

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 619**

51 Int. Cl.:

**A61K 33/00** (2006.01)

**A61M 16/12** (2006.01)

**A61P 11/08** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2013 E 18187122 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3421042**

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

30 Prioridad:

**07.03.2012 US 201261607686 P**

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

**21.11.2024**

73 Titular/es:

**BEYOND AIR LTD (100.0%)  
12 Eli Horovitz St.  
7608801 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 988 619 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Inhalación de óxido nítrico para el tratamiento de enfermedades respiratorias

5 **Campo y antecedentes de la invención**

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a terapia, y más particularmente, aunque no exclusivamente, a composiciones para usar en el tratamiento de enfermedades respiratorias mediante la inhalación de óxido nítrico gaseoso.

10 El óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) es una pequeña molécula de señalización lipofílica con un radio de Stokes pequeño y un peso molecular de 30 gramos/mol, lo que le permite cruzar fácil y rápidamente la membrana plasmática celular de glicolípidos hacia el citosol. El NO tiene un electrón no apareado disponible en su órbita externa, lo que lo caracteriza como un radical libre. Se demostró que el NO juega un papel crítico en varias funciones corporales, incluyendo la vasodilatación del músculo liso, la neurotransmisión, la regulación de la cicatrización de heridas y las respuestas inmunes a infecciones, tales como las acciones bactericidas dirigidas hacia varios organismos. Se demostró que el NO juega un papel importante en la cicatrización de heridas mediante la vasodilatación, la angiogénesis, la acción antiinflamatoria y antimicrobiana.

20 El NO es un contaminante común del aire y está presente en concentraciones de 150-650 ppm en el humo del cigarrillo y hasta 1200 ppm en el humo de cigarrillos y pipas. El Instituto Nacional de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA, por sus siglas en inglés) y la Agencia de Protección Ambiental establecieron un valor límite umbral (TLV, por sus siglas en inglés) para la inhalación de óxido nítrico (NO) como un promedio ponderado en el tiempo (TWA, por sus siglas en inglés) de 25 ppm. El TLV-TWA es la concentración a la cual el sistema respiratorio de una persona se puede exponer continuamente durante toda una semana laboral normal sin efectos adversos y, cuando se expresa en unidades de ppm horas, se calcula en 200 ppm horas. Este nivel es un promedio ponderado en el tiempo, es decir, el nivel promedio de NO debería ser menor que 25 ppm. sin embargo, se permiten exposiciones breves a concentraciones mayores.

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

40 Además de ser un agente antimicrobiano directamente establecido, se planteó la hipótesis de que las propiedades antimicrobianas y reguladoras de mensajeros celulares del NO, administrado en una forma gaseosa exógena, podrían ingresar fácilmente al ambiente pulmonar y ser útiles para optimizar el tratamiento de enfermedades pulmonares no controladas con acciones específicas dirigidas a reducir la carga bacteriana, disminuir la inflamación y mejorar los síntomas clínicos.

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

55 Desde el aspecto toxicológico, el NO tiene una vida media en el cuerpo de menos de 6 segundos y un radio de acción de aproximadamente 200 micrones desde su sitio de origen, más allá del cual se inactiva mediante la unión a los grupos sulfhidrilo de los tioles celulares o por nitrosilación de las entidades hemo de la hemoglobina para formar metahemoglobina (MetHb). La MetHb reductasa reduce el NO a nitratos en el suero sanguíneo. Se identificó el nitrato como el metabolito predominante del óxido nítrico excretado en la orina, representando más de 70 % de la dosis de óxido nítrico inhalado. El nitrato se elimina del plasma por el riñón a velocidades que se aproximan a la tasa de filtración glomerular. Los niveles de MetHb en sangre en humanos sanos son típicamente menores que 2 %.

65 Los efectos secundarios potenciales del tratamiento con altas dosis de NO incluyen, por lo tanto, la unión del NO a la hemoglobina y la formación de MetHb, lo cual podría conducir a una disminución en el transporte de oxígeno, y la capacidad del NO para actuar como un agente nitrosilante en proteínas y otros constituyentes celulares. La formación de MetHb y los niveles elevados del mismo se observaron en estudios previos sobre la inhalación de gNO en individuos humanos sanos, en donde la inhalación de gNO a 128 ppm durante 3 horas y a 512 ppm durante 55 minutos se informó

que eleva los niveles de MetHb por encima del umbral seguro de 5 % [Borgese N. y col., J. Clin. Invest., 1987, 80, 1296-1302; Young J.D. y col., Intensive Care Med., 1994, 20, 581-4 e Young J.D. y col., Brit. J. Anaesthesia, 1996, 76, 652-656].

5 Por lo tanto, se plantearon preocupaciones respecto al uso potencial del NO como un agente terapéutico en varios escenarios clínicos. Hasta la fecha, los estudios indican que lesiones pulmonares agudas, edema pulmonar, hemorragia, cambios en la tensión superficial del surfactante, reducción en el número de alvéolos y respuesta de las vías respiratorias pueden ser causados por altos niveles de NO, NO<sub>2</sub> y otros óxidos de nitrógeno en las vías respiratorias [Hurford W., Resp. Care, 2005, 50, 1428-9].

10 Varios estudios en animales realizados para evaluar la ventana de seguridad para la exposición a gNO se informaron en la Revisión médica primaria de NDA 20-845 (gas de óxido nítrico INOmax). Estos informes incluyen el estudio conocido como RDR-0087-DS, en donde grupos de 10 ratas cada uno se expusieron a aire ambiente o a 80, 200, 300, 400 o 500 ppm de gNO durante 6 horas continuas al día durante hasta 7 días. Se informa que todos los animales murieron en el primer día de exposición a 400 y 500 ppm de gNO con niveles de MetHb de 72,5 % y 67 %, respectivamente. Seis de los animales tratados con 300 ppm de gNO murieron durante los primeros 1-2 días. Todas las muertes se atribuyeron a metahemoglobinemia.

20 En estudios adicionales, las ratas se expusieron continuamente a aire ambiente, 40, 80, 160, 200 y 250 ppm de gNO durante 6 horas al día durante 28 días. No se registraron muertes en concentraciones de gNO por debajo de 200 ppm.

25 Actualmente, la inhalación de óxido nítrico gaseoso (gNO) como un vasodilatador selectivo de acción corta se aprueba solo a 80 ppm para usar en recién nacidos a término con insuficiencia respiratoria hipóxica asociada a hipertensión pulmonar. Sin embargo, otros estudios demostraron que a tales concentraciones bajas de gNO inhalado, el tratamiento de enfermedades respiratorias en adultos se limita, y el uso de dosis más altas de gNO para tratar varias afecciones médicas por inhalación requiere estudios de seguridad exhaustivos en humanos.

30 Miller y col. informaron el efecto de 1.600 ppm horas de gNO contra cinco especies planctónicas (suspendidas en un líquido) de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA, por sus siglas en inglés). Un modelo de biopelícula MRSA *in vitro* también se usó para comparar el gNO con el antibiótico vancomicina como un agente antibacteriano. Para el experimento con biopelículas, un reactor de flujo por goteo se usó para hacer crecer una biopelícula de MRSA que después se expuso durante ocho horas a lactato de Ringer, 200 ppm de gNO (1.600 ppm horas), aire o vancomicina (nivel MIC de 100 veces). Una reducción en la población de las cinco cepas planctónicas de MRSA se observó después de la exposición a 1600 ppm horas de gNO. En el experimento con biopelículas, también se demostró que el gNO reduce el MRSA.

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

45 Los estudios realizados en un modelo de neumonía por *Pseudomonas aeruginosa* en ratas sometieron a pruebas el efecto antimicrobiano de un régimen de administración inhalada intermitente de gNO con exposiciones de 30 minutos a 160-200 ppm de gNO, y revelaron que 160 ppm de gNO en tal régimen es eficaz para reducir la carga biológica pulmonar y la infiltración de leucocitos [Hergott C.A. y col., Am. J. Resp. Crit. Care Med., 2006, 173, A135]. También se demostró que este tratamiento disminuye los síntomas clínicos de la enfermedad respiratoria bovina en el ganado [Schaefer A.L. y col., Online J. Vet. Res., 2006, 10, 7-16].

50 Miller, C.C. y col. [1. Cutan. Med. Surg., 2004, 8(4), 233-8] informaron sobre el tratamiento tópico de un sujeto que tenía una herida crónica que no cicatrizaba y la presencia de una biopelícula recurrente con gNO a una concentración de tratamiento de 200 ppm durante dos semanas. Durante los primeros tres días de tratamiento, la biopelícula del sujeto ya no estuvo visiblemente presente y en una semana, el tamaño de la herida se redujo en 42 %. La úlcera del sujeto continuó curándose tras el cese de la exposición al óxido nítrico.

60 WO 20051110441 enseña un método y un dispositivo correspondiente para combatir microbios e infecciones mediante la administración intermitente de dosis altas de 160-400 ppm de gNO a un mamífero durante un período de tiempo que varía entre una concentración alta y baja de gas de óxido nítrico. El régimen implica la administración de 160 ppm de gNO durante 30 minutos cada cuatro horas con 0-20 ppm administradas durante las 3,5 horas entre las administraciones de mayor concentración. No se presentan datos experimentales en esta publicación.

65 La patente núm. US-7.122.018 enseña la exposición tópica intermitente a altas concentraciones de óxido nítrico que varían de 160 y 400 ppm, para el tratamiento de heridas infectadas e infecciones respiratorias mediante un régimen de sesiones de 4 horas interrumpidas por 1 hora de descanso mientras se monitorean los niveles de metahemoglobina en sangre.

La patente núm. US-7.516.742 enseña la administración intermitente de dosis altas y bajas por inhalación de gNO para superar la toxicidad relacionada con el gNO, en donde la concentración alta de gNO varía de 80 a 300 ppm y la concentración baja varía de 0 a 80 ppm, mientras que el régimen puede ser 160 ppm durante 30 minutos cada cuatro horas con 20 ppm administrados durante las 3,5 horas entre las administraciones de mayor concentración mientras se monitorea la concentración de O<sub>2</sub>, NO y NO<sub>2</sub>.

La patente núm. US-7.520.866 enseña la exposición tópica de heridas al gNO a una alta concentración que varía de 160-400 ppm con un régimen de dos sesiones de 4 horas, interrumpidas por 1 hora de descanso, en donde después de un primer período de tratamiento con alta concentración de gNO, un segundo período de tratamiento a una concentración más baja de 5-20 ppm se puede proporcionar para restaurar el equilibrio de óxido nítrico e inducir la expresión de colágeno para ayudar en el cierre de la herida.

La patente núm. US-7.955.294 enseña un método y un dispositivo correspondiente para la entrega intermitente tópica e inhalada de dosis altas y bajas de gNO durante un período de tiempo que varía entre concentraciones altas y bajas, con un régimen de ciclo ilustrativo de 160-200 ppm durante 30 minutos seguidos de 0-80 ppm durante 3,5 horas, en donde el régimen de ciclado puede durar 1-3 días.

Los antecedentes adicionales de la técnica incluyen las patentes n.º US-8.083.997, 8.079.998, 8.066.904, 8.057.742, 7.531.133, 6.432.077, las solicitudes de patente n.º US-2011/0262335, 2011/0259325, 2011/0240019, 2011/0220103 y 2010/0331405, 2011/0112468, 2008/028786, 2007/0116785, 2007/0088316, 2007/0065473, 2007/0014688, 2006/0207594, 2005/0191372 y WO 2006/071957, WO 20061110923, WO 20061110923, WO 2007/057763, WO 2007/057763, WO 2000/30659 y EP 0692984; Miller C.C. y col., Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 2007, 51(9), 3364-3366; and Miller C.C. y col., [Resp Care, 2008, 53(11), 1530].

## Sumario de la invención

La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Cualquier aspecto, realización o ejemplo de la presente memoria/descripción que no esté dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporciona únicamente con fines ilustrativos y no forma parte de la presente invención.

Según un aspecto de la presente invención, existe NO gaseoso (gNO) a una concentración de al menos 160 ppm, para usar en el tratamiento de un sujeto humano que padece una enfermedad o trastorno manifestado en el tracto respiratorio o una enfermedad o trastorno que se puede tratar mediante el tracto respiratorio, en donde la enfermedad o trastorno es fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, o una enfermedad o trastorno asociado con un microorganismo patógeno y el gNO se administra al sujeto humano intermitentemente, en donde la inhalación intermitente comprende de 1 a 6 ciclos por día de inhalación continua de dicho gNO durante un primer período de tiempo, seguido de la inhalación de ningún gNO durante un segundo período de tiempo; y en donde el gNO es parte de una mezcla que comprende además oxígeno, y la fracción de oxígeno inspirado (FiO<sub>2</sub>, por sus siglas en inglés) en dicha mezcla varía de 20 % a 100 %.

Los presentes inventores investigaron el efecto de la inhalación intermitente de óxido nítrico gaseoso a una concentración de 160 ppm o más en sujetos humanos y demostraron que tal protocolo de inhalación intermitente no resulta en cambios sustanciales en varios parámetros fisiológicos del sujeto humano. Son ejemplos de tales parámetros los que se pueden obtener en el sitio en tiempo real, tales como el nivel de metahemoglobina, el nivel de CO<sub>2</sub> al final de la espiración y la oxigenación, y los parámetros que se pueden obtener fuera del laboratorio, tales como el nivel de nitrito en sangre, el nivel de nitrito en orina, y el nivel de marcadores inflamatorios. Por lo tanto, los presentes inventores demostraron que tal un método se puede realizar de modo seguro. Se describen métodos para administrar óxido nítrico gaseoso a sujetos humanos que lo necesitan, mientras estos parámetros permanecen sustancialmente inalterados. La administración descrita se puede emplear en métodos para tratar y/o prevenir varias afecciones médicas que se manifiestan en el tracto respiratorio, o que se pueden tratar mediante el tracto respiratorio, al someter a un sujeto humano a la inhalación intermitente de óxido nítrico gaseoso a una concentración de 160 ppm o más.

Se describe el gNO para usar en un método para tratar a un sujeto humano que padece una enfermedad o trastorno manifestado en el tracto respiratorio o una enfermedad o trastorno que se puede tratar mediante el tracto respiratorio, el método que comprende someter al sujeto a la inhalación intermitente de gNO a una concentración de al menos 160 ppm, tratando de esta manera la enfermedad o trastorno.

Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en bronquiolitis bacteriana, viral y/o fúngica, faringitis y/o laringotraqueítis bacteriana, viral y/o fúngica, neumonía bacteriana, viral y/o fúngica, sinusitis bacteriana, viral y/o fúngica, infección del tracto respiratorio superior e inferior bacteriana, viral y/o fúngica, asma exacerbada por bacterias, virus y/o hongos, conjuntivitis y uveítis bacterianas, virales y/o fúngicas, infección viral sincitial respiratoria, bronquiectasias, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FQ), enfisema, otitis, otitis externa, otitis media, discinesia ciliar primaria (DCP), aspergilosis, aspergilloma, aspergilosis pulmonar (ABPA, por sus siglas en inglés) y criptococosis.

Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno oftalmológico, otorrinolaringológico y/o del tracto respiratorio superior.

5 Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad y trastorno oftalmológico, otorrinolaringológico y/o del tracto respiratorio superior implica una infección o una inflamación de un sitio corporal seleccionado del grupo que consiste en una cavidad del oído, una cavidad nasal, un ojo, una cavidad sinusal, una cavidad bucal, una faringe, una epiglotis, unas cuerdas vocales, una tráquea, un ápice y un esófago superior.

10 Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad y trastorno otorrinolaringológico y/o del tracto respiratorio superior se selecciona del grupo que consiste en un resfriado común, una enfermedad estomatognática, amigdalitis, una infección oral fugaz, sinusitis bacteriana, viral y/o fúngica, bronquitis, candidiasis de la cavidad bucal (sapito), aftas, epiglotitis (supraglotitis), halitosis, herpes, laringitis, laringotraqueítis, nasofaringitis, otitis, otitis externa, otitis media, conjuntivitis, uveítis, faringitis, rinitis, rinofaringitis, rinosinusitis, estomatitis, amigdalitis, traqueítis, traqueítis y timpanitis.

15 Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno del sistema respiratorio inferior de un sujeto humano.

20 Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en una afección obstructiva, una afección restrictiva, una enfermedad vascular y una infección, una inflamación debida a la inhalación de materia extraña y una intoxicación por partículas inhaladas.

25 Según algunas realizaciones de la presente invención, la afección obstructiva seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema, bronquiolitis, bronquitis, asma y asma exacerbada por virus, bacterias y hongos; la afección restrictiva seleccionada del grupo que consiste en fibrosis, fibrosis quística, sarcoidosis, daño alveolar y derrame pleural; la enfermedad vascular seleccionada del grupo que consiste en edema pulmonar, embolia pulmonar e hipertensión pulmonar; la infección seleccionada del grupo que consiste en infección por virus respiratorio sincitial, tuberculosis, neumonía viral, bacteriana, fúngica y/o parasitaria, neumonía idiopática; y la inflamación debida a la inhalación de materias extrañas y una intoxicación por partículas inhaladas seleccionadas del grupo que consiste en inhalación de humo, asbestosis y exposición a partículas contaminantes y vapores.

30 Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno es bronquiolitis.

35 Según algunas realizaciones de la presente invención, la bronquiolitis está asociada con un virus.

Según algunas realizaciones de la presente invención, el virus se selecciona del grupo que consiste en un virus respiratorio sincitial (RSV, por sus siglas en inglés), un rinovirus, un coronavirus, un enterovirus, un virus de la influenza A y/o B, un virus parainfluenza 1, 2 y/o 3, un bocavirus, un metapneumovirus humano, SARS y un adenovirus.

40 Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno es asma.

Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno es fibrosis quística.

45 Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno está asociado con un virus de la gripe.

Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno es EPOC.

50 Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad o trastorno respiratorio agudo, una enfermedad o trastorno respiratorio crónico, una enfermedad o trastorno respiratorio obstructivo, una enfermedad o trastorno respiratorio restrictivo intrínseco o extrínseco, una enfermedad o trastorno vascular pulmonar, una enfermedad o trastorno respiratorio infeccioso, una enfermedad o trastorno respiratorio inflamatorio, una enfermedad o trastorno de la cavidad pleural, y una enfermedad o trastorno respiratorio neonatal.

55 Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno está asociado con un microorganismo patógeno.

60 Según algunas realizaciones de la presente invención, el microorganismo patógeno se selecciona del grupo que consiste en una bacteria Gram-negativa, una bacteria Gram-positiva, un virus, un hongo y un parásito.

65 Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en bronquiolitis bacteriana, viral y/o fúngica, faringitis y/o laringotraqueítis bacteriana, viral y/o fúngica, sinusitis bacteriana, viral y/o fúngica, infección de las vías respiratorias superiores y/o inferiores bacteriana, viral y/o fúngica, asma exacerbada por bacterias, virus, hongos y/o parásitos, neumonía bacteriana, viral, fúngica y/o parasitaria, resfriado común, infección relacionada con fibrosis quística, infección viral sincitial respiratoria, acidosis o sepsis,

infección fúngica oral, aspergilosis, aspergiloma, criptococosis, aspergilosis pulmonar (ABPA), bronquitis criptocócica, candidiasis de la cavidad oral (sapito), aftas, epiglotitis (supraglotitis), halitosis, herpes, laringitis, laringotraqueítis, nasofaringitis, otitis y otitis media, faringitis, infección por virus sincitial respiratorio, conjuntivitis y uveítis bacterianas, virales y/o fúngicas, rinitis, rinofaringitis, rinusinusitis, estomatitis, amigdalitis, traqueítis, tuberculosis y timpanitis.

5 El método puede comprender además, o se efectúa mientras se monitorea, durante y después del sometimiento, al menos un parámetro en el sitio seleccionado del grupo que consiste en:

un nivel de metahemoglobina (SpMet);

10 un nivel de saturación de oxígeno (SpO<sub>2</sub>);

un nivel de CO<sub>2</sub> al final de la espiración (ETCO<sub>2</sub>); y

15 un nivel de fracción de oxígeno inspirado (FiO<sub>2</sub>),

y/o al menos un parámetro fuera del sitio seleccionado del grupo que consiste en:

un nivel de nitrito sérico (NO<sub>2</sub>); y

20 un nivel plasmático de citocinas inflamatorias,

en el sujeto, ya que estos parámetros se describen en la presente memoria.

25 El método puede comprender además, o se efectúa mientras se monitorea, al menos dos de los parámetros, como se describe en la presente memoria.

El método puede comprender además, o se efectúa mientras, se monitorean todos los parámetros.

30 Un cambio en el al menos uno de los parámetros después del sometimiento puede ser menor que 2 unidades de desviación aceptables desde un valor basal, como se describe en la presente memoria.

Un cambio en al menos dos de los parámetros después del sometimiento puede ser menor que 2 unidades de desviación aceptables desde una línea de base.

35 Un cambio en todos los parámetros después del sometimiento puede ser inferior a 2 unidades de desviación aceptables desde una línea de base.

40 Un cambio en al menos uno de los parámetros en el sitio después del sometimiento puede ser menor que 2 unidades de desviación aceptables desde una línea de base.

Un cambio en al menos uno de los parámetros fuera del sitio después del sometimiento puede ser menor que 2 unidades de desviación aceptables desde una línea de base.

45 El método puede comprender además, o se efectúa mientras, se monitorea el nivel de nitrito en orina en el sujeto, como se describe en la presente memoria.

El método puede comprender además, o se efectúa mientras, el monitoreo de un cambio en el nivel de nitrito en la orina después del sometimiento es menor que 2 unidades de desviación aceptables desde un valor basal.

50 El método puede comprender además, o se efectúa mientras, se monitorea en el sujeto al menos un parámetro fuera del sitio seleccionado del grupo que consiste en:

un marcador hematológico;

55 un factor de activación endotelial vascular;

un parámetro de coagulación;

60 un nivel de creatinina sérica; y

un marcador de la función hepática, ya que estos parámetros se describen en la presente memoria, en el sujeto. Un cambio en al menos uno de los parámetros fuera del sitio después del sometimiento puede ser menor que 2 unidades de desviación aceptables desde una línea de base.

65

El método puede comprender además, o se efectúa mientras, se monitorea al menos un parámetro fuera del sitio seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 un marcador hematológico;
- un factor de activación endotelial vascular;
- un parámetro de coagulación;
- 10 un nivel de creatinina sérica; y
- un marcador de la función hepática, en el sujeto, ya que estos parámetros se describen en la presente memoria.

15 Un cambio en el al menos un parámetro después del sometimiento puede ser menor que 2 unidades de desviación aceptables desde una línea de base.

El método puede comprender además, o se efectúa mientras, se monitorea en el sujeto al menos un parámetro en el sitio seleccionado del grupo que consiste en:

- 20 un signo vital; y
- una función pulmonar, ya que estos parámetros se describen en la presente memoria.

25 Según algunas realizaciones de la presente invención, no se observa deterioro en el al menos un parámetro durante y después del sometimiento.

Según algunas de las realizaciones de la presente invención, la inhalación intermitente comprende al menos un ciclo de inhalación continua del gNO durante un primer período de tiempo, seguido de la inhalación sin gNO durante un segundo período de tiempo.

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

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

35 Según algunas realizaciones de la presente invención, la inhalación comprende de 1 a 6 ciclos por día.

Según algunas realizaciones de la presente invención, la inhalación comprende 5 de los ciclos por día.

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

Según algunas realizaciones de la presente invención, durante el primer período de tiempo, una concentración de NO<sub>2</sub> en la mezcla es menor que 5 ppm.

45 Según algunas realizaciones de la presente invención, durante el primer período de tiempo, una concentración de O<sub>2</sub> en la mezcla varía de 20 % a 25 %.

Según algunas realizaciones de la presente invención, durante el primer período de tiempo, un nivel de fracción de oxígeno inspirado (FiO<sub>2</sub>) en la mezcla varía de 21 % a 100 %.

50 Según algunas realizaciones de la presente invención, el al menos un parámetro comprende ETCO<sub>2</sub> y durante y después del sometimiento, el ETCO<sub>2</sub> es menor que 60 mmHg.

55 Según algunas realizaciones de la presente invención, el al menos un parámetro comprende SpMet y durante y después del sometimiento, el SpMet aumenta en menos de 5 %.

Según algunas realizaciones de la presente invención, el al menos un parámetro comprende SpO<sub>2</sub> y durante el sometimiento, un nivel de SpO<sub>2</sub> es mayor que 89 %.

60 Según algunas realizaciones de la presente invención, el al menos un parámetro comprende el nivel de nitrito/nitrato en suero y durante y después del sometimiento, un nivel de nitrito en suero es menor que 2,5/25 micromol por litro respectivamente.

65 Según algunas de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, la inhalación intermitente de gNO se efectúa durante un período de tiempo que varía de 1 a 7 días.

Según algunas de cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, el sometimiento se efectúa mediante un dispositivo de inhalación seleccionado del grupo que consiste en un dispositivo de inhalación estacionario, un inhalador portátil, un inhalador de dosis medida, un recinto atmosféricamente controlado y un inhalador intubado.

5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o prueba de las realizaciones de la invención, los métodos y/o materiales ilustrativos se describen más abajo. En caso de conflicto, la especificación de la patente, incluyendo las definiciones, tendrá prioridad. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

### Breve descripción de los dibujos

15 Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente memoria, solo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. Con referencia específica ahora a las figuras en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con las figuras hace evidente para los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica las realizaciones de la invención.

