de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que se efectúa durante un período de tiempo que varía de 1 a 7 días.
11. El gNO para el uso de la reivindicación 10, que se efectúa durante un período de tiempo de 5 días.
12. gNO para su uso en el tratamiento de un sujeto humano de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el gNO es parte de una mezcla que comprende adicionalmente oxígeno, en el que la fracción de oxígeno inspirado (FOi2) en dicha mezcla varía del 21 % al 100 %.



(Técnica anterior)

Exposición continua a gNO a 160 ppm y 800 ppm

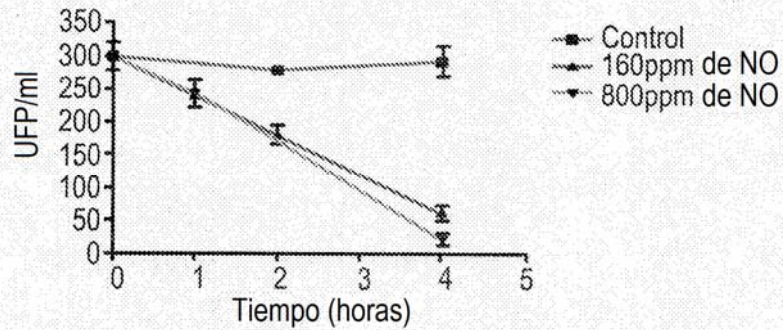


FIG. 2A

Exposición intermitente a gNO a 160 ppm

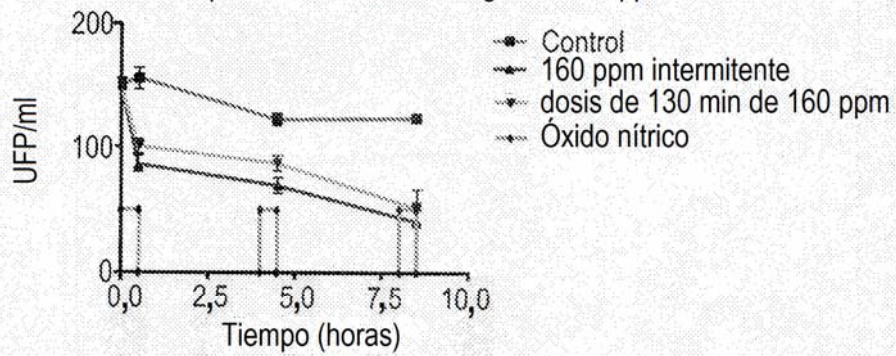


FIG. 2B

Gripe aviar HPAI H7N3

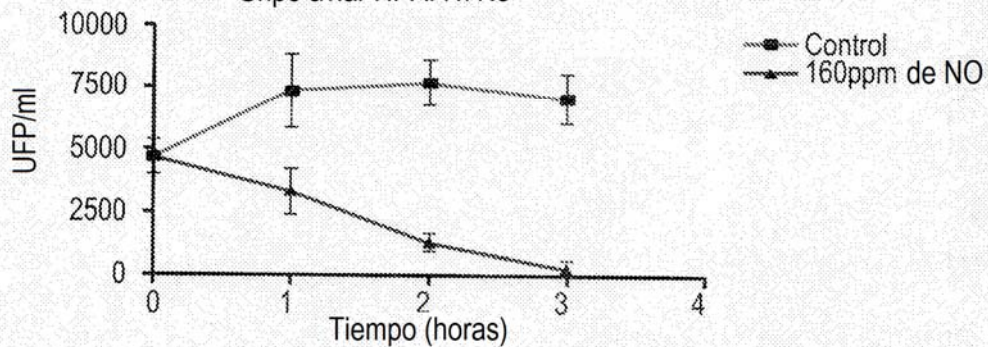


FIG. 2C

FIG. 3A

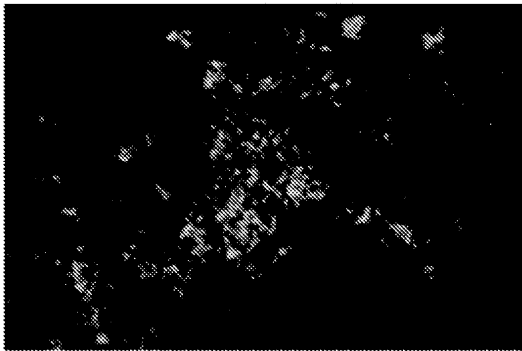


FIG. 3B

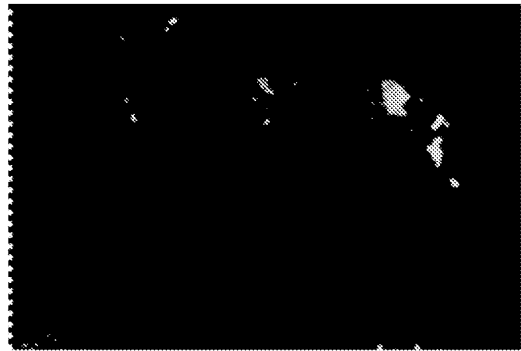


FIG. 3C

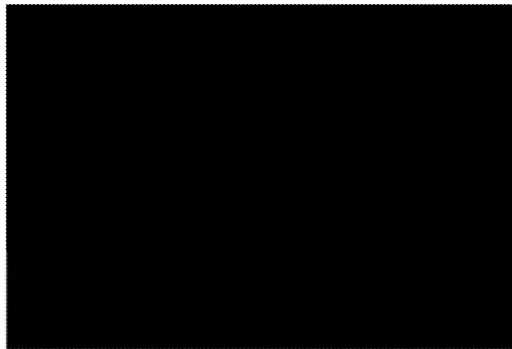
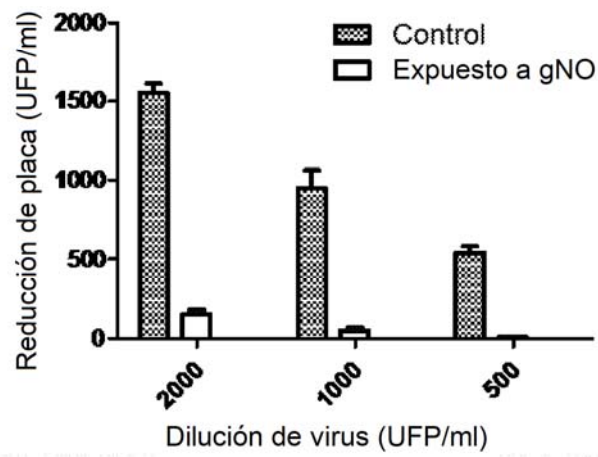


