

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5564157号
(P5564157)

(45) 発行日 平成26年7月30日 (2014. 7. 30)

(24) 登録日 平成26年6月20日 (2014. 6. 20)

(51) Int. Cl. F I
A 6 1 K 33/00 (2006. 01)
A 6 1 P 9/08 (2006. 01)

A 6 1 K 33/00
A 6 1 P 9/08

請求項の数 24 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2006-518922 (P2006-518922)	(73) 特許権者	303020761
(86) (22) 出願日	平成16年7月9日 (2004. 7. 9)		ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド
(65) 公表番号	特表2007-528852 (P2007-528852A)		ステイツ オブ アメリカ アズ リブ
(43) 公表日	平成19年10月18日 (2007. 10. 18)		レゼンテッド バイ ザ セクレタリー
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/021985		オブ ザ デパートメント オブ ヘルス
(87) 国際公開番号	W02005/007173		アンド ヒューマン サービシーズ
(87) 国際公開日	平成17年1月27日 (2005. 1. 27)		アメリカ合衆国 メリーランド州 208
審査請求日	平成19年6月28日 (2007. 6. 28)		52-3804, ロックビル, エグゼキ
審判番号	不服2011-27597 (P2011-27597/J1)		ュティブ ブールバード 6011, スイ
審判請求日	平成23年12月22日 (2011. 12. 22)		ート 325, オフィス オブ テクノ
(31) 優先権主張番号	60/485, 959		ロジー トランスファー, ナショナル
(32) 優先日	平成15年7月9日 (2003. 7. 9)		インスティテューツ オブ ヘルス
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/511, 244		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成15年10月14日 (2003. 10. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心臓血管状態の処置のための亜硝酸塩の使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象において血管拡張を誘発および／または血流を増大させるための治療に用いるための薬剤の製造における酸性化されていない薬学的に許容される亜硝酸塩の使用であって、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量が、対象中で0.6～240 μMの循環濃度まで投与される、使用。

【請求項 2】

薬学的に許容される亜硝酸塩が、対象中のヘモグロビンの存在下で反応して一酸化窒素を放出する、請求項1記載の使用。

【請求項 3】

薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量が、対象において25%以下のメトヘモグロビンの生成を誘発する、請求項1記載の使用。

【請求項 4】

薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量が、対象において3%以下のメトヘモグロビンの生成を誘発する、請求項1記載の使用。

【請求項 5】

薬学的に許容される亜硝酸塩が、注射によって毎分36 μmolで少なくとも5分間、対象の前腕上腕動脈に投与される、請求項1記載の使用。

【請求項 6】

薬学的に許容される亜硝酸塩が、カチオンとしてナトリウム、カリウム、またはアルギ

10

20

ニンを含む、請求項 1～5 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 7】

亜硝酸塩が亜硝酸ナトリウムである、請求項 6 記載の使用。

【請求項 8】

亜硝酸塩の投与が、非経口、経口、口腔、直腸、または眼内投与である、請求項 1～7 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 9】

亜硝酸塩の投与が、腹膜内、静脈内、動脈内、皮下、吸入、筋内、または心肺バイパス回路への投与である、請求項 1～7 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 10】

対象が哺乳動物である、請求項 1～9 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 11】

対象がヒトである、請求項 10 記載の使用。

【請求項 12】

亜硝酸塩が少なくとも一つのさらなる薬剤と組み合わせて投与される、請求項 1～11 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 13】

さらなる薬剤が、ペニシリン、ヒドロキシ尿素、酪酸塩、クロトリマゾール、アルギニン、またはホスホジエステラーゼ阻害薬からなるリストより選択される一つまたは複数である、請求項 12 記載の使用。

【請求項 14】

ホスホジエステラーゼ阻害薬がシルデナフィルである、請求項 13 記載の使用。

【請求項 15】

対象が高血圧を有し、治療が高血圧に関連する少なくとも一つの血管性合併症を処置するための治療である、請求項 1～12 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 16】

対象が溶血性状態を有し、治療がその溶血性状態に関連する少なくとも一つの血管性合併症を処置するための治療である、請求項 1～12 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 17】

溶血性状態が、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ヘモグロビンC症、ヘモグロビンSC症、鎌状赤血球サラセミア、遺伝性球状赤血球症、遺伝性橢円赤血球症、遺伝性卵形赤血球増加症、グルコース-6-リン酸欠乏症および他の赤血球酵素欠乏症、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、発作性寒冷ヘモグロビン尿症（PCH）、血栓性血小板減少性紫斑病／溶血性尿毒性症候群（TTP／HUS）、特発性自己免疫性溶血性貧血、薬物誘発免疫溶血性貧血、続発性免疫溶血性貧血、化学的または物理的因子によって生じる非免疫溶血性貧血、マラリア、熱帯熱マラリア、バルトネラ症、バベシア病、クロストリジウム感染症、重度ヘモフィルスインフルエンザタイプb感染症、広範な熱傷、輸血副作用、横紋筋融解症（ミオグロブリン血症）、高齢血の輸血、ヘモグロビンの輸血、赤血球の輸血、心肺バイパス、冠状動脈疾患、心臓虚血症候群、狭心症、医原性溶血、血管形成、心筋虚血、組織虚血、血管内装置によって生じる溶血、および血液透析からなる群より選択される一つまたは複数である、請求項 16 記載の使用。

【請求項 18】

組織への血流の低下に関連する状態を対象が有し、治療が該対象の該組織への血流を増大させるための治療である、請求項 1～12 のいずれか一項記載の使用。

【請求項 19】

組織への血流の低下が、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ヘモグロビンC症、ヘモグロビンSC症、鎌状赤血球サラセミア、遺伝性球状赤血球症、遺伝性橢円赤血球症、遺伝性卵形赤血球増加症、グルコース-6-リン酸欠乏症および他の赤血球酵素欠乏症、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、発作性寒冷ヘモグロビン尿症（PCH）、血栓性血小板減少性紫斑病／溶血性尿毒性症候群（TTP／HUS）、特発性自己免疫性溶血性貧血、薬物誘発免疫溶血

10

20

30

40

50

性貧血、続発性免疫溶血性貧血、化学的または物理的因子によって生じる非免疫溶血性貧血、マラリア、熱帯熱マラリア、バルトネラ症、バベシア病、クロストリジウム感染症、重度ヘモフィルスインフルエンザタイプb感染症、広範な熱傷、輸血副作用、横紋筋融解症（ミオグロブリン血症）、高齢者の輸血、ヘモグロビンの輸血、赤血球の輸血、心肺バイパス、冠状動脈疾患、心臓虚血症候群、狭心症、医源性溶血、血管形成、心筋虚血、組織虚血、血管内装置によって生じる溶血、血液透析、全身性高血圧症、皮膚潰瘍、急性腎不全、慢性腎不全、血管内血栓、および虚血性中枢神経系障害からなる群より選択される少なくとも一つの状態によって直接的または間接的に生じる、請求項18記載の使用。

【請求項20】

組織が虚血性組織である、請求項19記載の使用。

10

【請求項21】

組織が、神経細胞組織、腸組織、腸管組織、四肢組織、肺組織、中枢神経組織、または心臓組織からなる群より選択される一つまたは複数の組織である、請求項18～20のいずれか一項記載の使用。

【請求項22】

薬学的に許容される亜硝酸塩が、対象中で100 μ M以下の循環濃度まで投与される、請求項1記載の使用。

【請求項23】

亜硝酸塩が、50 μ M以下の循環濃度まで投与される、請求項1記載の使用。

【請求項24】

亜硝酸塩が、16 μ M以下の循環濃度まで投与される、請求項1記載の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、いずれも全体が参照により本明細書に組み入れられる、2003年7月9日出願の米国特許仮出願第60/485,959号、および2003年10月14日出願の米国特許仮出願第60/511,244号の利益を主張する。

【0002】

開示の背景

30

過去10年間に、血流および心臓血管ホメオスタシスの調整に寄与する血管拡張薬としての一酸化窒素の重要な役割についての理解の深まりが見られた。一酸化窒素は血液で酸化されると、そのような一酸化窒素酸化の不活性代謝最終産物であると考えられるアニオン、すなわち亜硝酸イオン (NO_2^-) になりうる。亜硝酸塩のインビボ血漿レベルは150～1000nMの範囲であると報告されており、大動脈環組織中の亜硝酸塩濃度は10,000nMを超えると報告されている (Rodriguez et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100, 336-41, 2003; Gladwin et al., Proc Natl Acad Sci USA, 97, 9943-8, 2000; and Rassaf et al., Nat Med, 9, 481-3, 2003)。この潜在的なNOプールは、ヒト血漿中では10nM未満であると報告されている血漿S-ニトロソチオールを超えている (Rassaf et al., Nat Med, 9, 481-3, 2003; Rassaf et al., Free Radic Biol Med, 33, 1590-6, 2002; Rassaf et al., J Clin Invest, 109, 1241-8, 2002; and Schechter et al., J Clin Invest, 109, 1149-51, 2002)。たとえば、キサンチンオキシドレダクターゼによる酵素的還元または非酵素的不均化／酸性還元による亜硝酸塩からNOへのインビボ転換の機序が提案されている (Millar et al., Biochem Soc Trans, 25, 528S, 1997; Millar et al., FEBS Lett, 427, 225-8, 1998; Godber et al., J Biol Chem, 275, 7757-63, 2000; Zhang et al., Biochem Biophys Res Commun, 249, 767-72, 1998 [Biochem Biophys Res Commun, 251, 667, 1998には誤植が見られる]; Li et al., J Biol Chem, 276, 24482-9, 2001; Li et al., Biochemistry, 42, 1150-9, 2003; Zweier et al., Nat Med, 1, 804-9, 1995; Zweier et al., Biochim Biophys Acta, 1411, 250-62, 1999; and Samouilov et al., Arch Biochem Biophys, 357:1-7, 1998)。

40

50

【0003】

安静時および局所的にNO合成酵素を阻害中のヒト前腕にかけての亜硝酸塩の動脈-静脈間勾配が、運動によって生じる亜硝酸塩の消費の増大とともに観察されている (Gladwin et al., Proc Natl Acad Sci USA, 97, 9943-8, 2000; Gladwin et al., Proc Natl Acad Sci USA, 97, 11482-11487, 2000; and Cicinelli et al., Clin Physiol, 19: 440-2, 1999)。Kelmらは、NO合成酵素阻害中に亜硝酸塩の大きな動脈-静脈間勾配がヒト前腕にかけて形成されることを報告している (Lauer et al., Proc Natl Acad Sci USA, 98, 12814-9, 2001)。血管床にかけての酸素抽出のより簡単なケースとは違い、亜硝酸塩は、NO合成酵素阻害および運動中の動脈-静脈間勾配によって示されるように消費されることもできるし、また、酸素との内皮一酸化窒素合成酵素誘導NO反応によって血管床で生成されることもできる。

10

【0004】

亜硝酸塩は高濃度では、インビトロで血管拡張剤であると報告されている (Ignarro et al., Biochim Biophys Acta, 631, 221-31, 1980; Ignarro et al., J Pharmacol Exp Ther, 218, 739-49, 1981; Moulds et al., Br J Clin Pharmacol, 11, 57-61, 1981; Gruetter et al., J Pharmacol Exp Ther, 219, 181-6, 1981; Matsunaga et al., J Pharmacol Exp Ther, 248, 687-95, 1989; and Laustiola et al., Pharmacol Toxicol, 68, 60-3, 1991)。インビトロで血管を拡張させることが示された亜硝酸塩のレベルは、常に10,000nM (100 μ M) を超え、通常ミリモル濃度である。

20

【0005】

インビトロで血管を拡張するのに必要な高い亜硝酸塩濃度とつじつまが合うように、Lauerらは、ヒト対象の前腕循環中に亜硝酸塩を注入した場合、前腕中200 μ Mの濃度でさえ、血管拡張効果が得られないということを報告した (Lauer et al., Proc Natl Acad Sci USA, 98, 12814-9, 2001)。Lauerらは、「亜硝酸塩の動脈内注入の血管拡張活性の完全な欠如は、明らかにNO送達におけるこの代謝産物のいかなる役割をも排除する」と報告し、「亜硝酸塩の生理学的レベルは血管拡張不活性である」と結論づけた。さらには、Rassafらも、亜硝酸塩の注入後のヒトにおける血管拡張効果を見いだせなかった (Rassaf et al., J Clin Invest, 109, 1241-8, 2002)。したがって、インビボ研究は、生理学的レベルの亜硝酸塩はNO供給源として作用せず、生理学的レベルの亜硝酸塩は血圧の調整に役割を持たないと結論づけた。

30

【0006】

歴史的に、亜硝酸塩はシアン化物中毒の処置に使用されてきた。シアン化物中毒に病む対象に高い濃度で注入してヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化させると、それがシアン化物と結合する。このような高濃度の亜硝酸塩は、臨床的に有意なメトヘモグロビン血症を生じさせ、酸素送達を潜在的に低下させる。このような高濃度の亜硝酸塩は、ヒトの血圧を下げることが示されているが、形成されるメトヘモグロビンの量が、他の医学的状態の処置における亜硝酸塩の使用を排除している。