20 En los dibujos:

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

30 las Figuras 2A-C presentan gráficos comparativos de los antecedentes de la técnica que muestran la formación de placas virales en tejido como una función del tiempo medido para los viriones de influenza A/victoria/H3N2 después de la exposición al óxido nítrico a 160 ppm y 800 ppm continuamente durante 4 horas (Figura 2A), los mismos viriones después de ser expuestos a una dosis de gNO durante 30 minutos en comparación con tres tratamientos de 30 minutos cada 4 horas (Figura 2B), y el efecto de la exposición continua a gNO a una concentración de 160 ppm durante 3 horas del virus altamente patógeno de la gripe aviar H7N3 (como se presenta en US 2007/0116785);

35 las Figuras 3A-D presentan imágenes de muestras de cultivo de tejidos que albergan rgRSV30 humano, un virus común de los pulmones y agente causante de la bronquiolitis, acoplado a una proteína fluorescente verde, y que tiene niveles virales iniciales de 2000 PFU (Figura 3A), 1000 PFU (Figura 3B) y 500 PFU (Figura 3C), tras la exposición a 160 ppm de gNO durante 30 minutos, y un gráfico de barras comparativo que muestra la reducción de placas en las muestras sometidas a pruebas con respecto a las muestras de control expuestas al aire ambiente;

40 las Figuras 4A-B presentan datos obtenidos mientras se monitorean los niveles de metahemoglobina (MetHb) antes, durante y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, quienes recibieron 5 cursos de administración diaria de gNO por inhalación, cada uno de 30 minutos de duración, durante 5 días consecutivos, mientras los niveles de metahemoglobina se midieron usando un oxímetro de pulso, en donde la Figura 4A es un gráfico de los niveles de metahemoglobina en porcentaje como una función de tiempo medido antes (punto de tiempo 0), durante 250 cursos individuales de administración de gNO de 30 minutos cada uno (intervalo de tiempo de 0 a 30 minutos), después de los cursos (intervalo de tiempo de 30 a 60 minutos) y a los 120, 180 y 240 minutos después de que se descontinuara la administración de gNO y la Figura 4B es un gráfico de los niveles de metahemoglobina en porcentaje como una función de tiempo medido al principio y al final de los cursos de administración de gNO de 30 minutos durante el transcurso de 5 días, y seguido a los 8, 12 y 26 días después de que se descontinuara la administración de gNO;

45 Las Figuras 5A-F presentan los datos obtenidos mientras se monitorea la función pulmonar antes, durante y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, en donde los valores basales de las pruebas de función pulmonar se obtuvieron dentro de los 7 días anteriores a la administración de gNO, y los valores durante la administración de gNO se obtuvieron el día 2 del tratamiento de 5 días y otros datos se obtuvieron después de la administración final de gNO el día 5 y los días 8, 12 y 26, en donde la Figura 5A presenta el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1, por sus siglas en inglés) en porcentajes (FEV1), la Figura 5B presenta el flujo espiratorio medio máximo (MMEF, por sus siglas en inglés), la Figura 5C presenta la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO, por sus siglas en inglés), la Figura 5D presenta la capacidad vital forzada (FVC, por sus siglas en inglés), la Figura 5E presenta la capacidad pulmonar total (TLC, por sus siglas en inglés) y la Figura 5F presenta el volumen residual (RV, por sus siglas en inglés), mientras que todos los datos se presentan como promedios de los diez sujetos y diferencias absolutas en comparación con el valor basal antes de la administración de gNO, y las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba de Mann-Whitney;

65 las Figuras 6A-F presentan niveles sanguíneos de varias citoquinas antes y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, medidos a partir de muestras de sangre recolectadas dentro

de los 7 días anteriores a la administración de gNO, cada día durante el tratamiento y 8, 12 y 26 días después del mismo, en donde la Figura 6A presenta los niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés), los datos de interleucina (IL)-1B se presentan en la Figura 6B, IL-6 en la Figura 6C, IL-8 en la Figura 6D, IL-10 en la Figura 6E e IL-12p70 en la Figura 6F, como se determina mediante una matriz de bolillas citométricas, mientras que las diferencias estadísticas se compararon mediante ANOVA de medidas repetidas con la prueba posterior de Bonferroni para datos paramétricos (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70) o la prueba de Friedman con la prueba posterior de Dunn para datos no paramétricos (TNF e IL-1b); y

las Figuras 7A-C presentan niveles plasmáticos de angiopoyetina (Ang)-1 y Ang-2 antes y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por 10 individuos humanos sanos, medidos en una muestra de sangre recolectada dentro de los 7 días anteriores a la inhalación de gNO, cada día durante la administración de gNO y 8, 12 y 26 días después del mismo, en donde los niveles plasmáticos de Ang 1 se muestran en la Figura 7A, Ang-2 en la Figura 7B, y las relaciones Ang-2/Ang-1 en la Figura 7C, como se determina mediante el uso de una matriz de bolillas citométricas, mientras que las diferencias estadísticas se evaluaron en comparación con la prueba de Friedman y la prueba posterior de Dunn.

### Descripción de realizaciones específicas de la invención

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

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

Antes de explicar en detalle al menos una realización de la invención, se debe entender que la invención no se limita en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de practicarse o llevarse a cabo de varios modos. Además, se debe entender que la fraseología y terminología empleadas en la presente memoria tienen fines de descripción y no se deben considerar limitantes.

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

Como se analizó además anteriormente en la presente memoria, se sugirió la dosificación intermitente y la administración por inhalación de gNO, los ciclos entre altas concentraciones de gNO durante un período de tiempo relativamente corto y los períodos más largos sin o con baja concentración de gNO para superar los problemas de toxicidad del NO. Se sugirió que la alta concentración de gNO, administrada según un régimen intermitente, sería eficaz para anular los mecanismos de defensa del óxido nítrico de los patógenos.

Se sugirió además en la técnica que la alta concentración de gNO se puede administrar a una concentración de entre 80 ppm a 300 ppm, y que los períodos de tiempo para administrar la alta concentración deberían permitir una administración diaria de 600 a 1000 ppm horas.

Sin embargo, hasta la fecha, no se aplicó en humanos un régimen de inhalación intermitente de gNO, ciclos entre altas concentraciones de gNO durante un período de tiempo relativamente corto y períodos más largos sin o con baja concentración de gNO. Nunca se han realizado estudios que demuestren la seguridad y eficacia de tales protocolos en sujetos humanos y no se proporcionaron protocolos para monitorear los parámetros de seguridad y/o para tratar a pacientes humanos que necesitan una inhalación de gNO por encima de la dosis aprobada de 80 ppm.

En el curso del diseño y práctica de métodos novedosos para tratar diversas infecciones bacterianas, virales y protozoarias, los presentes inventores realizaron estudios en sujetos humanos, y compilaron protocolos adecuados para el tratamiento seguro y eficaz de un sujeto humano mediante inhalación intermitente de altas concentraciones de gNO. Los presentes inventores demostraron que las duraciones cortas de altas concentraciones de gNO no causan lesión pulmonar u otros signos de efectos adversos en humanos e incluso mejoran algunos efectos vitales tales como la función pulmonar y la frecuencia cardíaca.

Específicamente, los presentes inventores realizaron un estudio prospectivo de fase I, abierto y sin etiqueta de seguridad en adultos sanos, quienes inhalaban 160 ppm de gNO durante 30 minutos, cinco veces al día, durante cinco días consecutivos. No se produjeron eventos adversos significativos ni eventos adversos atribuibles a la inhalación de gNO y todos los individuos toleraron bien los ciclos de tratamiento con gNO. El porcentaje del volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV<sub>1</sub>) y otros parámetros de función pulmonar mejoraron y los niveles de nitritos/nitrosos

séricos, protrombina, citocinas proinflamatorias y quimiocinas no mostraron diferencias entre el valor basal y el día 5, mientras que los niveles de metahemoglobina aumentaron durante el período de estudio a un nivel tolerado y aceptado de 0,9 %. Por lo tanto, se demostró que la inhalación de 160 ppm de gNO o más durante 30 minutos, aproximadamente 5 veces al día, durante 2-7 días consecutivos, es segura y bien tolerada en personas sanas.

Por lo tanto, la presente invención, en algunas realizaciones de la misma, proporciona gNO para usar en métodos para tratar sujetos humanos mediante inhalación intermitente de una alta concentración de gNO. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se efectúan mientras se monitorean diversos parámetros relevantes para mantener la dosificación y el régimen deseados, relevantes para la seguridad del procedimiento y relevantes para la eficacia del tratamiento.

Según un aspecto que no se reivindica, se proporciona un método para tratar a un sujeto humano que necesita inhalación de NO gaseoso (gNO), que se efectúa sometiendo al sujeto humano a una inhalación intermitente de gNO en una concentración de al menos 160 ppm., el método se puede efectuar mientras se monitorean diversos parámetros fisiológicos en el sujeto, como se describe en la presente memoria.

Someter al sujeto humano a inhalación intermitente de gNO se puede efectuar sometiendo intermitentemente al sujeto humano a una mezcla gaseosa que contiene gNO en la concentración indicada (una mezcla gaseosa que contiene gNO).

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

Por “medios activos” se entiende que la mezcla gaseosa se administra o suministra al tracto respiratorio del sujeto humano. Esto se puede efectuar, por ejemplo, por medio de un dispositivo de inhalación que tiene una interfaz de administración adaptada para órganos respiratorios humanos. Por ejemplo, la interfaz de administración se puede colocar de forma intermitente en los órganos respiratorios del sujeto humano, por lo que cuando se retira, el sujeto respira aire ambiente o cualquier otra mezcla gaseosa que esté desprovista de gNO, como se define en la presente memoria.

Por “medios pasivos” se entiende que el sujeto humano inhala una mezcla gaseosa que contiene la dosis indicada de gNO sin dispositivos para suministrar la mezcla gaseosa al tracto respiratorio.

Por ejemplo, el sujeto se puede someter a 160 ppm o más de gNO en un régimen intermitente entrando y saliendo de un recinto atmosféricamente controlado lleno con la mezcla de gases que contiene gNO analizada en la presente memoria, o llenando y evacuando un recinto atmosféricamente controlado que está en contacto con el tracto respiratorio de un sujeto.

El término “intermitente” se usa en la presente memoria y en la técnica como un antónimo de “continuo” y significa iniciar y cesar una acción y/o realizar una acción en intervalos.

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

En toda la presente memoria, se usa “una mezcla gaseosa que contiene gNO”, por simplicidad, para describir una mezcla gaseosa que contiene al menos 160 ppm de gNO. La mezcla que contiene gNO puede comprender 160 ppm, 170 ppm, 180 ppm, 190 ppm, 200 ppm e incluso concentraciones mayores de gNO. Otras mezclas gaseosas mencionadas en la presente memoria incluyen menos de 160 ppm de gNO o están esencialmente desprovistas de gNO, como se define en la presente memoria.

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

El método se puede realizar mientras se mantiene una mezcla controlada de gases inhalados y exhalados mediante medios estándar para monitorear y controlar, en el sitio, el contenido y/o flujo de la mezcla a la que se somete al sujeto, o la que se entrega a través de una interfaz de administración, y/o mientras se monitorean los gases exhalados en el sitio y se controla la entrada mediante retroalimentación en tiempo real. El método se puede efectuar mientras se monitorea la concentración de gNO,  $FiO_2/O_2$ ,  $ETCO_2$  y  $NO_2$  en la mezcla gaseosa a la que está expuesto el sujeto, o mediante el monitoreo no invasivo de otros sistemas corporales, tales como la saturación de oxígeno en sangre ( $SpO_2/SaO_2/DO$ ) y la presencia de metahemoglobina en la sangre (SpMet).

En algunas realizaciones, la concentración de gNO en la mezcla gaseosa que contiene gNO se controla para no desviarse de una concentración predeterminada en más de 10 %. Por ejemplo, la concentración de gNO, fijada en 160 ppm, no supera los márgenes de 144 ppm a 176 ppm.

5 De manera similar, el contenido de NO<sub>2</sub> en una mezcla gaseosa que contiene gNO se controla de tal modo que la concentración de NO<sub>2</sub> se mantenga por debajo de 5 ppm.

Además, el nivel de oxígeno en la mezcla gaseosa que contiene gNO se controla de tal modo que la concentración de O<sub>2</sub> en la mezcla varía de aproximadamente 20 % a aproximadamente 25 %.

10 Como alternativa o además, el nivel de oxígeno en la mezcla gaseosa que contiene gNO se controla de tal modo que la fracción de oxígeno inspirado (FiO<sub>2</sub>) varía de aproximadamente 20 % a aproximadamente 100 %.

15 La frase “fracción de oxígeno inspirado” o “FiO<sub>2</sub>”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la fracción o porcentaje de oxígeno en una muestra de gas determinada. Por ejemplo, el aire ambiente al nivel del mar incluye 20,9 % de oxígeno, lo que equivale a FiO<sub>2</sub> de 0,21. El aire enriquecido con oxígeno tiene una FiO<sub>2</sub> mayor que 0,21, hasta 1,00, lo que significa 100 % de oxígeno. En el contexto de las realizaciones de la presente invención, FiO<sub>2</sub> se mantiene por debajo de 1 (menos de 100 % de oxígeno)

20 La frase “CO<sub>2</sub> al final de la espiración” o “ETCO<sub>2</sub>”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la presión parcial o concentración máxima de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) al final de una exhalación, que se expresa como un porcentaje de CO<sub>2</sub> o en la unidad de presión mmHg. Los valores normales para los humanos varían de 5 % a 6 % de CO<sub>2</sub>, lo que equivale a 35-45 mmHg. Dado que el CO<sub>2</sub> se difunde desde los pulmones hacia el aire exhalado, los valores de ETCO<sub>2</sub> reflejan el gasto cardíaco (CO, por sus siglas en inglés) y el flujo sanguíneo pulmonar a medida que el gas es transportado por el sistema venoso al lado derecho del corazón y después bombeado a los pulmones por los ventrículos derechos. Un dispositivo llamado capnómetro mide la presión parcial o concentración máxima de CO<sub>2</sub> al final de la exhalación. En el contexto de las realizaciones de la presente invención, se usa un capnómetro y se monitorean los niveles de ETCO<sub>2</sub> para proporcionar una retroalimentación de advertencia cuando ETCO<sub>2</sub> es mayor que 60 mmHg.

30 Los niveles de concentración respiratoria de NO, NO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> (tanto inhalados como exhalados; gases inspiratorios y espiratorios) típicamente se monitorean continuamente mediante muestreo desde un puerto de muestra en la boquilla ubicada en una máscara de inhalación de NO, NO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> equipada con un analizador electroquímico. En el contexto de las realizaciones de la presente invención, las consideraciones de seguridad requieren la minimización absoluta del número de ocasiones en las que los niveles de NO<sub>2</sub> superan las 5 ppm, las variaciones de concentración de gNO superan 10 % y los niveles de FiO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> caen por debajo de 20 % durante la administración de gNO.

40 Según algunas realizaciones de la presente invención, la inhalación intermitente incluye uno o más ciclos, cada ciclo que comprende la inhalación continua de una mezcla gaseosa que contiene gNO a la alta concentración especificada (p. ej., al menos 160 ppm) durante un primer período de tiempo, seguido de la inhalación de una mezcla gaseosa que no contiene gNO durante un segundo período de tiempo. Según algunas realizaciones de la presente invención, durante el segundo período de tiempo el sujeto puede inhalar aire ambiente o una mezcla controlada de gases que está esencialmente desprovista de gNO, como se define en la presente memoria.

45 En algunas realizaciones, el primer período de tiempo abarca de 10 a 45 minutos, o de 20 a 45 minutos, o de 20 a 40 minutos, y según algunas realizaciones, abarca aproximadamente 30 minutos.

Según algunas realizaciones de la presente invención, el segundo período de tiempo varía de 3 a 5 horas, o de 3 a 4 horas, y según algunas realizaciones el segundo período de tiempo abarca aproximadamente 3,5 horas.

50 Según algunas realizaciones de la presente invención, este régimen de inhalación se repite de 1 a 6 veces durante 24 horas, dependiendo de la duración del primer y segundo período de tiempo.

55 En algunas realizaciones, un ciclo de administración intermitente de gNO, p. ej., 160 ppm durante 30 minutos seguido de 3,5 horas de respiración sin gNO, se repite de 1 a 6 veces al día. Según algunas realizaciones, los ciclos se repiten 5 veces al día.

60 Según algunas realizaciones de la presente invención, el régimen de 1-5 ciclos por día se realiza durante 1 a 7 días, o de 2 a 7 días, o de 3 a 7 días. Según algunas realizaciones de la presente invención, la inhalación intermitente se efectúa durante un período de tiempo de 5 días. Sin embargo, también se contemplan períodos de tiempo más prolongados de administración intermitente de gNO como se describe en la presente memoria.

65 El método se puede realizar mientras se monitorean uno o más parámetros fisiológicos en el sujeto y al mismo tiempo se garantiza que no se efectúe ningún cambio sustancial en los parámetros monitoreados (como se demuestra en la presente memoria).

El monitoreo de uno o más parámetros fisiológicos se puede efectuar mediante medidas no invasivas y/o medidas invasivas suaves.

5 El monitoreo del(los) parámetro(s) fisiológico(s) en el sujeto se puede efectuar mediante técnicas de medición y análisis en el sitio basadas en muestras recolectadas esporádica, continua o periódicamente del sujeto en el sitio en tiempo real al lado de la cama del sujeto, y/o técnicas de medición y análisis fuera del sitio basadas en muestras recolectadas esporádica o periódicamente del sujeto que se envían para su procesamiento fuera del sitio que proporciona los resultados y análisis en un momento posterior.

10 La frase “técnicas de medición y análisis en el sitio” o “técnicas en el sitio”, se refiere a técnicas de monitoreo que proporcionan al profesional información en tiempo real sobre un parámetro fisiológico dado del sujeto, sin necesidad de enviar la muestra o los datos sin procesar a una instalación fuera del sitio para su análisis. Las técnicas en el sitio frecuentemente no son invasivas; sin embargo, algunas dependen del muestreo desde un dispositivo médico invasivo tal como un tubo respiratorio, un tubo de drenaje, un catéter intravenoso, un puerto subcutáneo u cualquier otra sonda implantable. Por lo tanto, la frase “parámetros en el sitio”, como se usa en la presente memoria, se refiere a parámetros fisiológicos que se pueden obtener mediante técnicas en línea.

15 Aparte de la trivial ventaja de la determinación en el sitio en tiempo real de parámetros fisiológicos, expresada principalmente en la capacidad de un profesional para responder inmediata y manualmente a cualquier cambio crítico de los mismos, los datos que resultan de la determinación en línea en tiempo real de parámetros fisiológicos también se pueden introducir en la maquinaria y usar para el control en tiempo real de retroalimentación de la maquinaria. En el contexto de las realizaciones de la presente invención, el término “en tiempo real” también se refiere a sistemas que actualizan la información y responden a la misma sustancialmente a la misma velocidad a la que reciben la información. Tal retroalimentación en tiempo real se puede usar para cumplir con el régimen de tratamiento y/o actuar inmediata y automáticamente en respuesta a cualquier desviación crítica de los parámetros aceptables como una medida de seguridad.

20 Por lo tanto, según realizaciones de la presente invención, el término “parámetro en el sitio” se refiere a datos fisiológicos y/o mecánicos y/o químicos que se obtienen y se pueden poner en uso o consideración en o cerca del sitio del sujeto (p. ej., al lado de la cama) en un período de tiempo relativamente corto, es decir, que el período de tiempo que abarca las etapas de muestreo, prueba, procesamiento y visualización/usando el dato es relativamente corto. Un “parámetro en el sitio” se puede obtener, por ejemplo, en menos de 30 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos, menos de 1 minuto, menos de 0,5 minutos, menos de 20 segundos, menos de 10 segundos, menos de 5 segundos, o menos de 1 segundo desde el muestreo hasta el uso. Por ejemplo, el tiempo necesario para obtener parámetros en el sitio mediante una técnica conocida como oximetría de pulso es casi instantáneo; una vez que el dispositivo está en su lugar y configurado, los datos relacionados, p. ej., con la saturación de oxígeno en la periferia de un sujeto, están disponibles en menos de 1 segundo desde el muestreo hasta el uso.

30 En el contexto de algunas realizaciones de la presente invención, la frase “técnicas de análisis y medición fuera del sitio” o “técnicas fuera del sitio”, se refiere a técnicas que proporcionan información sobre un parámetro fisiológico dado del sujeto después de enviar una muestra o datos sin procesar a una instalación fuera de línea, y típicamente fuera del sitio, y recibir el análisis fuera de línea, a veces horas o días después de haber obtenido la muestra. Las técnicas fuera del sitio frecuentemente se basan en muestras recolectadas mediante técnicas de leve invasión, tales como la extracción de sangre para monitorear el nivel plasmático de citocinas inflamatorias, y técnicas invasivas, tales como biopsias, catéteres o tubos de drenaje, sin embargo, algunas técnicas fuera del sitio dependen de muestreos no invasivos tales como el análisis químico de orina y heces fuera de línea y fuera del sitio. La frase “parámetros fuera del sitio”, como se usa en la presente memoria, se refiere a parámetros fisiológicos que se obtienen mediante técnicas de laboratorio fuera del sitio.

40 Por lo tanto, según realizaciones de la presente invención, el término “parámetro fuera del sitio” se refiere a datos fisiológicos y/o mecánicos y/o químicos que se obtienen y se pueden poner en uso o consideración en un período de tiempo relativamente largo, es decir, que el período de tiempo que abarca los pasos de muestreo, prueba, procesamiento y visualización/uso del dato es largo en comparación con los parámetros en el sitio. Por lo tanto, un “parámetro fuera del sitio” se obtiene en más de 1 día, más de 12 horas, más de 1 hora, más de 30 minutos, más de 55 10 minutos o más de 5 minutos desde el muestreo hasta el uso.

Un “parámetro fuera del sitio” típicamente se obtiene al someter una muestra a procedimientos químicos, biológicos, mecánicos o de otro tipo, que típicamente se realizan en un laboratorio y, por lo tanto, no se realizan “en el sitio”, es decir, en el sitio del sujeto o cerca de él.

60 Las medidas no invasivas para monitorear diversos parámetros fisiológicos incluyen, sin limitación, oximetría de pulso, análisis respiratorio no intubado y/o capnometría. Las medidas invasivas leves para monitorear diversos parámetros fisiológicos incluyen, sin limitación, extracción de sangre, análisis continuo de gases en sangre y metabolitos y, en algunas realizaciones, análisis respiratorio intubado y medidas de monitoreo transcutáneo.

65

- 5 El término “oximetría de pulso” se refiere a una tecnología no invasiva y en el sitio que mide parámetros fisiológicos relacionados con la respiración siguiendo las características de absorción de luz de la hemoglobina a través de la piel (dedo, lóbulo de la oreja, etc.) y las diferencias espectroscópicas observadas en pacientes oxigenados y especies desoxigenadas de la hemoglobina, así como las especies de hemoglobina unidas a otras moléculas, tales como el monóxido de carbono (CO) y la metahemoglobina, en donde el hierro en el grupo hemo está en el estado Fe<sup>3+</sup> (férrico). Los parámetros fisiológicos que se pueden determinar mediante la oximetría de pulso incluyen SpO<sub>2</sub>, SpMet y SpCO.
- 10 La frase “análisis respiratorio no intubado”, como se usa en la presente memoria, se refiere a un grupo de tecnologías no invasivas y en el sitio, tales como la espirometría y la capnografía, que proporcionan mediciones de la mecánica pulmonar fisiológica y la química gaseosa respiratoria mediante el muestreo del flujo de aire inhalado/exhalado o dirigiendo la respiración del sujeto a un detector, todo sin entrar en el tracto respiratorio del sujeto u otros orificios ni penetrar la piel en ninguna etapa.
- 15 El término “espirometría”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la batería de mediciones de parámetros relacionados con la respiración y funciones pulmonares mediante un espirómetro no invasivo y en el sitio. A continuación se muestran parámetros de espirometría ilustrativos que se pueden usar en el contexto de algunas realizaciones de la presente invención:
- 20 El parámetro espirométrico volumen corriente (VC) es la cantidad de aire inhalado y exhalado normalmente en reposo, en donde los valores normales se basan en el peso corporal ideal de la persona.
- 25 El parámetro espirométrico capacidad pulmonar total (TLC, por sus siglas en inglés) es el volumen máximo de aire presente en los pulmones.
- 30 El parámetro espirométrico capacidad vital (VC, por sus siglas en inglés) es la cantidad máxima de aire que se puede expulsar de los pulmones después de una inhalación máxima, y es igual a la suma del volumen de reserva inspiratorio, el volumen corriente y el volumen de reserva espiratorio.
- 35 El parámetro espirométrico capacidad vital lenta (SVC, por sus siglas en inglés) es la cantidad de aire que se inhala tan profundamente como sea posible y después se exhala completamente, lo cual mide la profundidad con la que una persona puede respirar.
- 40 El parámetro espirométrico capacidad vital forzada (FVC, por sus siglas en inglés) es el volumen de aire medido en litros, que se puede exhalar forzosamente después de una inspiración completa, y constituye la maniobra más básica en las pruebas de espirometría.
- 45 El parámetro espirométrico volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEVI) es el volumen de aire que se puede expulsar con fuerza en un segundo, después de una inspiración completa. Los valores promedio de FEVI en personas sanas dependen principalmente del sexo y la edad, y los valores que caen entre 80 % y 120 % del valor promedio se consideran normales. Los valores normales predichos para FEVI se pueden calcular en el sitio y dependen de la edad, sexo, altura, peso, etnicidad, así como del estudio de investigación en el que se basan.
- 50 La relación del parámetro espirométrico FEVI/FVC (FEVI%) es la relación de FEVI a FVC, que en adultos sanos debería ser aproximadamente 75-80 %. El FEVI% previsto se define como el FEVI% del paciente dividido por el FEVI% promedio en la población apropiada para esa persona.
- 55 El parámetro espirométrico flujo espiratorio forzado (FEF) es el flujo (o velocidad) de aire que sale del pulmón durante la porción media de una espiración forzada. Se puede administrar en momentos discretos, generalmente definidos por la fracción restante de la capacidad vital forzada (FVC), es decir, 25 % de FVC (FEF25), 50 % de FVC (FEF50) o 75 % de FVC (FEF75). También se puede dar como la media del flujo durante un intervalo, también generalmente delimitado por cuando quedan fracciones específicas de FVC, usualmente 25-75 % (FEF25-75 %). Los valores medidos que varían de 50-60 % hasta 130 % del promedio se consideran normales, mientras que los valores normales previstos para FEF se pueden calcular en el sitio y dependen de la edad, sexo, altura, peso, etnicidad, así como del estudio de investigación en el que se basan. Investigaciones recientes sugieren que FEF25-75 % o FEF25-50 % puede ser un parámetro más sensible que FEVI en la detección de enfermedades obstructivas de las vías respiratorias pequeñas. Sin embargo, en la ausencia de cambios concomitantes en los marcadores estándar, las discrepancias en el flujo espiratorio medio pueden no ser lo suficientemente específicas como para ser útiles, y las guías prácticas actuales recomiendan continuar usando FEVI, VC y FEVI/VC como indicadores de enfermedad obstructiva.
- 60 El parámetro espirométrico fuerza inspiratoria negativa (NIF, por sus siglas en inglés) es la fuerza más grande que los músculos del pecho pueden ejercer para respirar, en donde los valores indican el estado de los músculos respiratorios.
- 65 El parámetro espirométrico MMEF o MEP se refiere al flujo espiratorio máximo (medio) y es el pico del flujo espiratorio tomado de la curva flujo-volumen y medido en litros por segundo. El MMEF se refiere al flujo pico espiratorio (PEF, por sus siglas en inglés), que generalmente se mide con un medidor de flujo máximo y se expresa en litros por minuto.

