

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5004391号
(P5004391)

(45) 発行日 平成24年8月22日(2012.8.22)

(24) 登録日 平成24年6月1日(2012.6.1)

(51) Int. Cl.	F 1	
A 6 1 K 31/21	(2006.01)	A 6 1 K 31/21
A 6 1 P 7/06	(2006.01)	A 6 1 P 7/06
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 P 9/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/12

請求項の数 3 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2001-521381 (P2001-521381)	(73) 特許権者	507189666
(86) (22) 出願日	平成12年8月18日(2000.8.18)		デューク ユニバーシティ
(65) 公表番号	特表2003-524630 (P2003-524630A)		アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
(43) 公表日	平成15年8月19日(2003.8.19)		7705, ダラム, アーウィン ロード
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/020784		2812 スイート 306
(87) 国際公開番号	W02001/017596	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成13年3月15日(2001.3.15)		弁理士 青山 稜
審査請求日	平成19年8月17日(2007.8.17)	(74) 代理人	100101454
(31) 優先権主張番号	09/390, 215		弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成11年9月8日(1999.9.8)	(74) 代理人	100106518
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 松谷 道子
前置審査		(74) 代理人	100067035
			弁理士 岩崎 光隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NO基化合物で心肺疾病を処置する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

アンギナ、心筋梗塞、心不全または高血圧である心臓障害の処置に使用するための、患者の肺に送達するのに適したガスとして治療有効量の亜硝酸エチルを含む、組成物。

【請求項2】

鎌状細胞疾病または広汎性血管内凝血(DIC)である血液障害の処置に使用するための、患者の肺に送達するのに適したガスとして治療有効量の亜硝酸エチルを含む、組成物。

【請求項3】

鎌状細胞疾病、アンギナ、心筋梗塞または心不全である組織酸素化の改善または血管拡張またはクローティングの阻害が必要な患者の障害の処置するための、患者の肺に送達するのに適したガスとして赤血球負荷有効量の亜硝酸エチルを含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、NO置換体を含む化合物の肺への送達による呼吸、心臓および血液障害の処置に関する。

【0002】

発明の背景

吸入性NOは、上昇肺血圧および低酸素状態と関係する肺障害を処置するために使用さ

れる。本処置方法は、ヘモグロビンによる吸入性NOの急速なトラッピングのために、灌流および局所効果によく適合した分布を提供する。さらに、本処置方法は、ガスの投与に慣れている麻酔医または救命救急内科医によって容易に実施され得る。副作用は、NO₂または他の毒性NO_xを生成するNOの酸素または反応性の酸素種類との反応を含み、その毒性は、炎症、気道過反応性、出血、臨床的改善の遅延、腎臓障害または死、および、例えば、メトヘモグロビンの形成によりその酸素送達機能を妨害するオキシヘモグロビンとの反応によって顕在化される。

【0003】

吸入性NOガスの別形は、噴霧性NOドナーであり、ここで当該NOドナーは固体粒子として、または液体の粒子として存在する。この別形はNOの投与と関係するNO₂/NO_x毒性問題を十分に回避することができないが、吸入性NOよりより長く持続する効果を生じ得る。肺における分布は粒子サイズに依存し、そして灌流には適さず、したがっていくつかのNOドナーは、血液または小さい気道に到達しない場所に付着する。一般的な場合に、これらのNO化合物は、肺の効果よりも大きい全身性平滑筋弛緩効果を有し、それによって肺障害を処置するための利用が制限されている。

10

【0004】

さらに、この方法は、麻酔医によって容易に実施できるものではない。なぜなら、麻酔医は通常はエアロゾルまたはパウダーを投与しないからである。さらに、ある種のNOドナーは、さらなる毒性を有し、すなわち、それらはNOには関連しないが、しかし代わりにそのNOが結合している基、またはそのNOが生成される基に関連する毒性を有する。噴霧性NOドナーを投与する不利な点は、吸入性ガス状NOが、吸入性液体または吸入性固体NO放出性化合物を上回る使用のために是認されている事実によって明瞭に説明される。

20

【0005】

肺血管収縮および喘息を処置するための、吸入性NOの使用およびエアロゾルにおける固体または液体として吸入される一酸化窒素放出性化合物の使用は、Zapoli U.S.Patent No. 5,823,180に記載されている。

【0006】

発明の要約

ここでの発明構成の目的は、NO使用と関係する毒性を有しないガスの肺への投与による選択的肺血管拡張および低酸素状態の軽減効果を提供することである。

30

【0007】

ここでの発明構成の目的は、ヘモグロビンの酸素送達機能を妨害することなくガスを肺へ投与することによって、NO/SNOを全身的に送達することである。この本発明構成の目的はまた、改善された、そして/または新規のNOドナー/放出性機能をヘモグロビンに与えることである。

【0008】

更なる目的は、ある種のクラスのNOドナーと関係する毒性(特異性の喪失)なく、NO/SNOを送達することである。

【0009】

第1の態様である、ここでのある態様は、低酸素状態および/または肺の平滑筋収縮および/またはそのような障害を有する患者における肺の炎症と関係する肺障害を処置するための方法であり、当該方法は、当該患者の肺にガスとして治療有効量の化合物であって、NO基を有し、そして低酸素状態軽減効果および平滑筋収縮軽減効果および/または抗炎症性または炎症防御効果を有しており、当該NO基が当該化合物に結合され、したがってそれは、体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下でNO₂またはNO_xを形成せず、または全身血圧への妥協(compromise)がない化合物を送達することを含む。

40

【0010】

第2の態様である、ここでの別の態様は、虚血、ポンプ不全および/またはそのような疾病を有する患者の後負荷増加を特徴とする心臓障害を処置する方法を指向し、当該方法は

50

、ヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基を有しており、当該NO基が当該化合物に結合され、したがってそれは体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下でNO₂またはNO_xを形成しない化合物の治療有効量を、当該患者の肺にガスとして送達することを含み、その肺への送達によって全身性効果を生じるが、血圧妥協はない。

【0011】

第3の態様である、ここでのなおさらなる態様は、血液障害を有する患者のNOによる処置によって改善される血液障害を処置する方法を指向し、当該方法はヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基を有しており、当該NO基が当該化合物に結合され、したがってそれが体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下でNO₂またはNO_xを形成しない化合物の治療有効量を、当該患者の肺にガスとして送達することを含み、その肺への送達が望まれる全身性効果を生じる。

10

【0012】

第4の態様である、ここでのなおさらなる態様は、組織酸素化の改善または血管の拡張またはクロットリングの阻害(酸素化、血流および/または血液の低粘稠化の改善)の必要のある患者を処置する方法を指向し、当該方法は、患者において治療有効量のニトロシル化されたヘモグロビンで負荷された赤血球細胞を与えることを含み、それによって酸素送達または血流の改善を生じる。

【0013】

ニトロシル化されたヘモグロビンで負荷された赤血球細胞を、下記要素を含む方法によって患者に与えることができる。例えば、(1)ヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基を有しており、当該NO基が当該化合物に結合され、したがってそれが体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下でNO₂またはNO_xを形成しない化合物の、血液中のニトロシル化されたヘモグロビンの測定によって決定される赤血球細胞負荷有効量を送達すること；(2)ヘモグロビンのシステインと優先的に反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基を有しており、当該NO基が当該化合物に結合され、したがってそれが体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下でNO₂またはNO_xを形成しない化合物の溶液を患者に点滴し、その量はニトロシル化されたヘモグロビンで患者の赤血球細胞を負荷するが、心収縮期血圧を90以下に低下させるには不十分である；そして(3)ニトロシル化されたヘモグロビンで負荷された赤血球細胞を含む血液を患者に輸血すること。

20

30

【0014】

第1、第2および第3の態様および第4の態様の(1)において有用である化合物の例は、亜硝酸エチルであり、これはO-ニトロソエタノールとしても知られ、ガス状形態で使用される。

【0015】

ここでの態様の有利な点は；(1)NOが投与されるときNO₂/NO_x形成によって生じる毒性の排除；(2)NO₂/NO_xを生成させることなくNO基を含む化合物を酸素と共に投与する選択性；(3)ここで投与される化合物はヘモグロビンのヘムと反応せず、したがってメトヘモグロビンの血液中の生理学的レベルは血液中で5%より小さいから、ヘモグロビンの酸素担持機能を妨害しない点；(4)投与される化合物がヘモグロビンのシステインと反応するとき、NO生物活性が保存されている；(5)遊離NOまたは噴霧性一酸化窒素放出性化合物液体または固体よりもNO基によってヘモグロビンシステインを負荷することにおいてより効率的で、そして選択的であること；

40

【0016】

(6)血液灌流へのベンチレーションに適合させることを含むガスの投与と関係する有利な点(理想的分布)、溶液の通常全身性投与と比較して比較的局在化される肺効果、および投与が実施される手法との麻酔医との馴染み；(6)投与がNOの投与のために使用される非常に高価な機械ではなくベンチレーターを使用して実施できることによる、より高価ではない投与；(7)NOを投与するときリバウンドなく、またはより低リバウン

50

ドでの酸素化の改善；(8) NOの投与に应答しない一部の患者が亜硝酸エチルの投与に应答する；(9) 心拍出力が改善し、一方、これはNOを投与するときには当てはまらない；(10) 低血圧の発生の危険のない酸素送達の改善（肺における効果が全身性効果より大きく、しかし、全身性効果が酸素要求に比例して発生する）；および(11) 内在性ニトロソグルタチオンプールを負荷すること。ガス状処置物質を使用する本発名の方法は、NOガス吸入および噴霧性一酸化窒素放出性化合物投与（これらの既知の方法と関係する不利な点を最小化しつつ）の両方の利点を維持する。

【0017】

ここで使用されている、用語「 NO_x 」は、NO、 N_2O_3 、 N_2O_4 、 OONO^- 、 OONO およびそれらの相互作用またはNOまたは NO_2 とそれらの反応の任意の産物を意味する。