【0007】

したがって、これまでの技術水準は、亜硝酸塩はインビトロで100 μ M未満の濃度では有意な血管拡張剤ではなく、前腕に200 μ Mの濃度でヒトに注入された場合でさえ有意な血管拡張剤ではないということであった。ヒト血流中では亜硝酸塩は一酸化窒素に転換されないということもまた、これまでの技術水準であった。

40

【発明の開示】

【0008】

開示の概要

驚くべきことに、薬学的に許容される亜硝酸塩の投与が心臓血管系の調整に有用であるということが見出された。また、驚くべきことに、亜硝酸塩がインビボで一酸化窒素に還元され、それによって生成される一酸化窒素が有効な血管拡張剤であるということが見出された。これらの効果は、驚くべきことに、臨床的に有意なメトヘモグロビン血症を生じさせない用量で発揮される。これらの発見により、心臓血管系に関連する状態、たとえば

50

高血圧、肺高血圧症、脳血管痙攣および組織虚血-再かん流傷害を予防し、処置する方法がここで可能となる。またこれらの発見により、組織、たとえば低酸素圧領域の組織への血流を増大させる方法が提供される。亜硝酸塩が心臓血管系を調整する効果を示すために、より具体的にはインビボで血管拡張剤として作用するために、酸性化状態で適用されなくてもよいということは、特に驚くべきことである。

【0009】

本発明者らにより、亜硝酸塩が、ヒトにおいてシアン化物中毒のために過去に使用されてきた濃度よりもはるかに低い濃度（ $0.9\mu\text{M}$ の低さ）で血管拡張剤として作用することができるということが実証された。その機序は、亜硝酸塩と脱酸素化ヘモグロビンおよび赤血球とが反応して血管拡張性一酸化窒素ガスを生成することを含むと考えられる。この強力な生物学的作用は、臨床的に有意なメトヘモグロビン血症を生じさせない（たとえば、対象中、メトヘモグロビン20%未満、より好ましくは5%未満）亜硝酸塩用量で認められる。

10

【0010】

亜硝酸塩がインビボで一酸化窒素に転換され、それによって生成される一酸化窒素が有効な血管拡張剤であることが見いだされた。驚くべきことに、亜硝酸塩、たとえば薬学的に許容される亜硝酸塩の対象への投与が、血圧の低下、および組織、たとえば低酸素圧領域の組織への血流の増大を生じさせるということがさらに見いだされた。これらの発見により、心臓血管系を調整して、たとえば心臓血管系に関連する異常、たとえば高血圧を予防し処置する、あるいは、血流を欠く、または血流が不十分である器官、組織、または系を調整する有用な方法がここで可能となる。考えられる異常の非限定的な例は、脳卒中、心臓病、腎臓病および腎不全、高血圧性網膜症をはじめとする眼の損傷、糖尿病、ならびに片頭痛を含む。

20

【0011】

一つの例示的な態様において、本開示は、対象の血圧を下げる、または血流を高める方法であって、特定の態様では、対象に対し、毎分約 $36\mu\text{mol}$ の亜硝酸ナトリウムを前腕上腕動脈に投与することを含む方法を提供する。

【0012】

本開示はさらに、対象の組織への血流を高める方法であって、薬学的に許容される亜硝酸イオン、たとえばその塩の有効量を対象に投与して、対象の組織への血流を高めることを含む方法を提供する。血流は、低酸素圧領域の組織で特異的に高めることができる。本開示はまた、対象の血圧を下げる方法であって、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量を対象に投与して、対象の血圧を下げることを含む方法を提供する。

30

【0013】

本開示はさらに、高血圧または血流の低下に関連する状態を有する対象を処置する方法であって、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量を対象に投与して、高血圧に関連する少なくとも一つの血管性合併症を処置することを含む方法を提供する。

【0014】

また、溶血性状態を有する対象を処置する方法であって、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量を対象に投与して、溶血性状態に関連する少なくとも一つの血管性合併症を処置することを含む方法も提供する。

40

【0015】

本開示はさらに、肺における高血圧に関連する状態、たとえば肺高血圧症を有する対象を処置する方法であって、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。一部の態様では、これは、新生児肺高血圧症を有する対象を処置することを含む。一部の態様では、これは、原発性および／または続発性肺高血圧症を有する対象を処置することを含む。肺における高血圧に関連する状態を有する対象を処理するための一部の態様では、亜硝酸塩は噴霧される。

【0016】

血流の他の状態または血流に関連する他の状態、たとえば血管痙攣、脳卒中、狭心症、

50

冠状動脈および他の動脈（末梢血管疾患）の血管再生、移植（たとえば腎臓、心臓、肺、または肝臓の）、重要な器官への再かん流傷害を防ぐための低血圧の処置（たとえばショックまたは外傷、手術および心肺停止で見られるような）、皮膚潰瘍（たとえば局所的非酸性化亜硝酸塩を用いる）、レイノー現象を処置、改善、または予防する方法、ならびに溶血性状態（たとえば鎌状赤血球、マラリア、TTP、およびHUS）および本明細書で挙げる他の状態の処置も、本明細書において想定される。

【0017】

添付図面を参照しながら進める以下のいくつかの態様の詳細な説明から、前記および他の特徴および利点が理解されるであろう。

【0018】

開示の詳細な説明

I. 略号

ANOVA	分散分析
デオキシRBC	脱酸素化赤血球
FBF	前腕血流
L-NMMA	L-NG-モノメチル-アルギニン
NO	一酸化窒素
NOS	一酸化窒素合成酵素
MAP	平均動脈圧
MetHb	メトヘモグロビン
オキシRBC	酸素化赤血球
PBS	リン酸緩衝食塩水
pO ₂ （またはPo ₂ ）	部分酸素圧
S-NO	S-ニトロソ-ヘモグロビン

【0019】

II. 用語

特に断りがない限り、本明細書で使用する用語は、その標準的な定義および一般的な用法に準じる。たとえば、当業者は、本明細書で使用される用語の定義を辞書ならびに参考書、たとえばStedman's Medical Dictionary (26th Ed., Williams and Wilkins, Editor M. Spraycar, 1995); The New Oxford American Dictionary (Oxford University Press, Eds E. Jewell and F. Abate 2001); Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); and Hawley's Condensed Chemical Dictionary, 11th Ed. (Eds. N. I. Sax and R. J. Lewis, Sr., Van Nostrand Reinhold, New York, New York, 1987); Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference (VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8))で得ることができる。

【0020】

様々な態様の検討を容易にするため、以下に特定の用語の説明を提供する。

【0021】

動物：生きた多細胞脊椎生物、すなわち、たとえば哺乳動物およびトリを含むカテゴリー。哺乳動物とは、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方を含む。

【0022】

脳虚血または虚血性脳卒中：脳への動脈または脳内の動脈が部分的または完全に閉塞されて、組織の酸素要求量が酸素供給量を超える場合に起こる状態。脳は、虚血性脳卒中のうち酸素および他の栄養素を奪われると、脳卒中の結果として損傷を受ける。

【0023】

虚血性脳卒中は、いくつかの異なる種類の疾病によって生じる。もっとも一般的な問題は、頸部または頭部の動脈の狭小化である。これは、非常に多くの場合、アテローム性硬化症または徐々に起こるコレステロール付着によって生じる。動脈が狭くなりすぎると、血液細胞がその中で凝集し、血餅（血栓）を形成する。これらの血餅が、それが形成した

10

20

30

40

50

ところで動脈を閉塞することもあるし（血栓症）、遊離して脳により近い動脈中に捕らえられることもある（塞栓症）。

【0024】

脳卒中のもう一つの原因は心臓内の血餅であり、これは不規則な心拍（たとえば心房細動）、心臓発作、または心臓弁の異常の結果として生じうる。これらが虚血性脳卒中のもっとも一般的な原因であるが、他にも多くの原因がある。例としては、麻薬の使用、頸部の血管への外傷、または血液凝固の異常がある。

【0025】

虚血性脳卒中は、すべての脳卒中の約80%を占め、断然もっとも一般的な種類の脳卒中である。脳卒中は、子供を含む全年齢の人に影響するおそれがある。虚血性脳卒中を起こす多くの人は高齢者（60歳以上）であり、脳卒中の危険は加齢とともに増大する。各年齢で、脳卒中は女性よりも男性に一般的であり、白人アメリカ人よりもアフリカ系アメリカ人に一般的である。脳卒中を起こす多くの人は、脳卒中の危険を高める他の問題または状態、たとえば高血圧（高血圧症）、心臓病、喫煙、または糖尿病をかかえている。

【0026】

低酸素症：体の組織に達する酸素量の欠乏。

【0027】

注射用組成物：少なくとも一つの有効成分、たとえば亜硝酸塩を含む薬学的に許容される流体組成物。有効成分は通常、生理学的に許容される担体に溶解または懸濁され、組成物は、少量の一つまたは複数の非毒性補助物質、たとえば乳化剤、保存料、pH緩衝剤などをさらに含むことができる。本開示の組成物と共に使用するのに有用なそのような注射用組成物は従来のものであり、適切な処方当技術分野において周知である。

【0028】

虚血：たとえば一つまたは複数の血管の狭窄または閉塞によって体の器官、組織、または部位への血液供給の低下が生じる血管の現象。虚血は、ときには、血管狭窄または血栓症または塞栓症から生じる。虚血は、直接的な虚血性損傷、すなわち酸素供給の低下によって生じる細胞死による組織損傷を招くことがある。

【0029】

虚血／再かん流傷害：虚血／再かん流傷害は、血流の欠乏の際に起こる直接的な傷害に加えて、血流が回復した後に起こる組織傷害をも含む。現在この傷害の多くは、虚血性組織中に放出される化学的産物およびフリーラジカルによって生じると理解されている。

【0030】

組織が虚血を受けると、最終的に細胞機能不全および壊死を招くおそれのある一連の化学的事象が始まる。血流の回復によって虚血が終了したとしても、第二の一連の傷害性事象が続発してさらなる傷害を生じさせる。したがって、対象の血流に一過性の低下または中断がある場合は常に、結果的な傷害は、二つの成分、すなわち、虚血期間中に起こる直接的な傷害およびそれに続く間接的または再かん流傷害を伴う。長期間の虚血がある場合、低酸素症から生じる直接的な虚血性損傷が支配的である。比較的短時間の虚血の場合、間接的または再かん流媒介損傷がますます重大になる。場合によっては、再かん流によって生じる傷害が、虚血そのものによって誘発される傷害よりも重篤になることがある。この直接的機序からの傷害と間接的機序からの傷害との相対的寄与のパターンは、すべての器官で起こることが示されている。

【0031】

メトヘモグロビン：ヘム成分中の鉄が二価鉄（+2）状態から三価鉄（+3）状態に酸化されているヘモグロビンの酸化形態。これは、ヘモグロビン分子が効果的に酸素を輸送し、組織に放出することを不可能にする。通常、総ヘモグロビン中の約1%がメトヘモグロビン形態である。

【0032】

メトヘモグロビン血症：対象の血液中のヘモグロビンの実質的部分がメトヘモグロビン形態にあり、酸素を効果的に組織に運ぶことができなくなった状態。メトヘモグロビン血症

10

20

30

40

50

は遺伝性障害であるが、硝酸塩（硝酸塩汚染水）、アニリン染料、および塩素酸カリウムのような化学物質への暴露によって後天的に獲得されることもある。臨床状況で重大なのは、メトヘモグロビンの存在ではなく、その量である。以下、血液中の様々なレベルのメトヘモグロビンに関連する症候のおおよその指標を提供する。<1.7%、正常；10~20%、軽いチアノーゼ（実質的に無症候性であるが、「チョコレート色」の血液を生じることがある）；30~40%、頭痛、疲労、頻脈、脱力感、めまい；>35%、低酸素症の症候、たとえば呼吸困難および眠気；50~60%、アシドーシス、不整脈、昏睡、痙攣、徐脈、重篤な低酸素症、発作；>70%、通常は死に至る。

【0033】

亜硝酸塩：無機アニオン NO_2^- または亜硝酸の塩（ NO_2^- ）。亜硝酸塩は多くの場合、可溶性が高く、酸化されて硝酸塩を形成することもできるし、還元されて一酸化窒素またはアンモニアを形成することもできる。亜硝酸塩は、アルカリ金属、たとえばナトリウム（ NaNO_2 、亜硝酸ナトリウム塩としても知られる）、カリウムおよびリチウム、アルカリ土類金属、たとえばカルシウム、マグネシウムおよびバリウム、有機塩基、たとえばアミン塩基、たとえばジシクロヘキシルアミン、ピリジン、アルギニン、リシンなどと塩を形成することもできる。多様な有機および無機塩基から他の亜硝酸塩を形成することもできる。特定の態様では、亜硝酸塩は、ナトリウム、カリウム、およびアルギニンから選択されるカチオンと送達される亜硝酸アニオンの塩である。多くの亜硝酸塩が市販されており、従来の技術を使用して容易に製造することもできる。

