



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 294 543**

(51) Int. Cl.:

A61K 33/00 (2006.01)

A61P 9/08 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04777982 .2**

(86) Fecha de presentación : **09.07.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1648475**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

(54) Título: **Uso de sales de nitrilo para el tratamiento de afecciones cardiovasculares.**

(30) Prioridad: **09.07.2003 US 485959 P**
14.10.2003 US 511244 P

(73) Titular/es: **THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES**
The National Institute of Health
Office of Technology Transfer, 6011 Executive Rockville, Maryland 20852, US
The Board of Supervisors of Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College;
University of Alabama Research Foundation;
Loma Linda University y
Wake Forest University

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

(72) Inventor/es: **Gladwin, Mark, T.; Schechter, Alan, N.; Lefer, David, J.; Patel, Rakesh, P.; Hunter, Christian J.; Power, Gordon, G.; Kim-Shapiro, Daniel, B.; Pluta, Ryszard; Oldfield, Edward, H. y Cannon III, Richard, O.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

(74) Agente: **Zea Checa, Bernabé**

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

Uso de las sales de nitrilo para el tratamiento de afecciones cardiovasculares.

5 Antecedentes de la descripción

En la última década se ha visto un incremento en la comprensión del papel crítico del óxido nítrico como dilatador de los vasos sanguíneos que contribuye a la regulación del flujo sanguíneo y a la homeostasis cardiovascular. El óxido nítrico puede oxidarse en la sangre a nitrito (NO_2^-), un anión que se considera un producto final metabólico inerte de esta oxidación del óxido nítrico. Se ha publicado que los niveles plasmáticos de nitrito *in vivo* varían de 150 a 1000 nM, y también se ha publicado que la concentración de nitrito en el tejido de los anillos aórticos es superior a 10.000 nM (Rodríguez *et al.*, Proc. Natl Acad Sci USA, 100, 336-41, 2003; Gladwin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 97, 9943-8, 2000; y Rassaf *et al.*, Nat Med, 9, 481-3, 2003). Esta posible reserva de almacenamiento potencial de NO es superior a la de los S-nitrosotioles plasmáticos, que según se ha publicado tienen una concentración por debajo de 10 nM en el plasma humano (Rassaf *et al.*, Nat Med., 9, 481-3, 2003; Rassaf *et al.*, Free Radic Biol Med, 33, 1590-6; 2002; Rassaf *et al.*, J Clin Invest, 109, 1241-8, 2002; y Schechter *et al.*, J Clin Invest, 109, 1149-54, 2002). Se han propuesto mecanismos para la conversión *in vivo* del nitrito en no, por ejemplo, mediante reducción enzimática por la xantina oxidoreductasa o por una reducción ácida/desproporcionación no enzimática (Millar *et al.*, Biochem Soc Trans, 25, 528S, 1997; Millar *et al.*, FEBS Lett, 427, 225-8, 1998; Godber *et al.*, J. Biol Chem, 275, 7757-63, 2000; Zhang *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 249, 767-72, 1998 [hay una errata en la publicación de Biochem Biophys Res Común 251, 667, 1998]; Li *et al.*, J Biol Chem, 276, 24482-9, 2001; Li *et al.*, Biochemistry, 42, 1150-9, 2003; Zweier *et al.*, Nat Med, 1, 804-9, 1995; Zweier *et al.*, Biochim Biophys Acta, 1411, 260-62, 1999; y Samouilov *et al.*, Arch Biochem Biophys, 357:1-7, 1998).

Se han observado gradientes de nitrito entre la sangre arterial y la venosa a lo largo del antebrazo humano en condiciones de reposo y durante la inhibición regional de la NO sintasa, aumentando el consumo de nitrito con el ejercicio (Gladwin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 97, 9943-8; 2000; Gladwin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 97, 11482-11487, 2000; y Cincinelli *et al.*, Clin Physiol, 19:440-2, 1999). Kelm y colaboradores han notificado que se forman grandes gradientes de nitrito entre la sangre arterial y la venosa a lo largo del antebrazo humano durante la inhibición de la NO sintasa (Lauer *et al.*, Proc. Natl Acad Sci USA, 98, 12814-9, 2001). A diferencia del caso más sencillo de extracción de oxígeno a través de un lecho vascular, el nitrito puede consumirse, como se demuestra por los gradientes entre la sangre arterial y la venosa durante la inhibición de la NO sintasa y el ejercicio, y producirse en el lecho vascular por las reacciones del NO mediadas por la óxido nítrico sintasa endotelial con el oxígeno.

Se ha indicado que, a altas concentraciones, el nitrito es un vasodilatador *in vitro* (Ignarro *et al.*, Biochim Biophys Acta, 631, 221-31, 1980; Ignarro *et al.*, J Pharmacol Exp Ther, 218, 739-49, 1981; Moulds *et al.*, Br J Clin Pharmacol, 11, 57-61, 1981; Gruetter *et al.*, J Pharmacol Exp Ther, 219, 181-6, 1981; Matsunaga *et al.*, J Pharmacol Exp Ther, 248, 687-98, 1989; y Laustiola *et al.*, Pharmacol Toxicol, 68, 60-3, 1991). Los niveles de nitrito que han demostrado tener un efecto vasodilatador *in vitro* siempre han sido superiores a 100.000 nM (100 μM) y normalmente a concentraciones milimolares. El documento WO 01/89572 describe el uso de nitrito sódico acidificado para administración tópica en el tratamiento de una serie de trastornos entre los que se incluyen la irritación de la piel y quemaduras.

Debido a las altas concentraciones de nitrito necesarias para producir un efecto vasodilatador *in vitro*, cuando Lauer y colaboradores introdujeron nitrito mediante infusión en la circulación del antebrazo de seres humanos, indicaron que no se producían efectos vasodilatadores, incluso a concentraciones de 200 μM en el antebrazo (Lauer *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 98, 12814-9, 2001). Lauer *et al.* indicaron que "la ausencia total de actividad vasodilatadora de las infusiones intraarteriales de nitrito descarta claramente cualquier papel de este metabolito en la liberación de NO" y concluyeron que "los niveles fisiológicos de nitrito carecen de actividad vasodilatadora". Además, Rassaf y colaboradores tampoco encontraron un efecto vasodilatador en seres humanos después de la infusión de nitrito (Rassaf *et al.*, J Clin Invest, 169, 1241-8, 2002). De esta manera, los estudios *in vivo* han concluido que los niveles fisiológicos de nitrito no sirven como fuente de NO y que los niveles fisiológicos de los nitritos no participan en la regulación de la presión sanguínea.

Históricamente, el nitrito se ha usado como tratamiento del envenenamiento con cianuro. Se introducen por infusión altas concentraciones en un sujeto que padece envenenamiento por cianuro para oxidar la hemoglobina a met-hemoglobina, la cual se une al cianuro. Estas altas concentraciones de nitrito producen una methemoglobinemia clínicamente significativa, reduciéndose de manera potencial la liberación de oxígeno. Aunque se ha demostrado que estas altas concentraciones de nitrito reducen la presión sanguínea en seres humanos, la cantidad de methemoglobina formada impedia el uso del nitrito en el tratamiento de otras patologías.

Por lo tanto, el estado de la técnica era que el nitrito no era un vasodilatador significativo a concentraciones inferiores a 100 μM *in vitro*, ni incluso cuando se introducía por infusión en seres humanos a concentraciones de 200 μM en el antebrazo. También era estado de la técnica que el nitrito no se convertía en óxido nítrico en la corriente sanguínea humana.

Descripción resumida de la invención

Se ha descubierto que, sorprendentemente, la administración de sales farmacéuticamente aceptables de nitrito es útil en la regulación del sistema cardiovascular. También se ha descubierto que, sorprendentemente, el nitrito se reduce a óxido nítrico *in vivo*, y que el óxido nítrico producido de esta manera es un vasodilatador eficaz. Estos efectos sorprendentemente se producen a dosis que no producen una methemoglobinemia clínicamente significativa. Estos descubrimientos ahora permiten desarrollar métodos para prevenir y tratar afecciones asociadas con el sistema cardiovascular, por ejemplo, una elevación de la presión sanguínea, hipertensión pulmonar, vasoespasio cerebral y lesión de tejidos por isquemia-reperfusión. Estos descubrimientos también proporcionan métodos para aumentar el flujo sanguíneo a los tejidos, por ejemplo, a tejidos en regiones de baja tensión de oxígeno. Es particularmente sorprendente que el nitrito no necesite administrarse en un estado acidificado para ser eficaz en la regulación del sistema cardiovascular, y más particularmente para actuar como vasodilatador *in vivo*.

Los inventores ahora han descubierto que, sorprendentemente, el nitrito puede servir como vasodilatador en seres humanos a concentraciones mucho menores (de tan sólo 0,9 μM) que las que se han usado en el pasado para el envenenamiento con cianuro. Se cree que el mecanismo implica una reacción del nitrito con la hemoglobina desoxigenada y con los glóbulos rojos sanguíneos, para producir el gas vasodilatador óxido nítrico. Este potente efecto biológico se observa a dosis de nitrito que no producen una methemoglobinemia clínicamente significativa (por ejemplo, menos del 20%, más preferiblemente menos del 5% de methemoglobina en el sujeto).

Se ha descubierto que el nitrito se convierte en óxido nítrico *in vivo* y que el óxido nítrico producido de esta manera es un vasodilatador eficaz. Además se ha descubierto que, sorprendentemente, la administración de nitrito, por ejemplo una sal farmacéuticamente aceptable de nitrito, a un sujeto produce una reducción en la presión sanguínea y un aumento en el flujo sanguíneo en tejidos, por ejemplo, en tejidos de regiones de baja tensión de oxígeno. Estos descubrimientos ahora permiten desarrollar métodos útiles para regular el sistema cardiovascular, por ejemplo para prevenir y tratar trastornos asociados con el sistema cardiovascular, por ejemplo, una elevación de la presión sanguínea, u órganos, tejidos o sistemas que tienen un flujo sanguíneo insuficiente o inadecuado. Ejemplos no limitativos de trastornos contemplados incluyen ictus, enfermedad cardiaca, enfermedad e insuficiencia renal, lesiones oftálmicas incluyendo retinopatía por hipertensión, diabetes y migrañas.

La presente invención proporciona usos como los definidos en las reivindicaciones.

Las características anteriores y otras características y ventajas serán más evidentes tras la siguiente descripción detallada de diversas realizaciones, que transcurre haciendo referencia a las figuras que se acompañan.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un gráfico que representa mediciones hemodinámicas y metabólicas basales y durante el ejercicio en 18 sujetos. La Figura 1A muestra los efectos sobre cada uno de los valores indicados sin inhibición de la síntesis de NO. La Figura 1B muestra los efectos con inhibición de la síntesis de NO, *clave*: MAP -presión arterial media, mmHg; FBF - flujo sanguíneo en el antebrazo, ml/min/100 ml; saturación de O₂, %; pO₂ - saturación de oxihemoglobina venosa, presión parcial de oxígeno, mmHg; pH, unidades; * = p <0,05 frente a Basal 1 ó 2, respectivamente; ** = p <0,01 frente a Basal 1 ó 2, respectivamente; † = p <0,05 frente a Basal 1; †† = p <0,01 frente a Ejercicio Inicial.

La Figura 2 es un gráfico que representa los efectos de la infusión de nitrito sódico en solución salina normal tamponada con bicarbonato en las arterias braquiales de 18 sujetos sanos. La Figura 2A muestra los efectos sobre cada uno de los valores indicados sin inhibición de la síntesis de NO. La Figura 2B muestra los efectos de la inhibición de la síntesis de NO. *Clave igual que en la Figura 1, más*: Nitrito - nitrito venoso, μM ; NO-hemo - hierro-nitrosil-hemoglobina venosa, μM ; y MetHb - methemoglobina venosa, %; + - p <0,01 frente a Ejercicio Inicial.

La Figura 3 es una serie de gráficos que ilustran los efectos de la infusión de una baja dosis de nitrito sódico en las arterias braquiales de 10 sujetos sanos en el punto basal y durante el ejercicio, sin y con inhibición de la síntesis de NO. La Figura 3A muestra el flujo sanguíneo en el antebrazo en el punto basal y después de una infusión de 5 minutos de NaNO₂. La Figura 3B muestra el flujo sanguíneo en el antebrazo con y sin una infusión de una baja dosis de nitrito en el punto basal y durante la infusión de L-NMMA con y sin estrés por ejercicio. La Figura 3C muestra los niveles venosos de nitrito en la circulación del antebrazo en el momento de las mediciones del flujo sanguíneo. La Figura 3D muestra los niveles venosos de S-nitroso-hemoglobina (S-NO) y hierro-nitrosil-hemoglobina (Hb-NO) en el punto basal y después de la infusión de nitrito durante el estrés por ejercicio.

La Figura 4 es un par de gráficos que muestran la formación de aductos de NO-hemoglobina. La Figura 4A muestra la formación de hierro-nitrosil-hemoglobina y S-nitroso-hemoglobina, comparando los valores basales con los valores obtenidos con la infusión de nitrito y con la infusión de nitrito con ejercicio. La Figura 4B compara la formación de aductos de NO-hemoglobina con la saturación de hemoglobina-oxígeno en la circulación humana, durante la infusión de nitrito.

La Figura 5A muestra la liberación de NO después de inyecciones de nitrito en soluciones de PBS ("PBS"), glóbulos rojos desoxigenados ("desoxi-RBC") y glóbulos rojos oxigenados ("oxi-RBC"). La Figura 5b muestra la

ES 2 294 543 T3

velocidad de formación de NO a partir de nitrito mezclado con PBS (primera barra de cada serie) y glóbulos rojos oxigenados y desoxigenados (segunda y tercera barra de cada serie, respectivamente).

La Figura 6 es una figura multipanel que muestra la terapia con nitrito en la lesión hepática por isquemia-reperfusión. La Figura 6A ilustra el protocolo experimental usado para el modelo murino de lesión hepática por isquemia-reperfusión. La Figura 6B es un gráfico que muestra los niveles séricos de AST en ratones después de una isquemia-reperfusión hepática. * p<0,05 frente a vehículo (0 μM) y ** p <0,01 frente a vehículo (0 μM). La Figura 6C es un gráfico que muestra los niveles séricos de ALT en ratones después de una isquemia-reperfusión hepática. * p <0,05 frente a vehículo (0 μM) y ** p <0,01 frente a vehículo (0 μM). La Figura 6D es una fotomicrografía representativa de una histopatología hepática después de 45 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión. La Figura 6E es un gráfico de barras que muestra la puntuación patológica de muestras de tejido hepático después de 45 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión. La Figura 6F es un gráfico de barras que muestra la apoptosis hepatocelular medida por tinción TUNEL después de 45 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión, ** p <0,001 frente al grupo de I/R solo.

La Figura 7 es una figura multipanel que muestra la terapia con nitrito en una lesión miocárdica por isquemia-reperfusión. La Figura 7A ilustra el protocolo experimental usado para los estudios de isquemia-reperfusión del miocardio en ratones. La Figura 7B es una fotomicrografía representativa de los corazones murinos después de 30 minutos de isquemia y reperfusión en el miocardio. La Figura 7C es un gráfico de barras que compara el área miocárdica con riesgo (AAR) por ventrículo izquierdo (LV), el tamaño de infarto (INF) por AAR, y el infarto por ventrículo izquierdo en ratones tratados con nitrato o nitrito. La Figura 7D es un gráfico de barras que compara la fracción de expulsión miocárdica basal y después de 45 minutos de isquemia de miocardio y 48 horas de reperfusión. La Figura 7E es un gráfico de barras que compara el acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo en el punto basal y después de 45 minutos de isquemia de miocardio y 48 horas de reperfusión.

La Figura 8 es una serie de gráficos que ilustran los niveles en sangre y en tejido hepático de nitrito, RSNO y RxNO. La Figura 8A muestra los niveles sanguíneos de nitrito, RSNO y RxNO ($\mu\text{mol/l}$) en animales (n = 3-5 por grupo) sometidos a isquemia-reperfusión hepática simulada (I/R) o isquemia hepática y 1 ó 30 minutos de reperfusión. ** p <0,001 frente al caso simulado. La Figura 8B muestra los niveles en tejido hepático de nitrito en ratones (n = 3-5 por grupo) sometidos a una lesión hepática por isquemia-reperfusión (I/R). La Figura 8C muestra los niveles de RSNO en tejido hepático ($\mu\text{mol/l}$) en ratones (n = 3-5 por grupo) sometidos a isquemia hepática y periodos variables de reperfusión. La Figura 8D muestra los niveles de RxNO en tejido hepático ($\mu\text{mol/l}$) después de una isquemia hepática y reperfusión en ratones (n = 3-5 por grupo).

La Figura 9 es una figura multipanel que ilustra la hepatoprotección mediada por nitrito y las rutas de señalización del óxido nítrico y la hemo-oxigenasa 1. La Figura 9A es un gráfico que compara los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST) en ratones que reciben vehículo salino, nitrito (24 μM), el “scavenger” de óxido nítrico (NO) PTIO, o nitrito (24 μM) + PTIO. ** p<0,01 frente al grupo de vehículo. La Figura 9B es un gráfico que compara los niveles séricos de AST en ratones deficientes en eNOS (-/-) que reciben un vehículo salino o nitrito sódico (24 μM). La Figura 9C es una imagen que muestra los niveles hepáticos de proteína hemo-oxigenasa 1 (HO-1) determinados usando análisis de transferencia western en animales operados de forma simulada y en animales sometidos a isquemia hepática (45 minutos) y reperfusión (5 horas). La Figura 9D es un gráfico que compara los niveles séricos de AST en ratones tratados con nitrito (24 μM) o el inhibidor de HO-1 zinc deuteroporfirina bis-glicol (ZnDPBG) en la situación de una lesión hepática por isquemia-reperfusión.

La Figura 10 es una serie de paneles que muestran los efectos de la inhalación del anión nitrito en corderos hipóxicos recién nacidos (n = 7) (Figura 10A) sobre mediciones hemodinámicas y metabólicas. Después de una mezcla de gas hipóxica ($\text{FiO}_2 = 0,12$) que se había iniciado a tiempo 0, el nitrito administrado por medio de un aerosol redujo la presión arterial pulmonar (PAP) desde los niveles hipóticos por $63 \pm 3\%$ ($P<0,01$ frente al punto basal hipótico) con un pequeño cambio en la presión arterial media (MAP), gasto cardíaco o niveles de methemoglobinina, pero con un aumento notable en el NO exhalado ($P<0,01$ en comparación con el punto basal). La Figura 10B ilustra el efecto de la inhalación de solución salina sobre la presión arterial pulmonar en corderos hipóxicos (n = 7). La Figura 10C es un gráfico multipanel que muestra los efectos máximos de la nebulización de nitrito en comparación con la nebulización de solución salina sobre PAP, MAP y el NO exhalado (eNO). Los datos son medias \pm SEM.

La Figura 11 ilustra los efectos de la inhalación de anión nitrito en corderos recién nacidos durante una hipertensión pulmonar normoxica estable ($\text{SaO}_2 \sim 99\%$) inducida por la infusión de un análogo endoperóxido de tromboxano (U46619) (n = 6). Después de iniciar la infusión de U46619 a tiempo 0, el nitrito administrado por medio de un aerosol redujo la presión arterial pulmonar (PAP) desde el nivel basal de infusión un $23 \pm 6\%$ ($P<0,05$ en comparación con el punto basal de infusión) sin un cambio medible en la presión arterial media (MAP) y con un aumento moderado en el NO exhalado ($P<0,01$ en comparación con el punto basal).

La Figura 12A compara el cambio en los valores de presión arterial pulmonar (PAP), NO exhalado y hierro-nitrosil-hemoglobina, medidos tanto por quimioluminiscencia como por resonancia paramagnética de electrones (EPR) después de la inhalación de nitrito en animales con hipertensión pulmonar inducida con hipoxia o infusión del análogo de tromboxano U46199. Los datos para la hierro- nitrosil-hemoglobina, medidos por áreas de picos de gasto después de quimioluminiscencia reductora basada en triyoduro (Figura 12B) y por profundidad del pico a 3350 Gaus en resonancia paramagnética electrónica (EPR) (Figura 12C; línea roja: inducido con fármaco, línea azul: hipótico) se midieron 20 minutos después iniciar la inhalación de nitrito. La Figura 12D muestra el cambio en la presión arterial

ES 2 294 543 T3

pulmonar media durante la hipoxia después de la inhalación de nitrito sódico nebulizado estaba relacionado con el pH sanguíneo, estando asociada una mayor vasodilatación con la reducción del pH ($r = 0,57$, $P = 0,055$). Los datos son medias \pm SEM.

- 5 La Figura 13 es una figura multipanel que muestra la duración del efecto de la inhalación de gas NO ($n = 7$) (Figura 13A) o la nebulización de nitrito ($n = 7$) (Figura 13B) sobre las mediciones hemodinámicas y metabólicas durante una hipertensión pulmonar inducida por hipoxia. El tratamiento con nitrito en aerosol produjo una rápida reducción sostenida en la vasoconstricción pulmonar inducida por hipoxia y un aumento graduado en la concentración de gas NO exhalado sin cambios en la presión sanguínea arterial media. Estos resultados se contrastan con el rápido 10 retorno de la presión arterial pulmonar al valor basal hipóxico después de terminar la inhalación del gas NO (Figura 13A). Las concentraciones de methemoglobin (Met Hb) aumentaron desde el nivel basal del $2,1 \pm 0,1\%$ al $2,8 \pm 0,2\%$ después de la nebulización de nitrito ($P < 0,05$). Debe tenerse en cuenta que las concentraciones de óxido nítrico exhalado en la Figura 13A alcanzan el límite de detección durante la administración de óxido nítrico inhalado (20 ppm). La Figura 13C muestra el cambio en la presión arterial pulmonar (PAP) después de la aerosolización de nitrito 15 nebulizado y durante la hora restante de hipoxia después de finalizar la nebulización de nitrito. La Figura 13D muestra las concentraciones en plasma arterial de nitrito durante el transcurso del experimento. La Figura 13E muestra la relación entre presión arterial pulmonar y NO exhalado después de la nebulización de nitrito durante la hipoxia. Los datos son medias \pm SEM.
- 20 La Figura 14 es una figura de múltiples columnas (paneles) que representa el diseño experimental y los resultados bioquímicos y clínicos en una serie de primates no humanos que recibieron nitrito intravenoso para examinar sus efectos sobre el desarrollo de vasoespasmos en las arterias cerebrales y la isquemia resultante. Cada una de las tres columnas representa un grupo experimental separado (control, baja concentración de nitrito y alta concentración de nitrito). Esta figura describe el diseño experimental (fila superior: las flechas que indican hacia abajo marcan los 25 acontecimientos; las flechas pequeñas que indican hacia arriba en la columna central representan las administraciones diarias de nitrito en bolo), los resultados bioquímicos (gráficos lineales: rojo, niveles de nitrito en sangre; azul, niveles de nitrito en CSF; verde, niveles de proteína nitrosilada/albúmina en CSF; el gráfico de barras de color marrón representa los niveles de methemoglobin en sangre) y la presión sanguínea media (el último gráfico en barras grises) en muestras recogidas durante el experimento.
- 30 La Figura 15 presenta arteriogramas cerebrales característicos antes de SAH (día 0 (antes de la infusión); Figura 15A, 15C) y en el día 7 después de SAH (Figura 15B, 15D) en dos animales: un control tratado con infusión intravenosa de solución salina a $2 \mu\text{l}/\text{min}$ durante 14 días (Figura 15A, 15B) y otro tratado con nitrito intravenoso a $870 \mu\text{mol}/\text{min}$ durante 14 días (Figura 15C, 15D). En la Figura 15B, las flechas apuntan a la arteria cerebral media derecha (R MCA) en el espasmo. R ICA, la arteria carótida interna derecha, R ACA la arteria cerebral anterior derecha.
- 35 La Figura 16 representa el grado de vasoespasio en la arteria cerebral media derecha (R MCA) en cada animal de todos los grupos experimentales (8 controles, 3 de baja dosis y 3 de alta dosis de nitrito). El vasoespasio R MAC se evaluó como el área del segmento de 14 mm proximal de la MCA derecha por tres examinadores siguiendo un diseño 40 ciego usando un sistema de análisis de imágenes informatizado (NHI Image 3.21). El vasoespasio arteriográfico se cuantificó con respecto a cada arteriograma basal de los animales. Los valores medios para los grupos de solución salina frente a nitrito se representan por los círculos; las barras representan desviaciones típicas. Significado estadístico $p < 0,001$.

45 Descripción detallada de la descripción

I. Abreviaturas

ANOVA	análisis de varianza
Carboxi-PTIO	2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido de potasio
DCV	vasoespasio cerebral retardado
Desoxi-RBC	glóbulos rojos desoxigenados
eNOS	NO sintasa endotelial
FiO ₂	concentración fraccional de oxígeno inspirado
FBF	flujo sanguíneo en el antebrazo
iNO	óxido nítrico inhalado
I/R	isquemia-reperfusión
LCA	arteria coronaria principal

ES 2 294 543 T3

	L-NMMA	L-NG-monometil-arginina
	LV	ventrículo izquierdo
5	NO	óxido nítrico
	NOS	óxido nítrico sintasa
10	MAP	presión arterial media
	MetHb	methemoglobinina
	Oxi-RBC	glóbulos rojos oxigenados
15	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	pO ₂ (o PO ₂)	presión parcial de oxígeno
20	SAH	hemorragia subaracnoidea
	S-NO	S-nitroso-hemoglobina.

II. Términos

25 A menos que se indique otra cosa, los términos usados en el presente documento deben estar de acuerdo con sus definiciones convencionales y su uso convencional. Por ejemplo, un experto en la materia puede obtener definiciones para los términos usados en este documento en diccionarios y libros de texto de referencia, por ejemplo: Stedman's Medical Dictionary (26th Ed., Williams and Wilkins, Editor M. Sparycar, 1995); The New Oxford American Dictionary (Oxford University Press, Eds E. Jewell and F. Abate, 2001); Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); y Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 11th Ed. (Eds. N.I. Sax and R. J. Lewis, Sr., Van Nostrand Reinhold, New York, New York, 1987); Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Referente (VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)).

35 Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Animal: organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves. El término mamíferos incluye tanto mamíferos no humanos como humanos.

40 *Isquemia cerebral o ictus isquémico:* una patología que se produce cuando una arteria que se dirige o que está en el cerebro se bloquea parcial o completamente de tal forma que la demanda de oxígeno del tejido supera al oxígeno suministrado. Al verse privado de oxígeno y de otros nutrientes después de un ictus isquémico, el cerebro se daña como resultado del ictus.

45 Un ictus isquémico puede producirse por varios tipos diferentes de enfermedades. El problema más común es el estrechamiento de las arterias en el cuello o en la cabeza. La mayoría de las veces esto se produce por aterosclerosis o deposición gradual de colesterol. Si las arterias se estrechan demasiado, pueden acumularse glóbulos rojos en ellas y pueden formarse coágulos sanguíneos (trombos). Estos coágulos sanguíneos puede bloquear la arteria en la que se forman (trombosis) o pueden desprenderse y quedar atrapados en arterias más próximas al cerebro (embolia).

50 Otra causa de ictus son los coágulos sanguíneos en el corazón, que pueden producirse como resultado de un latido cardiaco irregular (por ejemplo, fibrilación auricular), un ataque cardiaco o anomalías en las válvulas cardíacas. Aunque éstas son las causas más comunes del ictus isquémico, hay otras muchas causas posibles. Los ejemplos incluyen el uso de drogas, lesiones traumáticas en los vasos sanguíneos del cuello o trastornos de la coagulación sanguínea.

60 El ictus isquémico es, con mucho, el tipo de ictus más común, representando aproximadamente el 80% de todos los ictus. El ictus puede afectar a personas de todas las edades, incluyendo niños. Muchas personas con ictus isquémicos son ancianos (de 60 o más años), y el riesgo de ictus aumenta al aumentar la edad. En todas las edades el ictus es más común en hombres que en mujeres, y es más común entre afroamericanos que en los americanos blancos. Muchas personas con ictus tienen otros problemas o afecciones que hace que tengan un mayor riesgo de ictus, tales como una elevada presión sanguínea (hipertensión), enfermedad cardiaca, hábito de fumar o diabetes.

65 *Fetal:* un término que describe el periodo de tiempo en la última parte del embarazo cuando los sistemas de órganos son funcionales y están establecidos los patrones de flujo sanguíneo para órganos críticos centrales tales como el corazón, el cerebro y los pulmones.

ES 2 294 543 T3

Hipoxia: deficiencia en la cantidad de oxígeno que alcanza los tejidos corporales.

- 5 *Composición inyectable:* una composición fluida farmacéuticamente aceptable que comprende al menos un ingrediente activo, por ejemplo, una sal de nitrato. El ingrediente activo normalmente se disuelve o suspende en un vehículo fisiológicamente aceptable, y la composición además puede comprender cantidades minoritarias de una o más sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes emulsionantes, conservantes, agentes tamponantes del pH y similares. Estas composiciones inyectables que son útiles para uso con las composiciones de esta descripción son convencionales; las formulaciones apropiadas son bien conocidas en la técnica.
- 10 *Isquemia:* un fenómeno vascular en el que se produce una reducción en el suministro de sangre a un órgano, tejido o parte del cuerpo, por ejemplo, por constricción u obstrucción de uno o más vasos sanguíneos. Algunas veces la isquemia se produce por vasoconstricción, trombosis o embolia. La isquemia puede producir una lesión isquémica directa, lesión tisular debida a la muerte celular producida por una reducción del suministro de oxígeno.
- 15 *Lesión por isquemia/reperfusión:* además de la lesión inmediata que se produce durante la privación del flujo sanguíneo, la lesión por isquemia/reperfusión implica lesiones tisulares que se producen después de restaurar el flujo sanguíneo. Actualmente se cree que gran parte de esta lesión es producida por productos químicos y radicales libres liberados en los tejidos isquémicos.
- 20 Cuando un tejido se somete a isquemia, se inicia una secuencia de sucesos químicos que finalmente pueden ocasionar una disfunción celular y necrosis. Si la isquemia termina por la restauración del flujo sanguíneo, va seguida de una segunda serie de sucesos perjudiciales que producen lesiones adicionales. De esta manera, cuando hay una reducción transitoria o interrupción del flujo sanguíneo en un sujeto, la lesión resultante implica dos componentes - la lesión directa que se produce durante el intervalo isquémico y la lesión indirecta o de reperfusión que se produce posteriormente. 25 Cuando la isquemia tiene una larga duración predomina la lesión isquémica directa, debida a la hipoxia. Para una isquemia con una duración relativamente corta, la lesión mediada por reperfusión o indirecta se vuelve cada vez más importante. En algunos casos, la lesión producida por la reperfusión puede ser más severa que la lesión inducida por la propia isquemia. Se ha demostrado que este patrón de contribución relativa de lesiones por mecanismos directos e indirectos se produce en todos los órganos.
- 30 *Methemoglobina:* la forma oxidada de la hemoglobina en la que el hierro del componente hemo se ha oxidado desde el estado ferroso (+2) al estado férrico (+3). Esto hace que la molécula de hemoglobina sea incapaz de transportar y liberar eficazmente oxígeno a los tejidos. Normalmente, hay aproximadamente un 1% de hemoglobina total en forma de methemoglobina.
- 35 *Methemoglobinemia:* una afección en la que una parte sustancial de la hemoglobina de la sangre de un sujeto está en forma de methemoglobina, de manera que no puede llevar oxígeno de manera eficaz a los tejidos. La methemoglobinemia puede ser un trastorno hereditario, pero también puede adquirirse por exposición a agentes químicos tales como nitratos (agua contaminada con nitrato), colorantes de anilina y clorato potásico. No es la presencia de 40 methemoglobina, sino la cantidad, lo que es importante en una situación clínica. A continuación se proporcionan indicaciones generales de síntomas asociados con diferentes niveles de methemoglobina en la sangre: <1,7%, normal; 10-20%, cianosis leve (sustancialmente asintomática, aunque puede hacer que la sangre adquiera un color "marrón chocolate"); 30-40%, dolor de cabeza, fatiga, taquicardia, debilidad, desvanecimientos; >35%, síntomas de hipoxia tales como disnea y letargia; 50-60%, acidosis, arritmias, coma, convulsiones, bradicardia, hipoxia severa, ataques; 45 >70% normalmente produce muerte.
- Neonato: un término que describe el organismo humano o animal en el periodo de tiempo después del nacimiento y que se extiende hasta que se completan los ajustes desde la vida fetal a la vida del recién nacido.
- 50 *Nitrito:* el anión inorgánico NO_2^- o una sal de ácido nitroso (NO_2). Los nitratos a menudo son muy solubles y pueden oxidarse para formar nitratos o reducirse para formar óxido nítrico o amoniaco. El nitrato puede formar sales con metales alcalinos tales como sodio (NaNO_2 , que también se conoce como sal sódica del ácido nitroso), potasio y litio, con metales alcalinotérreos tales como calcio, magnesio y bario, y con bases orgánicas tales como bases de amina, por ejemplo diciclohexilamina, piridina, arginina, lisina y similares. Otras sales de nitrato pueden formarse a partir de una diversidad de bases orgánicas e inorgánicas. En realizaciones particulares, el nitrato es una sal de un nitrito aniónico administrado con un catión, seleccionándose dicho catión entre sodio, potasio y arginina. Muchas sales de nitrato están disponibles en el mercado y/o se producen fácilmente usando técnicas convencionales.
- 55 *Parenteral:* administrado fuera del intestino, por ejemplo, por una vía distinta del tracto digestivo. En general, las formulaciones parenterales son las que se administran de cualquier modo posible excepto la ingestión. Este término se refiere especialmente a inyecciones administradas por vía intravenosa, intratecal, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, y a diversas aplicaciones superficiales, incluyendo, por ejemplo, la aplicación intranasal, intradérmica y tópica.
- 60 *Vehículos farmacéuticamente aceptables:* los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles en esta descripción son convencionales. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa, 15th Edition (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de los compuestos descritos en este documento.

ES 2 294 543 T3

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo de administración particular que se vaya a emplear. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptable tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares, como vehículos. En el caso de las composiciones sólidas (por ejemplo, en forma de polvo, 5 píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico o monolaurato de sorbitán.

10 *Enfermedad vascular periférica (PVD)*: una afección en la que las arterias que llevan sangre a los brazos o piernas se estrechan u obstruyen. Esto interfiere con el flujo sanguíneo normal, produciendo algunas veces dolor pero sin causar a menudo síntomas fácilmente detectables.

15 La causa más común de PVD es la aterosclerosis, un proceso gradual en el que se acumulan colesterol y tejido cicatricial, formando placas que obstruyen los vasos sanguíneos. En algunos casos, la PVD puede producirse por coágulos sanguíneos que se alojan en las arterias y restringen el flujo sanguíneo. La PVD afecta a aproximadamente una de cada 20 personas a la edad de 50 años, o a 8 millones de personas en los Estados Unidos. Más de la mitad de las personas con PVD experimentan dolor o entumecimiento de las piernas y otros síntomas, pero muchas personas 20 hacen caso omiso de estos signos considerándolos "una parte normal del envejecimiento" y no buscan ayuda médica. El síntoma más común de la PVD es un calambre doloroso en la pierna o en la cadera, particularmente cuando se camina. Este síntoma, también conocido como "claudicación", se produce cuando no hay suficiente flujo de sangre para los músculos de las piernas durante el ejercicio de tal forma que se produce una isquemia. El dolor típicamente desaparece cuando los músculos están en reposo.

25 Otros síntomas pueden incluir entumecimiento, hormigueo o debilidad en las piernas. En casos severos, las personas con PVD pueden experimentar un dolor urente o intenso en una extremidad, tal como en el pie o en los dedos de los pies aunque estén en reposo, o pueden desarrollar una llaga en la pierna o en el pie que no se cura. Las personas con PVD también pueden experimentar un enfriamiento o cambio de color en la piel de las piernas o los pies, o pérdida 30 de pelo en las piernas. En casos extremos, la PVD no tratada puede conducir a una gangrena, una afección grave que puede requerir la amputación de una pierna, pie o dedos de los pies. Las personas con PVD también tienen un mayor riesgo de enfermedad cardiaca e ictus.

