



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 310**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/196 (2006.01)

A61K 33/00 (2006.01)

A61P 11/08 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01983064 .5**

86 Fecha de presentación : **15.11.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1339428**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.2003**

54 Título: **Inhalación de óxido nítrico.**

30 Prioridad: **17.11.2000 SE 0004229**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **AGA AB.**
181 81 Lidingö, SE

72 Inventor/es: **Hedenstierna, Göran y**
Chen, Luni

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de medicamentos para el tratamiento de la vasoconstricción pulmonar o de la constricción de las vías respiratorias en un mamífero, especialmente el hombre. La invención está destinada al tratamiento de individuos que son el objeto de una respuesta de rebote al discontinuar la inhalación de óxido nítrico.

10 **Antecedentes de la invención**

El óxido nítrico relaja los vasos pulmonares, en particular cuando están constreñidos por diversos trastornos, como se ejemplificará más abajo. El óxido nítrico también relaja el músculo liso de las vías respiratorias (Belvisi MG, Stretton CD, Barnes PJ. Eur. J. Pharmacol. 1992; 210: 221-222), y la inhalación de óxido nítrico exógeno atenúa la constricción de las vías respiratorias en respuesta a diversos agentes en animales de laboratorio y en seres humanos (Dupuy PM, Shore SA, Drazen JM, Frostell C, Hill WA, Zapol WM. J. Clin. Invest. 1992; 90: 421-428; Högman M, Frostell C, Arnberg H, Hedenstierna G. Eur. Respir. J. 1993; 6:177-180; Högman M, Frostell CG, Hedenström H, Hedenstierna G. Am. Rev. Respir. Dis. 1993; 148:1474-1478). De este modo, por ejemplo, los documentos EP 560928, US 5.485.827, 5.873.359 y WO 92/10228 describen el uso de óxido nítrico para tratar broncoconstricción y vasoconstricción pulmonar. Sin embargo, se ha encontrado que el efecto del tratamiento muestra una gran variabilidad entre y dentro de los individuos. Además, aunque la inhalación de NO (INO) puede ser una terapia eficaz en pacientes con hipertensión pulmonar, alrededor de 1/3 de los pacientes son hiporrespondedores o no respondedores a INO. Además de eso, se ha observado un empeoramiento de la hipertensión pulmonar y de la oxigenación durante los intentos para retirar INO, lo que se denomina respuesta de rebote. También se han dado a conocer inestabilidad hemodinámica con peligro para la vida y muertes al discontinuar la inhalación de óxido nítrico. La reducción por etapas de la dosis de NO prolongará la terapia de NO, pero aún puede no eliminar la respuesta de rebote.

Los mecanismos responsables de la hiposensibilidad y de la respuesta de rebote no están totalmente comprendidos. Una de las hipótesis es que la producción de NO endógeno puede verse inhibida por la inhalación de NO como un mecanismo de retroalimentación negativa con reducción de la síntesis endógena. En un estudio que forma la base de la presente invención, se desarrolló un modelo de animal que produjo una respuesta de rebote al discontinuar la inhalación de NO por infusión de endotoxina durante al menos 3 horas. Además, los hallazgos indicaron que el rebote no sólo estaba causado por una disminución de la producción de NO endógeno, sino también, y posiblemente más importante, por el aumento de actividad del vasoconstrictor endotelina 1 (ET-1). Otra observación fue que hubo una correlación inversa entre la respuesta a INO y el grado de rebote. De este modo, cuanto más pobre era el efecto de INO, más fuerte era la respuesta de rebote. Davidson y colaboradores han encontrado una relación similar entre la hiporrespuesta o la no respuesta y el rebote en casos de disnea neonatal (D. Davidson, MD, Pediatrics. 104(2): 231-236, 1999).

En el modelo, la infusión de endotoxina provocó un incremento bifásico de la tensión arterial pulmonar, y una disminución en PaO₂. Apareció un incremento inicial importante de la hipertensión pulmonar 15-30 minutos después del comienzo de la infusión de endotoxina, en paralelo con el incremento de las concentraciones del vasoconstrictor tromboxano A₂ (TXA₂) u otros productos de ciclooxigenasa (COX). Un segundo período estable de hipertensión pulmonar y de hipoxia apareció 2,5 horas después del comienzo de la infusión de endotoxina, en paralelo con un aumento de ET-1.

Varios estudios han dado a conocer que INO no tiene éxito a la hora de invertir la vasoconstricción pulmonar inducida por un análogo de tromboxano (Welte M *et al.*, Acta Physiol Scand 1995, July, 154(3): 395-405). Ikeda S *et al.* (Ikeda S., Shirai M., Shimouchi A., Min KY., Ohsawa N., Ninomiya I., J. Physiology 1999 Feb; 49(1): 89-98) dio a conocer que INO combinada con prostaciclina administrada intravenosamente puede producir un efecto vasodilatador más potenciado.

Además, el ácido y los ésteres fenilalquenoicos sustituidos específicos, que inhiben la broncoconstricción inducida por leucotrienos o ácido araquidónico, son conocidos *per se* desde los documentos 4.536.515 y US 4.537.906.