【0034】

非経口的：腸管外で投与される、たとえば、消化管を介さず投与されること。一般に、非経口製剤は、経口摂取以外の任意の可能な形態を介して投与される製剤である。この語は特に、静脈、鞘内、筋肉、腹腔内、または皮下を問わない注射、およびたとえば鼻腔内、皮内、および外用局所塗布をはじめとする様々な表面塗布に関していう。

【0035】

薬学的に許容される担体：本開示で有用な薬学的に許容される担体は従来のものである。E. W. MartinによるRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)に、本明細書で開示する化合物の薬学的送達に適した組成物および製剤が記載されている。

【0036】

一般に担体の性質は、使用される特定の投与形態に依存する。たとえば、非経口製剤は通常、薬学的かつ生理学的に許容される流体、たとえば水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどを溶媒として含む注射用流体を含む。固形組成物（たとえば粉末、ピル、錠剤、またはカプセル形）の場合、従来の非毒性固形担体として、たとえば、医薬品等級のマニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムがある。投与される薬学的組成物は、生物学的に中性の担体に加えて、少量の非毒性補助物質、たとえば湿潤剤または乳化剤、保存料、およびpH緩衝剤など、たとえば酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートを含むことができる。

【0037】

末梢血管疾患（PVD）：腕または脚に血液を運ぶ動脈が狭小化または閉塞する状態。これは正常な血流を妨害し、ときには痛みを生じさせるが、多くの場合、容易に検知可能な症候をまったく生じない。

【0038】

もっとも一般的なPVDの原因は、アテローム硬化症、すなわち、コレステロールおよび瘢痕組織が蓄積して、血管を閉塞させるプラークを形成する緩やかな過程である。場合によってはPVDは、動脈中にとどまり、血流を制限する血餅によって生じることがある。PVDは、50歳を超える20人に約1人、または合衆国内で800万人に影響を及ぼしている。PVDをもつ人の半数超が脚の痛み、しびれ感または他の症候を経験するが、多くの人はこれらの徴候を「正常な加齢の一部」として片づけ、医学的支援を求めようとしない。PVDのもっとも一般的な症候は、特に歩行時の、脚または股関節の痛みを伴う痙攣である。「跛行」

10

20

30

40

50

とも知られるこの症候は、運動中に十分な血液が脚部筋肉中を流れず、結果として虚血が起こる場合に発生する。通常、筋肉を休息させると痛みは消える。

【0039】

他の症候として、脚のしびれ感、刺痛または脱力感がある。重篤な場合には、PVDをもつ人は、休息中に末端、たとえば足または足指に灼熱痛またはうずく痛みを感じたり、癒えることのない脚または足の痛みを発したりすることもある。また、PVDをもつ人は、脚もしくは足の皮膚の冷えもしくは変色または脚の毛の抜けを経験することもある。極端な場合には、未処置のPVDは、壊疽、すなわち、脚、足または足指の切断を免れない深刻な状態につながるおそれもある。PVDをもつ人はまた、心臓病および脳卒中の危険が高い。

【0040】

「薬剤」または「薬物」とは、対象に正しく投与されると所望の治療または予防効果を誘発することができる化合物または他の組成物をいう。

【0041】

疾病の予防または治療：疾病の「予防」とは、疾病の完全な発症を阻止することをいう。

「処置」とは、疾病または病的状態が発症し始めた後に、その徴候または症候を改善する治療的介入をいう。

【0042】

精製された：この語は絶対的な純度を要求するものではない。むしろ、相対的な語として解釈される。したがって、たとえば、精製された亜硝酸塩調製物とは、特定の亜硝酸塩がその生成環境、たとえば生化学的反応チャンバー内よりも濃縮されている調製物である。好ましくは、特定の亜硝酸塩の調製物は、その亜硝酸塩が調製物中の総亜硝酸塩含量の少なくとも50%を占めるように精製されている。一部の態様では、精製された調製物は、特定の化合物、たとえば特定の亜硝酸塩を少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれを超える濃度で含有する。

【0043】

再かん流：血液供給が低下して虚血を起こした組織への血液供給の回復。再かん流は、生存可能な虚血性組織を回復させ、それによってさらなる壊死を抑制することによって梗塞または他の虚血を処置するための手法である。しかし、再かん流そのものが虚血性組織をさらに損傷し、再かん流傷害を生じさせるおそれもあると考えられている。

【0044】

対象：脊椎生物、すなわち、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方を含むカテゴリーを含む、生きた多細胞生物。

【0045】

治療：診断および処置の両方を含む総称。

【0046】

〔血管拡張剤〕の治療有効量：処置される対象において所望の効果を達成するのに十分な化合物、たとえば亜硝酸塩の量。たとえば、対象において比較的高い血圧を処置もしくは改善する、またはある期間にわたって血圧を計測可能な程度に低下させる、または血圧の上昇を計測可能な程度に抑止するのに必要な量でありうる。

【0047】

血管拡張剤の有効量は、単一用量で投与することもできるし、いくつかの用量で、たとえば処置の過程で日毎に投与することもできる。しかし、有効量は、適用される化合物、処置を受ける対象、病気の重篤度およびタイプ、ならびに化合物の投与法に依存する。たとえば、有効成分の治療有効量は、効果を生じさせる、血液中（インビボ）または緩衝剤中（インビトロ）の有効成分（たとえば薬学的に許容される亜硝酸塩）の濃度（1リットルあたりのモル数またはモル濃度M）で計測されうる。

【0048】

例として、本明細書に記載するように、ここで、薬学的に許容される亜硝酸塩（たとえば亜硝酸ナトリウム）が、対象の循環血中で約0.6～約200 μM の最終濃度の計算用量で血管拡張剤として有効であることが示されており、このレベルは経験的または計算によって

10

20

30

40

50

測定することができる。特定のレベルには、たとえば、単一用量またはある期間にわたって提供される用量で約200mg以下の亜硝酸塩を提供することによって（たとえば注入または吸入によって）達することができる。たとえば、他の用量は、150 mg、100 mg、75 mg、50 mgまたはそれ未満であることもできる。本明細書では亜硝酸塩の用量の具体例が提供されるが、これらの例は限定的であることを意図しない。正確な用量は、処置される対象のサイズ、処置の期間、投与形態などによって異なる。

【0049】

血管拡張剤、たとえば薬学的に許容される亜硝酸塩（たとえば亜硝酸ナトリウム）の特に有益な治療有効量は、血管拡張または血流の増大に有効な量であるが、血管拡張剤が投与される対象中で有意なレベルまたは毒性レベルのメトヘモグロビンが生成されるほど高くはない。具体的な態様では、たとえば、対象中で約25%以下のメトヘモグロビンしか生成されない。より好ましくは、血管拡張剤での処置に応答して、20%以下、15%以下、10%以下、8%以下またはそれ未満のメトヘモグロビン、たとえば5%または3%またはそれ未満のメトヘモグロビンしか生成されない。

10

【0050】

本明細書で論じる化合物は、医学および獣医学の状況で等しく適用される。したがって、総称「処置される対象」とは、血圧の異常、たとえば高血圧症に病んでいる、または病んでいるおそれのあるすべての動物（たとえばヒト、類人猿、実験動物、愛玩動物など）を含むものと理解される。

【0051】

20

血管狭窄：血管の口径または断面積の減少、たとえば身体部分への血流の低下につながる細動脈の狭窄。これは、特定の血管狭窄剤、すなわち血管の狭窄を直接的または間接的に生じさせる薬剤（たとえば化学物質または生化学的化合物）によって生じることがある。このような薬剤はまた、血管緊張剤と呼ばれることもあり、血管狭窄活性を有するといわれる。血管狭窄剤の代表的なカテゴリーは、毛細血管および動脈の筋組織の収縮を刺激する薬剤をさして一般に使用される、昇圧剤（「昇圧」という語から、血圧を高める傾向を有する）である。

【0052】

血管狭窄はまた、血管痙攣、不十分な血管拡張、血管壁の肥厚化、または内壁面もしくは壁そのものの流れを制限する物質の蓄積によって起こりうる。血管狭窄は、加齢、ならびにとりわけ進行性全身性アテローム発生、心筋梗塞、脳卒中、高血圧症、緑内障、黄斑変性症、片頭痛、高血圧症および糖尿病をはじめとする様々な臨床状態における、主要な推定要因または立証済みの要因である。

30

【0053】

血管拡張：血管の口径が増大した状態または血管を拡張する行為、たとえば身体部分への血流の増大につながる細動脈の拡張。これは、特定の血管拡張剤、すなわち血管の拡張を直接的または間接的に生じさせる薬剤（たとえば化学物質または生化学的化合物）によって生じうる。このような薬剤はまた、血管弛緩剤とも呼ばれることがあり、血管拡張活性を有するといわれる。

【0054】

40

血管痙攣：脳卒中のもう一つの原因は、脳に供給する血管の痙攣に続発して起こる。このタイプの脳卒中は通常、くも膜下動脈瘤出血に続いて起こり、出血事象から2〜3週以内に血管痙攣の遅延発症を伴う。類似したタイプの脳卒中は、鎌状赤血球病を併発するおそれがある。

【0055】

特に断りがない限り、本明細書で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。単数形の語は、文脈により明らかに示されていない限り、複数の指示対象も包含する。同様に、「または」という語は、文脈により明らかに示されていない限り、「および」も含むと解釈される。したがって、「AまたはBを含む」とは、AもしくはB、またはAおよびBを含むこと

50

を意味する。さらには、核酸またはポリペプチドに関して記す、すべての塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、およびすべての分子量または分子質量の値は概算値であり、説明のために提供されていることが理解されるべきである。本明細書に記載されたものと類似の、または同等な方法および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、適当な方法および材料を以下に記す。本明細書で言及するすべての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、全体が参照として本明細書に組み入れられる。矛盾がある場合、用語の説明を含めて本明細書が優先する。加えて、材料、方法、および例は例示目的に過ぎず、限定的であることを意図しない。

【0056】

III. いくつかの態様の概説

驚くべきことに、薬学的に許容される亜硝酸塩の投与が心臓血管系の調整に有用であるということが見出された。また、驚くべきことに、亜硝酸塩がインビボで一酸化窒素に還元され、それによって生成される一酸化窒素が有効な血管拡張剤であるということが見出された。これらの効果は、驚くべきことに、臨床的に有意なメトヘモグロビン血症を生じさせない用量で発揮される。これらの発見により、心臓血管系に関連する状態、たとえば高血圧、肺高血圧症、脳血管痙攣および組織虚血-再かん流傷害を予防し、処置する方法がここで可能となる。これらの発見はまた、組織、たとえば低酸素圧領域の組織への血流を増大させる方法を提供する。亜硝酸塩が、心臓血管系を調整する効果を示すために、より具体的にはインビボで血管拡張剤として作用するために、酸性化状態で適用されなくてもよいということは特に驚くべきことである。

【0057】

したがって、本開示は、一つの態様において、対象の血圧を下げる方法であって、対象に対し、毎分約36 μmol 以下の亜硝酸ナトリウムを前腕上腕動脈または静脈内に投与することを含む方法を提供する。

【0058】

本開示はまた、対象の血圧を下げる方法であって、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量を対象に投与して、対象の血圧を下げる（または低くする、または減少させる）ことを含む方法を提供する。もう一つの態様は、高血圧に関連する状態を有する対象を処置する方法であって、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量を対象に投与して、高血圧に関連する少なくとも一つの血管性合併症を処置することを含む方法である。同じく提供されるものは、溶血性状態を有する対象を処置する方法であって、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量を対象に投与して、溶血性状態に関連する少なくとも一つの血管性合併症を処置することを含む方法である。

【0059】

本開示はさらに、対象の組織への血流を増大させる方法であって、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量を対象に投与して、対象の組織への血流を増大させることを含む方法を提供する。同じく提供されるものは、対象の血圧を下げるのに有効な量のNOを対象中で生成する方法であって、薬学的に許容される亜硝酸塩を対象に投与することを含む方法である。

【0060】

本開示はさらに、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量および担体を含む薬学的組成物を提供する。

【0061】

一部の態様では、血管性合併症は、肺高血圧症（新生児肺高血圧症、原発性肺高血圧症、および続発性肺高血圧症を含む）、全身性高血圧症、皮膚潰瘍、急性腎不全、慢性腎不全、血管内血栓、虚血性中枢神経系事象、および死からなる群より選択される一つまたは複数である。

【0062】

一部の態様では、亜硝酸塩は、肺高血圧症を処置するために新生児に投与される。

【0063】

一部の態様では、溶血性状態は、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ヘモグロビンC症、ヘモグロビンSC症、鎌状赤血球サラセミア、遺伝性球状赤血球症、遺伝性橢円赤血球症、遺伝性オーバルサイトーシス、グルコース-6-リン酸欠乏症および他の赤血球酵素欠乏症、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、発作性寒冷ヘモグロビン尿症（PCH）、血栓性血小板減少性紫斑病／溶血性尿毒性症候群（TTP／HUS）、特発性自己免疫性溶血性貧血、薬物誘発免疫溶血性貧血、続発性免疫溶血性貧血、化学的または物理的因子によって生じる非免疫溶血性貧血、マラリア、熱帯熱マラリア、バルトネラ症、バベシア病、クロストリジウム感染症、重度ヘモフィルスインフルエンザタイプb感染症、広範な熱傷、輸血副作用、横紋筋融解症（ミオグロブリン血症）、高齢血（aged blood）の輸血、心肺バイパス、および血液透析から選択される一つまたは複数を含む。