10

ここで使用されるように、用語「反応性酸素種」は、一重項酸素、スーパーオキシド、過酸化水素またはヒドロキシルラジカルである。

ここで使用されている、用語「低酸素状態」は、正常に比較した低血液酸素含量、すなわち室空気を呼吸しているヒトの動脈血における95%より小さいヘモグロビン飽和および90より小さい PaO_2 を意味する。

【0018】

ここで使用されている、用語「 PaO_2 」は、動脈血液におけるガスの酸素の分圧を意味する。

ここで使用されている、用語「ニトロシル化されたヘモグロビンで負荷された赤血球細胞」は、ベースライン上方100ナノモルないし10マイクロモルのニトロシル化されたヘモグロビンを含む赤血球細胞を意味し、好ましくはベースライン上方100ナノモルないし1マイクロモルである。赤血球細胞において、ニトロシル化されたヘモグロビンはニトロソグルタチオンと平衡である。

20

ここで使用されている、用語「リバウンド (rebound)」は、処置による血中酸素濃度の増加または肺血管圧/抵抗の低下の後に起こる血中酸素濃度の低下または肺動脈圧または抵抗性の増大を意味し、その程度は血中酸素濃度または肺性高血圧に関して使用されるときは少なくとも10%であり、一般には処置後の改善からの低下を意味する。

【0019】

他の態様は以下の通りである。

30

第5の態様である、あるさらなる態様は、体外で、ニトロシル化されたヘモグロビンで負荷された赤血球細胞を示す。

第6の態様である、別のさらなる態様は、気道内液 (airway lining fluid) のニトロソグルタチオンの濃度を増加させる薬物のスクリーニングの方法を示し、これは、モデル動物の肺へガス形態の候補薬物を投与すること、その動物から気道内液をサンプリングすること、そしてサンプリングによって得られた試料中のニトロソグルタチオンを検定することを含む。

【0020】

図面の簡単な説明

図1は、3用量の亜硝酸エチルガスについての肺動脈圧力のグラフを示し、そして実施例Iの結果を示す。

40

図2は、3用量の亜硝酸エチルガスについての肺血管抵抗性のグラフを示し、そして実施例Iの結果を示す。

図3は、3用量の亜硝酸エチルガスについての肺動脈流のグラフを示し、そして実施例Iの結果を示す。

図4は、2用量の亜硝酸エチルガスについての心拍出力のグラフを示し、そして実施例Iの結果を示す。

図5は、3用量の亜硝酸エチルガスについての平均血圧のグラフを示し、そして実施例Iの結果を示す。

【0021】

50

図6は、3用量の亜硝酸エチルガスについての心拍数(heart rate)のグラフを示し、そして実施例Iの結果を示す。

図7は、75ppmでの実施例Iのベンチレーションシステムを經由して送達された亜硝酸エチルガスにおけるガスクロマトグラフィー/マススペクトル分析結果を示す。

図8は、無処置での、亜硝酸エチル(EtONO)での処置での、ポストEtONO処置、NOでの処置での、そしてポストNO処置のPaO₂(すなわちPaO₂)レベルのグラフを示し、そして実施例XIIの結果を示す。

図9は、無処置での、亜硝酸エチル(EtONO)での処置での、ポストEtONO処置、NOでの処置での、そしてポストNO処置の心拍出力の変化のグラフを示し、そして実施例XIIの結果を示す。

図10は、吸入性NOに対する吸入性EtNO(亜硝酸エチル)のppmでの気道SNO(ニトロソグルタチオン)における増加倍数のグラフを示し、そして実施例XIVの結果を示す。

図11A、11B、11Cおよび11Dは、時間に対する張力(tension)のグラフであり、そして実施例XVの結果を示す。

【0022】

発明の詳細な記載

ここで我々は、肺の平滑筋収縮および/または低酸素状態および/またはそのような障害を有する患者の肺の炎症と関係する肺障害を処置するための方法を示し、当該方法は、治療有効量の、NO基を有し、そして当該NO基によって低酸素状態回復効果および平滑筋収縮回復効果および抗炎症性または炎症防御効果を有する化合物をガスとして当該患者の肺に送達することを含み、当該NO基は当該化合物に結合されており、したがってそれは体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下、NO₂またはNO_xを形成したり、または全身性血圧受協効果を生じない。

【0023】

この方法によって処置可能な肺障害は、例えば、ヒト新生児の難治性肺性高血圧およびヒト成人の原発性および二次性肺性高血圧、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、喘息、嚢胞性線維症および呼吸不全を含む。

【0024】

肺性高血圧は肺の平滑筋収縮と関係し、そしてそれは低酸素状態と関係することができる。

【0025】

ARDSは血液中の低酸素含量と関係するX線診断可能病態(radiographic manifestation)であり、そして典型的にはまた上昇した肺圧を示す。酸素遊離ラジカル損傷が病理生理学的に寄与する。遊離のNOは、酸素遊離ラジカルと反応することによって損傷を悪化させ、反応の毒性産物(すなわちそれらは組織を損傷する)を形成するが、本発明で投与される化合物は酸素遊離ラジカルと反応しないので、この効果を有しない。吸入性NOは罹病率および致死率の増加を来すことが示されている。この障害は低酸素状態と関係し、そしてそれは肺の平滑筋収縮と関係することが有り得る。

【0026】

喘息は肺の平滑筋収縮と関係し、そして低酸素状態と関係し得る。

嚢胞性線維症は肺の平滑筋収縮と関係し、そして低酸素状態と関係し得る。

【0027】

ここで、我々は、NO基を有し、そして当該NO基(当該化合物に結合されている)によって低酸素状態回復および平滑筋収縮回復効果および抗炎症または炎症防御効果を有する化合物を示す。これらの化合物は、NOより体温温度において酸素または酸素遊離ラジカルとの反応性がより小さく、そしてNOよりもより強力に抗微生物性である。これらの化合物は、例えば、式RX-NO_y(ここで、Rは存在しないか、または水素/プロトン、またはC₁-C₇-アルキルであり、そしてXは酸素、硫黄、窒素または例えば鉄、銅、ルテニウムおよびコバルト原子からなる群より選択される金属、またはアルキルまたはア

10

20

30

40

50

ルケニルまたはアルキルチオまたはアルケニルチオ基であって1ないし7個（例えば1ないし6個）の炭素原子（直鎖または分枝）を含むもの、 CF_3 -および CF_3S -であり、そしてyは1または2である）を有するものを含む。ただし二酸化窒素および NO_x を除く。

【0028】

ここでの使用のための特異的な処置物質は、例えば、亜硝酸エチル（それはここでの実施例において使用される）、硝酸メチル、硝酸tert-ブチル、硝酸イソアミル、トリフルオロニトロソメタン（ CF_3NO ）、 CF_3SNO 、 CH_3SNO 、 $CH_2=CHSNO$ 、 $CH_2=CHCH_2SNO$ 、 $ONSCH_2-CH_2-CH_2SNO$ および $CH_3CH_2CH_2SNO$ を含む。硝酸アルキルはLandscheidt et al. U.S. Patent No. 5,412,147に記載されたように調製することができる。亜硝酸エチルは商業的に例えば、エタノールに希釈して入手可能である。 CF_3NO は商業的製品であり、またはJ. Phys. Chem. 100, 10641 (1996)に記載されたように CF_3I と NO^- の処理によって製造することができる。脂肪族チオ亜硝酸、すなわち $RSNO$ の形態の化合物（ここで、Rはアルキルまたはアルケニルまたは水素を示す）、対応するチオールを NO^+ 源（1以上の次のもの：亜硝酸tert-ブチル、亜硝酸エチル、ニトロソニウムテトラフルオボレート（ $NOBF_4$ ）、ニトロソニウム過塩素酸塩（ $NOClO_4$ ）、ニトロソニウム硫酸水素塩（ $NOHSO_4$ ）、ニトロソニウムリン酸水素塩（ NOH_2PO_4 ）、または亜硝酸ナトリウムのHCl性酸性溶液を含むがこれらに限定されない）で処理することによって製造することができる。

【0029】

ここで我々は、これらの化合物を投与することについて述べる。通常ガスであるものは、窒素または他の不活性ガスに希釈して容易に投与され、そして酸素と混合して投与されることができる。通常ガスでないものは、投与のためにガスに変換され、そして通常ガスであるNO含有化合物の場合におけるように希釈して投与される。希釈された形態におけるガスとしてそれらを維持するために要求される温度が肺を害するような沸点を当該化合物は有してはならず、そして好ましくは肺において濃縮しない。

【0030】

例えば、1ないし100ppmの濃度への希釈は典型的には適切である。希釈されたガスは、患者の肺へのガスの投与のための通常の装置であるベンチレーターを使用して肺に容易に送達される。当該装置に付属されたチューブは90mmHgの PaO_2 を維持する一定の速度および圧力で肺にガスを送入する。投与の期間は典型的には1分ないし2日またはより多い日数の範囲であり、そして投与は症候暖解まで実施される。投与はまたフェイスマスクを使用して実施されることができる。

【0031】

先に指摘したように、治療有効量を投与する。これは低酸素状態回復に有効性で、そして平滑筋収縮回復、そして抗炎症性または炎症防御に（対して）有効な量である。投与は症候緩解に十分な長さで実施される。投与形態は患者ごとに異なる。投与の上で、結果を用量の変化と共に記録し、その後最良の結果が達成された用量を好ましくは使用する。最も有効な用量は試行されたいくつかの用量より低いことがある。従って、用量の増量を試して、増加させた用量がより低い改善をもたらしたら、より有効なより低い用量が処方されるべきである。理想的な用量はベンチレーションから灌流までに適合する。

【0032】

亜硝酸エチルは、ガス状形態において患者に容易に送達され、この際エタノールで希釈された亜硝酸エチル（例えば、0.00125ないし0.5%（v/v）亜硝酸エチルのエタノール溶液、好ましくは0.0025ないし0.125%（v/v）亜硝酸エチルのエタノール溶液）を収容したMilliganガスデフューザーを通して、 N_2 または O_2 を、例えば、0.5リットル/分ないし1.5リットル/分の流速で通気し、亜硝酸エチルを含む N_2 または O_2 を生成して、そして例えば、ベンチレーターからの排気を当該亜硝酸エチルを含む N_2 または O_2 とトータルで5ないし15リットル/分で混合することによって