Finalmente, Lipton H.L. *et al.*, "Influence of cyclooxygenase blockade on a response to isoproterenol, bradykinin and nitroglycerin in the feline pulmonary vascular bed"; Prostaglandins; 1984, Vol. 28. n° 2, p. 253-270, describe que los productos de ciclooxigenasa, tales como PGI₂, no median la respuesta vasodilatadora a isoproterenol, bradiquinina y nitroglicerina en el lecho vascular pulmonar.

Basándose en lo mencionado anteriormente, es muy sorprendente que se pueda lograr según la presente invención una terapia de combinación para un tratamiento eficaz de la vasoconstricción pulmonar o de la constricción de las vías respiratorias, es decir, en la que se pueda eliminar o al menos reducir de forma muy importante los efectos secundarios de INO como se describen anteriormente.

Sumario de la invención

En consecuencia, el objeto de la invención es proporcionar compuestos adecuados para uso para contra actuar o eliminar una respuesta de rebote cuando se discontinúa la inhalación de óxido nítrico.

Un objeto adicional de la invención es lograr el uso de un medicamento inhalable puro.

El objeto mencionado anteriormente se logra mediante el uso, método y preparación farmacéutica definidos en las reivindicaciones que se acompañan.

Según la invención, se proporciona un uso de óxido nítrico (NO) inhalable, en combinación con un inhibidor de ciclooxigenasa (COX), para la fabricación de un medicamento para contrarrestar una respuesta de rebote en el caso de la retirada del tratamiento con óxido nítrico gaseoso o un donante de óxido nítrico solo, usándose dicha combinación en una cantidad terapéuticamente eficaz para lograr dicha contra acción.

De este modo, según la presente invención, se encontró sorprendentemente que el efecto relajante reducido del óxido nítrico exógeno, o incluso el efecto amenazante para la vida cuando se discontinúa la inhalación de óxido nítrico, es, al menos parcialmente, debido a productos de ciclooxigenasa.

Más específicamente, se ha encontrado que, cuando se usa un inhibidor de ciclooxigenasa (COX) en combinación con óxido nítrico, se atenúa o incluso se elimina la respuesta de rebote que aparece cuando se discontinúa la inhalación de óxido nítrico.

Descripción detallada de la invención

La combinación de óxido nítrico gaseoso y un inhibidor de COX, según la presente invención, se puede usar para la fabricación de un medicamento para tratar una respuesta de rebote que aparece al discontinuar la inhalación de NO.

Según la invención, el óxido nítrico se usa preferiblemente en forma gaseosa, inhalable. La inhalación de óxido nítrico gaseoso representa una gran ventaja en terapia, por ejemplo en comparación con un dador de óxido nítrico no gaseoso, ya que el gas no tiene partículas ni gotitas que dispersar ni transportar al aparato respiratorio. Los gases tienen caminos libres de difusión largos, evitan más fácilmente las obstrucciones (tales como vías respiratorias constreñidas) que las partículas o las gotitas, y se disuelven directamente en el tejido sin provocar broncoespasmo de impacto. El efecto beneficioso de NO gaseoso sobre la vasculatura pulmonar y el tono del músculo liso de las vías respiratorias se observa inmediatamente tras la inhalación, haciendo al NO una primera defensa útil contra el broncoespasmo así como contra la vasoconstricción pulmonar, que puede ser seguido, si se desea, por la inhalación de agentes que actúan de forma más prolongada.

Sin embargo, según otra realización, el óxido nítrico se administra en forma de un dador de óxido nítrico, es decir, un compuesto que actúa liberando óxido nítrico. Los compuestos liberadores de óxido nítrico conocidos, útiles en la práctica de la invención, son nitrosocompuestos o compuestos nitrosílicos tales como S-nitroso-N-acetilpenicilamina, S-nitroso-L-cisteína y nitrosoguanidina, caracterizados por un resto –NO que se libera espontáneamente o que se transforma de otro modo a partir del compuesto en condiciones fisiológicas, tales como las obtenidas en el pulmón. Otros compuestos son compuestos en los que NO es un ligando en un complejo con un metal de transición, y como tal se libera fácilmente o se transfiere desde el compuesto en condiciones fisiológicas, por ejemplo nitroprusuro, NO-ferredoxina, o un complejo de NO-heme. Otros compuestos adecuados que contienen nitrógeno son compuestos que son metabolizados por enzimas endógenas del sistema respiratorio y/o vascular para producir el radical NO, por ejemplo arginina, trinitrato de glicerol, nitrito de isoamilo, nitrito inorgánico, azida e hidroxilamina. Tales tipos de compuestos liberadores de óxido nítrico, y el método para su síntesis, son bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, el dador de óxido nítrico es un compuesto que libera óxido nítrico de tal manera que sólo se ven afectadas las vías respiratorias y los vasos pulmonares.