FIG. 3D



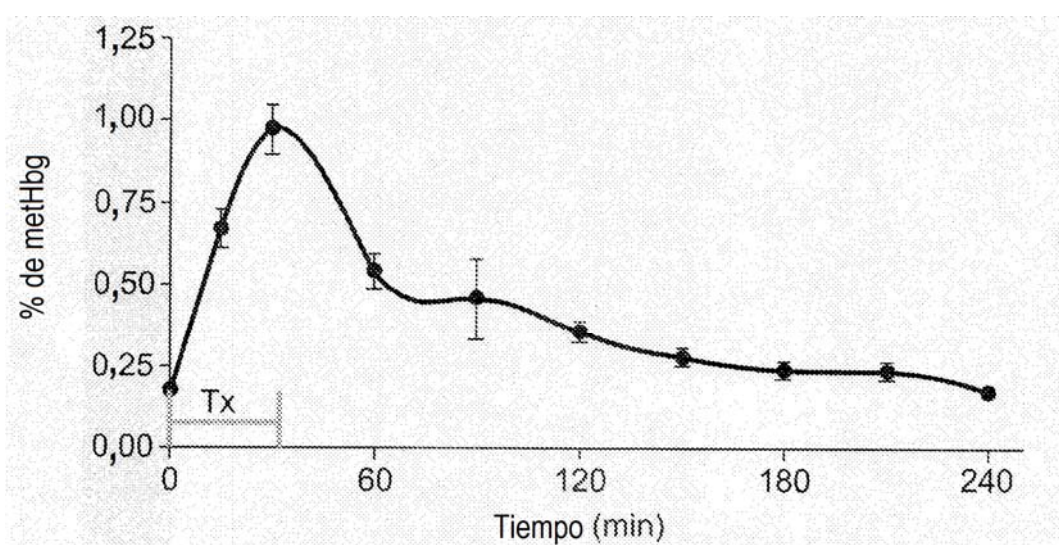


FIG. 4A

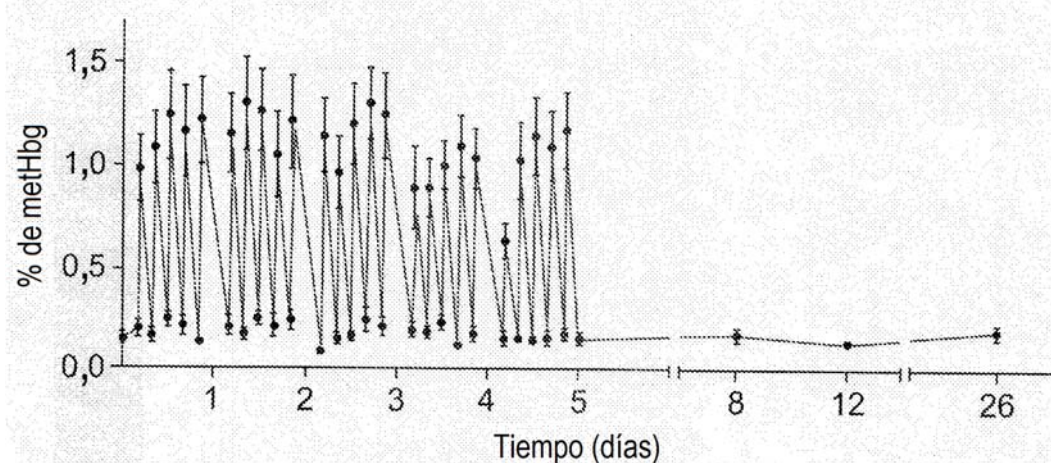


FIG. 4B

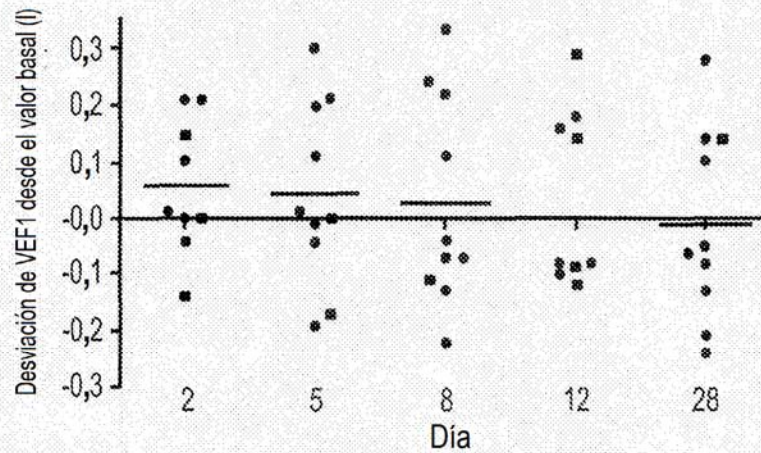