10

20

30

40

50

ベンチレーションシステムにこれを導入し、得られたガスにおける1ないし100ppmのある濃度の亜硝酸エチルを調製し、そしてこれを患者に、90mmHgの P_{aO_2} を維持し、または P_{aO_2} を改善し、または肺血管抵抗性を減少させる速度および圧力で送達する。投与される亜硝酸エチルガスの濃度は、 N_2 または O_2 の流速およびエタノール中の亜硝酸エチル液の濃度に比例する。

【0033】

NOの投与と比較して亜硝酸エチルを使用する処置の利点は、亜硝酸エチルの投与に新しい装置を必要とせず、一方、NOを投与するためには数万ドルもかかる機械が必要であることである。したがって、NOを投与するよりもより亜硝酸エチルを投与するほうが廉価である。

10

【0034】

さらに、亜硝酸エチルの使用は、NOの投与に伴う毒性の NO_2 および NO_x の生成がなく、そしてNOの投与で特徴的に起こる、一旦投与が中止されたときの、より低い酸素濃度またはより高い肺圧力へのリバウンドなく、酸素化を改善する。

【0035】

さらに、亜硝酸エチルの投与は疾病において心拍出力の低下を阻止する。これはNOの投与では起こらない。

さらに、亜硝酸エチルの投与はヘモグロビンのシステインに結合するNOの濃度を上昇させる点でNOの投与よりもより優れている。

述べられたメカニズムに縛られないが、ニトロソグルタチオン負荷（それは気道内液中のニトロソグルタチオンの増加である）は、投与が停止された後のより低いレベルへのリバウンドがない酸素化、そして心拍出力の低下の阻止の原因であると考えられる。亜硝酸エチルの投与はグルタチオン負荷を生じ、一方NOの投与はこれを生じない。

20

【0036】

NOと比較して亜硝酸エチルの他の利点は、NOと異なり、酸素中で投与することができることである。NOは、酸素中で安定ではなく、そして呼気 O_2 濃度を希釈する窒素基剤中で投与されなければならない。このために、吸入NOガスを与えられている患者は、95%よりもより高濃度の O_2 の濃度を投与することができない。対照的に、亜硝酸エチルは100% O_2 と共に投与することができ、そして酸素濃度を全く希釈化せず、したがって吸入亜硝酸エチルを投与されている患者は、吸入NOを与えられている患者よりもより高濃度の酸素を投与され得る。したがって、難治性肺性高血圧の処置において、100% 酸素を必要とする新生児は、亜硝酸エチルを投与されるとき、100% 酸素状態を継続することができ、一方、NOを投与されるとき、酸素の最終吸気濃度は低下する。

30

【0037】

NOが難治性肺性高血圧を有する新生児を処置するために使用されるとき、処置は高価であり、 NO_2 および NO_x 形成または肺血管抵抗を監視する必要があり、メトヘモグロビンが形成され、そして改善された血液酸素濃度のいずれの場合においても、リバウンドがある。NOを用いた場合、何らかの応急処置がされなければ、25%の患者において血液動態失調が現れる。これらのすべての場合において亜硝酸エチル投与の利点があり、そして血液動態失調の問題またはリバウンドがない。さらに、新生児の一部は、亜硝酸エチルに対して応答し、NOの投与に対して応答しない。さらに、心拍出力は亜硝酸エチル投与によって改善されるが、NOの投与によっては改善されない。

40

【0038】

ここで、我々は、虚血、ポンプ不全および/またはそのような障害を有する患者における後負荷増加を特徴とする心臓障害を処置する方法を示し、当該方法は、ヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解する、そしてNO基を有しており、当該NO基は当該化合物に結合され、したがってそれは体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下、 NO_2 または NO_x を形成しない、化合物の治療的有効量を、当該患者の肺にガスとして送達することを含む。

【0039】

50

この方法によって処置可能な心臓障害は、アンギナ、心筋梗塞、心不全および高血圧を含む。

【0040】

高血圧を処置する場合において、投与されるNO基含有化合物は、下記の様にヘモグロビンのシステインと反応するもの、例えば亜硝酸エチルであり、そしてチオールもまた全身的に、または吸入性経路で投与され、ヘモグロビンのシステインへの結合からNOの全身的放出を促進することが要求される。他の心臓障害を処置する場合において、ここで、投与されるNO含有化合物はヘモグロビンのシステインと反応するもの、例えば亜硝酸エチルであり、必要に応じて、チオールもまた全身的に（例えば静脈内に、または経口的に、または噴霧により）、または吸入経路によって投与され、ヘモグロビンのシステインへの結合からNOの全身的放出を起こす。

10

【0041】

適当なチオールは、例えば、N - アセチルシステイン（投与量、例えば、静脈内に50ないし200mg / kgの範囲または経口的に600mg、1日3回またはFDA承認PDR投与量にしたがって噴霧され、好ましくは静脈内または噴霧による投与経路によって）、グルタチオン（投与量、例えば、静脈内の好ましい投与経路によって、50ないし200mg / kgの範囲）、およびシステイニルグリシン（投与量、例えば、静脈内の好ましい投与経路によって、50ないし200mg / kgの範囲）を含む。

【0042】

ここで我々は、心臓障害を処置するためのここでの方法における使用のための、ヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基を有する化合物について述べる。当該NO基は当該化合物に結合され、したがってそれは体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下、NO₂またはNO_xを形成しない。これらの化合物は、例えば、前記のような式RX - NO_yを有するもの、および前記のこのクラスの種類（亜硝酸エチルは以下の実施例において使用される）を含む；前記の様に、通常ガスではないこれらの化合物、すなわち、室温および体温温度においてガスではない化合物が、投与のためにガスに変換される。

20

【0043】

前記の肺障害を処置する方法に適用可能なNO含有化合物の濃度および投与の方法は、心臓障害を処置するためのここでの方法に適用可能である。

30

【0044】

先に指摘したように、ガス形態の治療有効量のNO含有化合物を、心臓障害を処置するためのここでの方法において投与する。これはアンギナに対しては胸部疼痛軽減有効量、心筋梗塞に対しては心不全解消有効量、心不全に対しては肺圧減少および末梢血管抵抗減少有効量および高血圧に対しては血圧低下有効量である。もっとも有効な投与量は患者ごとに変化し、したがって各病例に複数の投与量を試み、それから最良の結果が達成された投与量を利用することが好ましい。

【0045】

心臓障害を処置するための亜硝酸エチルの投与のために、肺障害を処置するために前記したのと同じ濃度および投与の方法が、適用可能である。亜硝酸エチルが投与されるとき、リバウンドなく改善がある。

40

【0046】

ここで我々は、血液障害を有する患者における血液障害を処置するための方法について述べる。当該方法は、ヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基を有し、当該NO基は当該化合物に結合され、したがってそれは体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下、NO₂またはNO_xを形成しない、治療有効量の化合物を、当該患者の肺にガスとして投与することを含む。

【0047】

当該血液障害はNOまたは関連する分子での処置によって緩解されるものであり、すなわち、ここで、NOは赤血球細胞の形状を正常に変化させ、またはそれらの機能を正常に復

50

帰させ、または血液または血液血小板凝固の溶解を生じる。これらは鎌状細胞疾病および広汎性血管内凝血（DIC）、心臓発作、発作およびCoumadinプロッキングタンパク質Cおよびタンパク質Sによって引き起こされるCoumadin誘導性クロッティングを含むクロッティング疾病を含む。

【0048】

ここで我々は、血液障害を処置するための本明細書の方法において使用される、ヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基（それは当該化合物に結合され、したがってそれは体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下、NO₂またはNO_xを形成しない）を有する化合物を示す。これらの化合物は、心臓障害を処置するために記載したものと同じであり、そして例えば、前記の式RX-NO_yを有するもの、および前記のこのクラスの種類（亜硝酸エチルが本明細書の実施例において使用される）を含む；前記の様に、通常ガスでないこれらの化合物は、投与のためにガス形態に変換される。

10

【0049】

NO含有化合物の濃度および前記の肺障害の処置のための方法に適用可能な投与の方法は、血液障害を処置するためのここでの方法に適用可能である。

【0050】

先に指摘したように、ガス形態の治療有効量のNO含有化合物を、血液障害を処置するためのここでの方法において投与する。これは赤血球細胞形状の復帰、および/または鎌状細胞疾病および凝固溶解について赤血球細胞機能復帰有効量、および/またはクロッティング障害について凝固形成防止量である。もっとも有効な投与量は患者ごとに変化し、したがって各病例に複数の投与量を試み、それから最良の結果が達成された投与量を利用することが好ましい。

20

【0051】

血液障害を処置するために投与されるNO基含有化合物は、ヘモグロビンのシステインと反応するものである場合、NO基含有化合物をチオールと組み合わせて投与することが有利であり、ヘモグロビンのシステインへの結合からNOの全身的放出を生じる。適当なチオール類、投与量および投与の経路は前記チオール類について記載したとおりである。

【0052】

血液障害を処置するための亜硝酸エチルの投与には、肺障害を処置するための先に記載したのと、同じ投与の濃度および方法が適用可能である。

30

【0053】

ここで我々は、組織酸素化の改善、血管拡張またはクロッティング阻害の必要がある患者を処置する方法に関する態様について述べる。当該方法は、当該患者に治療有効量の、ニトロシル化されたヘモグロビンで負荷された赤血球細胞を、酸素化または血流の改善を生じるように与えることを含む。