El dador de óxido nítrico usado en la invención se puede administrar como un polvo (es decir, un sólido finamente dividido, ya sea proporcionado puro o como una mezcla con un polvo portador biológicamente compatible, o con uno o más compuestos terapéuticos adicionales), o como un líquido (es decir, disuelto o suspendido en un vehículo líquido biológicamente compatible, opcionalmente mezclado con uno o más compuestos terapéuticos adicionales), y se puede inhalar convenientemente en forma nebulizada (preferiblemente incluyendo partículas o gotitas que tienen un diámetro menor que 10 μm). Los líquidos y polvos portadores que son adecuados para la inhalación se usan habitualmente en tratamientos de inhalación tradicionales para el asma, y de este modo son bien conocidos en la técnica. El intervalo óptimo de dosificación se puede determinar mediante procedimientos normales conocidos por la persona experta.

El inhibidor de ciclooxigenasa a usar en la invención puede ser cualquier compuesto que se reconoce que es adecuado para uso con un mamífero, especialmente un ser humano, que se puede administrar convenientemente. Los experimentos realizados en relación con la presente invención son experimentos con un inhibidor de COX no selectivo. Sin embargo, el bloqueo de la enzima COX-2 parece aumentar y prolongar el efecto de INO. El bloqueo de las enzimas COX-1 y COX-2 pueden ambas embotar la respuesta de rebote. El uso de un bloqueador no selectivo de COX debería de ser por lo tanto útil, pero igualmente se pueden lograr efectos ventajosos con un bloqueador más selectivo de COX.

Sin embargo, algunos ejemplos de inhibidores de COX que debieran funcionar según la presente invención son: diclofenaco; aceclofenaco; nabumetona; meloxicam; ácido meclofenámico; nimesulida; paracetamol; rofecoxib; celecoxib; DuP 697 (5-bromo-2-(4-fluorofenil)-3-[4-(metilsulfonyl)-fenil]tiofeno); GR 32191 (ácido ((1R- α (Z),2 β ,3 β ,5 α))-(+)-7-5(((1,1'-bifenil)-4-il)-metoxi)-3-hidroxi-2-(1-piperidinil)-ciclopentil)-4-heptenoico); flosulida (o cGP 28238); NS 398 (N-(2-(ciclohexiloxi)-4-nitrofenil)-metanosulfonamida); L-745.337 (N-[6-[(2,4-difluorofenil)-tio]-2,3-dihidro-1-oxo-1H-inden-5-il]metanosulfonamida); DFU ((5,5-dimetil-3-(3-fluorofenil)-4-(4-metilsulfonyl)-fenil-2(5H)-furanona); HN-56249 ((3-2,4-diclorotiofenoxi)-4-metilsulfonylamino-bencenosulfonamida); JTE-522 ((4-(4-ciclohexil-2-metiloxazol-5-il)-2-fluorobencenosulfonamida); aspirina; indometacina; e ibuprofeno.

De estos compuestos específicos, la aspirina, la indometacina y el ibuprofeno parecen ser más selectivos con relación a la inhibición de COX-1, mientras que los otros compuestos (al menos la mayoría de ellos) parece que son más selectivos con relación a la inhibición de COX-1 y COX-2, o esencialmente son selectivos de forma similar con relación a la inhibición de COX-2. También pueden ser útiles sus sales de adición de ácidos, por ejemplo hidroclozuros.

Los componentes usados según la invención se pueden administrar mediante dispositivos inhaladores comercialmente disponibles. El NO gaseoso comprimido se puede obtener a partir de un proveedor comercial, típicamente como una mezcla de 200-2000 ppm de NO en N₂ gaseoso puro. Dicha mezcla gaseosa de NO-N₂ se puede suministrar en el gas de inhalación en una cantidad de 1-100000 nmoles/min., o se puede mezclar con aire, oxígeno u otro gas portador adecuado, o mezcla de gases, generalmente hasta una concentración de 1 ppm a 180 ppm de dicha mezcla. Para inhalaciones durante períodos de tiempo prolongados, generalmente se utiliza un intervalo de 1-40 ppm, mientras que se puede usar 1-80 ppm o 1-180 ppm para períodos de tiempo más cortos, cuando se desee un gran efecto inmediato. Los intervalos especialmente preferibles en los casos últimamente mencionados son 20-80 ppm (por ejemplo 40-80 ppm) o 40-180 ppm, respectivamente. En cuanto a detalles adicionales que se refieren a la inhalación de NO, se hace referencia a la técnica anterior a este respecto, por ejemplo el documento EP 560928 B1.

El óxido nítrico y el inhibidor de ciclooxigenasa se pueden administrar secuencialmente en cualquier orden, o se pueden administrar simultáneamente, en este último caso ya sea con los dos componentes procedentes de fuentes separadas al mismo tiempo o juntos, o en forma de una composición que comprende tanto dicho óxido nítrico como dicho inhibidor de ciclooxigenasa.