35 Un "agente farmacéutico" o "fármaco" se refiere a un compuesto químico u otra composición que puede inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado cuando se administra de manera apropiada a un sujeto.

40 *Placenta*: un órgano vascular que hace que se produzca el intercambio metabólico entre la madre y el feto en mamíferos. Libera oxígeno, agua y nutrientes al feto desde la sangre de la madre y secreta las hormonas necesarias para un embarazo con éxito. Además, lleva los residuos procedentes del feto a procesar en el cuerpo de la madre.

45 *Preeclampsia*: una enfermedad de causa desconocida en mujeres embarazadas, caracterizada por hipertensión, vasos sanguíneos anómalos en la placenta y proteínas en la orina. Con frecuencia, pero no siempre, se produce con diabetes gestacional o en pacientes diabéticas. Otros síntomas pueden incluir retención de agua, que conduce a un hinchamiento de la cara, manos y pies, y un mayor aumento de peso. También se denomina toxemia. La preeclampsia puede derivar en eclampsia si no se trata. La única cura conocida para la preeclampsia es el nacimiento del niño.

50 *Prevención o tratamiento de una enfermedad*: "prevención" de una enfermedad se refiere a la inhibición del desarrollo completo de una enfermedad. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o patología después de que haya empezado a desarrollarse.

55 *Purificado*: el término purificado no requiere una pureza absoluta; en su lugar, debe entenderse como un término relativo. De esta manera, por ejemplo, una preparación de sal de nitrito purificada es una preparación en la que la sal de nitrito especificada está más enriquecida que en su medio de generación, por ejemplo dentro de una cámara de reacción bioquímica. Preferiblemente, una preparación de una sal de nitrito especificada se purifica de tal forma que la sal represente al menos un 50% del contenido total de nitrito de la preparación. En algunas realizaciones, una preparación purificada contiene al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% y al menos un 95% o más del compuesto especificado, tal como una sal de nitrito particular.

60 *Reperfusión*: restauración del suministro de sangre a un tejido que es isquémico debido a la reducción del suministro de sangre. La reperfusión es un procedimiento para tratar el infarto u otra isquemia, permitiendo que el tejido isquémico viable se recupere y limitando de esta manera necrosis adicionales. Sin embargo, se cree que la propia reperfusión puede dañar el tejido isquémico, produciendo lesión por reperfusión.

65 *Sujeto*: organismos multicelulares vivos, incluyendo organismos vertebrados, una categoría que incluye tanto seres humanos como mamíferos no humanos.

Terapéutico: un término genérico que incluye tanto el diagnóstico como el tratamiento.

5 *Cantidad terapéuticamente eficaz de [un vasodilatador]:* una cantidad de compuesto, tal como una sal de nítrito, suficiente para conseguir un efecto deseado en un sujeto que se está tratando. Por ejemplo, puede ser la cantidad necesaria para tratar o mejorar una presión sanguínea relativamente elevada, o para reducir de forma medible la presión sanguínea durante un periodo de tiempo, o para inhibir de forma medible un aumento en la presión sanguínea, en un sujeto.

10 Una cantidad eficaz de un vasodilatador puede administrarse en una sola dosis, o en varias dosis, por ejemplo diariamente, durante un curso de tratamiento. Sin embargo, la cantidad eficaz será dependiente del compuesto aplicado, el sujeto a tratar, la gravedad y tipo de afección y la forma de administración del compuesto. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un ingrediente activo puede medirse como la concentración (moles por litro o molar - M) del ingrediente activo (tal como una sal farmacéuticamente aceptable de nítrito) en la sangre (*in vivo*) o un tampón (*in vitro*) que produce un efecto.

15 A modo de ejemplo, como se describe en este documento, ahora se ha demostrado que las sales farmacéuticamente aceptables de nítrito (tales como el nítrito sódico) son eficaces como vasodilatadores a dosificaciones calculadas de concentración final de nítrito de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 200 μM en la sangre circulante de un sujeto, pudiendo determinarse estos niveles empíricamente o a través de cálculos. Los niveles específicos pueden alcanzarse, por ejemplo, proporcionando menos de aproximadamente 200 mg o menos de nítrito en una sola dosis, o proporcionando la dosis durante un periodo de tiempo (por ejemplo, por infusión o inhalación). Por ejemplo, otras 20 dosificaciones pueden ser de 150 mg, 100 mg, 75 mg, 50 mg o menos. En este documento se proporcionan ejemplos de dosis específicas de sales de nítrito, aunque los ejemplos no pretenden ser limitantes. Las cantidades de dosificación exactas pueden variar en función de las dimensiones del sujeto que se va a tratar, la duración del tratamiento, el modo de administración y similares.

25 Son cantidades terapéuticamente eficaces particularmente beneficiosas de un vasodilatador, tal como una sal de nítrito farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, nítrito sódico), las que son eficaces para conseguir una vasodilatación o para aumentar el flujo sanguíneo, pero no tanto como para producir un nivel significativo o tóxico de methemoglobina en el sujeto al que se administra el vasodilatador. En realizaciones específicas, por ejemplo, no se produce más de aproximadamente un 25% de methemoglobina en el sujeto. Más preferiblemente, no se produce más de un 20%, 30 no más de un 15%, no más de un 10%, no más de un 8% o un porcentaje menor de methemoglobina, por ejemplo, tan bajo como 5% o un 3% o menos, en respuesta al tratamiento con el vasodilatador.

35 Los compuestos descritos en este documento tienen la misma aplicación en situaciones médicas y veterinarias. Por lo tanto, se entiende que la expresión general "sujeto que se va a tratar" incluye todos los animales (por ejemplo, seres humanos, simios, animales de laboratorio, animales de compañía, etc.) que padecen o pueden padecer una anomalía en la presión sanguínea, tal como hipertensión.

40 *Vasoconstricción:* la disminución del calibre o área transversal de un vaso sanguíneo, por ejemplo la constricción de arteriolas que ocasiona una reducción del flujo sanguíneo en una parte del cuerpo. Esto puede producirse por un vasoconstrictor específico, un agente (por ejemplo, un compuesto químico o bioquímico) que produce, directa o indirectamente, constricción de vasos sanguíneos. Este agente puede denominarse también agente vasohipertónico, y se dice que tiene actividad vasoconstrictora. Una categoría representativa de vasoconstrictores es el vasopresor (del término presor, que tiende a aumentar la presión sanguínea), usándose este término generalmente para hacer referencia a un agente que estimula la contracción del tejido muscular de los capilares y las arterias.

45 La vasoconstricción también puede deberse a un vasoespasmo, a una vasodilatación inadecuada, al espesamiento de la pared de los vasos o a la acumulación de materiales que restringen el flujo en las superficies de las paredes internas o dentro de la propia pared. La vasoconstricción es un factor importante, presunto o probado, en el envejecimiento y en diversas patologías que incluyen aterogénesis generalizada progresiva, infarto de miocardio, ictus, hipertensión, 50 glaucoma, degeneración macular, migraña, hipertensión y diabetes mellitus, entre otras.

55 *Vasodilatación:* un estado en el que está aumentado el calibre de los vasos sanguíneos, o la acción de dilatación de un vaso sanguíneo, por ejemplo la dilatación de las arteriolas que conduce a un aumento del flujo sanguíneo en una parte del cuerpo. Puede producirse por un vasodilatador específico, un agente (por ejemplo, un compuesto químico o bioquímico) que produce, directa o indirectamente, dilatación de los vasos sanguíneos. Este agente también puede denominarse agente vasohipotónico, y se dice que tiene actividad vasodilatadora.

60 *Vasoespasmo:* otra causa de ictus se produce secundariamente al espasmo de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro. Este tipo de ictus típicamente sigue a una hemorragia subaracnoidea aneurismática con un retraso del desarrollo del vasoespasmo en las 2-3 semanas posteriores al suceso hemorrágico. Un tipo similar de ictus puede complicar la anemia de células falciformes.

65 A menos que se explique de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que se entienden comúnmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Los términos singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. De forma similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, "que comprende A o B" significa que incluye A, o B, o A y B. Además debe entenderse que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o de masa

ES 2 294 543 T3

molecular dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan con fines descriptivos. En caso de conflicto tendrá preferencia la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de términos.

III. Visión general de varias realizaciones

5 Sorprendentemente, se ha descubierto que la administración de sales de nitrito farmacéuticamente aceptables es útil en la regulación del sistema cardiovascular. También se ha descubierto que, sorprendentemente, el nitrito se reduce a óxido nítrico *in vivo* y que el óxido nítrico producido de esta manera es un vasodilatador eficaz. Sorprendentemente, estos efectos se producen a dosis que no producen methemoglobinemia de una forma clínicamente significativa. Estos 10 descubrimientos ahora permiten desarrollar métodos para prevenir y tratar afecciones asociadas con el sistema cardiovascular, por ejemplo, una elevada presión sanguínea, hipertensión pulmonar, vasoespasmo cerebral y lesión tisular por isquemia-reperfusión. Estos descubrimientos también proporcionan métodos para aumentar el flujo sanguíneo en los tejidos, por ejemplo, en tejidos en regiones de baja tensión de oxígeno. Es particularmente sorprendente que el 15 nitrito no tenga que aplicarse en un estado acidificado para que sea eficaz en la regulación del sistema cardiovascular, y más particularmente para actuar como un vasodilatador *in vivo*.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona un uso como se define en la reivindicación 1. El medicamento puede ser para la administración al sujeto a aproximadamente 36 μ moles por minuto o menos en la arteria braquial del antebrazo o por vía intravenosa.

20 El medicamento es útil en un método para reducir la presión sanguínea de un sujeto, incluyendo la administración al sujeto de una cantidad eficaz de nitrito farmacéuticamente aceptable para reducir (o disminuir o rebajar) la presión sanguínea del sujeto. El medicamento también es útil en un método para tratar a un sujeto que tiene una afección 25 asociada con una elevación de la presión sanguínea, que incluye la administración al sujeto de una cantidad eficaz de nitrito farmacéuticamente aceptable para tratar al menos una complicación vascular asociada con la elevación de la presión sanguínea. También es útil en un método para tratar a un sujeto que tiene una afección hemolítica, que incluye la administración al sujeto de una cantidad eficaz de nitrito farmacéuticamente aceptable para tratar al menos una complicación vascular asociada con la afección hemolítica.

30 El medicamento es útil en un método para aumentar el flujo sanguíneo en un tejido de un sujeto, que incluye la administración al sujeto de una cantidad eficaz de nitrito farmacéuticamente aceptable para aumentar el flujo sanguíneo en el tejido del sujeto. También, es útil en un método para producir una cantidad de NO eficaz en un sujeto para reducir la presión sanguínea del sujeto, que incluye la administración de un nitrito farmacéuticamente aceptable al sujeto.

35 La presente descripción describe además una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un nitrito farmacéuticamente aceptable y un vehículo.

Una complicación vascular es una o más seleccionadas entre el grupo que consiste en hipertensión pulmonar (que 40 incluye hipertensión pulmonar neonatal, hipertensión pulmonar primaria e hipertensión pulmonar secundaria), hipertensión sistémica, ulceración cutánea, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, trombosis intravascular, un suceso isquémico del sistema nervioso central y muerte.

45 En algunas realizaciones, los medicamentos son para la administración a neonatos para tratar la hipertensión pulmonar.

Una afección hemolítica incluye una o más seleccionadas entre: anemia de células falciformes, talasemia, enfermedad de hemoglobina C, enfermedad de hemoglobina SC, talasemia de células falciformes, esferocitosis hereditaria, eliptocitosis hereditaria, ovalcitosis hereditaria, deficiencia en glucosa-6-fosfato y otras deficiencias enzimáticas de 50 glóbulos rojos, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), criohemoglobinuria paroxística (PCH), púrpura trombocitopénica trombótica/síndrome urémico hemolítico (TTP/HUS), anemia hemolítica autoinmune idiopática, anemia hemolítica inmune inducida por fármacos, anemia hemolítica inmune secundaria, anemia hemolítica no inmune producida por agentes químicos o físicos, malaria, malaria falciparum, bartonelosis, babesiosis, infección por clostridios, infección grave por *haemophilus influenzae* de tipo b, quemaduras importantes, reacción a una transfusión, rabdomiolisis (mioglobinemia), transfusión de sangre envejecida, bypass cardiopulmonar y hemodiálisis.

La reducción del flujo sanguíneo en el tejido se produce directa o indirectamente por al menos una de las siguientes afecciones: anemia de células falciformes, talasemia, enfermedad de hemoglobina C, enfermedad de hemoglobina SC, talasemia de células falciformes, esferocitosis hereditaria, eliptocitosis hereditaria, ovalcitosis hereditaria, deficiencia en glucosa-6-fosfato y otras deficiencias enzimáticas de glóbulos rojos, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), criohemoglobinuria paroxística (PCH), púrpura trombocitopénica trombótica/síndrome urémico hemolítico (TTP/HUS), anemia hemolítica autoinmune idiopática, anemia hemolítica inmune inducida por fármacos, anemia hemolítica inmune secundaria, anemia hemolítica no inmune producida por agentes químicos o físicos, malaria, malaria falciparum, bartonelosis, babesiosis, infección por clostridios, infección grave por *haemophilus influenzae* de tipo b, quemaduras importantes, reacción a una transfusión, rabdomiolisis (mioglobinemia), transfusión de sangre envejecida, transfusión de hemoglobina, transfusión de glóbulos rojos, bypass cardiopulmonar, enfermedad coronaria, síndrome isquémico cardíaco, angina, hemólisis iatrogénica, angioplastia, isquemia de miocardio, isquemia tisular, hemólisis producida por dispositivos intravasculares, hemodiálisis, hipertensión pulmonar, hipertensión sistémica, ulceración

cutánea, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, trombosis intravascular y un suceso isquémico en el sistema nervioso central.

El tejido puede ser un tejido isquémico. El medicamento puede ser para administración parenteral, oral, bucal, rectal, *ex vivo* o intraocular. La administración puede ser peritoneal, intravenosa, intraarterial, subcutánea, por inhalación o intramuscular. En algunas realizaciones, los medicamentos son para la administración al sujeto en un medio de baja tensión de oxígeno, o para que actúen en un área del cuerpo del sujeto que presenta una tensión de oxígeno relativamente baja. En algunas realizaciones, el nitrito es para la administración como una sal de nitrito farmacéuticamente aceptable tal como, por ejemplo, nitrito sódico, nitrito potásico o nitrito de arginina. En algunas realizaciones, el nitrito es para la administración en combinación con un agente activo adicional. Específicamente se contempla que, en ciertas realizaciones, el sujeto es un mamífero, por ejemplo un ser humano.

La descripción además proporciona el uso como se define en la reivindicación 1, donde el medicamento es para el tratamiento de un sujeto que tiene hipertensión pulmonar, incluyendo para la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un nitrito farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, esto incluye el tratamiento de un sujeto que tiene hipertensión pulmonar neonatal. En algunas realizaciones, esto incluye el tratamiento de un sujeto que tiene hipertensión pulmonar primaria y/o secundaria. En algunas realizaciones para tratar sujetos que tienen una afección asociada con una presión sanguínea elevada en los pulmones, el nitrito se nebuliza.

La descripción también proporciona sugerencias de un medio para tratar la hipertensión y/o preeclampsia en mujeres embarazadas. Esta terapia incluiría la acción de nitritos en vasos sanguíneos espásticos y enfermos dentro de la placenta.

La descripción también proporciona la sugerencia del tratamiento, en el útero, de anomalías cardiovasculares, hipertensión y/o un flujo sanguíneo mal dirigido. En estas estrategias, el nitrito puede administrarse por introducción en la cavidad amniótica directamente o por medio de minibombas osmóticas, esto último para conseguir la liberación sostenida a lo largo de días y semanas de embarazo.

De esta manera, en el presente documento se describe un método para inducir vasodilatación y/o aumentar el flujo sanguíneo en un sujeto, implicando dicho método administrar al sujeto una cantidad eficaz de una sal farmacéuticamente aceptable de nitrito durante un periodo de tiempo suficiente para inducir la vasodilatación y/o aumentar el flujo sanguíneo en el sujeto. Los ejemplos no limitantes de sales de nitrito farmacéuticamente aceptables incluyen nitrito sódico, nitrito potásico y nitrito de arginina. En ejemplos de los métodos descritos, la sal farmacéuticamente aceptable de nitrito reacciona en forma de hemoglobina en el sujeto para liberar óxido nítrico.

Es una ventaja específica de los métodos descritos en este documento, el hecho de que la cantidad eficaz de la sal de nitrito farmacéuticamente aceptable administrada al sujeto no induzca niveles tóxicos de methemoglobin y, en muchas realizaciones, no induzca la formación de cantidades clínicamente significativas de methemoglobin en el sujeto. Por lo tanto, en el presente documento se describen métodos en los que la cantidad eficaz de la sal de nitrito farmacéuticamente aceptable, cuando se administra al sujeto, induce la producción en el sujeto de no más de aproximadamente un 25% de methemoglobin, no más de aproximadamente un 20% de methemoglobin; no más de aproximadamente un 10% de methemoglobin; no más de aproximadamente un 8% de methemoglobin; o no más de aproximadamente un 5% de methemoglobin. De forma beneficiosa, los ejemplos de los métodos descritos inducen la producción de incluso menos de un 5% de methemoglobin, por ejemplo no más de aproximadamente un 3% de methemoglobin, menos de un 3%, menos de un 2%, o incluso menos de un 1%.

En un método específico descrito en este documento para reducir la vasodilatación y/o aumentar el flujo sanguíneo en un sujeto, el nitrito sódico se administra por inyección a aproximadamente 36 μ moles por minuto durante al menos cinco minutos en la arteria braquial del antebrazo del sujeto.

La cantidad eficaz de la sal farmacéuticamente aceptable de nitrito es para la administración, en diversas realizaciones, en una concentración circulante en el sujeto de aproximadamente 0,6 a 240 μ M, medida localmente en el sitio de administración o de forma general en el sujeto. Debe indicarse que es de esperar que el nivel local de nitrito sea mayor que el nivel circulante general, particularmente en regímenes de administración cortos; en los regímenes de administración a largo plazo, tales como la administración usando una bomba o inyector, o por inhalación, es de esperar que el nivel de nitrito general o sistémico se aproxime al nivel medido cerca del sitio de administración.

La administración del nitrito farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, parenteral, oral, bucal, rectal *ex vivo* o intraocular en ciertas realizaciones. En diversas realizaciones, también se contempla que el medicamento puede ser para administración peritoneal, intravenosa, intraarterial, subcutánea, inhalado, intramuscular o en un circuito de bypass cardiopulmonar. También se contemplan combinaciones de dos o más vías de administración.

En diversas realizaciones del uso definido en las reivindicaciones, el sujeto es un mamífero. Se contempla particularmente que el sujeto puede ser un ser humano.

Se contemplan métodos de terapia combinada donde el nitrito se administra en combinación con al menos un agente adicional. A modo de ejemplo no limitante, el agente adicional es uno o más seleccionados entre la lista que consiste en penicilina, hidroxiurea, butirato, clotrimazol, arginina o un inhibidor de fosfodiesterasa (tal como sildenafil).

ES 2 294 543 T3

También se describe un método para inducir vasodilatación y/o aumentar el flujo sanguíneo en un sujeto, donde el sujeto tiene una presión sanguínea elevada y el método es un método para tratar al menos una complicación vascular asociada con la presión sanguínea elevada, o el sujeto tiene una afección hemolítica y el método es un método para tratar al menos una complicación vascular asociada con la afección hemolítica. Opcionalmente, el sujeto puede tener tanto una presión sanguínea elevada como una afección hemolítica.

En los ejemplos de los métodos descritos en este documento, la al menos una complicación vascular es una o más seleccionadas entre el grupo que consiste en hipertensión pulmonar, hipertensión sistémica, enfermedad vascular periférica, traumatismo, paro cardiaco, cirugía general, transplante de órganos, ulceración cutánea, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, trombosis intravascular, angina, un suceso de isquemia/reperfusión, un suceso isquémico en el sistema nervioso central y muerte.

En los métodos descritos en este documento en los que el sujeto tiene una afección hemolítica, la afección hemolítica es una o más seleccionadas entre el grupo que consiste en anemia de células falciformes, talasemia, enfermedad de hemoglobina C, enfermedad de hemoglobina SC, talasemia de células falciformes, esferocitosis hereditaria, eliptocitosis hereditaria, ovalcitosis hereditaria, deficiencia en glucosa-6-fosfato y otras deficiencias enzimáticas de glóbulos rojos, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), criohemoglobinuria paroxística (PCH), púrpura trombocitopénica trombótica/síndrome urémico hemolítico (TTP/HUS), anemia hemolítica autoinmune idiopática, anemia hemolítica inmune inducida por fármacos, anemia hemolítica inmune secundaria, anemia hemolítica no inmune producida por agentes químicos o físicos, malaria, malaria falciparum, bartonelosis, babesiosis, infección por clostridios, infección grave por haemophilus influenzae de tipo b, quemaduras importantes, reacción a una transfusión, rabdomiolisis (mioglobinemia), transfusión de sangre envejecida, transfusión de hemoglobina, transfusión de glóbulos rojos, bypass cardiopulmonar, enfermedad coronaria, síndrome de isquemia cardiaca, angina, hemólisis iatrogénica, angioplastia, isquemia de miocardio, isquemia tisular, hemólisis producida por dispositivos intravasculares y hemodiálisis.

En todavía otro método descrito en este documento para inducir la vasodilatación y/o aumentar el flujo sanguíneo en un sujeto, el sujeto tiene una afección asociada con una reducción del flujo sanguíneo en un tejido y el método es un método para aumentar el flujo sanguíneo en el tejido del sujeto. Por ejemplo, la reducción del flujo sanguíneo en el tejido se produce directa o indirectamente por al menos una afección seleccionada entre el grupo que consiste en: anemia de células falciformes, talasemia, enfermedad de hemoglobina C, enfermedad de hemoglobina SC, talasemia de células falciformes, esferocitosis hereditaria, eliptocitosis hereditaria, ovalcitosis hereditaria, deficiencia en glucosa-6-fosfato y otras deficiencias enzimáticas de glóbulos rojos, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), criohemoglobinuria paroxística (PCH), púrpura trombocitopénica trombótica/síndrome urémico hemolítico (TTP/HUS), anemia hemolítica autoinmune idiopática, anemia hemolítica inmune inducida por fármacos, anemia hemolítica inmune secundaria, anemia hemolítica no inmune producida por agentes químicos o físicos, malaria, malaria falciparum, bartonelosis, babesiosis, infección por clostridios, infección grave por haemophilus influenzae de tipo b, quemaduras importantes, reacción a una transfusión, rabdomiolisis (mioglobinemia), transfusión de sangre envejecida, transfusión de hemoglobina, transfusión de glóbulos rojos, bypass cardiopulmonar, enfermedad coronaria, síndrome isquémico cardiaco, angina, hemólisis iatrogénica, angioplastia, isquemia de miocardio, isquemia tisular, hemólisis producida por dispositivos intravasculares, hemodiálisis, hipertensión pulmonar, hipertensión sistémica, ulceración cutánea, insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica, trombosis intravascular y un suceso isquémico del sistema nervioso central.

En este método descrito en el presente documento se contempla específicamente que el tejido sea un tejido isquémico, por ejemplo uno o más tejidos seleccionados entre el grupo que consiste en tejido neuronal, tejido digestivo, tejido intestinal, tejido de extremidades, tejido pulmonar, tejido nervioso central o tejido cardiaco.

También se describen métodos para inducir una vasodilatación y/o aumentar el flujo sanguíneo en un sujeto que tiene una presión sanguínea elevada, donde la presión sanguínea elevada comprende la presión sanguínea elevada en los pulmones. A modo de ejemplo, se contempla que este sujeto en algunos casos tiene hipertensión pulmonar neonatal o hipertensión pulmonar primaria y/o secundaria.

Cuando la presión sanguínea elevada o la necesidad de un mayor flujo sanguíneo en el sujeto comprende la presión sanguínea elevada o la necesidad de un mayor flujo sanguíneo en los pulmones, la sal farmacéuticamente aceptable de nitrato se nebuliza.

A modo de ejemplo, en diversas realizaciones la sal de nitrato farmacéuticamente es para administración a una concentración circulante en el sujeto no mayor de aproximadamente 100 μM ; no mayor de aproximadamente 50 μM ; no mayor de aproximadamente 20 μM ; no mayor de aproximadamente 16 μM ; o menor de aproximadamente 16 μM .

Otra realización es el uso como se ha definido en la reivindicación 1 para tratar o producir una mejoría en una afección seleccionada entre: (a) lesión por isquemia-reperfusión cerebral, cardiaca o hepática; (b) hipertensión pulmonar; o (c) vasoespasmo de arterias cerebrales en un sujeto, por medio de la reducción de la presión sanguínea y/o el aumento de la vasodilatación en el sujeto.

En ejemplos específicos de esta realización, el uso es un uso en el que el medicamento es para tratar o producir una mejoría de una lesión por isquemia-reperfusión cerebral, cardiaca o hepática. Opcionalmente, el nitrato es para

ES 2 294 543 T3

administración al sujeto por inyección, por ejemplo por inyección intravenosa. En ciertos ejemplos, el nitrito sódico es para administración a una concentración circulante de aproximadamente 0,6 a 240 μM .

- En otros ejemplos específicos de esta realización, el medicamento es para tratar o producir una mejoría en caso de hipertensión pulmonar, tal como, por ejemplo, la hipertensión pulmonar neonatal. De forma beneficiosa, en estos métodos, el nitrito sódico puede ser para administración al sujeto por inhalación, por ejemplo puede nebulizarse. Opcionalmente, en cualquiera de estos métodos, el nitrito sódico es para administración a una velocidad de 270 $\mu\text{mol}/\text{minuto}$, aunque se contemplan otras velocidades y niveles circulantes.
- 10 En otros ejemplos de esta realización, también se proporcionan usos en los que el medicamento es para tratar o producir una mejoría en caso de vasospasmo de arterias cerebrales. Opcionalmente, el nitrito sódico es para la administración al sujeto por inyección, por ejemplo, por inyección intravenosa. En ejemplos de estos métodos, el nitrito sódico es para la administración en una proporción de aproximadamente 45 a 60 mg/kg.
- 15 En ejemplos de los usos descritos, el nitrito sódico opcionalmente puede ser para administración en combinación con al menos otro agente adicional.

En cualquiera de los usos descritos, se contempla que el sujeto puede ser un mamífero, tal como por ejemplo un ser humano.

20 IV. Nitrito sódico como vasodilatador *in vivo*

Los aniones nitrito están presentes en concentraciones de aproximadamente 150-1000 nM en el plasma y de aproximadamente 10 μM en el tejido aórtico. Esto representa las mayores reservas de almacenamiento vasculares de óxido nítrico (NO), siempre que existan mecanismos fisiológicos para reducir el nitrito a NO. Se han investigado las propiedades vasodilatadoras del nitrito en el antebrazo humano y los mecanismos existentes para su bioactivación y los resultados se presentan en este documento. Se infundió nitrito sódico a aproximadamente 36 μmoles por minuto en la arteria braquial del antebrazo de 18 voluntarios normales, obteniéndose una concentración de nitrito regional de aproximadamente 222 μM y un aumento inmediato de aproximadamente un 175% en el flujo sanguíneo del antebrazo en reposo. Se observó un aumento del flujo sanguíneo en reposo durante la inhibición de la NO sintasa y con ejercicio, y se obtuvo una mayor perfusión del tejido, como se demuestra por aumentos en la saturación venosa de hemoglobina-oxígeno, en la presión parcial de oxígeno y en el pH. Las concentraciones sistémicas de nitrito aumentaron a aproximadamente 16 μM y redujeron significativamente la presión sanguínea arterial media. En 6 sujetos más, la dosis de nitrito se redujo aproximadamente en dos unidades logarítmicas y se infundió a 360 mmoles por minuto, dando como resultado una concentración de nitrito en el antebrazo de aproximadamente 2 μM y un aumento de aproximadamente el 22% en el flujo sanguíneo.

Las infusiones de nitrito se asociaron con la formación de hierro-nitrosil-hemoglobina en los eritrocitos y, en una menor medida, con la S-nitroso-hemoglobina a lo largo del sistema vascular del antebrazo. La formación de hemoglobina modificada con NO parece deberse a la actividad nitrito reductasa de la desoxihemoglobina, lo cual asocia la hipoxia del tejido con la bioactivación del nitrito.

Estos resultados indican que los niveles fisiológicos de nitrito en sangre y en tejidos representan una reserva bi-disponible importante de NO que contribuye a la vasorregulación y proporciona un mecanismo para la vasodilatación hipódica a través de la reacción del nitrito vascular con proteínas hemo desoxigenadas. Se producen efectos sustanciales sobre el flujo sanguíneo por la infusión de nitrito en la arteria braquial de seres humanos normales a concentraciones de nitrito en el antebrazo de tan solo aproximadamente 0,9 μM .

A modo de ejemplo, como se describe en este documento, ahora se demuestra que sales de nitrito farmacéuticamente aceptables (tales como el nitrito sódico) son eficaces como vasodilatadores a dosificaciones calculadas para una concentración final de aproximadamente 0,6 a aproximadamente 200 μM de nitrito en la sangre circulante de un sujeto. Pueden alcanzarse niveles circulantes específicos (localmente o generalmente en el sujeto), por ejemplo, proporcionando menos de aproximadamente 200 mg o menos de nitrito en una sola dosis, o una dosis proporcionada durante un periodo de tiempo (por ejemplo, por infusión o inhalación). Por ejemplo, otras dosificaciones pueden ser 150 mg, 100 mg, 75 mg, 50 mg o menos. En este documento se proporcionan dosificaciones ejemplificativas específicas de sales de nitrito, aunque los ejemplos no pretenden ser limitantes. Las cantidades de dosificación exacta variarán según las dimensiones del sujeto a tratar, la duración del tratamiento, el modo de administración y similares.

Las velocidades de infusión pueden calcularse, para cualquier concentración circulante diana deseada, usando la siguiente ecuación:

$$\text{Velocidad de infusión } (\mu\text{M}/\text{min}) = \text{concentración diana } (\mu\text{mol/l} \text{ o } \mu\text{M}) \times \text{aclaramiento } (\text{l}/\text{min})$$

65 donde aclaramiento (l/min) = 0,015922087 x peso del sujeto (kg) ↑0,8354

La velocidad de aclaramiento se ha calculado basándose en resultados empíricos, incluyendo los indicados en este documento.

ES 2 294 543 T3

A modo de ejemplo, cuando se infunde nitrito sódico en un antebrazo humano a 36 micromoles (μMol) por minuto, la concentración medida procedente del antebrazo es de aproximadamente $222 \mu\text{M}$ y en el cuerpo entero es de aproximadamente $16 \mu\text{M}$, después de 15 minutos de infusión. El nivel base de nitrito circulante en mamíferos es bajo, aproximadamente 150-500 nM.

5 Son cantidades terapéuticamente eficaces particularmente beneficiosas de un vasodilatador, tal como una sal de nitrito farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, nitrito sódico), las que son eficaces para conseguir vasodilatación o para aumentar el flujo sanguíneo pero no son tan elevadas como para producir un nivel significativo o tóxico de methemoglobina en el sujeto al que se administra el vasodilatador. En realizaciones específicas, por ejemplo, no se produce más de aproximadamente un 25% de methemoglobina en el sujeto. Más preferiblemente, no se produce más de un 20%, no más de un 15%, no más de un 10%, no más de un 8% o menos de methemoglobina, por ejemplo, tan solo un 5% o un 3% o menos, en respuesta al tratamiento con el vasodilatador.

10 15 A modo de ejemplo específico, el nitrito puede infundirse a concentraciones menores de $40 \mu\text{M}$ por minuto por vía intravenosa o intraarterial, o administrarse a través de la boca. De manera importante, la dosis usadas son menores que las usadas para el tratamiento del envenenamiento con cianuro, que están diseñadas para inducir una methemoglobinemia clínicamente significativa. Sorprendentemente, las dosis descritas en este documento para el tratamiento/prevención de afecciones cardiovasculares producen efectos clínicos significativos y beneficiosos sin producir methemoglobina de una forma clínicamente significativa.

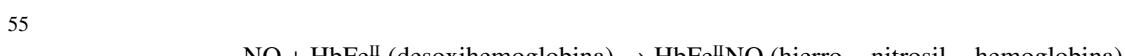
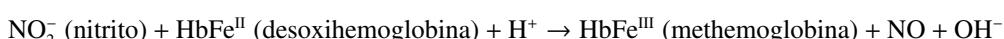
20 25 Se han utilizado clínicamente compuestos de nitrato y compuestos de nitrito inorgánico/orgánico relativamente complejos para tratar trastornos, incluyendo la angina. Sin embargo, estos fármacos (por ejemplo, el trinitrato de glicerilo) tienen el inconveniente de la tolerancia (necesitando aumentos en la dosificación para mantener el mismo efecto), y son vasodilatadores que funcionan de manera distinta al nitrito. Por ejemplo, requieren tioles celulares para el metabolismo, mientras que el nitrito o las sales de nitrito descritas en este documento (por ejemplo, el nitrito sódico) no.

V. Un mecanismo de formación de hierro-nitrosil- y S-nitroso-hemoglobina *in vivo*

30 Los niveles de hierro-nitrosil y S-nitroso-hemoglobina formados *in vivo* en este estudio son sorprendentes. Durante un tiempo de tránsito de menos de 10 segundos a través de la circulación del antebrazo durante el ejercicio, el nitrito introducido por infusión (concentración regional $200 \mu\text{M}$) produjo hierro-nitrosil-hemoglobina en una concentración de aproximadamente 750 nM y SNO-Hb en una concentración de 200 nM. La formación de estos dos aductos de NO-hemoglobina estaba inversamente correlacionada con la saturación de hemoglobina-oxígeno, que se redujo durante el estrés de ejercicio, medida a partir de la vena antecubital por cooximetría (para hierro-nitrosil-hemoglobina $r = -0,7$, $P < 0,0001$; para S-nitroso-hemoglobina $r = -0,45$; $P = 0,04$; Figura 4B). La adición de nitrito $200 \mu\text{M}$ a sangre entera a diferentes tensiones de oxígeno (0-100%) recapituló los datos *in vivo*, formándose concentraciones de hierro-nitrosil-hemoglobina cada vez mayores según se reducía la tensión de oxígeno (para hierro-nitrosil-hemoglobina $r = -0,968$, $P < 0,0001$; para S-nitroso-hemoglobina $i = -0,45$, $P = 0,07$), lo cual sugería firmemente que la formación de NO y SNO era dependiente de la reacción de nitrito con desoxihemoglobina.

40 45 Estos datos son coherentes con la reacción del nitrito con la desoxihemoglobina para formar NO y hierro-nitrosil-hemoglobina (Doyle *et al.*, J Biol Chem, 256, 12393-12398, 1981). El nitrito se reduce primero para formar NO y methemoglobina con una constante de velocidad de $2,9\text{M}^{-1} \text{seg}^{-1}$ (medida a 25°C , pH 7.0). Esta reacción será una reacción de pseudo-primer orden, gobernada por las cantidades de hemoglobina intraeritrocítica (20 mM) y limitada por la velocidad de captación de nitrito por la membrana del eritrocito. El NO después se une a la desoxihemoglobina para formar hierro-nitrosil-hemoglobina, escapa del eritrocito o reacciona con otros óxidos superiores, tales como NO_2 , para formar N_2O_3 y S-nitroso-hemoglobina.