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

5 El parámetro espirométrico Capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO) se refiere a la absorción de monóxido de carbono de una sola inspiración en un tiempo estándar (usualmente 10 segundos). Hay calculadoras in situ disponibles para corregir el DLCO en función de los niveles de hemoglobina, la anemia, la hemorragia pulmonar y la altitud o la presión atmosférica en el lugar donde se realizó la medición.

10 El parámetro espirométrico Máxima ventilación voluntaria (MW) es una medida de la cantidad máxima de aire que se puede inhalar y exhalar en un minuto. Típicamente, este parámetro se determina durante un período de tiempo de 15 segundos antes de extrapolarse a un valor de un minuto expresado en litros/minuto. Los valores promedio para hombres y mujeres son de 140 a 180 y 80 a 120 litros por minuto, respectivamente.

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

20 El parámetro espirométrico Tiempo de espiración forzada (PET) mide la duración de la espiración en segundos.

El parámetro espirométrico Capacidad vital lenta (SVC) es el volumen máximo de aire que se puede exhalar lentamente después de una inhalación máxima lenta.

25 La Presión espiratoria estática intrínseca positiva al final de la espiración (PEEPi estática) se mide como una presión meseta de apertura de las vías respiratorias durante la oclusión de las vías respiratorias.

30 El parámetro espirométrico Presión inspiratoria máxima (MIP) es el valor que representa el nivel más alto de presión negativa que una persona puede generar por sí misma durante una inhalación, que se expresa en centímetros de presión de agua (cmH<sub>2</sub>O) y se mide con un manómetro y sirve como indicador de la fuerza del diafragma y como parámetro de diagnóstico independiente.

35 El término «capnografía» se refiere a una tecnología para controlar la concentración o la presión parcial del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en los gases respiratorios. El CO<sub>2</sub> de la marea final, o ETCO<sub>2</sub>, es el parámetro que se puede determinar mediante capnografía.

40 La tecnología de detección de gases está integrada en muchos dispositivos médicos y otros dispositivos industriales y permite la determinación cuantitativa de la composición química de una muestra gaseosa que fluye o se captura de otro modo en ella. Tal determinación química de los gases puede formar parte de la batería de ensayos no invasivos in situ, de la actividad controlada y monitorizada de los métodos que se presentan en la presente memoria. Los detectores de gas, así como los mezcladores y reguladores de gas, se utilizan para determinar y controlar parámetros tal como la fracción del nivel de oxígeno inspirado (FiO<sub>2</sub>) y la concentración de óxido nítrico en la mezcla de gases inhalados.

45 La medición de los signos vitales, tal como la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la temperatura corporal, puede considerarse parte de una serie de mediciones in situ y no invasivas.

50 La expresión «índice pulmonar integrado», o IPI, se refiere al índice pulmonar del paciente, que utiliza información sobre los gases inhalados/exhalados de la capnografía y sobre los gases disueltos en la sangre de la pulsioximetría para proporcionar un valor único que describe el estado respiratorio del paciente. El IPI, que se obtiene mediante técnicas in situ y no invasivas, integra cuatro parámetros fisiológicos principales proporcionados por un monitor de paciente (el CO<sub>2</sub> de la marea final y la frecuencia respiratoria, medidas mediante capnografía, y la frecuencia del pulso y la oxigenación de la sangre, SpO<sub>2</sub>, medidas mediante oximetría de pulso), y utiliza esta información junto con un algoritmo para producir la puntuación del IPI. El IPI proporciona una indicación simple en tiempo real (in situ) del estado ventilatorio general del paciente en forma de un número entero (puntuación) que varía entre 1 y 10. La puntuación IPI no reemplaza los parámetros respiratorios actuales del paciente, sino que se utiliza para evaluar rápidamente el estado respiratorio del paciente a fin de determinar la necesidad de una evaluación o intervención clínica adicional.

Los parámetros fisiológicos o químicos monitorizados pueden incluir uno o más de los siguientes parámetros:

60 un nivel de metahemoglobina (SpMet) (un parámetro en línea);

un nivel de CO<sub>2</sub> de la marea final (ETCO<sub>2</sub>) (un parámetro en línea);

un nivel de oxigenación; FiO<sub>2</sub> o nivel de saturación de oxígeno (SpO<sub>2</sub>) (un parámetro en línea);

65 un nivel plasmático de citocinas inflamatorias (un parámetro fuera de línea); y

un nivel sérico de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2\text{-}/\text{NO}_3\text{-}$ ) (un parámetro fuera de línea);

Los parámetros fisiológicos o químicos monitorizados incluyen además uno o más de los siguientes parámetros:

- 5 un nivel de dióxido de nitrógeno en la orina (nivel de nitrito en la orina) (un parámetro fuera de línea);
- 10 un signo vital seleccionado del grupo que consiste en la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la temperatura corporal (un parámetro en línea);
- 15 una función pulmonar (parámetro espirométrico) (un parámetro en línea) como, aunque no de forma limitativa, el volumen espiratorio forzado (FEV1), el flujo espiratorio medio máximo (MMEF), la capacidad de difusión del monóxido de carbono del pulmón (DLCO), la capacidad vital forzada (PVC), la capacidad pulmonar total (TLC) y el volumen residual (RV);
- 20 un marcador hematológico (un parámetro fuera de línea), tal como, aunque no de forma limitativa, un nivel de hemoglobina, una relación de hematocrito, un recuento de glóbulos rojos, un recuento de glóbulos blancos, un diferencial de glóbulos blancos y un recuento de plaquetas;
- un parámetro de coagulación (un parámetro fuera de línea) tal como, aunque no de forma limitativa, un tiempo de protrombina (PT), un cociente de protrombina (PR) y un cociente internacional normalizado (INR);
- un nivel de creatinina sérica (un parámetro fuera de línea);
- 25 un marcador de la función hepática (un parámetro fuera de línea) seleccionado del grupo que consiste en un nivel de aspartato aminotransferasa (AST), un nivel de transaminasa glutámica-oxaloacética (SOOT) en suero, un nivel de fosfatasa alcalina y un nivel de gamma-glutamil transferasa (GGT);
- 30 un factor de activación endotelial vascular (un parámetro fuera de línea) seleccionado del grupo que consiste en la relación Ang-1, Ang-2 y Ang-2/Ang-1.

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

35 El método como se describe en la presente memoria puede ser tal que no se observe ningún cambio sustancial en al menos uno de los parámetros monitorizados.

Un cambio en un parámetro puede considerarse sustancial cuando el valor de una observación (medición, resultado de una prueba, lectura, resultado calculado, etc.) o un grupo de observaciones se aleja notablemente del nivel normal, por ejemplo, cae aproximadamente el doble del límite superior de un nivel normal.

40 En la presente memoria, se hace referencia a un nivel «normal» de un parámetro como valores basales o simplemente «valor basal». El término «valor basal» se define como un intervalo de valores que se han determinado estadísticamente a partir de un gran número de observaciones y/o mediciones que se han recopilado durante años de práctica médica con respecto a la población humana general, un subconjunto específico de la misma (cohorte) o, en algunos casos, con respecto a una persona específica. Un valor basal es un valor específico de un parámetro que, generalmente y desde el punto de vista médico, se acepta en la técnica como normal para un sujeto en determinadas condiciones físicas. Estos valores basales o valores «normales» y los medios para determinar estos valores normales se conocen en la técnica. Alternativamente, se puede determinar un valor basal a partir de o en un sujeto específico antes de efectuar el método que se describe en la presente memoria utilizando métodos, procedimientos y medios técnicos bien conocidos y aceptados. Por lo tanto, un valor basal se asocia con un intervalo de valores tolerados, o tolerancia, que se han determinado junto con la medición de un parámetro. En otras palabras, un valor basal es un intervalo de valores aceptables que limitan el intervalo de observaciones que se consideran «normales». La amplitud del valor basal, o la diferencia entre los límites superior e inferior del mismo, se denomina «intervalo de valor basal», la diferencia desde el centro del intervalo se denomina en la presente memoria «unidad de desviación aceptable» o ADU. Por ejemplo, un valor basal de 4 a 8 tiene un intervalo de valor basal de 4 y una unidad de desviación aceptable de 2.

60 Un cambio significativo en una observación relacionada con un parámetro dado puede ser aquel que disminuya más de 2 unidades de desviación aceptable (2 ADU) desde un valor basal aceptable predeterminado. Por ejemplo, una observación de 10, relacionada con un valor basal de 4 a 8 (caracterizada por un intervalo de referencia de 4 y una unidad de desviación aceptable de 2), representa una unidad de desviación aceptable, o 1 ADU, del valor basal. Alternativamente, un cambio se considera sustancial cuando es de más de 1,5 ADU, más de 1 ADU o más de 0,5 ADU.

65

Una «observación estadísticamente significativa» o una «desviación estadísticamente significativa con respecto a un valor basal» es tal que es poco probable que se haya producido como resultado de un factor aleatorio, un error o una casualidad.

5 Cabe señalar que, en algunos parámetros o grupos de parámetros, la importancia de un cambio de los mismos puede depender del contexto, del sistema biológico, del caso médico, del sujeto humano e incluso de la maquinaria de medición, es decir, un parámetro en particular puede requerir o dictar criterios más estrictos o flexibles para determinar si una lectura del mismo debe considerarse significativa. Se observa en la presente memoria que, en casos específicos, algunos parámetros pueden no ser mensurables debido al estado del paciente, la edad u otras razones.  
10 En tales casos, el método se efectúa mientras se monitorizan los demás parámetros.

Por lo tanto, una desviación con respecto a un valor basal se define como un cambio estadísticamente significativo en el valor del parámetro medido durante y/o después de un período completo o parcial de administración del régimen que se describe en la presente memoria, en comparación con el valor basal correspondiente del parámetro. Se señala aquí que las observaciones de algunos parámetros pueden fluctuar por varias razones, y la determinación de un cambio significativo en los mismos debe tener en cuenta tales eventos y corregir el valor basal apropiado en consecuencia.  
15

La monitorización de los niveles de metahemoglobina y nitrito sérico se ha aceptado en la técnica como un requisito para controlar la seguridad de la inhalación de gNO en un sujeto. Sin embargo, hasta la fecha, no hay indicios claros de que los niveles de metahemoglobina y nitrito sérico permanezcan sustancialmente inalterados tras la inhalación de gNO por parte de un sujeto humano.  
20

El método puede comprender monitorizar al menos uno de los parámetros que se han descrito anteriormente en la presente memoria.  
25

El parámetro monitorizado puede ser el nivel de metahemoglobina.

Como los niveles de metahemoglobina se pueden medir usando medidas no invasivas, el parámetro del porcentaje de saturación en la periferia de la metahemoglobina (SpMet) se usa para monitorear la estabilidad, seguridad y eficacia del método que se presenta en la presente memoria. Por lo tanto, según algunas realizaciones de la presente invención, el parámetro siguiente es SpMet y durante y después de la administración, el nivel de SpMet no supera el 5 % y, preferiblemente, no supera el 1 %. Como se demuestra en la sección de Ejemplos que sigue, el nivel de SpMet de los sujetos sometidos al método que se describe en la presente memoria no supera el 1 %.  
30  
35

El parámetro monitorizado puede ser el nivel sérico de nitrato/nitrito.

Los niveles altos de nitrito y nitrato en el suero de un sujeto están asociados con la toxicidad del NO y, por lo tanto, los niveles séricos de nitrito/nitrato se usan para detectar los efectos adversos del método que se presenta en la presente memoria. Según algunas realizaciones de la presente invención, el parámetro ensayado es el nitrito/nitrato sérico, que se controla durante y después del tratamiento y el nivel aceptable de nitrito sérico es inferior a 2,5 micromoles/litro y el nitrato sérico es inferior a 25 micromoles/litro.  
40

El parámetro monitorizado puede ser el nivel de marcadores inflamatorios.  
45

La elevación de los marcadores inflamatorios se asocia con un fenómeno llamado «tormenta de citocinas», que se ha observado en sujetos sometidos a un tratamiento por inhalación de gNO.

La monitorización de los marcadores inflamatorios mientras se lleva a cabo el método que se describe en la presente memoria nunca se ha enseñado hasta ahora. Asimismo, nunca se han enseñado hasta ahora métodos que impliquen la inhalación de gNO en un régimen en el que no se observe ningún cambio significativo en los marcadores inflamatorios.  
50

El método puede comprender monitorizar al menos dos de los parámetros mencionados anteriormente.  
55

Los parámetros monitorizados pueden ser dos o todos los niveles de metahemoglobina, el nivel de nitrito sérico y los marcadores inflamatorios.

Si bien típicamente se observan cambios en el nivel de metahemoglobina, el nivel de nitrito sérico y los marcadores inflamatorios en sujetos sometidos a la inhalación de gNO, sorprende el descubrimiento de que no se ha observado ningún cambio sustancial en estos parámetros en sujetos humanos sometidos al régimen que se ha descrito.  
60

Por lo tanto, el método como se describe en la presente memoria puede llevarse a cabo mientras se monitoriza el nivel de metahemoglobina (SpMet), el nivel de nitrito sérico (NO<sub>2</sub>) y el nivel plasmático de un grupo de citocinas inflamatorias, tales como, aunque no de forma limitativa, los niveles séricos de (TNF) α, (IL)-1β, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-  
65

12p70 en el sujeto, en donde un cambio en al menos uno de estos parámetros es inferior a 2 unidades de desviación aceptables con respecto a un valor basal.

5 El método puede efectuarse mientras se monitorizan al menos uno, al menos dos o todos los parámetros in situ, que incluyen SpMet, SpO<sub>2</sub> y ETCO<sub>2</sub>, y/o se monitorizan al menos uno o todos los parámetros externos, que incluyen el nivel sérico de nitrito/nitrato y las citocinas inflamatorias en el plasma.

10 Por ejemplo, el método se efectúa mientras se monitoriza SpMet como un parámetro in situ. Alternativamente, el método se efectúa mientras se monitorizan SpMet y ETCO<sub>2</sub> como parámetros in situ. Alternativamente, el método se efectúa controlando SpMet, ETCO<sub>2</sub> y SpO<sub>2</sub> como parámetros in situ.

15 Además, alternativamente, el método se efectúa mientras se monitoriza la SpMet como un parámetro in situ y las citocinas inflamatorias en el plasma como un parámetro externo. Alternativamente, el método se efectúa mientras se monitorizan el SpMet y el ETCO<sub>2</sub> como parámetros in situ, y el nivel sérico de nitrito/nitrato como un parámetro externo. Alternativamente, el método se lleva a cabo mientras se monitoriza el SpMet como un parámetro in situ, y las citocinas inflamatorias en el plasma y el nivel sérico de nitrito/nitrato como parámetros externos. Alternativamente, el método se lleva a cabo mientras se monitoriza el ETCO<sub>2</sub> como un parámetro in situ, y las citocinas inflamatorias en el plasma y el nivel sérico de nitrito/nitrato como parámetros externos. Alternativamente, el método se lleva a cabo mientras se monitoriza el SpO<sub>2</sub> como un parámetro in situ, y las citocinas inflamatorias en el plasma y el nivel sérico de nitrito/nitrato como parámetros externos.

20 Además, alternativamente, el método se efectúa mientras se monitorizan SpMet, ETCO<sub>2</sub> y SpO<sub>2</sub> como parámetros in situ, y las citocinas inflamatorias en el plasma y el nivel de nitrito/nitrato sérico como parámetros externos.

25 El método puede efectuarse monitorizando al menos uno, al menos dos o todos los parámetros in situ, que incluyen SpMet, ETCO<sub>2</sub> y SpO<sub>2</sub>, y/o monitorizando al menos uno o todos los parámetros externos, que incluyen el nivel sérico de nitrito/nitrato y las citocinas inflamatorias en el plasma, y monitorizando adicionalmente uno o más y en cualquier combinación de:

30 un nivel de NO<sub>2</sub> en la orina (un parámetro fuera de línea);

un signo vital (un parámetro en línea);

35 una función pulmonar (un parámetro en línea);

un marcador hematológico (un parámetro fuera de línea);

un parámetro de coagulación (un parámetro fuera de línea);

40 un nivel de creatinina sérica (un parámetro fuera de línea);

un marcador de función hepática (un parámetro fuera de línea);

45 un factor de activación endotelial vascular (un parámetro fuera de línea).

El método puede efectuarse mientras se monitoriza al menos uno, al menos dos o todos los parámetros químicos in situ en la mezcla de gases inhalados, tales como FiO<sub>2</sub> y NO<sub>2</sub>.

50 Se observa en la presente memoria que el método puede efectuarse siempre que no se observe ningún cambio sustancial en uno o más de uno o todos los parámetros monitorizados que se describen en la presente memoria.

55 El método puede efectuarse mientras se monitorizan los niveles de nitrito en la orina, de tal modo que el nivel de nitrito en la orina permanezca sustancialmente inalterado durante y después de llevar a cabo el método como se presenta en la presente memoria. Se observa en la presente memoria que los niveles de nitrito en la orina pueden fluctuar por varias razones conocidas, y la determinación de un cambio significativo en los mismos debe tener en cuenta tales eventos y corregir el valor basal apropiado en consecuencia.

60 Se observa que el nivel de nitrito en la orina es indicativo de la seguridad de la inhalación de gNO, pero nunca se ha controlado hasta ahora en el contexto de la inhalación de gNO en general y en el contexto de la inhalación intermitente de gNO, como se describe en la presente memoria.

65 Los marcadores hematológicos, tales como el nivel de hemoglobina, la relación de hematocrito, el recuento de glóbulos rojos, el recuento de glóbulos blancos, el diferencial de glóbulos blancos y el recuento de plaquetas, pueden permanecer sustancialmente inalterados durante y después de llevar a cabo el método como se presenta en la presente memoria.

Los factores de activación endotelial vascular, tal como la relación Ang-1, Ang-2 y Ang-2/Ang-1, así como el nivel de creatinina sérica y varios marcadores de la función hepática, tal como el nivel de aspartato aminotransferasa (AST), el nivel de transaminasa glutámica oxaloacética (SOOT) en suero, el nivel de fosfatasa alcalina y el nivel de gamma-glutamil transferasa (GGT), pueden mantenerse sustancialmente sin cambios durante y después de llevar a cabo el método como se presenta en la presente memoria.

La oxigenación del sujeto se puede evaluar mediante la medición de la saturación de oxígeno periférico del sujeto ( $SpO_2$ ). Este parámetro es una estimación del nivel de saturación de oxígeno y, típicamente, se mide mediante medidas no invasivas, tal como un dispositivo de oxímetro de pulso. Por lo tanto, el parámetro seguido durante y después de la administración puede ser  $SpO_2$ , y el nivel de  $SpO_2$  es superior a aproximadamente el 89 %.

Diversos signos vitales, tal como la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la temperatura corporal;

y/o diversas funciones pulmonares (parámetro espirométrico), tal como el volumen espiratorio forzado (FEY1), el flujo espiratorio medio máximo (MMEF), la capacidad de difusión del monóxido de carbono del pulmón (DLCO), la capacidad vital forzada (PVC), la capacidad pulmonar total (TLC) y el volumen residual (RV); y varios parámetros de coagulación, tales como el tiempo de protrombina (PT), la relación de protrombina (PR) y la relación internacional normalizada (INR), pueden permanecer sustancialmente inalterados durante y después de llevar a cabo el método como se presenta en la presente memoria. Se observa que estos parámetros se consideran una indicación de que la salud general del sujeto no se está deteriorando como resultado de la afección médica y/o el tratamiento.

Los indicadores generales de salud antes mencionados pueden mostrar una mejora durante y después de llevar a cabo el método como se presenta en la presente memoria, lo que indica que el tratamiento es beneficioso para el sujeto.

Por lo tanto, el método como se describe en la presente memoria puede efectuarse de tal modo que los indicadores de salud generales como se describen en la presente memoria se mantengan al menos sin cambios o se mejoren.

Un sujeto humano que necesite un tratamiento por inhalación de gNO puede ser un ser humano que padece una enfermedad o trastorno del tracto respiratorio.

Como se utiliza en la presente memoria, la frase «tracto respiratorio» abarca todos los órganos y tejidos que participan en el proceso de respiración en un sujeto humano u otro sujeto mamífero, incluidas las cavidades conectadas al tracto respiratorio, tal como los oídos y los ojos.

Un tracto respiratorio, como se utiliza en la presente memoria, abarca el tracto respiratorio superior, que incluye la nariz y las fosas nasales, los senos prenasales, la faringe, la laringe, la tráquea, los bronquios y los bronquiolos no alveolares; y el tracto respiratorio inferior, incluidos los pulmones y los bronquiolos respiratorios, los conductos alveolares, los sacos alveolares y los alvéolos del mismo.

Las enfermedades y trastornos respiratorios que se pueden tratar mediante cualquiera de los métodos como se presenta en la presente memoria pueden clasificarse en: Enfermedad pulmonar inflamatoria; enfermedades pulmonares obstructivas tales como la EPOC; enfermedades pulmonares restrictivas; infecciones del tracto respiratorio, tal como infecciones del tracto respiratorio superior/inferior y tumores malignos o benignos; enfermedades de la cavidad pleural; enfermedades vasculares pulmonares; y enfermedades neonatales.

Según las realizaciones de la presente invención, las enfermedades restrictivas incluyen enfermedades restrictivas intrínsecas, tales como la asbestosis causada por la exposición prolongada al polvo de amianto; fibrosis por radiación, usualmente por la radiación que se administra para el tratamiento del cáncer; ciertos fármacos tales como la amiodarona, la bleomicina y el metotrexato; como consecuencia de otra enfermedad tal como la artritis reumatoide; neumonitis por hipersensibilidad debida a una reacción alérgica a las partículas inhaladas; síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), una afección pulmonar grave que se produce en respuesta a una enfermedad o lesión crítica; síndrome de dificultad respiratoria infantil debido a una deficiencia de surfactante en los pulmones de un bebé nacido prematuramente; fibrosis pulmonar idiopática; neumonía intersticial idiopática, de la cual hay varios tipos; sarcoidosis; neumoma eosinofílico; linfangioleiomiomatosis; histiocitosis pulmonar de células de Langerhans; proteinosis alveolar pulmonar; enfermedades pulmonares intersticiales (EPI), tales como sustancias inorgánicas inhaladas: silicosis, asbestosis, beriliosis, sustancias orgánicas inhaladas: neumonitis por hipersensibilidad, inducidas por fármacos: antibióticos, fármacos quimioterapéuticos, agentes antiarrítmicos, estatinas, enfermedad del tejido conectivo: esclerosis sistémica, polimiositis, dermatomiositis, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, infección, neumonía atípica, neumonía por neumocistis (PCP), tuberculosis, clamidia trachomatis, RSV, sarcoidosis idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, síndrome de Hamman-Rich, síndrome de antisintetasa y carcinomatosis linfagítica maligna; y enfermedades restrictivas extrínsecas, tales como las enfermedades neuromusculares, incluidas la miastenia gravis y el síndrome de Guillain-Barré; enfermedades no musculares de la parte superior del tórax, tales como la cifosis y las deformidades de la pared torácica; enfermedades que restringen el volumen

torácico/abdominal inferior debido a la obesidad, la hernia diafragmática o la presencia de ascitis; y el engrosamiento pleural.