El inhibidor de ciclooxigenasa se puede administrar de la misma manera que NO, es decir, mediante inhalación, pero también mediante otras vías de administración normales para los fármacos. Entre tales vías, se puede hacer referencia a las administraciones sublingual, oral y rectal, a la aplicación a superficies epiteliales, y a la inyección, que puede ser subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Sin embargo, preferiblemente, el inhibidor de ciclooxigenasa se administra mediante inhalación. De este modo, se puede administrar como un polvo (es decir, un sólido finamente dividido, ya sea proporcionado puro o como una mezcla con un polvo portador biológicamente compatible, o con uno o más compuestos terapéuticos adicionales), o como un líquido (es decir, disuelto o suspendido en un vehículo líquido biológicamente compatible, opcionalmente mezclado con uno o más compuestos terapéuticos adicionales), pero se puede inhalar convenientemente en forma nebulizada (incluyendo preferiblemente partículas o gotitas que tienen un diámetro menor que 10 μ m). Los líquidos y polvos portadores que son adecuados para inhalación se usan habitualmente en tratamientos de inhalación tradicionales para el asma, y de este modo son bien conocidos en la técnica.

El inhibidor de ciclooxigenasa se usa en una cantidad terapéuticamente eficaz, tal como una cantidad que se establece fácilmente por la persona experta, dependiendo, entre otros, del tipo de compuesto usado, y de la vía de administración. Como debe ser manifiesto para la persona experta en la técnica, el término "terapéutico", a este respecto así como en general en la descripción y reivindicaciones, engloba tratamiento profiláctico así como tratamiento de una afección establecida. Además, "terapéuticamente eficaz" se utiliza en el sentido que es habitual dentro de este campo técnico, como se define, por ejemplo, en el documento EP 560928 B1 citado anteriormente, aunque en general, en este caso específico, el inhibidor de ciclooxigenasa es terapéuticamente eficaz tan pronto como invierte un efecto negativo obtenido cuando se usa óxido nítrico gaseoso solamente. Como guía, a este respecto, también se podría añadir que el compuesto diclofenaco es generalmente eficaz cuando se usa en una cantidad total de 50-150 mg/día para un adulto, usado mediante comprimidos orales, supositorios, inyección intramuscular o infusión intravenosa. Esto debería de corresponder a una dosis de aproximadamente 0,1 hasta 5 mg/kg de peso corporal, tal como 0,15 a 3 mg/kg de peso corporal, cuando se usa en forma de un aerosol. Sin embargo, los efectos se pueden obtener algunas veces a una dosis más baja, y algunas veces incluso se pueden necesitar dosis más elevadas. Para otros compuestos, esto se podría usar como base para el establecimiento de las dosis apropiadas de los mismos.

Se describe un método para el tratamiento de vasoconstricción pulmonar o constricción de las vías respiratorias en un mamífero, especialmente el hombre, a fin de contrarrestar una hiporrespuesta o una falta de respuesta al tratamiento con óxido nítrico gaseoso o con un dador de óxido nítrico solamente, y/o para contrarrestar una respuesta de rebote en el caso de la retirada del tratamiento con óxido nítrico gaseoso o con un dador de óxido nítrico solamente. Dicho método comprende administrar mediante inhalación, a un mamífero que necesite de tal tratamiento, óxido nítrico (NO), en forma de óxido nítrico gaseoso o de un dador de óxido nítrico, en combinación con un inhibidor de ciclooxigenasa, usándose dicha combinación en una cantidad terapéuticamente eficaz para lograr dicha contra acción.

En cuanto a realizaciones específicas y preferibles de dicho método, se hace referencia a aquellas realizaciones específicas y preferibles que se han descrito en relación con el uso según la invención.

Finalmente, se describe una preparación farmacéutica para el tratamiento de la vasoconstricción pulmonar o de la constricción de las vías respiratorias en un mamífero, especialmente el hombre, a fin de contrarrestar una hiporrespuesta o una falta de respuesta al tratamiento con óxido nítrico gaseoso o con un dador de óxido nítrico solamente, y/o contrarrestar una respuesta de rebote en el caso de la retirada del tratamiento con óxido nítrico gaseoso o con un dador de óxido nítrico solamente, que comprende óxido nítrico (NO), en combinación con un inhibidor de ciclooxigenasa, estando dicho óxido nítrico gaseoso y dicho inhibidor de ciclooxigenasa presentes en una cantidad terapéuticamente eficaz para lograr dicha contra acción.

Con referencia a realizaciones específicas y preferibles de dicha preparación, también se hace referencia a dichas realizaciones específicas y preferibles del uso según la invención.

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo

Se realizaron experimentos para investigar el efecto de un inhibidor de COX, el diclofenaco, en relación con la inhalación de NO, más específicamente sobre la respuesta de rebote al discontinuar dicha inhalación.