【0054】

この方法は、例えば、鎌状細胞疾病および虚血性障害、例えば、アンギナ、心臓発作または発作に罹患した患者を処置することに適用可能である。

【0055】

先に指摘したように、ある事例においては、ヘモグロビンで負荷された赤血球細胞が、次のような方法で患者に与えられる。当該方法は、ヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基を有しており、当該NO基は当該化合物に結合され、したがってそれは体温温度では酸素または反応性酸素種の存在下、NO₂またはNO_xを形成しない化合物の、血液中のニトロシル化されたヘモグロビンの測定によって決定される赤血球細胞負荷有効量を、当該患者の肺にガスとして送達することを含む。上記の事例は、以下の記載で、第4態様の第1事例として引用する。

40

【0056】

ここで我々は、第4態様の第1事例の方法で使用する、ヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基を有し、当該NO基は当該化合物に結合

50

され、したがってそれは体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下、 NO_2 または NO_x を形成しない化合物について述べる。これらの化合物は、心臓障害を処置するために、そして血液障害を処置するために記載したものと同じであり、そして例えば、前記の式 $\text{RX} - \text{NO}_y$ を有するもの、および前記のこのクラスの種類（亜硝酸エチルを含む）を含む；前記の様に、通常ガスでない場合のこれらの化合物は、投与のためにガス形態に変換される。

【0057】

前記の肺障害を処置する方法に適用可能なNO含有化合物の濃度および投与の方法は、第4態様の第1事例を処置するためのここでの方法に適用可能である。

第4態様の第1事例のための治療有効量は、酸素送達または血流増加または血液低粘稠化有効量である。

10

【0058】

第4態様の第1事例を処置するために投与されるNO基含有化合物は、ヘモグロビンのシステインと反応するものである場合、NO基含有化合物をチオールと組み合わせて投与することが有利であり、ヘモグロビンのシステインへの結合からNOの全身的放出を生じる。適当なチオール類、投与量および投与の経路は前記チオール類について記載したとおりである。

【0059】

第4態様の第1事例を処置するための亜硝酸エチルの投与のためには、肺障害を処置するために先に記載したのと同じ投与の濃度および方法が適用可能である。

20

血液中のニトロシル化されたヘモグロビンの測定は、Jia, L., et al., Nature, Vol. 380, 221-226(1996)に記載されたように実施することができる。

【0060】

先にさらに指摘したように、別の事例において、ヘモグロビンで負荷された赤血球細胞が、次に述べる方法によって患者に与えられる。当該方法は、当該患者に、ヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基を有する化合物の溶液を点滴することを含み、当該NO基は当該化合物に結合され、したがってそれは体温温度においては酸素または反応性酸素種の存在下、 NO_2 または NO_x を形成せず、患者の赤血球細胞にニトロシル化されたヘモグロビンで負荷するが、しかし心収縮血圧を90以下に低下させるには不十分である量である。液体として点滴されるとき、亜硝酸エチルは血圧の低下を生じるから、血圧についての制限が含まれる。以下、この場合を第4態様の第2事例と称する。

30

【0061】

第4態様の第2事例における使用のための化合物は、第4態様の第1事例で使用されたものと同じであってよいが、しかし第4態様の第1事例と異なり、それらはガスとして投与されるのではなく液体形態で点滴される。液体形態は溶媒、例えばプロトン性溶媒、例えば、アルコール中に溶解された化合物を投与することによって取得される。0.00125ないし0.5パーセント(v/v) 亜硝酸エチルを含むエタノール溶液を提供するためのエタノールに溶解された亜硝酸エチルは、第4態様の第2事例のために好ましい薬剤であり、そして当該溶液は、より好ましくは0.0025ないし0.125パーセント 亜硝酸エチル(v/v)を含有する。

40

【0062】

第4態様の第2事例のための治療有効量は、酸素化改善または血流改善有効量である。ヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解する化合物の溶液の投与は、好ましくは静脈内に実施される。

【0063】

処置のために投与されるNO基含有化合物がヘモグロビンのシステインと反応するものである場合、チオールと組み合わせてNO基含有化合物を投与し、ヘモグロビンのシステインへの結合からNOの全身的放出を生じることが有利である。適当なチオール、投与量、および静脈内に、経口的に、および噴霧化を含む投与の経路は、前記チオールと結び付けて

50

説明したものである。

【0064】

なおさらに先に指摘したように、さらなる場合において、ヘモグロビンで負荷された赤血球細胞は患者にある方法によって提供され、当該方法は、ニトロシル化されたヘモグロビンで負荷された赤血球細胞を含む血液を当該患者に輸血することを含む。ヘモグロビンで負荷された赤血球を含む血液は、血液を1分ないし1時間、例えば、1分ないし30分、25ないし37 で化合物とインキュベーションすることによって取得されることができ、そして当該化合物は、ヘモグロビンのシステインと反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基を有し、当該NO基は当該化合物に結合され、したがってそれは体温温度において反応性酸素種の酸素の存在下、NO₂またはNO_xを形成しない。

10

【0065】

当該化合物は、システインと反応し、そして/または血液に溶解し、そしてNO基を有する化合物について先に記載されたものと同じものであることができ、当該NO基は当該化合物に結合され、したがってそれは体温温度において酸素または反応性酸素種の存在下、NO₂またはNO_xを形成しない。インキュベーションは、血液を、0.00125ないし0.5% (v/v) 亜硝酸エチルを含む、好ましくは0.0025ないし0.125% (v/v) 亜硝酸エチルを含む亜硝酸エチルのエタノール溶液とインキュベーションすることによって好ましくは実施され、該インキュベーション中に存在する亜硝酸エチルのヘモグロビンに対する比が1:1000ないし10:1、好ましくは1:100ないし10:1の範囲である。以下、この場合を第4態様の第3事例と称する。

20

【0066】

好ましくは、チオールが、第4態様の第3事例のために共投与される。適当なチオール類、投与量および投与のための経路は、前記のチオール投与について記載したとおりである。

ニトロシル化されたヘモグロビンで負荷された赤血球細胞の治療有効量は、ベースライン上方0.1ないし1マイクロモルまたは当量に増加される、ニトロシル化されたヘモグロビンを有する血液の、0.1ないし3単位である。

【0067】

投与は好ましくは輸液によって実施される。

我々は、ここで体の外部においてニトロシル化されたヘモグロビンで負荷された赤血球細胞であるここでの態様を示す。これらは第4態様の第3事例において記載したように容易に作成される。

30

【0068】

我々は、ここで、気道内液におけるニトロソグルタチオンの濃度を増加させる薬物についてスクリーニングするためのここでの方法を示し、当該方法は、モデル動物の肺へガス形態の薬物を投与すること、気道内液をサンプリングすること、そしてサンプリングによって取得されたサンプルにおけるニトロソグルタチオンを検定することを含む。モデル動物は、例えば、新生仔ブタ、モルモット、ラットおよびイヌを含む。気道内液のサンプルは、気管支鏡検査法によって容易に取得される。サンプル中のニトロソグルタチオンについての検定は、例えば、Gaston, B., et al., PNAS, Vol. 90, 10957-10961 (1993)に記載されたように容易に実施される。ベースライン上方少なくとも50%のニトロソグルタチオンの増加を示すレベルは、ヒトを含む哺乳動物の気道内液のニトロソグルタチオンの濃度の増加のための薬物の候補を指摘している。

40

ここで本発明を以下の実施例によって説明するが限定しない。

【0069】

実施例I

本実験を、以下のように肺性高血圧のブタのモデルを使用して実施した。

混合系統2-3週齢仔ブタを利用した。最初の麻酔誘導をハロメタン 5%吸入により、動物が安定であったとき2%に減少させた。気管切開外科手術および頸静脈ラインの挿入の後、20 μg/kgのフェンタニール丸薬および0.2 mg/kgのアセプロマジン

50

与え、次いで継続的に $10 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{時間}$ のフェンタニール点滴を与えた。首の右側を切開し、外部頸静脈経由でカテーテルを右房に挿入し、それを經由して 5% グルコースの $30 \text{mL} / \text{kg} / \text{時間}$ の維持 $i.v.$ 流体を点滴した。心収縮動脈圧力 (SAP) の測定のために、カテーテルを頸動脈に配置した。

【0070】

気管切開手術の後、ハロタンを中止し、補助性ベンチレーションを開始し、そして45分ごとに臭化パンクロニウム ($0.1 \text{mg} / \text{kg}$) を使用して麻痺を取得した。さらにフェンタニール ($5 - 10 \mu\text{g} / \text{kg}$) の用量を必要に応じてボラス投与した。左開鏡術によって、6 - または 8 - mm 超音波フロープローブ (Transonic Inc., Rochester, New York) を、心拍出力の測定のために肺動脈の周りに位置させ、そして4 - ないし 6 - mm プローブを動脈管の周りに位置させた。肺動脈圧力 (PAP) の継続的測定のために 22 - ゲージカテーテルを肺動脈の根に、財布糸縫合 (purse string suture) を經由して挿入した。

10

【0071】

全身性および肺カテーテルを ECG シグナルとともに圧カトランスデューサーに接続し、新生仔モニター (Model 78833B, Hewlett Packard, Waltham, Massachusetts) 上にディスプレイした。全身性酸素飽和 (SaO_2) を、皮下パルス酸素濃度計 (N200, Nellcor Inc., Hayward, California) を使用して測定した。ピカルボネート ($i.v.$ 流体の $15 \text{mEq} / 100 \text{mL}$) の継続的な点滴を与え、低酸素状態の期間の重度のアシドーシス発生を防止した。心拍出力をキャリブレーションした超音波フロープローブの測定から決定した。

20

【0072】

この装着の後、動物を 20 分間休ませ (rest)、安定性 (それは 5 分の期間の心拍数、SAP、および PAP の 5% より小さい変化として定義される) を確保させた。そしてその後、吸気性の酸素濃度を 10 ないし 14% へ減少させ、 35 ないし 45% の標的 SaO_2 を生成することによって、低酸素状態を誘導した。低酸素状態の誘導の後、安定な低酸素状態のベースラインを取得した (2 分)。動脈血試料を血液ガスおよびメトヘモグロビンの測定のために取得した。