5 Según las realizaciones de la presente invención, las enfermedades obstructivas incluyen el asma, la EPOC, la bronquitis crónica, el enfisema, las bronquiectasias, la fibrosis quística y la bronquiolitis.

10 Las enfermedades y trastornos respiratorios que se pueden tratar mediante cualquiera de los métodos que se presentan en la presente memoria también pueden clasificarse como agudos o crónicos; causada por un factor externo o un factor endógeno; o como enfermedades y trastornos respiratorios infecciosos o no infecciosos.

15 Las enfermedades y trastornos del tracto respiratorio incluyen enfermedades y trastornos otorrinolaringológicos y/o del tracto respiratorio superior y/o del sistema respiratorio inferior, y también la presente memoria se refiere a ellas como «enfermedades respiratorias» o «enfermedades y trastornos respiratorios».

20 Las enfermedades y trastornos ilustrativos y más comunes del tracto respiratorio incluyen infecciones agudas, tales como, por ejemplo, sinusitis, broncolitis, tuberculosis, neumonía, bronquitis e influenza, y afecciones crónicas tales como asma, fibrosis quística y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

25 Según algunas realizaciones de la presente invención, el sujeto que necesita un tratamiento por inhalación de gNO es un sujeto humano que padece una enfermedad o trastorno que se manifiesta en el tracto respiratorio, como se define en la presente memoria.

30 En cualquiera de las realizaciones que se describen en la presente memoria, un sujeto humano incluye cualquier ser humano vivo de cualquier edad, desde neonatales y recién nacidos hasta adultos y personas mayores, con cualquier peso, altura y cualquier otro estado físico.

35 Una enfermedad o trastorno que se manifiesta en el tracto respiratorio abarca también cualquier enfermedad o trastorno que no sea causado por una infección u obstrucción de las vías respiratorias en el tracto respiratorio, sino que sea causado por otro factor, pero que puede manifestarse por una infección u obstrucción de las vías respiratorias en el tracto respiratorio.

40 Una afección ilustrativa es la fibrosis quística (CF). La fibrosis quística es un trastorno genético en el que las mutaciones en el canal de cloruro epitelial, el regulador de la conductancia transmembrana (CFTR) de la fibrosis quística, alteran varios mecanismos de la inmunidad innata. Las infecciones pulmonares microbianas crónicas son la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes con fibrosis quística. El tratamiento precoz de erradicación antibiótica de los pacientes con fibrosis quística para el patógeno bacteriano más prevalente, la *Pseudomonas aeruginosa*, ha aumentado considerablemente la esperanza de vida de los pacientes con fibrosis quística; sin embargo, la gran mayoría de los pacientes adultos con fibrosis quística siguen padeciendo infecciones pulmonares crónicas por *P. aeruginosa* que son difíciles de tratar debido a la formación de biopelículas y al desarrollo de cepas virulentas resistentes a los antibióticos. Otras especies que se encuentran en las vías respiratorias de la fibrosis quística son las cepas resistentes a los antibióticos, tal como el *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), los miembros del complejo *Burkholderia cepacia*, las especies de *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, las especies *mycobacteria* no tuberculosas (NTM) y varias bacterias anaeróbicas estrictas.

45 Según algunas realizaciones de la presente invención, un sujeto humano que necesita un tratamiento por inhalación de gNO es un sujeto humano que es propenso a padecer una enfermedad o trastorno del tracto respiratorio. Por «propenso a padecer» se entiende que el sujeto humano tiene un mayor riesgo de padecer la enfermedad o trastorno en comparación con un sujeto normal.

50 Tales sujetos humanos incluyen, por ejemplo, sujetos inmunodeprimidos, tales como sujetos con VIH, pacientes con cáncer sometidos o que se sometieron a quimioterapia, pacientes con cáncer y otros pacientes sometidos o que fueron sometidos a un trasplante, incluido el trasplante de médula ósea y el trasplante de un órgano sólido, sujetos con asma crónica o sinusitis, y sujetos que estuvieron en contacto con un sujeto o sujetos afectados por una enfermedad o trastorno infeccioso del tracto respiratorio, o que de otro modo han estado expuestos a un patógeno. Se observa en la presente memoria que someter a un sujeto humano propenso a padecer una enfermedad o trastorno del tracto respiratorio al tratamiento de inhalación de gNO que se presenta en la presente memoria puede considerarse como un tratamiento preventivo, un cuidado preventivo o un tratamiento médico profiláctico.

55 Alternativamente, un sujeto humano que necesita un tratamiento con gNO es un sujeto inmunodeprimido, tal como los sujetos que tienen el VIH, los pacientes con cáncer sometidos o que se sometieron a quimioterapia, el cáncer y otros pacientes sometidos o que se sometieron a un trasplante, incluido el trasplante de médula ósea y el trasplante de un órgano sólido, que se han infectado o padecen de otro modo una enfermedad o trastorno respiratorio como se describe en la presente memoria.

65

Las enfermedades o trastornos ilustrativos de tales sujetos inmunodeprimidos se describen con más detalle a continuación.

5 Según algunas realizaciones de la presente invención, un sujeto humano que necesita un tratamiento por inhalación de gNO es un sujeto humano que padece una enfermedad o trastorno que se puede tratar a través del tracto respiratorio.

10 Dado que el gNO inhalado se absorbe en los pulmones, entra en contacto con el sistema sanguíneo y, por lo tanto, puede llegar a otros tejidos y órganos del sistema biológico. Por lo tanto, las enfermedades y trastornos que no están asociados directamente al tracto respiratorio, pero que pueden tratarse mediante la inhalación de agentes que muestran un efecto terapéutico sobre tales enfermedades y trastornos, pueden tratarse según las realizaciones de la presente invención. Tales enfermedades y trastornos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, acidosis, sepsis, leishmaniasis y diversas infecciones víricas.

15 La familia de parásitos, *Leishmania*, se ha estudiado ampliamente en la literatura, lo que demuestra que el gNO mata al parásito directamente. Los parásitos de *Leishmania infectan* preferentemente a los macrófagos. La infección por *Leishmania* hace que los macrófagos produzcan IFN-gamma, lo que induce la producción de iNOS, una enzima responsable de la producción de óxido nítrico. Sin embargo, ciertas manifestaciones de *Leishmania* provocan que los macrófagos también produzcan IL-10 y TGF-Beta, lo que minimiza la inducción de iNOS. La disminución de los niveles de NO es un factor clave que permita que la infección continúe. Por lo tanto, sería muy beneficioso determinar si el tratamiento con la inhalación de gNO elude el sistema de defensa del parásito. Sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado que el gNO administrado por inhalación en cualquier concentración sea seguro o eficaz contra la leishmaniasis.

25 Otras enfermedades y trastornos de este tipo incluyen las infecciones víricas. Los virus han sido y muy probablemente seguirán siendo un «objetivo móvil» desafiante para las metodologías médicas modernas. Sin paredes celulares ni vías de desintoxicación a base de tiol, los virus pueden ser intrínsecamente más susceptibles al estrés nitrosativo. Varios estudios *in vitro*, usando donantes de NO, a diferencia del gNO, han demostrado que el NO inhibe la ribonucleótido reductasa vírica, una enzima constituyente necesaria de la síntesis del ADN vírica y, por lo tanto, inhibe la replicación vírica. Se ha demostrado que el NO inhibe la replicación de los virus al principio del ciclo de replicación, lo que implica la síntesis del ARNv y el ARNm que codifican las proteínas víricas. Otros mecanismos directos también podrían explicar los efectos viricidas a través de la desaminación del ADN vírico. No obstante, hasta ahora no se ha demostrado que el gNO administrado por inhalación sea seguro o eficaz contra las infecciones víricas agudas ni como tratamiento vírico profiláctico del mismo.

35 Los presentes inventores han demostrado que el uso de concentraciones suprafisiológicas de gNO administradas por inhalación puede proporcionar una actividad antivírica inespecífica de amplio espectro para usar en diversas etapas de la infección. Los presentes inventores han probado dos cepas de la gripe humana (gripe A/victoria H3N2) y una cepa de la gripe aviar altamente patógena (H7N2), así como del virus sincitial respiratorio humano (rgRSV30), utilizando los ensayos tradicionales de placa o fluorescencia, y han demostrado que el tratamiento del RSV y la gripe con 160 ppm de NO gaseoso exógeno reduce su ineficacia.

45 Según algunas realizaciones de la presente invención, un ser humano que necesita inhalar gNO es un ser humano afectado por una enfermedad o trastorno que se puede tratar con gNO. La gama de enfermedades y trastornos tratables abarca enfermedades y trastornos oftalmológicos, otorrinolaringológicos y/o del tracto respiratorio superior y/o del sistema respiratorio inferior, así como afecciones médicas sistémicas.

50 Las enfermedades y trastornos ilustrativos que se pueden tratar con gNO incluyen, sin limitación, una reacción a la heparina-protamina, una lesión traumática del tracto respiratorio, la acidosis o la sepsis, el mal de montaña agudo, el edema pulmonar agudo, la hipertensión pulmonar aguda, la tromboembolia pulmonar aguda, el síndrome de dificultad respiratoria en adultos, una vasoconstricción pulmonar aguda, una lesión o intoxicación por aspiración o inhalación, asma o estado asmático, displasia broncopulmonar, hipoplasia pulmonar, hipoplasia broncopulmonar, hipoxia o hipoxia crónica, hipertensión pulmonar crónica, pulmonar crónica tromboembolismo, fibrosis quística (FQ), aspergilosis, aspergiloma, criptococosis, embolia grasa del pulmón, enfermedad de la membrana halina, hipertensión pulmonar idiopática o primaria, inflamación del pulmón, síndrome de aspiración perinatal, hipertensión pulmonar persistente de un recién nacido y cirugía poscardíaca.

60 Según algunas realizaciones de la presente invención, las enfermedades o trastornos tratables ilustrativos incluyen, sin limitación, una bronquiolitis bacteriana, vírica y/o fúngica, una faringitis y/o laringotraqueítis bacteriana, vírica y/o fúngica, una neumonía bacteriana, vírica y/o fúngica, una infección pulmonar bacteriana, vírica y/o fúngica, una infección pulmonar bacteriana, vírica y/o fúngica, una sinusitis bacteriana, vírica y/o fúngica de las vías respiratorias superiores y/o inferiores infección del tracto, un asma exacerbado por bacterias, virus y/o hongos, un virus respiratorio sincitial infección, bronquiectasias, bronquitis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FQ), aspergilosis, aspergiloma, criptococosis, enfisema, otitis, otitis externa bacteriana, vírica y/o fúngica, otitis media, conjuntivitis, uveítis, discinesia ciliar primaria (PCD) y aspergilosis pulmonar (ABPA).

65

Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno tratable mediante gNO está asociada a un microorganismo patógeno. Los microorganismos patógenos, según algunas realizaciones de la presente invención, pueden ser, por ejemplo, bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas, virus y viriones viables, hongos y parásitos.

5 Los microorganismos patógenos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, *Acinetobacter baumannii*, *Aspergillus niger*, *Bacteroides vulgatus*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Clostridium perfringens*, Grupo entérico 137, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacteria tuberculosis*, *Pasteurella multocida*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Proteus mirabilis*,  
10 *Providencia rustigianii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (positivo para FVL), *Staphylococcus aureus* (positivo para VNL), *Staphylococcus aureus* MRSA, Streptococci del grupo B, Streptococci del grupo D, Streptococci del grupo G, *Streptococcipyrogenes* rosenbach del grupo A, *Streptococcus pneumoniae*, *Trichophyton meriagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, y *Vibrio vulnificus*.

15 Las bacterias gramnegativas ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, *Proteobacteria*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii*, *Bdellovibrio*, *Cyanobacteria*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Helicobacter*, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella*, *Spirochaetes* y *Stenotrophomonas*.

25 Las bacterias grampositivas ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, especies de *Bacillus* tales como *B. alcalophilus*, *B. alvei*, *B. aminovorans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. aneurinolyticus*, *B. anthracis*, *B. aquaemaris*, *B. atrophaeus*, *B. boroniphilus*, *B. brevis*, *B. caldolyticus*, *B. centrosporus*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flavothermus*, *B. fusiformis*, *B. globigii*, *B. infimus*, *B. larvas*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. mucilaginosus*, *B. mycoides*, *B. natto*, *B. pantothenicus*, *B. polymyxa*, *B. pseudoanthracis*, *B. pumilus*, *B. schlegelii*, *B. sphaericus*, *B. sporothermodurans*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. thermoglucosidasius*, *B. thuringiensis*, *B. vulgatus* y *B. weihensis stephanensis*, especies de *Clostridium* tales como *C. acetobutylicum*, *C. aerotolerans*, *C. argentinense*, *C. baratii*, *C. beijerinckii*, *C. bifermentans*, *C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. cadaveris*, *C. cellulolyticum*, *C. chauvoei*, *C. clostridioforme*, *C. colicanis*, *C. difficile*, *C. estertheticum*, *C. fallax*, *C. fesi*, *C. formicaceticum*, *C. histolyticum*, *C. innocuum*, *C. kluyveri*, *C. lavalense*, *C. ljungdahlii*, *C. novyi*, *C. oedematiens*, *C. paraputrificus* especies de *Corynebacterium*, *C. perfringens*, *C. phytofermentans*, *C. piliforme*, *C. ragsdalei*, *C. ramosum*, *C. scatologenes*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, *C. sticklandii*, *C. tertium*, *C. tetani*,  
35 *C. thermocellum*, *C. thermosaccharolyticum*, *C. tyrobutyricum* *C. accolens*, *C. afermentans*, *C. amycolatum*, *C. aquaticum*, *C. argentatense*, *C. auris*, *C. bovis*, *C. diphtheriae*, *C. equi*, *C. flavescens*, *C. glucuronolyticum*, *C. glutamicum*, *C. granulosum*, *C. haemolyticum*, *C. halofytica*, *C. jeikeium*, *C. macginleyi*, *C. matruchotii*, *C. minutissimum*, *C. parvum*, *C. propinquum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. pyogenes*, *C. renale*, *C. spec*, *C. striatum*, *C. tenuis*, *C. ulcerans*, *C. urealyticum*, *C. urealyticum* y *C. xerosis*, especies de *Listeria* como *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri*, especies de *Staphylococcus* como *S. arlettae*, *S. aureus*, *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. carnosus*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. condimenti*, *S. delphini*, *S. devriesei*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. felis*, *S. fleurettii*, *S. gallinarum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. kloosii*, *S. leei*, *S. lentus*, *S. lugdunensis*, *S. lutrae*, *S. massiliensis*, *S. microti*, *S. muscae*, *S. nepalensis*, *S. pasteurii*, *S. pettenkoferi*, *S. piscifermentans*, *S. pseudolugdunus ensis*, *S. pulvereri*, *S. rostri*, *S. saccharolyticus*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi*, *S. sciuri*, *S. simiae*, *S. simulans*, *S. stepanovicii*, *S. succinus*, *S. vitulinus*, *S. warneri* y *S. xylosus*, y especies de *Streptococcus* tales como *S. agalactiae*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. canis*, *S. constellatus*, *S. dysgalactiae*, *S. equinus*, *S. iniae*, *S. intermedius*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. peroris*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. rattii*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. suis*, *S. thermophilus*, *S. uberis*, *S. vestibularis*, *S. viridians* y *S. zooepidemicus*.

50 Como se describió anteriormente en la presente memoria y se demuestra en la sección Ejemplos que sigue a continuación, la enfermedad o trastorno que puede tratarse efectuando el método que se presenta en la presente memoria a un sujeto humano, incluye bronquiolitis bacteriana, vírica y/o fúngica, faringitis y/o laringotraqueítis bacteriana, vírica y/o fúngica, sinusitis bacteriana, vírica y/o fúngica, infección bacteriana, vírica y/o fúngica del tracto respiratorio superior y/o inferior bacteriana, vírica y/o fúngica asma exacerbado por hongos, neumonía bacteriana, vírica, fúngica y/o parasitaria, resfriado común, infecciones relacionadas con la fibrosis quística, aspergilosis, aspergiloma, infecciones víricas respiratorias sinciales, acidosis o sepsis, infecciones fúngicas orales, bronquitis, candidiasis de la cavidad oral (aftas), aftas, epiglotitis (supraglotitis), halitosis, herpes, laringitis, laringotraqueítis, nasofaringitis, otitis externa y otitis media, conjuntivitis, uveítis (y otras infecciones oculares), faringitis, aspergilosis pulmonar (ABPA), infecciones por el virus respiratorio sincicial, rinitis, rinofaringitis, rinosinusitis, estomatitis, amigdalitis, traqueítis, tuberculosis, criptococosis y timpanitis.

65 Según algunas realizaciones de la presente invención, un sujeto humano que necesita inhalar gNO es un sujeto humano que necesita un tratamiento preventivo y profiláctico de una enfermedad o trastorno como se describe en la presente memoria. Por lo tanto, un sujeto que no padece ninguna enfermedad actual o manifestada, y/o un sujeto que

se sospecha que está expuesto a un patógeno, y/o un sujeto que padece una enfermedad, se trata mediante los métodos que se presentan en la presente memoria para prevenir la aparición de otra enfermedad o trastorno.

5 Como se presenta en la sección de Ejemplos que sigue a continuación, los presentes inventores han contemplado el tratamiento de la bronquiolitis como se define esta afección a continuación en la presente memoria. Por lo tanto, se proporciona un método para tratar a un sujeto humano que padece bronquiolitis, que se efectúa sometiendo al sujeto a un régimen de inhalación intermitente, gNO, a una concentración de al menos 160 ppm, tratando de este modo la bronquiolitis.

10 Se observa en la presente memoria que la bronquiolitis tratable, según algunas realizaciones de la presente invención, puede estar asociada con un microorganismo patógeno o no estar asociada con él. Por lo tanto, se observa que el método que se presenta en la presente memoria se puede usar para tratar la bronquiolitis idiopática, la bronquiolitis inducida por bacterias y/o virus y/o la bronquiolitis que está asociada con otras afecciones médicas tales como, aunque no de forma limitativa, la inmunodeficiencia.

15 En algunas realizaciones, la bronquiolitis es una bronquiolitis inducida por virus. Las infecciones víricas ilustrativas que se conoce que se manifiestan por bronquiolitis incluyen, aunque no de forma limitativa, los virus sinciales respiratorios (RSV), los rinovirus, los coronavirus, los enterovirus, los virus de la gripe A y/o B, los virus de la parainfluenza 1, 2 y/o 3, los bocavirus, los metapneumovirus humanos, el SARS y los adenovirus. Sin embargo, también se contemplan las infecciones causadas por cualquier otro virus.

20 Los hallazgos de que una alta concentración de gNO inhalado, que demostró mostrar un efecto terapéutico contra una variedad de afecciones asociadas con microorganismos patógenos, puede usarse de modo seguro en sujetos humanos indican que la inhalación intermitente de gNO descrita puede utilizarse de modo eficiente para tratar tales afecciones, así como cualquier otra afección que sea tratable con gNO cuando entra en contacto con el tracto respiratorio.

25 Por lo tanto, se proporciona un método para tratar a un sujeto humano que padece una enfermedad o un trastorno que está asociado, directa o indirectamente, con un microorganismo patógeno, como se describe en la presente memoria. El método se efectúa sometiendo al sujeto a un régimen de inhalación intermitente de gNO a una concentración de al menos 160 ppm.

30 Se proporciona un método para tratar a un sujeto humano que padece una enfermedad o trastorno que se manifiesta en el tracto respiratorio o una enfermedad o trastorno que puede tratarse a través del tracto respiratorio, que se efectúa sometiendo al sujeto a un régimen de inhalación intermitente, gNO a una concentración de al menos 160 ppm.

35 Se proporciona un método para tratar a un sujeto humano propenso a padecer una enfermedad o trastorno que se manifiesta en el tracto respiratorio o una enfermedad o trastorno que puede tratarse a través del tracto respiratorio, como se describe en la presente memoria, que se efectúa sometiendo al sujeto a un régimen de inhalación intermitente, gNO a una concentración de al menos 160 ppm.

Tal método puede considerarse como un tratamiento preventivo o profiláctico del sujeto.

40 Se proporciona un método para tratar a un sujeto humano que padece una enfermedad o trastorno oftalmológico, otorrinolaringológico y/o del tracto respiratorio superior, como se describe en la presente memoria, que se efectúa sometiendo al sujeto a un régimen de inhalación intermitente, gNO, a una concentración de al menos 160 ppm.

45 Según algunas realizaciones de la presente invención, la enfermedad y trastorno otorrinolaringológico y/o del tracto respiratorio superior implica una infección o una inflamación de un sitio corporal seleccionado del grupo que consiste en una cavidad del oído, una cavidad nasal, una cavidad sinusal, una cavidad oral, una faringe, una epiglotis, una cuerda vocal, una tráquea, un vértice y un esófago superior.

50 Según algunas realizaciones de la presente invención, las enfermedades y trastornos oftalmológicos, otorrinolaringológicos y/o del tracto respiratorio superior incluyen, sin limitación, el resfriado común, una enfermedad estomatognática, la amigdalitis, una infección fúngica oral, la sinusitis bacteriana, vírica y/o fúngica, la bronquitis, la candidiasis de la cavidad oral (aftas), las aftas, la epiglotitis (supraglotitis), la halitosis, el herpes, laringitis, laringotraqueítis, nasofaringitis, otitis (externa y media), conjuntivitis, uveítis y otras infecciones oculares, faringitis, rinitis, rinofaringitis, rinosinusitis, estomatitis, amigdalitis, traqueítis, traqueítis y timpanitis.

55 Se proporciona un método para tratar a un sujeto humano que padece una enfermedad o trastorno del sistema respiratorio inferior, como se describe en la presente memoria, mediante un régimen de inhalación intermitente, gNO a una concentración de al menos 160 ppm.

60 Según algunas realizaciones de la presente invención, las enfermedades y trastornos del sistema respiratorio inferior incluyen, sin limitación, una afección obstructiva, una afección restrictiva, una enfermedad vascular y una infección, una inflamación debida a la inhalación de materias extrañas y una intoxicación por partículas inhaladas.

- Según algunas realizaciones de la presente invención, la afección obstructiva incluye, sin limitación, una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema, bronquiolitis, bronquitis, asma y asma exacerbado por virus, bacterias y hongos; la afección restrictiva incluye, sin limitación, fibrosis, fibrosis quística, sarcoidosis, daño alveolar y derrame pleural; la enfermedad vascular incluye, sin limitación, edema pulmonar, embolia pulmonar e hipertensión pulmonar; la infección incluye, sin limitación, la infección por el virus respiratorio sincitial, la tuberculosis, una neumonía vírica, bacteriana, fúngica y/o parasitaria, la neumonía idiopática; y la inflamación debida a la inhalación de materias extrañas y a la intoxicación por partículas inhaladas incluye, sin limitación, la inhalación de humo, la asbestosis y la exposición a partículas contaminantes y humos.
- Cualquiera de los métodos de tratamiento o prevención de un sujeto como se describe en la presente memoria abarca todas las afecciones, enfermedades y trastornos que se han descrito anteriormente en la presente memoria para los sujetos que necesitan la inhalación de gNO.
- Se** observa en la presente memoria que cualquiera de los métodos que se describen en la presente memoria se puede usar de forma beneficiosa para tratar la bronquiolitis, que se produce en bebés y niños. La administración por inhalación se considera un método preferido para pacientes jóvenes y más aún cuando se evitan las técnicas invasivas.
- La gripe de todos los tipos y clases también se puede tratar mediante los métodos que se presentan en la presente memoria, y dado que algunas realizaciones se basan en una técnica relativamente simple y no invasiva, estos métodos son particularmente preferidos en casos complicados y graves de gripe.
- Los métodos que se presentan en la presente memoria son eficaces en el tratamiento del asma en niños y adultos, así como en el tratamiento de la EPOC y la CF.
- Los métodos que se presentan en la presente memoria son rápidos y eficaces en el tratamiento de una afección, enfermedad o trastorno médico reciente. Asimismo, los métodos que se presentan en la presente memoria son eficaces para prevenir que la enfermedad o trastorno se apodere de un sujeto que es propenso a padecer, contraer o desarrollar una enfermedad o trastorno que esté asociado con el tracto respiratorio. Algunos métodos de inhalación de gNO son particularmente útiles para prevenir una enfermedad o trastorno, mientras que otros métodos son particularmente eficaces para tratar una enfermedad o trastorno existente.
- Cualquiera de los métodos que se describen en la presente memoria se puede usar en el contexto de las siguientes condiciones:
- Cualquiera de los métodos que se presentan en la presente memoria puede usarse eficazmente para tratar enfermedades o trastornos respiratorios que se producen en seres humanos a los que se les diagnostican afecciones médicas que afectan adversamente a su sistema inmunitario innato. Se dice que los seres humanos a los que se les diagnostican tales afecciones médicas están inmunodeprimidos o inmunosuprimidos. En la presente memoria se indica que la inmunosupresión puede ser un resultado directo de un patógeno, tal como una infección por VIH, o un resultado indirecto, tal como la inmunosupresión que se produce en pacientes con cáncer a los que se está tratando con agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, los métodos que se presentan en la presente memoria se usan para tratar una enfermedad o trastorno respiratorio actual en un sujeto humano inmunodeprimido.
- Los sujetos humanos inmunodeprimidos o inmunosuprimidos son intrínsecamente más susceptibles a las infecciones oportunistas, lo que los hace propensos a padecer enfermedades o trastornos respiratorios. Otros incidentes y afecciones que hacen que un ser humano sea más susceptible a las infecciones están asociados con la ubicación, la ocupación, la edad, las condiciones de vida y ambientales, el contacto cercano con grandes grupos de personas y ganado, el contacto cercano con personas enfermas y similares, todos los cuales se incluyen en el contexto de la presente invención como factores que hacen que un sujeto humano sea propenso a padecer una enfermedad o trastorno respiratorio.
- Cualquiera de los métodos que se presentan en la presente memoria se usa para tratar infecciones oportunistas en un sujeto humano.
- Las infecciones oportunistas ilustrativas que se producen en seres humanos que padecen el VIH y que pueden tratarse o prevenirse mediante los métodos que se presentan en la presente memoria incluyen, sin limitación, la infección por *Pneumocystis jiroveci*, la infección por *Pneumocystis carinii* y la neumonía por *Pneumocystis* (una forma de neumonía causada por el hongo similar a la levadura).
- Las afecciones médicas ilustrativas que están asociadas con la inmunosupresión incluyen el SIDA, el cáncer y la discinesia ciliar primaria (PCD, también conocida como síndrome ciliar inmóvil o síndrome de Kartagener).
- Cualquiera de los métodos que se presentan en la presente memoria puede usarse para tratar a un sujeto humano que padece SIDA.