Materiales y métodos

Preparación de los animales

El Comité de Ética de Investigación con Animales de la Universidad de Uppsala aprobó el estudio. En el estudio se usaron veintiséis cerdos criados en los campos suecos, que pesan 24-29 kg. Antes del transporte desde la granja, los cerdos se sedaron con un neuroléptico, azaperonum (STRESNIL, Janssen, Bélgica), 40 mg intramuscularmente (im). Se indujo anestesia con atropina im (0,04 mg/kg), tiletamina/zolazepam (ZOLETIL, Virbac Laboratories) (6 mg/kg) y xylzry (ROMPUN, Bayer AG, Alemania) (2,2 mg/kg). Después de la inducción, se insertó una cánula en la vena de la oreja, y se inyectó un opioide (FENTANILO, Antigen Pharmaceuticals Ltd., Roscrea, Irlanda) (5 ug/kg). La relajación del músculo se proporcionó mediante pancuronio (PAVULON, Organon Technika AB, Göteborg, Suecia) (0,2 ug/kg). La anestesia se mantuvo con una infusión continua de un hipnótico (clometiazol, HEMINEVRIN, Astra, Södertälje, Suecia) (400 mg/hora), pancuronio (2 mg/hora) y fentanilo (150 ug/hora). Se administraron, según fue necesario, dosis repetidas de fentanilo 0,2-0,5 mg i.v. La intensidad de la anestesia se consideró que era adecuada cuando las incisiones en la piel no provocaron cambios en la frecuencia cardíaca ni en la tensión arterial. Para la hidratación se administró disolución salina isotónica calentada previamente (38°C), 500 ml/hora. Los animales se colocaron en la posición supina (recostados sobre el dorso) durante el resto del estudio.

Se realizó una traqueotomía después de la inducción de la anestesia, y se insertó un tubo traqueal con manguito (diámetro interno de 6 mm). Un ventilador controlado por el volumen (Siemens 900c) proporcionó la ventilación mecánica. Los transductores en el ventilador registraron la presión del tubo endotraqueal y el volumen de gas ventilado en un minuto. La frecuencia respiratoria se mantuvo a 20 respiraciones por minuto, ajustándose el volumen corriente para mantener un volumen corriente final de CO₂ (PetCO₂) entre 36 y 41 mm Hg (4,8-5,4 kPa). El tiempo de inspiración fue 25%; se aplicó una pausa de inspiración final de 5% del ciclo respiratorio, así como una presión espiratoria final (PEEP) de 5 cm H₂O. La fracción inspirada de oxígeno (FiO₂) fue 0,5.

Cateterizaciones y medidas sanguíneas

Se introdujo un catéter con punta de balón de luz triple (Swan Ganz no. 7F), vía la vena yugular externa derecha, a la arteria pulmonar para la toma de muestras de sangre y para registrar la presión. Para fines de infusión, se insertó en la vena yugular contralateral un gran catéter con perforaciones, con su punta en la vena cava superior. La arteria carótida derecha se canuló para la toma de muestras de sangre y para el registro de la tensión arterial.

Los catéteres arterial, venoso central y de la arteria pulmonar se conectaron a transductores apropiados de la presión (Sorenson Transpac Transducers, Abbott Critical Care Systems, ILL, USA), y se registraron las presiones en un monitor Marquette 7010 (Marquette Electronics Inc., WI USA). Se registraron la presión arterial media (MAP), la presión de la arteria pulmonar media (MPAP), la frecuencia cardíaca (HR), la presión venosa central (CVP), la presión de enclavamiento capilar pulmonar (PCWP) y el gasto cardíaco (Qt). Las presiones de las vías respiratorias se registraron desde el ventilador. Las presiones vasculares se promediaron durante todo el ciclo respiratorio, y como nivel de referencia cero se usó la parte media del tórax.

El Qt se midió por medio de termodilución: se inyectaron como bolo 10 ml de disolución salina enfriada en hielo, y se computó el Qt (gasto cardíaco computerizado Marquette 7010, Marquette Electronics Inc., WI, USA). Al menos se administraron tres inyecciones para cada medida, y se calculó la media. Las inyecciones se distribuyeron uniformemente durante el ciclo respiratorio. En cada medida se registró el volumen de gas espirado en un minuto. Se recogieron muestras mezcladas de sangre venosa y arterial, para gasometría arterial (ABL 3, Radiometer, Copenhagen, Dinamarca), para determinar la saturación de oxígeno y la concentración de hemoglobina (OSM 3, Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). Se recogieron cinco ml de sangre arterial al mismo tiempo, y el plasma se separó para el análisis bioquímico (véase más abajo).

Lesión pulmonar

Se indujo un daño pulmonar agudo mediante infusión intravenosa de endotoxina 25 ug/kg/hora durante 3 horas, y se mantuvo entonces a 10 ug/kg/hora durante el resto del período experimental.

Protocolo

Treinta minutos después de la cirugía, se realizaron medidas de referencia de la hemodinámica, se tomaron muestras de sangre, y la sangre se recogió para análisis bioquímicos subsiguientes. Se creó una lesión pulmonar aguda mediante infusión intravenosa de endotoxina (LPS, *E Coli* 0111:B4, Sigma Chemicals, St Louis, Mo, USA) 25 ug/kg/hora, durante 3 horas. La respuesta se midió 30, 60, 120 y 150 minutos después del comienzo de la infusión de endotoxina. Los animales se dividieron entonces en tres grupos, a fin de analizar el efecto potencial del refuerzo de INO de un inhibidor de COX. Esto se logró distribuyendo los cerdos en “un grupo de bloqueo de ciclooxigenasa (COX)”, un grupo “sin bloqueo”, y un “grupo de control”.