50 Serie de ecuaciones 1



60 También se observó la formación de cantidades significativas de S-nitroso-hemoglobina *in vivo* durante la infusión de nitrito. Luschinger y colaboradores (Proc Natl Acad Sci USA, 100, 461-6, 2003) propusieron recientemente que el nitrito reacciona con desoxihemoglobina para producir hierro-nitrosil-hemoglobina, con la posterior "transferencia" del NO a la cisteína 93 para formar S-nitroso-hemoglobina mediada por reoxigenación y transición cuaternaria de T o R de hemoglobina. Sin embargo, una transferencia directa de NO desde el grupo hemo al tiol requiere la oxidación de NO a NO^+ y este "ciclo" no se ha reproducido por otros grupos de investigación. Fernández y colaboradores han sugerido recientemente que el nitrito cataliza la nitrosilación reductora de la methemoglobina por el NO, un proceso que genera las especies de nitrosación intermedias tetraóxido de dinitrógeno (N_2O_3) (Inorg Chem, 42, 2-4, 2003). Sin embargo, las reacciones del nitrito con la hemoglobina proporcionan condiciones ideales para la generación de NO y S-nitrosotiol a lo largo del gradiente de oxígeno, ya que el nitrito reacciona con la desoxihemoglobina para formar NO

y con la oxihemoglobina para formar radical de dióxido de nitrógeno (NO_2). El NO_2 participa en reacciones radical-radical ($k=10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$) con NO para formar N_2O_3 y S-nitrosotiol. Otra reacción química adicional del nitrito con la hemoglobina produce metabolitos de oxígeno reactivos (tales como superóxido y peróxido de hidrógeno; Watanabe *et al.*, *Acta Med Okayama* 35, 173-8, 1981; Kosaka *et al.*, *Biochim Biophys Acta* 702, 237-41, 1982; y Kosaka *et al.*,

- 5 Environ Health Perspect 73, 147-51, 1987). La química que implica estas reacciones de radicales de oxígeno-radicales de NO proporciona rutas competitivas para la formación de S-nitrosotiol en presencia de sumideros de NO de alta afinidad, tales como hemoglobina.

VI. Consideraciones fisiológicas

10 Durante la última década se ha visto un aumento en la comprensión del papel crítico que juega el óxido nítrico (NO) en la homeostasis vascular. El equilibrio entre la producción de NO y la eliminación de NO determina la biodisponibilidad del NO, y este equilibrio se mantiene cuidadosamente en la fisiología normal. El sistema vasorregulador homeostático está aparentemente ajustado para eliminar el exceso de NO para limitar las acciones endocrinas generales mientras que permite un nivel de NO local suficiente necesario para la vasodilatación tónica regional. Sin embargo, la rápida eliminación del NO por la hemoglobina no asociada a células altera este equilibrio (Reiter *et al.*, *Nat Med* 8, 1383-1389, 2002). En condiciones fisiológicas normales, la hemoglobina es eliminada de forma rápida y eficaz por el sistema eliminador de hemoglobina. Sin embargo, en condiciones hemolíticas crónicas tales como las que se producen en la anemia falciforme, se produce una liberación diaria de cantidades sustanciales de hemoglobina en el sistema vascular, lo que sugiere que la hemoglobina libre de células puede tener efectos sistémicos importantes sobre la biodisponibilidad del NO. Un enfoque reciente de investigación intenta explicar y tratar las complicaciones vasculares comunes para muchas afecciones hemolíticas crónicas tales como hipertensión pulmonar, ulceración cutánea e insuficiencia renal aguda y crónica. De forma similar, varias enfermedades clínicas y terapias tales como crisis hemolíticas agudas, hemólisis durante procedimientos de bypass cardiopulmonar, transfusión de sangre envejecida y mioglobinuria después de un infarto muscular a menudo se complican por una hipertensión aguda pulmonar y sistémica, insuficiencia renal aguda, trombosis intravascular, sucesos isquémicos en el sistema nervioso central y/o muerte.

30 En el presente documento se demuestra que, en seres humanos, el nitrito produce vasodilatación asociada con la reducción del nitrito a NO por la desoxihemoglobina. Sorprendentemente, niveles sistémicos de 16 μM produjeron una vasodilatación sistémica y redujeron la presión sanguínea, y niveles regionales en el antebrazo de sólo 1-2 μM aumentaron significativamente el flujo sanguíneo en reposo y con estrés por ejercicio. Además, la conversión de nitrito en NO y S-nitrosotiol estaba mediada por la reacción con la desoxihemoglobina, proporcionando un mecanismo para la producción de NO catalítico regulada por hipoxia por proteínas hemo de los eritrocitos o endoteliales/tisulares.

35 Aunque las altas concentraciones de hemoglobina en los glóbulos rojos, junto con las velocidades de reacción limitadas próximas a la difusión ($\sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) del NO con la hemoglobina, parecen prohibir la exportación del NO desde los glóbulos rojos, los datos presentados en este documento indican lo contrario. Aunque sin intención de limitarse, quizás las características únicas de la membrana de los eritrocitos, con una proteína submembrana y un entorno rico en methemoglobina, y la naturaleza lipófila relativa del NO, permiten una producción de NO compartimentada en la membrana de los glóbulos rojos. Esto, junto con la pequeña producción de NO necesaria para la vasodilatación, podría explicar la exportación del NO a pesar de estas limitaciones cinéticas. Además se propone que la química *in vivo* para la conversión de nitrito en NO y S-nitrosotiol por medio de la reacción con desoxihemoglobina y methemoglobina proporciona un mecanismo para la producción de NO catalítico regulada por hipoxia por las proteínas hemo del eritrocito o del tejido endotelial.

45 Tres factores sitúan específicamente al nitrito, en lugar del S-nitrosotiol, como la reserva de almacenamiento vascular principal de NO: 1) el nitrito está presente en concentraciones sustanciales en plasma, en los eritrocitos y en tejidos (Rodríguez *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:336-341, 2003); 2) el nitrito es relativamente estable, porque no se reduce fácilmente por reductores intracelulares, como los S-nitrosotioles (Gladwin *et al.*, *J Biol Chem* 21:21, 2002) y su velocidad de reacción con proteínas hemo es 10.000 veces menor que la del NO auténtico; y 3) el nitrito solo se convierte en NO por reacción con desoxihemoglobina (o presumiblemente desoxi-mioglobina, -citoglobina y -neuroglobina) y su “grupo saliente” es la proteína met-hemo(férreo) que no eliminará ni inactivará el NO (Doyle *et al.*, *J Biol Chem* 256:12393-12398, 1981). Por lo tanto, esta reserva proporciona el sustrato ideal para la generación de NO durante la hipoxia, proporcionando un nuevo mecanismo para la vasodilatación hipódrica.

55 Puesto que un sistema de desoxihemoglobina-nitrito reductasa daría como resultado la formación de NO en sangre en desoxigenación, este sistema asocia el estado de oxigenación de la hemoglobina a la generación de NO, el principio atribuido previamente a la S-nitroso-hemoglobina (Jie *et al.*, *Nature* 380:221-226, 1996). La hemoglobina posee cavidades de unión aniónicas que retienen el nitrito (Gladwin *et al.*, *J Biol Chem* 21:21, 2002), y el nitrito es absorbido por los eritrocitos a través de la proteína de intercambio aniónico (AE1 o Banda 3) o a través de la membrana como ácido nitroso (un proceso dependiente del pH que acelera la captación de nitrito durante la hipoxia del tejido (Shingles *et al.*, *J Bioenerg Biomembr* 29:611-616, 1997; May *et al.*, *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1946-1954, 2000). Este nitrito proporcionaría una fuente constante de generación de NO, NO_2 y S-nitrosotiol que se produciría preferentemente en territorios vasculares hipódicos. Como la proteína AE1 se une tanto a la desoxihemoglobina como a la methemoglobina y puede canalizar el nitrito, AE1 podría servir para localizar la generación de S-nitrosotiol y NO catalítico en la membrana del eritrocito, donde el N_2O_3 , NO_2 y NO relativamente lipófilo podría reaccionar en la bicapa lipídica vecina (Figura 5). La membrana del eritrocito está revestida por una barrera de difusión externa no agitada y una matriz de proteína rica en methemoglobina interna que podría promover adicionalmente esta química

ES 2 294 543 T3

del NO y NO₂ (Coin *et al.*, J Biol Chem 254:1178-1190, 1979; Liu *et al.*, J Biol Chem 273:18709-18713, 1998; Han *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99:7763-7768, 2002).

Este modelo es coherente con las observaciones *in vitro* de Pawloski y colaboradores (Pawloski *et al.*, Nature 409: 5 622-626, 2001) que muestran que en la membrana del eritrocito se producen una S-nitrosación de la hemoglobina y AE1 después del tratamiento de glóbulos rojos desoxigenados con soluciones de NO (que contienen significativamente más de 50 μM de nitrito contaminante; Fernández *et al.*, Inorg Chem 42:1-4, 2003). Además, el N₂O₃ generado en la membrana podría nitrosar directamente el abundante glutatión intraeritrocítico, eliminando la necesidad de reacciones de trans-nitrosación con S-nitroso-hemoglobina y facilitando de esta manera la exportación rápida del S-nitrosotiol 10 de bajo peso molecular por difusión simple a través de la membrana del eritrocito (Figura 5). La química de nitrito-hemoglobina confirma el papel del glóbulo rojo en la homeostasis del NO dependiente de oxígeno y proporciona un mecanismo para las observaciones de múltiples grupos de investigación de que los glóbulos rojos y el plasma “cargados” con NO por exposición al NO en altas concentraciones en solución o a donadores o a gas de NO (en equilibrio con altas concentraciones de nitrito), pueden exportar el NO e inducir vasodilatación *in vitro* e *in vivo* (Rassaf 15 *et al.*, J Clin Invest 109:1241-1248, 2002; Fox-Robichaud *et al.*, J Glitz Invest 101:2497-2505, 1998; McMahon *et al.*, Nat Med 3:3, 2002; Cannon *et al.*, J Clin Invest 108:279-287, 2001; Gladwin *et al.*, J Biol Chem 21:21, 2002; Gladwin *et al.*, Circulation 107:271-278, 2003; Schechter *et al.*, N Engl J Med 348:1483-1485, 2003).

Además de la reacción del nitrito con la desoxihemoglobina, también pueden ser importantes reacciones con desoxi-mioglobina, -citoglobina y -neuroglobina o con otras proteínas hemo de células endoteliales. Esta química se produciría entre el nitrito tisular y la desoxi-mioglobina del músculo vascular y esquelético, contribuyendo de esta manera a una vasodilatación hipoxica y a una potenciación hipoxica de donadores de NO. El valor de P₅₀ de estos monómeros de globina es de aproximadamente 3-5 mmHg, poniendo su punto de desoxigenación de equilibrio en el intervalo del pO₂ tisular (0-10 mmHg) durante un estrés metabólico, tal como el ejercicio. Esta baja tensión de oxígeno 20 reduce la disponibilidad del oxígeno como sustrato para la síntesis de NO, sin embargo, las reservas de nitrito tisular 25 podrían reducirse a NO y 5-nitrosotiol manteniendo de esta manera una vasodilatación crítica.

VII. Métodos de uso

Ahora puede usarse la aplicación terapéutica de nitrito para proporcionar una vasodilatación selectiva en un sujeto, y particularmente en un tejido hipoxémico e isquémico en el sujeto, y será útil para tratar afecciones hemolíticas tales como la anemia de células falciformes, donde la hemoglobina libre liberada durante la hemólisis elimina el NO y altera la función vascular dependiente de NO. Es de esperar que el nitrito no sólo inhiba la capacidad de la hemoglobina libre de retirar el NO por medio de su oxidación a methemoglobina, sino que también genere NO en lechos tisulares con una baja tensión de oxígeno. De esta manera, el nitrito aplicado preferiblemente liberará óxido nítrico a áreas de baja tensión de oxígeno, proporcionando de esta manera una vasodilatación localizada y/o un aumento del flujo sanguíneo. 30

Pueden administrarse nitritos a un sujeto para aumentar el flujo sanguíneo en un tejido del sujeto, por ejemplo, para aumentar el flujo sanguíneo en un tejido, por ejemplo, un tejido con una baja tensión de oxígeno; para producir 40 vasodilatación; para reducir la presión sanguínea del sujeto; para tratar a un sujeto que tiene una afección asociada con una presión sanguínea elevada; para tratar una afección hemolítica; para tratar complicaciones vasculares asociadas con tratamientos o afecciones que producen hemólisis; para tratar la hipertensión pulmonar, un vasoespasmo cerebral o una reducción del flujo sanguíneo en órganos (tales como lesión por isquemia-reperfusión en órganos que incluyen el cerebro, corazón, riñón, placenta e hígado); y/o para tratar órganos antes y después de un trasplante. 45

El nitrito tiene propiedades vasodilatadoras in vivo

Las propiedades vasodilatadoras del nitrito y los mecanismos de su bioactivación se investigaron como se describe en este documento. El nitrito sódico infundido a 36 μmoles por minuto en la arteria braquial del antebrazo de 18 voluntarios normales produjo una concentración regional de nitrito de 222 μM y, sorprendentemente, un aumento del 50 175% en el flujo sanguíneo del antebrazo en reposo. Se observó un aumento del flujo sanguíneo en reposo, durante la inhibición de la NO sintasa y con ejercicio. La infusión de nitrito también produjo, sorprendentemente, un aumento de la perfusión de los tejidos, como se demuestra por aumentos en la saturación venosa de hemoglobina-oxígeno, en la presión parcial de oxígeno y en el pH. Las mayores concentraciones sistémicas de nitrito (16 μM) redujeron 55 significativamente la presión sanguínea arterial media.

En diez sujetos más, la dosis de nitrito se redujo en dos unidades logarítmicas dando como resultado una concentración de nitrito en el antebrazo de 2 μM en reposo y de 0,9 μM durante el ejercicio (Figura 3). Estas concentraciones de nitrito aumentaron de una forma sorprendentemente significativa el flujo sanguíneo en reposo y durante la inhibición 60 de la NO sintasa, con y sin ejercicio.

Las infusiones de nitrito se asociaron con la rápida formación de hierro-nitrosil-hemoglobina en los eritrocitos y, en una menor medida, de S-nitroso-hemoglobina a lo largo del sistema vascular del antebrazo. La formación de estos aductos de NO-Hb era inversamente proporcional a la saturación de oxihemoglobina. Además, se observó una 65 vasodilatación de los anillos aórticos de rata y la formación de NO gas y hemoglobina modificada en NO por la actividad nitrito reductasa de la desoxihemoglobina y los eritrocitos desoxigenados, un resultado que asocia la hipoxia del tejido, la alosteria de la hemoglobina y la bioactivación del nitrito. Estos resultados indican que los niveles fisiológicos de nitritos en sangre y en tejidos son una reserva biodisponible importante de NO que contribuye a la vasorregulación

y proporcionan un mecanismo para la vasodilatación hipódica a través de la reacción del nitrito vascular con proteínas hemo desoxigenadas presentes en los tejidos y/o en los eritrocitos.

- Los descubrimientos descritos en este documento de que la administración de nitrito reduce la presión sanguínea y aumenta el flujo sanguíneo son inesperados y sorprendentes porque los informes publicados hasta la fecha enseñan al experto en la materia que los niveles farmacológicos de nitrito (por debajo de aproximadamente 100-200 μM), cuando se administran a sujetos, carecen de propiedades vasodilatadoras intrínsecas (Lauer *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 98: 12814-9, 2001).
- También se cree que pueden infundirse sales farmacéuticamente aceptables de nitrito a pacientes con una enfermedad hemolítica, tal como anemia de células falciformes, para mejorar el flujo sanguíneo, limitar la lesión tisular por isquemia-reperfusión y oxidar la Hb del plasma no asociada a células. Estos efectos deberían ser útiles en el tratamiento de crisis de dolor vasooclusivas de células falciformes, ictus (isquemia cerebral) y el síndrome de tórax agudo.

15 Efectos citoprotectores del nitrito durante una isquemia-reperfusión del corazón y el hígado

El anión nitrito (NO_2^-) se forma como una consecuencia de la oxidación del óxido nítrico (NO) y está presente a concentraciones de 0,3-0,1 μM en plasma y 1-20 μM en tejidos (Gladwin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 97:11432-11487, 2000; Rodríguez *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100:336-341, 2003; Rassaf *et al.*, Nat Med 9:481-483, 2003; Bryan *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2004; Gladwin *et al.*, J Clin Invest 113:19-21, 2004). El nitrito se ha considerado históricamente un producto final metabólico inerte con una actividad biológica intrínseca limitada (Lauer *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 98: 12814-12819, 2001; McMahon, N Engl J Med 349:402-405, respuesta del autor 402-405, 2003; Pawloski, N Engl J Med 349: 402-405, respuesta del autor 402-405, 2003). Los datos recientes de nuestro grupo y de otros grupos sugieren que el nitrito puede reducirse a NO durante la hipoxia y la acidosis (Gladwin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 97:11482-11487, 2000; Bryan *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2004; Cosby *et al.*, Nat Med 9:1498-1505, 2003; Nagababu *et al.*, J Biol Chem 278:46349-46356, 2003; Tiravanti *et al.*, J Biol Chem 279:11065-11073, 2004). A valores de pH y PO_2 tisular extremadamente bajos, el nitrito puede reducirse a NO por desproporcionación (reducción ácida; Zweier *et al.*, Nat Med 1:804-809, 1995) o por la acción enzimática de la xantina oxidoreductasa (Millar *et al.*, FEBS Lett 427:225-228, 1998; Zhang *et al.*, Biochem Soc Trans 25:524S, 1997; Godber *et al.*, J Biol Chem 275:7757-7763, 2000; Li *et al.*, J Biol Chem 276:24482-24489, 2001).

El nitrito representa una forma de almacenamiento circulante y tisular de óxido nítrico (NO) cuya bioactivación está mediada por las actividades nitrito reductasa de la desoxihemoglobina. Como la velocidad de generación de NO a partir del nitrito es linealmente dependiente de las reducciones en el oxígeno y el pH, los presentes solicitantes propusieron la hipótesis de que el nitrito se reduciría a NO en el tejido isquémico y ejercería efectos protectores dependientes de NO. Se administraron soluciones de nitrito sódico en la situación de lesión por isquemia-reperfusión (I/R) hepática y cardiaca en ratones. En caso de I/R hepática, el nitrito ejerció profundos efectos protectores dependientes de la dosis sobre la necrosis celular y apoptosis con efectos protectores muy significativos a concentraciones de nitrito casi fisiológicas (0,6 μM). En la lesión por I/R de miocardio, el nitrito redujo el tamaño del infarto cardiaco en un 67% y mejoró significativamente la fracción de eyección del ventrículo izquierdo después de la isquemia. De forma consecuente con la bioactivación de nitrito dependiente de hipoxia, el nitrito se redujo a NO, S-nitrosotioles, N-nitrosaminas y proteínas hemo nitrosiladas en hierro en un periodo de 1-30 minutos de reperfusión. La protección mediada por nitrito dependía de la generación de NO y era independiente de eNOS y HO-1. Estos resultados sugieren que el nitrito es una reserva de almacenamiento biológico del NO que ayuda a una función crítica en la protección tisular frente a lesiones isquémicas. Estos estudios muestran una terapia inesperada y novedosa para enfermedades tales como el infarto de miocardio, la conservación y trasplante de órganos y estados de shock.

Aunque la reperfusión de tejidos isquémicos proporciona oxígeno y los sustratos metabólicos necesarios para la recuperación y supervivencia de células dañadas de forma reversible, la propia reperfusión realmente acelera la necrosis celular (Braunwald *et al.*, J Clin. Invest. 76: 1713-1719, 1985). La isquemia-reperfusión se caracteriza por la formación de radicales de oxígeno tras la reintroducción de oxígeno molecular en los tejidos isquémicos, que tiene como resultado modificaciones oxidativas generalizadas de lípidos y proteínas celulares, lesión mitocondrial, y apoptosis y necrosis tisular (McCord *et al.*, Adv Myocardiol 5: 183-189, 1985). Además, después de la reperfusión de tejidos isquémicos, es posible que el flujo de sangre no vuelva de forma uniforme a todas las partes de los tejidos isquémicos, un fenómeno que se ha denominado fenómeno de “no reflujo” (Kloner *et al.*, J Clin Invest 54: 1946-1508, 1974). Se cree que las reducciones en el flujo sanguíneo después de la reperfusión contribuyen a la lesión celular y a la necrosis (Kloner *et al.*, J Clin Invest 54:1496-1508, 1974). La reintroducción repentina de sangre en el tejido isquémico también produce un aumento espectacular en la liberación de calcio en el tejido previamente isquémico (es decir, “paradoja de calcio”), dando como resultado una alteración tisular masiva, liberación de enzimas, reducciones en las reservas de fosfato de alta energía, lesiones mitocondriales y necrosis (Nayler, Amer. J. Path. 102:262, 1981; Shen *et al.*, Amer J Path 67:417-440, 1972). Ciertos estudios recientes también han indicado que la lesión por isquemia-reperfusión también se caracteriza por una respuesta inflamatoria inapropiada en la microcirculación que tiene como resultado interacciones de leucocitos-células endoteliales que están mediadas por la regulación positiva de moléculas de adhesión de leucocitos y de células endoteliales (Lefer *et al.*, Cardiovasc Res 32:743-751, 1996; Entman *et al.*, Faseb J 5:2529-2537, 1991). Los intensos esfuerzos de investigación se han centrado en mejorar diversos componentes patofisiológicos de la lesión por isquemia-reperfusión para limitar el grado de lesión y necrosis tisular.

ES 2 294 543 T3

Se ha demostrado que el NO, los donadores de NO y la activación o la sobreexpresión transgénica de la NO sintasa ejercen efectos protectores sobre este proceso en varios modelos (Lefer *et al.*, New Horiz 3:105-112, 1995; Lefer *et al.*, Circulación 88: 2337-2350, 1993; Nakanishi *et al.*, Am J Physiol 263:H1650-1658, 1992; Jones *et al.*, Am J Physiol Heart Circ Physiol 286:H276-282, 2004; Jones *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100: 4891-4896, 2003; Kanno *et al.*, Circulation 101:2742-2748, 2000), pero en otros modelos parece perjudicial (Flogel *et al.*, J Mol Cell Cardiol 31:827-836, 1999; Menezes *et al.*, Am J Physiol 277:G144-151, 1999; Woolfson *et al.*, Circulation 91:1545-1551, 1995; Schulz R. *et al.*, Cardiovasc Res 30:432-439, 1995). La evaluación de estos estudios sugiere un efecto crítico de la dosis y duración de la exposición al NO, dando como resultado una ventana de seguridad terapéutica estrecha para el NO en la patofisiología de la isquemia-reperfusión (Bolli, J Mol. Cell. Cardio. 33: 1897-1918, 2001; Wink *et al.*, Am J Physiol Heart Circ Physiol 285:H2264-2276, 2003). Otra limitación es que la formación de NO por la NO sintasa requiere oxígeno como sustrato, una molécula cuya disponibilidad está limitada durante la isquemia.

Por lo tanto, se considera el uso de nitrato en este contexto por las siguientes razones: (1) es una sustancia natural sin ningún “grupo saliente” potencialmente tóxico, (2) se reduce selectivamente a NO en tejidos con baja tensión de oxígeno y un bajo pH (Bryan *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA., 2004; Cosby *et al.*, Nat Med 9:1498-1505, 2003; Nagababu *et al.*, J Biol Chem 278:46349-46356, 2003; Tiravanti *et al.*, J Biol Chem 279:11065-11073, 2004; Doyle *et al.*, J Biol Chem 256:12393-12398, 1981; Luchsinger *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100:461-466, 2003), (3) su activación no requiere oxígeno molecular (Cosby *et al.*, Nat Med 9:1498-1505, 2003), y (4) se sabe que el NO mantiene las proteínas hemo en un estado reducido y ligado (Herold *et al.*, Free Radic Biol Med 34:531-545, 2003; Herold *et al.*, J Biol Inorg Chem 6:543-555, 2001; Fernández *et al.*, Inorg Chem 42:2-4, 2003), limita la química oxidativa mediada por hemo y hierro libre (Kanner *et al.*, Arch Biochem Biophys 237:314-321, 1985; Kanner *et al.*, Lipids 20:625-628, 1985; Kanner *et al.*, Lipids 27:46-49, 1992), inhibe de forma transitoria la respiración mitocondrial y la citocromo c oxidasa (Torres *et al.*, FEBS Lett 475:263-266, 2000; Brown *et al.*, FEBS Lett 356:295-298, 1994, Cleeter *et al.*, FEBS Lett 345:50-54, 1994; Rakhit *et al.*, Circulation 103:2617-2623, 2001), y modula los efectores apoptóticos (Mannick *et al.*, Science 284: 651-654, 1999), siendo todos estos mecanismos que podrían participar en la citotoxicidad posterior a una isquemia severa.

Se ha demostrado que el óxido nítrico inactiva los radicales libres de oxígeno en modelos animales de lesión por isquemia-reperfusión transitoria (Mason *et al.*, J Neurosurg 93: 99-107, 2000), limitando de forma significativa el volumen del ictus (Pluta *et al.*, Neurosurgery, 48:884-892, 2001). Por lo tanto, el nitrato por medio de la liberación de NO en el área de reperfusión también puede tener el mismo efecto beneficioso sobre el ictus por medio de la limitación de la presencia de radicales libres de oxígeno después de la reperfusión.

Además, la apertura selectiva de la barrera sangre-tumor por el NO facilita la penetración de agentes quimioterapéuticos en el tumor cerebral (Weyerbrock *et al.*, J Neurosurgery, 99:728-737, 2003); se cree que esto también mejorará la penetración de otros agentes, particularmente agentes terapéuticos tales como radioterapia, en el cáncer cerebral. Por lo tanto, debido a las condiciones hipoxicas dentro del tumor cerebral es posible que el nitrato también pueda abrir selectivamente la barrera sangre-tumor proporcionando un efecto beneficioso en combinación con quimioterapia.

40 *El nitrato nebulizado inhalado es un vasodilatador pulmonar*

La hipertensión pulmonar persistente en el recién nacido se produce con una incidencia de 0,43-6,8/1.000 nacimientos vivos y está asociada con tasas de mortalidad comprendidas entre el 10 y el 20% (Walsh-Sukys *et al.*, Pediatrics 105, 14-20, 2000). Los supervivientes pueden desarrollar deficiencias en el neurodesarrollo y auditivas (46%), retrasos cognitivos (30%), pérdida de audición (19%) y una alta proporción de rehospitalización (22%) (Lipkin *et al.*, J Pediatr 140, 306-10, 2002).

La hipertensión pulmonar se produce como una enfermedad primaria o idiopática (Runo & Loyd, Lancet 361:1533-44, 23003; Trembath & Harrison, Pediatr Res 53:883-8, 2003), así como secundaria a varias enfermedades sistémicas y pulmonares (Rubin, N Engl J Med 336:111-7, 1997). Independientemente de la etiología, la hipertensión pulmonar está asociada con una morbilidad y mortalidad sustanciales. Los bebés recién nacidos y los adultos con enfermedad pulmonar a menudo desarrollan hipoxemia sistémica, reducción de la saturación de oxihemoglobina y aumento de la resistencia vascular pulmonar (Rubin, N Engl J Med 336:111-7, 1997; Haworth Heart 88:658-64, 2002). El óxido nítrico (NO) administrado terapéuticamente por inhalación reduce la resistencia vascular pulmonar en recién nacidos y adultos y mejora la correspondencia entre ventilación y perfusión y la oxigenación; en recién nacidos, el NO inhalado reduce las lesiones pulmonares crónicas y reduce la necesidad de oxigenación por membrana extracorpórea. Los ensayos aleatorios controlados con placebo de la terapia con NO inhalado para el tratamiento de recién nacidos a término y casi a término con insuficiencia respiratoria hipoxica severa, demostraron una mejora en la hipoxemia y una reducción de la necesidad de oxigenación por membrana extracorpórea (Clark *et al.*, N Engl J Med 342, 469-74, 2000; Roberts *et al.*, N Engl J Med 336, 605-10, 1997; The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group. N Engl J Med 336, 597-604, 1997). Un reciente ensayo aleatorio controlado con placebo realizado en bebés prematuros con síndrome de insuficiencia respiratoria indicó que el tratamiento con NO inhalado reducía el criterio de valoración combinado de muerte y enfermedad pulmonar crónica (Schreiber *et al.*, N Engl J Med 349, 2099-107, 2003).

65 A pesar de los resultados alentadores con respecto al tratamiento de la hipertensión pulmonar persistente del recién nacido con NO inhalado, la terapia tiene varias limitaciones significativas (Martin, N Engl J Med 349, 2157-9, 2003): un coste considerable (Jacobs *et al.*, Crit Care Med 30, 2330-4, 2002; Pierce *et al.*, Bmj 325, 336, 2002; Subhedar *et al.*, Lancet 359, 1781-2, 2002; Angus *et al.*, Pediatrics 112, 1351-60, 2003), dificultades técnicas implicadas en la

adaptación de los sistemas de administración de NO para el transporte en recién nacidos (Kinsella *et al.*, Pediatrics 109, 158-61, 2002), y la falta de disponibilidad en pequeños hospitales comunitarios y en países en desarrollo. Además, el NO reacciona con el oxígeno formando el dióxido de nitrógeno tóxico, y de esta manera debe almacenarse y administrarse en nitrógeno a altos caudales. Los sistemas de gas y de administración son costosos y la tecnología de administración requerida no está disponible universalmente. Por lo tanto, son muy deseables terapias alternativas basadas en NO para el tratamiento de la hipertensión pulmonar.

Las relación entre el nitrito y el óxido nítrico se ha apreciado casi durante un siglo, reconociendo Haldane y posteriormente Hoagland que se formaba mioglobina nitrosilada en hierro (NO unido al grupo hemo) como un producto final durante el curado de la carne basado en nitrito (Gladwin *et al.*, J Clin Invest 113, 19-21, 2004). Hace más de 50 años, Furchtgott y Bhadrakom notificaron que el nitrito producía una vasodilatación en preparaciones de anillo aórtico *in vitro* (Furchtgott & Bhadrakom, J Pharmacol Exp Ther 108, 129-43, 1953); esta observación se exploró posteriormente por el grupo de Ignarro en experimentos que evaluaban el papel de la guanilil ciclase soluble en la vasodilatación dependiente del endotelio (Ignarro *et al.*, J Pharmacol Exp Ther 218, 739-49, 1981). Sin embargo, las altas concentraciones de nitrito, típicamente en el intervalo milimolar, requeridas para inducir vasodilatación en bioensayos *in vitro* de anillo aórtico impidió la consideración del nitrito como un vasodilatador fisiológico (Lauer *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 98, 12814-9, 2001; Pawloski, N Engl J Med 349, 402-5; respuesta del autor 402-5, 2003; McMahon, N Engl J Med 349, 402-5, respuesta del autor 402-5, 2003).

Dos décadas después, en estudios fisiológicos humanos, se observaron diferencias entre el nitrito arterial y venoso a lo largo del antebrazo humano produciéndose una mayor extracción durante la inhalación de NO y el estrés de ejercicio con una inhibición concomitante de la NO sintasa (Gladwin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 97, 11482-7, 2000). Este descubrimiento sugirió que el nitrito se estaba metabolizando a lo largo del antebrazo con un mayor consumo durante el ejercicio. Basándose en estas observaciones junto con los datos de varios investigadores que identificaron mecanismos para una reducción no enzimática (desproporcionación de nitrito) (Zweier *et al.*, Nat Med 1, 804-9, 1995) y enzimática (xantina oxidoreductasa) (Zweier *et al.*, Nat Med 1, 804-9, 1995; Millar *et al.*, FEBS Lett 427, 225-8, 1998; Tiravanti *et al.*, J Biol Chem 279:11065-11073, 2004; Li *et al.*, J Biol Chem, 279(17):16939-16946, 2004) de nitrito a NO, los presentes solicitantes propusieron la hipótesis de que el nitrito se reduce *in vivo* a NO en tejidos en condiciones de baja PO₂ o de bajo pH. Los presentes solicitantes encontraron apoyo para esta hipótesis en estudios de voluntarios humanos normales en los que una infusión de nitrito en el antebrazo produjo una notable vasodilatación incluso en condiciones basales a concentraciones de nitrito casi fisiológicas (Ejemplo 1; Cosby *et al.*, Nat Med 9, 1498-505, 2003). El mecanismo de esta vasodilatación fue consecuente con una reacción del nitrito con la hemoglobina desoxigenada para formar NO, methemoglobin (Cosby *et al.*, Nat Med 9, 1498-505, 2003; Nagababu *et al.*, J Biol Chem 278, 46349-56, 2003) y otros aductos de NO.

Esta actividad nitrito reductasa de la desoxihemoglobina fue caracterizada considerablemente por Doyle y colaboradores en 1981 (Doyle *et al.*, J Biol Chem 256, 12393-8, 1981): el nitrito parece reaccionar con la desoxihemoglobina y un protón para formar NO y methemoglobin. Esta química es idealmente adecuada para la generación hipódica de NO a partir de nitrito, ya que la reacción mejora por la desoxigenación de la hemoglobina y un medio ácido, proporcionando una producción graduada de NO a partir del nitrito asociada a cambios fisiológicos en el oxígeno y pH/CO₂. La observación en este ejemplo de que el nitrito inhalado genera hierro-nitrosil-hemoglobina y gas NO exhalado y produce vasodilatación en proporción a la reducción de los niveles de oxigenación y pH, indica adicionalmente que el nitrito es una reserva de almacenamiento biodisponible del NO y que la hemoglobina puede tener una función fisiológica como una nitrito reductasa, pudiendo contribuir a la vasodilatación hipódica (véase el Ejemplo 1). Además de estas consideraciones mecánicas, este ejemplo confirma otra aplicación terapéutica del nitrito, que se extiende más allá de su papel bien establecido en el tratamiento del envenenamiento por cianuro.

En el presente documento (Ejemplo 3) se demuestra que esta reacción bioquímica puede aprovecharse para el tratamiento de la hipertensión pulmonar en el recién nacido, un estado de deficiencia de NO caracterizado por vasoconstricción pulmonar, patofisiología de “shunt” derecha-izquierda, falta de homogeneidad de ventilación/perfusión e hipoxemia sistémica. Se administró nitrito sódico inhalado por medio de un aerosol a corderos recién nacidos con hipertensión pulmonar hipódica y normódica. El nitrito inhalado indujo una reducción rápida y sostenida (~60%) en la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia, una magnitud que se aproximaba a la de los efectos de la inhalación de 20 ppm de gas NO y que se asociaba con la aparición inmediata de niveles crecientes de NO en el gas inspiratorio. La vasodilatación pulmonar inducida por el nitrito aerosolizado era dependiente de la desoxihemoglobina y del pH y estaba asociada con un aumento de los niveles sanguíneos de hierro-nitrosilación de la hemoglobina. De forma significativa, desde un punto de vista terapéutico, la administración a corto plazo de nitrito disuelto en solución salina por medio de nebulización produjo una vasodilatación pulmonar selectiva y sostenida sin un aumento apreciable en los niveles sanguíneos de methemoglobin. Estos datos confirman el paradigma de que el nitrito es un vasodilatador que actúa a través de la conversión en NO, un proceso acoplado a la desoxigenación y protonación de la hemoglobina, y además muestra una posible terapia nueva, sencilla y barata para la hipertensión pulmonar en el recién nacido.

El nitrito aerosolizado es un vasodilatador eficaz en el modelo de cordero recién nacido descrito (Ejemplo 3). Puede administrarse fácilmente por nebulización y parece presentar un amplio margen terapéutico-de seguridad, con cambios hemodinámicos sistémicos limitados y escasa producción de methemoglobin. Esto presenta una opción terapéutica atractiva al NO inhalado. El nitrito es un agente “productor de NO” ideal ya que 1) es un compuesto natural en la sangre, el fluido de revestimiento alveolar y los tejidos, y 2) no tiene ningún grupo saliente del compuesto

ES 2 294 543 T3

parental, tal como los diolatos de diazonio, que requiera un estudio toxicológico considerable antes de la traducción a la enfermedad humana.

El nitrito inhalado es un vasodilatador potente y selectivo de la circulación pulmonar del cordero recién nacido.

- 5 Esto confirma adicionalmente el paradigma de que el nitrito es un vasodilatador dependiente de NO cuya bioactivación está acoplada a la desoxigenación y protonación de la hemoglobina. Esto tiene aplicaciones clínicas en situaciones veterinarias y médicas, incluyendo la hipertensión pulmonar y otros síndromes pulmonares con aparentes deficiencias en NO. Basándose en los datos presentados en este documento, se cree que el nitrito inhalado tendrá eficacia en todas las aplicaciones conocidas y ensayadas del NO inhalado.