【0073】

亜硝酸エチル (EtONO) を、次いで、コンピューター - 作成したランダムシーケンスにしたがって、 EtONO 濃度を (固定流速で) 変化させることによって 1.5 、 15 または 75ppm の用量で投与し、ここで、同じレベルで部分吸気性酸素飽和 (fractional inspired oxygen saturation) (FiO_2) を維持する。亜硝酸エチルは、窒素亜硝酸エチル混合物をベンチレーションシステムに導入することによって (当該混合物とベンチレーターからの出力を混合することによって)、窒素とともに投与した。亜硝酸エチル窒素混合物を発生させ、これは 0.6 リットル / 分の流速でエタノール中に希釈した亜硝酸エチル (0.075% (v/v) 亜硝酸エチル) を含む Milligan ガスデフューザー (Fisher Scientific) によって窒素をバブリングし、亜硝酸エチルを含む窒素を発生させ、次いで 6 リットル / 分の流速のガス導入を有するベンチレーターにおいて混合することによった。

30

40

【0074】

投与されるべきガスにおける亜硝酸エチルの濃度は、Milligan ガスデフューザーへの窒素のフローおよび / またはエタノール中の亜硝酸エチルの濃度に直接的に比例的である。PAP、 SaO_2 、SAP、または心拍出力のさらなる変化がなかったとき、測定を各用量で取得し、そしてシグナルを 1 分間記録した。この時点で、 EtONO 投与を中断した。ポスト EtONO データは EtONO 中断の 4 分後のサンプルからのものであり、そしてパラメーターが安定したと測定されたときに (ポスト EtONO サンプルの約 4 分後)、最終ベースラインサンプルを取得した。この手法を、 EtONO のすべての用量が投与されるまで反復した。動物が有意な低血圧 (低酸素ベースラインの 60% より小への心収縮期動脈圧力減少) を経験したならば、低酸素状態を終了させ、そして動物を低酸素状態

50

の再導入の前は回復するに任せた。

【 0 0 7 5 】

所望の生理学的パラメーターを、アナログ - ないし - デジタル変換機 (DT 2801, Data Translation Inc., Marborough, Massachusetts) を使用して、パーソナルコンピューター (Dell 486/33, Dell Computer Corporation, Richmond Hill, Ontario, Canada) によって取得した。取得分析のためのソフトウェアを、Asyst Scientific Software System (Macmillan Software Co., New York, New York) を使用して記載した。このソフトウェアで、測定されたパラメーターの連続的取得を、ベースラインの2分の期間、そして各低酸素状態性 E t O N O 曝露の間の安定の後の1分の期間実施した。測定されたパラメーターのコンピューター - 作成平均値を次いで次の分析に利用した。

10

【 0 0 7 6 】

P A P における変化の時間応答を、P A P についての1秒間の平均値を使用して同様に分析し、ベースラインと比較したP A P における変化の時間応答を決定した。すべてのシグナルを24 Hz で取得した。約5秒である分析器についてのサンプリング遅延時間を補正するために、応答の開始は、適当な用量の結果が分析器によって測定されたという最初の指示の5秒前であるべきであると考えられた (モデル系を使用してGCマスマスペクトル分析によって測定した)。心臓インデックスを、キログラムにおける動物の体重でわった心拍出力として算出した。肺血管抵抗性 (R V R) を心臓インデックスでわった平均P A P として算出した。肺動脈フロー (図3) をドゥブローフロープローブを使用して測定した。

20

【 0 0 7 7 】

結果を図1 - 6 に示す。

図1は、ベースライン、低酸素状態 (安定的低酸素性ベースライン)、E t O N O (1分間にわたりP A P におけるさらなる変化がないとき)、ポストE t O N O (E t O N O 中断の4分後) およびベースライン (P A P 通常時、ポストE t O N O データーの約4分後) のデータ点について、3濃度のE t O N O 投与についてのmm H g におけるP A P のグラフを示す。データは、低酸素状態がP A P を増加させ、そしてE t O N O 投与が低酸素性肺血管収縮を逆転させることを示している。

【 0 0 7 8 】

図2は、図1に関する同じステージでのデータ点について3濃度のE t O N O 投与についての $\text{d} \ln x \times 5 \times \text{c} \text{m}^{-1}$ におけるR V R のグラフを示す。データは、低酸素状態がP V R を増加させ、そしてE t O N O 投与がR V R を最初のベースラインに復帰させることを示す。

30

図1および2について、低酸素状態の肺血管血液動態への影響の任意の進行性の減少はE t O N O の肯定的影響と矛盾しない。

図3は、図1についての同じステージにおけるデータ点についての3濃度のE t O N O 投与についてのml / 分における肺動脈フローのグラフを示す。データは、E t O N O 投与が75 ppm で肺動脈フローを増加させることを示す。

【 0 0 7 9 】

図4は、図1と同じステージのデータ点について2濃度のE t O N O 投与についてml / 分における心拍出力のグラフを示す。データは、E t O N O 投与が、心拍出力における低酸素状態誘導性増加を正常化させる傾向があることを示す。

40

図5は、図1と同じステージのデータ点についての3濃度のE t O N O 投与についてのmm H g における平均血圧のグラフを示す。データは、E t O N O 投与が血圧に影響のないことを示す。

【 0 0 8 0 】

図6は、図1と同じステージのデータ点における3濃度のE t O N O 投与についての分当たりの鼓動における心拍数のグラフを示す。データは、E t O N O 投与が心拍数に影響のないことを示している。

投与された最高用量のE t O N O (75 ppm) の吸入の間に取得した血液サンプルは、0.5ないし4.5% (n = 5) の範囲のメトヘモグロビン含量を示し、すなわち、許容

50

される生理学的範囲の十分範囲内である。

【0081】

75 ppm 亜硝酸エチルにおけるベンチレーター出力で、窒素亜硝酸エチル混合物の混合物で送達されたガスについてのガスクロマトグラフィー/マススペクトロメーター分析を実施した。特に、100 µl ガスサンプルを、呼吸システムの呼気アームから取得し（モデル肺として手袋を使用する）、これは患者にシステムから75 ppmで送達される亜硝酸エチルによった。ガスサンプルをHP GC/MSシステムに、30 m0.53 µm GS-Qカラムを使用してインジェクションした。亜硝酸エチルがマススペクトロメーター内で分解し、エタノール（質量数46）およびいくらかのNO（質量数30）を生成し、しかし、遊離NOは実質的に生成しなかった。結果を図7に示す。非結合性一酸化窒素がGS-Qカラムから約1.5分で溶出し、そして亜硝酸エチルが4.1分でカラムから溶出する。データは実質的に遊離NOまたはNO₂が検出されないことを示す。

10

【0082】

本実施例の実験を、投与による病的症候の逆転を示すために実施し、そしてリバウンドを評価するためではない。リバウンドは適切に評価されず、なぜなら処置の結論時において対象はなお十分に低酸素状態であり、肺動脈圧力増加の通常の応答が結果として発生したからである。リバウンドは以下の実施例XIIにおいて評価する。

仔ブタによる他の場合、PaO₂の増加および肺血管抵抗性の減少を、亜硝酸エチルの代わりに100 ppm トリフルオロニトロソメタンで取得した。

【0083】

20

実施例II

70/40 mmHgの肺圧力を有する30歳の白人女性を集中治療室に受け入れ、そして右心不全のために悪化し、そしてPaO₂を90に維持し、亜硝酸エチルが70 ppmで存在するように、フェイスマスクによってO₂、N₂、および亜硝酸エチルの混合物を吸入によって与える。肺圧力は30/15に低下し、そして右心不全は消失する。

【0084】

別の場合に、同一の患者に、70 ppm 亜硝酸エチルの代わりに吸入性80 ppm NOである他は同じ処置を受容させる。肺圧力は低下し、しかし患者は気道過反応性を発生し（軽いゼイゼイ）、そして化学蛍光分析器は吸入性エアールにおけるNO₂濃度の3倍の増加を示す。さらに、血液中のメトヘモグロビン含量は10%であると測定される。患者をNOから吸入性亜硝酸エチル（70 ppm）にスイッチさせ、そしてNO₂およびメトヘモグロビン濃度は低下し、そして回復を維持する。

30

【0085】

実施例III

60歳の男性癌患者は、化学療法後、ARDSと一致したエックス線撮影的变化を発生する。この患者のPaO₂は100% 酸素であるにもかかわらず50 mmHgに低下し、そして右心カテーテル法によれば正常の左心室拡張終期圧力を現す。この患者に40 ppm 吸入性亜硝酸エチルを投与する。PaO₂は70 mmHgに増加する。

【0086】

同一の患者に30 ppm 吸入性NOを与え、そして急性PaO₂改善が発生し、しかし次いで臨床的な悪化が発生し、これは胸部エックス線撮影的悪化（炎症による）および腎臓機能障害を特徴としており、そしてPaO₂が70から60 mmHgに低下する。この患者に50 ppm 吸入性亜硝酸エチルにスイッチさせ、そしてエックス線撮影的变化および腎臓機能障害は安定化し、そしてPaO₂は90 mmHgに増加する。

40

【0087】

実施例IV

26歳の白人女性喘息患者に挿管し、なぜなら重度の喘息性増悪のためである。この患者に噴霧性エピネフリンおよびAtroventを投与し、しかしベンチレーションしない。内科医は100 ppm 吸入性亜硝酸エチルを、再呼吸フェイスマスクを介して処置に添加し、そして患者のPaO₂は60から80に改善し、そしてベンチレーションはより低い気道

50

圧力（肺応諾）によって証拠付けられるように、より容易化する。

【 0 0 8 8 】

実施例 V

嚢胞性線維症を有する 12 歳の少女はシュードモナス性感染を現し、これは肺不全 (pulmonary exacerbation) につながる。この患者に噴霧性抗生物質を与え、しかしスパイク熱 (spike fever) を継続し、そしてよくなる。吸入性亜硝酸エチルを酸素中の 80 ppm で与え、4 日にわたり感染症の解決がある。