1. En el grupo de bloqueo de COX, la infusión de endotoxina se mantuvo durante tres horas antes de que comenzase la inhalación de 30 ppm de INO. Se administró un inhibidor no selectivo de COX, diclofenaco (Sigma D6899), en disolución salina (300 mg/kg), como un bolo iv, 30 minutos antes de la inhalación de NO. Antes de discontinuar la INO 30 minutos más tarde, se tomaron medidas de la hemodinámica y del intercambio gaseoso, y se tomaron muestras de sangre para el análisis bioquímico. También se tomaron medidas cuando se retiró el NO durante 5, 10, 15, 30 minutos, para comprobar signos de una reacción de rebote. Después, la inhalación de NO se continuó durante otra media hora (es decir, cuatro horas después del comienzo de la infusión de endotoxina), y se retiró nuevamente. Los resultados se estudiaron a los mismos puntos de tiempo como antes. Esto se realizó a fin de ver si la respuesta a INO permaneció o había cambiado, y si cualquier respuesta de rebote fue más fuerte que, o había aparecido después de, la primera ocasión.
2. En el grupo sin bloqueo, no se administró ningún inhibidor de COX. El protocolo fue de otro modo similar al usado en el grupo de bloqueo de COX. En 5 cerdos, se tomaron muestras del tejido pulmonar vía una esternotomía en 4 ocasiones (antes, durante y después de la inhalación de NO) durante el estudio.
3. Al grupo de control se le administró la misma infusión de endotoxina, pero no se expuso a INO o a un inhibidor de COX. Los cerdos de control se estudiaron en el momento inicial y en los puntos de tiempo que coinciden con el comienzo y el final de las dos exposiciones de INO, y al final del experimento, cinco horas después del comienzo de la administración de la endotoxina.

De este modo, el período de estudio después del comienzo de la infusión de endotoxina fue 300 minutos (cinco horas), y el tiempo total del estudio, incluyendo la anestesia, la preparación y la medida de la línea de base antes de la endotoxina, fue aproximadamente 7 horas.

Administración de NO y registro de NO en el aire respiratorio

Se mezcló NO, 1000 ppm en N₂, con una mezcla de O₂/N₂, y se conectó a la entrada de un caudal bajo del ventilador. El gas inspirado se hizo pasar a través de un bote que contiene sosa cálcica, para absorber cualquier NO₂. Las concentraciones de NO y NO₂ inspirados se midieron mediante quimioluminiscencia (9841 NOx, Lear Siegler Measurement Controls Corporation, Englewood CO. USA) en la rama de inspiración de la tubería de ventilación. El NO inspirado se ajustó a 30 ppm, y el NO₂ inspirado fue siempre menor que 0,5 ppm.

Expresión de COX-1 y COX-2 mediante transferencia Western

Los bloques de tejido pulmonar se enjuagaron mediante PBS, a 4°C. La proteína total del tejido pulmonar se extrajo mediante homogeneización (Ultra-Turrax, Jenke and Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) en 5 volúmenes de tampón Tris 0,05 M (pH 7,4) enfriado en hielo, que contiene 0,5 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, para inhibir la proteólisis. El sobrenadante se recogió y se almacenó a -80°C hasta el análisis. La concentración de la proteína total en el sobrenadante se determinó mediante el método de Lowry. Después, la proteína se fraccionó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio, y se transfirió electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se bloqueó con 5% de BSA en TBS toda la noche a 4°C, y después se incubó con anti-COX-1 (1:2500, Cayman Chemical, MI, USA, Ca 160108), COX-2 (1:1500, Cayman Chemical, MI, USA, Ca 160108) en TBS que contiene 1% de BSA, toda la noche a 4°C. Después de lavar con TBS cinco veces, las transferencias se incubaron durante 1 hora con inmunoglobulina G (Ig G) anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (dilución 1:2500, Vector Laboratories, Burlingame, USA), para la detección de ET-1. La transferencia se lavó 5 veces en TBS, y el complejo de antígeno-anticuerpo se detectó sobre una película fotográfica, usando un reactivo de quimioluminiscencia potenciado (Amersham, Arlington Heights, IL, USA). Todos los experimentos se llevaron a cabo tres veces, y las bandas procedentes de cada experimento se analizaron usando el programa Image 1.6 C del National Institutes of Health (NIH), para el análisis estadístico.

TXB2 del plasma

La sangre se recogió en tubos previamente helados que contienen EDTA (10 mM, concentración final), y se centrifugó (10 min. a 40°C). Las medidas de la concentración de TXB2 se realizaron usando un inmunoensayo enzimático comercialmente disponible (kit de EIA para tromboxano B2, Cayman Chemical, MI, USA, Ca 519031). El suero se recogió de cada tubo de ensayo, y se almacenó a -70°C hasta que se realizaron las mediciones de TXB2. Para asegurarse de que todas las muestras estaban libres de disolventes orgánicos, el suero se purificó antes de su adición al pocillo de ensayo. La purificación de TXB2 se realizó como la Introducción de Cayman Chemical, añadiendo primeramente 10.000 cpm de TXB2 marcado con tritio (3H-TXB2) a cada muestra, y después 2 ml de etanol, seguido del giro mediante remolino a 4°C durante 5 minutos, y la centrifugación a 1500 g durante 10 minutos, para eliminar las proteínas precipitadas. El sobrenadante se recogió y se mezcló con agua ultrapura. La muestra se hizo pasar a través de un cartucho de fase inversa C-18. Se retiró diez por ciento del eluato, para el recuento por centelleo.