10 *Prevención del vasoespasio de arterias cerebrales después de una hemorragia subaracnoidea*

Además, se ha descubierto que la infusión de nitrito puede usarse para prevenir el vasoespasio de arterias cerebrales después de una hemorragia aneurismática (Ejemplo 4). La hemorragia subaracnoidea (SAH) debida a la ruptura de aneurismas intracraneales afecta a 28.000 americanos anualmente. Casi el 70% de los pacientes con SAH aneurismática desarrolla un espasmo severo de las arterias cerebrales el séptimo día después de la SAH. A pesar de la agresiva terapia médica, los déficits neurológicos debidos al vasoespasio siguen siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad. Aunque se entiende poco la etiología del vasoespasio cerebral, cada vez hay más pruebas de que la hemólisis de los eritrocitos en el líquido cefalorraquídeo y la menor disponibilidad del óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador, participan de forma significativa. En varios modelos animales se ha documentado la inversión del vasoespasio por NO o profármacos de NO.

El vasoespasio cerebral retardado (DCV) sigue siendo la causa individual de déficits neurológicos permanentes o de muerte en al menos el 15% de los pacientes después de un tratamiento quirúrgico o endovascular por lo demás satisfactorio para un aneurisma intracraneal roto. La reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) se ha asociado mecánicamente con el desarrollo de DCV. Se usó un sistema modelo de primates para el vasoespasio de arterias cerebrales para determinar si las infusiones de nitrito, un anión natural que reacciona con la desoxihemoglobina para formar NO y S-nitrosotiol, podría prevenir el DCV por medio de reacciones con la hemoglobina perivascular.

30 Como se describe en el Ejemplo 4, las infusiones de nitrito (45 mg/kg y 60 mg/kg al día) que producían niveles sanguíneos de nitrito que variaban de 16 a 60 microM sin formación de methemoglobinina clínicamente significativa (<5%) estaban asociadas con aumentos de los niveles de nitrito en el líquido cefalorraquídeo y con aumentos modestos en las concentraciones sanguíneas de methemoglobinina (del 2% o menores) sin hipotensión sistémica, y reducían significativamente la gravedad del vasoespasio (Figuras 15 y 16). Ninguno de los animales a los que se les había infundido nitrito sódico desarrolló un vasoespasio significativo; la reducción media en el área de R MCA el día 7 después de la SAH fue del 8 ± 9% frente al 45 ± 5%; P<0,001). Los efectos farmacológicos de la infusión de nitrito estaban asociados con la bioconversión del nitrito del líquido cefalorraquídeo en S-nitrosotiol, un potente intermedio donador de NO vasodilatador de la bioactivación del nitrito. No hubo ninguna prueba clínica ni patológica de toxicidad del nitrito.

45 Las infusiones de nitrito sódico subagudas previenen el DCV en un modelo de primate de SAH, y lo hacen sin toxicidad. Estos datos muestran una terapia nueva, segura, barata y diseñada de forma racional para el DCV, una enfermedad para la que actualmente no existe ninguna terapia preventiva.

Los resultados presentados en el presente documento sugieren que la terapia con nitrito sódico puede prevenir las lesiones tisulares producidas por productos metabólicos de la hemoglobina, por espasmo vascular o por otros mecanismos de lesión tisular debida a estos productos metabólicos.

50 *Tratamiento o mejora de trastornos cardiovasculares gestacionales o fetales*

Basándose en los resultados presentados en este documento, se cree que el nitrito, particularmente las sales farmacéuticamente aceptables del nitrito descritas en este documento, pueden usarse para tratar la hipertensión y la pre-eclampsia durante el embarazo. Esta terapia incluiría la acción de nitritos en vasos sanguíneos espásticos y enfermos dentro de la placenta.

También se sugieren usos en métodos para tratar a fetos dentro del útero, particularmente a fetos que padecen anomalías cardiovasculares, hipertensión y un flujo sanguíneo mal dirigido. Se cree que es posible añadir nitritos al líquido amniótico y de esta manera indirectamente al feto, para conseguir una vasodilatación y redistribución del flujo sanguíneo antes del nacimiento. Por medio de esto, podría alterarse el desarrollo y la función del sistema cardiovascular fetal, por ejemplo, promoviendo el flujo sanguíneo al corazón y al cerebro. Para que sea eficaz a largo plazo, se prevé que las realizaciones de esta terapia fetal incluyan la introducción de una o más minibombas osmóticas, que contienen nitrito (por ejemplo nitrito sódico), en la cavidad amniótica para conseguir de esta manera una liberación lenta y sostenida. Por ejemplo, estas minibombas podrían usarse para conseguir la liberación sostenida a lo largo de días y semanas de embarazo.

También se sugieren usos en métodos para tratar a fetos en los que los niveles plasmáticos de nitrito pueden estar reducidos por una incompatibilidad inmune y anemias hemolíticas asociadas. Este tratamiento fetal puede extenderse

ES 2 294 543 T3

al periodo neonatal. La administración en el periodo fetal puede incluir la implantación de minibombas osmóticas cargadas con nitrito en la cavidad amniótica y podría incluir la inhalación de aerosol después del nacimiento.

VIII. Formulaciones y administración

5 A un sujeto se le administran nitritos, incluyendo sus sales, de acuerdo con métodos proporcionados en el presente documento para reducir la presión sanguínea y/o aumentar la vasodilatación en el sujeto. La administración de los nitritos de acuerdo con la presente descripción puede realizarse en una sola dosis, en múltiples dosis y/o de una manera continua o intermitente, dependiendo, por ejemplo, del estado fisiológico del destinatario, de si el objetivo de la administración es terapéutico o profiláctico y de otros factores conocidos por los expertos en la materia. La administración de los nitritos puede ser esencialmente continua durante un periodo preseleccionado de tiempo o puede realizarse en una serie de dosis espaciadas. La cantidad administrada variará dependiendo de diversos factores que incluyen, pero sin limitación, la afección a tratar y el peso, estado físico, estado de salud y edad del sujeto. Estos factores pueden determinarse por un médico empleando modelos animales u otros sistemas de ensayo que estén disponibles en la técnica.

10 Para preparar los nitritos, los nitritos se sintetizan o se obtienen de otra manera y se purifican cuando es necesario o se desea. En algunas realizaciones de la descripción, el nitrito es una sal farmacéuticamente aceptable de nitrito, por ejemplo, nitrito sódico. En algunas realizaciones de la descripción, el nitrito no es nitrito de etilo. En algunas realizaciones de la descripción, el nitrito sódico no está en un dispositivo médico, por ejemplo no está en una endoprótesis vascular (stent). En algunas realizaciones de la descripción, el nitrito no está en forma de un gel. Los nitritos pueden ajustarse a la concentración apropiada y opcionalmente combinarse con otros agentes. El peso absoluto de un nitrito dado incluido en una dosis unitaria puede variar. En algunas realizaciones de la descripción, el nitrito se administra como una sal de un nitrito aniónico con un catión, por ejemplo sodio, potasio o arginina.

15 25 Una o más formas de dosificación unitaria adecuadas incluyendo el nitrito pueden administrarse por una diversidad de rutas que incluyen la vía tópica, oral (por ejemplo en una formulación con un recubrimiento entérico), parenteral (incluyendo subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraperitoneal), rectal, intraamniótica, dérmica, transdérmica, intratorácica, intrapulmonar e intranasal (respiratoria).

30 35 40 Cuando sea apropiado, las formulaciones pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación unitarias discretas y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en las técnicas farmacéuticas. Estos procedimientos incluyen la etapa de mezclar el nitrito con vehículos líquidos, matrices sólidas, vehículos semi-sólidos, vehículos sólidos finamente divididos o combinaciones de los mismos y después, si es necesario, introducir o transformar el producto en el sistema de liberación deseado. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un vehículo, diluyente, excipiente y/o sal que es compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial o inconvenientemente nocivo para el destinatario del mismo. Los compuestos terapéuticos también pueden formularse para la liberación sostenida, por ejemplo, usando microencapsulación (véase el documento WO 94/07529 y la Patente de Estados Unidos N° 4.962.091).

45 50 Los nitritos pueden formularse para administración parenteral (por ejemplo, por inyección, por ejemplo por inyección en forma de bolo o infusión continua) y pueden presentarse en forma de dosificación unitaria en ampollas, jeringas rellenadas previamente, recipientes de infusión de pequeño volumen o recipientes de múltiples dosis. Pueden añadirse conservantes para mantener la vida media de la forma de dosificación. Los nitritos y otros ingredientes pueden formar suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, los nitritos y otros ingredientes pueden estar en forma de polvo, obtenido por aislamiento aséptico de un sólido estéril o por liofilización a partir de una solución, para constituirse con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril sin pirógenos, antes del uso.

55 60 Estas formulaciones pueden contener excipientes y vehículos farmacéuticamente aceptables que están disponibles en la técnica. Por ejemplo, es posible preparar soluciones usando uno o más disolventes orgánicos que sean aceptables desde el punto de vista fisiológico, elegidos, además del agua, entre disolventes tales como acetona, etanol, alcohol isopropílico, glicol éteres tales como los productos vendidos con el nombre "Dowanol", poliglicoles y polietilenglicoles, ésteres de alquilo C₁-C₄ de ácidos de cadena corta, lactato de etilo o isopropilo, triglicéridos de ácidos grasos tales como los productos comercializados con el nombre "Miglyol", miristato de isopropilo, aceites animales, minerales y vegetales, y polisiloxanos.

65 Es posible añadir otros ingredientes tales como antioxidantes, tensioactivos, conservantes, filmógenos, agentes queratolíticos o cornedolíticos, perfumes, aromatizantes y colorantes. Pueden usarse antioxidantes tales como t-butil-hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado y α-tocoferol, y sus derivados.

70 Las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción pueden incluir, como ingredientes opcionales, vehículos, diluyentes, agentes solubilizantes o emulsionantes farmacéuticamente aceptables y sales del tipo disponible en la técnica. Los ejemplos de estas sustancias incluyen soluciones salinas normales tales como solución salina tamponada fisiológicamente y agua. Los ejemplos específicos no limitantes de los vehículos y/o diluyentes que son útiles en las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción incluyen agua y soluciones salinas tamponadas fisiológicamente aceptables tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato. Meramente a modo de ejemplo, la solución

ES 2 294 543 T3

tamponada puede estar a un pH de aproximadamente 6,0-8,5, por ejemplo de aproximadamente 6,5-8,5, aproximadamente de 7-8.

Los nitritos también pueden utilizarse para administración a través del tracto respiratorio. De esta manera, la 5 presente descripción también proporciona formulaciones farmacéuticas de aerosol y formas de dosificación útiles en los métodos descritos en el presente documento. En general, estas formas de dosificación incluyen una cantidad de nitrito eficaz para tratar o prevenir los síntomas clínicos de una afección específica. Cualquier atenuación, por ejemplo una atenuación estadísticamente significativa de uno o más síntomas de una afección que se haya tratado de acuerdo con los métodos descritos en este documento se considera un tratamiento de dicha afección.

10 Para la administración por inhalación, la composición puede tomar la forma de un polvo seco, por ejemplo, una mezcla en polvo del nitrito y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón. La composición en polvo puede presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en cápsulas o cartuchos o, por ejemplo, en gelatina o blísteres a partir de los cuales el polvo puede administrarse con la ayuda de un inhalador, insuflador o un inhalador 15 dosificador (véase, por ejemplo, el inhalador dosificador (MDI) presurizado y el inhalador de polvo seco descrito en Newman, S.P. en *Aerosols and the Lung*, Clarke, S. W y Davia, D. eds., páginas 197-224, Butterworths, London, England, 1984).

20 Los nitritos también pueden administrarse en una solución acuosa, por ejemplo, cuando se administran en una forma de aerosol o inhalada. De esta manera, otras formulaciones farmacéuticas de aerosol pueden incluir, por ejemplo, una solución salina tamponada fisiológicamente aceptable. También puede ser útil en la práctica de la presente descripción un aerosol seco en forma de un compuesto sólido finamente dividido que no se disuelve o suspende en un líquido.

25 Para la administración en el tracto respiratorio, por ejemplo, en el tracto respiratorio superior (nasal) o inferior, por inhalación, los nitritos pueden administrarse convenientemente desde un nebulizador o un envase presurizado u otro medio conveniente de administración de una pulverización de aerosol. Los envases presurizados pueden incluir un propulsor adecuado tal como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionado 30 una válvula para administrar una cantidad medida. Los nebulizadores incluyen, pero sin limitación, los descritos en las patentes de Estados Unidos Nº 4.624.251; 3.703.173; 3.561.444; y 4.635.627. Están disponible sistemas de administración de aerosol del tipo descrito en este documento en numerosas fuentes comerciales, incluyendo Fisons Corporation (Bedford, Mass.) Schering Corp. (Kenilworth, NJ) y American Pharmoscal Co. (Valencia, CA). Para administración intranasal, el agente terapéutico también puede administrarse a través de gotas nasales, un pulverizador 35 líquido, tal como por medio de un atomizador en un frasco de plástico, o un inhalador dosificador. Son atomizadores típicos el Mistometer (Wintrop) y el Medihaler (Riker). Los nitritos también pueden administrarse a través de un sistema de administración ultrasónico. Los nitritos pueden administrarse a través de un tubo endotraqueal. Los nitritos pueden administrarse a través de una máscara facial.

40 La presente descripción también describe una composición farmacéutica envasada tal como un kit u otro recipiente. El kit o recipiente contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de nitrito e instrucciones para usar la composición farmacéutica para tratar una afección.

IX. Terapias combinadas

45 Además, el nitrito también puede usarse en combinación con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes para aliviar el dolor, agentes antiinflamatorios, antihistamínicos y similares, ya sea para las afecciones descritas o para alguna otra afección. A modo de ejemplo, el agente adicional es uno o más seleccionados entre la lista consistente en penicilina, hidroxiurea, butirato, clotrimazol, arginina o un inhibidor de fosfodiesterasa (tal como sildenafilo).

50 Generalmente, se cree que las terapias que se ha sugerido o demostrado que son eficaces cuando se combinan con la terapia con NO, también pueden ser eficaces cuando se combinan con la administración de nitrito. Es probable que todas las terapias combinadas que se han estudiado con la terapia de NO (inhalado o de otra manera) serán dignas de estudio en combinación con la terapia de nitrito. Véase, por ejemplo, Uga *et al.*, Pediatr. Int. 46 (1): 10-14, 2004; Gianetti *et al.*, J Thorac. Cardiov. Sur. 127 (1): 44-50, 2004; Stubbe *et al.*, Intens. Care Med. 29 (10): 1790-1797, 2003; Wagner *et al.*, Eur. Herat J 23: 326-326 Suppl. 2002; Park *et al.*, Yonesi Med J 44 (2): 219-226, 2003; Kohele, Israel Med. Assoc. J. 5: 19-23, 2003, en relación con las discusiones de terapias combinadas usadas con NO.

60 Además, pueden usarse sales de nitrito farmacéuticamente aceptables (tales como, por ejemplo, nitrito sódico) en combinaciones con fármacos y agentes que limitan la velocidad de eliminación de los nitritos administrados. Esta combinación podría servir para prolongar la duración de la acción del nitrito e incluiría antagonistas e inhibidores de enzimas que afectan a la eliminación de nitritos o su conversión en NO.

65 Como alternativa, el nitrito puede usarse en combinaciones con fármacos y agentes que aumentan la acción de los nitritos. Esta combinación podría servir para aumentar la intensidad de las respuestas a los nitritos administrados.

El activador del plasminógeno tisular recombinante (rt-PA) y la uroquinasa son los únicos fármacos que han demostrado abrir las arterias cerebrales obstruidas en caso de ictus isquémico. Se considera posible que el uso del nitrito

ES 2 294 543 T3

a través de la inactivación de radicales libres de oxígeno producidos en respuesta a la reperfusión pueda proporcionar un efecto beneficioso adicional.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o realizaciones particulares. Estos ejemplos no deben considerarse limitantes de la invención en cuanto a las características o realizaciones particulares descritas.

Ejemplo 1

10 *El nitrito tiene propiedades vasodilatadoras in vivo*

Este ejemplo proporciona una demostración de que el nitrito, administrado por infusión en el antebrazo de seres humanos, es un vasodilatador eficaz.

15 *Métodos*

Protocolo en seres humanos

El protocolo se aprobó por el Institutional Review Board of the National Heart, Lung and Blood Institute, y se obtuvo un consentimiento informado de todos los voluntarios. Nueve hombres y nueve mujeres con una edad media de 33 años (intervalo entre 21 a 50 años) participaron en el estudio. Diez sujetos más volvieron de 3 a 6 meses después para someterse a una segunda serie de experimentos con una infusión de una baja dosis de nitrito. Los voluntarios tenían una concentración de hemoglobina normal y todos tenían una salud general excelente sin factores de riesgo de disfunción endotelial (azúcar sanguíneo en ayunas >120 mg/dl, colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad >130 mg/dl, presión sanguínea >145/95 mmHg, hábito de fumar en los dos últimos años, enfermedad cardiovascular, enfermedad vascular periférica, coagulopatía o cualquier otra enfermedad que predisponga a vasculitis o fenómeno de Raynaud). Se excluyeron los sujetos con deficiencia en G6PD, deficiencia conocida de citocromo B5 o un nivel de methemoglobin basal >1% (ningún sujeto seleccionado cumplió estos criterios de exclusión). Se excluyeron mujeres en periodo de lactancia y embarazadas (se excluyó un sujeto con niveles de HCG positivos). A ningún voluntario se le permitió tomar ninguna medicación (se permitía tomar anticonceptivos orales), suplementos de vitaminas, preparaciones de hierbas, nutracéuticos y otras “terapias alternativas” durante al menos un mes antes del estudio y no se permitió que tomaran aspirina durante la semana previa al estudio.

Mediciones del flujo sanguíneo en el antebrazo

Se pusieron catéteres en al arteria braquial y en la vena antecubital en el brazo, con el catéter intraarterial conectado a un transductor de presión para medir la presión sanguínea y una bomba de infusión que administraba solución salina normal a 1 ml/min. Después de 20 minutos de reposo, se obtuvieron muestras basales de sangre arterial y venosa y se realizaron mediciones del flujo sanguíneo en el antebrazo por plethysmografía de oclusión venosa con sensor de desplazamiento como se ha indicado previamente (Panza *et al.*, Circulation, 87, 1468-74, 1993). Se calculó la media de una serie de 7 mediciones del flujo de sangre para cada determinación del flujo de sangre. Se realizó una serie de mediciones denominadas Partes I y II en orden aleatorio para minimizar el efecto del tiempo sobre la respuesta del flujo sanguíneo en el antebrazo durante la infusión de nitrito.

45 *Medición del flujo sanguíneo y la extracción de nitrito en el antebrazo durante el bloqueo de NO y un ejercicio repetitivo*

Parte I: después de 20 minutos de infusión de solución de NaCl (salina) al 0,9% a 1 ml/min en la arteria braquial, se obtuvieron muestras de sangre arterial y venosa para los ensayos descritos más adelante y se midió el flujo de sangre en el antebrazo. El ejercicio se realizó apretando un “hand-grip” de manera repetitiva a un tercio de la resistencia máxima de apriete predeterminada usando un dinamómetro específico para el “hand-grip” (Technical Products Co.) (Gladwin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 97, 9943-8, 2000; Gladwin *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 97, 11482-11487, 2000; Cannon *et al.*, J Clin Invest, 108, 279-87, 2001). Cada contracción duró 10 segundos y se continuó por una relajación de 5 segundos. Después de 5 minutos de ejercicio, se obtuvieron mediciones del flujo sanguíneo en el antebrazo durante las fases de relajación del ejercicio, y se recogieron muestras de sangre arterial y venosa. Después de un periodo de reposo de 20 minutos con infusión continua de solución salina en la arteria braquial, se obtuvieron muestras de sangre basales repetidas y mediciones del flujo sanguíneo en el antebrazo. Después se infundió L-NMMA a una velocidad de 1 ml/min (8 µmol/min) en la arteria braquial. Después de 5 minutos de infusión de L-NMMA, se midió el flujo de sangre en el antebrazo y se obtuvieron muestras de sangre arterial y venosa. Después se inició el ejercicio del antebrazo en ese brazo durante la infusión continua de L-NMMA. Se midió el flujo de sangre en el antebrazo y se obtuvieron muestras de sangre después de 5 minutos de ejercicio durante la infusión continua de L-NMMA (Figura 1).

Parte II: después de un periodo de reposo de 30 minutos con infusión continua de solución salina, se obtuvieron mediciones basales. Posteriormente se interrumpió la infusión de solución salina y se inició una infusión de nitrito (NaNO₂ a 36 µmol/ml en solución salina al 0,9%) a 1 ml/min. El nitrito sódico para uso en seres humanos se obtuvo en Hope Pharmaceuticals (300 mg en 10 ml de agua) y se diluyeron 286 mg en 100 ml de solución salina al 0,9% por el Hope Pharmaceutical Development Service a una concentración final de 36 µmol/ml. Para los 9 sujetos finales

estudiados, se añadió bicarbonato sódico 0,01-0,03 mM a la solución salina normal para valorar el pH a 7,0-7,4. La solución de nitrito se protegió de la luz y los niveles de nitrito y de gas NO libre en solución se midieron por quimioluminiscencia reductora después de todos los experimentos (Gladwin *et al.*, J Biol Chem, 21, 21, 2002). En las soluciones de nitrito el NO sólo estaba presente en una concentración de $50,5 \pm 40,5$ nM que no se vio afectada por el tamponamiento con bicarbonato. No hubo correlación entre los niveles de NO en las soluciones de nitrito y los efectos sobre el flujo sanguíneo del nitrito ($r = -0,23$, $P = 0,55$). Después de 5 minutos de infusión de nitrito, se obtuvieron mediciones del flujo sanguíneo en el antebrazo y muestras de sangre, con una breve interrupción de la infusión de nitrito para obtener la muestra arterial. Con la infusión de nitrito continuada, se realizó el ejercicio como se ha descrito previamente, obteniéndose mediciones del flujo sanguíneo del antebrazo y muestras de sangre como se ha descrito anteriormente. La infusión de nitrito se interrumpió y se reinició la infusión de solución salina durante el periodo de reposo de 30 minutos posterior. Después de las segundas mediciones basales, se reinició la infusión de nitrito junto con L-NMMA a $8 \mu\text{mol}/\text{min}$. Cinco minutos después, se realizaron mediciones del flujo sanguíneo en el antebrazo y se obtuvieron muestras de sangre seguidas de 5 minutos de ejercicio continuando las infusiones de nitrito y L-NMMA. Posteriormente se obtuvieron mediciones finales del flujo sanguíneo en el antebrazo y muestras de sangre finales. En todos los puntos de tiempo durante la parte II se obtuvieron muestras de sangre de la vena antecubital del brazo contralateral para determinar los niveles de methemoglobina y los niveles sistémicos de hemoglobina modificada con NO (Figura 2, 3 y 4). La dosis total de nitrito sódico infundida fue de $36 \mu\text{mol}/\text{min} \times 15 \text{ minutos} \times 2 \text{ infusions} = 1,08 \text{ mmol} = 75 \text{ mg}$ (PM de NaNO₂ = 69).

En otros estudios en 10 sujetos, las mismas etapas del protocolo de las Partes I y II se continuaron con la infusión de una baja dosis de nitrito (NaNO₂ a $0,36 \mu\text{mol}/\text{ml}$ en solución salina al 0,9%, infundido a 1 ml/min).

Los valores de pH, pO₂ y pCO₂ arteriales y venosos se midieron en la cabecera usando el sistema i-STAT (i-STAT Corporation, East Windsor, NJ) y la concentración de methemoglobina y la saturación de hemoglobina-oxígeno se midieron por cooximetría.

Medición de S-nitroso-hemoglobina y hierro-nitrosil-hemoglobina en glóbulos rojos

La S-nitroso-hemoglobina es inestable en el entorno reductor de los glóbulos rojos y se degrada rápidamente de una forma dependiente de la temperatura y del estado redox, e independiente de la tensión de oxígeno (Gladwin *et al.*, J Bio Chem, 21:21, 2002). Para estabilizar la S-nitroso-hemoglobina para la medición, el glóbulo rojo debe oxidarse rápidamente con ferricianuro. Antes y durante las infusiones de nitrito, se extrajo sangre tanto de la arteria braquial como de la vena antecubital y la sangre entera inmediatamente (en la cabecera para eliminar el tiempo de procesamiento) se lisó 1:10 en una “solución de estabilización” de NO-hemoglobina de PBS que contenía NP-40 al 1% (para solubilizar las membranas), NEM 8 mM (para unirse al tiol libre y prevenir la S-nitrosación artefactual), DTPA 0,1 mM (para quelar las trazas de cobre) y cianuro y ferricianuro 4 mM (para estabilizar la S-nitrosohemoglobina e impedir la hierro-nitrosilación *ex vivo* artefactual durante el procesamiento). Las muestras se desalaron a través de una columna Sephadex G25 con un volumen de lecho de 9,5 ml para eliminar el nitrito y los reactivos en exceso y para purificar parcialmente la hemoglobina (preparación de hemoglobina al 99%). La fracción de hemoglobina se cuantificó por el método de Drabkin y las fracciones de hemoglobina se hicieron reaccionar con y sin cloruro mercúrico (relación de HgCl₂:hemo 1:5 usada para diferenciar el S-nitrosotiol que es lábil al mercurio del hierro-nitrosilo que es estable frente al mercurio) y después en HCl 0,1 M/sulfanilamida al 0,5% (para eliminar el nitrito residual; Marley *et al.*, Free Radic Res, 32, 1-9, 2000). Las muestras después se inyectaron en una solución de triyoduro (I₃-) en línea con un analizador de óxido nítrico quimioluminiscente (analizador de NO Sievers, Modelo 280, Boulder, CO). El pico estable frente al mercurio representa hierro-nitrosil-hemoglobina. Este ensayo es sensible y específico tanto para la S-nitrosohemoglobina como la hierro-nitrosil-hemoglobina a 5 nM en sangre entera (S-NO al 0,00005% por hemo) (Gladwin *et al.*, J Biol Chem, 21, 21, 2002).

El análisis se realizó inicialmente usando un sedimento de glóbulos rojos, sin embargo, a pesar de que la muestra se puso en hielo e inmediatamente se separó el plasma del sedimento de eritrocitos, se formó NO en la sangre venosa *ex vivo*. Para medir los verdaderos niveles *in vivo*, se mezcló sangre entera en la cabecera en una proporción 1:10 con la “solución de estabilización de NO-hemoglobina”. La formación de S-nitroso-albúmina plasmática fue insignificante durante la infusión de nitrito, de forma que este ensayo de sangre entera en la cabecera se usó para limitar el tiempo de procesamiento y de esta manera para caracterizar de forma más precisa la química *in vivo*. En una serie de experimentos de validación, tanto la S-nitroso-hemoglobina como la hierro-nitrosil-hemoglobina fueron estables en la “solución de estabilización de NO-hemoglobina” durante 20 minutos a temperatura ambiente sin formación artefactual o degradación de las especies modificadas con NO ($n = 6$).

Detección quimioluminiscente de gas NO liberado a partir de desoxihemoglobina y eritrocitos desoxigenados después de la adición de nitrito

Para determinar si el radical NO libre puede formarse a partir de la reacción de nitrito y desoxihemoglobina, se mezcló nitrito 100 y 200 mM con 5 ml de eritrocitos desoxigenados 660 y 1000 μM en un recipiente de reacción protegido de la luz purgado con helio u oxígeno (tanto al 21% como al 100%) en línea con un analizador de NO quimioluminiscente (Sievers, Boulder, CO). Después de permitir el equilibrio durante 5 minutos, se inyectó nitrito y se midió la velocidad de producción de NO. Se inyectó nitrito en PBS como control y en hemoglobina 100 μM para controlar la hemólisis en las soluciones de eritrocitos desoxigenados 660 y 1000 μM . Al final de todos los experimentos, se analizaron los espectros de absorción visible del sobrenadante y de la mezcla de reacción de eritrocitos y se

simplificó la composición de hemoglobina usando un algoritmo de mínimos cuadrados. Hubo una hemólisis menor de $100 \mu\text{M}$ en el sistema, sin desnaturalización de hemoglobina, y una formación significativa de hierro-nitrosil-hemoglobina. La producción de NO a partir de las suspensiones de eritrocitos superaba a la producida a partir del control de hemolisado, lo cual es coherente con la exportación de NO desde los eritrocitos.

5

Análisis estadístico

Un cálculo del tamaño de la muestra *a priori* determinó que en el estudio se necesitarían 18 sujetos para detectar una mejora del 25% en el flujo sanguíneo del antebrazo durante la infusión de nitrito cuando la síntesis de NO en el antebrazo se había inhibido por L-NMMA en comparación con los valores de control con infusión de solución salina normal ($\alpha = 0,05$, potencia = 0,80). Los valores de P bilaterales se calcularon por ensayos t de muestras dependientes para las comparaciones por parejas entre los valores basal y de infusión de L-NMMA, entre los valores basales y con ejercicio y entre los valores de nitrito y control con solución salina en puntos de tiempo comparables del estudio. Se realizaron ANOVA de mediciones repetidas para los gradientes de arterial a venoso de las especies de NO durante el periodo basal, la infusión de L-NMMA y las condiciones de ejercicio. Las mediciones mostradas con medias \pm SEM.

Resultados y Discusión

Dieciocho sujetos sanos (9 hombres y 9 mujeres; intervalo de edad de 21 a 50 años) se incluyeron en un estudio fisiológico para determinar si el nitrito es un vasodilatador y para examinar la química *in vivo* del nitrito. La Parte I del protocolo se diseñó para medir las respuestas hemodinámicas y metabólicas normales al ejercicio y a la inhibición de la síntesis de NO dentro del antebrazo como control para la Parte II del protocolo, en la que estas intervenciones se realizaron durante la infusión de nitrito. Las mediciones basales iniciales incluían una presión sanguínea media de $85,6 \pm 3,7 \text{ mmHg}$ y un flujo sanguíneo en el antebrazo de $4,0 \pm 0,3 \text{ ml/min}$ por 100 ml de tejido (Figura 1A). El ejercicio en el antebrazo repetido con un "hand-grip" aumentó el flujo sanguíneo aproximadamente un 600% con respecto a los valores en reposo y redujo significativamente la saturación de hemoglobina-oxígeno venosa ipsilateral, el valor de pO_2 y el pH, lo cual es coherente con un aumento del consumo de oxígeno y la generación de CO_2 . Después de un periodo de reposo de 20 minutos, las mediciones hemodinámicas repetidas mostraron un flujo sanguíneo en el antebrazo aproximadamente un 10% superior, pero no mostraron ningún cambio en la presión sanguínea sistémica o en la saturación de hemoglobina-oxígeno venosa en el antebrazo, el valor de pO_2 y el valor de pH en comparación con los valores basales iniciales (Figura 1B). Después se infundió el inhibidor de la NO sintasa L-NMMA en la arteria braquial a $8 \mu\text{mol}/\text{min}$ durante 5 minutos, reduciéndose significativamente el flujo sanguíneo del antebrazo en aproximadamente un 30% y reduciéndose significativamente la saturación de hemoglobina-oxígeno venosa, el valor de pO_2 y el valor de pH. El ejercicio repetido en el antebrazo durante la infusión continua de L-NMMA aumentó el flujo sanguíneo, pero a un valor máximo significativamente menor en comparación con el ejercicio solo ($P < 0,001$). Además, la saturación de hemoglobina-oxígeno, el valor de pO_2 y el valor de pH fueron significativamente menores durante el ejercicio con L-NMMA que con el ejercicio pero sin inhibición regional de la NO sintasa ($P < 0,001$, $P < 0,005$ y $P = 0,027$, respectivamente). La presión sanguínea arterial media permaneció sin cambios durante todos los componentes de la Parte I del protocolo.

40

La Figura 1 representa las mediciones hemodinámicas y metabólicas en el punto basal y durante el ejercicio, sin (Figura 1A) y con (Figura 1B) inhibición de la síntesis de NO en 18 sujetos. Se muestra la presión arterial media (MAP), el flujo sanguíneo en el antebrazo (FBF) y la saturación de oxihemoglobina venosa, la presión parcial de oxígeno (pO_2) y el pH para todas las condiciones experimentales. Estas intervenciones y mediciones (Parte I del protocolo) sirvieron como control para la Parte II del protocolo, en la que estas intervenciones se realizaron durante la infusión de nitrito.

Para determinar si el nitrito tiene vasoactividad en seres humanos, en la Parte II del protocolo se infundió nitrito sódico en solución salina normal tamponada con bicarbonato (concentración final $36 \mu\text{mol}/\text{ml}$) en las arterias braquiales de esos 18 sujetos para conseguir una concentración intravascular estimada de aproximadamente $200 \mu\text{M}$ (Lauer *et al.*, Proc Acad Sci USA, 98, 12814-9, 2001). Después de realizar mediciones basales repetidas y de la infusión de nitrito sódico a $1 \text{ ml}/\text{min}$ durante 5 minutos, los niveles de nitrito en la vena antecubital ipsilateral aumentaron de $3,32 \pm 0,32$ a $221,82 \pm 57,59 \mu\text{M}$ (Figura 2A). El flujo sanguíneo en el antebrazo aumentó un 175% con respecto a los valores en reposo; la saturación de hemoglobina-oxígeno venosa, el valor de pO_2 y los niveles de pH aumentaron significativamente con respecto a los valores previos a la infusión, lo cual es coherente con una mayor perfusión del antebrazo.

Los niveles sistémicos de nitrito fueron de $16 \mu\text{M}$, medidos en el brazo contralateral, y se asociaron con un efecto sistémico de la reducción de la presión sanguínea media de aproximadamente 7 mmHg . Coherente con la generación inmediata de NO a partir de nitrito durante el tránsito de arterial a venoso, la hierro-nitrosil-hemoglobina en la vena antecubital ipsilateral aumentó de $55,7 \pm 11,4$ a $693,4 \pm 216 \text{ nM}$ durante la infusión de nitrito. Durante el ejercicio en el antebrazo con continuación de la infusión de nitrito, el flujo sanguíneo aumentó adicionalmente, con evidencia de estrés metabólico gracias a la reducción en la saturación de hemoglobina-oxígeno venosa en el antebrazo, el nivel de pO_2 y el nivel de pH con respecto a los valores basales. Los niveles de nitrito venoso se redujeron, lo cual es coherente con el aumento del flujo sanguíneo en el antebrazo diluyéndose la concentración del nitrito infundido. A pesar de la reducción de las concentraciones de nitrito en el antebrazo durante el ejercicio, aumentaron los niveles de hierro-nitrosil-hemoglobina (Figura 2A).

Después del cese de la infusión de nitrito y la sustitución de solución salina como material infundido intraarterial durante 30 minutos, las mediciones basales repetidas mostraron una elevación persistente en los niveles sistémicos de nitrito, hierro-nitrosil-hemoglobina y methemoglobinina (Figura 2B) con respecto a los valores obtenidos antes de la infusión de nitrito casi una hora antes. Además, también era evidente la persistencia de un efecto vasodilatador, ya que el flujo sanguíneo en el antebrazo era significativamente mayor ($4,79 \pm 0,37$ frente a $3,94 \pm 0,38$ ml/min por 100 ml de tejido, $P = 0,003$) y la presión sanguínea sistémica significativamente menor ($82,1 \pm 3,7$ frente a $89,2 \pm 3,5$ mmHg, $P = 0,002$) que los valores iniciales previos a la infusión de nitrito. Durante la reinfusión en la arterial braquial de nitrito sódico a $36 \mu\text{mol}/\text{ml}$, combinado con L-NMMA a $8 \mu\text{mol}/\text{min}$ para inhibir de nuevo la síntesis regional de NO, se observaron efectos vasodilatadores del nitrito sobre el flujo sanguíneo en el antebrazo en reposo y durante el ejercicio similares a los observados durante la infusión de nitrito sin L-NMMA (Figura 2B). Esto se opone al efecto vasoconstrictor de la inhibición de la NO sintasa con L-NMMA observado en la Parte I del protocolo (Figura 1B). Los niveles venosos de nitrito y hierro-nitrosil-hemoglobina siguieron patrones similares durante la inhibición de NO y durante la infusión de nitrito inicial.