FIG. 5A

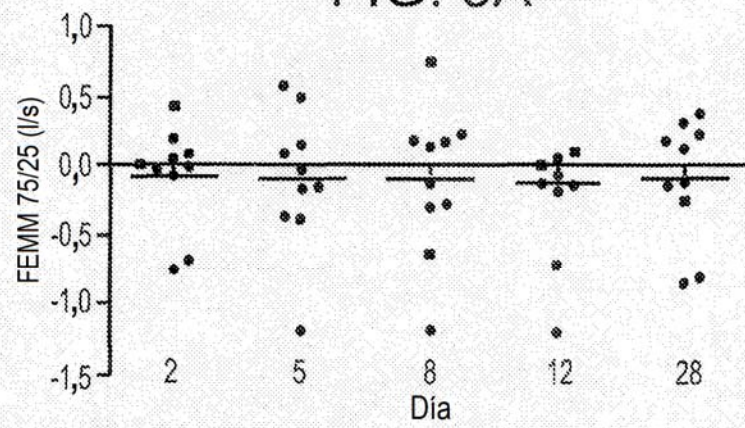


FIG. 5B

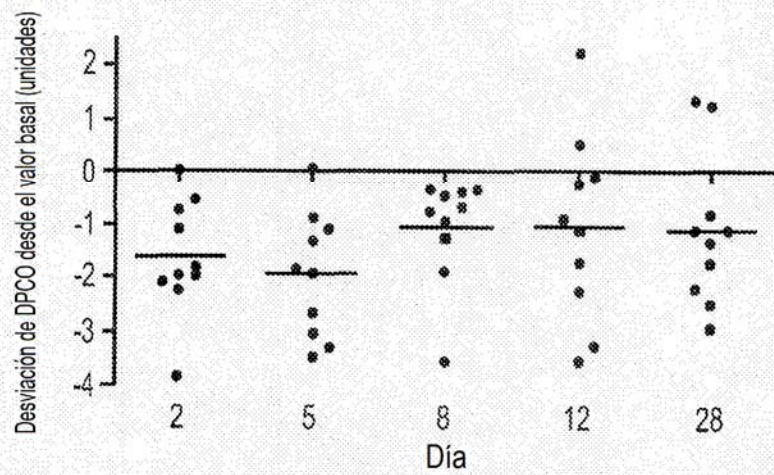


FIG. 5C

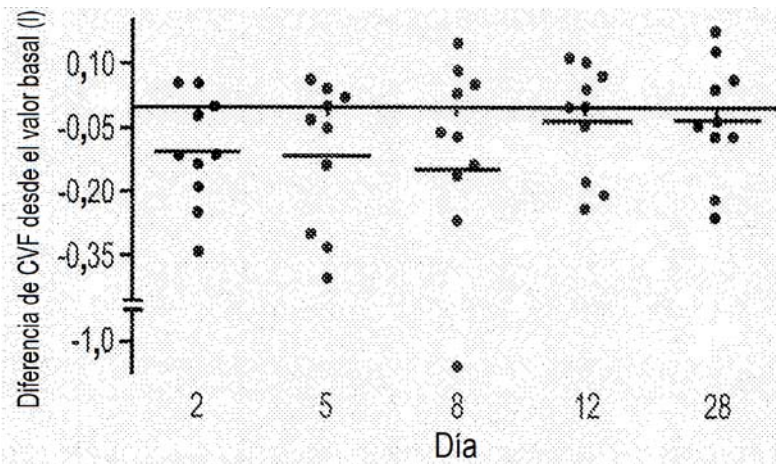