Los inmunoensayos enzimáticos se realizaron por duplicado mezclando 50 µl de muestra purificada con 50 µl de trazador y 50 µl de antisuero, en microplacas. Después de la incubación durante 18 horas, se añadieron 200 µl de los reactivos de Ellmans, para comenzar la reacción enzimática, y se midió la absorción de viales individuales 30 minutos más tarde, a 405 nm, usando un lector de microplacas por fotometría (Thermo Max, Molecular Devices). Las concentraciones de TXB2 en las muestras se estimaron a partir de curvas estándares obtenidas mediante regresión no lineal frente a la absorción de ocho concentraciones conocidas de TXB2, que oscilan desde 7,5 hasta 1000 pg/ml. Los coeficientes de intraensayo e interensayo de la variación fueron < 10%. Para detalles adicionales, véase el manual de Cayman Chemical del kit 519031 de inmunoensayo enzimático para TXB2.

Análisis estadístico

La desviación media y estándar de la media se calculó para todas las variables en todas las condiciones del estudio. Se hicieron comparaciones usando análisis de varianza (ANOVA) para mediciones repetidas; se realizaron correcciones para comparaciones múltiples. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de $p < 0,05$.

*Resultados**Daño pulmonar inducido por endotoxina*

La hemodinámica de la línea de base y la oxigenación arterial fueron similares a las medidas en cerdos sanos en experimentos previos (Freden F. *et al.*, Br J Anaesth, 77 (3):413-8, 1996). No hubo ninguna diferencia entre los tres grupos.

La infusión de endotoxina incrementó la MPAP más de dos veces después de 150 minutos de infusión en todos los grupos. La PaO2 se redujo significativamente, hasta la mitad del valor de la línea de base. Además, se incrementó la frecuencia cardíaca, mientras que disminuyó el gasto cardíaco. No hubo diferencias significativas entre las medidas tomadas a las 3 y 4 horas después del comienzo de la infusión de endotoxina en el grupo sin COX, y después de 3, 4 y 5 horas en el grupo de control.

Inhalación y discontinuación de NO

En el grupo sin bloqueante, después de 3 horas de infusión de endotoxina, la inhalación de 30 ppm de NO dio como resultado una disminución del 28% en MPAP, y un incremento del 54% en PaO2. Cuando, después de 30 minutos, se discontinuó la inhalación de NO, MPAP aumentó rápidamente (dentro de los 5 minutos) hasta un nivel que fue 23% (9 mm Hg) mayor que antes de la inhalación de NO; de este modo, se había desarrollado una respuesta de rebote. PaO2 disminuyó rápidamente hasta el valor antes de la inhalación de NO, pero no mostró un fenómeno claro de rebote.

Cuando se repitió la inhalación de NO después de 4 horas de infusión de endotoxina, la caída de MPAP y el incremento de PaO2 fueron más débiles, y ya no fue significativo para PaO2, que durante el ensayo una hora antes. Cinco minutos después de discontinuar la inhalación de NO, MPAP se había incrementado de nuevo significativamente hasta por encima del nivel antes de NO (+ 26%), y PaO2 había caído hasta una cifra por debajo del nivel antes de NO. De este modo, se observó una hipoxemia clara de rebote.

Había una relación inversa entre la mejora en PaO2 con la inhalación de NO y la magnitud de la respuesta de rebote al discontinuar NO. De este modo, cuanto más débil era la respuesta a NO inhalado, mayor era la caída en PaO2 cuando se discontinuaba NO. No se observó tal relación para MPAP.

En el grupo de bloqueo de COX, el pretratamiento con diclofenaco redujo la MPAP. La INO disminuyó significativamente MPAP, e incrementó PaO2. Sin embargo, al discontinuar la INO, no se observó rebote ni en MPAP ni en PaO2. La magnitud de la reducción de PAP no fue mayor con la combinación de INO y diclofenaco. Sin embargo, prolongó la duración de acción del NO inhalado, en comparación con el grupo sin bloqueo. Además, la INO produjo la misma mejora en MPAP y PaO2, en el segundo ensayo de inhalación de NO, que durante el primer ensayo una hora antes, contrario a la respuesta atenuada a NO en el grupo sin bloqueo. Nuevamente, no se registró ninguna respuesta de rebote cuando se discontinuó la INO. La resistencia respiratoria aumentó durante la infusión de endotoxina. La INO

ES 2 282 310 T3

sola no previene ni atenúa el aumento. Sin embargo, en el grupo de bloqueo de COX, el incremento en la resistencia fue significativamente menor ($p < 0,01$), y no hubo ningún aumento en absoluto durante los períodos de INO.