La Figura 2 representa los efectos de la infusión de nitrito sódico (NaNO_2) en solución salina normal tamponada con bicarbonato (0,9%; concentración final $36 \mu\text{mol}/\text{ml}$) en las arterias braquiales de 18 sujetos sanos a 1 ml/min durante 5 minutos en el punto basal y continuado durante el ejercicio. La Figura 2A representa los efectos sin la inhibición de la síntesis de NO. La Figura 2B representa los efectos con inhibición de la síntesis de NO. Se muestran valores para la presión sanguínea arterial media (MAP), el flujo sanguíneo en el antebrazo (FBF), la saturación venosa de oxihemoglobina, la presión parcial de oxígeno (pO_2) y el pH, el nitrito venoso, la hierro-nitrosil-hemoglobina venosa y la methemoglobinina venosa para todas las intervenciones experimentales.

Como ensayo de la relevancia fisiológica del nitrito vascular como vasodilatador, las concentraciones de nitrito se redujeron en dos unidades logarítmicas a $400 \text{ nmol}/\text{ml}$. Una infusión de 1 ml/min durante 5 minutos en 10 sujetos aumentó significativamente el flujo sanguíneo en el antebrazo en los 10 sujetos desde $3,49 \pm 0,24$ a $4,51 \pm 0,33$ ml/min por 100 ml de tejido (Figura 3A; $P = 0,0006$). El flujo sanguíneo aumentó significativamente en reposo y durante la inhibición de la NO sintasa con y sin ejercicio (Figura 3B; $P < 0,05$ durante todas las condiciones). Los niveles medios de nitrito venoso aumentaron de $176 \pm 17 \text{ nM}$ a $2564 \pm 462 \text{ nM}$ después de una infusión de 5 minutos y los niveles de nitrito venoso durante el ejercicio aumentaron a $909 \pm 113 \text{ nM}$ (de forma secundaria a los efectos de dilución del aumento del flujo durante el ejercicio; Figura 3C). De nuevo, los efectos vasodilatadores del nitrito fueron paralelos a una formación observada de hierro-nitrosil-hemoglobina y S-nitroso-hemoglobina a lo largo de la circulación en el antebrazo (Figura 3D; descrita más adelante). Estos datos indican que los niveles basales de nitrito, de $150\text{-}1000 \text{ nM}$ en plasma a 10.000 nM en el tejido vascular, contribuyen al tono vascular en reposo y a la vasodilatación hipóxica.

La Figura 3 representa los efectos de la infusión de una baja dosis de nitrito sódico en solución salina normal tamponada con bicarbonato en las arterias braquiales de 10 sujetos sanos en el punto basal y durante el ejercicio, sin y con inhibición de la síntesis de NO. La Figura 3A representa el flujo sanguíneo en el antebrazo en el punto basal y después de 5 minutos de infusión de NaNO_2 ($0,36 \mu\text{mol}/\text{ml}$ en solución salina al 0,9% infundida a 1 ml/min). La Figura 3B representa el flujo sanguíneo en el antebrazo con y sin infusión de una baja dosis de nitrito en el punto basal y durante la infusión de L-NMMA con y sin estrés de ejercicio. La Figura 3C representa los niveles venosos de nitrito determinados a partir de la circulación en el antebrazo en el momento de las mediciones del flujo sanguíneo. La Figura 3D representa los niveles venosos de S-nitroso-hemoglobina (s-NO) y hierro-nitrosil-hemoglobina (Hb-NO) en el punto basal y después de la infusión de nitrito durante el estrés de ejercicio.

La propiedad vasodilatadora del nitrito durante las condiciones basales del flujo, cuando el valor de pO_2 tisular y el valor de pH no son demasiado bajos, era inesperada. Estos resultados indican que los mecanismos hipotetizados previamente para la reducción de nitrito, la desproporciónación de nitrito y la actividad xantina oxidoreductasa, requiriendo ambos un valor de pO_2 y valores de pH extremadamente bajos que no se encuentran típicamente en la fisiología normal, se complementan *in vivo* por factores adicionales que sirven para catalizar la reducción de nitrito. Aunque el ácido ascórbico y otros reductores presentes en abundancia en la sangre pueden proporcionar los electrones necesarios para la reducción del ácido nitroso de tal forma que la reacción pueda producirse a niveles de pH que pueden conseguirse fisiológicamente, en el presente documento se indica que la desoxihemoglobina reduce eficazmente el nitrito a NO, en la mitad del tiempo de circulación. Este mecanismo proporciona una producción graduada de NO junto con el gradiente de oxígeno fisiológico, regulado estrechamente por la desaturación de hemoglobina-oxígeno.

Formación intravascular de NO y S-nitrosotiol por reacción de nitrito con desoxihemoglobina intraeritrocítica

Antes y durante las infusions de nitrito, se extrajo sangre de la arteria braquial y de la vena antecubital, la sangre entera inmediatamente (en la cabecera para eliminar el tiempo de procesamiento) se lisó en una proporción 1:10 en una “solución de estabilización” de NO-hemoglobina y se determinó el contenido de hierro-nitrosil-hemoglobina y S-nitroso-hemoglobina por quimioluminiscencia reductora basada en triyoduro y espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica como se describe en la sección de Métodos. Los niveles basales de S-nitroso-hemoglobina y hierro-nitrosil-hemoglobina estuvieron en los límites de detección ($<50 \text{ nM}$ o $0,0005\%$ de NO por hemo) sin gradientes entre arterial y venoso. Después de la infusión de nitrito en la Parte II del protocolo, los niveles venosos de hierro-nitrosil-hemoglobina y de S-nitroso-hemoglobina se elevaron de forma espectacular (Figura 4A). La formación de los dos aductos de NO-hemoglobina se produjo a lo largo del lecho vascular, siendo la mitad del tiempo circulatorio menor de 10 segundos. La velocidad de formación de NO, medida como hierro-nitrosil- y S-nitroso-hemoglobina y cuantificada por medio de la resta de los niveles arteriales de los niveles venosos multiplicándose la diferencia por el

ES 2 294 543 T3

flujo sanguíneo, aumentó en gran medida durante el ejercicio a pesar de la reducción significativa en la concentración venosa de nitrito secundaria al aumento del flujo sanguíneo que diluía la concentración de nitrito regional (Figura 4A; $P = 0,0006$ para la hierro-nitrosil-hemoglobina y $P = 0,02$ para la S-nitroso-hemoglobina según mediciones repetidas ANOVA).

5 La Figura 4A representa la formación de hierro-nitrosil-hemoglobina (cuadrados negros) y S-nitroso-hemoglobina (círculos rojos) durante la infusión de nitrito en el punto basal, durante la infusión de nitrito y durante la infusión de nitrito con el ejercicio, cuantificada por medio de la resta de los niveles arteriales de los venosos y multiplicando el resultado por el flujo sanguíneo. La formación de los dos aductos de NO-hemoglobina se correlacionaba inversamente 10 con la saturación de hemoglobina-oxígeno en la circulación humana durante la infusión de nitrito (para hierro-nitrosil- hemoglobina $r = -0,7$, $p < 0,0001$, para S-nitroso-hemoglobina $r = -0,45$, $p = 0,04$) (Figura 4B). La saturación de hemoglobina-oxígeno se midió a partir de la vena antecubital por cooximetría. El asterisco en todas las figuras significa $P < 0,05$ para un ensayo t para muestras dependientes o un análisis de varianza de medidas repetidas.

15 Para determinar si el radical NO libre puede formarse por la reacción de nitrito y desoxihemoglobina, se hizo reaccionar nitrito 100 y 200 μM con eritrocitos desoxigenados (volumen de 5 ml que contenía un total de 660 y 1000 μM en hemo) en un recipiente de reacción protegido de la luz purgado con helio conectado con un analizador de NO quimioluminiscente (Seivers, Boulder, CO). Como se muestra en las Figuras 5A y 5B, la inyección de nitrito en una 20 solución de eritrocitos desoxigenados ocasionó la liberación de NO en fase de gas. No hubo liberación de nitrito en el control con tampón en las mismas condiciones y se liberó significativamente menos NO tras la adición de nitrito a eritrocitos oxigenados (21% y 100% de oxígeno). La velocidad observada (determinada por la evaluación del área bajo la curva del aumento de la generación de NO en estado estacionario después de la inyección de nitrito calculada durante 120 segundos) de producción de NO en el volumen de reacción de 5 ml fue coherente con la producción de NO de 47 pM por segundo (correspondiente a una producción de NO estimada de 300 a 500 pM por segundo en 25 sangre entera). Aunque las velocidades de formación de NO en este sistema experimental no pueden extrapolarse a velocidades de formación de NO *in vivo*, los experimentos son consecuentes con dos conceptos importantes: 1) una fracción de NO libre puede escapar a la autocaptura por los grupos hemo restantes; probablemente esto sólo es posible porque el nitrito únicamente se convierte en NO por reacción con desoxihemoglobina y su “grupo saliente” es la proteína met-hemo(férica) que limitará la eliminación e inactivación del NO (Doyle *et al.*, J Biol Chem, 256, 12393-30 12398, 1981); y 2) la velocidad de producción de NO aumenta en condiciones anaerobias, lo cual es consecuente con una reacción de nitrito-desoxihemoglobina.

Ejemplo 2

35 *Efectos citoprotectores del nitrito durante la isquemia-reperfusión del corazón y el hígado*

Como se ha demostrado en el Ejemplo 1, el nitrito se reduce a NO por reacción con desoxihemoglobina junto con el gradiente de oxígeno fisiológico, una química cuya velocidad depende del oxígeno y del pH y que puede contribuir a la vasodilatación hipoxica. Basándose en este descubrimiento inesperado, los presentes solicitantes propusieron que 40 la producción de NO dependiente de hipoxia a partir de nitrito en el tejido isquémico podría limitar la lesión por isquemia-reperfusión. Este ejemplo proporciona una demostración de que las infusiones de nitrito sódico son eficaces para proporcionar citoprotección durante la isquemia-reperfusión del corazón y el hígado.

Aunque la reperfusión de los tejidos isquémicos proporciona oxígeno y sustratos metabólicos necesarios para la recuperación y supervivencia de las células lesionadas reversiblemente, la propia reperfusión realmente acelera la necrosis celular (Braunwald *et al.*, J. Clin. Invest. 76:1713-1719, 1985). La isquemia-reperfusión se caracteriza por la 45 formación de radicales de oxígeno tras la reintroducción de oxígeno molecular en tejidos isquémicos produciéndose modificaciones oxidativas de lípidos y proteínas extendidas de las proteínas celulares, lesiones mitocondriales y apoptosis y necrosis de tejidos (McCord *et al.*, Adv Myocardiol 5: 183-189, 1985). Además, después de la reperfusión de 50 tejidos isquémicos, es posible que el flujo sanguíneo no vuelva de forma uniforme a todas las partes de los tejidos isquémicos, un fenómeno que se ha denominado fenómeno de “no reflujo” (Kloner *et al.*, J Clin Invest 54: 1496-1508, 1974). Se cree que las reducciones del flujo sanguíneo después de la reperfusión contribuyen a las lesiones celulares y a la necrosis (Kloner *et al.*, J Clin Invest 54:1496-1508, 1974). La reintroducción repentina de sangre en un tejido 55 isquémico también produce un aumento espectacular en la liberación de calcio al tejido previamente isquémico (es decir, la “paradoja del calcio”) que tiene como resultado una ruptura masiva del tejido, liberación de enzimas, reducciones en las reservas de fosfato de alta energía, lesiones mitocondriales y necrosis (Nayler, Amer. J. Path. 102: 262, 1981; Shen *et al.*, Amer. J. Path. 67: 417-440, 1972). Ciertos estudios recientes también han indicado que la lesión por isquemia-reperfusión también se caracteriza por una respuesta inflamatoria inapropiada en la microcirculación que produce interacciones de leucocitos-células endoteliales que están mediadas por la regulación positiva tanto de 60 leucocitos como de moléculas de adhesión de células endoteliales (Lefer *et al.*, Cardiovasc Res 32: 743-751, 1996; Entman *et al.*, Faseb J 5:2529-2537, 1991). Se han centrado intensos esfuerzos de investigación en la mejora de diversos componentes patofisiológicos de la lesión por isquemia-reperfusión para limitar el grado de lesión y de necrosis tisular.

65 Se ha demostrado que el NO, los donadores de NO y la activación o sobreexpresión transgénica de la NO sintasa ejercen efectos protectores sobre este proceso en varios modelos (Lefer *et al.*, New Horiz 3:105-112, 1995; Lefer *et al.*, Circulation 88: 2337-2350, 1993; Nakanishi *et al.*, Am J Physiol 263:H1650-1658, 1992; Jones *et al.*, Am J Physiol Heart Circ Physiol 286:H276-282, 2004; Jones *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100:4891-4896, 2003; Kanno *et al.*,

ES 2 294 543 T3

Circulation 101:2742-2748, 2000), pero en otros modelos parecen ser perjudiciales (Fogel *et al.*, J Mol Cell Cardiol 31: 827-836, 1999; Menezes *et al.*, Am J Physiol 277:G144-151, 1999; Woolfson *et al.*, Circulation 91:1545-1551, 1995; Schulz, R. *et al.*, Cardiovasc Res 30: 432-439, 1995). La evaluación de estos estudios sugiere un efecto crítico de la dosis y la duración de la exposición al NO, que tiene como resultado una ventana de seguridad terapéutica estrecha 5 para el NO en la patofisiología de la isquemia-reperfusión (Bolli, J. Mol. Cell. Cardio. 33: 1897-1918, 2001; Wink *et al.*, Am J Physiol Heart Circ Physiol 285:H2264-2276, 2003). Otra limitación es que la formación de NO a partir de la NO sintasa requiere oxígeno como sustrato, una molécula cuya disponibilidad está limitada durante la isquemia.

Por lo tanto, se considera el uso de nitrito en este contexto por las siguientes razones:

- (1) es una sustancia natural sin ningún “grupo saliente” potencialmente tóxico,
- (2) se reduce selectivamente a NO en tejidos con baja tensión de oxígeno y bajos valores de pH (Bryan *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA., 2004; Cosby *et al.*, Nat Med 9:1498-1505, 2003; Nagababu *et al.*, J Biol Chem 278:46349-15 46356, 2003; Tiravanti *et al.*, J Biol Chem 279:11065-11073, 2004; Doyle *et al.*, J Biol Chem 256:12393-12398, 1981; Luchsinger *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100: 461-466, 2003),
- (3) su activación no requiere oxígeno molecular (Cosby *et al.*, Nat Med 9:1498-1505, 2003) y
- (4) se sabe que el NO mantiene las proteínas hemo en un estado reducido y ligado (Herold *et al.*, Free Radic Biol Med 34: 531-545, 2003; Herold *et al.*, J Biol Inorg Chem 6:543-555, 2001; Fernández *et al.*, Inorg Chem 42:2-4, 2003), limita la química oxidativa mediada por el hierro libre y el grupo hemo (Kanner *et al.*, Arch Biochem Biophys 237:314-321, 1985; Kanner *et al.*, Lipids 20:625-628, 1985; Kanner *et al.*, Lipids 27:46-49, 1992), inhibe de forma transitoria la citocromo c oxidasa y la respiración mitocondrial (Torres *et al.*, FEBS Lett 475:263-266, 2000; Brown *et al.*, FEBS Lett 356:295-298, 1994; Cleeter *et al.*, FEBS Lett 345:50-54, 1994; Rakhit *et al.*, Circulation 103:2617-25 2623, 2001), y modula los efectores apoptóticos (Mannick *et al.*, Science 284:651-654, 1999), siendo todos éstos mecanismos que podrían participar en la citotoxicidad posterior a una isquemia severa.

Se evaluaron los efectos de la terapia con nitrito en comparación con controles con vehículo y con nitrato, en modelos murinos bien caracterizados de lesión hepática y miocárdica por isquemia-reperfusión. La siguiente descripción proporciona una fuerte evidencia de un profundo efecto protector del nitrito sobre la necrosis celular y la apoptosis, que se considera mediado por una bioconversión dependiente de hipoxia de nitrito en NO y proteínas nitrosadas.

Materiales y Métodos

Agentes Químicos y Reactivos: el nitrito sódico (S-2252) y el nitrato sódico (S-8170) se obtuvieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Se disolvieron nitrito sódico y nitrato sódico en solución salina tamponada con fosfato y el pH se ajustó a 7,4. En todos los experimentos se administró un volumen final de 50 µl de nitrito sódico o nitrato sódico a los ratones para conseguir concentraciones finales de nitrito circulante de 0,6 a 240 µM, asumiendo un volumen sanguíneo circulante total de 2 ml. Se utilizó sal de potasio de carboxi-PTIO [2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido], un eliminador directo del NO intravascular, para inhibir los efectos dependientes de NO después de la lesión hepática por I/R. Se disolvió carboxi-PTIO (Alexis Biochemicals) en solución salina tamponada con fosfato y se administró por vía intravenosa a una dosis de 1 mg/kg en un volumen de 50 µl 30 minutos antes de la isquemia hepática. Se injectó cinc deuteroporfirina IX-2,4-bisetylenglicol (ZnDBG) (Alexis Biochemicals), un inhibidor de la hemo-oxigenasa-1, i.p. a una dosis de 10 mg/kg en un volumen de 50 µl 30 minutos antes de la inducción de la isquemia hepática.

Animales: todos los ratones utilizados en el presente estudio eran ratones C57BL6/J de 8-10 semanas de edad obtenidos en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). En otros experimentos de lesión hepática por I/R se utilizaron 50 ratones completamente deficientes (-/-) en óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Los ratones eNOS -/- originalmente se donaron generosamente por el Dr. Paul Huang (Mass. General Hospital) y se generaron en la colonia de cría de los presentes solicitantes en LSU-Health Sciences Center. Se utilizaron ratones eNOS -/- que tenían 8-10 semanas de edad.

Protocolo de isquemia-reperfusión (I/R) hepática: el protocolo de I/R hepática se representa en la Figura 6A y se ha descrito previamente (Hines *et al.*, Biochem Biophys Res Común 284:972-976, 2001; Hines *et al.*, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284:G536-545, 2001). Los ratones se anestesiaron con la combinación de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (8 mg/kg) y se realizó una laparotomía en la línea media para exponer el hígado. Después, a los ratones se les injectó heparina (100 µg/kg i.p.) para prevenir la coagulación sanguínea. Se provocó una isquemia en 60 los lóbulos lateral izquierdo y medio del hígado grapando completamente la arteria hepática y la vena porta usando grapas de microaneurismas. Este modelo experimental produce una isquemia hepática segmentaria (70%). Este método de isquemia parcial previene la congestión venosa mesentérica permitiendo la descompresión portal a lo largo de los lóbulos derecho y caudado del hígado. El hígado después se volvió a colocar en la cavidad peritoneal en su localización original durante 45 minutos. El hígado se mantuvo húmedo usando una gasa empapada en solución salina normal al 65 0,9%. Además, la temperatura corporal se mantuvo a 37°C usando una lámpara de calor y controlando la temperatura corporal con una sonda de temperatura rectal. Las cirugías simuladas fueron idénticas con la excepción de que no se redujo el flujo de sangre hepática con una grapa de microaneurisma. La duración de la isquemia hepática fue de 45 minutos en todos los experimentos, después de lo cual se retiraron las grapas de microaneurisma. La duración de la

reperfusión hepática fue de 5 horas en los estudios de los niveles séricos de transaminasas hepáticas (es decir, AST o ALT) y de 24 horas para los estudios de histopatología hepática (tal como infarto hepatocelular).

Determinaciones de las Enzimas Hepáticas: en muestras de suero se analizaron los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) usando un método espectrofotométrico (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo) (Harada *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100:739-744, 2003). Estas enzimas son específicas del hígado y se liberan desde el hígado durante una lesión (Hines *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 284:972-976, 2001; Hines *et al.*, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284:G536-545, 2001).

- 5 *Estudios de Histopatología Hepática:* la histopatología del tejido hepático se realizó como se ha indicado previamente (Hines *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 284:972-976, 2001). Se fijó tejido hepático en formalina tamponada al 10% durante 24 horas, se introdujo en parafina y se tiñeron secciones de 10 µm con hematoxilina y eosina. La puntuación de histopatología se realizó siguiendo un diseño doble ciego en campos de alta potencia aleatorios usando los siguientes criterios:

- 10 0 - sin lesión hepatocelular
 15 1 - lesión leve caracterizada por vacuolización citoplásica y picnosis nuclear focal
 20 2 - lesión moderada con sinusoides dilatados, vacuolización citósica y falta de definición de los bordes intercelulares,
 25 3 - lesión de moderada a severa con necrosis coagulativa, abundante dilatación sinusoidal, extravasación de RBC a los cordones hepáticos, e hipereosinofilia y marginación de neutrófilos,
 4 - necrosis severa con pérdida de arquitectura hepática, desintegración de los cordones hepáticos, hemorragia e infiltración de neutrófilos.

30 La apoptosis hepatocelular se determinó usando el kit de tinción TUNEL de Roche de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En resumen, el tejido hepático de diversos tratamientos se fijó en formalina tamponada y se prepararon secciones de 10 µm. Las secciones se permeabilizaron en hielo durante 2 minutos y se incubaron 50 µl de solución TUNEL durante 30 minutos a 37°C. Las secciones después se trataron con 50 µl de solución de sustrato durante 10 minutos y se montaron bajo cubreobjetos de vidrio. El número de núcleos apoptóticos se determinó a partir de 5 campos aleatorios 40x por muestra. Se analizó un total de 6 muestras por grupo de tratamiento (16 portaobjetos por grupo) y se compararon usando un análisis de varianza de una vía con post-test de Bonferroni.

35 *Protocolo de Isquemia-Reperfusión (I/R) del Miocardio:* se realizó una ligadura quirúrgica de la arteria coronaria principal izquierda (LCA) de manera similar a la indicada en los métodos descritos previamente (Jones *et al.*, Am J Physiol Heart Circ Physiol 286:H276-282, 2004). En resumen, se anestesiaron ratones con inyecciones intraperitoneales de ketamina (50 mg/kg) y pentobarbital sódico (50 mg/kg). Los animales después se fijaron a un tablero quirúrgico con el lado ventral hacia arriba. Los ratones se intubaron por vía oral con un tubo de polietileno PE-90 conectado a un tubo de PE-240 y después conectado a un ventilador de roedores Modelo 683 (Harvard Apparatus, Natick, MA). El volumen tidal se fijó a 2,2 milímetros y la velocidad respiratoria se fijó a 122 respiraciones por minuto. Los ratones se suplementaron con oxígeno al 100% a través del orificio lateral del ventilador. Se realizó una esternotomía media usando un cauterio eléctrico y la arteria coronaria principal izquierda proximal se visualizó y se ligó completamente con sutura de seda 7-0 montada en una aguja afilada (BV-1 ethicon). En los experimentos iniciales del tamaño del infarto de miocardio, la oclusión coronaria se mantuvo durante 30 minutos y después se retiró la sutura y se realizó una reperfusión durante 24 horas. En otros experimentos de la función cardiaca, la LCA proximal se obstruyó completamente durante 45 minutos y posteriormente se retiró la sutura y se realizó la reperfusión durante 48 horas. En estos experimentos se realizó una ecocardiografía bidimensional en el punto basal y de nuevo a las 48 horas de reperfusión.

40 *Determinación del Tamaño del Infarto de Miocardio:* a las 24 horas de reperfusión, los ratones se anestesiaron como se ha descrito previamente, se intubaron y se conectaron a un ventilador de roedores. Se puso un catéter (tubo de PE-10) en la arteria carótida común para permitir la inyección de colorante Azul de Evans. Se realizó una esternotomía media y la arteria coronaria principal izquierda se volvió a ligar en la misma localización que se ha indicado anteriormente. Se inyectó colorante Azul de Evans (1,2 ml de una solución al 2,0%, Sigma Chemical Co.) en el catéter de la arteria carótida para que llegara al interior del corazón con el fin de distinguir la zona isquémica de la zona no isquémica. El corazón se escindió rápidamente y se seccionó en serie por el eje largo en cinco secciones de 1 mm de espesor que después se incubaron en cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio al 1,0% (Sigma Chemical Co.) durante 5 minutos a 37°C para demarcar el miocardio viable y no viable dentro de la zona de riesgo. Se pesaron cada uno de los cinco cortes de miocardio de 1 mm de espesor y se evaluaron las áreas de infarto, riesgo y ventrículo izquierdo no isquémico por un observador siguiendo un diseño ciego y usando planimetría asistida por ordenador (NIH Image 1.57). Todos los procedimientos para determinar el área con riesgo del ventrículo izquierdo y para la determinación del tamaño del infarto se han descrito previamente (Jones *et al.*, Am J Physiol Heart Circ Physiol 286:H276-282, 2004).

45 *Evaluación Ecocardiográfica de la Función del Ventrículo Izquierdo:* se realizó una ecocardiografía transtorácica del ventrículo izquierdo usando un transductor en serie lineal (transductor Linear Array) de 15 MHz (15L8) conectado con una Sequoia C256 (Acuson) en otros grupos de ratones (n = 9 vehículo y n = 10 nitrito) sometidos a 45 minutos de

ES 2 294 543 T3

isquemia de miocardio y 48 horas de reperfusión. Se realizó una ecocardiografía bidimensional en el punto basal y a las 48 horas de reperfusión como se ha descrito previamente (Jones *et al.*, Am J Physiol Heart Circ Physiol 286:H276-282, 2004; Jones *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100:4891-4896, 2003). Los parámetros ventriculares se midieron usando una técnica vanguardista. Se capturaron ecocardiogramas en modo M (velocidad de barrido = 200 mm/seg) a partir de 5 vistas bidimensionales a través del eje corto, del eje largo y paraesternales del ventrículo izquierdo (LV) a nivel papilar medio. El acortamiento fraccional (FS) en porcentaje del LV se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: %FS de LV = ((LVEDD-LVESD)/LVEDD) x 100. Todos los datos se calcularon a partir de 10 ciclos cardíacos por experimento.

10 *Análisis de Transferencia de Western de HO-1:* este análisis de muestras de tejido hepático homogeneizadas (50 µg de proteína total) se realizó usando un mAb de ratón anti-HO-1 (Stressgen, Victoria, BC) a una dilución de 1:3.000 y un Ab secundario de cabra anti-ratón (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) a una dilución de 1:3.000.

15 *Determinación del Nitrito en Sangre y en Tejidos:* para medir el nitrito en sangre, se mezclaron 160 µl de sangre entera con 40 µl de una solución de estabilización de nitrito que contenía ferricianuro 80 mM, N-ethylmaleimida (NEM) 20 mM, 200 µl de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y NP-40 al 0,2% (las concentraciones proporcionadas son después de la mezcla con sangre entera). Después se midió el nitrito en sangre entera usando quimioluminiscencia 20 reductora basada en triyoduro como se ha descrito y validado previamente (Gladwin *et al.*, J Biol Chem 21:21, 2002; Yang *et al.*, Free Radic Res 37:1-10, 2003).

20 El tejido hepático se homogeneizó usando un protocolo modificado publicado por Bryan y colaboradores (Bryan *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2004). El tejido hepático recogido se secó con un papel de filtro seco, se pese y se homogeneizó inmediatamente en tampón que contenía NEM enfriada con hielo (10 mmol/l)/DTPA (2 mmol/l) (dilución 3:1 - p/v). Posteriormente, la mezcla de tampón/tejido se homogeneizó con un homogeneizador de vidrio-vidrio 25 Wheaton. Los homogeneizados de tejido se mantuvieron en hielo y se analizaron antes de que hubieran transcurrido 5 minutos. El homogeneizado posteriormente se inyectó directamente en triyodo para medir la suma de productos de nitrito, los aductos de NO estables frente al mercurio (Rx-NO) y lábiles frente al mercurio (RS-NO). Para determinar los niveles de aductos de NO específicos (Rx-NO y RS-NO), la muestra se hizo reaccionar con y sin cloruro mercúrico 30 5 mM (el RS-NO se transforma en nitrito en presencia de cloruro mercúrico y el Rx-NO es estable) y en ambos casos se trató con sulfanilamida ácida (al 0,5%) para eliminar el nitrito.

35 *Análisis Estadístico:* los datos se analizaron por un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) con análisis post-hoc de Bonferroni usando el software StatView versión 5.0 (SAS Institute, Carey, North Carolina). Los datos se presentan como medias ± error típico de la media (SEM) aceptándose las diferencias como significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

40 *El nitrito intraperitoneal limita la lesión hepática por isquemia-reperfusión (I/R):* la administración intraperitoneal de 1,2-480 nmoles de nitrito sódico (concentración final estimada de 0,6 µM a 240 µM en un volumen sanguíneo total de 2 ml del ratón) durante la isquemia hepática, limitó de forma dependiente de la dosis las elevaciones séricas de transaminasas hepáticas, aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) (Figuras 6B y 6C), produciéndose el efecto máximo a una concentración sistémica calculada de 24 µM (48 nmoles de nitrito añadidos). En un marcado contraste, el tratamiento con solución salina o nitrato sódico (48 nmoles) no ejerció ningún efecto protector en la situación de lesión hepática por I/R. Se realizaron otros estudios para evaluar los efectos del tratamiento con nitrito sobre la lesión hepatocelular en ratones después de una isquemia hepática *in vivo* (45 minutos) y una reperfusión más prolongada (24 horas; Figura 6D, 6E y 6F). La administración de nitrito a una concentración sanguínea final de 24 µM (48 nmoles) redujo significativamente la lesión hepatocelular a las 24 horas de reperfusión en comparación con los animales tratados con solución salina y nitrato. Además, la terapia con nitrito también atenuó significativamente ($p < 0,001$) el grado de apoptosis hepatocelular después de 45 minutos de isquemia hepática y 24 horas de reperfusión 50 (Figura 6F). El grado de apoptosis de células hepáticas en los animales tratados con nitrito sometidos a I/R fue similar a la observada en los animales de control operados de forma simulada ($p = NS$).

55 *El Nitrito Intraventricular Limita la Lesión Miocárdica por Isquemia-Reperfusión:* para determinar si los potentes efectos citoprotectores del nitrito sobre la lesión hepática por isquemia-reperfusión eran generalizables a otros sistemas de órganos, se realizaron estudios para evaluar los posibles efectos cardioprotectores de la terapia aguda con nitrito en situación de oclusión de la arteria coronaria y reperfusión. El protocolo experimental para los estudios de I/R de miocardio se representa en la Figura 7A. La administración de nitrito (48 nmoles) en la cavidad ventricular izquierda 5 minutos antes de la reperfusión, limitó significativamente ($p < 0,001$) el tamaño del infarto de miocardio (Figuras 7B y 7C) en comparación con el tratamiento con 48 nmoles de nitrato. A pesar de que las áreas miocárdicas con riesgo 60 eran similares ($p = NS$ entre grupos), el tamaño del infarto de miocardio por área con riesgo y por ventrículo izquierdo se redujeron en un 67% con la terapia con nitrito en comparación con el nitrato.

65 En otros estudios, los ratones se sometieron a 45 minutos de isquemia de miocardio y 48 horas de reperfusión para evaluar los efectos del tratamiento con nitrito sobre el rendimiento del ventrículo izquierdo (Figuras 7D y 7E). En estos estudios, se midieron tanto la fracción de eyección del miocardio (Figura 7D) como el acortamiento fraccional del miocardio (Figura 7E) usando ecocardiografía bidimensional en el punto basal y después del infarto de miocardio y la reperfusión. La fracción de eyección del miocardio fue similar entre el grupo de estudio tratado con vehículo y el tratado con nitrito en el punto inicial. Después del infarto de miocardio y de la reperfusión, la fracción de eyección fue

significativamente ($p<0,001$ frente al valor basal) menor en el grupo de vehículo salino, aunque permaneció esencialmente sin cambios en los animales tratados con nitrito ($p = \text{NS}$ frente al punto basal). Además, la fracción de eyeccción fue significativamente ($p<0,02$) mayor en el grupo de nitrito en comparación con el grupo de vehículo. Se realizaron observaciones similares para el acortamiento fraccional sin diferencias significativas entre grupos en el punto basal.

- 5 Sin embargo, después del infarto de miocardio y la reperfusión, el acortamiento fraccional del ventrículo izquierdo se redujo significativamente ($p<0,001$ frente al punto basal) en el grupo del vehículo, pero no en el grupo del nitrito ($p = \text{NS}$ frente al punto basal) y fue significativamente mayor ($p<0,02$) en el grupo del nitrito en comparación con el grupo de vehículo.

10 *La Citoprotección Mediada por Nitrito está Asociada con una Reducción Isquémica Aguda del Nitrito a NO y Proteínas S- y N-nitrosadas dentro del Hígado:* de forma consecuente con la reducción descrita previamente de nitrito a NO y S-nitrosotioles en una reacción con desoxihemoglobina y proteínas hemo desoxigenadas (Bryan *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA., 2004; Cosby *et al.*, Nat Med 9:1498-1505, 2003; Nagababu *et al.*, J Biol Chem 278:46349-43656, 2003; Doyle *et al.*, J Biol Chem 256:12393-12398, 1981), un minuto después de la reperfusión, los niveles de nitrito 15 en los hígados de los ratones tratados con solución salina (control) sometidos a isquemia se redujeron de $1,75 \mu\text{M}$ a niveles indetectables ($p<0,001$ frente al grupo simulado) y los niveles de proteínas modificadas con NO estables frente al mercurio (probablemente N-nitrosaminas y hierro-nitrosil proteínas; RxNO) aumentaron hasta aproximadamente 750 nM (Figura 8A; $p<0,001$). Curiosamente, con el tratamiento con nitrito hubo un aumento significativo ($p<0,01$ frente a controles tratados con solución salina) en los niveles hepáticos posteriores a la reperfusión de nitrito (Figura 20 8B), S-nitrosotioles (Figura 8C) y S-nitrosaminas (Figura 8D) en los ratones tratados con nitrito. Estos datos son coherentes con la tesis de que el nitrito se bioactiva durante el estrés hipóxico y son coherentes con recientes estudios de Bryan y colaboradores que demuestran una conversión aguda del nitrito tisular en RSNO y RxNO después de una lesión anóxica sistémica (Proc Natl Acad Sci USA, 2004). Los bajos niveles de nitrito que son citoprotectores (1,2 nmoles a la menor dosis - Figura 6B y 6C) y la descomposición reductora del nitrito hepático “nativo” en los 25 animales de control tratados con solución salina (Figura 8A) sugieren que éste puede ser un mecanismo natural para la producción hipóxica de NO y la citoprotección. De forma consecuente con las cantidades casi fisiológicas de nitrito administradas, los niveles sanguíneos de nitrito no se elevaron significativamente ($594 \pm 83 \text{ nM}$ a $727 \pm 40 \text{ nM}$; $n = 3$; $p = 0,16$) en los ratones tratados con 48 nmoles de nitrito, la dosis más eficaz.

30 *Los Efectos Citoprotectores de Nitrito son Dependientes del NO, Independientes de la NO Sintasa e Independientes de la Hemo-oxigenasa:* confirmando adicionalmente un mecanismo que implica la reducción hipóxica de nitrito a NO, el inhibidor de NO PTIO inhibía completamente los efectos protectores del nitrito en experimentos de diseño factorial completo (Figura 9A). Por el contrario, se observó una citoprotección significativa del nitrito en ratones deficientes en NO sintasa endotelial (eNOS) (Figura 9B; $p<0,001$), lo que sugiere que la producción de NO a partir de nitrito durante 35 la isquemia-reperfusión es independiente de la eNOS. Aunque la expresión de la proteína hemo-oxigenasa 1 se induce significativamente después de la isquemia-reperfusión en este modelo y parece conferir protección (Figura 9C y 9D), en ratones tratados previamente con ZnDPBG (un inhibidor específico y potente de la hemo-oxigenasa 1) el nitrito limitaba significativamente la lesión tisular, lo que sugiere un efecto independiente de la hemo-oxigenasa (Figura 9C; $p<0,05$).

40 Discusión

En este ejemplo, el tratamiento con nitrito aumentaba significativamente los niveles de nitrito hepático y de especies nitros(il)adas (RSNO y RXNO) en comparación con los controles tratados con solución salina y con nitrato, y 45 confería un efecto citoprotector espectacular dependiente de la dosis, limitando la necrosis, la apoptosis y protegiendo la función de los órganos. Sorprendentemente, los niveles de nitrito añadido eran casi fisiológicos, observándose un efecto protector incluso a 1,2 nmoles de nitrito añadido (un nivel sanguíneo calculado de 600 nM), lo que sugiere que esto puede representar un mecanismo protector endógeno que amortigua tensiones metabólicas severas o estrés patofisiológico.