FIG. 5D

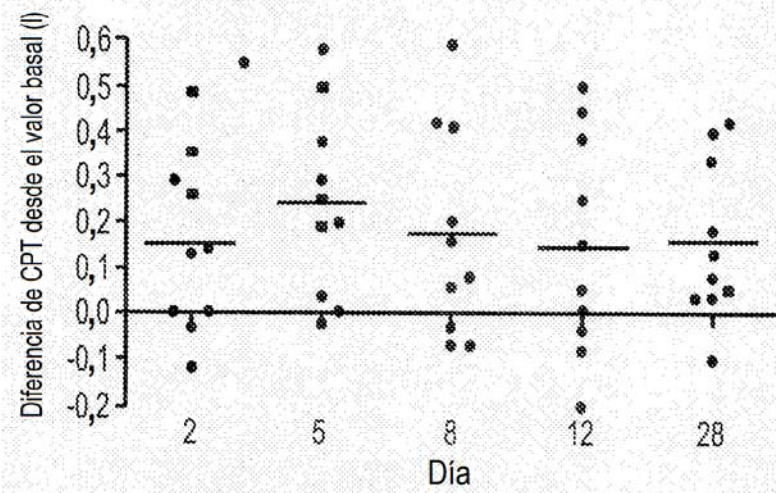


FIG. 5E

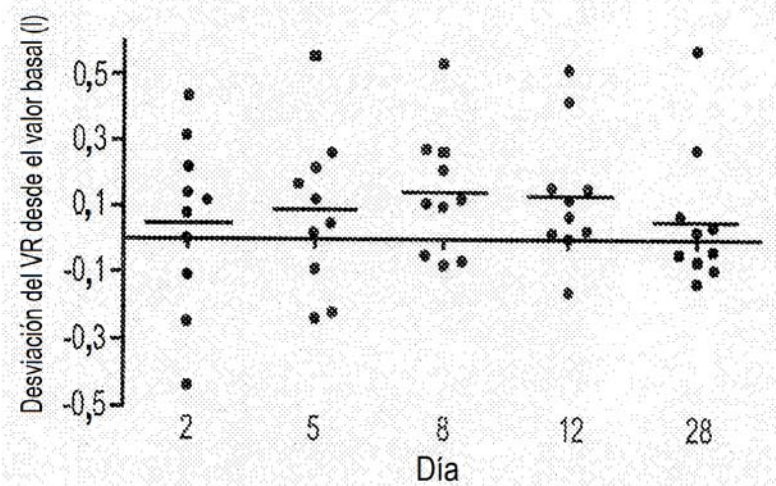
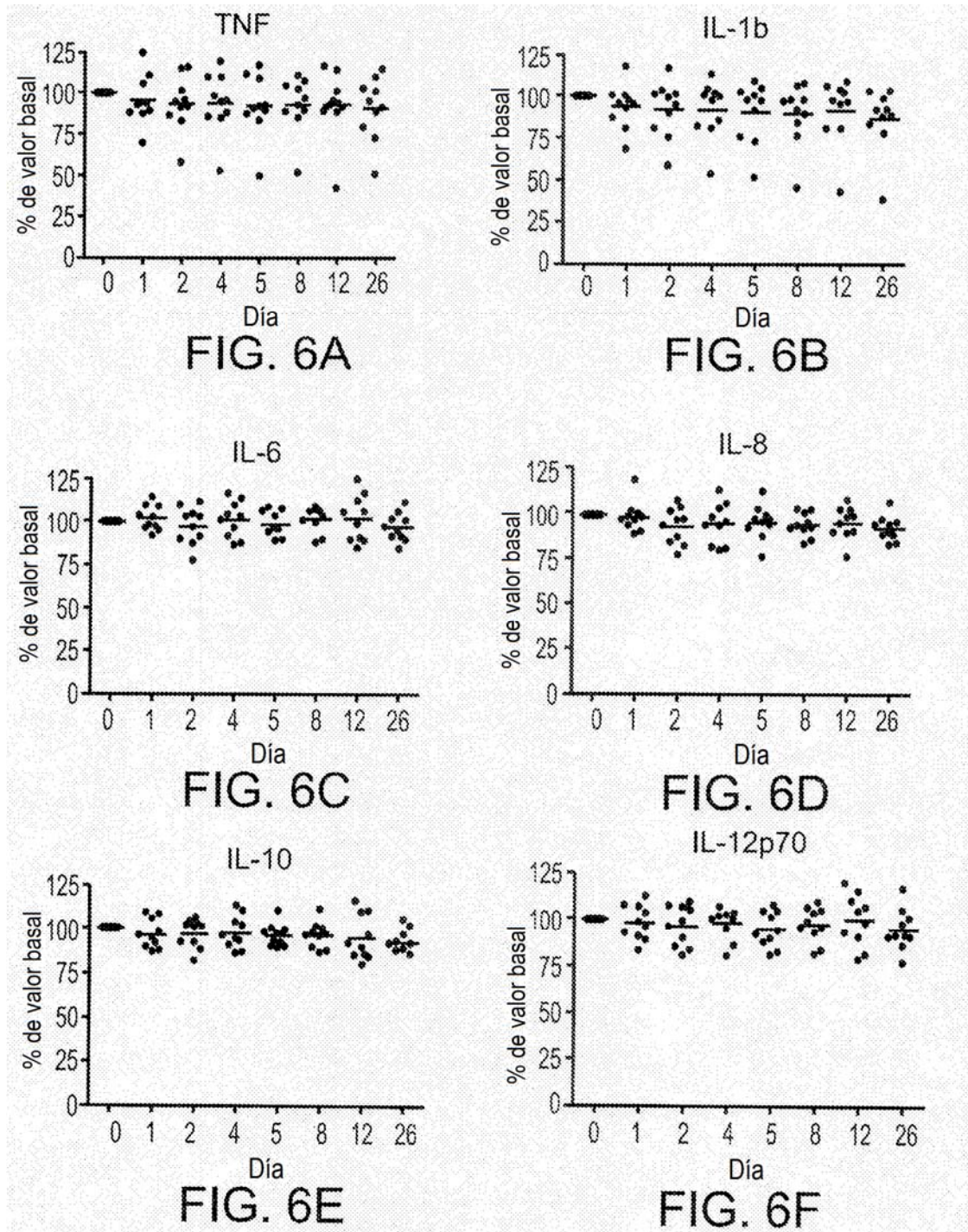