En el grupo de control, MPAP y PaO₂ permanecieron estables durante las dos horas, que corresponden a las exposiciones a la INO en los grupos de estudio. De este modo, una comparación entre la INO y los grupos de control describió incluso más claramente las mejoras en MPAP y PaO₂ por las dos exposiciones a la INO, la respuesta de rebote al discontinuar la INO, y los efectos del inhibidor de COX.

La inhalación o la discontinuación de NO no afectó la expresión de COX-1, ni en la 3ª ni en la 5ª hora del ensayo de INO. La expresión de COX-2 aumentó notablemente después de 3 horas de infusión de endotoxina, en el grupo sin bloqueo, con un aumento adicional a las 5 horas hasta casi 10 veces los niveles normales de la línea de base ($p < 0,01$). Treinta minutos de INO no tuvieron ningún efecto sobre la expresión, ni durante el ensayo de inhalación a las 3 horas ni durante el ensayo de inhalación a las 5 horas. También, la expresión de COX-2 permaneció elevada después de los períodos de INO.

Concentración de TXB-2 en plasma

No hubo ninguna diferencia significativa en la línea de base entre los tres grupos. El TXA₂ plasmático aumentó drásticamente (6000-80000 pg/ml) media hora después del comienzo de la infusión de endotoxina, y entonces disminuyó hasta el doble de la línea de base a las 3 horas, sin diferencia entre los grupos. En el grupo sin bloqueo, el nivel de TXB₂ plasmático no cambió durante la inhalación de NO, pero aumentó cinco minutos después de la retirada de la INO, y ascendió hasta un pico a 15 minutos después de la INO ($p < 0,05$). Permaneció elevado cuando se comenzó el segundo ensayo de INO, 30 minutos más tarde (20000-40000 pg/ml), con un incremento posterior cuando se retiró la INO durante el segundo tiempo. En el grupo de bloqueo de COX, el TXA₂ plasmático no aumentó debido a la primera exposición a INO, ni a la retirada. Hubo una disminución del TXB₂ plasmático durante el segundo ensayo de INO, y no hubo ningún incremento después de la retirada de INO.

REIVINDICACIONES

1. Uso de óxido nítrico (NO) inhalable, en forma de óxido nítrico gaseoso o de un dador de óxido nítrico, en combinación con un inhibidor de ciclooxigenasa para la fabricación de un medicamento para tratar la vasoconstricción pulmonar o la constricción de las vías respiratorias en un mamífero, especialmente el hombre, a fin de contrarrestar una hiporrespuesta o una ausencia de respuesta al tratamiento con óxido nítrico gaseoso o con un dador de óxido nítrico solamente, y/o para contrarrestar una respuesta de rebote en caso de retirada del tratamiento con óxido nítrico gaseoso o con un dador de óxido nítrico solamente.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha vasoconstricción pulmonar o constricción de las vías respiratorias está asociada con una afección clínica seleccionada del grupo que consiste en lesión traumática, embolia grasa en el pulmón, acidosis, síndrome disneico agudo del adulto, mal de las alturas agudo, cirugía post-cardiovascular y pulmonar, hipertensión pulmonar aguda, hipertensión pulmonar persistente del neonato, síndrome de aspiración perinatal, enfermedad de las membranas hialinas, tromboembolia pulmonar aguda, edema pulmonar agudo, reacciones a la heparina-protamina, hipoxia y asma bronquial.

3. Uso según la reivindicación 2, en el que dicha constricción de las vías respiratorias está asociada con asma bronquial.

4. Uso según la reivindicación 3, en el que dicha constricción de las vías respiratorias está asociada con una afección aguda de asma bronquial o estado asmático.

5. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho medicamento es un medicamento inhalable.

6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha fabricación se refiere a un medicamento para la administración secuencial de dicho óxido nítrico y de dicho inhibidor de COX, en cualquier orden.

7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho medicamento está en forma de una composición que comprende dicho óxido nítrico y dicho inhibidor de ciclooxigenasa, para la administración simultánea de la misma.

8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho inhibidor de ciclooxigenasa se selecciona del grupo que consiste en diclofenaco; aceclofenaco; nabumetona; meloxicam; ácido meclofenámico; nimesulida; paracetamol; rofecoxib; celecoxib; DuP 697; GR 32191; flosulida; NS 398; L-745.337; DFU; HN-56249; JTE-552; aspirina; indometacina; e ibuprofeno; o sales de adición de ácidos de los mismos.

9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que NO está presente en dicho medicamento en una cantidad de 1-100 nmoles/min.

10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de NO a inhalar está en el intervalo de 1:180 ppm, preferiblemente 1-80 ppm, especialmente 1-40 ppm, estando presente dicho NO en un gas portador o en una mezcla de gases.

11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho dador de óxido nítrico se selecciona de S-nitroso-N-acetilpenicilamina, S-nitrosocisteína, nitroprusuro, nitrosoguanidina, trinitrato de glicerol, nitrito de isoamilo, nitrito inorgánico, azida e hidroxilamina.