Cualquiera de los métodos que se presentan en la presente memoria puede usarse para tratar a un sujeto humano que padece cáncer.

5 Cualquiera de los métodos que se presentan en la presente memoria puede usarse para tratar o prevenir una infección asociada con la inmunodeficiencia. Estos incluyen la prevención/tratamiento preventivo y el tratamiento de infecciones en pacientes oncológicos.

10 En cualquiera de los métodos que se presentan en la presente memoria, el sujeto humano puede correr el riesgo de padecer una infección nosocomial.

15 Los grupos ilustrativos de sujetos humanos que son propensos a padecer enfermedades o trastornos respiratorios debido a condiciones generales, ambientales y ocupacionales incluyen, sin limitación, las personas mayores, el personal médico y el personal (médicos, enfermeras, cuidadores y similares) de centros médicos y otros hogares de cuidados y centros de larga duración, la tripulación y el personal de las aerolíneas comerciales (pilotos, azafatas y similares), los ganaderos y similares.

20 Los métodos que se presentan en la presente memoria se usan para tratar o prevenir infecciones nosocomiales, tales como las infecciones derivadas de la transmisión por contacto directo, la transmisión por contacto indirecto, la transmisión por gotitas, la transmisión por el aire, la transmisión por vehículos comunes y la transmisión por vectores. Las infecciones nosocomiales ilustrativas son causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, tales como la *Klebsiella* (KPC) resistente a los carbapenémicos u otras enterobacterias, el estafilococo MRSA resistente a la meticilina *Staph. Aureus*, *Streptococcus* del grupo A, *Staphylococcus aureus* (sensible o resistente a la meticilina), *Neisseria meningitides* de cualquier serotipo y similares.

25 Por lo tanto, los métodos que se presentan en la presente memoria pueden usarse para prevenir el transporte, la transmisión y la infección de bacterias patógenas y microorganismos patógenos resistentes a los antibióticos.

30 Cualquiera de los métodos de tratamiento que se presentan en la presente memoria puede incluir además la monitorización, durante y después de la administración del gNO, de uno o más de los parámetros que se han descrito anteriormente en la presente memoria.

Los métodos pueden efectuarse mientras se monitorizan uno, dos, etc., o todos de:

35 un nivel de metahemoglobina (SpMet) (un parámetro en línea);

un nivel de CO<sub>2</sub> de la marea final (ETCO<sub>2</sub>) (un parámetro en línea);

un nivel de oxigenación o un nivel de saturación de oxígeno (SpO<sub>2</sub>) (un parámetro en línea);

40 un nivel plasmático de citocinas inflamatorias (un parámetro fuera de línea); y

un nivel sérico de nitrito/nitrato (NO<sub>2</sub>-/NO<sub>3</sub>-) (un parámetro fuera de línea).

45 No se puede mostrar ninguna desviación significativa con respecto al valor basal, como se describe en la presente memoria, en al menos uno, dos, tres, cuatro o todos los parámetros anteriores, cuando se monitoriza, como se describe en la presente memoria.

50 También pueden monitorizarse otros parámetros y marcadores, como se presentó anteriormente en la presente memoria, a la vez que muestran una desviación significativa con respecto a un valor basal, y varios indicadores de salud generales no muestran ningún cambio para empeorar o una mejora, como se presentó anteriormente en la presente memoria.

55 En cualquiera de los métodos de tratamiento que se presentan en la presente memoria, la administración de gNO puede efectuarse mediante un dispositivo de inhalación que incluye, sin limitación, un dispositivo de inhalación estacionario, un inhalador portátil, un inhalador de dosis medidas y un inhalador intubado.

60 Un inhalador puede generar datos de espirometría y ajustar el tratamiento en consecuencia a lo largo del tiempo, como se proporciona, por ejemplo, en la patente US-5.724.986 y en la patente WO 2005/046426. El inhalador puede modular la forma de onda de inhalación del sujeto para dirigirse a sitios pulmonares específicos. Un inhalador portátil puede administrar dosis de gNO de rescate y de mantenimiento a elección del sujeto o automáticamente según un régimen específico.

65 Un dispositivo de inhalación ilustrativo puede incluir una interfaz de administración adaptable para la inhalación por parte de un sujeto humano.

La interfaz de suministro puede incluir una máscara o una boquilla para el suministro de la mezcla de gases que contienen gNO a un órgano respiratorio del sujeto.

5 El dispositivo de inhalación puede incluir además un analizador de gNO colocado cerca de la interfaz de administración para medir la concentración de gNO, oxígeno y dióxido de nitrógeno que fluye hacia la interfaz de suministro, en donde el analizador está en comunicación con el controlador.

10 El sometimiento del sujeto al método que se describe en la presente memoria puede llevarse a cabo mediante el uso de un dispositivo de inhalación que puede ser cualquier dispositivo que pueda administrar la mezcla de gases que contienen gNO a un órgano respiratorio del sujeto. Un dispositivo de inhalación puede incluir, sin limitación, un dispositivo de inhalación fijo que comprende tanques, medidores, tubos, una máscara, controladores, valores y similares; un inhalador portátil (que incluye los componentes antes mencionados), un inhalador de dosis medidas, una carcasa con control atmosférico, una máquina/sistema de respiración y una máquina/sistema de inhalación/respiración intubado. Un recinto controlado atmosféricamente incluye, sin limitación, un recinto con cabezal (burbuja), un recinto de cuerpo completo o una habitación, en donde la atmósfera que llena el recinto puede controlarse mediante el flujo, mediante un intercambio de contenido continuo o intermitente o cualquier otra forma de controlar el contenido de la mezcla gaseosa del mismo.

20 Se espera que durante la vigencia de una patente que venza a partir de la presente solicitud se desarrollen muchos procedimientos médicos pertinentes que impliquen la inhalación de gNO y se pretende que el alcance del término tratamiento por inhalación de gNO incluya *a priori* todas estas nuevas tecnologías.

Como se utiliza en la presente memoria, el término «aproximadamente» se refiere a  $\pm 10\%$ .

25 Los términos «comprende», «que comprende», «incluye», «que tiene» y sus conjugados significan «que incluye aunque no de forma limitativa».

El término «que consiste en» significa «que incluye y se limita a».

30 El término «que consiste esencialmente en» significa que la composición, método o estructura puede incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicados.

35 Como se utiliza en la presente memoria, las formas singulares «a», «una» y «el» incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término «un compuesto» o «al menos un compuesto» puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

40 A lo largo de esta solicitud, se pueden presentar diversas realizaciones de esta invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. En consecuencia, se debe considerar que la descripción de un intervalo describe específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 incluye subintervalos que se han descrito específicamente, tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

50 Siempre que se indique un intervalo numérico en la presente memoria, se pretende incluir cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases «variar/variar entre» un primer número de indicación y un segundo número de indicación y «variar/variar de» un primer número de indicación y un segundo número de indicación se usan aquí indistintamente y pretenden incluir el primer y el segundo números indicados y todos los números fraccionarios y enteros entre los mismos.

55 Como se utiliza en la presente memoria, el término «método» se refiere a modos, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea determinada que incluyen, aunque no de forma limitativa, los modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de modos, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las artes química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

60 Como se utiliza en la presente memoria, el término «tratar» incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección y prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección, es decir, el tratamiento preventivo y profiláctico.

65 Se aprecia que ciertas características de la invención, que, en aras de claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características de la invención, que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o según sea adecuado en cualquier

otra realización descrita de la invención. Ciertas características que se describen en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no funcione sin esos elementos.

- 5 Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención, como se han descrito anteriormente en la presente memoria y como se reivindica en la sección de reivindicaciones que figura a continuación, encuentran apoyo experimental o calculado en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

10 Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de forma no limitativa.

Ejemplo 1 (antecedentes de la técnica)

15 Determinación del nivel antimicrobiano efectivo de gNO

El efecto directo del gNO sobre las bacterias se estudió determinando la concentración de gNO que es letal para los microbios. Una vez estimada la dosis óptima, se llevó a cabo un estudio cronológico para optimizar la duración de la exposición de los microbios al gNO.

20 Para estos estudios iniciales, inóculos altamente densos de suspensiones de *P. aeruginosa* y *S. aureus* ( $10^8$  chum) se colocaron en placas de agar. Estas placas se expusieron luego a diversas concentraciones de gNO en un dispositivo de exposición para evaluar el efecto sobre el crecimiento de las colonias.

25 Las Figuras 1A-B presentan un gráfico de barras que muestra la curva de dosificación de gNO medida para *S. Aureus* (Figura 1A) y *P. aeruginosa* (Figura 1B) cultivados en medios sólidos, en donde el porcentaje relativo de crecimiento de las unidades formadoras de colonias (CPU) es de 50, 80, 120 y 160 partes por millón (ppm) de óxido nítrico gaseoso (gNO) en comparación con el crecimiento del CPU en el aire medicinal (100 %).

30 Como puede verse en las Figuras IA-B, los resultados confirmaron que el gNO tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Los datos proporcionaron pruebas preliminares de que había una tendencia de relación entre el tiempo y la dosis, ya que la cantidad de actividad bactericida (antibiótica) aumentaba con el aumento del tiempo de exposición y la concentración de gNO. A medida que aumentaba la concentración de gNO, disminuía el número de colonias que crecían en las placas. Aunque hubo una tendencia bactericida a la baja, hasta alcanzar una supervivencia del 5 al 10 %, ninguno de los datos mostró un efecto bactericida del 100 %. Es posible que algunas bacterias hayan sobrevivido porque los materiales y las sustancias químicas del agar pueden haber reaccionado con el gNO y haber amortiguado el efecto.

40 Se observa que las colonias bacterianas permanecieron iguales en tamaño y número después de ser transferidas a una incubadora convencional durante 24 horas, mientras que los controles aumentaron en número y tamaño hasta el punto de que no pudieron contarse. Esta observación sugirió que la exposición al gNO impidió el crecimiento de la bacteria y puede haberla matado en algún momento durante la exposición al gNO.

45 Estos resultados demostraron que el gNO tenía un efecto bacteriostático en ambas cepas bacterianas y, como resultado, se diseñaron estudios posteriores para estudiar más a fondo los efectos bactericidas del gNO. Los estudios demostraron que los niveles de gNO superiores a 120 ppm redujeron la formación de colonias en más del 90 %. Luego, se realizaron estudios que indicaron que el tiempo requerido para lograr este efecto se produjo entre 8 y 12 horas.

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

55 Un efecto bactericida exitoso se definió como una disminución de las bacterias superior a  $3 \log_{10}$  UFC/ml. Además, también se incluyeron *C. albicans*, *S. aureus* resistente a la metilina (MRSA), una cepa particularmente resistente de *P. aeruginosa* de un paciente con fibrosis quística, también se incluyeron *Streptococcus* del grupo B y *M. smegmatis* para evaluar si las levaduras, una cepa de bacterias y actinomicetos multirresistente tienen una respuesta similar. Estas bacterias representan una amplia variedad de patógenos bacterianos resistentes a los medicamentos que contribuyen a las infecciones respiratorias y de las heridas. Los resultados de estos estudios sentaron las bases para el uso del gNO a una concentración superior a 160 ppm como agente antibacteriano, específicamente para su uso contra las bacterias asociadas a infecciones clínicas.

60 Para este estudio, se seleccionó la solución salina como medio de suspensión porque no ocultaría el efecto directo del gNO como bactericida, mientras que el medio de crecimiento totalmente suplementado podría introducir variables externas (p. ej., amortiguar o reaccionar con el gNO). Otros medios también pueden proporcionar metabolitos y

reponer los nutrientes que producen enzimas que protegen a las bacterias del daño oxidativo y nitrosativo, enmascarando de este modo el efecto del gNO. Además, se ha sugerido que un entorno salino representa mejor el entorno hostil del huésped al que típicamente están expuestas las bacterias *in vivo*. En solución salina, las colonias estaban estáticas pero permanecían viables. Estas condiciones son similares al enfoque usado anteriormente en modelos animales.

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

Tabla 1

Bacterias	Tinción de Gram	Período de latencia (horas)	-2,5 Log <sub>10</sub> (horas)	LD10o (horas)
<i>S. aureus</i> (ATCC)	Positivo	3	3,3	4
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC)	Negativo	1	2,1	3
MRSA	Positivo	3	4,2	5
<i>Serratia sp.</i>	Negativo	4	4,9	6
<i>S. aureus</i> (clínico)	Positivo	3	3,7	4
<i>Klebsiella sp. n.° 1</i>	Negativo	3	3,5	6
<i>Klebsiella sp. n.° 2</i>	Negativo	2	4,1	5
<i>Klebsiella sp. n.° 3</i>	Negativo	3	5,1	6
<i>S. maltophilia</i>	Negativo	2	2,8	4
<i>Enterobacter sp.</i>	Negativo	4	5,3	6
<i>Acinetobacter sp.</i>	Negativo	4	5	6
<i>E. Coli</i>	Negativo	3	4,2	5
<i>Streptococos del grupo B</i>	Positivo	1	1,5	2
<i>Micobacteria</i>	Positivo	7	9,2	10
<b>Promedio</b>		2,77	3,82	4,77
<b>DE</b>		1,01	1,17	1,3

Como puede verse en la tabla 1, este estudio mostró que el gNO a 200 ppm tenía un efecto bactericida completo en todos los microorganismos ensayados. Sin excepción, todas las bacterias expuestas a 200 ppm de gNO tuvieron una reducción de al menos 3 log<sub>10</sub> en UFC/ml. Además, cada prueba resultó en una muerte celular completa y total de todas las bacterias. Estos resultados se caracterizaron por un período de latencia en el que parecía que las bacterias no se veían afectadas por la exposición al gNO. El período de latencia fue seguido entonces por una muerte abrupta de todas las células; las bacterias gram negativas y gram positivas, las cepas bacterianas resistentes a los antibióticos, las levaduras y las micobacterias fueron todas susceptibles a 200 ppm de gNO. Se observa que las dos cepas de bacterias resistentes a los fármacos también eran susceptibles de tratamiento con gNO a 200 ppm.

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

#### Example2

##### Determinación del nivel antiviral efectivo de gNO

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

Los virus usados para los siguientes experimentos procedían de materias primas congeladas que contenían 1 x 10<sup>6</sup> - 1 x 10<sup>7</sup> pfu/ml.

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

Se usó un ensayo de placa estándar para un ensayo de hemaglutinación. Las reservas congeladas de viriones se diluyeron 1:10 en PBS y se colocaron 3 ml en cada pocillo de las bandejas de seis pocillos. Las muestras se expusieron a 160-20.000 ppm de gNO o aire medicinal a 37 °C. Para medir el efecto del gNO sobre el pH, cuando se añade una gran concentración de NO a la solución salina, el pH disminuye, por lo que se usaron reguladores ácido/base estándar para hacer coincidir el pH del control con el del tratado. Tras la exposición, las muestras se diluyeron 1:2 en bandejas de 96 pocillos de fondo redondo. Se añadieron glóbulos rojos de cobaya y se midió la aglutinación según procedimientos estándar.

Las Figuras 2A-C muestran el crecimiento viral en función del tiempo medido para los viriones de la influenza A/Victoria/H3N2 tras la exposición a 160 ppm y 800 ppm de óxido nítrico de forma continua durante 4 horas (figura 2A), los mismos viriones después de haber estado expuestos a una dosis de gNO durante 30 minutos en comparación con tres tratamientos de 30 minutos cada 4 horas (figura 2B), y el efecto de la exposición continua al gNO a una concentración de 160 ppm durante 3 horas de influenza aviar H7N3 altamente patógena.

Como puede verse en las Figuras 2A-C, se ha demostrado que el gNO es capaz de reducir la infectividad de 2 cepas de la influenza humana A/Victoria/H3N2 y HPAIIH7N2, y que el efecto antiviral de la exposición a 160 ppm de gNO es más evidente en la forma intermitente de exposición.

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

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

Como puede verse en las Figuras 3A-D, cuando la unidad formadora de placa (UFP) de partida del RSV fue de 2000 y 1000 UFP, una sola exposición de 30 minutos a 160 ppm de gNO redujo la viabilidad del virus en un factor de aproximadamente 10, y a un nivel inicial de 500 UFP, la viabilidad viral se anuló sustancialmente.

## Ejemplos

### Administración de gNO a sujetos humanos sanos

*Cohorte:* Se inscribieron en el estudio 10 voluntarios adultos sanos (5 hombres y 5 mujeres), de entre 20 y 62 años, tras analizar su historial médico, un examen físico, pruebas de función pulmonar y valores sanguíneos. Los criterios de exclusión incluyeron a personas menores de 19 años, mujeres embarazadas que no querían practicar métodos anticonceptivos durante el estudio, diagnosticadas con enfermedad pulmonar, epistaxis, hemoptisis, metahemoglobinemia, receptoras de un trasplante de órganos o que recibían tratamiento con antibióticos.

*Régimen y postratamiento:* Tras obtener el consentimiento informado, el tratamiento se inició dentro de los 5 días posteriores a la inscripción. Los sujetos fueron alojados en una sala de hospital y recibieron 160 ppm de gNO durante 30 minutos cada cuatro horas (cuarto trimestre), cinco veces al día, durante cinco días consecutivos por inhalación. Los sujetos regresaron para realizar evaluaciones de seguimiento 3, 7 y 21 días después de la administración final del gNO. La seguridad de los sujetos se determinó monitorizando los signos vitales, los niveles de metahemoglobina, la función pulmonar, la química sanguínea, la hematología, el tiempo de protrombina, los niveles de citocinas y quimiocinas inflamatorias y la activación endotelial. Estos parámetros se compararon con los valores basales y en varios momentos durante y después de la administración del gNO.

*Dispositivo:* A los sujetos se les administró gNO a través de una boquilla desechable modificada para maximizar la mezcla. El sujeto inició espontáneamente la inspiración a partir de un respirador convencional de presión positiva intermitente (Mark-7, Carefusion, EE. UU.) en modo de flujo fijo que suministraba 48 litros por minuto (LPM). Los flujos de gas se verificaron con un medidor de flujo másico calibrado (TSI, EE. UU.). El óxido nítrico gaseoso (gNO, obtenido en INOmax, Ikaria, EE. UU.) a una concentración de 800 ppm administrado a un flujo de 12 LPM se valoró en un

puerto de administración distal en la boquilla conectada al respirador únicamente durante la fase inspiratoria (interruptor de presión). El respirador Mark 7 se suministró mediante un mezclador de aire/oxígeno (Bird Sentry, Carefusion, EE. UU.) configurado para suministrar un 26 % de oxígeno.

- 5 Todos los componentes del sistema de administración de gNO fueron aprobados por la Dirección de Productos Terapéuticos de Health Canada.

Monitorización de los parámetros químicos y fisiológicos durante la administración:

10 Los niveles de gNO, NO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y metahemoglobina se controlaron durante la administración de gNO. La mezcla de gases objetivo era de 160 ppm de gNO con un nivel de dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) inferior a 5 ppm y un nivel de oxígeno (O<sub>2</sub>) que variaba entre el 21 y el 25 %. Los niveles inspiratorios de NO, NO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> se controlaron continuamente tomando muestras del orificio de muestra de la boquilla ubicado a unos 6 milímetros de la boca del sujeto con un analizador electroquímico de NO, NO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> AeroNox (Pulmonox, AB, Canadá). La seguridad del suministro se determinó por el número de ocasiones en las que el NO<sub>2</sub> superó las 5 ppm, el gNO superó la variación del 10 % y el O<sub>2</sub> cayó por debajo del 20 % durante la administración del gNO. Se usó un oxímetro de pulso no invasivo disponible en el mercado (Rad 57, Masimo Corporation, EE. UU.) para medir los niveles de saturación en la periferia de la metahemoglobina (SpMet).

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

25 Los sujetos se sometieron a pruebas completas de función pulmonar (PFT), incluida la capacidad de difusión pulmonar (DLCO), realizadas por un técnico capacitado que utilizó un sistema de función pulmonar calibrado (Jaeger MasterScreen, VIASYS Healthcare, EE. UU.) durante el cribado y los días 2, 8, 12 y 26. La prueba de espirometría (Microloop de Micro Medical, Inglaterra) se realizó los días 1, 3 y 4. El efecto del gNO sobre la función pulmonar y la DLCO se determinó mediante los cambios con respecto al valor basal, los días de tratamiento y los días de seguimiento.

30 Los exámenes médicos generales los realizó un médico pulmonar durante el cribado y los días 8, 12 y 26 para obtener mediciones de la oxigenación y los signos vitales. Una enfermera titulada realizó un examen físico abreviado todos los días antes del inicio de los tratamientos los días 1-5. La oxigenación se midió con un oxímetro de pulso (Rad 57, Masimo Corporation, EE. UU.) que se usó según las directrices del fabricante para medir la saturación funcional de oxígeno de la hemoglobina arterial (SpO<sub>2</sub>) y la frecuencia cardíaca. Estos parámetros se midieron de forma continua durante cada administración de gNO y durante 3,5 horas después del primer tratamiento del día. El estado cardiovascular se determinó monitorizando la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la temperatura. Los valores se registraron antes del inicio de cada administración de gNO, después de un descanso de 5 minutos. Durante los tratamientos, los signos vitales (excepto la temperatura) también se realizaron 15 minutos después del inicio del tratamiento y al final de la administración del gNO y se registraron. Después del primer tratamiento de cada día, se registraron los signos vitales cada 30 minutos hasta el inicio de la segunda administración de gNO del día.

45 La evaluación hematológica incluyó un hemograma completo y se obtuvieron los diferenciales (hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos rojos, recuento de glóbulos blancos, diferencial de glóbulos blancos y recuento de plaquetas) para controlar las mediciones de la química sanguínea, la hematología y la inflamación. El perfil bioquímico de la sangre incluyó la creatinina sérica y las pruebas de función hepática, tal como el aspartato aminotransferasa (AST), la transaminasa glutámica oxaloacética sérica (SOOT), la fosfatasa alcalina y la gamma-glutamyl transferasa (GGT). El efecto del gNO sobre la coagulación se determinó mediante el tiempo de protrombina (PT) y sus medidas derivadas del cociente de protrombina (PR) y del cociente internacional normalizado (INR). El plasma heparinizado se recolectó al inicio y los días 1, 2, 4 y 5 de la administración del gNO, y en los días de seguimiento 3, 7 y 21 y se congeló a -80 °C. Los niveles plasmáticos de citocinas se evaluaron usando el kit de matriz de bolillas de citocinas para la inflamación humana (BD Bioscience, Canadá). Los niveles plasmáticos de la angiopoyetina Ang-1 y Ang-2 se determinaron mediante ELISA (R&D Systems, EE. UU.).

55 Durante el estudio se registraron un total de 750 mediciones de gNO. El gNO inspirado promedio fue de 163,3 ppm (DE = 4,0). La concentración de gNO más alta registrada fue de 177 ppm. El nivel más alto de NO<sub>2</sub> registrado durante los tratamientos fue de 2,8 ppm (media: 2,32; Nivel de confianza del 95 %: 2,17-2,47 ppm) y ninguno de los sujetos experimentó un nivel de NO<sub>2</sub> superior a 5 ppm. Esto fue coherente con las especificaciones de rendimiento proporcionadas por el fabricante del aparato de 1,56 ppm (DE = 0,3). De los 300 valores de oxígeno registrados, el nivel de oxígeno promedio fue del 22,0 % (DE = 0,22 %).

Análisis de datos:

65 Las características estadísticas descriptivas de los sujetos antes, durante y al final del estudio se tabularon y se expresaron como media ± desviación estándar (DE). Las diferencias en las variables continuas (metahemoglobina,

niveles séricos de nitritos/nitratos y SpO<sub>2</sub>) a lo largo del estudio se analizaron mediante un análisis de varianza de medidas repetidas. Los eventos categóricos (número de sujetos con un evento adverso en particular) se determinaron mediante la construcción de límites de confianza del 95 % para su incidencia. Las diferencias entre las variables continuas en dos momentos específicos se evaluaron con la prueba t pareada. Los eventos categóricos, tales como los cambios clínicos en la función pulmonar y en la difusión pulmonar, los cambios en los marcadores inflamatorios séricos, la hematología, la química clínica y la incidencia de eventos adversos, se analizaron mediante la construcción de límites de confianza del 95 % para su incidencia.