10

【0064】

一部の態様では、組織への血流の低下は、以下の状態の少なくとも一つによって直接的または間接的に生じる。鎌状赤血球貧血、サラセミア、ヘモグロビンC症、ヘモグロビンSC症、鎌状赤血球サラセミア、遺伝性球状赤血球症、遺伝性橢円赤血球症、遺伝性オーバルサイトーシス、グルコース-6-リン酸欠乏症および他の赤血球酵素欠乏症、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、発作性寒冷ヘモグロビン尿症（PCH）、血栓性血小板減少性紫斑病／溶血性尿毒性症候群（TTP／HUS）、特発性自己免疫性溶血性貧血、薬物誘発免疫溶血性貧血、続発性免疫溶血性貧血、化学的または物理的因子によって生じる非免疫溶血性貧血、マラリア、熱帯熱マラリア、バルトネラ症、バベシア病、クロストリジウム感染症、重度ヘモフィルスインフルエンザタイプb感染症、広範な熱傷、輸血副作用、横紋筋融解症（ミオグロブリン血症）、高齢血の輸血、ヘモグロビンの輸血、赤血球の輸血、心肺バイパス、冠状動脈疾患、心臓虚血症候群、狭心症、医原性溶血、血管形成、心筋虚血、組織虚血、血管内装置によって生じる溶血、血液透析、肺高血圧症、全身性高血圧症、皮膚潰瘍、急性腎不全、慢性腎不全、血管内血栓、および虚血性中枢神経系事象。

20

【0065】

一部の態様では、組織は虚血性組織である。一部の態様では、投与は、非経口、経口、口腔、直腸、エクスピボ、または眼内投与である。一部の態様では、投与は、腹膜内、静脈内、動脈内、皮下、吸入、または筋肉内投与である。一部の態様では、亜硝酸塩は、低酸素圧の環境で対象に投与されるか、比較的低い酸素圧を示す対象の身体区域で作用する。一部の態様では、亜硝酸塩は、薬学的に許容される亜硝酸塩、たとえば亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウム、または亜硝酸アルギニンとして投与される。一部の態様では、亜硝酸塩は、少なくとも一つのさらなる有効薬剤と組み合わせて投与される。特定の態様では、具体的には、対象は哺乳動物、たとえばヒトであることが想定される。

30

【0066】

本開示はさらに、肺における高血圧に関連する状態、たとえば肺高血圧症を有する対象を処置する方法であって、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。一部の態様では、新生児肺高血圧症を有する対象を処置することを含む。一部の態様では、原発性および／または続発性肺高血圧症を有する対象を処置することを含む。肺における高血圧に関連する状態を有する対象を処理するための一部の態様では、亜硝酸塩は噴霧される。

40

【0067】

このように本明細書では、対象において血管拡張を誘発および／または血流を増大させる方法であって、対象において血管拡張を誘発および／または血流を増大させるのに十分な期間、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量を対象に投与することを含む方法が提供される。薬学的に許容される亜硝酸塩の非限定的な例として、亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウム、および亜硝酸アルギニンが挙げられる。提供される方法の例として、薬学的に許容される亜硝酸塩は、対象中のヘモグロビンの存在下で反応し、一酸化窒素を放出する。

【0068】

本明細書で提供する方法の具体的な利点は、対象に投与される薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量が毒性レベルのメトヘモグロビンを誘発せず、多くの態様で、対象において

50

臨床的に有意な量のメトヘモグロビンの形成を誘発しないということである。したがって、本明細書で考慮するものは、薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量が対象に投与されると、対象において約25%以下のメトヘモグロビン、約20%以下のメトヘモグロビン、約10%以下のメトヘモグロビン、約8%以下のメトヘモグロビン、または約5%以下のメトヘモグロビンの生成を誘発する方法である。有利には、提供される方法の例は、5%未満のメトヘモグロビン、たとえば約3%以下のメトヘモグロビン、3%未満のメトヘモグロビン、2%未満のメトヘモグロビン、または1%未満のメトヘモグロビンの生成しか誘発しない。

【0069】

対象において血管拡張を誘発および／または血流を増大させる方法の一つの具体例では、亜硝酸ナトリウムを注射によって毎分約36 μmol で少なくとも5分間、対象の前腕上腕動脈に投与する。

10

【0070】

薬学的に許容される亜硝酸塩の有効量は、様々な態様において、投与部位で局所的または対象内で全体的に計測して、対象中で約0.6~240 μM の循環濃度まで投与される。なお、亜硝酸塩の局所レベルは、特に短期送達計画では一般的な循環レベルよりも高いと予想される。長期送達計画では、たとえばポンプもしくはインジェクタを使用する送達または吸入による送達では、全システムのまたは全体的な亜硝酸塩レベルは、投与部位の近くで計測されるレベルに近いと予想される。

【0071】

薬学的に許容される亜硝酸塩の投与は、特定の態様では、たとえば、非経口、経口、口腔、直腸、エクスピボ、または眼内投与であることができる。様々な態様では、亜硝酸塩の投与は、腹膜内、静脈内、動脈内、皮下、吸入、筋内、または心肺バイパス回路への投与でありうるということが想定される。また、二つ以上の投与経路の組み合わせも考えられる。

20

【0072】

対象において血管拡張を誘発および／または血流を増大させる方法の様々な態様では、対象は哺乳動物である。特に、対象はヒトでありうるということが想定される。

【0073】

亜硝酸塩を少なくとも一つのさらなる薬剤と組み合わせて投与する組み合わせ療法が考えられる。非限定的な例として、さらなる薬剤は、ペニシリン、ヒドロキシ尿素、酪酸塩、クロトリマゾール、アルギニン、またはホスホジエステラーゼ阻害薬（たとえばシルデナフィル）からなるリストより選択される一つまたは複数である。

30

【0074】

対象において血管拡張を誘発および／または血流を増大させる方法のもう一つの態様において、対象は高血圧を有し、方法は、高血圧に関連する少なくとも一つの血管性合併症を処置する方法であり、あるいは、対象は溶血性状態を有し、方法は、溶血性状態に関連する少なくとも一つの血管性合併症を処置する方法である。場合によっては、対象は高血圧および溶血性状態の両方を有することもある。

【0075】

本明細書で提供する方法の例では、少なくとも一つの血管性合併症は、肺高血圧症、全身性高血圧症、末梢血管疾患、外傷、心停止、一般的な手術、臓器移植、皮膚潰瘍、急性腎不全、慢性腎不全、血管内血栓、狭心症、虚血-再かん流事象、虚血性中枢神経系事象、および死からなる群より選択される一つまたは複数である。

40

【0076】

対象が溶血性状態を有する場合の方法の例では、溶血性状態は、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ヘモグロビンC症、ヘモグロビンSC症、鎌状赤血球サラセミア、遺伝性球状赤血球症、遺伝性橢円赤血球症、遺伝性オーバルサイトーシス、グルコース-6-リン酸欠乏症および他の赤血球酵素欠乏症、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、発作性寒冷ヘモグロビン尿症（PCH）、血栓性血小板減少性紫斑病／溶血性尿毒症症候群（TTP／HUS）、特発性自己免疫性溶血性貧血、薬物誘発免疫溶血性貧血、続発性免疫溶血性貧血、化学的または物理的因子によって生じる非免疫溶血性貧血、マラリア、熱帯熱マラリア、バルトネ

50

ラ症、バベシア病、クロストリジウム感染症、重度ヘモフィルスインフルエンザタイプb感染症、広範な熱傷、輸血副作用、横紋筋融解症（ミオグロブリン血症）、高齢血の輸血、ヘモグロビンの輸血、赤血球の輸血、心肺バイパス、冠状動脈疾患、心臓虚血症候群、狭心症、医原性溶血、血管形成、心筋虚血、組織虚血、血管内装置によって生じる溶血、および血液透析からなる群より選択される一つまたは複数である。

【0077】

対象において血管拡張を誘発および／または血流を増大させる方法のさらに別の態様では、対象は、組織への血流の低下に関連する状態を有し、方法は、対象の組織への血流を増大させる方法である。たとえば、この方法の例では、組織への血流の低下は、鎌状赤血球貧血、サラセミア、ヘモグロビンC症、ヘモグロビンSC症、鎌状赤血球サラセミア、遺伝性球状赤血球症、遺伝性橢円赤血球症、遺伝性オーバルサイトーシス、グルコース-6-リン酸欠乏症および他の赤血球酵素欠乏症、発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）、発作性寒冷ヘモグロビン尿症（PCH）、血栓性血小板減少性紫斑病／溶血性尿毒症性症候群（TTP／HUS）、特発性自己免疫性溶血性貧血、薬物誘発免疫溶血性貧血、続発性免疫溶血性貧血、化学的または物理的因子によって生じる非免疫溶血性貧血、マラリア、熱帯熱マラリア、バルトネラ症、バベシア病、クロストリジウム感染症、重度ヘモフィルスインフルエンザタイプb感染症、広範な熱傷、輸血副作用、横紋筋融解症（ミオグロブリン血症）、高齢血の輸血、ヘモグロビンの輸血、赤血球の輸血、心肺バイパス、冠状動脈疾患、心臓虚血症候群、狭心症、医原性溶血、血管形成、心筋虚血、組織虚血、血管内装置によって生じる溶血、血液透析、肺高血圧症、全身性高血圧症、皮膚潰瘍、急性腎不全、慢性腎不全、血管内血栓、および虚血性中枢神経系事象からなる群より選択される少なくとも一つの状態によって直接的または間接的に生じる。

【0078】

この方法の例では、具体的には、組織は、虚血性組織、たとえば神経細胞組織、腸組織、腸管組織、四肢組織、肺組織、中枢神経組織、または心組織からなる群より選択される一つまたは複数の組織であることが想定される。

【0079】

同じく提供されるものは、高血圧を有する対象において血管拡張を誘発および／または血流を増大させる方法であって、高血圧が肺における高血圧を含む方法である。例として、このような対象は場合によっては、新生児肺高血圧症、または原発性および／もしくは続発性肺高血圧症を有することが想定される。

【0080】

対象における高血圧または血流を増大させる必要性が、肺における高血圧または血流を増大させる必要性を含む態様の例では、薬学的に許容される亜硝酸塩は噴霧される。

【0081】

例として、様々な態様において、薬学的に許容される亜硝酸塩は、対象中で約100 μM 以下、約50 μM 以下、約20 μM 以下、約16 μM 以下、または約16 μM 未満の循環濃度まで投与される。

【0082】

IV. インビボ血管拡張剤としての亜硝酸ナトリウム

亜硝酸アニオンは、血漿中で約150～1000 nMの濃度、大動脈組織中で約10 μM の濃度で存在する。亜硝酸塩をNOに還元するための生理学的機序が存在するとすると、これは一酸化窒素（NO）の最大血管プールに相当する。ヒト前腕における亜硝酸塩の血管拡張特性およびその生体活性化のために現存する機序が調査され、結果が本明細書で報告されている。亜硝酸ナトリウムを毎分約36 μmol で健常なボランティア18名の前腕上腕動脈に注入すると、安静時の前腕血流中に約222 μM の局所亜硝酸塩濃度および約175%の即座の増大が得られた。血流の増大は、安静時、NO合成酵素阻害中および運動時に認められ、静脈ヘモグロビン酸素飽和度、酸素分圧、およびpHの増大によって実証されるように、組織かん流の増大を生じさせた。亜硝酸塩の全身濃度は約16 μM に増大し、平均動脈血圧を有意に低下させた。さらに6名の対象で、亜硝酸塩用量を約2対数減らし、毎分360 nmolで注入すると

10

20

30

40

50

、約2 μM の前腕亜硝酸塩濃度および約22%の血流増が生じた。

【0083】

亜硝酸塩注入は、前腕血管系にかけて、赤血球鉄-ニトロシル-ヘモグロビンの形成と関連し、程度は低めであるが、S-ニトロソ-ヘモグロビンの形成とも関連していた。NO修飾ヘモグロビンの形成は、デオキシヘモグロビンの亜硝酸塩還元酵素活性から生じるようであり、組織低酸素症と亜硝酸塩生体活性化とをリンクさせる。

【0084】

これらの結果は、血液および組織亜硝酸塩の生理学的レベルが血管調節に寄与し、血管亜硝酸塩と脱酸素化ヘムタンパク質との反応を介して低酸素血管拡張の機序を提供する生物学的に利用可能な主要なNOプールに相当するということを示す。健常なヒト対象の上腕動脈への亜硝酸塩注入の実質的な血流効果は、約0.9 μM という低い前腕亜硝酸塩濃度から生じる。