【 0 0 8 9 】

実施例 V I

65 歳の白人男性を不安定性アングナで病院に受け入れる。この患者に i . v . ニトログリセリン、ヘパリンおよびベータブロッカーを与える。しかし、この患者は、休息で間欠性胸部疼痛を継続的に経験する。患者に酸素中の 20 ppm 吸入性亜硝酸エチルを与える。この胸部疼痛は解決する。

【 0 0 9 0 】

実施例 V I I

70 歳の白人男性は、心筋梗塞を現す。この患者のヘマトクリットは 26 である。患者に 2 単位の血液を与えるが、しかし心不全に至る。患者に窒素中の 60 ppm 吸入性亜硝酸エチルを開始し、心不全の解決を有する。この患者は組織プラスミノゲンアクチベーター、ベータブロッカーおよび ACE インヒビターの標準的医学的投薬療法をも受容している。

【 0 0 9 1 】

実施例 V I I I

80 歳の老人は、ステージ 3 の両心不全および 50 / 30 の肺動脈圧力を現す。この患者に Captopril、ジゴキシンおよび lasix を与え、しかしなお 140 / 80 の全身性圧力であり、高血管抵抗性を有する。患者は酸素中 80 ppm 吸入性亜硝酸エチルガスを受容する。患者の肺圧力は 20 / 10 に低下し、そして全身性動脈圧力は 100 / 80 に低下し、正常の末梢血管抵抗性を有する。亜硝酸エチル投与を停止し、そして圧力は低いままである。

【 0 0 9 2 】

実施例 I X

40 歳の黒人男性は、悪性高血圧 (240 / 160 の血圧) を現す。この患者に Captopril および ニトロプルシドを受容させ、そして血圧は 200 / 160 に低下する。この患者に次の日のあいだ、窒素中の 80 ppm 吸入性亜硝酸エチルを受容させ、亜硝酸エチル治療を開始した 6 時間後に、200 mg / kg N - アセチルシステインの静脈内用丸薬を投与する。血圧は 170 / 95 に低下する。

【 0 0 9 3 】

実施例 X

ホモ接合性鎌状細胞疾病を有する 18 歳黒人女性は、疼痛のある難局を現し、胸部エックス線写真的変化および低酸素状態を伴う。当該患者は重度の腹部および胸部疼痛を訴え、そしていくらか見当織を喪失している。彼女に、酸素中 80 ppm 吸入性亜硝酸エチルを投与しながら、2 単位の血液を受容させる。すべての症候およびエックス線写真的変化の解決がある。

【 0 0 9 4 】

実施例 X I

白血病を有する 60 歳の白人男性は広汎性血管内凝血症候群を現す。足指は虚血性となる。この患者に酸素中 80 ppm 吸入性亜硝酸エチル治療を開始し、そして N - アセチルシステインの 100 mg / kg 点滴を与える。足指へ血流は改善する。

【 0 0 9 5 】

実施例 X I I

急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) の肺障害のモデルのために、肺性高血圧を、 $P a_{O_2}$ が

10

20

30

40

50

100 mmHg以下に低下し、そして30分間そこにとどまるまで、反復生食水洗浄（界面活性剤を除去するために）によって、100% 酸素を呼吸している挿管した新生仔ブタにおいて誘導する。NOまたは亜硝酸エチル（EtONO）のいずれかを2時間までに投与した。NOを10分間20 ppmで、次いで5 ppmで投与した。EtONOを20 ppmで投与した。ここに示す結果は、 $P a_{O_2}$ について（図8）および心拍出力について（図9）のものである。最初の測定を実施し（コントロール）、次いで測定をEtONOおよびNO投与の間反復して実施し（（EtONO）および（NO）と示す）、それから血液動態を吸入性ガスの突然の散布（dissemination）の後20分間5分ごとに再試験した（ポストEtONO）および（ポストNO）。EtONOおよびNOを酸素ガス中で投与した。

10

【0096】

図8に示すように、EtONO投与は、2時間マークで(at the two hour mark) $P a_{O_2}$ における有意な増加を生じ、そしてポスト処置にさらなる改善があった。図8に示すように、NO投与は2時間マークで $P a_{O_2}$ に有意な増加を生じ、しかしポスト処置にリバウンドおよび $P a_{O_2}$ の低下がみられた。EtONOについて、投与を中断した後20分間、何らの変化またはよりよい $P a_{O_2}$ レベルもなかった。NOについて、投与を中断した3分後、悪いほうに変化がみられた。さらに、両方の薬物は、肺血管抵抗性を対照可能な程度まで減少させ、しかしNOを中断したときにリバウンドが発生し、一方、EtONOを中断したときに肺血管抵抗性は変化がないままであった。

【0097】

結果はEtONO投与について、投与中に少なくともできるだけNO血液酸素濃度における劇的な改善があり、そして処置の中断後、リバウンドがなく、そしてさらなる改善があり、一方、NO投与によって、処置の中断によるリバウンドがあることを示している。

20

【0098】

図9に示すように、EtONO投与は、正常からマイナス40%のレベルから（コントロール動物は心不全を有した）、投与の中断のときにおいて正常からマイナス27%まで心拍出力における有意な増加まで、心拍出力における増加を生じ、そして処置の中断後、正常から約マイナス20%まで心拍出力におけるさらなる増加を生じ、一方、NO投与は心拍出力における有意な増加を生じなかった。

【0099】

図8および9に示す結果は、15匹のブタに基づき、そして図8および図9において、アステリスクはコントロールから有意に異なることを表す（ $P < 0.05$ ）。

EtONO投与によるリバウンドなく $P a_{O_2}$ の増加およびリバウンドなく肺血管抵抗性の減少および心拍出力の増加、一方NO投与によるリバウンドのある $P a_{O_2}$ の増加およびリバウンドのある肺血管抵抗性の減少の同じ筋書きが、原発性肺性高血圧のためのヒト成人の処置においてまたは複数病因の難治性肺性高血圧を有するヒト新生児の処置において観察され、以下の実施例XIIIに例示する通りである。

30

【0100】

実施例XIII

ここでの発明者の一人の指示の下で亜硝酸エチルを使用し、難治性肺性高血圧および/または低酸素状態を有する4人のヒト新生児を処置する。結果は、血液酸素濃度における劇的な改善、リバウンドのないこと、メトヘモグロビン血状態のないこと、そして心拍出力における改善であった。EtONO治療を開始した後、短期間の時間の内に昇圧支持剤（pressor support）を停止することができた。一人の新生児は亜硝酸エチルに応答し、NOに応答しなかった。

40

【0101】

亜硝酸エチルを使用して原発性肺性高血圧を有する6人の成人を処置する。結果は血液酸素濃度の改善、肺血管抵抗性の減少および心拍出力の改善であった。

メトヘモグロビンの増加はなかった。

難治性肺性高血圧を有する一人の新生児および原発性肺性高血圧を有する一人の成人にお

50

ける処置の詳細を以下に示す。

【0102】

血圧を維持する必要によってエピネフリンを投与された難治性肺性高血圧を有する新生児に1.5 ppm 亜硝酸エチル (EtONO) を15分間、次いで75 ppmに増加させてEtONOを次の15分間、次いで75 ppm EtONOを次の30分間、次いで15 ppm EtONOを次の3時間投与し、ここで投与を29分間停止し、それからNOを通常の処置にしたがって4時間投与した。EtONOをガスがベンチレーターを介して投与されるベンチレーターを介して投与した。最初のPaO₂は29であった。それは生命を両立させることができない(そして新生児は死んだことを意味する)。PaO₂はEtONO治療の結論時に54まで増加し、次いで処置の間約30分の間86までさらに増加した。

10

【0103】

こうしてEtONOによる処置によってPaO₂における改善があり、そしてEtONO治療を停止した後にリバウンドなかった。これに対して、NO治療はPaO₂の減少を生じ、終わりの4時間は停止させなければならなかった。最初のPaCO₂(いかによく肺がベンチレーションされているかの基準)は62であり、そしてEtONO治療を停止した時点で29に減少し、そして結果としてベンチレーションを停止させることができた。さらに、EtONO治療の停止の時点で昇圧支持剤を中断することができた。

【0104】

ここで我々は、原発性肺性高血圧を有する成人の処置の場合を示す。当該成人に亜硝酸エチル (EtONO) を10分間1.5 ppm、10分間15 ppm、そして10分間75 ppmで与え、それからEtONO治療を停止した。処置の結果として、平均肺動脈圧力は56から40に低下し、心拍出力は5.3から5.9に上昇し(それは良好である)、そして処置の後5.6に低下し、肺血管抵抗性は7.4から5.2まで低下し、そしてPaO₂は79から94に増加した。結果は、この治療が血液動態を正常化するように働いたことを示す。目的は酸素化を改善すること、およびより低い肺血管抵抗性であり、そしてこれは達成された。

20

【0105】

実施例XIV

この実験は、EtONO投与が肺、すなわち気道内液におけるGSNO(ニトロソグルタチオン)を増加させ、そしてNO投与が肺におけるニトロソグルタチオン濃度を有効に増加させず、したがって不利な反応の素因とならないことを示すために実施した。

30

【0106】

亜硝酸エチル (EtONO) またはNOを、図10に示す用量で新生仔ブタの吸入吸入性ガスに添加した。EtONOを室空気(20%酸素)に0.6リットル/分で添加した。NOを100%室素と混合した。5分後、肺における気道内液を気管支鏡検査法によってサンプリングした。アスピレートは100 μM ジエチレントリアミンペンタ酢酸を含有するホスフェートバッファー生食水(PBS)に収集し、そしてすみやかにSNO含量について化学的還元化学蛍光(chemical reduction-chemiluminescence)によって検定し、そしてLowry法によってタンパク質含量について検定した。

40

【0107】

タンパク質含量に標準化されたSNO濃度を内生濃度の倍数増加として表現する(NO基について0.145 ± 0.03 nM / μg、EtONO基について0.22 ± 0.04 nM / μg)。結果を図10に示し、ここで、ppm表記のEtONOおよびNO用量がX軸を示し、そしてY軸がSNOにおける倍数増加であることを示す。図10に示すように、最低の用量におけるEtONOはGSNOにおける5倍の増加を生じ、そしてすべての用量において少なくともこの増加である。