Los datos se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney no apareada para la comparación entre dos grupos y el ANOVA para medidas de varianza repetidas. Las comparaciones basales se analizaron mediante ANOVA de medidas repetidas con la prueba posterior de Bonferroni para datos paramétricos, o la prueba de Friedman con la prueba posterior de Dunn para datos no paramétricos.

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

A menos que se especifique lo contrario,  $p < 0,05$  indicaba significación estadística. Los resultados se representaron mediante la media  $\pm$  DE Grapada al menos tres mediciones independientes.

Resultados de los estudios de seguridad:

La observación médica de los efectos adversos y los problemas generales de seguridad relacionados con la administración repetida de gNO en una concentración de 160 ppm a las vías respiratorias de 10 personas adultas sanas se efectuó controlando los niveles excesivos de NO<sub>2</sub> y manteniendo una saturación aceptable de oxígeno en la hemoglobina arterial (SpO<sub>2</sub>). Se realizaron un total de 250 procedimientos de administración de gNO a 10 sujetos durante el periodo de estudio. Todos los tratamientos se toleraron bien y no se observaron efectos adversos significativos. Se notificaron tres eventos adversos menores: un sujeto informó de hematomas en el brazo debido a múltiples intentos de extraer sangre con éxito, mientras que otros dos sujetos informaron de una sensación de entumecimiento de la lengua durante la administración del gNO. Esto se resolvió ordenando al sujeto que relajara y reposicionara la boquilla.

Durante y después de la administración del gNO, todos los signos vitales permanecieron dentro de los límites normales para la edad y con respecto a los valores basales. Específicamente, no hubo ninguna caída en la presión sanguínea (lo que podría producirse debido al efecto vasodilatador de la administración de gNO) durante o después de la administración de gNO. No se observaron incidencias repentinas de hipoxemia (menos del 85 % de SpO<sub>2</sub>) durante o después de la administración del gNO. La SpO<sub>2</sub> más baja observada fue del 93 %. Los niveles de SpO<sub>2</sub> con el tiempo disminuyeron ligeramente entre el tratamiento previo y el posterior, pero no difirieron significativamente desde el punto de vista estadístico ni clínico. El análisis de ANOVA descartó que esta disminución estuviera asociada con las cinco exposiciones repetidas al gNO en el transcurso del mismo día.

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

Como puede verse en la Figura 4A, los 930 niveles porcentuales de metahemoglobina registrados (SpMet) permanecieron por debajo del nivel máximo aceptable del 5 %. La SpMet de valor basal inicial fue del 0,16 (DE = 0,10) por ciento. El SpMet más alto se observó al final del tratamiento de 30 minutos y fue del 2,5 % con un aumento promedio del 0,9 % (DE = 0,08). La SpMet aumentó como se predijo en aproximadamente un 1 % entre el pretratamiento y el postratamiento ( $p < 0,001$ ) y volvió al valor inicial después de 3,5 horas antes de la siguiente administración de gNO.

Como puede verse en la Figura 4B, el análisis de ANOVA descartó que este aumento estuviera asociado con tratamientos repetidos el mismo día, ya que no hubo ningún efecto acumulativo o persistente sobre el SpMet después de cinco tratamientos diarios durante cinco días consecutivos. Las mediciones de seguimiento del SpMet realizados 3, 7 y 21 días después de la exposición final al gNO el día 5 no mostraron ningún aumento residual del SpMet.

La metahemoglobina se reduce mediante una reductasa enzimática que, en teoría, resulta en un aumento de los niveles de nitrito/nitrato en sangre. Sin embargo, durante el ensayo no se observaron diferencias significativas en los niveles séricos de nitrito/nitrato con respecto al valor basal. Un sujeto presentó valores máximos de nitrito y nitrato

significativamente más altos ( $p < 0,001$ ) que también fueron ligeramente diferentes al valor basal ( $p = 0,038$ ) en comparación con los otros sujetos.

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

Las Figuras 5A-F presentan varios resultados de la monitorización de la función pulmonar antes, durante y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por parte de 10 individuos humanos sanos, en donde los valores basales de las pruebas de función pulmonar se obtuvieron dentro de los 7 días anteriores a la administración del gNO, y los valores durante la administración del gNO se obtuvieron el día 2 del tratamiento de 5 días y otros datos se obtuvieron después de la administración final del gNO el día 5 y los días 8, 12 y 26, en donde la Figura 5A presenta un volumen de espiración forzado en 1 segundo en porcentajes ( $FEV_1$ ), la Figura 5B presenta el flujo espiratorio medio máximo (MMEF), la Figura 5C presenta la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO), la Figura 5D presenta la capacidad vital forzada (PVC), la Figura 5E presenta la capacidad pulmonar total (TLC) y la Figura 5F presenta el volumen residual (RV), mientras que todos los datos se presentan como medias de los diez sujetos y las diferencias absolutas en comparación con el valor basal antes de la administración del gNO, y las diferencias estadísticas se evaluaron mediante Prueba de Mann-Whitney.

Como puede verse en las Figuras 5A-F, las pruebas de función pulmonar no revelaron ninguna anomalía en ningún sujeto durante y después de los tratamientos de administración de gNO. En concreto, el flujo de aire medido mediante  $FEV_1$  y el flujo espiratorio máximo a mitad de la espiración (MMEF) no difirieron del valor basal durante el transcurso del estudio. Otras mediciones de la función pulmonar, tales como la DLCO, la capacidad vital forzada (PVC), la capacidad pulmonar total (TLC) y el volumen residual (RV), tampoco cambiaron con respecto a la medición del valor basal.

Para evaluar si la inhalación de gNO puede provocar inflamación o activación endotelial, se cuantificaron las citocinas y los factores de activación del endotelio vascular Ang-1 y Ang-2 en el plasma periférico al valor basal del estudio en varios momentos posteriores.

Las Figuras 6A-F presentan los niveles en sangre de varias citocinas antes y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por parte de 10 individuos humanos sanos, medidos a partir de muestras de sangre recogidas 7 días antes de la administración del gNO, cada día durante el tratamiento y 8, 12 y 26 días después, en donde la Figura 6A presenta los niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral (TNF) $\alpha$ , interleucina (IL)-1 $\beta$ . Los datos se presentan en la Figura 6B, IL-6 en la Figura 6C, IL-8 en la Figura 6D, IL-10 en la Figura 6E y IL-12p70 en la Figura 6F, según lo determinado por una matriz de bolillas citométricas de forma estadística las diferencias se comparan mediante ANOVA de medidas repetidas con la prueba posterior de Bonferroni para datos paramétricos (IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70) o la prueba de Friedman con la prueba posterior de Dunn para datos no paramétricos (TNF e IL-1  $\beta$ ).

Como puede verse en las Figuras 6A-F, los niveles de citocinas de TNF, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$  e IL-12p70 no se vieron afectados por la inhalación de gNO en comparación con los valores basales. Las comparaciones entre los niveles de valores basales de citocinas y los niveles en cada uno de los puntos temporales de muestreo de los 10 participantes humanos no arrojaron diferencias significativas, en comparación con el ANOVA de medidas repetidas con la prueba posterior de Bonferroni para datos paramétricos, o la prueba de Friedman con la prueba posterior de Dunn para datos no paramétricos.

Las Figuras 7A-C presentan los niveles plasmáticos de las angiopoyetinas Ang-1 y Ang-2 antes y después de la inhalación de 160 ppm de óxido nítrico gaseoso por parte de 10 individuos humanos sanos, medidos en una muestra de sangre recogida dentro de los 7 días anteriores a la inhalación del gNO, cada día durante la administración del gNO y 8, 12 y 26 días después, donde los niveles plasmáticos de Ang 1 se muestran en la Figura 7A, Ang-2 en la Figura 7B y las proporciones de Ang-2/Ang-1 en la Figura 7C, según lo determinado por una matriz de bolillas citométricas, mientras que se evaluaron las diferencias estadísticas en comparación mediante la prueba de Friedman con la prueba posterior de Dunn.

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

Conclusiones:

Se ha demostrado y presentado en la presente memoria la seguridad de un tratamiento en seres humanos mediante la inhalación de gNO a una concentración de 160 ppm. En la presente memoria se ha demostrado que 160 ppm de gNO pueden administrarse de forma segura a pulmones humanos sanos de forma pulsada durante cinco días

consecutivos, sin mostrar efectos adversos significativos. Todos los signos vitales permanecieron dentro de los márgenes clínicos aceptables durante la administración del gNO a 160 ppm y varios días después de la administración del gNO.

5 Al menos con respecto a los niveles de metahemoglobina y NO<sub>2</sub>, los hallazgos presentados en esta memoria son superiores a los obtenidos con la inhalación continua de 80 ppm de gNO, que es la dosis de gNO actualmente aprobada para uso por inhalación en bebés nacidos a término, presumiblemente debido a la estrategia de dosificación intermitente utilizada en esta memoria. Si bien se ha informado que la administración continua de 80 ppm de gNO  
10 provoca un aumento de al menos un 5 % en los niveles de SpMet, con un 35 por ciento de los sujetos que superan el 7 %, los resultados presentados anteriormente (los 930 niveles de SpMet registrados) permanecieron por debajo del 5 %.

15 Si bien el aumento esperado de los niveles de metahemoglobina durante un ciclo de tratamiento se estimó en un 1 %, el aumento promedio observado de metahemoglobina del 0,9 % en las diez personas que participaron en un solo ciclo de tratamiento coincidió con las estimaciones del modelo farmacocinético de primer orden, teniendo en cuenta la precisión absoluta del oxímetro de pulso de  $\pm 1$  %. El estudio estableció que un período intermedio de 3,5 horas permitió que la concentración de metahemoglobina volviera a los valores basales, lo que permitió cinco ciclos diarios durante cinco días sin un aumento clínico significativo de las concentraciones de metahemoglobina. En conjunto, se ha demostrado en la presente memoria que la estrategia de dosificación intermitente de gNO es segura para los seres  
20 humanos con respecto a la producción de metahemoglobina y la carga metabólica.

25 Similarmente, las concentraciones máximas medias del nivel de NO<sub>2</sub> mostradas anteriormente (2,8 ppm) son comparables con las observadas durante la administración continua de 80 ppm (2,6 ppm) de los estudios anteriores. Las limitaciones de este y otros estudios con respecto a la administración de gNO son que los niveles de NO y NO<sub>2</sub> solo se conocen en el punto de entrada en las vías respiratorias de los sujetos y se desconocen los niveles reales resultantes de óxidos de nitrógeno en el pulmón. A pesar de esta resistencia al estrés nitrosativo, podría ser prudente en futuros estudios evaluar a los sujetos para detectar deficiencias de tiol y metahemoglobina reductasa.

30 El estudio presentado anteriormente también demuestra que 160 ppm de gNO, administrados como se describe, afectan la función pulmonar solo mínimamente, y la inflamación aguda de las vías respiratorias, medida mediante la determinación de los caudales, no fue detectable. Posiblemente, la posible reactividad perjudicial de las vías respiratorias podría enmascarse o prevenirse mediante la mejora de la relajación del músculo liso que se sabe que ejerce el gNO. En pacientes con infección pulmonar, un suministro elevado de NO puede provocar un aumento de la reactividad de las vías respiratorias. Sin embargo, la actividad vasodilatadora del NO puede beneficiar al paciente  
35 además de la actividad antimicrobiana del NO.

40 La administración de 160 ppm de NO a humanos que se muestra aquí no causó parénquima pulmonar lesión, medida por diferentes parámetros de la función pulmonar. Asimismo, los niveles plasmáticos de citocinas inflamatorias, las primeras respuestas del huésped a la lesión pulmonar y los niveles de eosinófilos y neutrófilos permanecieron constantes durante y días después de la inhalación del gNO. Además, los factores de activación endotelial vascular Ang-1, Ang-2 y la relación Ang-2/Ang-1 no se vieron afectados por la administración de gNO por inhalación.

45 La mecánica de la función pulmonar y los marcadores inflamatorios permanecieron sin cambios en comparación con los valores basales en las mediciones tres días y 28 días después del tratamiento mediante la administración de gNO. Si bien no se puede excluir que se produzca algún cambio a largo plazo en la función pulmonar, la ausencia de cualquier signo de inflamación en el período posterior al tratamiento mostrado anteriormente hace que esto sea poco probable. Si los marcadores inflamatorios séricos pueden resultar insensibles para medir los cambios agudos o incluso crónicos en los pulmones, se podrían tomar muestras de los marcadores inflamatorios de los líquidos del lavado broncoalveolar (BAL).

#### 50 Ejemplo 4

Tratamiento de la bronquiolitis en bebés con gNO

55 El siguiente es un protocolo para probar la eficacia y para tratar a los bebés que padecen bronquiolitis viral. El médico investigador inscribió a cada paciente y se obtuvo la firma del consentimiento informado de los padres en un documento oficial. El médico relleno un cuestionario detallado y obtuvo muestras de sangre y nasofaringe para detectar virus respiratorios.

60 Indicación y pronóstico:

La bronquiolitis se define como una infección de las vías respiratorias pequeñas. También es una de las manifestaciones más comunes de la infección aguda del sistema respiratorio inferior en la primera infancia y es la principal causa de mortalidad infantil mundial. En 2005, se calculó que entre 2,8 y 4,3 millones de niños pequeños en todo el mundo desarrollaron una ALRI grave asociada al RSV, por lo que fue necesario el ingreso hospitalario. La hospitalización por bronquiolitis es cara, ya que solo los gastos hospitalarios en los EE. UU. superaron los mil millones

de dólares en 2006. Estos cargos reflejan en parte la duración de la estancia (LOS, por sus siglas en inglés) en el hospital. El promedio de LOS para la bronquiolitis en los Estados Unidos es de 3,3 días.

5 La bronquiolitis, que incluye afecciones asociadas con virus, bacterias, hongos u otros irritantes patógenos, es actualmente el motivo más común de ingreso hospitalario pediátrico en los Estados Unidos y representa casi el 20 por ciento de las hospitalizaciones infantiles por cualquier causa. La etiología viral es la causa principal y, entre los virus respiratorios, se cree que el virus sincitial respiratorio (RSV) es el patógeno viral más importante que causa la infección aguda de las vías respiratorias inferiores (ALRI) en niños pequeños. Se estima que entre 60.000 y 199.000 niños menores de 5 años mueren cada año a causa de la ALRI asociada al RSV, y el 99 por ciento de estas muertes se producen en países en desarrollo. La enfermedad es común principalmente en el primer año de vida. Los signos y síntomas clínicos son consistentes con hipoxia, dificultad para respirar, coriza, mala alimentación, tos, sibilancias y crepitaciones durante la auscultación y, en algunos casos, insuficiencia respiratoria.

15 Tratamiento actual de la bronquiolitis aguda:

Hasta ahora no se dispone de un tratamiento específico para la infección viral y hasta la fecha solo se usan tratamientos de apoyo, tal como oxígeno e inhalaciones de solución salina hipertónica o esteroides con o sin fármacos beta agonistas.

20 Los bebés con hipoxemia son admitidos para recibir suplementos de oxígeno y tratamiento de apoyo. La administración de oxígeno y líquidos es la piedra angular del tratamiento de la bronquiolitis viral aguda. Hasta la fecha, no se ha demostrado que todas las demás intervenciones, incluidos los broncodilatadores inhalados, los corticosteroides, la fisioterapia torácica, los agentes antivirales y los antibióticos, sean eficaces y no se recomiendan de forma rutinaria para el tratamiento de la bronquiolitis viral aguda.

25 Afecciones relacionadas con la enfermedad:

30 Los virus respiratorios son a menudo responsables de la manifestación de la bronquiolitis, que es causada, exacerbada por ella o asociada de otro modo a la misma. Entre ellos, los más comunes son el virus sincitial respiratorio (RSV), el rinovirus, el coronavirus, el enterovirus, la influenza A y B, la parainfluenza 1, 2 y 3, el bocavirus, el metapneumovirus humano, el SARS y el adenovirus. Sin embargo, otros virus y otros patógenos suelen causar infecciones que se manifiestan por bronquiolitis y, además, la bronquiolitis puede producirse como resultado de afecciones que no están asociadas con ningún patógeno (p. ej., complicaciones de la fibrosis quística, inmunosupresión relacionada con el cáncer y diversas enfermedades pulmonares, etc.).

35 Seguridad y efectos adversos:

Los objetivos observacionales del tratamiento con gNO de bebés de 2-12 meses que padecen bronquiolitis incluyen:

40 Evaluación del resultado clínico;

Evaluación de parámetros externos, tal como el recuento de glóbulos blancos; y

45 evaluación de la carga viral respiratoria en la nasofaringe.

Se documenta cualquier efecto adverso y los efectos adversos serios se abordan según los protocolos establecidos, se interrumpe el tratamiento con gNO y se notifica el evento a la parte correspondiente.

50 Definición de cohorte:

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

bebés de 2-12 meses;

55 diagnosticado con bronquiolitis (dificultad respiratoria con hipoxia);

no hay enfermedades concomitantes como neumonía u otitis media;

no se ha recetado ni se ha necesitado ningún tratamiento con antibióticos;

60 puntuación clínica entre 6 y 10 (ver la descripción detallada más adelante);

sin enfermedades subyacentes; y

65 consentimiento paterno informado documentado.

Una enfermedad subyacente es una enfermedad como los trastornos genéticos o las enfermedades pulmonares crónicas.

Régimen:

5 Los bebés de 2 a 12 meses que ingresan en la sala de pediatría debido a una bronquiolitis se someten a un tratamiento con gNO según el régimen descrito en el ejemplo 3 anterior, es decir, a la inhalación de 163,3 ppm (DE de 4,0) de gNO durante 30 minutos, 5 veces al día, durante 5 días consecutivos o hasta que sean dados de alta, lo que ocurre primero.

10 Los bebés inscritos pueden ser asignados al azar en una proporción de 1:1 o 1:2 para recibir gNO con O<sub>2</sub> o placebo (aire) con O<sub>2</sub>.

Puntuación clínica:

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

Tabla 3

Puntuación	<6 meses	≥6 meses	Sibilancias	SaO <sub>2</sub> (aire ambiente)	Uso del músculo accesorio
0	40	30	Ninguna	≥95 %	
25 1	41-55	31-45	Final de espiración audible por estetoscopio	92-94 %	+
2	56-70	46-60	Inspiración y espiración audibles por estetoscopio	90-92 %	++
30 3	>70	> 60	Audible sin estetoscopio <sup>2</sup>	≥89 %	+++

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

Parámetros monitorizados:

35 La monitorización clínica se lleva a cabo mediante el registro de una puntuación clínica por parte de un médico dos veces al día. La saturación de oxígeno en el aire ambiente se registra tres veces al día.

40 La monitorización de laboratorio externa se realiza antes y durante el tratamiento e incluye los niveles sanguíneos de metahemoglobina, nitritos/nitratos séricos, protrombina, citocinas proinflamatorias y 18 quimiocinas.

La Tabla 4 presenta el cronograma de varias actividades protocolarias.

Tabla

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

65 Criterios de eficacia:

El tratamiento se evalúa determinando la tasa de mejora de la puntuación clínica, la reducción de la duración de la hospitalización, la tasa de mejora de la saturación de O<sub>2</sub> y la tasa de derivación a una unidad de cuidados intensivos pediátricos.

- 5 Además, para evaluar la eficacia se usa una reducción de la carga viral en la nasofaringe, determinada mediante RT-PCR.

**Ejemplos**

- 10 Tratamiento de la bronquiolitis en bebés mediante el protocolo de estudio clínico gNO

El siguiente es un protocolo ejemplar para estudios clínicos basados en los métodos dirigidos al tratamiento de la bronquiolitis en seres humanos. En concreto, el tema del estudio es una evaluación doble ciega y aleatoria de la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad del óxido nítrico administrado de forma intermitente por inhalación a sujetos con bronquiolitis.

15 Los objetivos del estudio incluyen la evaluación de la seguridad y la tolerabilidad del tratamiento por inhalación intermitente de gNO en bebés de 2-12 meses que padecen bronquiolitis. Otros objetivos incluyen la evaluación de la eficacia del tratamiento por inhalación intermitente de gNO en comparación con el tratamiento estándar con O<sub>2</sub> en un grupo de sujetos similares.

Equipo:

25 Un dispositivo de inhalación improvisado se basa en un equipo hospitalario estándar y en una fuente de oxígeno hospitalaria. Por ejemplo, el oxígeno se suministra desde el sistema de oxígeno principal del hospital a través de un mezclador de oxígeno, como por ejemplo el Bird modelo 03800, seguido del medidor de flujo másico de oxígeno de un hospital. El aire rico en oxígeno se controla para alcanzar una concentración final máxima de aproximadamente el 40 % de O<sub>2</sub>. La mezcla de aire y oxígeno se suministra al sujeto a través de un conector en forma de Y conectado junto a una máscara facial de hospital estándar, como por ejemplo, una máscara Hospitak™ de Unomedical Inc.

30 El flujo de gNO, extraído de un tanque que contiene 800 ppm de óxido nítrico en N<sub>2</sub> con una pureza del 99,999 %, suministrado por un proveedor de gas autorizado en, por ejemplo, contenedores de 50 o 30 litros con 120 bar o 150 bar respectivamente, se ajusta pasando por un regulador hospitalario estándar, como el CareFusion™ modelo 400, y el medidor de flujo másico del hospital, como el CareFusion™ modelo 77063.

35 La responsabilidad de NO no se puede comprobar directamente, ya que varios sujetos pueden recibir NO del mismo recipiente y la cantidad neta de NO usada para cada inhalación es mínima en comparación con el peso total del recipiente. Por lo tanto, la cantidad de NO administrada por tratamiento se evalúa basado en los cambios de presión en el recipiente (una evaluación aproximada).

40 El flujo de gNO se ajusta antes de cada ciclo de inhalación basado en la concentración de gNO detectada en la máscara del sujeto. Tras una nueva calibración del sistema, el regulador y el medidor de flujo másico se ajustan para suministrar 160 ppm de gNO a una velocidad de 5 a 15 litros por minuto. El gNO se suministra al sujeto a través del segundo brazo del conector en forma de Y (especificado anteriormente) que se coloca junto a la máscara facial. Los orificios de máscara y tubo se usan para controlar continuamente las concentraciones de gNO y NO<sub>2</sub> y los valores de FiO<sub>2</sub> suministrados al sujeto.

45 La exhalación se controla, por ejemplo, mediante el CO<sub>2</sub> al final de la espiración (EtCO<sub>2</sub>). El EtCO<sub>2</sub> se monitorea con un equipo estándar, como el monitor de capnografía portátil Microcap®, cat. n.º CS04179 de Oridion, Israel, con puntas nasales como (Infant Neonate, cat. n.º 008179 de Oridion, Israel).

50 Los niveles de metahemoglobina (SpMet) y saturación de oxígeno u oxígeno disuelto (SpO<sub>2</sub>) se controlan continuamente usando un monitor dedicado como, por ejemplo, el RAD 57 de Masimo.

55 Cohorte:

La población objeto del estudio es de 44 niños de 2-12 meses diagnosticados con bronquiolitis, que necesitaron hospitalización (la tasa de abandono prevista es del 10 %). La población se divide en dos grupos: El grupo 1, denominado grupo de tratamiento, recibe una inhalación intermitente (5 × 30 minutos, un día) de 160 ppm de gNO además del tratamiento estándar de administración de O<sub>2</sub>, durante un máximo de 5 días. Entre las inhalaciones de gNO, los sujetos continúan recibiendo el tratamiento de inhalación estándar (O<sub>2</sub>), el grupo 2, denominado grupo de control, recibe la inhalación continua del tratamiento estándar (O<sub>2</sub>).

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

Tabla 5

5	Puntuación	<6 meses	6-30 meses	Sibilancias	SaOz (aire ambiente)	Uso muscular accesorio
	0	40	30	Ninguna	95 %	Ninguna
	1	41-55	31-45	Finalizar la caducidad con un estetoscopio	92-94 %	+
10	2	56-70	46-60	Insp. y espiración con estetoscopio	90-92 %	++
	3	>70	>60	Audible sin estetoscopio	89 %	+++

15 Los criterios de inclusión se definen como hombres o mujeres de 2-12 meses de edad, diagnosticados con bronquiolitis con una puntuación clínica inferior a 10 (ver más abajo) y el consentimiento informado de los padres o tutores legales.

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

30 Régimen, vía y forma posológica de administración:

La duración del estudio para cada asignatura es de 30 (+5) días desde la admisión al departamento, hasta el tratamiento, incluido el período de seguimiento. Todos los sujetos se presentan a las visitas de seguimiento el día 14 (+5 días) y se contacta con ellos el día 30 (+5 días) a partir del día de la admisión.

35 La Tabla 6 presenta un programa ejemplar de actividades de evaluación del estudio, en donde (\*) indica el tratamiento durante 5 días o hasta que el sujeto sea dado de alta (lo que ocurra primero), (\*\*) indica el tratamiento el día 5 o cuando el sujeto sea dado de alta (lo que ocurra primero), por la mañana, (\*\*\*) indica el tratamiento realizado por un médico del estudio ciego y (\*\*\*\*) indica el tratamiento en caso de que el quinto día de tratamiento sea el sexto día desde el ingreso al estudio.