【0085】

例として、本明細書に記載するように、薬学的に許容される亜硝酸塩（たとえば亜硝酸ナトリウム）が、対象の循環血中で約0.6～約200 μM の最終亜硝酸塩濃度の計算用量で、血管拡張剤として有効であることがここで示される。たとえば、単一用量またはある期間にわたって提供される用量（たとえば注入または吸入によって）で約200mg以下の亜硝酸塩を提供することにより、特定の循環レベル（対象中で局所的または全身的）を実現することができる。たとえば、他の用量は、150 mg、100 mg、75 mg、50 mgまたはそれ未満であってもよい。亜硝酸塩の具体的な用量の例が本明細書で提供されるが、それらの例は限定的であることを意図しない。正確な用量は、処置される対象のサイズ、処置の期間、投与形態などによって異なる。

【0086】

所与の目標循環濃度が望まれる場合の注入速度は、以下の式を使用することによって計算することができる。

注入速度（ $\mu\text{M}/\text{min}$ ）＝目標濃度（ $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、すなわち μM ）×除去率（ L/min ）

ただし、除去率（ L/min ）＝0.015922087×対象の体重（kg）↑0.8354

【0087】

除去率は、本明細書で報告するものを含め、経験的結果に基づいて計算したものである。

【0088】

たとえば、亜硝酸ナトリウムが毎分36マイクロモル（ μMol ）でヒト前腕に注入される場合、15分間の注入ののち、前腕から得られる計測濃度は約222 μM であり、全身では約16 μM である。哺乳動物中で循環する亜硝酸塩のバックグラウンドレベルは低く、約150～500ナノMである。

【0089】

薬学的に許容される亜硝酸塩（たとえば亜硝酸ナトリウム）のような血管拡張剤の特に有利な治療有効量は、血管拡張または血流の増大に有効な量であるが、血管拡張剤が投与される対象中で有意なレベルまたは毒性レベルのメトヘモグロビンが生成されるほど高くない。具体的な態様では、たとえば、対象中で約25%以下のメトヘモグロビンしか生成されない。より好ましくは、血管拡張剤での処置に応答して、20%以下、15%以下、10%以下、8%以下またはそれ未満のメトヘモグロビン、たとえば5%または3%またはそれ未満のメトヘモグロビンしか生成されない。

【0090】

具体例として、亜硝酸塩は、毎分40 μMol 未満の濃度で静脈内または動脈内に注入することもできるし、経口的に与えることもできる。重要なことに、用量は、臨床的に有意なメトヘモグロビン血症を誘発するように設計されているシアン化物中毒の処置に使用される量よりも少ない。驚くべきことに、心臓血管状態の処置／予防のために本明細書で記載される用量は、臨床的に有意なメトヘモグロビン生成なしで、有意で有益な臨床効果を発揮する。

【0091】

狭心症をはじめとする障害を処置するために、比較的複雑な無機／有機亜硝酸化合物および硝酸化合物が臨床的に使用されてきた。これらの薬物（たとえばグリセリルトリニートレート）は耐性の問題をかかえる（同じ効果を維持するためには用量を増やさなければならない）が、亜硝酸塩とは明らかに異なる血管拡張剤である。たとえば、前者は、代謝のための細胞チオールを要するが、本明細書で論じる亜硝酸イオンまたは亜硝酸塩（たとえば亜硝酸ナトリウム）は要しない。

【0092】

V. 鉄-ニトロシルおよびS-ニトロソ-ヘモグロビンのインビボ形成の機序

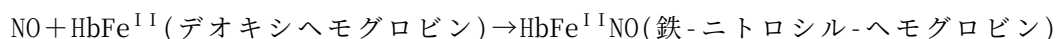
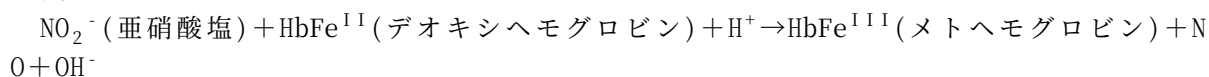
この実験でインビボで形成される鉄-ニトロシル-およびS-ニトロソ-ヘモグロビンのレベルは特筆すべきである。注入された亜硝酸塩（局所濃度200 μM ）は、運動時に前腕を循環する10秒未満の通過時間中、約750nMの鉄-ニトロシル-ヘモグロビンおよび200nMのSNO-Hbを生成した。両NO-ヘモグロビンアダクトの形成は、ヘモグロビン酸素飽和度と逆相関していた。ヘモグロビン酸素飽和度は、コオキシメトリー（co-oxymetry）による肘窩静脈からの計測によると、運動ストレス下で低下していた（鉄-ニトロシル-ヘモグロビンの場合、 $r=-0.7$ 、 $P<0.0001$ 、S-ニトロソ-ヘモグロビンの場合、 $r=-0.45$ 、 $P=0.04$ 、図4B）。異なる酸素圧（0～100%）での全血への200 μM 亜硝酸塩の添加がインビボデータを再現し、低めの酸素圧で増大する濃度の鉄-ニトロシルヘモグロビンが形成され（鉄-ニトロシル-ヘモグロビンの場合、 $r=-0.968$ 、 $P<0.0001$ 、S-ニトロソ-ヘモグロビンの場合、 $r=-0.45$ 、 $P=0.07$ ）、NOおよびSNO形成が亜硝酸塩とデオキシヘモグロビンとの反応に依存するということを強く示唆した。

【0093】

これらのデータは、NOおよび鉄-ニトロシル-ヘモグロビンを形成する亜硝酸塩とデオキシヘモグロビンとの反応と一貫している（Doyle et al., J Biol Chem, 256, 12393-12398, 1981）。まず、亜硝酸塩が還元されて、 $2.9\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ の速度定数（25°C、pH7.0で計測）でNOおよびメトヘモグロビンを形成する。この反応は、赤血球内ヘモグロビンの量（20 mM）によって支配され、赤血球膜による亜硝酸塩取り込みの速度によって制限される擬一次反応（pseudo-first order）である。次に、NOがデオキシヘモグロビンと結合して鉄-ニトロシル-ヘモグロビンを形成して赤血球から脱出し、または他の高級酸化物、たとえばNO₂と反応してN₂O₃およびS-ニトロソ-ヘモグロビンを形成する。

【0094】

式列1



【0095】

また、亜硝酸塩注入中にインビボで有意量のS-ニトロソ-ヘモグロビンの形成が認められた。Luschingerら（Proc Natl Acad Sci USA, 100, 461-6, 2003）は最近、亜硝酸塩がデオキシヘモグロビンと反応して鉄-ニトロシル-ヘモグロビンを形成し、続いてNOがシステイン93に「移行」して、ヘモグロビンの再酸素化および第四級T型-R型転位によって媒介されてS-ニトロソ-ヘモグロビンを形成すると提唱した。しかし、ヘムからチオールへのNOの直接移行はNO+へのNO酸化を要し、そのような「循環」は他の研究グループによって再現されていない。Fernandezらは最近、亜硝酸塩が、NOによるメトヘモグロビンの還元ニトロシル化、すなわち、中間体ニトロソ化種、三酸化二窒素（N₂O₃）を生成する過程を触媒することを示唆した（Inorg Chem, 42, 2-4, 2003）。しかし、ヘモグロビンとの亜硝酸塩の反応は、亜硝酸塩がデオキシヘモグロビンと反応してNOを形成し、オキシヘモグロビンと反応して二酸化窒素（NO₂）ラジカルを形成するので、酸素勾配に沿ってNOおよびS-ニトロソチオールを生成するための理想的な条件を提供する。NO₂は、NOとのラジカル-ラジカル反応（ $k=10^9\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ ）に関与してN₂O₃およびS-ニトロソチオールを形成する。亜硝酸塩とヘモグロビンとのさらなる化学反応は、反応性酸素代謝産物を生成する（

たとえばスーパーオキシドおよび過酸化水素；Watanabe et al., *Acta Med Okayama* 35, 173-8, 1981; Kosaka et al., *Biochim Biophys Acta* 702, 237-41, 1982; and Kosaka et al., *Environ Health Perspect* 73, 147-51, 1987)。このようなNOラジカル-酸素ラジカル反応に参与する化学作用は、ヘモグロビンのような高親和性NOシンクの存在下におけるS-ニトロソチオール形成の競争力の高い経路を提供する。

【0096】

VI. 生理学的考察

過去10年に、一酸化窒素（NO）が血管ホメオスタシスにおいて演じる決定的な役割について理解の深まりが見られた。NOの生成とNOの掃去との間のバランスがNOの生物学的利用能を決定し、このバランスは、正常な生理状態では注意深く維持されている。恒常性血管調整系は、局所強直性血管拡張に必要な十分な局所NOを考慮しながらも過剰なNOを掃去して総エンドクリン作用を制限するように微調整されていることは明白である。しかし、無細胞ヘモグロビンによる急速なNO掃去がこのバランスを乱す（Reiter et al., *Nat Med* 8, 1383-1389, 2002）。正常な生理学的状態では、ヘモグロビンは、ヘモグロビン掃去系によって速やかかつ効果的に除去される。しかし、鎌状赤血球病のような慢性的な溶血性状態は、結果的に、実質的な量のヘモグロビンを日々血管系中に放出させ、無細胞ヘモグロビンがNOの生物学的利用能に対して重大な全身性の影響を及ぼしうることが示唆される。現在の研究の焦点は、多くの慢性溶血性状態、たとえば肺高血圧症、皮膚潰瘍ならびに急性および慢性の腎不全に共通の血管性合併症を説明し、処置することを試みている。同様に、多数の臨床的疾患および治療、たとえば急性溶血発作、心肺バイパス処置中の溶血、高齢血の輸血、および筋梗塞後のミオグロビン尿症は、多くの場合、急性の肺および全身性高血圧症、急性腎不全、血管内血栓、虚血性中枢神経事象および／または死を併発する。

【0097】

亜硝酸塩が、デオキシヘモグロビンによる亜硝酸塩のNOへの還元に伴って、ヒトにおいて血管拡張を生じさせることが本明細書で実証される。注目すべきことに、16 μM の全身レベルが全身性血管拡張および血圧低下を生じさせ、わずか1~2 μM の局所前腕レベルが安静時および運動ストレス下で血流を有意に増大させた。さらに、NOおよびS-ニトロソチオールへの亜硝酸塩の転換は、デオキシヘモグロビンとの反応によって媒介され、赤血球または内皮／組織ヘムタンパク質による低酸素症調整触媒NO生成の機序を提供した。赤血球中の高濃度ヘモグロビンが、NOとヘモグロビンとの近拡散制限反応速度（ $\sim 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ）と合わせて、NOが赤血球から排出されるのを抑制するようであるが、本明細書で提示するデータはこれに反論する。限定的であることを意図しないが、おそらくは赤血球膜の独自の特性が、膜直下タンパク質およびメトヘモグロビンに富む微小環境ならびにNOの相対的な親油性とともに、赤血球膜での区画化NO生成を可能にする。これが、血管拡張に必要なNOの産量が少ないことと合わせて、これらの動態学的制約にもかかわらずNOの排出を説明づけることができる。さらには、デオキシヘモグロビンおよびメトヘモグロビンとの反応によって亜硝酸塩をNOおよびS-ニトロソチオールに転換するためのインビボ化学が、赤血球または内皮組織ヘムタンパク質による低酸素症調整触媒NO生成の機序を提供することが提唱される。

【0098】

三つの要因が、S-ニトロソチオールではなく亜硝酸塩をNOの主要な血管プールとして独自に位置づける。1) 亜硝酸塩は、血漿、赤血球および組織中に実質的な濃度で存在する（Rodriguez et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 336-341, 2003）。2) 亜硝酸塩は、S-ニトロソチオールのように細胞内還元剤によって容易に還元されないため、比較的安定であり（Gladwin et al., *J Biol Chem* 277: 21211-21217, 2002）、ヘムタンパク質との反応速度は、真のNOの10,000倍低い。3) 亜硝酸塩は、デオキシヘモグロビン（またはおそらくはデオキシ-ミオグロビン、-サイトグロビン、および-ニューログロビン）との反応によってのみNOに転換され、その「脱離基」は、NOを掃去せず、不活性化しないメト（三価鉄）ヘムタンパク質である（Doyle et al., *J Biol Chem* 256, 12393-12398, 1981）。したがっ

てこのプールは、低酸素症の際にNO生成の理想的な基質を提供し、低酸素血管拡張のための新規な機序を提供する。

【0099】

デオキシヘモグロビン-亜硝酸塩還元酵素系は脱酸素血中でNO形成を生じさせ、このような系はヘモグロビン酸素化状態をNO生成とリンクさせる。これは、以前にはS-ニトロソ-ヘモグロビンに起因するとされていた原理である (Jia et al., Nature 380: 221-226, 1996)。ヘモグロビンは、亜硝酸塩を保持するアニオン性結合キャビティを有し (Gladwin et al., J Biol Chem 271: 21, 2002)、亜硝酸塩は、アニオン交換タンパク質 (AE1またはBand 3) を介して、または亜硝酸として膜を介して、赤血球に取り込まれる (組織低酸素症の際に亜硝酸塩取り込みを促進するpH依存性過程 (Shingles et al., J Bioenerg Biomembr 29: 611-616, 1997; May et al., Am J Physiol Cell Physiol 279: C1946-1954, 2000))。このような亜硝酸塩は、低酸素血管領域で優先的に起こるであろうNO、NO₂およびS-ニトロソチオール生成の定常的な供給源を提供するであろう。AE1タンパク質はデオキシヘモグロビンおよびメトヘモグロビンの両方に結合し、亜硝酸塩をチャネリングすることができるため、触媒NOおよびS-ニトロソチオール生成を赤血球膜に局限化するように作用することができ、その赤血球膜で、比較的親油性のNO、NO₂およびN₂O₃が、隣接する脂質二分子層で反応することができる (図5)。赤血球膜は、乱れのない外側拡散バリアおよび内側のメトヘモグロビンに富むタンパク質マトリックスによって裏打ちされており、それがそのようなNOおよびNO₂化学反応をさらに促進する可能性がある (Coin et al., J Biol Chem 254: 1178-1190, 1979; Liu et al., J Biol Chem 273: 18709-18713, 1998; Han et al., Proc Natl Acad Sci USA 99: 7763-7768, 2002)。