FIG. 5F



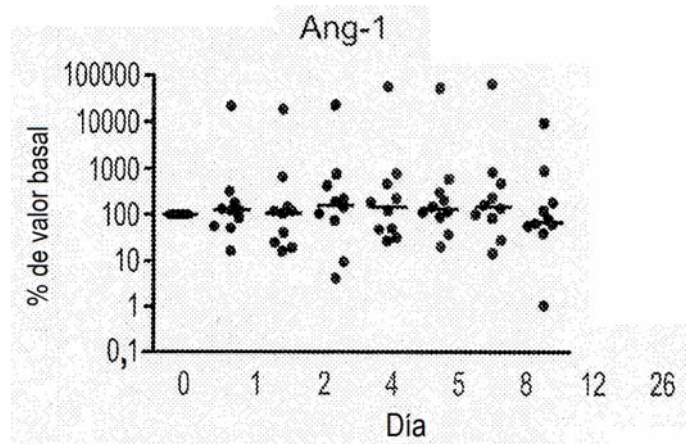


FIG. 7A

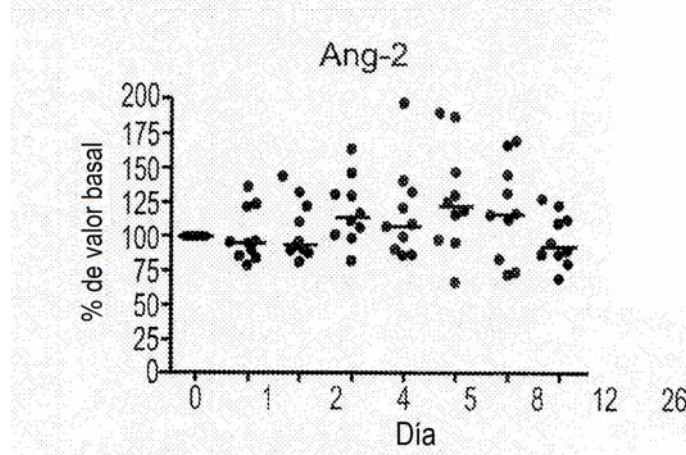


FIG. 7B

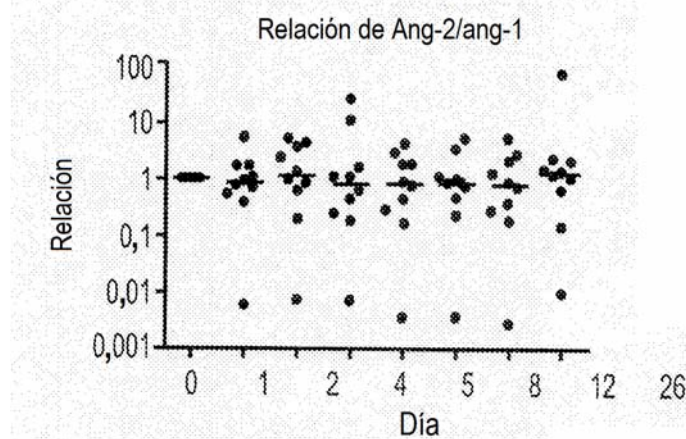


FIG. 7C