50 Ciertos datos recientes sugieren que las concentraciones de nitrito varían entre la sangre y los diferentes órganos y típicamente están entre la parte superior del intervalo nanomolar y la parte inferior del intervalo micromolar. Sin embargo, hasta hace poco las altas concentraciones necesarias para vasodilatar las preparaciones de anillos aórticos llevaron a su desestimación como una molécula biológicamente activa importante. De hecho, Furchtgott *et al.*, (J Pharmacol. Exper. Thera. 108: 129-143, 1953) demostraron en 1953 que una concentración $100 \mu\text{M}$ de nitrito estimulaba la vasodilatación de preparaciones de anillos aórticos, un proceso que, según se demostró posteriormente, estaba mediado por la activación de la guanilato ciclase soluble (Kimura *et al.*, J Biol Chem 250:8016-8022, 1975; Mittal *et al.*, J Biol Chem 253:1266-1271, 1978; Ignarro *et al.*, Biochim Biophys Acta 631: 221-223, 1980; Ignarro *et al.*, J Pharmacol Exp Ther 218:739-749, 1981). Desde un punto de vista fisiológico, la conversión *in vivo* de nitrito en NO se consideró 55 limitada al estómago y al corazón gravemente isquémico, mientras que la reducción ácida o desproporcionación a valores de pH muy bajos produce vasodilatación en la mucosa gástrica (Gladwin *et al.*, J Clin Invest 113:19-21, 2004; Bjorne *et al.*, J Clin Invest 113:106-114, 2004) y una aparente lesión en el tejido cardíaco y nitrosilación del hierro del grupo hemo (a altas concentraciones de nitrito en preparaciones de corazón isquémico *ex vivo*; Tiravanti *et al.*, J Biol Chem 279:11065-11073, 2004), respectivamente. Aunque se puede producir una reducción de nitrito dependiente de la xantina oxidoreductasa a tensiones de oxígeno muy bajas, la producción de NO a partir de este sistema sólo es detectable en presencia de altas concentraciones de superóxido dismutasa (Li *et al.*, J Biol Chem 279:16939-16946, 2004; Li *et al.*, Biochemistry 42:1150-1159, 2001).

ES 2 294 543 T3

Como se describe en la Figura 6 y Cosby *et al.* (Nat. Med 9:1498-1505, 2003), las infusions de nitrito sódico en la circulación humana produjeron una vasodilatación significativa tanto a concentraciones farmacológicas como a concentraciones casi fisiológicas. La bioactivación de nitrito parecía estar mediada por una actividad nitrito reductasa de la hemoglobina desoxigenada, que finalmente formaba NO y hierro-nitrosil-hemoglobina, y en una menor medida especies de proteínas S-nitrosadas. Basándose en estos datos, se propuso un papel para el nitrito circulante en la mediación de la vasodilatación hipóxica, siendo el sensor de oxígeno en este caso la hemoglobina (Cosby *et al.*, Nat Med 9:1498-1505, 2003). Ahora se ha propuesto que una actividad nitrito reductasa similar de la desoxihemoglobina, desoximoglobin y/u otras proteínas hemo desoxigenadas explica la formación de proteínas nitros(il)adas y la aparente citoprotección dependiente de NO observada durante la isquemia hepática y cardiaca en el presente ejemplo.

Aunque no está claro el mecanismo preciso de cómo confiere el nitrito la protección tisular, por los datos mostrados en la Figura 3 y 9A se deduce un papel crítico para el NO. Los estudios previos del NO y la isquemia-reperfusión han producido informes conflictivos con respecto a los efectos del NO sobre la gravedad de la lesión por I/R, sugiriendo algunos estudios que el NO realmente contribuía a la lesión de reperfusión (Woolfson *et al.*, Circulation 91:1545-1551, 1995; Wink *et al.*, Am J Physiol Heart Circ Physiol 285:H2264-2276, 2003). El laboratorio de los presentes solicitantes ha demostrado previamente que los donadores de NO, así como el precursor de NO, L-arginina, protegen contra la lesión por I/R del miocardio (Lefer *et al.*, New Horiz 3:105-112, 1995; Nakanishi *et al.*, Am J Physiol 263:H1650-1658, 1992; Pabla *et al.*, Am J Physiol 269:H1113-1121, 1995). Más recientemente, los presentes solicitantes demostraron que la gravedad de la lesión por I/R del miocardio está increíblemente exacerbada en ratones eNOS -/- (Jones *et al.*, Am J Physiol 276:H1567-1576, 1999), mientras que los ratones con sobreexpresión de eNOS están protegidos frente al infarto de miocardio y la posterior insuficiencia cardiaca congestiva (Jones *et al.*, Am J Physiol Heart Circ Physiol 286:H276-282, 2004; Jones *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100:4891-4896, 2003; Jones *et al.*, Am J Physiol 276:H1567-1573, 1999).

Los datos conflictivos sobre los efectos del NO sobre la lesión por isquemia-reperfusión pueden estar relacionados con la dosis de NO y las condiciones durante la isquemia y la reperfusión (Bolli, J. Mol. Cell. Cardio. 33:1897-1918, 2001). Hoy en día es bien sabido que los niveles muy altos, no fisiológicos de NO (es decir, la parte superior del intervalo micromolar y el intervalo milimolar) realmente promueven la necrosis celular y la apoptosis (Dimmeler *et al.*, Nitric Oxide 4:275-281, 1997), mientras que los efectos citoprotectores demostrados del NO típicamente implican concentraciones nanomolares o de pocos micromoles de NO (Lefer *et al.*, New Horiz 3:105-112, 1995; Lefer *et al.*, Circulation 88:2337-2350, 1993; Bolli, J. Mol. Cell. Cardio. 33:1897-1918, 2001). Además, los estudios que investigan el NO y los agentes de liberación de NO en condiciones *in vitro* de I/R han notificado de forma coherente efectos perjudiciales del NO (Bolli, J. Mol. Cell. Cardio. 33:1897-1918, 2001), a diferencia de los estudios *in vivo* de I/R que presentaron efectos beneficiosos de la terapia con NO (Lefer *et al.*, New Horiz 3:105-112, 1995; Lefer *et al.*, Circulation 88:1337-2350, 1993). No está claro cómo media el NO la protección, habiéndose publicado múltiples mecanismos, incluyendo la activación de sGC, la inhibición de la citocromo C oxidasa y la inhibición de la captación de calcio mitocondrial perjudicial (Torres *et al.*, FEBS Lett 475:263-266, 2000; Brown *et al.*, FEBS Lett 356:295-298, 1994; Cleeter *et al.*, FEBS Lett 345:50-54, 1994; Rakhit *et al.*, Circulation 103:2617-2623, 2001). Aunque estos datos sugieren que los efectos del nitrito se producen de forma secundaria a la formación del NO, actualmente se desconoce el mecanismo de citoprotección fundamental dependiente de nitrito (Luchsinger *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100:461-466, 2003; Fernández *et al.*, Inorg Chem 42:2-4, 2003; Han *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 99:7763-7768, 2002; Crawford *et al.*, Blood 101:4408-4415, 2003).

Una posibilidad intrigante es la formación intermedia de S-nitrosotioles, que se sabe que se forman a través de reacciones de nitrito con desoxihemoglobina y posiblemente proteínas hemo de los tejidos (Bryan *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2004; Cosby *et al.*, Nat Med 9:1498-1505, 2003; Nagababu *et al.*, J Biol Chem 278:46349-46356, 2003). De forma consecuente con la formación dependiente de hipoxia de S-nitrosotioles en los glóbulos rojos y tejidos a partir del nitrito, los niveles hepáticos de estas especies eran significativamente mayores después de la reperfusión (de uno a treinta minutos) en los hígados expuestos a isquemia y nitrito. Dentro del medio relativamente reductor que existe dentro de las células, los S-nitrosotioles formados a través del nitrito se reducirán rápidamente a NO y activarán a la sGC. Como alternativa, la S-nitrosación y los posteriores efectos sobre la actividad de proteínas críticas importantes en la lesión inducida por I/R y la muerte apoptótica de las células pueden llevar a la protección (Mannick *et al.*, Science 284:651-654, 1999).

Además, los datos presentados aquí revelan una regulación dinámica de las RxNO hepáticas, una reserva de proteínas modificadas con NO estables frente al mercurio que incluyen N-nitrosaminas y hierro-nitrosilos (Bryan *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 2004; Gladwin *et al.*, J Biol Chem 21:21, 2002; Rassaf *et al.*, Free Radic Biol Med 33:1590-1596, 2002), durante la isquemia-reperfusión. En grupos tratados con solución salina, los niveles de RxNO aumentan después de 1 minuto de reperfusión y posteriormente se reducen después de 30 minutos de reperfusión, mientras que se observa una elevación sostenida en los niveles de RxNO en los ratones tratados con nitrito, lo que sugiere que el mantenimiento de RxNO podría ser importante en la protección de tejidos de la lesión por I/R.

En conclusión, los datos presentados en este ejemplo demuestran una función extraordinaria para el anión inorgánico relativamente sencillo nitrito como un potente inhibidor de la lesión hepática y cardiaca por isquemia-reperfusión, como se muestra en un sistema modelo de ratón. Los efectos del nitrito parecen ser dependientes del NO, con una rápida conversión del nitrito en NO y proteínas nitros(il)adas después de la reperfusión. Considerando la seguridad conocida del nitrito como anión natural y como agente terapéutico aprobado por la FDA para el envenenamiento por cianuro, estos datos muestran una terapia nueva, segura y barata para la lesión por isquemia-reperfusión. Esta terapia

ES 2 294 543 T3

podría usarse para prevenir o modular la disfunción de órganos que se produce después de, por ejemplo, una reperfusión del sistema vascular coronario y periférico, una cirugía abdominal de alto riesgo (tal como una reparación de aneurisma aórtico que conduce a una necrosis aguda de los túbulos renales), resucitación cardiopulmonar y, quizás lo más importante, transplante de órganos sólidos.

5

Ejemplo 3

El nitrito nebulizado inhalado es un vasodilatador pulmonar selectivo dependiente de NO y sensible a la hipoxia

10 Este ejemplo proporciona una descripción del uso de nitrito nebulizado inhalado (específicamente nitrito sódico) para tratar la hipertensión pulmonar en el recién nacido.

Basándose en los resultados presentados anteriormente, ahora se sabe que el anión nitrito sanguíneo contribuye a la vasodilatación hipódica por medio de una reacción de generación de óxido nítrico (NO) basada en hemo con desoxihemoglobina y posiblemente otras proteínas hemo. Esta reacción bioquímica puede utilizarse para el tratamiento de la hipertensión pulmonar en el recién nacido, un estado de deficiencia de NO caracterizado por vasoconstricción pulmonar, patofisiología de shunt derecha-izquierda, falta de homogeneidad de ventilación/perfusión e hipoxemia sistémica. Como se muestra en este ejemplo, se administró nitrito sódico inhalado por medio de un aerosol a corderos recién nacidos con hipertensión pulmonar hipódica y normoxica. El nitrito inhalado inducía una reducción rápida y sostenida (~60%) de la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia, una magnitud que se aproximaba a la de los efectos de la inhalación de 20 ppm de gas NO y que estaba asociada con la aparición inmediata de niveles crecientes de NO en el gas espirado. La vasodilatación pulmonar inducida por el nitrito administrado por medio de un aerosol era dependiente de la desoxihemoglobina y del pH y estaba asociada con un aumento de los niveles sanguíneos de hierro-nitrosilación de hemoglobina. De forma significativa, desde el punto de vista terapéutico, la administración de nitrito a corto plazo disuelto en solución salina por medio de la nebulización producía una vasodilatación pulmonar selectiva y sostenida sin un aumento apreciable en los niveles sanguíneos de methemoglobin. Estos datos confirman el paradigma de que el nitrito es un vasodilatador que actúa a través de la conversión en NO, un proceso acoplado a la desoxigenación y protonación de la hemoglobina, y además muestra una terapia nueva, sencilla y barata para la hipertensión pulmonar en el recién nacido. En corderos recién nacidos se comparó el efecto del nitrito sódico nebulizado frente a la solución salina, o NO inhalado, sobre la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia e inducida por fármacos. Como se describe en este ejemplo, el nitrito inhalado forma gas NO que se respira y hierro-nitrosilhemoglobina circulante, y produce un efecto vasodilatador selectivo de la circulación pulmonar. Esta vasoactividad está asociada con el nivel de desaturación de hemoglobina y el pH sanguíneo en el intervalo fisiológico, confirmando el paradigma fisiológico y terapéutico de la hemoglobina como nitrito reductasa asociada a la desoxigenación.

35

Métodos

Los protocolos de los animales se aprobaron por el Institutional Animal Research Committee of Loma Linda University y estaban de acuerdo con las directrices de los institutos nacionales de la salud para uso de animales experimentales.

40 *Preparación de los animales:* después de la inducción de la anestesia con tiopental sódico intravenoso (20 mg/kg), los corderos recién nacidos se intubaron orotraquealmente y se mantuvo la anestesia con halotano al 1% hasta que se pusieron catéteres quirúrgicamente. Posteriormente se interrumpió la administración de halotano y la anestesia se mantuvo con morfina (0,1 mg/kg/h). después de inducir la parálisis con vecuronio (0,1 mg/kg/h), los pulmones se ventilaron mecánicamente estableciendo parámetros iniciales de presiones: 22/6 cm H₂O, frecuencia: 25 respiraciones por minuto, FiO₂: 0,21 y tiempo de inspiración: 0,6 segundos (Sechrist Modelo 100, Sechrist Industries, Anaheim CA, USA). Inicialmente y a lo largo de los experimentos normoxicos, los parámetros de frecuencia, presión de inspiración máxima y FiO₂ del ventilador se ajustaron para mantener SaO₂>95%, PaO₂ a 90-150 Torr y PaCO₂ a 35-45 Torr.

50

Se puso un catéter en la arteria braquial derecha para extraer muestras de sangre preductal para el análisis de los gases y para el análisis químico. Se pasó un catéter de termodilución pediátrico a través de la vena femoral hasta la arteria pulmonar para medir el gasto cardíaco, la presión de enclavamiento capilar pulmonar y la presión de la arteria pulmonar (catéter de termodilución 5.0 Pediatric Swan-Ganz®, Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA, USA).

55

Se pusieron catéteres en la arteria y vena femoral para controlar la presión sanguínea, el ritmo cardíaco y para la administración de fluidos y fármacos. Se puso un termopar en la vena femoral para controlar la temperatura corporal interna, que se mantuvo a 39°C usando una manta calefactora y una lámpara de calor a lo largo de los experimentos.

60

Después de finalizar los experimentos, los corderos se sacrificaron con una solución de eutanasia patentada (Euthasol, Western Medical Supply, Arcadia, CA, USA). En experimentos seleccionados, se realizó una necropsia para verificar la posición de los catéteres (que estaban colocados correctamente en todos los casos) y para determinar si el ductus arteriosus estaba cerrado (que estaba cerrado en todos los casos).

65

Mediciones hemodinámicas: la presión arterial media, la presión media de las arterias pulmonares y la presión venosa central se midieron de forma continua, y la presión de enclavamiento capilar pulmonar se midió de forma intermitente usando transductores de presión calibrados (COBE Laboratories, Lakewood, CO) fijados a cero a nivel torácico medio. El gasto cardíaco se midió a intervalos de 15 minutos a lo largo de todo el estudio por termo dilución

usando un módulo de termodilución Com-2 (Baxter Medical, Irving, CA, USA). Se usaron inyecciones de cinco ml de solución salina enfriada con hielo. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se promediaron para cada punto de tiempo de muestreo. La resistencia vascular pulmonar y la resistencia vascular sistémica se calcularon usando fórmulas convencionales.

- 5 *Análisis sanguíneo de gases y methemoglobinina:* en muestras de sangre (0,3 ml) recogidas a intervalos a lo largo de los experimentos se midieron los valores arteriales y venosos mixtos de pH, PCO₂ y PO₂. Se midieron los gases sanguíneos (ABL3, Radiometer, Copenhagen, Denmark) y también se midieron la saturación de oxihemoglobina y la concentración de hemoglobina usando un hemoxímetro (OSM2 Hemoximeter, Radiometer, Copenhagen, Denmark).
- 10 Las concentraciones de methemoglobinina arterial y venosa mixta se analizaron por fotometría con el hemoxímetro OSM2 usando la misma muestra arterial que en las determinaciones de los gases sanguíneos.

15 *Administración de nitrito, solución salina o gas NO por medio de un aerosol:* en un nebulizador de chorro (Hudson RCI Micro Mist Nebulizer (Hudson Respiratory Care; Temecula, CA), accionado a un caudal constante de 8 l/minuto en todos los experimentos, se introdujeron cinco mililitros de nitrito sódico acuoso (solución 1 mM) o solución salina. La solución de nitrito sódico se nebulizó a una velocidad de 270 µmol/minuto. Los aerosoles se administraron en el ciclo de inspiración del ventilador. En general se cree que cuando se usa un nebulizador de chorro, <10% del fármaco nebulizado se deposita en el pulmón (Coates *et al.*, Chest 119, 1123-30, 2001). Esto se debe al volumen muerto del nebulizador y a la pérdida de fármaco durante la fase de espiración. La deposición en el pulmón depende de la distribución del tamaño de las partículas, que está bajo la influencia del flujo de aire, el volumen de relleno, la solución de fármaco y la temperatura ambiente (Flavin *et al.*, Pediatr Pulmonol 2, 35-9, 1986; Suárez & Hickey, Respir Care 45, 652-66, 2000; Clay *et al.*, Thorax 38, 755-9, 1983; Clay *et al.*, Lancet 2, 592-4, 1983). Éste es un sistema nebulizador clínico sencillo, barato y disponible ampliamente, aunque podrían usarse otros sistemas.

- 25 El gas NO se introdujo en la parte de inspiración del circuito de respiración. La concentración inspirada de NO se midió de forma continua por quimioluminiscencia (CLD 700 AL, Eco Physics Inc, Ann Arbor, MI) en la parte de inspiración del ciclo del ventilador.

30 *Inhalación de aerosoles de nitrito o solución salina durante una vasoconstricción pulmonar inducida por hipoxia.* Se estudiaron siete corderos para demostrar que el nitrito nebulizado es un vasodilatador pulmonar selectivo en corderos recién nacidos hipóticos. Después de la anestesia y la instrumentación, se permitió que los corderos se recuperaran durante 30 a 90 minutos mientras que se controlaban los parámetros hemodinámicos relevantes. Después de obtener las mediciones basales, se indujo un periodo de 30 minutos de hipertensión pulmonar reduciendo el FiO₂ del gas inspirado a 0,12 durante 30 minutos. Diez minutos después de iniciar la hipoxia, se administraron aerosoles de solución salina o de nitrito sódico durante el resto del periodo hipótico. Después de un periodo de recuperación de una hora, se indujo un segundo periodo de 30 minutos de hipoxia de nuevo con aerosoles de solución salina o nitrito sódico administrados durante los últimos 20 minutos. Se extrajeron muestras de sangre arterial para los ensayos de los gases sanguíneos y los ensayos analíticos y las mediciones del gasto cardíaco se realizaron a intervalos regulares.

40 *Inhalación de nitrito durante una hipertensión pulmonar inducida por U46619 en situación normoxica.* Se estudiaron otros seis corderos para evaluar los efectos de la nebulización de nitrito sobre la hipertensión pulmonar normoxica. Se indujo hipertensión pulmonar estable por medio de una infusión de un análogo endoperóxido estable de tromboxano (U46619 - 9,11-didesoxi-11α-epoximetano-prostaglandina F_{2α}, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI). El fármaco se disolvió en solución salina y se administró a una velocidad de 2 µg/kg/min en el catéter venoso femoral durante 30 minutos. El nitrito se nebulizó para inhalación durante los últimos 20 minutos de la infusión (Figura 11).

45 *Comparación de nitrito inhalado y gas NO durante una vasoconstricción pulmonar inducida por hipoxia: eficacia y duración del efecto.* Este protocolo se diseñó para comparar la eficacia del nitrito con el patrón clínico, 20 ppm de gas NO inhalado. Esta concentración de gas NO está en el extremo superior de la dosis terapéutica administrada a lactantes con hipertensión pulmonar primaria (Kinsella & Abman, Semin Perinatol 24, 387-95, 2000; Kinsella *et al.*, Lancet 340, 819-20, 1992), y se ha demostrado que también es eficaz en la inversión de la vasoconstricción hipótica en corderos recién nacidos (Frostell *et al.*, Circulation 83, 2038-47, 1991). Un segundo objetivo fue determinar la duración del efecto de una corta nebulización de nitrito frente a la inhalación de gas NO sobre las mediciones hemodinámicas y fisiológicas durante una vasoconstricción pulmonar prolongada inducida por hipoxia. Después de realizar las mediciones basales, se indujo hipoxia en los corderos como se ha descrito anteriormente durante 35 minutos. Diez minutos después de iniciar la hipoxia, se inició un periodo de 20 minutos de inhalación de gas NO (20 ppm), continuando la hipoxia durante 5 minutos después de cesar la administración de gas NO. Después se dejó que los corderos se recuperaran durante una hora. De nuevo, después de realizar las mediciones basales, se inició un segundo periodo de hipoxia de 90 minutos. Diez minutos después de iniciar la hipoxia, se administró un aerosol de nitrito sódico durante 20 minutos, continuando la hipoxia durante 60 minutos después de cesar la aerosolización de nitrito (Figura 13).

50 *Medición del NO exhalado.* La concentración de NO exhalado se midió con un analizador de NO de quimioluminiscencia (NOA 280, Sievers Instruments, Inc., Boulder, CO). El analizador de quimioluminiscencia se calibró con aire-NO y gas NO (45 partes por millón) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se extrajeron muestras de NO a través de un brazo lateral de Teflon acoplado a un orificio de muestreo en el extremo proximal del tubo endotraqueal a través del cual pasaba el flujo al analizador a 250 ml/min.

En experimentos previos seleccionados, se nebulizó nitrito a través de un circuito ventilador sin que estuviera conectado ningún cordero mientras se media el NO con el analizador de NO de quimioluminiscencia. En ningún experimento la nebulización de nitrito a través del circuito desconectado produjo un aumento en la concentración de NO en el aire ventilado.

- 5 *Medición de los niveles plasmáticos de nitrito y hierro-nitrosil-hemoglobina.* Se extrajo sangre tanto de la arteria braquial como del catéter venoso central y se procesó rápidamente. Se separó el plasma después de una centrifugación, se congeló inmediatamente en hielo seco y después se almacenó a -70°C hasta que se ensayó el nivel de nitrito usando las metodologías de quimioluminiscencia (analizador de NO Sievers modelo 280) como se ha descrito previamente (Cosby *et al.*, Nat Med 9, 1498-505, 2003; Gladwin *et al.*, J Biol Chem 277, 27818-28, 2002; Yang *et al.*, Free Radic Res 37, 1-10, 2003). El sedimento de glóbulos rojos congelado se descongeló, se hizo reaccionar en NEM 8 mM, DTPA 100 µM y ferricianuro 4 mM, se incubó durante 5 minutos y se hizo pasar a través de una columna Sephadex G25 (Yang *et al.*, Free Radic Res 37, 1-10, 2003; Xu *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 100, 11303-8, 2003). La fracción de hemoglobina de la columna G25 se cuantificó por el método de Drabkin (J. Biol. Chem. 112, 51-65, 1935) y se 10 hizo reaccionar en HCl 0,1 M/sulfanilamida al 0,5% para eliminar el nitrito residual. Las muestras posteriormente se 15 inyectaron en una solución de triyoduro (I_3^-) en línea con un analizador de óxido nítrico quimioluminiscente (Sievers, Modelo 280 NO analizar, Boulder, CO). El gas NO se separa en la solución de triyoduro estequiometricamente de la hierro-nitrosil-hemoglobina (Yang *et al.*, Free Radic Res 37, 1-10, 2003).
- 20 *Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica de sangre entera.* Esto se hizo a 110K usando un controlador de la temperatura Bruker 4131VT en un sistema espektrómetro EMX 10/12 EPR fijado a 9,4 GHz, 10 mW, modulación 5G, constante de tiempo de 0,08 s y un tiempo de exploración de 84 s durante 60 G. Cada curva representa 25 una sola exploración de 84 segundos. Las concentraciones de hierro-nitrosil-hemoglobina se calcularon comparando las alturas de un pico a otro con una muestra patrón.
- 25 *Adquisición de datos y análisis.* La presión arterial media, la presión de la arterial pulmonar, la presión venosa central, el ritmo cardíaco, la concentración de NO exhalado y la temperatura corporal interna se midieron de forma continua. Las señales analógicas se digitalizaron a 100 Hz y se almacenaron usando un convertidor analógico-digital (PowerLab SP, ADInstruments, Colorado Springs, CO) y un software de adquisición de datos (Chart v 5.2 para Macintosh, ADInstruments, Colorado Spring, CO). Después de los experimentos, se calcularon los promedios de los valores 30 de presión sanguínea arterial, presión venosa central, ritmo cardíaco y las mediciones de NO exhalado en bloques de 60 segundos.
- 35 *Análisis estadístico:* se compararon seis mediciones de variables fisiológicas por medio de un ANOVA de dos direcciones con mediciones repetidas con grupo y tiempo como factores. El significado de las diferencias se evaluó con un post-test de Dunnett. Las diferencias significativas con respecto al periodo basal se evaluaron usando un ANOVA de una dirección con mediciones repetidas, con los animales individuales y el tiempo como factores. El significado de las 40 diferencias se evaluó adicionalmente con un post-test de Newman-Keul. Los cálculos se realizaron usando GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Se asumió significado estadístico con $P<0,05$. Los datos se presentan como media ± SEM.

Resultados

45 *Propiedades vasodilatadoras pulmonares de nitrito aerosolizado durante una vasoconstricción pulmonar inducida por hipoxia*

Para determinar el efecto del nitrito nebulizado sobre la hipertensión pulmonar hipódica, se instrumentaron siete corderos recién nacidos (2-10 días de edad) con anestesia general y se mantuvieron con ventiladores mecánicos e infusión de morfina. Despues de la estabilización basal, los corderos se sometieron a un periodo de 30 minutos de 50 hipoxia reduciendo el FiO_2 a 0,12. El nitrito o la solución salina nebulizada se administraron durante los últimos 20 minutos del periodo hipódico. El inicio de hipoxia (HbO_2 arterial ~55%) estaba asociado con rápidos aumentos en la presión arterial pulmonar media (de 21 ± 1 a 34 ± 2 mmHg, $P<0,01$) (Figura 10A, 10B) y la resistencia vascular pulmonar (20% ($P<0,01$)) y con una reducción de la resistencia vascular sistémica (~20% ($P<0,01$)). La inhalación de 55 nitrito nebulizado pero no de solución salina (Figura 10A, 10B) produjo una reducción selectiva en la presión arterial pulmonar en un ~60% ($P<0,01$) (Figura 10A, 10C) y redujo la resistencia de la arteria pulmonar en un ~70% ($P<0,05$), pero no tuvo ningún efecto medible sobre la presión sanguínea arterial media (Figura 10A, 10C) o la resistencia vascular sistémica en comparación con los animales de control. La reducción de la presión de la arteria pulmonar con nebulización de nitrito estaba asociada con un aumento progresivo en el NO exhalado de 3 ± 1 a 15 ± 4 ppb (Figura 10A, 10C). El gasto cardíaco, la saturación de oxihemoglobina arterial y los niveles de methemoglobina no 60 cambiaron de forma medible después de la inhalación de nitrito en comparación con los valores durante los 10 minutos precedentes de hipoxia (Figura 10A). El valor de PO_2 arterial no pudo cambiar apreciablemente en el sistema de los presentes solicitantes, ya había una obstrucción experimental.

65 *Propiedades de vasodilatación pulmonar de nitrito aerosolizado durante vasoconstricción pulmonar inducida por fármaco en condiciones normóticas*

Para contrastar los efectos del nitrito nebulizado sobre la presión de la arteria pulmonar en presencia de desoxihemoglobina normal con los efectos en la presencia de hemoglobina oxigenada reducida, se estudiaron los efectos del

ES 2 294 543 T3

nitrito nebulizado en un grupo separado de seis corderos sometidos a hipertensión pulmonar en condiciones normóxicas. Se indujo una hipertensión pulmonar normóxica estable ($\text{SaO}_2 \sim 98\%$) por infusión del análogo endoperóxido de tromboxano (U46619). La infusión intravenosa de U46619 a una velocidad de $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ durante 30 minutos se asoció con rápidos aumentos en la presión arterial pulmonar de 24 ± 1 a $51 \pm 4 \text{ mmHg}$ ($P < 0,001$) (Figura 11). Diez 5 minutos después de iniciar la infusión, la adición de inhalación de nitrito nebulizado produjo una reducción selectiva en la presión arterial pulmonar en un $23 \pm 6\%$ ($P < 0,05$ en comparación con el valor basal de infusión), pero no tuvo ningún efecto sobre la presión sanguínea arterial media o la resistencia vascular sistémica (Figura 11). La reducción en la presión de la arteria pulmonar con nebulización de nitrito se asociaba con un aumento progresivo en el NO 10 exhalado de $4,8 \pm 1,2$ a $10,11 \pm 2,0 \text{ ppb}$ ($P < 0,05$ en comparación con el valor basal, Figura 11). La Figura 2 muestra una comparación de los efectos de la inhalación de nitrito después de 20 minutos sobre la vasoconstricción pulmonar 15 hipódica frente a la normóxica inducida con fármaco. Los cambios en la presión media de la arteria pulmonar y el NO exhalado fueron significativamente mayores con el tratamiento con nitrito durante las condiciones hipódicas. En general, los efectos de la inhalación de nitrito sobre la hipertensión pulmonar normóxica (inducida por tromboxano) fueron menores que los observados con la hipertensión pulmonar hipódica (Figura 10, 11, 12A), lo cual es consecuente con un modelo de potenciación hipoxémica y posiblemente acidémica de la vasoactividad del nitrito.

Dependencia del pH y del oxígeno de la actividad nitrito reductasa de la desoxihemoglobina

Especulamos que la conversión bioquímica de nitrito a NO requiere tanto desoxihemoglobina como protonación. 20 De esta manera, se usaron datos tanto de los experimentos normóxicos como de los experimentos hipódicos para estudiar la influencia de la saturación de hemoglobina y del pH sobre la producción del NO a partir del nitrito. Las mediciones del gas NO exhalado y de la hemoglobina modificada con NO (hierro-nitrosil-hemoglobina) se usaron como dosímetros de la producción de NO y como una medida de los subproductos directos de la reacción por la nitrito 25 reductasa del nitrito y la hemoglobina para producir NO. La Figura 12 demuestra que la hierro-nitrosil-hemoglobina, medida por quimioluminiscencia reductora basada en triyoduro (Figura 12B) y resonancia paramagnética electrónica (Figura 12C), aumentaba sensiblemente por la inhalación de nitrito durante la hipoxia, pero no con vasoconstricción pulmonar normóxica inducida por fármaco. Como se muestra en la Figura 12D, el cambio en la presión media de la arteria pulmonar durante la hipoxia después de la inhalación de nitrito sódico nebulizado estaba relacionada con el pH 30 sanguíneo, estando asociada una mayor vasodilatación con una reducción del pH ($r = 0,57$, $P = 0,055$).

Comparación con el NO inhalado y la duración del efecto

A continuación los presentes solicitantes compararon la eficacia del nitrito con el agente terapéutico estándar actual, el NO gas inhalado. Después de iniciar la hipoxia, los corderos se sometieron a gas NO inhalado (20 ppm) o nitrito nebulizado durante 20 minutos. Los datos de la Figura 13 muestran la duración y la magnitud del efecto de la inhalación del gas NO (Figura 13A) o de la nebulización de nitrito (Figura 13B, 13C) sobre las mediciones hemodinámicas y metabólicas durante la hipoxia. Aunque los dos tratamientos produjeron una reducción pronunciada en la hipertensión pulmonar hipódica, la respuesta al gas NO inhalado fue ligeramente más rápida y la presión pulmonar se aproximaba más al valor basal en contraste con la corrección del 60-70% en la presión inducida por el nitrito. 35 Sistémicamente, la presión sanguínea arterial media y la resistencia se redujeron en una medida similar con los dos tratamientos durante la hipoxia. Sin embargo, con la estabilidad química relativa del anión nitrito en comparación con el gas NO, hubo una vasodilatación sostenida de más de 60 minutos (la duración de la exposición hipódica) después de interrumpir la inhalación de nitrito, mientras que la terminación de la administración de gas NO anuló el efecto vasodilatador en cuestión de segundos (Figura 13A, 13B). El efecto relativamente sostenido de la nebulización de 40 nitrito podría ser ventajoso terapéuticamente, permitiendo la terapia intermitente análoga al tratamiento del asma con agonistas beta-adrenérgicos por medio de un inhalador dosificador. Se muestra el transcurso a lo largo del tiempo de la vasodilatación pulmonar inducida por inhalación de nitrito y los niveles plasmáticos de nitrito (Figura 13C, 13D). 45 En este experimento en el que se rastrearon cambios bioquímicos durante un periodo mayor que en la Figura 10, las concentraciones de methemoglobina (MetHb) aumentaron desde $2,1 \pm 0,1\%$ en el punto basal hasta $2,8 \pm 0,2\%$ después de la nebulización de nitrito ($P < 0,05$).

Discusión

Un descubrimiento importante de este ejemplo es que un breve periodo de inhalación de solución nebulizada de 55 nitrito sódico produce una vasodilatación pulmonar rápida y selectiva durante la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia en corderos recién nacidos. La reducción significativa en presión de la arteria pulmonar después de la nebulización de nitrito se mantuvo cuando la hipoxia se continuó durante más de una hora después de terminar la nebulización de nitrito. En ninguno de los experimentos la inhalación de nitrito produjo hipotensión sistémica, y la elevación de la methemoglobina fue mínima. Desde un punto de vista mecánico, la administración de nitrito estaba asociada con la 60 producción de NO, medida por el gas NO exhalado y la hemoglobina modificada con NO, con respuestas en proporción a los niveles de desaturación de hemoglobina-oxígeno y reducciones en el pH sanguíneo. Estos datos confirman el paradigma de que el nitrito es un vasodilatador dependiente de NO cuya bioactivación está acoplada a la desoxigenación y protonación de la hemoglobina.

La inhalación de NO es el tratamiento estándar actual de la hipertensión pulmonar. La Figura 13 proporciona una 65 comparación de los efectos del gas NO a 20 ppm con los del nitrito aerosolizado. En aproximadamente 5 minutos, el gas NO anulaba eficazmente aproximadamente un 80% de la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia, un efecto que tenía corta duración pero que podía reproducirse cuando se administraba de nuevo 20 minutos después. El nitrito

ES 2 294 543 T3

sódico aerosolizado eliminaba aproximadamente un 60% de la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia. Esta respuesta se observaba consecuentemente en cada uno de los corderos estudiados y persistía a lo largo del período de una hora de hipoxia que se mantenía después de interrumpir la administración del aerosol de nítrito. Los cambios en el flujo sanguíneo pulmonar iban acompañados de cambios correspondientes en la resistencia calculada al flujo

5 sanguíneo a través de los pulmones, indicando que los cambios se realizaban en el sistema vascular pulmonar en lugar de secundariamente a los cambios en el gasto cardíaco o los efectos sistémicos que podrían haber alterado las presiones de perfusión.

10 Los presentes solicitantes demuestran en el presente documento que el nítrito aerosolizado es un agente productor de NO en corderos recién nacidos que puede administrarse fácilmente por nebulización y parece presentar un amplio margen terapéutico-de seguridad, con cambios limitados en la hemodinámica sistémica y una producción de metemoglobinina también limitada. Esto presenta una opción terapéutica atractiva al NO inhalado. El nítrito es un agente “productor de NO” ideal ya que 1) es un compuesto natural presente en la sangre, en el fluido de revestimiento alveolar y en los tejidos, 2) no tiene ningún grupo saliente de compuesto parental, tal como los diolatos de diazonio,

15 25 que requiera un estudio toxicológico de consideración antes de la traducción a la enfermedad humana y 3) ya se ha aprobado para uso humano en kits de antídotos de cianuro. Estas ventajas deben sopesarse con los posibles problemas que podrían producirse con la administración más prolongada, incluyendo la acumulación alveolar de nítrito, la vasodilatación sistémica y el desarrollo de metemoglobinemia.