Tabla 6

45		Día 1-	Día 1 - Primera inhalación del estudio	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día **** 6	Día 14 (+ 5)	Día 21 (+ 5)	Día 30 (+5)
	Admisión	+	+	+	+	+	+	+			
50	Evaluación, firma del consentimiento informado e inscripción	Dentro de las 4 horas siguientes a la admisión									
	Aleatorización	+									
55	Examen físico***	+		+	+	+	+	+	+	+	
	Evaluación de la puntuación clínica (dos veces al día, por la mañana +noche) **	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
60	Signos vitales (una vez por turno)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Tratamiento de estudio (NO/control)		+	+	+	+	+	+			
	Análisis de sangre: % de metahemoglobina;	+	+	+	+	+	+	+			
65	% de oxihemoglobina;										

	Día 1-	Día 1 - Primera inhalación del estudio	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día **** 6	Día 14 (+ 5)	Día 21 (+ 5)	Día 30 (+5)
5										
		Frecuencia cardíaca (cada tratamiento de inhalación x5/24 horas) *								
	+	Niveles de NO, NO <sub>2</sub> , FiO <sub>2</sub> 1 desde la máscara	+*	+*	+*	+*	+*			
10	+	Nivel ETCO <sub>2</sub> de las puntas nasales ubicadas en la fosa nasal del sujeto	+*	+*	+*	+*	+*			
15	+	Hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos: 1 para detectar <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	+*	+*	+*	+*	+*	+	+	
	+	Lavado nasofaríngeo para +PCR de virus respiratorios								
20	+	Cuestionario para todos los efectos adversos	+	+	+	+	+	+	+	+/teléfono
	+	Medicación concomitante	+*	+*	+*	+*	+*	+	+	+
	+	Documentar todas las pruebas de laboratorio realizadas por motivos médicos	+*	+*	+*	+*	+*	+	+	+

La Tabla 7 presenta el programa de administración y evaluación del gNO, en donde (\*) indica la actividad en la primera inhalación del primer día de tratamiento.

Tabla 7

	Tratamiento previo	Inicio del tratamiento del estudio	Durante el tratamiento del estudio	Fin del tratamiento del estudio					
35		0-minutos		30 minutos	60* minuto	90* minuto	120* minuto	180* minuto	210* minuto
40	+								
		Presión en el cilindro de NO	+	+					
	+	Tratamiento estándar de O <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+
45		Tratamiento de NO (Grupo 1)	Comenzar	Continuo	Finalizar				
50	+	OxyHem+ MethHem medida %	+	En curso, registre el valor observado en caso de superar el intervalo aprobado	+	+	+	+	+
55		Frecuencia cardíaca	+	15 minutos después del inicio del tratamiento	+	+	+	+	+
60	+	NO+N <sub>2</sub> O, FiO <sub>2</sub> , niveles extraídos de la máscara	+	En curso, registre el valor observado en caso de superar el intervalo aprobado	+				
65	+	Nivel de ETCO <sub>2</sub> tomado de las puntas nasales ubicadas en la fosa nasal del sujeto			+				
	+	Todos los efectos adversos	+	+	+	+	+	+	+

	Tratamiento previo	Inicio del tratamiento del estudio	Durante el tratamiento del estudio	Fin del tratamiento del estudio					
5	Medicación concomitante	+	+	+	+	+	+	+	+

La ceguera relacionada con el tratamiento se mantiene separando entre los miembros del equipo que no fueron cegados por el tratamiento y los miembros del equipo que no fueron cegados, y escondiendo el contenedor/fuente de NO y todo el equipo relacionado con el estudio detrás de una cortina.

El grupo 1 (grupo de tratamiento) recibe el tratamiento estándar (O<sub>2</sub>) combinado con la inhalación mediante mascarilla facial de óxido nítrico gaseoso (gNO, 800 ppm) al 0,08 % administrado durante 30 minutos cada cuatro horas, manteniendo un mínimo de 3 horas entre el final de un ciclo de inhalación de gNO y el comienzo del siguiente ciclo, cinco veces al día durante cinco días consecutivos o hasta que se decida interrumpir el tratamiento. La exposición máxima acumulada al óxido nítrico se estima en 2000 ppm por hora.

El grupo 2 (grupo de control) recibe el tratamiento estándar de la inhalación de O<sub>2</sub> con el mismo equipo que el usado para administrar el gNO a los miembros del grupo 1.

El tratamiento final del estudio para ambos grupos lo evalúa un médico “cegado” del estudio basado en una evaluación clínica. La mejora del sujeto puede llevar a la decisión de dar de baja al sujeto del estudio.

Teniendo en cuenta una tasa de abandono esperada de aproximadamente el 10 %, se reclutan 44 sujetos para tener un tamaño de muestra de al menos 40 (20 por grupo) sujetos que completaron el estudio.

Criterios de valoración del estudio:

Los criterios de valoración de seguridad primarios incluyen la determinación del porcentaje de metahemoglobina (MetHb) asociado con el gNO inhalado y la determinación de los efectos adversos asociados con el gNO inhalado.

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

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

Los criterios de valoración observacionales incluyen la observación del número de sujetos con un nivel de metanfetamina superior a aproximadamente el 5 % en cualquier momento; observación del cambio en los recuentos medios de neutrófilos y eosinófilos de los sujetos de 2-12 meses tratados con gNO por bronquiolitis en comparación con los sujetos tratados con el tratamiento estándar; observación del número de sujetos con hemorragias relacionadas con el fármaco del estudio en cualquier momento; la observación de la reducción del transporte bacteriano en la nasofaringe de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. Aureus* y la evaluación del resultado clínico durante 21 días desde el ingreso al estudio de sujetos de 2-12 meses tratados con gNO para la bronquiolitis; y la evaluación de parámetros externos, como el recuento de glóbulos blancos en sujetos de 2-12 meses de edad tratados con gNO para la bronquiolitis en comparación con los sujetos tratados con el tratamiento estándar.

Los criterios para finalizar el tratamiento debido a la mejoría del sujeto se basan en la mejora del sujeto que lleva a la decisión de darle el alta del paciente del hospital.

Los criterios para la interrupción temprana del tratamiento temporal incluyen:

metahemoglobina en sangre superior al 5 %;

nivel de NO<sub>2</sub> medido cerca de la boca del sujeto superior a 5 ppm;

SpO<sub>2</sub> durante el tratamiento más del 90 %;

ETCO<sub>2</sub> de más de 60 mmHg; y

efectos adversos que se sospecha que están relacionados a NO, según el criterio del médico.

5 En caso de que un parámetro medido supere el nivel aprobado, se interrumpirá la inhalación del tratamiento del estudio actual. A continuación, se mide un nivel de repetición 30 minutos más tarde y se registra la medición final. La siguiente inhalación comienza según el protocolo del estudio.

Los criterios para la interrupción temprana del tratamiento permanente incluyen:

10 un segundo episodio de metahemoglobina en sangre superior al 5 %; y  
una puntuación clínica de más de 10.

15 Un sujeto cuyo tratamiento se interrumpió por cualquier motivo, excepto la retirada voluntaria del consentimiento del padre o tutor legal, completa toda la evaluación del estudio, incluidas las visitas de seguimiento.

La medicación concomitante (es decir, antibióticos o esteroides) administrada durante el estudio no debe usarse como motivo para la interrupción temprana del tratamiento.

20 Los criterios para la retirada temprana del estudio incluyen:

el padre/tutor legal del sujeto retiró el consentimiento;

25 la dirección del estudio solicitó que se retirara la asignatura;

discreción del investigador;

violación/incumplimiento del protocolo;

30 pérdida de seguimiento/falta de retorno;

evento adverso o evento adverso grave; y

35 muerte; en cuyo caso se interrumpe el estudio para todos los miembros de la cohorte para su reevaluación médica.

Procedimientos de tratamiento:

Día 1:

40 Hasta 5 inhalaciones según la hora de ingreso.

45 El pretratamiento incluye la monitorización y el registro de los niveles de oxihemoglobina (%), metahemoglobina (%), EtCO<sub>2</sub>, FiO<sub>2</sub>, NO y NO<sub>2</sub>. Se establece un valor basal para el flujo de gas que coincida con la ventilación mínima del paciente (5-15 lpm), y se valida que el flujo de gNO alcanza las 160 ppm en la máscara de inhalación, con una fluctuación que no supere las 15 ppm. Si el gNO fluctúa, el flujo de gas basal aumenta para satisfacer las necesidades mínimas de ventilación y flujo del paciente. Al final de la etapa de pretratamiento, la máscara se coloca en la cara del sujeto.

50 Al inicio del tratamiento se registran los siguientes parámetros:

hora de inicio y presión del cilindro;

frecuencia cardíaca;

55 oxihemoglobina (%) y metahemoglobina (%); y

niveles de FiO<sub>2</sub>, NO y NO<sub>2</sub>.

60 Durante el tratamiento, los siguientes parámetros se controlan y registran de forma continua:

oxihemoglobina (%) y metahemoglobina (%);

niveles de FiO<sub>2</sub>, NO y NO<sub>2</sub> tomados de la máscara;

65 cualquier forma de efectos adversos; y

## ES 2 988 619 T3

frecuencia cardíaca 15 minutos después del inicio del tratamiento.

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

- 5 detener el tiempo de tratamiento y la presión del cilindro;
- cualquier forma de efectos adversos;
- 10 niveles de FiO<sub>2</sub>, NO y NO<sub>2</sub>;
- frecuencia cardíaca;
- niveles de oxihemoglobina (%) y metahemoglobina (%);
- 15 solo después de la primera inhalación del primer día para ambos grupos, se registra lo siguiente: oxihemoglobina (%), metahemoglobina (%) y frecuencia cardíaca 60, 90, 120, 150, 180 y 210 minutos después del inicio del tratamiento;
- el coordinador del estudio y el médico del estudio completan un cuestionario que incluye todos los efectos adversos, y los signos vitales se miden una vez por turno.
- 20 Días 2-5 (o Día 6):
- El último día de tratamiento es el sexto día desde la admisión.
- 25 El Día 5 (o el Día 6, si el quinto día de tratamiento termina el sexto día desde el ingreso o el alta o el último día del tratamiento del estudio) hasta 5 inhalaciones, según el estado clínico del sujeto.
- Una vez al día, por la mañana, se realiza un examen físico y se registran los signos vitales (incluida la temperatura, el pulso, la frecuencia respiratoria, la presión arterial, etc.);
- 30 evaluación de la puntuación clínica por un médico cegado; y
- detección de bacterias mediante cultivo a partir de hisopos nasales (hisopos nasofaríngeos y orofaríngeos para detectar *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*)
- 35 De forma rutinaria, el coordinador del estudio y el médico del estudio completan un cuestionario que incluye todos los efectos adversos, y se observa al sujeto para que cumpla con los criterios de inclusión y exclusión.
- Los procedimientos de pretratamiento, inicio del tratamiento, durante el tratamiento y final del tratamiento se llevan a cabo como en el Día 1.
- 40 Las evaluaciones al final del tratamiento se realizan de 2 a 4 horas después del último tratamiento de inhalación e incluyen la evaluación de la puntuación clínica, los signos vitales realizados por un médico cegado, la oxihemoglobina (%) y la metahemoglobina (%) y la detección de bacterias mediante cultivo a partir de una muestra nasal.
- 45 Visitas de seguimiento programadas:
- Días 14+5 y 21+5:
- 50 el médico del estudio completa el cuestionario que incluye cualquier efecto adverso;
- revisar y documentar los medicamentos concomitantes;
- examen físico realizado por el médico del estudio;
- 55 evaluar la puntuación clínica por parte de un médico cegado;
- realizar la detección de bacterias mediante cultivo a partir de un hisopo nasal;
- 60 registrar en el archivo del sujeto de estudio cualquier prueba de laboratorio (es decir, análisis de sangre y radiografía de tórax) si se realiza por motivos clínicos.
- Día 30+5:
- 65 el médico del estudio completa el cuestionario que incluye cualquier efecto adverso;

revisar y documentar los medicamentos concomitantes.

Evaluación médica/clínica:

- 5 Se llena el formulario inicial de demografía/historial médico y se realiza un examen físico. Un médico realiza un examen físico el día del examen y durante las visitas de seguimiento. Los sistemas corporales que se examinan a grandes rasgos incluyen el general, la piel, los ganglios linfáticos, la cabeza, los ojos, los oídos, la nariz y la garganta, el sistema respiratorio, el cardiovascular, el gastrointestinal, el neurológico y el musculoesquelético. Los nuevos hallazgos anormales se documentan y un médico hace un seguimiento en la próxima visita programada.
- 10 Se realiza un examen físico abreviado según lo consideren necesario los investigadores. Además de los signos vitales, los sistemas corporales deben examinarse a fondo. Las mediciones de los signos vitales después de descansar durante 5 minutos, incluidas la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la temperatura, se realizan y registran tres veces al día.
- 15 La saturación de oxígeno (SpO<sub>2</sub>) se mide mediante pulsioximetría (usando, p. ej., RAD 57) durante cada tratamiento y se registra antes, durante y después del tratamiento con NO. En caso de que el nivel de SpO<sub>2</sub> durante el tratamiento sea inferior a aproximadamente el 89 %, se interrumpe la inhalación del tratamiento del estudio actual. Se mide un nivel de repetición 30 minutos después y se debe registrar la medición final. La siguiente inhalación comienza según el protocolo del estudio.
- 20 Los niveles de metahemoglobina se miden de forma no invasiva y continua con un metahemoglobinómetro de pulso durante el tratamiento y se registran antes, durante y después del Día 1 al Día 5. Cualquier nivel de metahemoglobina superior a aproximadamente el 5 % requiere una medición repetida 30 minutos después y se registra la medición final. La siguiente inhalación comienza según el protocolo del estudio.
- 25 El CO<sub>2</sub> (EtCO<sub>2</sub>) al final de la espiración se mide usando, p. ej., un capnógrafo MicroCap y se registra antes y después del tratamiento del Día 1 al Día 5.
- 30 La información sobre la aparición de efectos o eventos adversos se documenta a lo largo del estudio y hasta que se complete el seguimiento de los sujetos durante 30 días. La duración del evento (fechas y horas de inicio y finalización), la gravedad, el resultado, el tratamiento y la relación con la medicación del estudio (causalidad) y si el evento se considera un evento adverso grave, se registran en el formulario de informe del caso. Los efectos o eventos adversos se controlan hasta el día 30 de la visita/llamada de seguimiento.
- 35 La medicación concomitante administrada durante el estudio no conduce a la interrupción del tratamiento del estudio. Todos los medicamentos concomitantes y las terapias simultáneas se documentan a lo largo del estudio hasta el día 30 de la visita/llamada de seguimiento. Se registra la siguiente información: dosis, vía, frecuencia unitaria de administración e indicación (si se considera relevante) para la administración del medicamento. El motivo de la administración de medicamentos concomitantes se considera un efecto o evento adverso, a menos que se programara antes del inicio del estudio.
- 40 Los resultados de las pruebas de laboratorio recibidos durante la hospitalización del sujeto o el seguimiento del estudio se registran en el archivo del sujeto y se usan para el análisis observacional.
- 45 El enjuague nasal para determinar la diseminación viral se recoge en un recipiente estéril para muestras. Se recoge un hisopo nasal (nasofaríngeo y orofaríngeo) para la determinación de bacterias (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Staphylococcus aureus*) en un recipiente estéril para muestras.
- 50 Efectos adversos de los eventos:
- Los eventos adversos se registran a partir de la fecha del formulario de consentimiento informado firmado por el sujeto y durante todo el estudio, incluido el período de seguimiento. Los efectos adversos deben revisarse y actualizarse en cada visita posterior y durante cualquier contacto telefónico con el sujeto. La intensidad o gravedad del efecto adverso se caracteriza por ser leve si se tolera fácilmente, moderada si es lo suficientemente molesta como para interferir con la actividad diaria y grave si impide las actividades diarias normales.
- 55 La causalidad del evento adverso se evalúa de la siguiente manera:
- 60 no está relacionado cuando el efecto adverso se debe clara e incontrovertible a causas ajenas (enfermedad, medio ambiente, etc.);
- 65 relación poco probable si el efecto adverso cumple al menos dos de los siguientes criterios: no sigue una secuencia temporal razonable desde la administración del fármaco del estudio; podría haberse producido fácilmente por el estado clínico del sujeto, los factores ambientales o tóxicos u otros modos de terapia administrados al sujeto; no sigue un

patrón conocido de respuesta al fármaco del estudio y no reaparece ni empeora cuando se vuelve a administrar el fármaco;

5 posiblemente relacionado si el efecto adverso cumple al menos dos de los siguientes criterios: sigue una secuencia temporal razonable desde la administración del fármaco del estudio; no necesariamente se puede excluir razonablemente una relación causal con el tratamiento experimental y no se puede sugerir razonablemente que una explicación alternativa (p. ej., un fármaco concomitante o una enfermedad concomitante) sea la causa del SAE; y sigue un patrón conocido de respuesta al fármaco del estudio;

10 probablemente esté relacionado si el evento adverso cumple al menos tres de los siguientes criterios: sigue una secuencia temporal razonable desde la administración del fármaco del estudio; no puede explicarse razonablemente por las características conocidas del estado clínico del sujeto, los factores ambientales o tóxicos u otros modos de terapia administrados al sujeto; desaparece o disminuye al cesar o reducir la dosis del fármaco y sigue un patrón conocido de respuesta al fármaco del estudio.

15 Los efectos adversos potencialmente relacionados a NO son aquellos que están asociados con una metahemoglobinemia (% de elevación de la metahemoglobina) de más del 5 % y una elevación del NO<sub>2</sub> de más de 5 ppm.

20 Consideraciones estadísticas y de procesamiento de datos:

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

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

30 La prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher se aplican para probar las proporciones de la diferencia m entre los grupos de estudio.

35 Los efectos adversos se codifican según diccionarios de codificación, como el Diccionario médico para actividades reguladoras (MedDRA, versión 14.0 o superior), y se presentan en tablas según la clasificación de órganos del sistema (SOC) y el término preferido (PT).

Se calcula un intervalo de confianza (CI) del 95 % para la proporción de sujetos que presentan efectos adversos asociados con la inhalación de gNO.

40 La prueba T pareada o la prueba de rango firmado para dos medias se aplican para analizar los cambios en los parámetros continuos dentro de cada grupo de estudio.

45 La prueba T de dos muestras o la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon-Mann-Whitney para muestras independientes se aplican para analizar las diferencias en los parámetros continuos entre los grupos de estudio.

Todas las pruebas tienen dos caras y un valor p del 5 % o menos se considera estadísticamente significativo.

50 Los datos se analizan usando un software de procesamiento de datos, como el SAS® versión 9.1 (SAS Institute, Cary, North Carolina).

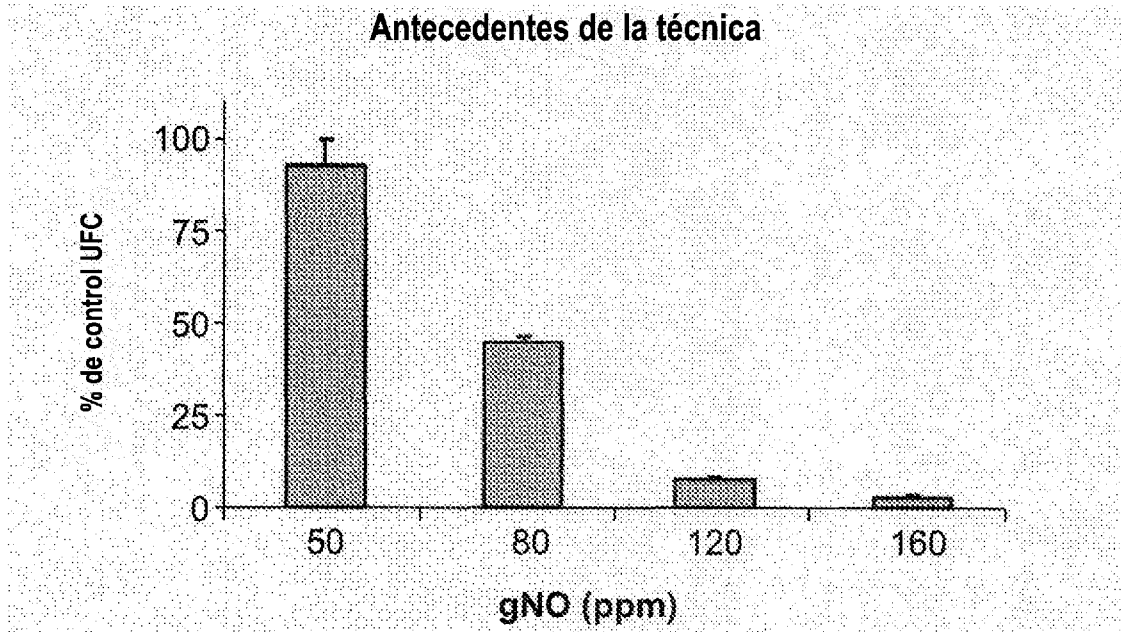
55

60

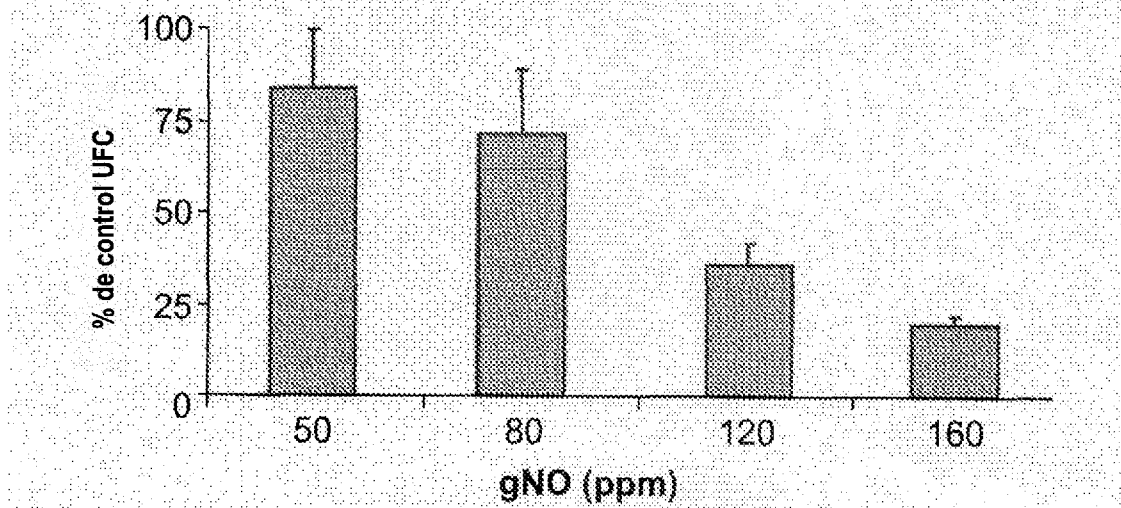
65

## REIVINDICACIONES

1. NO gaseoso (gNO) a una concentración de al menos 160 ppm, para usar en el tratamiento de un sujeto humano que padece una enfermedad o trastorno que se manifiesta en el tracto respiratorio o una enfermedad o trastorno que puede tratarse a través del tracto respiratorio, en donde la enfermedad o trastorno es fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica o una enfermedad o trastorno asociado con un microorganismo patógeno y el gNO se administra al sujeto humano intermitentemente, en donde la inhalación intermitente comprende de 1 a 6 ciclos por día de inhalación continua de dicho gNO durante un primer período de tiempo, seguida de la inhalación de ningún gNO durante un segundo período de tiempo; y en donde el gNO es parte de una mezcla que comprende además oxígeno, y la fracción de oxígeno inspirado (FiO<sub>2</sub>) en dicha mezcla varía de 20 % a 100 %.
2. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano según la reivindicación 1, en donde el gNO forma parte de una mezcla y en donde el NO<sub>2</sub> está presente en la mezcla en una concentración inferior a 5 ppm.
3. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano según la reivindicación 1 o 2, en donde el gNO forma parte de una mezcla, en donde la concentración de gNO en la mezcla se desvía de la concentración de al menos 160 ppm en menos del 10 %.
4. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho primer período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos.
5. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano según cualquier reivindicación anterior, en donde dicho segundo período de tiempo varía de 3 a 5 horas.
6. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano, según cualquier reivindicación anterior, comprendiendo 5 de dichos ciclos por día.
7. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano, según cualquier reivindicación anterior, efectuándose durante un período de tiempo que varía de 1 a 7 días.
8. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano, según la reivindicación 7, efectuándose durante un período de 5 días.
9. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano según cualquier reivindicación anterior, en donde la enfermedad o trastorno es la fibrosis quística.
10. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano según la reivindicación 9, en donde el sujeto humano con fibrosis quística comprende además una infección pulmonar microbiana.
11. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano según la reivindicación 10, en donde la infección pulmonar microbiana se asocia con un microbiano seleccionado entre *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), miembros del complejo *Burkholderia cepacia*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, micobacterias no tuberculosas (NTM) y diversas bacterias anaerobias estrictas.
12. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la enfermedad o trastorno está asociado a un microorganismo patógeno.
13. gNO para usar en el tratamiento de un sujeto humano según la reivindicación 12, en donde el microorganismo patógeno es *Acinetobacter baumannii*, *Aspergillus niger*, *Bacteroides vulgatus*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Clostridium perfringens*, Grupo entérico 137, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacteria tuberculosis*, *Pasteurella multocida*, *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium granulosum*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rustigianii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (FVL positivo), *Staphylococcus aureus* (VNL positivo), *Staphylococcus aureus* MRSA, *Streptococci* del grupo B, *Streptococci* del grupo D, *Streptococci* del grupo G, *Streptococcipyrogenes* rosenbach del Grupo A, *Streptococcus pneumoniae*, *richophyton meriagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, y *Vibrio vulnificans*.