【0108】

他方、NOはSNOのわずかな増加をもたらすことを示し、これは殆どのNOがO₂および/または反応性酸素種(それはその毒性の基礎となる)との交化学反応(alternative

50

chemical reaction) を有することを示唆している。結論は、E t O N O が天然のグルタチオンを負荷し、ニトロソグルタチオン (G S N O) のプールを増加するということである。図 7 は、これが N O の放出なく起こることを指摘している。したがって E t O N O 投与は肺 S N O を選択的に充満させる (replet) (すなわち、N O を生じる毒性効果を生じることなく S N O を増加させる)。G S N O の充満は、嚢胞性線維症、喘息、低酸素状態および呼吸不全において患者の気道内液に発生するから、E t O N O によるこれらの処置が示唆される。

【 0 1 0 9 】

ここでのデータは、E t O N O の効果のメカニズムが G S N O の形成であり、一方、N O の効果のメカニズムが N O の弛緩効果であることを示唆している。G S N O の肺への直接的投与は噴霧化によって実施されなければならない。G S N O は、より大きい気道に付着し、そして細胞を横断しないので、その肺への噴霧化はその均等な分配を生じない。さらに患者は G S N O 投与に耐えることができない。なぜなら、それは次いでせきを生じるからである。このために、N - アセチルシス테인投与を試みなければならない；それは G S N O 濃度を増加させるように働かない。したがって G S N O の直接的投与はここでの発明の置換または別形または均等なものではない。

【 0 1 1 0 】

実施例 X V

原発性肺性高血圧および低酸素状態を有する志願の患者であって、治療への応答を評価するための右心カテーテル化を受けている者を、吸入性亜硝酸エチル (E t O N O) で 3 0 分間、1 . 5 から 7 5 p p m の (1 . 5 p p m で 1 0 分、次いで 1 5 p p m で 1 0 分、次いで 7 5 p p m) 増加性用量タイトレーションによって処置した。患者の赤血球細胞を内在性動脈性ラインから引出し、そして測定をインタクト赤血球細胞で、および低張生食水で赤血球細胞を溶血させることによって取得した溶血産物で、ウサギ大動脈生物検定 (r a b i t a o r t i c b i o a s s a y) において実施した。

【 0 1 1 1 】

ウサギ大動脈生物検定を、アブミ骨上につるし、そしてフォーストランスデューサーに接続したウサギ大動脈断片上で実施し、そして測定を張力 (t e n s i o n) の増加および減少について、Stamler, J., et al., PNAS, Vol. 89, 444-448(1992)に記載されたように実施した。検定をおよそ 1 % 酸素で実施し、組織に存在するものをシュミレーションした (それは低 $P a_{O_2}$ を含む)。結果は図 1 1 A (インタクト赤血球細胞のコントロール、無処置)、1 1 B (インタクト赤血球細胞、E t O N O 処置)、1 1 C (溶血産物のコントロール、無処置)、および 1 1 D (溶血産物、E t O N O 処置) に示し、これらは時間 (X 軸) に対して張力 (Y 軸) で示し、下方への方向性は弛緩を示し、上方への方向性は収縮を示す。

【 0 1 1 2 】

図 1 1 A に示すように、ネイティブ赤血球細胞によって誘導された小さい一過性の減少がみられ、しかし図 1 1 B に示すように、E t O N O 処置された患者からの赤血球細胞によって誘導された張力の有意により大きい低下がみられる。張力の引き続く増加の理由は、赤血球細胞におけるエクスポーターがすべての活性を放出することである。しかし、この活性は、望まれる生物学的効果を達成するために十分に大きいことを示している。ここで溶血産物の結果をみると、図 1 1 C はネイティブ血液細胞からの溶血産物が低 $P a_{O_2}$ で非常に小さい弛緩、次いで収縮を生じることを示し、一方、図 1 1 D は、E t O N O 処置された患者からの血液細胞からの溶血産物がより強い拡張を生じ、そしてベースラインと比較して収縮のないことを示す。

【 0 1 1 3 】

図 1 1 A、1 1 B、1 1 C および 1 1 D において、アステリクスはコントロールから有意に異なることを示し ($p < 0 . 0 5$)、そして # は $p = 0 . 0 6$ を意味する。インタクト赤血球細胞と溶血産物についての結果間の相違の理由は、溶血産物が機能性エクスポーターを含まないことである。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 4 】

測定値およびデータは、E t O N O 処置された患者からのインタクト赤血球細胞および溶血産物において、ニトロシル化されたヘモグロビンとS - ニトロソグルタチオンの混合物が形成され、そしてE t O N O 処置が患者の赤血球細胞において両方（平衡状態にあるニトロシル化されたヘモグロビンおよびS - ニトロソグルタチオン）の濃度を増加させることを指摘している。

【 0 1 1 5 】

実施例 X V I

赤血球細胞を、37、15分間で、1：50の亜硝酸エチルのヘモグロビンに対するモル率で、種々の濃度の亜硝酸エチルを含有する亜硝酸エチルのアルコール溶液とインキュベーションする。結果は平衡状態でニトロシル化されたヘモグロビンおよびニトロシル化されたグルタチオンで負荷された赤血球細胞であり、そして約10 μM S - ニトロシル化されたヘモグロビンを含んでいる。

得られた赤血球細胞は、例えば、鎌状細胞疾病または虚血性障害、例えば、アングナを処置するために有用である。

【 0 1 1 6 】

実施例 X V I I

実施例 X I V におけるような新生仔ブタに吸入性ガス状薬物を投与する。5分後、気道内液をサンプリングし、そしてニトロソグルタチオン（G S N O）について、Gaston, B., et al., PNAS, Vol. 90, 10957-10961(1993)に記載された方法によって検定する。スクリーニングは、亜硝酸エチルおよび亜硝酸アミル（しかしN Oではない）が気道内液におけるG S N Oを、ベースラインと比較して50%より大きく増加させることを示す。

別形

上記の変形は当業者にとって自明である。したがって本発明の範囲は請求の範囲によって定義される。

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 図 1 は、3 用量の亜硝酸エチルガスについての肺動脈圧力のグラフを示し、そして実施例 I の結果を示す。

【 図 2 】 図 2 は、3 用量の亜硝酸エチルガスについての肺血管抵抗性のグラフを示し、そして実施例 I の結果を示す。

【 図 3 】 図 3 は、3 用量の亜硝酸エチルガスについての肺動脈流のグラフを示し、そして実施例 I の結果を示す。

【 図 4 】 図 4 は、2 用量の亜硝酸エチルガスについての心拍出力のグラフを示し、そして実施例 I の結果を示す。

【 図 5 】 図 5 は、3 用量の亜硝酸エチルガスについての平均血圧のグラフを示し、そして実施例 I の結果を示す。

【 図 6 】 図 6 は、3 用量の亜硝酸エチルガスについての心拍数（heart rate）のグラフを示し、そして実施例 I の結果を示す。

【 図 7 】 図 7 は、75 ppmでの実施例 I のベンチレーションシステムを経由して送達された亜硝酸エチルガスにおけるガスクロマトグラフィー / マススペクトル分析結果を示す。

【 図 8 】 図 8 は、無処置での、亜硝酸エチル（E t O N O）での処置での、ポストE t O N O 処置、N Oでの処置での、そしてポストN O 処置のP a O₂（すなわちP a o₂）レベルのグラフを示し、そして実施例 X I I の結果を示す。

【 図 9 】 図 9 は、無処置での、亜硝酸エチル（E t O N O）での処置での、ポストE t O N O 処置、N Oでの処置での、そしてポストN O 処置の心拍出力の変化のグラフを示し、そして実施例 X I I の結果を示す。

【 図 1 0 】 図 1 0 は、吸入性N Oに対する吸入性E t N O（亜硝酸エチル）のppmでの気道S N O（ニトロソグルタチオン）における増加倍数のグラフを示し、そして実施例 X I V の結果を示す。