20 En conclusión, los datos presentados en este ejemplo sugieren que el nítrito inhalado es un vasodilatador potente y selectivo de la circulación pulmonar del cordero recién nacido y confirman adicionalmente el paradigma de que el nítrito, y en particular sales de nítrito tales como el nítrito sódico, es un vasodilatador dependiente de NO cuya bioactivación está acoplada a la desoxigenación y protonación de la hemoglobina. En ninguno de los estudios de los presentes solicitantes el nítrito inhalado produjo hipotensión sistémica o una elevación de los niveles de metemoglobinina.

Ejemplo 4

Uso de infusiones de nítrito para la prevención del vasoespasio de las arterias cerebrales después de una hemorragia subaracnoidea

30 Este ejemplo describe un método para usar la infusión de nítrito para prevenir el vasoespasio de las arterias cerebrales después de una hemorragia intracraneal.

35 La hemorragia subaracnoidea (SAH) debida a una ruptura de aneurismas intracraneales afecta a 28.000 americanos al año. Casi el 70% de los pacientes con SAH aneurismática desarrollan espasmos severos de las arterias cerebrales el séptimo día después de la SAH. A pesar de la terapia médica agresiva, los déficits neurológicos resultantes del vasoespasio siguen siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad. Aunque se sabe poco sobre la etiología del vasoespasio cerebral, cada vez hay más pruebas de que la hemólisis de los eritrocitos en el líquido cefalorraquídeo y la reducción de la disponibilidad de óxido nítrico (NO), un vasodilatador potente, participan de forma significativa. La inversión del vasoespasio por NO o profármacos de NO se ha documentado en varios modelos animales.

40 45 A pesar del medio siglo de investigación y de los ensayos clínicos, el vasoespasio cerebral retardado (DCV) sigue siendo la causa individual de déficits neurológicos permanentes o de muerte en al menos un quince por ciento de los pacientes después de un tratamiento quirúrgico o endovascular por lo demás satisfactorio de la ruptura de aneurismas intracraneales. La reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) se ha asociado mecánicamente con el desarrollo del DCV. Este trabajo se realizó para determinar si las infusiones de nítrito, un anión natural que reacciona con la desoxihemoglobina para formar NO y S-nitrosotiol, podrían prevenir el DCV a través de reacciones con la hemoglobina perivascular.

Métodos

50 El día 0 del estudio se puso un coágulo sanguíneo arterial autólogo en los alrededores de la arteria cerebral media derecha (R MCA) de 14 monos *Cynomolgus* anestesiados. Se infundió por vía intravenosa solución de nítrito sódico (NaNO_2 , 135 mg/día y 180 mg/día, que se aproxima a 45 mg/kg y 60 mg/kg por día) en solución salina al 0,9% ($n = 6$) o solución salina sola ($n = 8$), durante 14 días en animales despiertos a través de una bomba de infusión MiniMed ambulatoria, a 2 $\mu\text{l}/\text{minuto}$. Se realizó un arteriograma cerebral antes de la colocación del coágulo y en los días 7 y 14 para evaluar el DCV. El vasoespasio arteriográfico se definió como una reducción del 25% o mayor en los 14 mm proximales del área de la R MCA medida en la proyección AP del arteriograma cerebral (evaluación con diseño ciego). Desde el día 0 se midió la presión sanguínea arterial media y se recogieron muestras de sangre diariamente; las muestras de líquido cefalorraquídeo se recogieron los días 0, 7 y 14).

Resultados

65 En los animales de control, los niveles de nítrito en el líquido cefalorraquídeo se redujeron de $3,1 \pm 1,5 \mu\text{M}$ a $0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$ a los 7 días y $0,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$ a los 14 días (Figura 14), y los 8 animales desarrollaron un vasoespasio significativo de la R MCA (Figuras 15 y 16), complicado por ictus y muerte en un animal.

ES 2 294 543 T3

Las infusiones de nitrito se asociaron con aumentos en las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo y plasma de nitrito y methemoglobin sanguínea sin hipotensión sistémica (Figura 14), y redujeron significativamente la gravedad del vasoespasio (Figuras 15 y 16; ningún animal desarrollo un vasoespasio significativo; la reducción media en el área de la R MCA el día 7 después de la SAH fue del 8 ± 9% frente al 45 ± 5%; P<0,01). Los efectos farmacológicos de la infusión de nitrito se asociaron con una bioconversión del nitrito del líquido cefalorraquídeo en S-nitrosotiol, un potente donador de NO vasodilatador intermedio en la bioactivación del nitrito. No hubo ninguna prueba clínica o 5 patológica de toxicidad del nitrito.

Conclusiones

10 Las infusiones subagudas de nitrito sódico previenen el DCV en un modelo de primate de SAH y lo hacen sin toxicidad. Estos datos muestran una terapia nueva, segura, barata y diseñada racionalmente para el DCV, una enfermedad para la que actualmente no existe ninguna terapia preventiva.

15 Referencias citadas en la descripción

20 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente Europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.*

25 Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 0189572 A [0003]
- WO 9407529 A [0141]
- US 4962091 A [0141]
- US 4624251 A [0149]
- US 3703173 A [0149]
- US 3561444 A [0149]
- US 4635627 A [0149]

30 Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- **RODRIGUEZ** et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 336-41 [0001]
- **GLADWIN** et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, vol. 97, 9943-8 [0001] [0002] [0160]
- **RASSAF** et al. *Nat Med*, 2003, vol. 9, 481-3 [0001] [0001]
- **RASSAF** et al. *Free Radic Biol Med*, 2002, vol. 33, 1590-6 [0001]
- **RASSAF** et al. *J Clin Invest*, 2002, vol. 109, 1241-8 [0001]
- **SCHECHTER** et al. *J Clin Invest*, 2002, vol. 109, 1149-51 [0001]
- **MILLAR** et al. *Biochem Soc Trans*, 1997, vol. 25, 528S [0001]
- **MILLAR** et al. *FEBS Lett*, 1998, vol. 427, 225-8 [0001] [0125]
- **GODBER** et al. *J. Biol Chem*, 2000, vol. 275, 7757-63 [0001]
- **ZHANG** et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, vol. 249, 767-72 [0001]
- *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, vol. 251, 667 [0001]
- **LI**. *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 24482-9 [0001]
- **LI** et al. *Biochemistry*, 2003, vol. 42, 1150-9 [0001]
- **ZWEIER** et al. *Nat Med*, 1995, vol. 1, 804-9 [0001] [0125] [0125]
- **ZWEIER** et al. *Biochim Biophys Acta*, 1999, vol. 1411, 260-62 [0001]
- **SAMOUILOV** et al. *Arch Biochem Biophys*, 1998, vol. 357, 1-7 [0001]
- **GLADWIN** et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, vol. 97, 11482-11487 [0002]
- **CICINELLI** et al. *Clin Physiol*, 1999, vol. 19, 440-2 [0002]

ES 2 294 543 T3

- **LAUER** et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, vol. 98, 12814-9 [0002] [0004] [0112]
- **IGNARRO** et al. *Biochim Biophys Acta*, 1980, vol. 631, 221-31 [0003]
- 5 • **IGNARRO** et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981, vol. 218, 739-49 [0003] [0124]
- **MOULDS** et al. *Br J Clin Pharmacol*, 1981, vol. 11, 57-61 [0003]
- 10 • **GRUETTER** et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981, vol. 219, 181-6 [0003]
- **MATSUNAGA** et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989, vol. 248, 687-95 [0003]
- 15 • **LAUSTIOLA** et al. *Pharmacol Toxicol*, 1991, vol. 68, 60-3 [0003]
- **RASSAF** et al. *J Clin Invest*, 2002, vol. 169, 1241-8 [0004]
- 20 • Stedman's Medical Dictionary. *Williams and Wilkins*, 1995 [0014]
- The New Oxford American Dictionary. *Oxford University Press*, 2001 [0014]
- 25 • **SAMBROOK** et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 2001 [0014]
 - Hawley's Condensed Chemical Dictionary. 1987 [0014]
 - Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference. *VCH Publishers, Inc.*, 1995 [0014]
 - **DOYLE** et al. *J Biol Chem*, 1981, vol. 256, 12393-12398 [0099] [0103] [0118] [0179] [0183] [0201]
 - 30 • *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 461-6 [0100]
 - **WATANABE** et al. *Acta Med Okayama*, 1981, vol. 35, 173-8 [0100]
 - **KOSAKA** et al. *Biochim Biophys Acta*, 1982, vol. 702, 237-41 [0100]
 - 35 • **KOSAKA** et al. *Environ Health Perspect*, 1987, vol. 73, 147-51 [0100]
 - **REITER** et al. *Nat Med*, 2002, vol. 8, 1383-1389 [0101]
 - 40 • **RODRIGUEZ** et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 336-341 [0103] [0114]
 - **GLADWIN** et al. *J Biol Chem*, 2002, vol. 21, 21 [0103] [0104] [0105] [0161] [0164] [0164] [0195] [0209]
 - 45 • **JIA** et al. *Nature*, 1996, vol. 380, 221-226 [0104]
 - **SHINGLES** et al. *J Bioenerg Biomembr*, 1997, vol. 29, 611-616 [0104]
 - **MAY** et al. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, vol. 279, C1946-1954 [0104]
 - 50 • **COIN** et al. *J Biol Chem*, 1979, vol. 254, 1178-1190 [0104]
 - **LIU** et al. *J Biol Chem*, 1998, vol. 273, 18709-18713 [0104]
 - **HAN** et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, vol. 99, 7763-7768 [0104]
 - 55 • **PAWLOSKI** et al. *Nature*, 2001, vol. 409, 622-626 [0105]
 - **FERNANDEZ** et al. *Inorg Chem*, 2003, vol. 42, 2-4 [0105] [0118] [0183] [0207]
 - **RASSAF** et al. *J Clin Invest*, 2002, vol. 109, 1241-1248 [0105]
 - 60 • **FOX-ROBICHAUD** et al. *J Glitz Invest*, 1998, vol. 101, 2497-2505 [0105]
 - **MCMAHON** et al. *Nat Med*, 2002, vol. 3, 3 [0105]
 - 65 • **CANNON** et al. *J Clin Invest*, 2001, vol. 108, 279-287 [0105]
 - **GLADWIN** et al. *Circulation*, 2003, vol. 107, 271-278 [0105]

ES 2 294 543 T3

- **SCHECHTER** *et al.* *N Engl J Med*, 2003, vol. 348, 1483-1485 [0105]
- **GLADWIN** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, vol. 97, 11432-11487 [0114]
- 5 • **RASSAF** *et al.* *Nat Med*, 2003, vol. 9, 481-483 [0114]
- **BRYAN** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA.*, 2004 [0114] [0208] [0209]
- 10 • **GLADWIN** *et al.* *J Clin Invest*, 2004, vol. 113, 19-21 [0114] [0204]
- **LAUER** *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, vol. 98, 12814-12819 [0114]
- 15 • **MCMAHON**. *N Engl J Med*, vol. 349, 402-405 [0114]
- **PAWLOSKI**. *N Engl J Med*, vol. 349, 402-405 [0114]
- **GLADWIN** *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, vol. 97, 11482-11487 [0114]
- 20 • **BRYAN** *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004 [0114]
- **COSBY** *et al.* *Nat Med*, 2003, vol. 9, 1498-1505 [0114] [0118] [0118] [0183] [0183] [0201] [0205] [0205]
- **NAGABABU** *et al.* *J Biol Chem*, 2003, vol. 278, 46349-46356 [0114] [0118] [0183] [0201] [0208]
- 25 • **TIRAVANTI** *et al.* *J Biol Chem*, 2004, vol. 279, 11065-11073 [0114] [0118] [0125] [0183] [0204]
- **ZWEIER** *et al.* *Nat Med*, 1995, vol. 1, 804-809 [0114]
- 30 • **MILLAR** *et al.* *FEBS Lett*, 1998, vol. 427, 225-228 [0114]
- **ZHANG** *et al.* *Biochem Soc Trans*, 1997, vol. 25, 524S [0114]
- **GODBER** *et al.* *J Biol Chem*, 2000, vol. 275, 7757-7763 [0114]
- 35 • **LI** *et al.* *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 24482-24489 [0114]
- **BRAUNWALD** *et al.* *J. Clin. Invest.*, 1985, vol. 76, 1713-1719 [0116] [0181]
- **MCCORD** *et al.* *Adv Myocardiol*, 1985, vol. 5, 183-189 [0116] [0181]
- 40 • **KLONER** *et al.* *J Clin Invest*, 1974, vol. 54, 1496-1508 [0116] [0116] [0181] [0181]
- **NAYLER**. *Amer. J. Path.*, 1981, vol. 102, 262 [0116] [0181]
- 45 • **SHEN** *et al.* *Amer. J. Path*, 1972, vol. 67, 417-440 [0116] [0181]
- **LEFER** *et al.* *Cardiovasc Res*, 1996, vol. 32, 743-751 [0116] [0181]
- **ENTMAN** *et al.* *Faseb J*, 1991, vol. 5, 2529-2537 [0116] [0181]
- 50 • **LEFER** *et al.* *New Horiz*, 1995, vol. 3, 105-112 [0117] [0182] [0206] [0207] [0207]
- **LEFER** *et al.* *Circulation*, 1993, vol. 88, 2337-2350 [0117] [0182] [0207] [0207]
- 55 • **NAKANISHI** *et al.* *Am J Physiol*, 1992, vol. 263, H1650-1658 [0117] [0182] [0206]
- **JONES** *et al.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, vol. 286, H276-282 [0117] [0182] [0191] [0192] [0206]
- 60 • **JONES** *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 4891-4896 [0117] [0182] [0206]
- **KANNO** *et al.* *Circulation*, 2000, vol. 101, 2742-2748 [0117] [0182]
- **FLOGEL** *et al.* *J Mol Cell Cardiol*, 1999, vol. 31, 827-836 [0117]
- 65 • **MENEZES** *et al.* *Am J Physiol*, 1999, vol. 277, G144-151 [0117] [0182]
- **WOOLFSON** *et al.* *Circulation*, 1995, vol. 91, 1545-1551 [0117] [0182] [0206]

ES 2 294 543 T3

- **SCHULZ**, R. et al. *Cardiovasc Res*, 1995, vol. 30, 432-439 [0117] [0182]
- **BOLLI**. *J. Mol. Cell. Cardio.*, 2001, vol. 33, 1897-1918 [0117] [0182] [0207] [0207] [0207]
- 5 • **WINK** et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, vol. 285, H2264-2276 [0117] [0182] [0206]
- **BRYAN** et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004 [0118] [0183] [0201]
- 10 • **LUCHSINGER** et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 461-466 [0118] [0207]
- **HEROLD** et al. *Free Radic Biol Med*, 2003, vol. 34, 531-545 [0118] [0183]
- 15 • **HEROLD** et al. *J Biol Inorg Chem*, 2001, vol. 6, 543-555 [0118] [0183]
- **KANNER** et al. *Arch Biochem Biophys*, 1985, vol. 237, 314-321 [0118] [0183]
- 20 • **KANNER** et al. *Lipids*, 1985, vol. 20, 625-628 [0118] [0183]
- **KANNER** et al. *Lipids*, 1992, vol. 27, 46-49 [0118] [0183]
- 25 • **TORRES** et al. *FEBS Lett*, 2000, vol. 475, 263-266 [0118] [0183] [0207]
- **BROWN** et al. *FEBS Lett*, 1994, vol. 356, 295-298 [0118] [0183] [0207]
- 30 • **CLEETER** et al. *FEBS Lett*, 1994, vol. 345, 50-54 [0118] [0183] [0207]
- **RAKHIT** et al. *Circulation*, 2001, vol. 103, 2617-2623 [0118] [0183] [0207]
- **MANNICK** et al. *Science*, 999, vol. 284, 651-654 [0118] [0183] [0208]
- 35 • **MASON** et al. *J Neurosurg*, 2000, vol. 93, 99-107 [0119]
- **PLUTA** et al. *Neurosurgery*, 2001, vol. 48, 884-892 [0119]
- **WEYERBROCK** et al. *J. Neurosurgery*, 2003, vol. 99, 728-737 [0120]
- 40 • **WALSH-SUKYS** et al. *Pediatrics*, 2000, vol. 105, 14-20 [0121]
- **LIPKIN** et al. *J Pediatr*, 2002, vol. 140, 306-10 [0121]
- **RUNO; LOYD**. *Lancet*, 2003, vol. 361, 1533-44 [0122]
- 45 • **TREMBATH; HARRISON**. *Pediatr Res*, 2003, vol. 53, 883-8 [0122]
- **RUBIN**. *N Engl J Med*, 1997, vol. 336, 111-7 [0122] [0122]
- **HAWORTH**. *Heart*, 2002, vol. 88, 658-64 [0122]
- 50 • **CLARK** et al. *N Engl J Med*, 2000, vol. 342, 469-74 [0122]
- **ROBERTS** et al. *N Engl J Med*, 1997, vol. 336, 605-10 [0122]
- The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group. *N Engl J Med*, 1997, vol. 336, 597-604 [0122]
- 55 • **SCHREIBER** et al. *N Engl J Med*, 2003, vol. 349, 2099-107 [0122]
- **MARTIN**. *N Engl J Med*, 2003, vol. 349, 2157-9 [0123]
- **JACOBS** et al. *Crit Care Med*, 2002, vol. 30, 2330-4 [0123]
- 60 • **PIERCE** et al. *Bmj*, 2002, vol. 325, 336 [0123]
- **SUBHEDAR** et al. *Lancet*, 2002, vol. 359, 1781-2 [0123]
- **ANGUS** et al. *Pediatrics*, 2003, vol. 112, 1351-60 [0123]
- 65 • **KINSELLA** et al. *Pediatrics*, 2002, vol. 109, 158-61 [0123]

ES 2 294 543 T3

- **GLADWIN.** *J Clin Invest*, 2004, vol. 113, 19-21 [0124]
- **FURCHGOTT; BHADRAKOM.** *J Pharmacol Exp Ther*, 1953, vol. 108, 129-43 [0124]
- 5 • **LAUER** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, vol. 98, 12814-9 [0124]
- **PAWLOSKI.** *N Engl J Med*, vol. 349, 402-5 [0124]
- 10 • **MCMAHON.** *N Engl J Med*, vol. 349, 402-5 [0124]
- **GLADWIN** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, vol. 97, 11482-7 [0125]
- **LI** *et al. J Biol Chem*, 2004, vol. 279 (17), 16939-16946 [0125]
- 15 • **COSBY** *et al. Nat Med*, 2003, vol. 9, 1498-505 [0125] [0125] [0227]
- **NAGABABU** *et al. J Biol Chem*, 2003, vol. 278, 46349-56 [0125]
- **DOYLE** *et al. J Biol Chem*, 1981, vol. 256, 12393-8 [0126]
- 20 • **NEWMAN, S. P.** *Aerosols and the Lung*. 1984, 197-224 [0147]
- **UGA** *et al. Pediatr. Int.*, 2004, vol. 46 (1), 10-14 [0152]
- 25 • **GIANETTI** *et al. J Thorac. Cardiov. Sur.*, 2004, vol. 127 (1), 44-50 [0152]
- **STUBBE** *et al. Intens. Care Med.*, 2003, vol. 29 (10), 1790-1797 [0152]
- 30 • **WAGNER** *et al. Eur. Heart J*, 2002, vol. 23, 326-326 [0152]
- **PARK** *et al. Yonesi Med J*, 2003, vol. 44 (2), 219-226 [0152]
- **KOHELE.** *Israel Med. Assoc. J.*, 2003, vol. 5, 19-23 [0152]
- 35 • **PANZA** *et al. Circulation*, 1993, vol. 87, 1468-74 [0159]
- **GLADWIN** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, vol. 97, 11482-11487 [0160]
- **CANNON** *et al. J Clin Invest*, 2001, vol. 108, 279-87 [0160]
- 40 • **MARLEY** *et al. Free Radic Res*, 2000, vol. 32, 1-9 [0164]
- **LAUER** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, vol. 98, 12814-9 [0170]
- 45 • **FLOGEL** *et al. J Mol Cell Cardiol*, vol. 31, 827-836 [0182]
- **LUCHSINGER** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 461-466 [0183]
- 50 • **HINES** *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2001, vol. 284, 972-976 [0187] [0188] [0189]
- **HINES** *et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, vol. 284, G536-545 [0187] [0188]
- 55 • **HARADA** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 739-744 [0188]
- **JONES** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 4891-4896 [0193]
- **YANG** *et al. Free Radic Res*, 2003, vol. 37, 1-10 [0195] [0227] [0227] [0227]
- 60 • **BRYAN** *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004 [0196]
- *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004 [0201]
- **FURCHGOTT** *et al. J. Pharmacol. Exper. Thera.*, 1953, vol. 108, 129-143 [0204]
- 65 • **KIMURA** *et al. J Biol Chem*, 1975, vol. 250, 8016-8022 [0204]
- **MITTAL** *et al. J Biol Chem*, 1978, vol. 253, 1266-1271 [0204]

ES 2 294 543 T3

- **IGNARRO** et al. *Biochim Biophys Acta*, 1980, vol. 631, 221-231 [0204]
- **IGNARRO** et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981, vol. 218, 739-749 [0204]
- 5 • **BJORNE** et al. *J Clin Invest*, 2004, vol. 113, 106-114 [0204]
- **LI** et al. *J Biol Chem*, 2004, vol. 279, 16939-16946 [0204]
- 10 • **LI** et al. *Biochemistry*, 2001, vol. 42, 1150-1159 [0204]
- **PABLA** et al. *Am J Physiol*, 1995, vol. 269, H1113-1121 [0206]
- 15 • **JONES** et al. *Am J Physiol*, 1999, vol. 276, H1567-1573 [0206]
- **JONES** et al. *Am J Physiol*, 1999, vol. 276, H1567-1573 [0206]
- 20 • **DIMMELER** et al. *Nitric Oxide*, 1997, vol. 4, 275-281 [0207]
- **HAN** et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, vol. 99, 7763-7768 [0207]
- 25 • **CRAWFORD** et al. *Blood*, 2003, vol. 101, 4408-4415 [0207]
- **RASSAF** et al. *Free Radic Biol Med*, 2002, vol. 33, 1590-1596 [0209]
- 30 • **COATES** et al. *Chest*, 2001, vol. 119, 1123-30 [0220]
- **FLAVIN** et al. *Pediatr Pulmonol*, 1986, vol. 2, 35-9 [0220]
- **SUAREZ; HICKEY**. *Respir Care*, 2000, vol. 45, 652-66 [0220]
- 35 • **CLAY** et al. *Thorax*, 1983, vol. 38, 755-9 [0220]
- **CLAY** et al. *Lancet*, 1983, vol. 2, 592-4 [0220]
- **KINSELLA; ABMAN**. *Semin Perinatol*, 2000, vol. 24, 387-95 [0224]
- 35 • **KINSELLA** et al. *Lancet*, 1992, vol. 340, 819-20 [0224]
- **FROSTELL** et al. *Circulation*, 1991, vol. 83, 2038-47 [0224]
- 40 • **GLADWIN** et al. *J Biol Chem*, 2002, vol. 277, 27818-28 [0227]
- **XU** et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, vol. 100, 11303-8 [0227]
- 45 • *J. Biol. Chem.*, 1935, vol. 112, 51-65 [0227]

50

55

60

65

ES 2 294 543 T3

REIVINDICACIONES

1. Uso de nitrito sódico no acidificado en la preparación de un medicamento para tratar o mejorar una afección seleccionada entre:

- (a) lesión por isquemia-reperfusión cerebral, cardiaca o hepática;
- (b) hipertensión pulmonar; o
- (c) vasoespasmo en las arterias cerebrales,

en un sujeto, mediante la reducción de la presión sanguínea y/o un aumento de la vasodilatación en el sujeto.

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho medicamento es para el tratamiento o mejora de una lesión por isquemia-reperfusión cerebral, cardiaca o hepática.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho medicamento es para la administración intravenosa.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, donde dicho nitrito sódico es para la administración a una concentración circulante de aproximadamente 0,6 a 240 μM .

5. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho medicamento es para el tratamiento o mejora de la hipertensión pulmonar.

6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la hipertensión pulmonar es la hipertensión pulmonar neonatal.

7. Uso de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, donde dicho medicamento es para la administración por inhalación.

8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho nitrito sódico está nebulizado.

9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, donde dicho nitrito sódico es para la administración a una velocidad de 270 $\mu\text{mol}/\text{minuto}$.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho medicamento es para el tratamiento o mejora de un vasoespasmo de arterias cerebrales.

11. Uso de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho medicamento es para la administración intravenosa.

12. Uso de acuerdo con la reivindicación 10 ó 11, donde dicho nitrito sódico es para la administración en una proporción de aproximadamente 45 a 60 mg/kg.

13. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el nitrito sódico es para la administración en combinación con al menos un agente adicional.

14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el sujeto es un mamífero.

15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, donde el sujeto es un ser humano.