【0100】

このモデルは、脱酸素化赤血球をNO溶液 (有意量、つまり50 μMを超える混入亜硝酸塩を含有する。Fernandez, et al. Inorg Chem 42: 2-4, 2003) で処置したのちに、ヘモグロビンおよびAE1のS-ニトロソ化が赤血球膜中で起こることを示すPawloskiらのインビトロ観察 (Pawloski et al., Nature 409: 622-626, 2001) と合致している。さらに、膜で生成されたN₂O₃は、豊富な赤血球内グルタチオンを直接ニトロソ化して、S-ニトロソ-ヘモグロビンとのトランスニトロソ化反応の必要性を除き、それによって、赤血球膜を透過する単純な拡散によって低分子量S-ニトロソチオールの急速な排出を促進することができる (図5)。亜硝酸塩-ヘモグロビン化学反応は、酸素依存性NOホメオスタシスにおける赤血球の役割を支え、溶液中の高濃度のNOまたはNOガスもしくはドナー (高濃度の亜硝酸塩と平衡している) への暴露によってNOを「添加」されている赤血球および血漿がNOを排出し、インビトロおよびインビボで血管拡張を誘発することができるという多数の研究グループの観察の機序を提供する (Rassaf et al., J Clin Invest 109: 1241-1248, 2002; Fox-Robichaud et al., J Glutathione Invest 101: 2497-2505, 1998; McMahon et al., Nat Med 3: 3, 2002; Cannon et al., J Clin Invest 108: 279-287, 2001; Gladwin et al., J Biol Chem 271: 21, 2002; Gladwin et al., Circulation 107: 271-278, 2003; Schechter et al., N Engl J Med 348: 1483-1485, 2003)。

【0101】

亜硝酸塩とデオキシヘモグロビンとの反応に加えて、デオキシ-ミオグロビン、-サイトグロビン、および-ニューログロビン、または他の内皮細胞ヘムタンパク質との反応もまた重要である可能性がある。このような化学反応は、血管および骨格筋中、組織亜硝酸塩とデオキシ-ミオグロビンとの間で起こり、それにより、NOドナーの低酸素血管拡張および低酸素増強作用に寄与する。これらのグロビンモノマーのP₅₀は約3~5mmHgであり、運動のような代謝ストレス下、その平衡脱酸素化点を組織pO₂の範囲 (0~10mmHg) 内に配する。このような低い酸素圧は、NO合成のための基質としての酸素利用能を減らす、組織貯留亜硝酸塩をNOおよび5-ニトロソチオールに還元して、臨界血管拡張を維持することもできる。

【0102】

VII. 使用方法

10

20

30

40

50

亜硝酸塩の治療用途は今や、対象に、特に対象における低酸素血性および虚血性組織に対して選択的血管拡張を提供するために使用することができ、溶血中に放出される遊離ヘモグロビンがNOを掃去し、NO依存性血管機能を乱す鎌状赤血球病のような溶血性状態を処置するのに有用であろう。亜硝酸塩は、遊離ヘモグロビンをメトヘモグロビンに酸化させることによってNOを掃去する遊離ヘモグロビンの能力を阻害することだけでなく、低酸素圧の組織床中でNOを生成することも予想される。したがって、適用された亜硝酸塩は、低酸素圧区域で優先的に一酸化窒素を放出し、局所的血管拡張および／または血流増大を提供する。

【0103】

亜硝酸塩は、対象に投与されると、対象の組織への血流を増大させ、たとえば組織、たとえば低酸素圧組織への血流を増大させ；血管拡張を生じさせ；対象の血圧を下げ；高血圧に関連する状態を有する対象を処置し；溶血性状態を処置し；溶血を生じさせる処置または状態に関連する血管性合併症を処置し；肺高血圧症、脳血管痙攣、または器官への低い血流（たとえば脳、心臓、腎臓、および肝臓をはじめとする器官への虚血-再かん流傷害）を処置したり；および／または移植の前後の器官を処置することができる。

10

【0104】

亜硝酸塩の血管拡張性およびその生体活性化の機序を、本明細書に記載するように調査した。亜硝酸ナトリウムを毎分36 μmol で健常なボランティア18名の前腕上腕動脈に注入すると、222 μM の局所亜硝酸塩濃度、驚くことに安静中の前腕血流の175%の増大が生じた。血流の増大は、安静時、NO合成酵素阻害中および運動中で認められた。亜硝酸塩注入はまた驚くことに、静脈ヘモグロビン酸素飽和度、酸素分圧、およびpHの増大によって実証されるように、組織かん流の増大を生じさせた。亜硝酸塩の増大した全身濃度（16 μM ）は、平均動脈血圧を有意に低下させた。

20

【0105】

さらに10名の対象で亜硝酸塩の用量を2対数減らすと、安静時で2 μM および運動中で0.9 μM の前腕亜硝酸塩濃度が得られた（図3）。これらの亜硝酸塩濃度は驚くことに、運動時および運動なしで、安静時およびNO合成酵素阻害中で血流を有意に増大させた。

【0106】

亜硝酸塩注入は、前腕血管系にかけて、赤血球鉄-ニトロシル-ヘモグロビンの速やかな形成に関連し、より低い程度であるが、S-ニトロソ-ヘモグロビンの速やかな形成にも関連していた。これらのNO-Hbアダクトの形成は、オキシヘモグロビン飽和度と反比例していた。さらに、ラット大動脈環の血管拡張ならびにデオキシヘモグロビンおよび脱酸素赤血球の亜硝酸塩還元酵素活性からのNOガスおよびNO修飾ヘモグロビンの形成が観察され、これは、組織低酸素症、ヘモグロビンアロステリズム、および亜硝酸塩生体活性化をリンクさせる結果である。これらの結果は、血液および組織亜硝酸塩の生理学的レベルが、血管調整に寄与するNOの主要な生物学的に利用可能なプールであることを示し、組織および／または赤血球中の血管亜硝酸塩と脱酸素ヘムタンパク質との反応による低酸素血管拡張の機序を提供する。

30

【0107】

これまでに公表されている報告は、亜硝酸塩の薬理学的濃度（約100～200 μM 未満）は対象に投与された場合、本来の血管拡張性を欠くと当業者に教示しているため（Lauer et al., Proc Natl Acad Sci USA, 98:12814-9, 2001）、亜硝酸塩の投与が血圧を下げ、血流を増大させるという本明細書で記載する発見は予想外かつ驚くべきことである。

40

【0108】

また、薬学的に許容される亜硝酸塩は、鎌状赤血球病のような溶血性疾患の患者に注入されると、血流を改善し、虚血-再かん流組織傷害を制限し、無細胞血漿Hbを酸化させることができると考えられる。これらの効果は、鎌状赤血球血管閉塞性疼痛発作、脳卒中（脳虚血）および急性胸部症候群の処置に有用であるはずである。

【0109】

VIII. 処方および投与

50

亜硝酸イオンは、その塩を含め、対象において血圧を下げたり、血管拡張を増したりするために、本明細書で提供する方法にしたがって対象に投与される。本開示による亜硝酸塩の投与は、たとえばレシピエントの生理学的状態、投与の目的が治療であるのか予防であるのか、および実務者に公知の他の要因に依存して、単一用量、多用量、および／または連続的もしくは断続的であってよい。亜硝酸塩の投与は本質的には、事前に選択された期間にわたって連続的であってもよいし、間隔を置いた一連の用量であってもよい。投与量は、処置される状態ならびに対象の体重、身体状態、健康状態、および年齢を含むがこれらに限定されない様々な要因に依存して異なる。このような要因は、臨床医により、動物モデルまたは当技術分野において利用可能な他の試験系を使用して決定することができる。

10

【0110】

亜硝酸塩を調製するためには、亜硝酸塩を合成または他の方法で得て、必要または所望によって精製する。本開示の一部の態様では、亜硝酸塩は、薬学的に許容される亜硝酸塩、たとえば亜硝酸ナトリウムである。本開示の一部の態様では、亜硝酸塩は亜硝酸エチルではない。本開示の一部の態様では、亜硝酸ナトリウムは、医療装置、たとえばステント上には存在しない。本開示の一部の態様では、亜硝酸塩はゲルの形態にはない。亜硝酸塩は、適切な濃度に調節し、任意に他の薬剤と組み合わせることができる。単位用量に含められる所与の亜硝酸塩の絶対重量は異なりうる。本開示の一部の態様では、亜硝酸塩は、亜硝酸アニオンとカチオン、たとえばナトリウム、カリウム、またはアルギニンとの塩として投与される。

20

【0111】

亜硝酸塩を含む一つまたは複数の適当な単位用量剤形は、外用局所、経口（たとえば腸溶性製剤として）、非経口（皮下、静脈内、筋内、および腹腔内を含む）、直腸、皮膚、経皮、胸腔内、肺内、および鼻腔内（呼吸）経路を含む多様な経路によって投与することができる。

【0112】

製剤は、適切な場合には、別個の単位用量剤形で好都合に提供することもできるし、薬学技術の公知の方法のいずれかによって調製することもできる。そのような方法は、亜硝酸塩を液状担体、固形マトリックス、半固形担体、微分散固形担体またはそれらの組み合わせと混合したのち、必要であれば生成物を所望の送達系に導入または成形する工程を含む。「薬学的に許容される」とは、担体、希釈剤、賦形剤、および／または塩が、製剤の他の成分と適合性であり、そのレシピエントに対して有毒性または不適切に有害ではないことをいう。治療化合物はまた、たとえばマイクロカプセル封入を使用して徐放用に処方することもできる（W094/07529および米国特許第4,962,091号を参照）。

30

【0113】

亜硝酸塩は、非経口投与（たとえば注射、たとえばボラス注射または連続注入）のために処方することもできるし、単位用量剤形で、アンプル、充填済み注射器、少量注入容器または多用量容器として提供することもできる。保存料を添加して用量剤形の貯蔵寿命の維持を助けることもできる。亜硝酸塩および他の成分は、油性または水性溶媒中で、懸濁液、溶液、または乳濁液を形成させてもよく、処方用剤、たとえば懸濁剤、安定剤および／または分散剤を含ませてもよい。または、亜硝酸塩および他の成分は、無菌固体の無菌単離によって得られる、または溶液から凍結乾燥させて、使用前に適当な溶媒、たとえば無菌パイロジェンフリー水で構成することによって得られる、粉末形態であってもよい。

40

【0114】

これらの製剤は、当技術分野で利用可能な薬学的に許容される担体および溶媒を含有することができる。たとえば、水の他に、溶媒、たとえばアセトン、エタノール、イソプロピルアルコール、グリコールエーテル、たとえば商品名「Dowanol」として販売されている製品、ポリグリコールおよびポリエチレングリコール、短鎖酸のC₁~C₄アルキルエステル、乳酸エチルもしくはイソプロピル、脂肪酸トリグリセリド、たとえば商品名「Miglyo

50

l」として市販されている製品、ミリスチン酸イソプロピル、動物性、鉱物性および植物性の油ならびにポリシロキサンから選択される、生理学的観点から許容される一つまたは複数の有機溶媒を使用して溶液を調製することが可能である。

【0115】

他の成分、たとえば酸化防止剤、界面活性剤、保存料、膜形成剤、角質溶解剤またはにきび溶解剤、芳香剤、着香料および着色剤を加えることも可能である。酸化防止剤、たとえばt-ブチルヒドロキノン、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエンおよびα-トコフェロールならびにその誘導体を加えることもできる。

【0116】

本開示の薬学的製剤は、選択的な成分として、薬学的に許容される担体、希釈剤、可溶化剤もしくは乳化剤、および当技術分野において利用可能なタイプの塩を含むことができる。このような物質の例としては、生理食塩溶液、たとえば生理学的に緩衝された食塩溶液および水が挙げられる。本開示の薬学的製剤に有用な担体および／または希釈剤の非限定的な具体例としては、水および生理学的に許容される緩衝食塩溶液、たとえばリン酸緩衝食塩溶液が挙げられる。単に例として、緩衝溶液は、約6.0～8.5、たとえば約6.5～8.5、約7～8のpHでありうる。

【0117】

亜硝酸塩はまた、気道を介して投与することができる。したがって、本開示はまた、本開示の方法で使用するためのエアロゾル薬学的製剤および剤形を提供する。このような剤形は概して、特定の状態の臨床症候を処置または予防するのに有効な量の亜硝酸塩を含む。本開示の方法にしたがって処置された状態の一つまたは複数の症候の減衰、たとえば統計的に有意な減衰が、そのような状態の処置であるとみなされ、本開示の範囲内である。