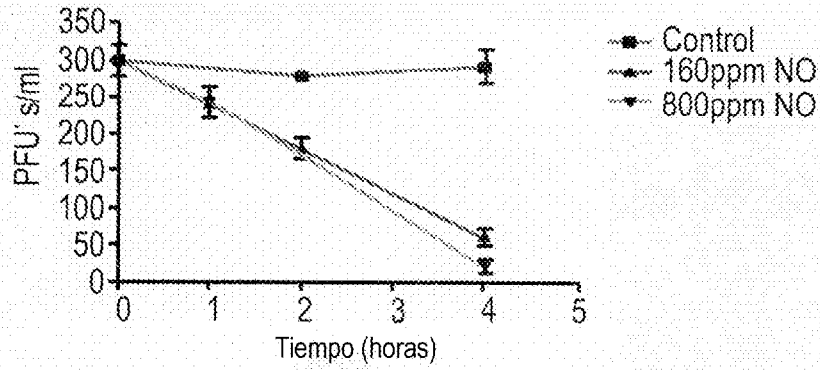
**Figura 1A**



**Figura 1B**

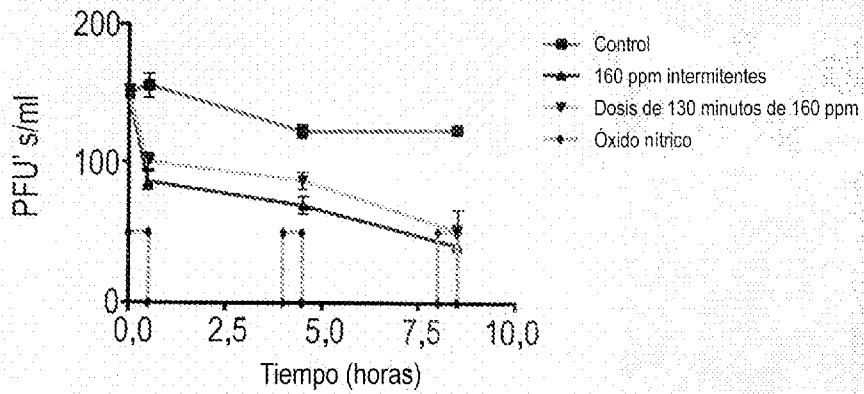
(Antecedentes de la técnica)

Exposición continua a gNO a 160 ppm y 800 ppm



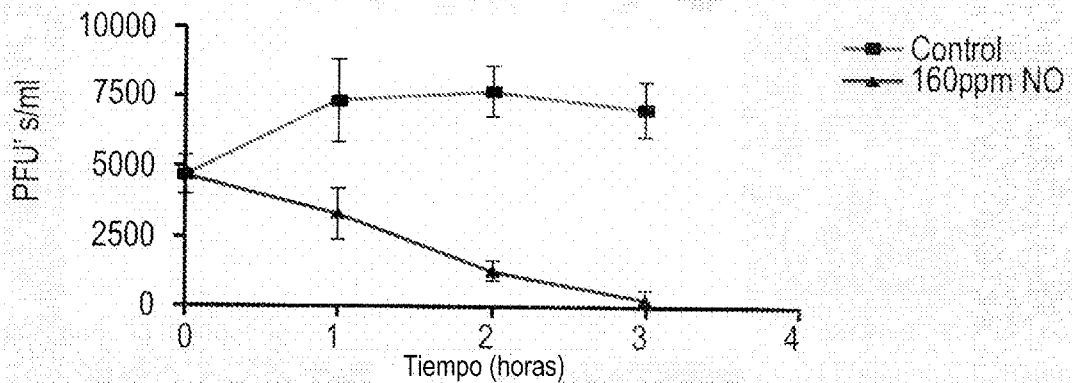
**Figura 2A**

Exposición intermitente a gNO a 160 ppm



**Figura 2B**

Influenza aviar H7N3 de alta patogenicidad



**Figura 2C**

Figura 3A

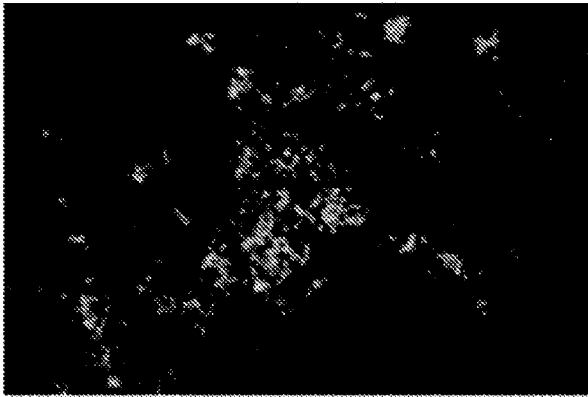


Figura 3B

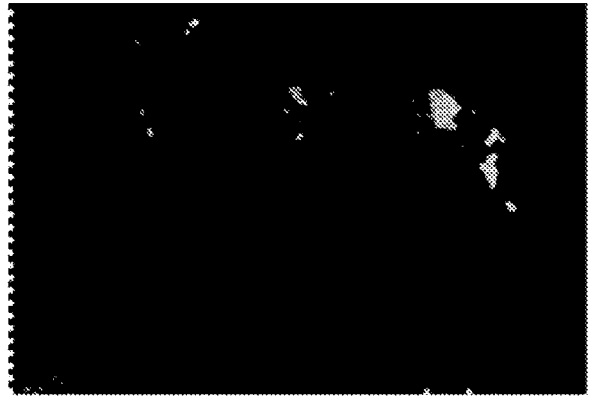
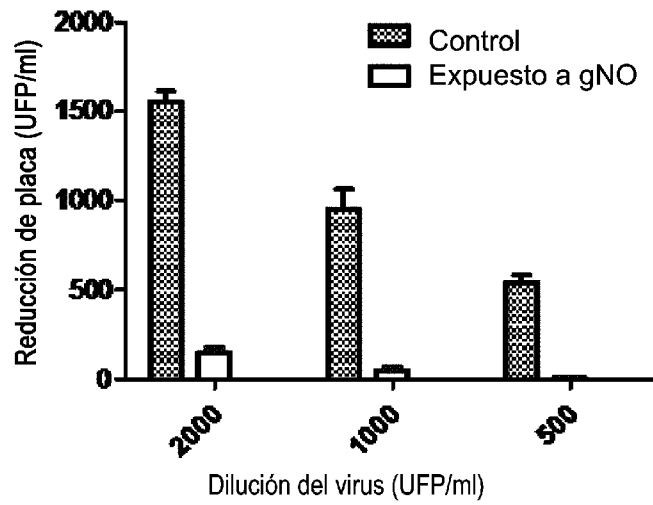


Figura 3C



Figura 3D



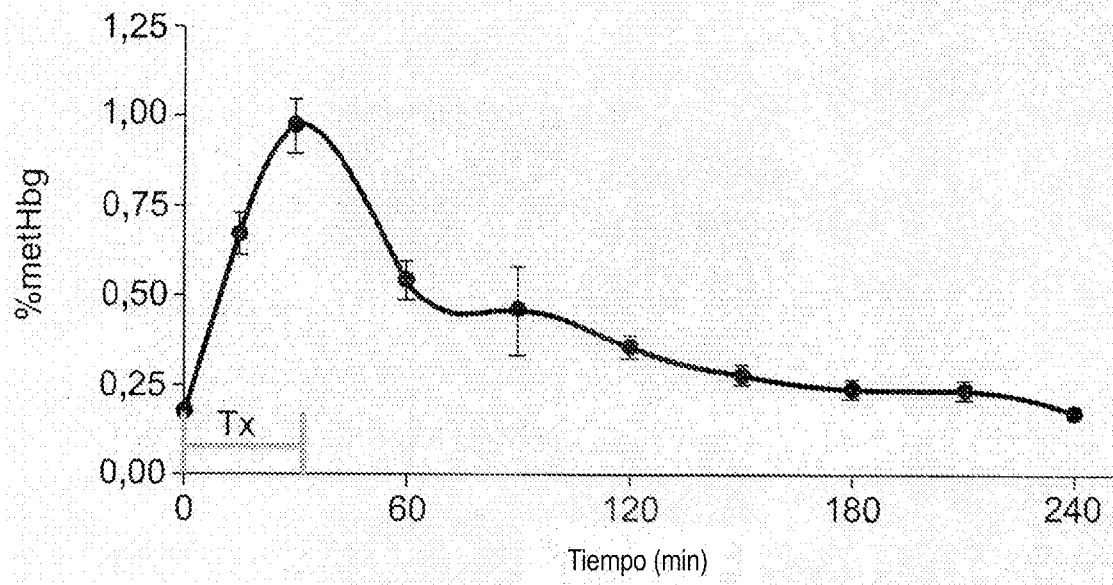


Figura 4A

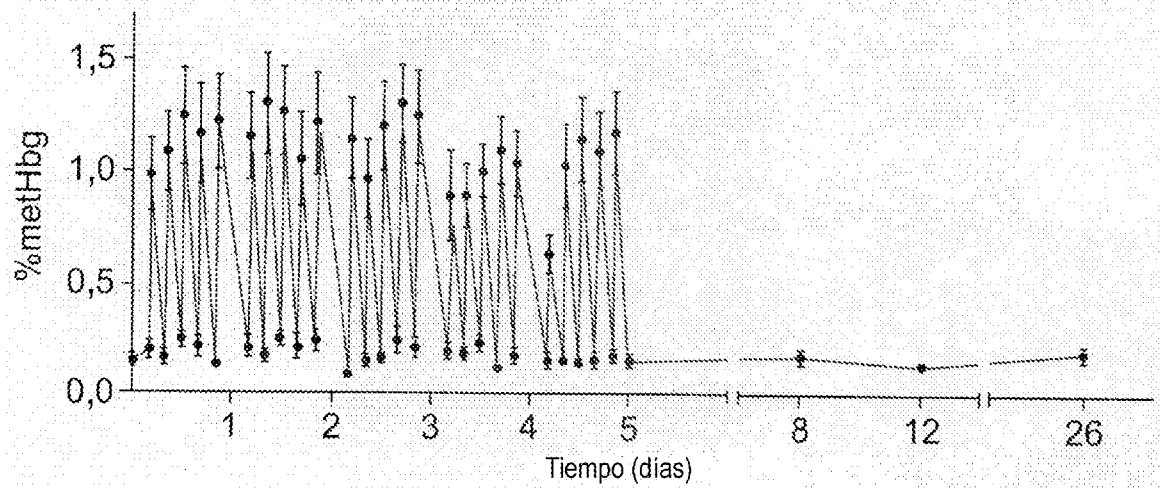


Figura 4B

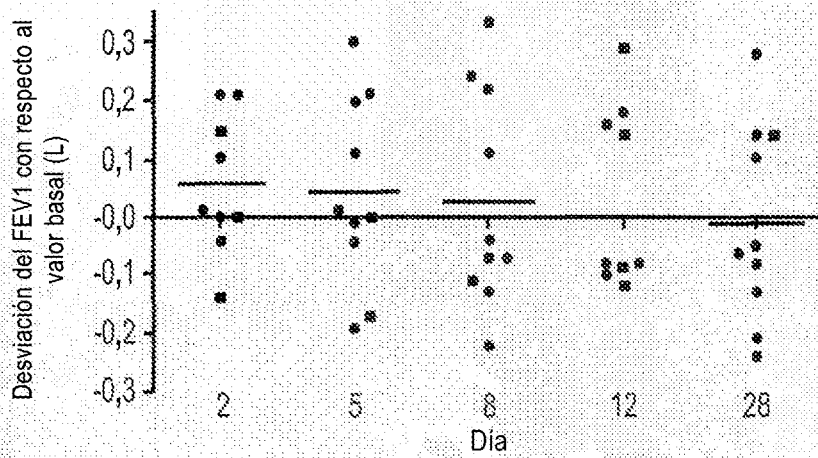


Figura 5A

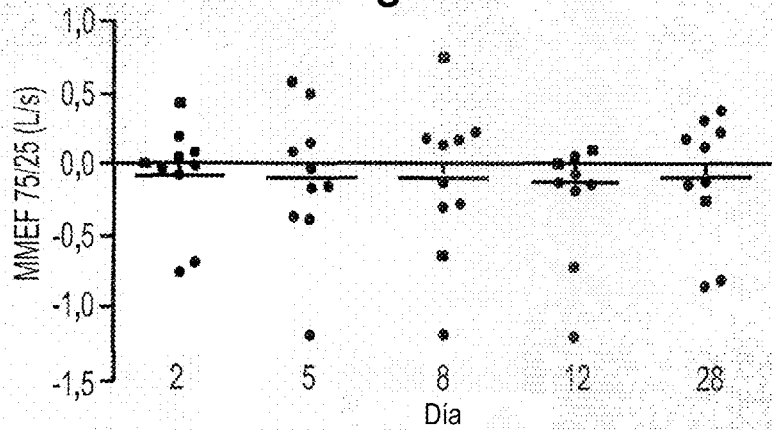


Figura 5B

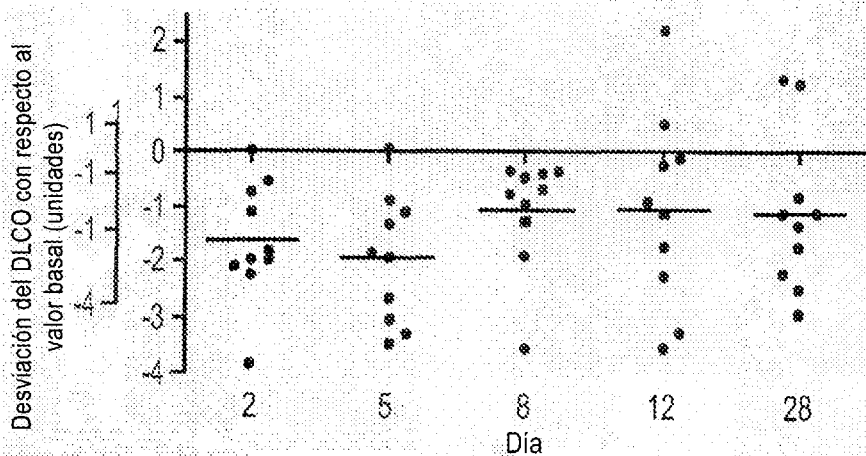


Figura 5C

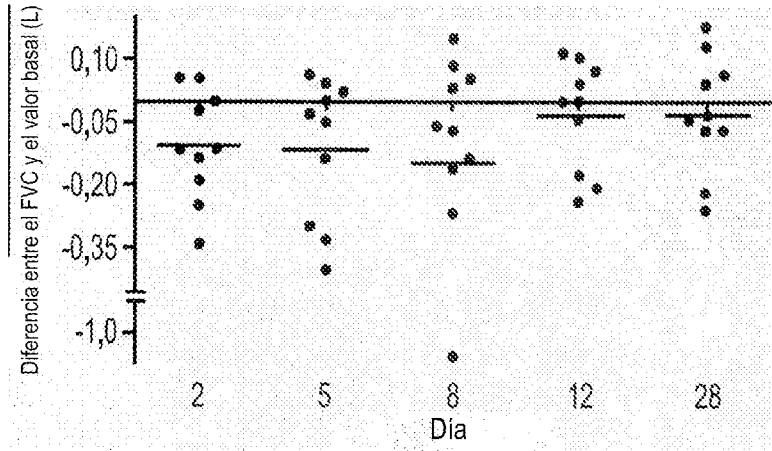


Figura 5D

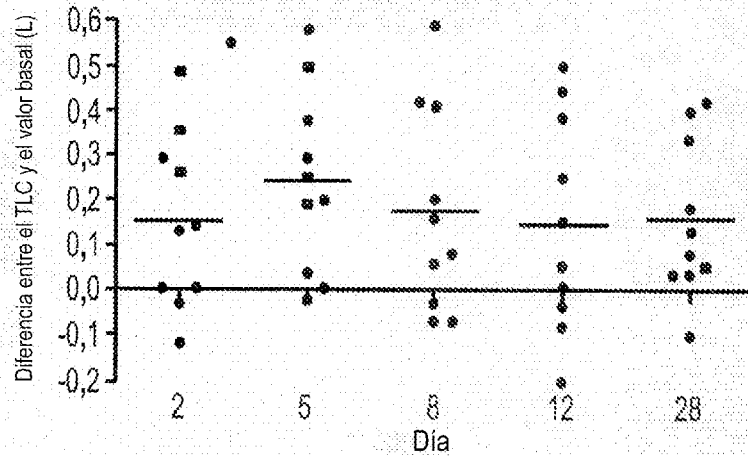


Figura 5E

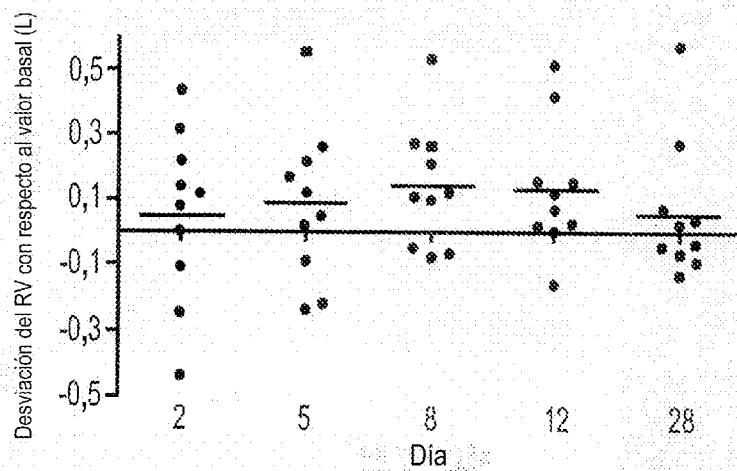


Figura 5F

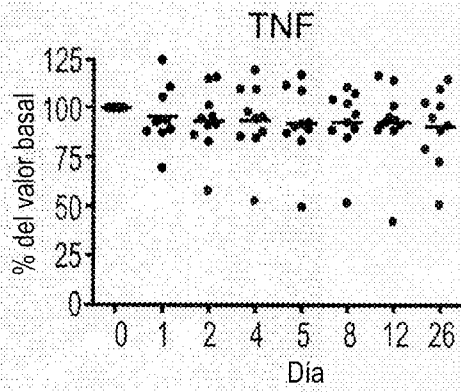


Figura 6A

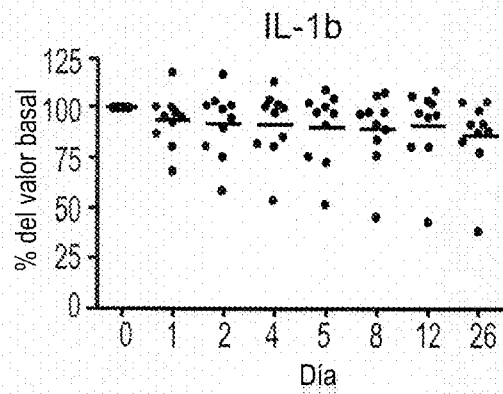


Figura 6B

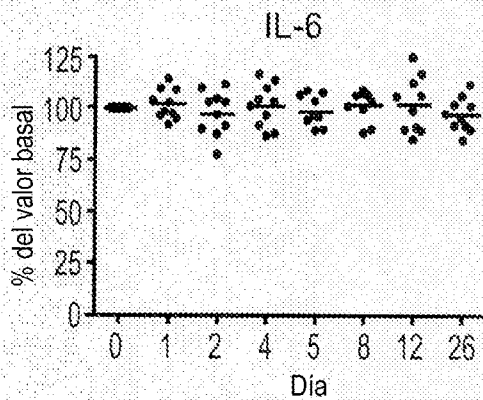


Figura 6C

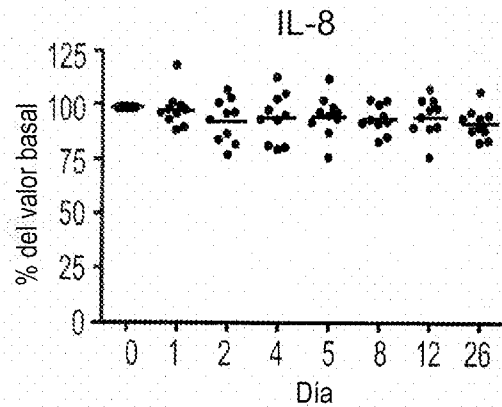


Figura 6D

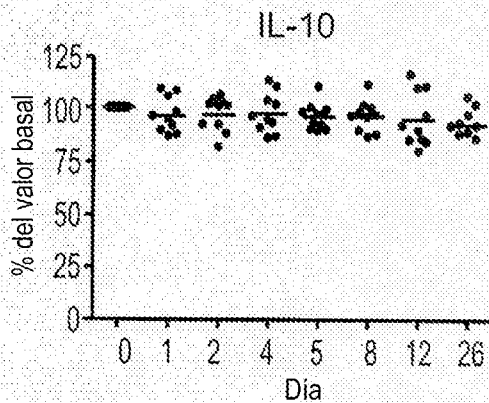


Figura 6E

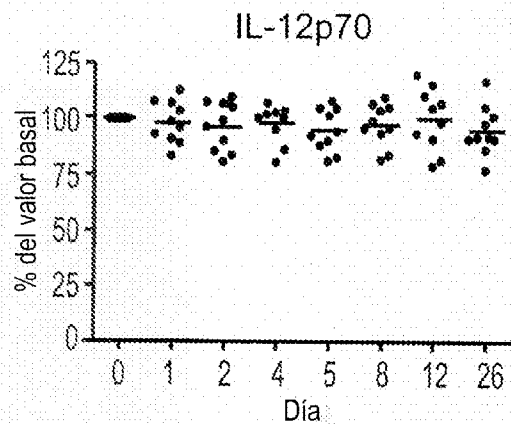


Figura 6F

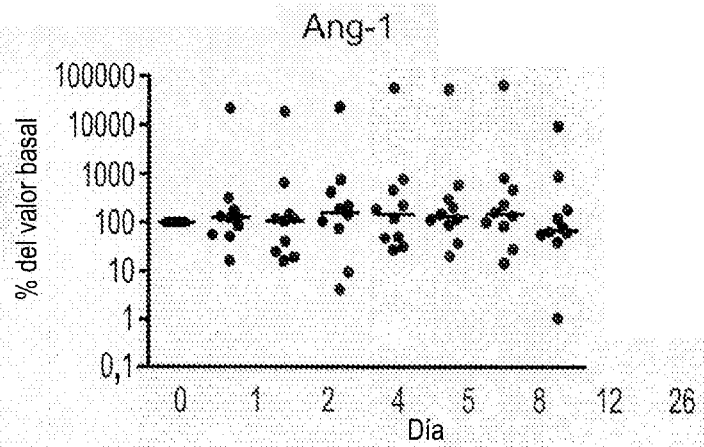


Figura 7A

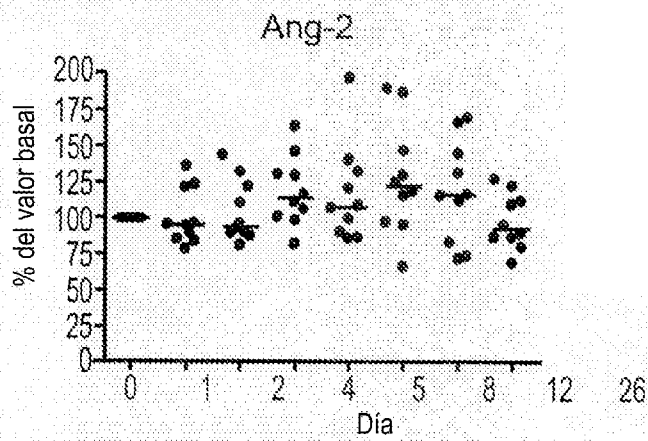


Figura 7B

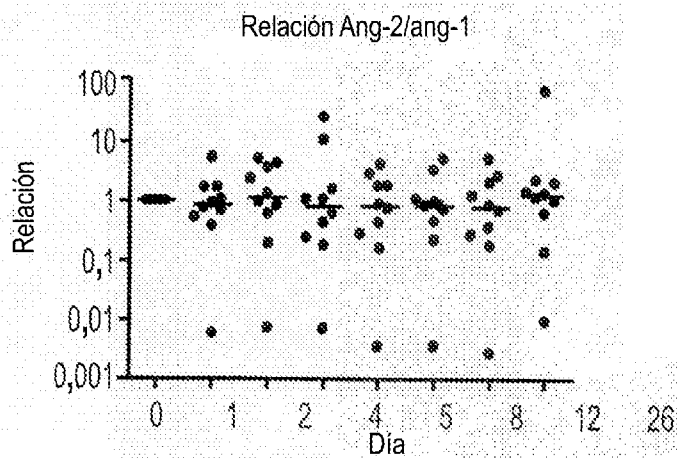


Figura 7C