50

55

60

65

Figura 1A

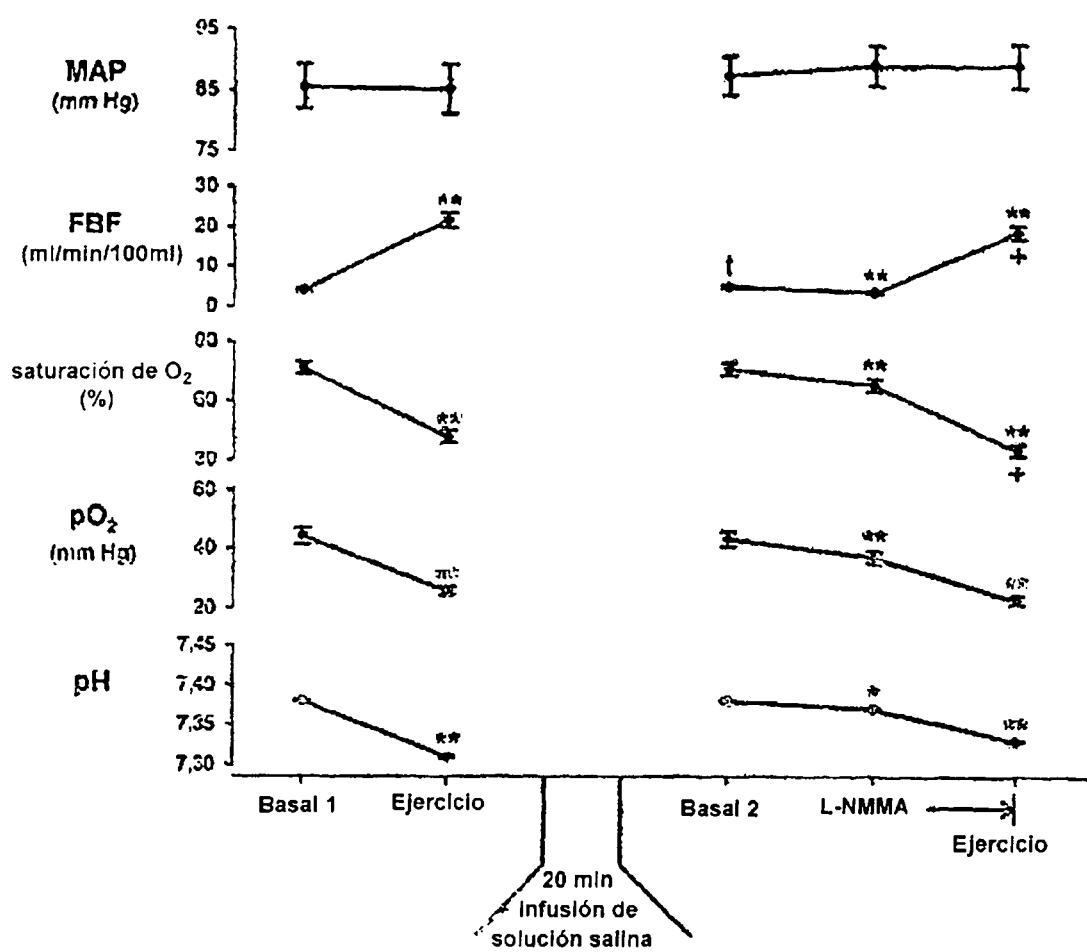


Figura 1B

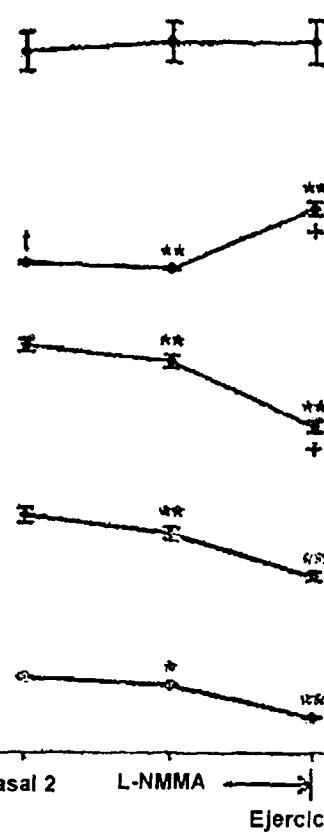


Figura 2A

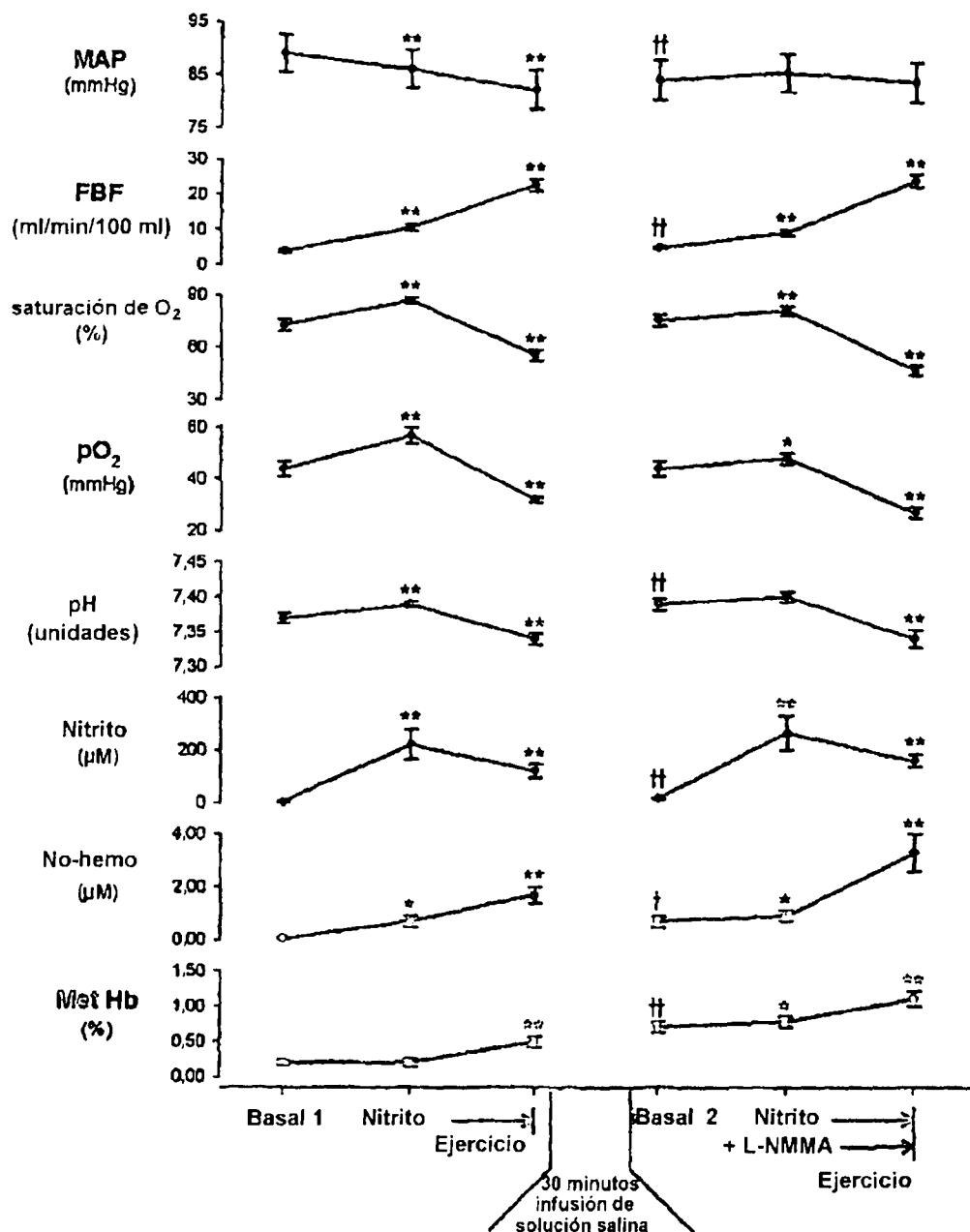


Figura 2B

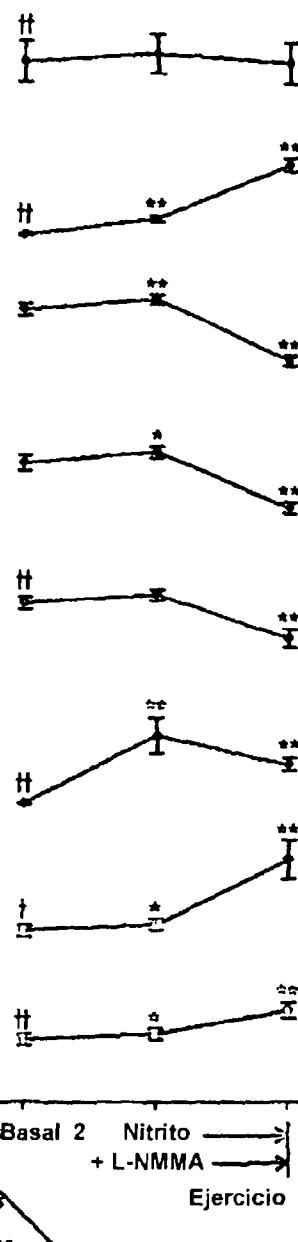


Figura 3A

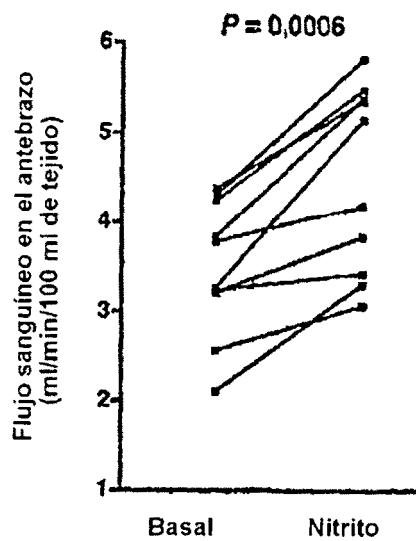


Figura 3B

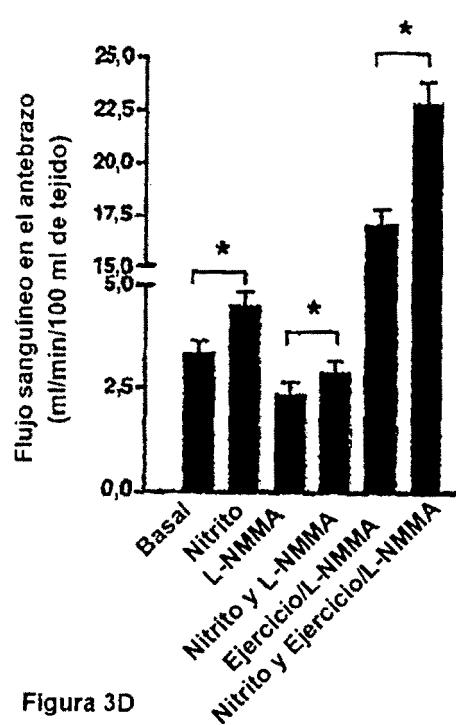


Figura 3C

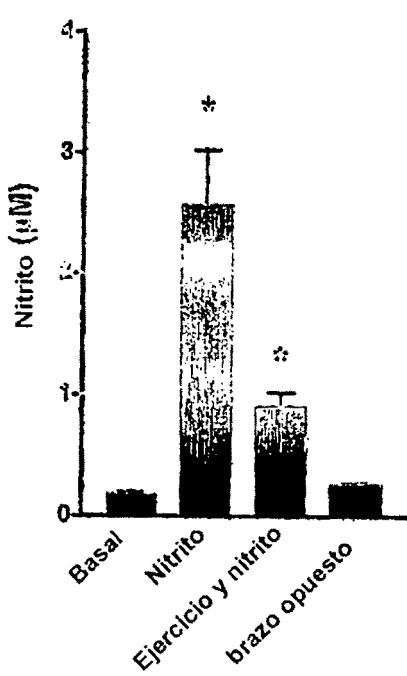


Figura 3D

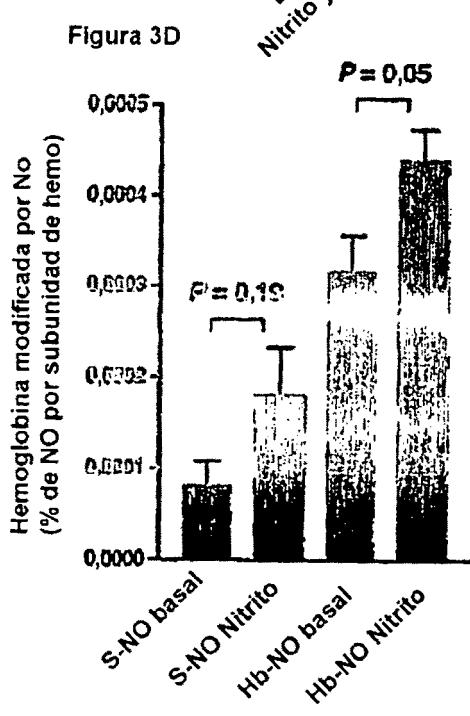


Figura 4A

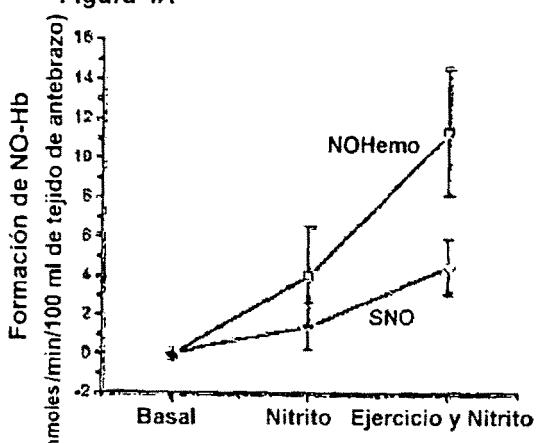


Figura 4B

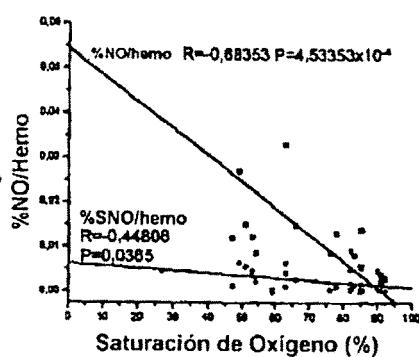


Figura 5A

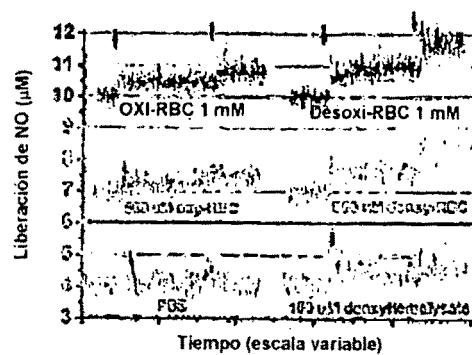


Figura 5B

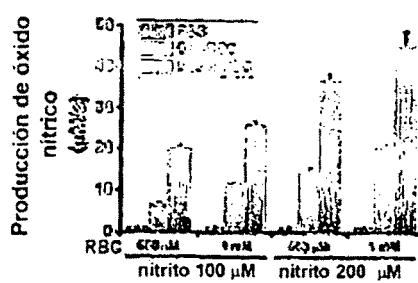


Figura 6A

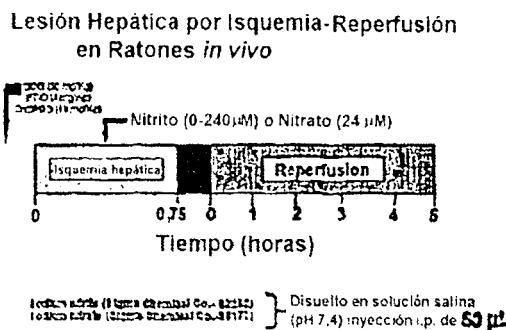


Figura 6B

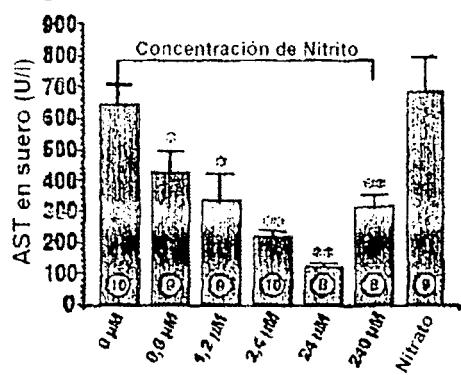


Figura 6C

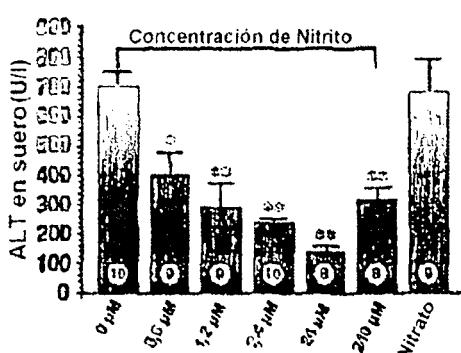


Figura 6D

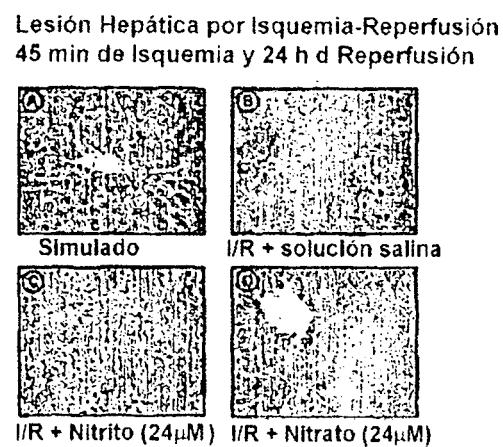


Figura 6E

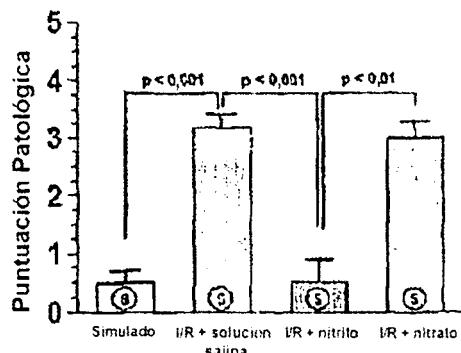


Figura 6F

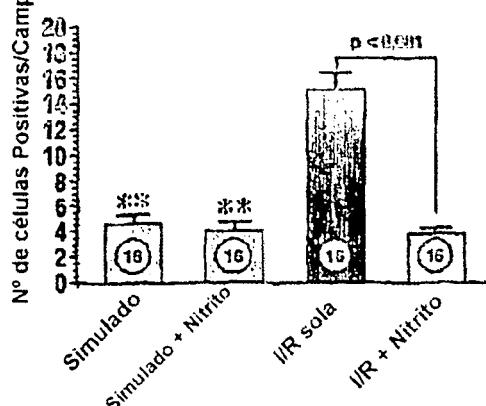


Figura 7A

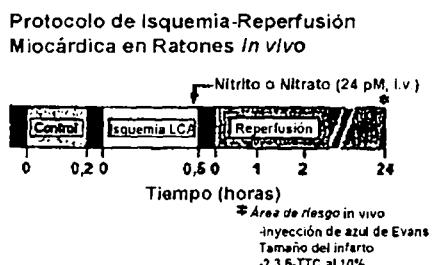


Figura 7B

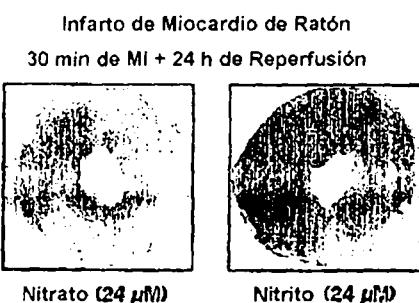


Figura 7C

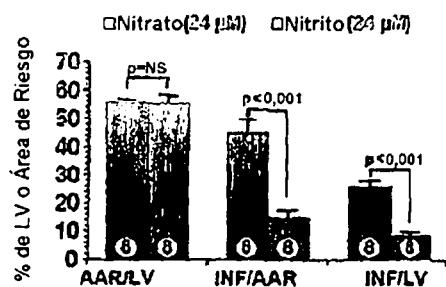


Figura 7D

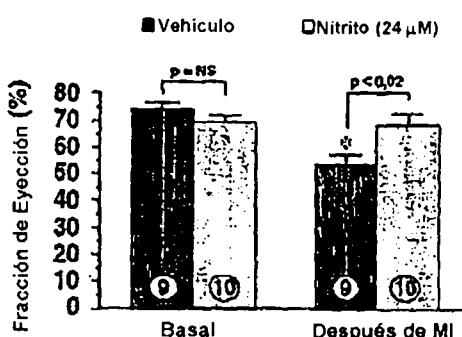


Figura 7E

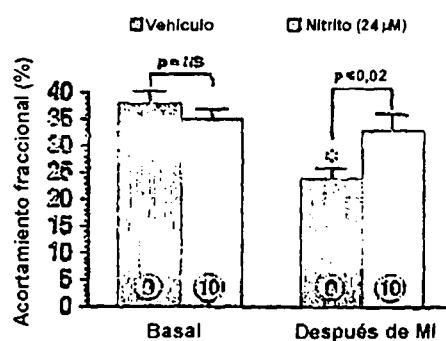


Figura 8A

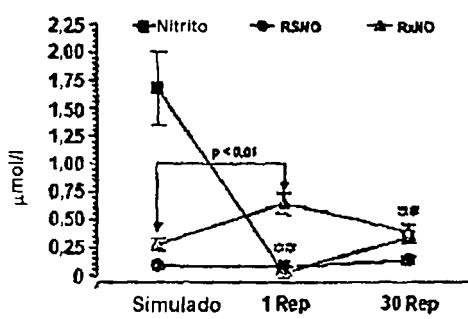


Figura 8B

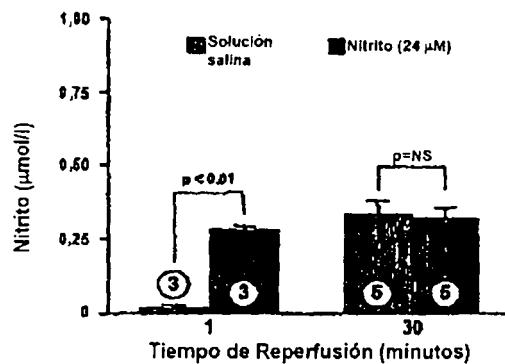


Figura 8C

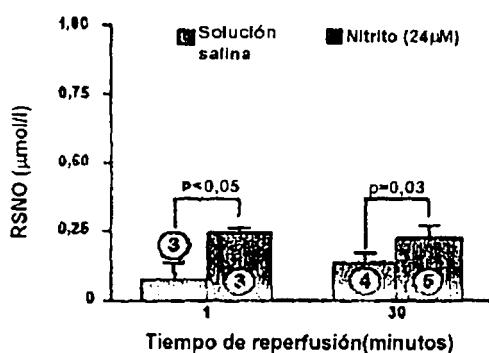


Figura 8D

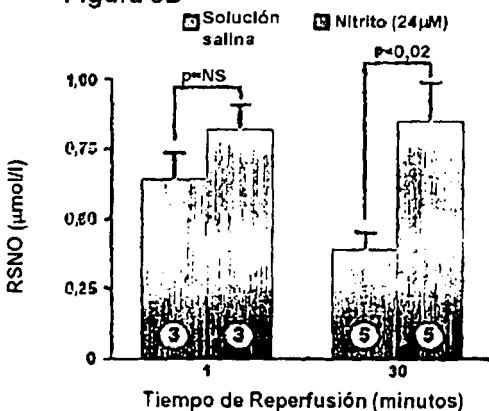


Figura 9A

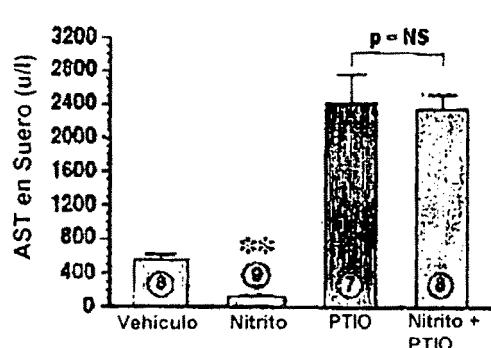


Figura 9B

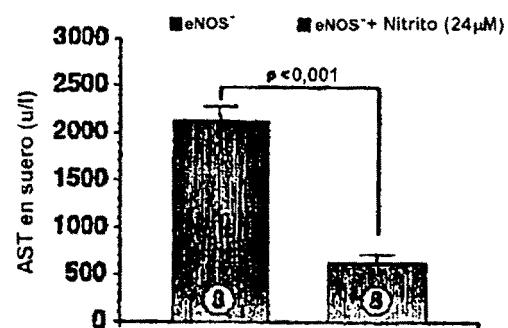


Figura 9C

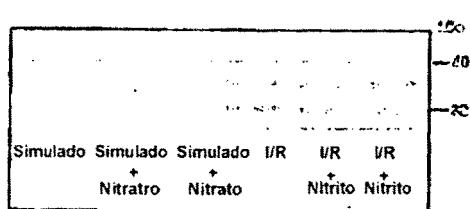


Figura 9D

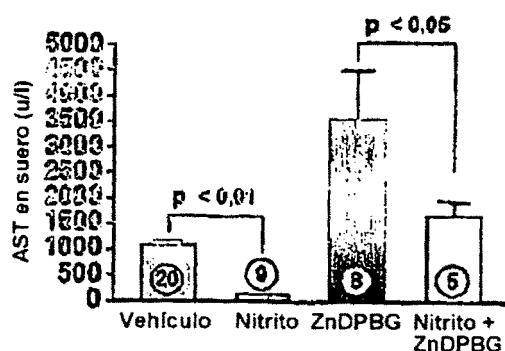


Figura 10A

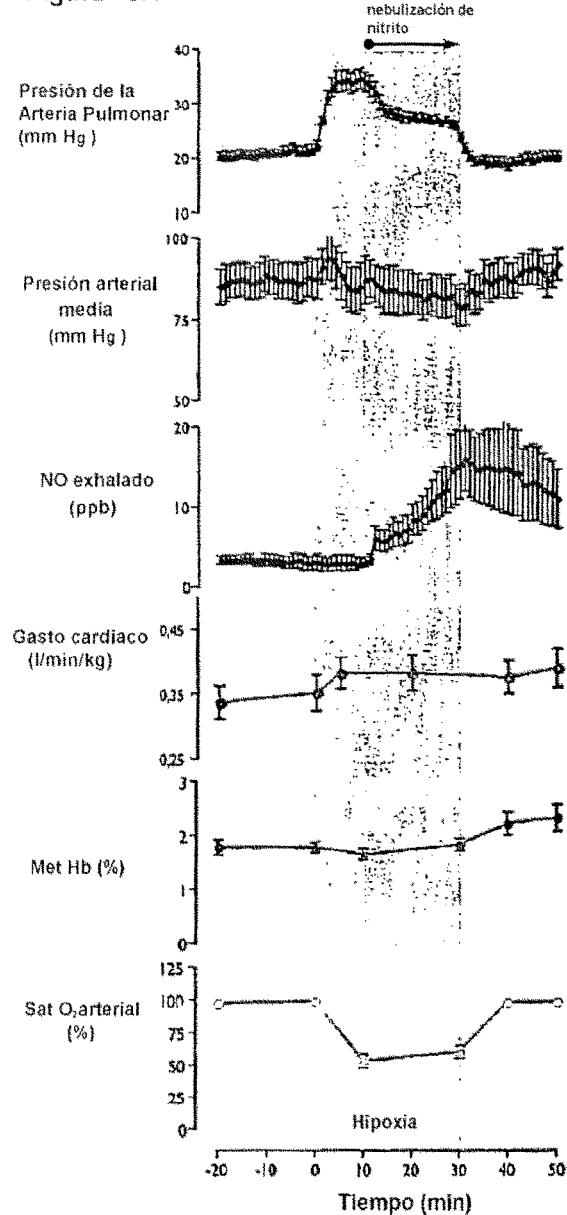


Figura 10B

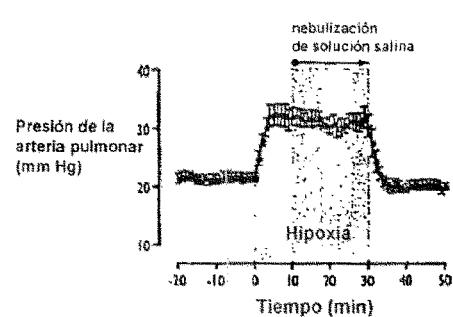


Figura 10C

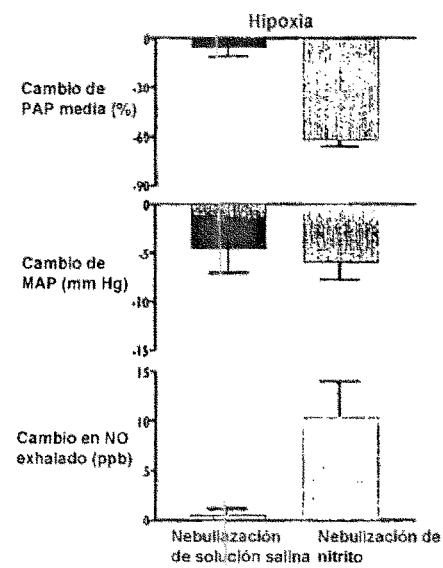
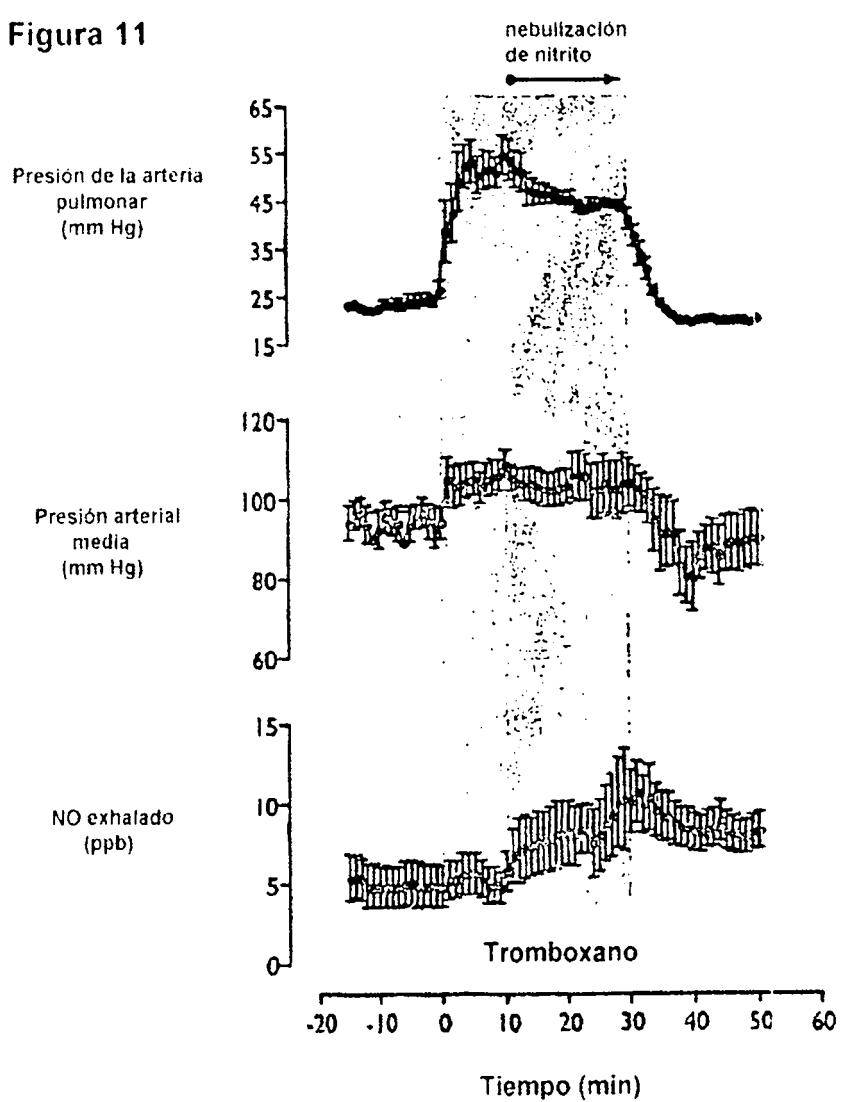
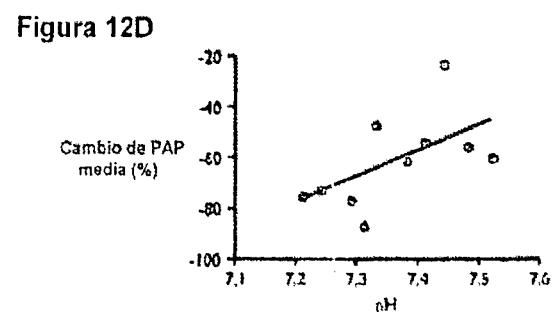
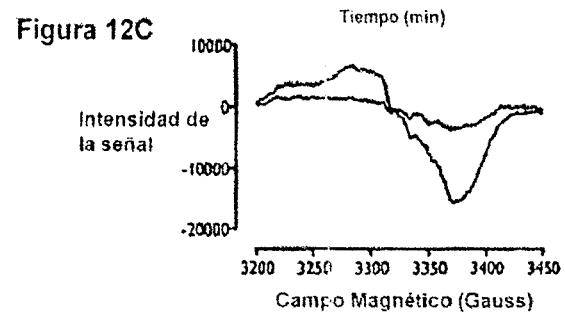
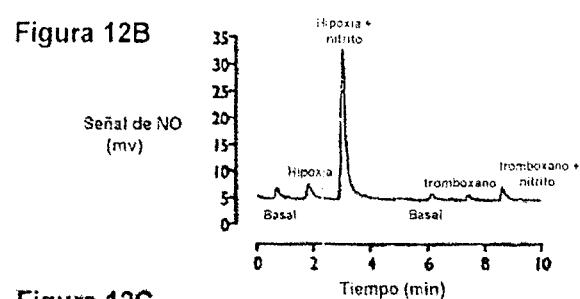
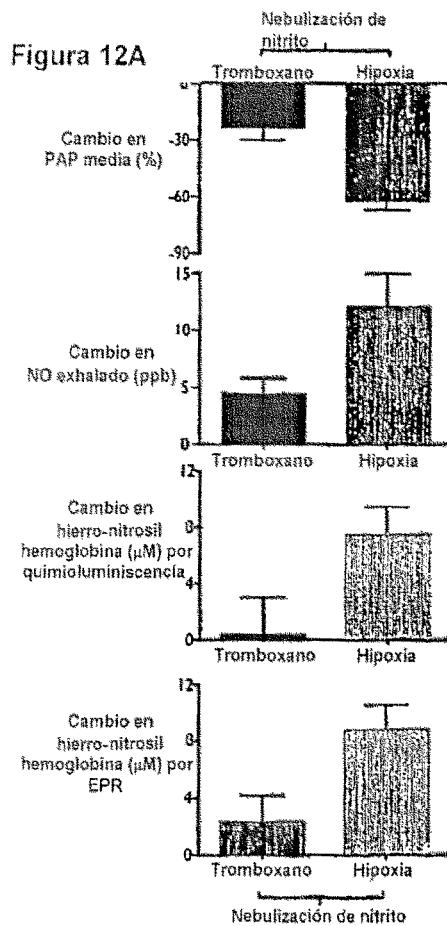


Figura 11





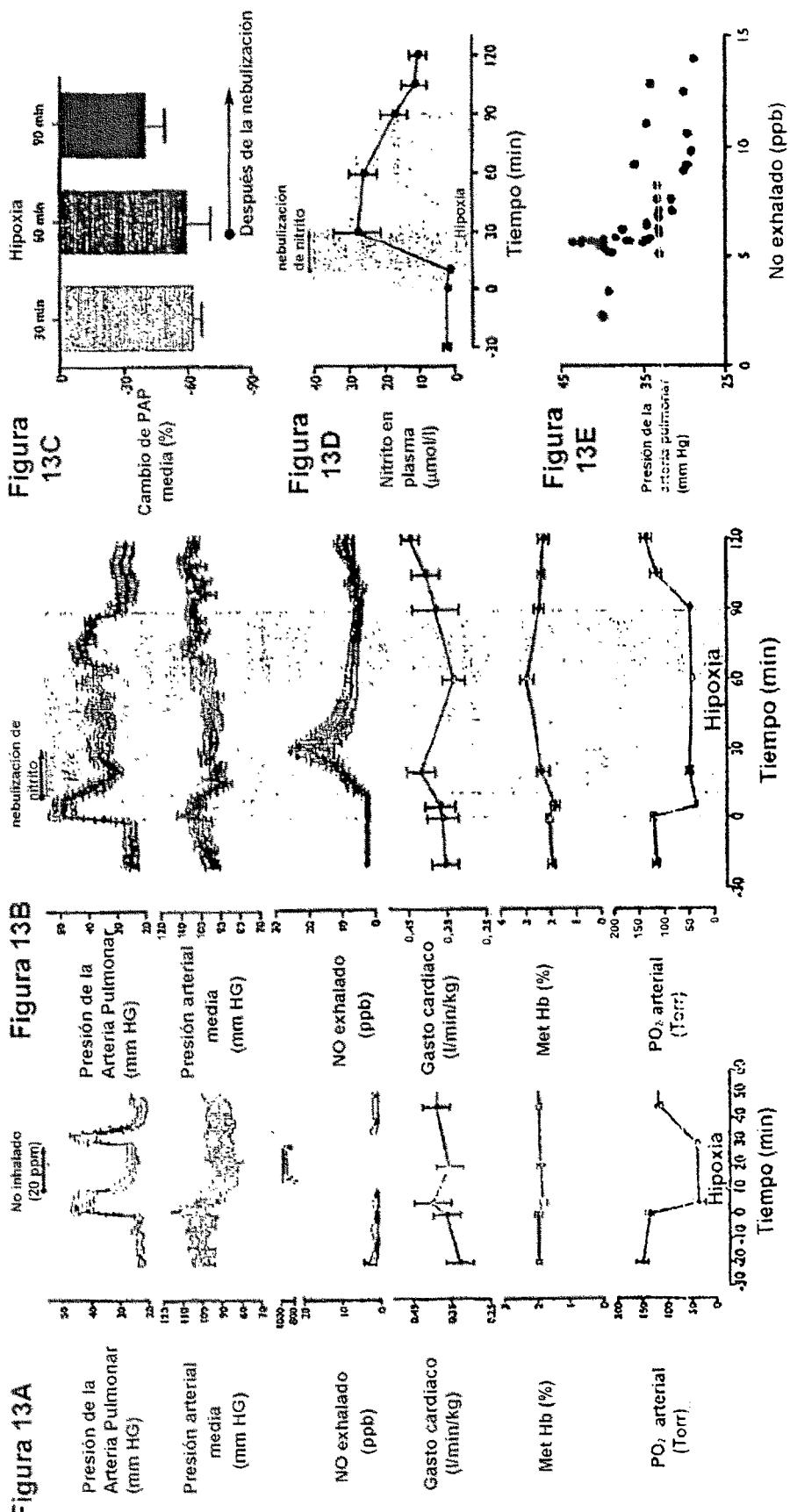


Figura 14

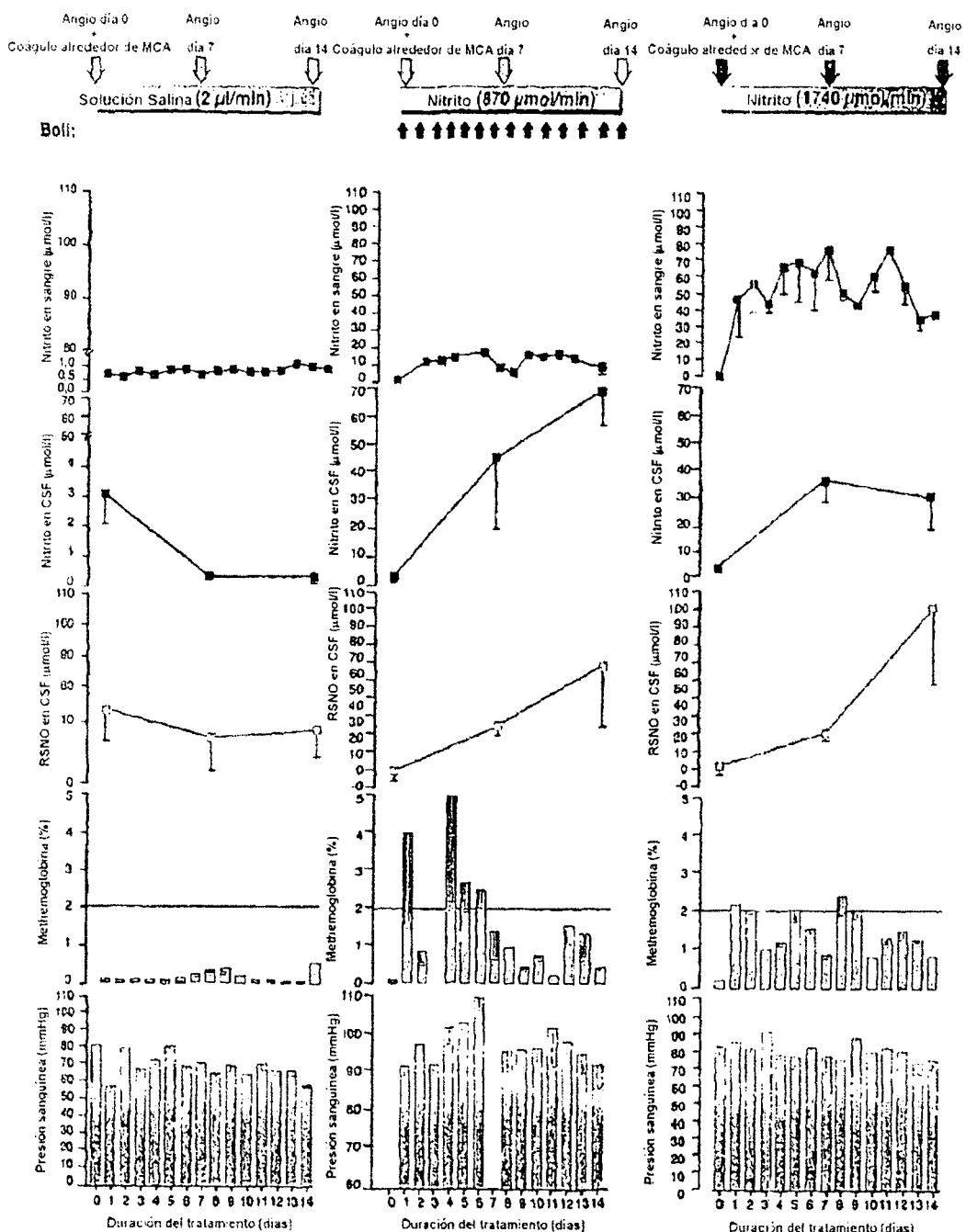
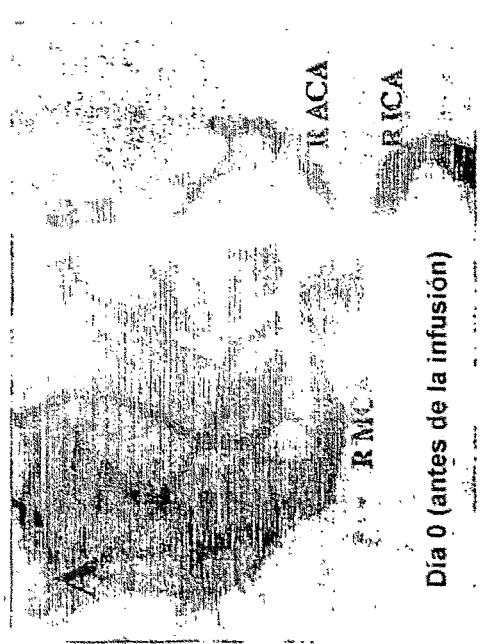
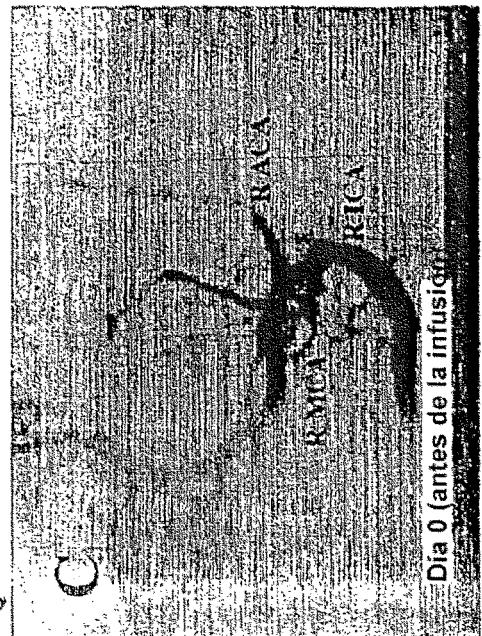


Figura 15A

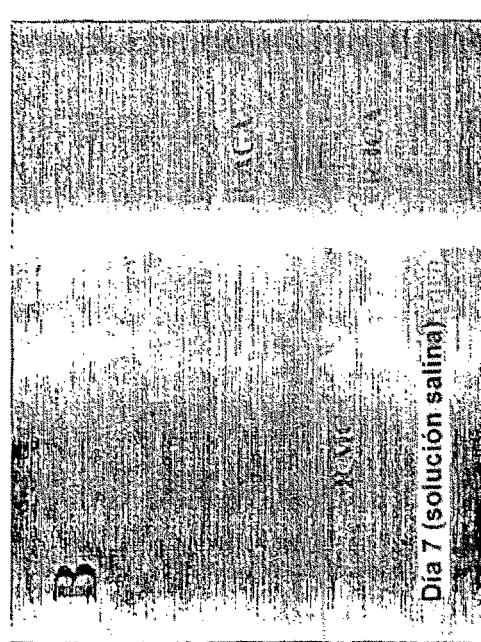


Día 0 (antes de la infusión)

Figura 15C



Día 0 (antes de la infusión)

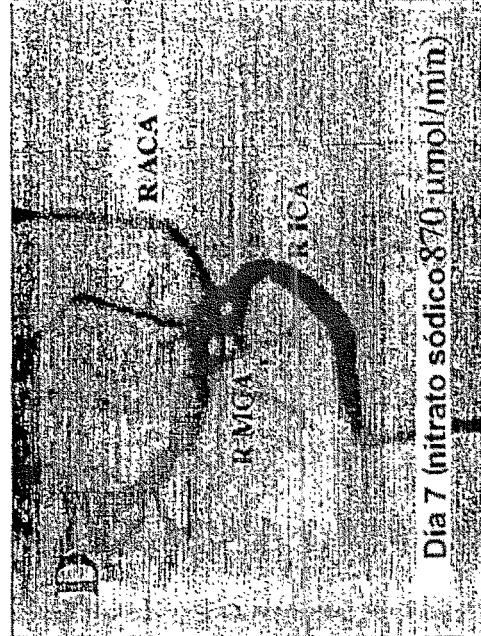


Día 7 (solución salina)

Figura 15B

Día 7 (nitroato sódico 870 μ mol/min)

Figura 15D



Día 7 (nitroato sódico 870 μ mol/min)

Figura 16