【0118】

吸入による投与の場合、組成物は、乾燥粉末の形態、たとえば亜硝酸塩と適当な粉末ベース、たとえばラクトースまたはデンプンとの粉末混合物の形態をとることができる。粉末組成物は、単位剤形、たとえばカプセルまたはカートリッジとして提供されてもよいし、吸入器、ガス注入器、または計量吸入器（たとえば、Newman, S. P. in *Aerosols and the Lung*, Clarke, S. W. and Davia, D. eds., pp. 197-224, Butterworths, London, England, 1984で開示されている加圧計量吸入器（MDI）および乾燥粉末吸入器を参照）を用いて粉末を投与することができ、たとえばゼラチンまたはブリスタパックとして提供されうる。

【0119】

亜硝酸塩はまた、たとえばエアロゾルまたは吸入形態で投与される場合、水溶液として投与することもできる。したがって、他のエアロゾル薬学的製剤としては、たとえば生理学的に許容される緩衝食塩溶液が含まれる。液体中に溶解または懸濁されていない微分散固形化合物の形態の乾燥エアロゾルもまた、本開示の実施に有用である。

【0120】

吸入による気道、たとえば上（鼻）気道または下気道への投与の場合、亜硝酸塩は、噴霧器もしくは加圧パック、またはエアロゾルスプレーを送達するのに好都合な他の手段から好都合に送達することができる。加圧パックは、適当な推進剤、たとえばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素または他の適当なガスを含むことができる。加圧エアロゾルの場合、用量単位は、弁を設けて計量供給量を送達することによって決定することができる。噴霧器としては、米国特許第4,624,251号、第3,703,173号、第3,561,444号、および第4,635,627号に記載されている噴霧器が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に開示されるタイプのエアロゾル送達システムは、Fisons Corporation (Bedford, Mass.), Schering Corp. (Kenilworth, NJ) および American Pharmoseal Co. (Valencia, CA) をはじめとする多数の販売元から市販されている。鼻腔内投与の場合、治療剤は、点鼻薬、液体スプレー、たとえばプラスチックボトル噴霧器または計量吸入器によって投与することもできる。典型的な噴霧器は、Mistometer (Wintrop) およびMedihaler (Riker) である。亜硝酸塩はまた、超音

10

20

30

40

50

波送達システムによって送達することもできる。本開示の一部の態様では、亜硝酸塩は、気管内チューブを介して送達することもできる。本開示の一部の態様では、亜硝酸塩は、マスクを介して送達することもできる。

【0121】

本開示はさらに、パッケージ化された薬学的組成物、たとえばキットまたは他の容器に関する。キットまたは容器は、治療有効量の亜硝酸塩の薬学的組成物および状態を処置するために薬学的組成物を使用するための取り扱い説明書を含む。

【0122】

IX. 併用療法

さらに亜硝酸塩はまた、本明細書に記載する状態または他の状態に対し、一つまたは複数の他の治療剤、たとえば鎮痛剤、抗炎症剤、抗ヒスタミン剤などと組み合わせて使用することもできる。例として、さらなる薬剤は、ペニシリン、ヒドロキシ尿素、酪酸塩、クロトリマゾール、アルギニン、またはホスホジエステラーゼ阻害薬（たとえばシルデナフィル）から選択される一つまたは複数である。

【0123】

NO治療と併用される、またはNO治療との併用が示唆されるいかなる治療をも、本明細書に記載する亜硝酸塩治療と共に使用することができると考えられる。

【0124】

以下の実施例は、特定の特徴および／または態様を例示するために提供する。この実施例は、記載する特定の特徴または態様に本発明を限定するとみなすべきものではない。

【0125】

実施例1

亜硝酸塩はインビボで血管拡張性を有する

この実施例は、亜硝酸塩が、注入によってヒト対象の前腕に投与された場合、有効な血管拡張剤であることを実証する。

【0126】

方法

ヒト対象プロトコル

このプロトコルは米国国立心臓・肺・血液研究所の施設内倫理委員会（the Institutional Review Board of the National Heart, Lung and Blood Institute）によって認可され、すべてのボランティア対象からインフォームドコンセントを得た。平均年齢33歳（21～50歳）の男性9人および女性9人が実験に参加した。さらに10名の対象が、3～6ヶ月後、低用量亜硝酸塩注入での第二の一連の実験のために戻ってきた。ボランティアは正常なヘモグロビン濃度を有し、全員、内皮機能不全の危険因子（空腹時血糖 >120 mg/dL、LDLコレステロール >130mg/dL、血圧 >145/95 mmHg、過去2年間の喫煙、心臓血管疾患、末梢血管疾患、凝固障害、または血管炎もしくはレイノー現象の素因となる他の疾患）をもたない優秀な健康状態であった。G6PD欠乏症、既知のチトクロームB5欠乏症またはベースラインメトヘモグロビンレベル >1%の対象は除外した（スクリーニングした対象のうち、これらの除外規準に該当したものはいなかった）。授乳中および妊娠中の女性は除外した（HCGレベル陽性対象1名を除外した）。ボランティア対象には、実験前の少なくとも1ヶ月間、いかなる薬物（経口避妊薬は許可）、ビタミンサプリメント、生薬、栄養補助食品または他の「代替療法」をも摂取させず、実験前の1週間はアスピリンの摂取も許可しなかった。

【0127】

前腕血流計測

上腕動脈および肘窩静脈カテーテルを腕に挿入し、動脈内カテーテルを血圧計測のための圧力変換器および生理食塩水を1mL/minで送達する注入ポンプに接続した。20分間の安静ののち、ベースライン動脈血および静脈血サンプルを採取し、以前に報告されているひずみゲージ静脈閉塞プレシスモグラフィー（Panza et al., Circulation, 87, 1468-74, 1993）によって前腕血流計測を実施した。血流測定ごとに7回の血流計測値を平均した。

亜硝酸塩注入の間の前腕血流応答に対する時間の影響を最小限にするため、パートIおよびIIと呼ぶ一連の計測を無作為な順序で実施した。

【0128】

NO遮断および反復運動中の血流および前腕亜硝酸塩抽出の計測

パートI

0.9%NaCl（食塩水）溶液を1mL/minで20分間、上腕動脈に注入したのち、以下に記すアッセイのために動脈血および静脈血のサンプルを採取し、前腕血流を計測した。握力計（Technical Products社）を使用して、予め定めた最大握力の3分の1の力での反復把握動により、運動を実施した（Gladwin et al., Proc Natl Acad Sci USA, 97, 9943-8, 2000; Gladwin et al., Proc Natl Acad Sci USA, 97, 11482-11487, 2000; Cannon et al., J Clin Invest, 108, 279-87, 2001）。各収縮を10秒間継続させたのち、5秒間弛緩させた。5分間の運動ののち、運動の弛緩段階中に前腕血流計測値を得、動脈および静脈のサンプルを採取した。食塩水を上腕動脈に連続的に注入しながら20分の安静期間ののち、反復ベースライン血液サンプルおよび前腕血流計測値を得た。次に、L-NMMAを1mL/min（8 μ mol/min）の速度で上腕動脈に注入した。5分間のL-NMMA注入ののち、前腕血流を計測し、動脈血および静脈血のサンプルを得た。そしてその腕でL-NMMA注入を続けながら、前腕の運動を開始した。L-NMMA注入を続けながら5分間の運動ののち、前腕血流を計測し、血液サンプルを得た（図1）。

【0129】

パートII

食塩水を注入しながら30分間の安静ののち、ベースライン計測値を得、そこで食塩水注入を止め、亜硝酸塩（NaNO₂、0.9%食塩水中36 μ mol/ml）の注入を1 ml/minで開始した。ヒト用の亜硝酸ナトリウムは、Hope Pharmaceuticalsから得たものであり（水10ml中300 mg）、286 mgを、Pharmaceutical Development Serviceの0.9%食塩水100 ml中で最終濃度36 μ mol/mlまで希釈した。実験した最後の9名の対象の場合、0.01~0.03 mM重炭酸ナトリウムを生理食塩水に加えてpHを7.0~7.4に滴定した。亜硝酸塩溶液は遮光し、すべての実験ののち、溶液中の亜硝酸塩レベルおよび遊離NOガスを還元的化学発光によって計測した（Gladwin et al., J Biol Chem, 21, 21, 2002）。亜硝酸塩溶液中には50.5 $\pm$ 40.5nMのNOしか存在せず、重炭酸緩衝による影響を受けていなかった。亜硝酸塩溶液中のNOレベルと亜硝酸塩の血流効果との間に相関関係は見られなかった（ $r=-0.23$, $P=0.55$ ）。5分間の亜硝酸塩注入ののち、前腕血流計測値および血液サンプルを得るとともに、亜硝酸塩注入を短く中断して動脈サンプルを得た。亜硝酸塩注入を続けるとともに、前記のように運動を実施し、上記のように前腕血流計測値および血液サンプルを得た。亜硝酸塩注入を止め、その後30分の安静期間中、食塩水注入を再開した。2回目のベースライン計測ののち、L-NMMAを8 μ mol/minで注入しながら亜硝酸塩注入を再開した。5分後、前腕血流計測を実施し、血液サンプルを得たのち、亜硝酸塩およびL-NMMAの注入を続けながら5分間の運動を実施した。最終的な前腕血流計測値および血液サンプルを得た。パートII中のすべての時点で、メトヘモグロビンおよびNO修飾ヘモグロビンの全身レベルの測定のために、反対の腕の肘窩静脈から血液サンプルを得た（図2、3、および4）。亜硝酸ナトリウムの合計注入量は、36 μ mol/min $\times$ 15分 $\times$ 注入2回 = 1.08 mmol = 75 mg（MW NaNO₂ = 69）であった。

【0130】

さらなる実験において、対象10名に、パートIおよびIIのプロトコルの同じ段階を踏襲したが、低用量の亜硝酸塩を注入した（0.9%食塩水中0.36 μ mol/mlのNaNO₂を1 ml/minで注入）。

【0131】

i-STATシステム（i-STAT Corporation, East Windsor, NJ）を使用して、動脈および静脈pH、pO₂、およびpCO₂をベッドサイドで計測し、メトヘモグロビン濃度およびヘモグロビン酸素飽和度をコオキシメトリーによって計測した。

【0132】

赤血球S-ニトロソ-ヘモグロビンおよび鉄-ニトロシル-ヘモグロビンの計測

S-ニトロソ-ヘモグロビンは還元性赤血球環境では不安定であり、酸素圧には依存せずに温度および酸化還元依存的に急速に崩壊する (Gladwin et al., J Biol Chem, 21:21, 2002)。計測に備えてS-ニトロソ-ヘモグロビンを安定化するためには、赤血球をフェリシアン化物で速やかに酸化させなければならない。亜硝酸塩注入の前および最中、上腕動脈および肘窩静脈から血液を抜き取り、全血をただちに (処理時間を省くためにベッドサイドで) 1%NP-40 (膜を可溶化するため)、8 mM NEM (遊離チオールと結合し、人為的S-ニトロソ化を防ぐため)、0.1 mM DTPA (極微量の銅をキレート化するため)、ならびに4 mMフェリシアン化物およびシアン化物 (S-ニトロソヘモグロビンを安定化し、処理中の人為的なエクスピボ鉄-ニトロシル化を防ぐため) を含有するPBSのNO-ヘモグロビン「安定化溶液」中で1:10に溶解した。サンプルを総容積9.5 mLのSephadex G25カラムに通して脱塩して、亜硝酸塩および過剰な試薬を除去し、ヘモグロビンを部分的に精製した (99%ヘモグロビン調製物)。Drabkinの方法によってヘモグロビン画分を定量し、ヘモグロビン画分を、塩化第二水銀を用いた場合と用いない場合で反応させ (1:5のHgCl₂:ヘム比、水銀不安定なS-ニトロソチオールと水銀安定な鉄-ニトロシルとを区別するために使用)、さらに0.1M HCL/0.5%スルファニルアミド中で反応させた (残留亜硝酸塩を除去するため。Marley et al., Free Radic Res, 32, 1-9, 2000)。そしてサンプルを、化学発光一酸化窒素分析装置 (Sievers、モデル280 NO分析装置、Boulder, CO) と直列に配した三ヨウ化物 (I₃⁻) の溶液に注入した。水銀安定なピークが鉄-ニトロシル-ヘモグロビンを表す。このアッセイは、全血中5nM (ヘムあたりS-NO 0.00005%) までのS-ニトロソ-ヘモグロビンおよび鉄-ニトロシル-ヘモグロビンの両方に対して感度および特異性を示す (Gladwin et al., J Biol Chem 21, 21, 2002)。