10

20

30

40

50

【図11】 図11A、11B、11Cおよび11Dは、時間に対する張力 (tension) のグラフであり、そして実施例XVの結果を示す。

【図1】

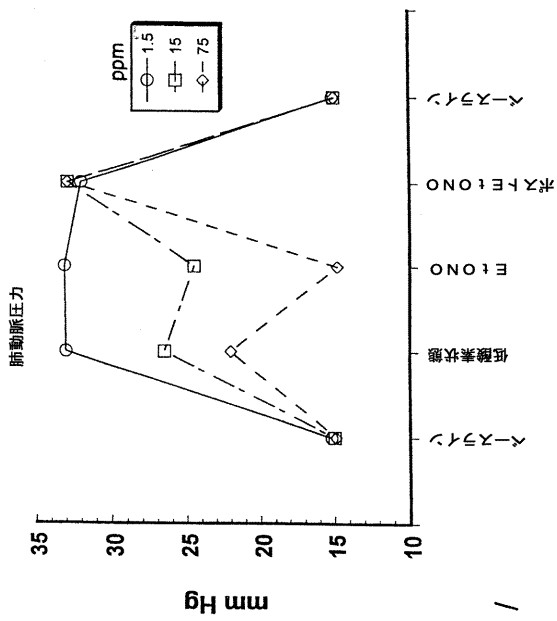


FIG. 1

【図2】

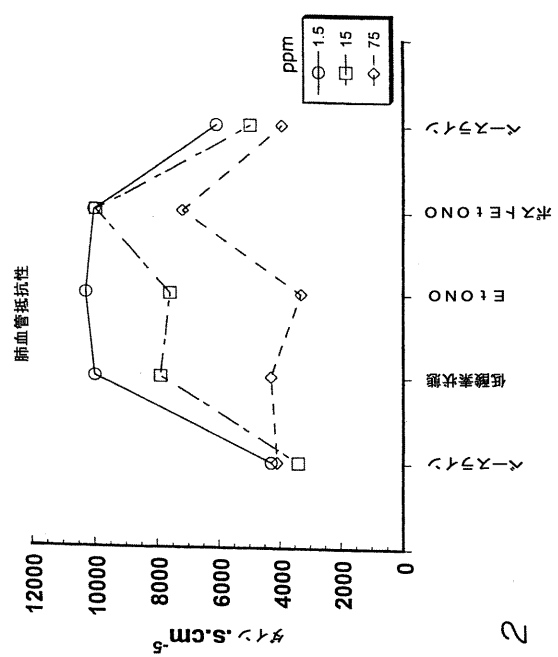


FIG. 2

【 図 3 】

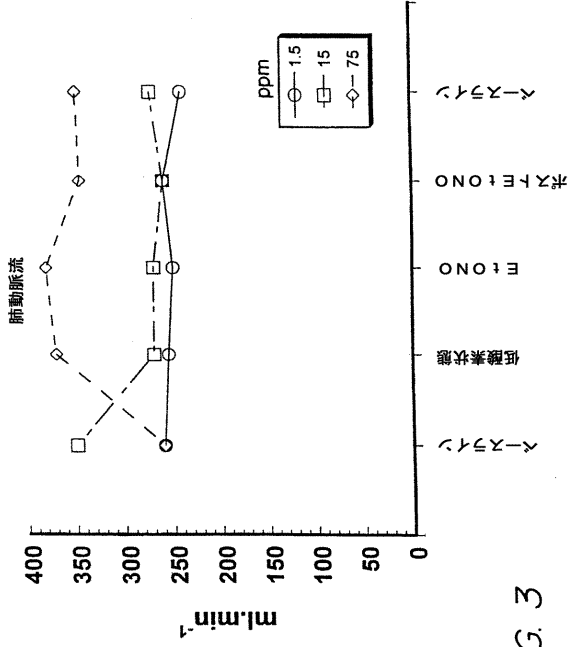


FIG. 3

【 図 4 】

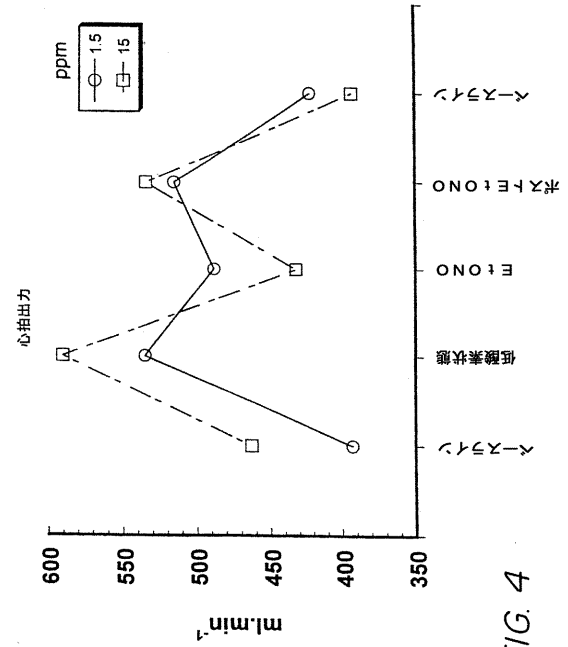


FIG. 4

【 図 5 】

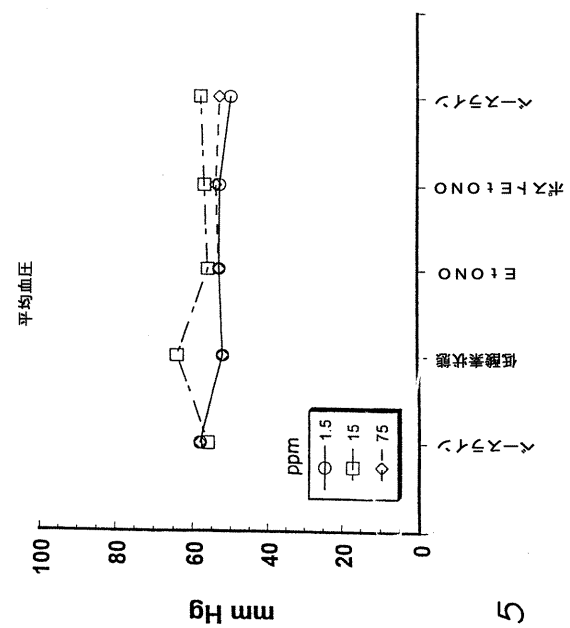


FIG. 5

【 図 6 】

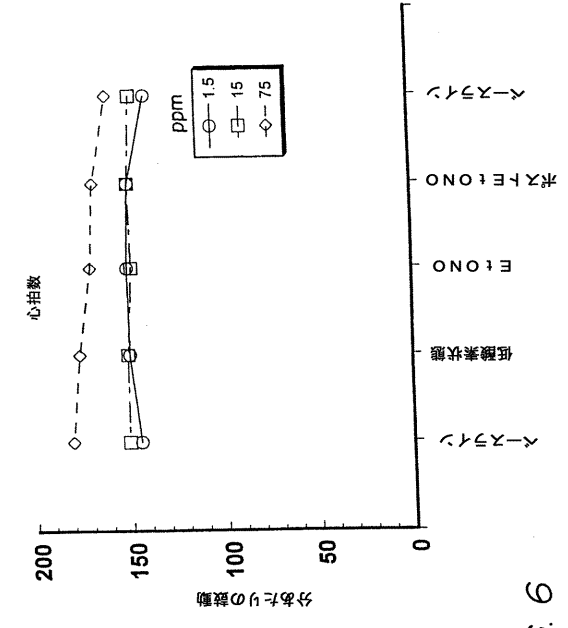
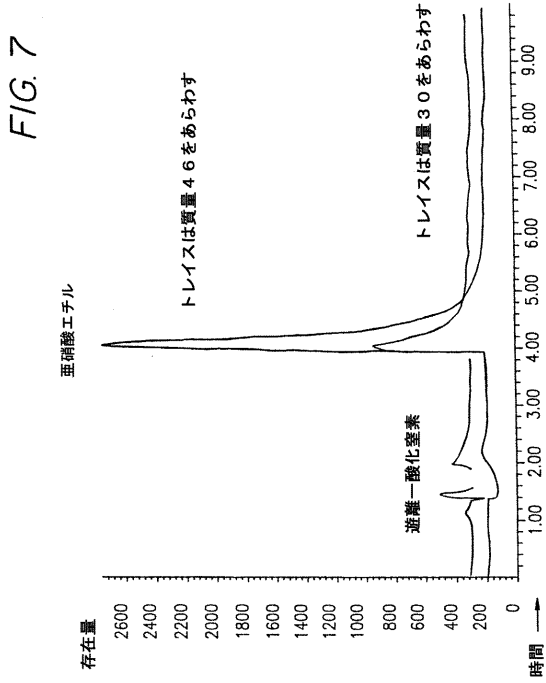
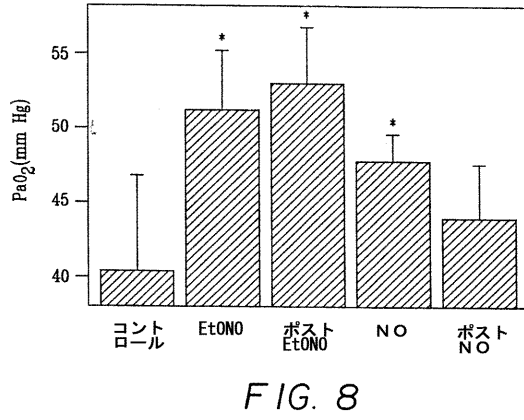


FIG. 6

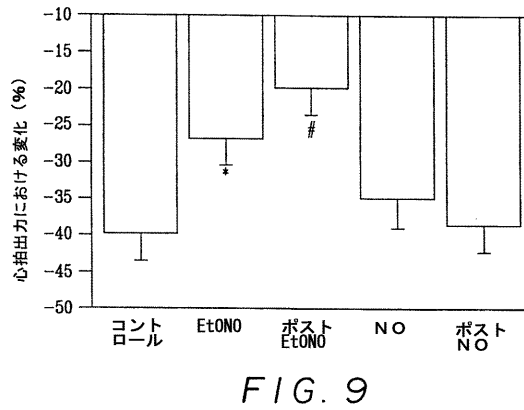
【 図 7 】



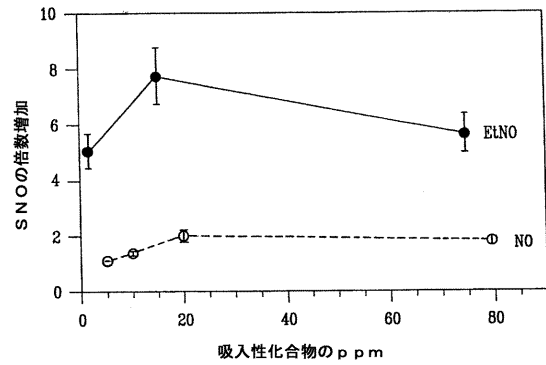
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 11 D 】



【 図 11 A 】



【 図 11 B 】



【 図 11 C 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ジョナサン・エス・スタムラー
アメリカ合衆国27514 ノースカロライナ州チャペル・ヒル、ジュニパー・ブレイス101番
- (72)発明者 エリック・ジェイ・トゥーン
アメリカ合衆国27705 ノースカロライナ州ダーラム、エバンズ・ストリート2601番
- (72)発明者 アンドリュー・ジェイ・ガウ
アメリカ合衆国08540 ニュージャージー州プリンストン、カーター・ロード197番

審査官 鈴木 理文

- (56)参考文献 特表平06-504778(JP,A)
特表平06-510800(JP,A)
Biochem. Pharmacol., 1994年, Vol.47 No.6, pp.1047-1053

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/21
A61P 7/06
A61P 9/00
A61P 9/10
A61P 9/12
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)