【0133】

分析は、まず赤血球ペレットを使用して実施したが、サンプルを氷に入れ、ただちに赤血球ペレットから血漿を分離したにもかかわらず、NOが静脈血中エクスピボで形成した。真のインビボレベルを計測するため、全血をベッドサイドで「NO-ヘモグロビン安定化溶液」中1:10に混合した。亜硝酸塩注入中、血漿S-ニトロソ-アルブミン形成は無視しうる程度であったため、このベッドサイド全血アッセイを使用して処理時間を制限し、インビボ化学作用をより正確に特徴づけた。一連の立証実験で、S-ニトロソ-ヘモグロビンおよび鉄-ニトロシル-ヘモグロビンは両方とも、室温で20分間「NO-ヘモグロビン安定化溶液」中で安定であり、NO修飾種の人為的形成または崩壊はなかった (n=6)。

【0134】

亜硝酸塩添加ののちデオキシヘモグロビンおよび脱酸素化赤血球から放出されるNOガスの化学発光検出

亜硝酸塩とデオキシヘモグロビンとの反応からフリーNOラジカルが形成しうるかどうかを判定するため、化学発光NO分析装置 (Seivers, Boulder, CO) と直列に配した、ヘリウムまたは酸素 (いずれも21%および100%) でパージした遮光反応容器中、100および200 μM亜硝酸塩を660および1000 μM脱酸素化赤血球5mLと混合した。5分間平衡させたのち亜硝酸塩を注入し、NO生成の速度を計測した。亜硝酸塩を、対照としてのPBSおよび100 μMヘモグロビンに注入して、660および1000 μM脱酸素化赤血球溶液中の溶血を制御した。すべての実験の最後に、上澄みおよび赤血球反応混合物の可視吸収スペクトルを解析し、最小二乗アルゴリズムを使用してヘモグロビン組成を逆重畳積分した。系中には100 μM未満の溶血しかなく、ヘモグロビンの変性はなく、鉄-ニトロシル-ヘモグロビンの有意な形成があった。赤血球懸濁液からのNO生成は、溶血産物対照から生成されるものを超え、赤血球からのNO排出と合致していた。

【0135】

統計解析

前腕NO合成がL-NMMAによって阻害される場合、生理食塩水注入対照値と比較して亜硝酸塩注入中の前腕血流の25%改善を検出するための実験には18名の対象が必要であろうことが先験的サンプルサイズ計算により決定された (アルファ=0.05、パワー=0.80)。実験

10

20

30

40

50

の比較しうる時点でのベースライン値とL-NMMA注入値との間、ベースライン値と運動値との間、および亜硝酸塩値と食塩水対照値との間の対単位の比較のために、対応t検定によって両側P値を計算した。ベース、L-NMMA注入、および運動条件の間のNO種の動脈から静脈への勾配に関して反復測定ANOVAを実施した。示す計測値は平均±標準誤差である。

【0136】

結果および考察

亜硝酸塩が血管拡張剤であるかどうかを判定し、亜硝酸塩のインビボ化学作用を試験するため、健常な対象18名（男性9名、女性9名、年齢21～50歳）を生理学的実験に参加させた。プロトコルのパートIは、運動およびNO合成阻害に対する前腕内での正常な血行動態的および代謝的応答を計測するために、亜硝酸塩注入中にこれらの介入を実施したプロトコルのパートIIの対照として設計されたものであった。初期ベースライン計測値は、 85.6 ± 3.7 mmHgの平均血圧および組織100 mLあたり 4.0 ± 0.3 ml/minの前腕血流を含んだ（図1A）。反復把握前腕運動が血流を安静時の値に対して約600%増大させ、同側の静脈ヘモグロビン酸素飽和度、 pO_2 、およびpHを有意に低下させ、これは酸素消費および CO_2 生成の増大と合致するものであった。20分の安静期間ののち、初期ベースライン値と比較して、反復血行動態的計測は約10%高い前腕血流を示したが、全身血圧または前腕静脈ヘモグロビン酸素飽和度、 pO_2 およびpH値に変化は見られなかった（図1B）。次に、NO合成酵素阻害薬L-NMMAを $8 \mu\text{mol}/\text{min}$ で5分間、上腕動脈に注入すると、前腕血流が有意に約30%低下し、静脈ヘモグロビン酸素飽和度、 pO_2 およびpH値が有意に低下した。L-NMMA注入を継続しながらの反復前腕運動が血流を増大させたが、運動のみの場合に比べると有意に低いピーク値であった（ $P < 0.001$ ）。加えて、L-NMMAを注入しながらの運動中、ヘモグロビン酸素飽和度、 pO_2 およびpHは、局所NO合成酵素阻害なしで運動した場合によりも有意に低かった（それぞれ $P < 0.001$ 、 $P < 0.005$ および $P = 0.027$ ）。プロトコルのパートIのすべての構成部で平均動脈血圧に変化はなかった。

【0137】

図1は、対象18名におけるベースラインおよび運動中の血行動態および代謝の計測値を、NO合成の阻害なしの場合（図1A）およびNO合成を阻害した場合（図1B）で示す。すべての実験条件に関して、平均動脈圧（MAP）、前腕血流（FBF）、および静脈オキシヘモグロビン飽和度、酸素分圧（ pO_2 ）、およびpHを示す。これらの介入および計測（プロトコルのパートI）を、亜硝酸塩注入中にこれらの介入を実施したプロトコルのパートIIの対照とした。

【0138】

亜硝酸塩がヒトにおいて血管作動性を有するかどうかを判定するため、プロトコルのパートIIで、重炭酸緩衝生理食塩水中の亜硝酸ナトリウム（最終濃度 $36 \mu\text{mol}/\text{ml}$ ）をこれら18名の対象の上腕動脈に注入して、約 $200 \mu\text{M}$ の推定静脈濃度を達成した（Lauer et al., Proc Natl Acad Sci USA, 98, 12814-9, 2001）。反復ベースライン計測および $1 \text{ mL}/\text{min}$ で5分間の亜硝酸ナトリウム注入ののち、同側肘窩静脈中の亜硝酸塩レベルは $3.32 \pm 0.32 \mu\text{M}$ から $221.82 \pm 57.59 \mu\text{M}$ まで増大した（図2A）。前腕血流は安静時の値に対して175%増大し、静脈ヘモグロビン酸素飽和度、 pO_2 およびpHのレベルは注入前の値に対して有意に増大して、前腕のかん流の増大と合致するものであった。

【0139】

亜硝酸塩の全身レベルは、反対側の腕で計測して $16 \mu\text{M}$ であり、約7 mmHgの低下した平均血圧の全身性効果と対応していた。動脈から静脈へ移動する亜硝酸塩からの直接的なNO生成と合致して、亜硝酸塩注入中、同側肘窩静脈中の鉄-ニトロシル化ヘモグロビンは、 $5.7 \pm 11.4 \text{ nM}$ から $693.4 \pm 216.9 \text{ nM}$ まで増大した。亜硝酸塩の注入を継続しながらの前腕運動中、血流はさらに増大し、前腕静脈ヘモグロビン酸素飽和度、 pO_2 およびpHレベルがベースライン値より低下することにより、代謝ストレスが証明された。静脈亜硝酸塩レベルは低下し、注入された亜硝酸塩の濃度を希釈する前腕への血流の増大と合致するものであった。運動中の前腕亜硝酸塩濃度の低下にもかかわらず、鉄-ニトロシル-ヘモグロビンレベルは増大した（図2A）。

【0140】

亜硝酸塩注入を中止し、動脈内注入物を食塩水に交換して30分間注入したのちの反復ベースライン計測により、ほぼ1時間前の亜硝酸塩注入の前に得られた値に対して亜硝酸塩、鉄-ニトロシル-ヘモグロビンおよびメトヘモグロビンの全身レベルが持続的に上昇したことが示された(図2B)。加えて、亜硝酸塩注入前の初期値よりも前腕血流が有意に高く(組織100 mLあたり 4.79 ± 0.37 対 3.94 ± 0.38 mL/min、 $P=0.003$)、全身血圧が有意に低かったため(82.1 ± 3.7 対 89.2 ± 3.5 mmHg、 $P=0.002$)、血管拡張剤効果の持続性が明らかであった。NOの局所合成を再び阻害するために、亜硝酸ナトリウム $36 \mu\text{mol/ml}$ をL-NMMA $8 \mu\text{mol/min}$ と合わせて上腕動脈へ再注入する間、L-NMMAなしで亜硝酸塩を注入する場合と同様に、安静中および運動中の前腕血流に対する亜硝酸塩の同様な血管拡張効果が見られた(図2B)。これは、プロトコルのパートIで観察されたL-NMMAによるNO合成酵素阻害の血管狭窄剤効果(図1B)とは対照的である。静脈亜硝酸塩および鉄-ニトロシル-ヘモグロビンレベルは、NO阻害中、初期亜硝酸塩注入中と類似したパターンをたどった。

10

【0141】

図2は、健常な対象18名の上腕動脈への重炭酸緩衝生理食塩水中の亜硝酸ナトリウム(NaNO_2) (0.9%、最終濃度 $36 \mu\text{mol/ml}$)を1 mL/minで5分間注入した効果をベースラインおよび運動を継続した状態で示す。図2Aは、NO合成の阻害なしでの効果を示す。図2Bは、NO合成を阻害した場合の効果を示す。すべての実験介入に関して、平均動脈血圧(MAP)、前腕血流(FBF)、静脈オキシヘモグロビン飽和度、酸素分圧($p\text{O}_2$)およびpH、静脈亜硝酸塩、静脈鉄-ニトロシル-ヘモグロビンおよび静脈メトヘモグロビンの値を示す。

20

【0142】

血管拡張剤としての血管亜硝酸塩の生理学的関連性の試験として、亜硝酸塩濃度を400 nmol/mLまで2対数低下させた。対象10名への1 mL/minで5分間の注入は、対象10名すべてにおいて、前腕血流を、組織100 mLあたり 3.49 ± 0.24 mL/minから 4.51 ± 0.33 mL/minまで有意に増大させた(図3A、 $P=0.0006$)。血流は、安静時およびNO合成酵素阻害中、運動した場合でも運動しなかった場合でも有意に増大した(図3B、すべての条件で $P<0.05$)。平均静脈亜硝酸塩レベルは、5分間の注入ののち 176 ± 17 nMから 2564 ± 462 nMまで増大し、運動静脈亜硝酸塩レベルは 909 ± 113 nMまで低下した(運動中の血流増大の希釈効果に続発、図3C)。ここでもまた、亜硝酸塩の血管拡張剤効果は、前腕循環中の鉄-ニトロシル-ヘモグロビンおよびS-ニトロソ-ヘモグロビンの観察された形成と並行するものであった(図3D、以下に記す)。これらのデータは、血漿中の150~1000 nMから血管組織中の10,000 nMまでの亜硝酸塩のベースレベルが安静時血管緊張および低酸素血管拡張に寄与することを示す。

30

【0143】

図3は、NO合成を阻害しない場合と阻害する場合とでの、健常な対象10名におけるベースラインおよび運動中の上腕動脈への重炭酸緩衝生理食塩水中の低用量亜硝酸ナトリウムの注入の効果を示す。図3Aは、ベースラインおよび5分間の NaNO_2 注入(0.9%食塩水中 $0.36 \mu\text{mol/ml}$ 、1 mL/minで注入)後での前腕血流を示す。図3Bは、低用量亜硝酸塩注入を実施した場合と実施しない場合とでの、ベースラインおよびL-NMMA注入中の、運動ストレスを加えた場合と加えない場合とでの前腕血流を示す。図3Cは、血流計測時における前腕循環からの亜硝酸塩の静脈レベルを示す。図3Dは、ベースラインおよび運動ストレス下の亜硝酸塩注入後のS-ニトロソ-ヘモグロビン(S-NO)および鉄-ニトロシル-ヘモグロビン(Hb-NO)の静脈レベルを示す。

40

【0144】

組織 $p\text{O}_2$ およびpHが低すぎない場合の、ベース血流条件中の亜硝酸塩の血管拡張性は予想外であった。これらの結果は、亜硝酸塩還元に関して以前に仮定されていた機序、すなわち、いずれも正常な生理状態では通常は遭遇されないきわめて低い $p\text{O}_2$ およびpH値を要する亜硝酸塩不均化およびキサンチンオキシドレダクターゼ活性が、亜硝酸塩還元を触媒するように働くさらなる要因によってインビボで補足されるということを示す。血液中に豊富に存在するアスコルビン酸および他の還元剤が、亜硝酸還元に必要な電子を提供する

50

ことができ、そのため、反応は生理学的に達成可能なpHレベルで起こるかもしれないが、本明細書では、デオキシヘモグロビンが循環時間の半分以上で亜硝酸塩をNOへと効果的に還元することを報告する。この機序は、ヘモグロビン酸素不飽和化によって厳密に規制される、生理学的酸素勾配に沿った段階的なNO生成を提供する。

【0145】

亜硝酸塩と赤血球内デオキシヘモグロビンとの反応によるNOおよびS-ニトロソチオールの静脈内生成

亜硝酸塩注入の前および最中、上腕動脈および肘窩静脈から血液を抜き取り、全血をただちに（処理時間を省くためにベッドサイドで）NO-ヘモグロビン「安定化溶液」中で1:10に溶解し、鉄-ニトロシル-ヘモグロビンおよびS-ニトロソ-ヘモグロビン含量を、方法の項で述べた三ヨウ化物ベースの還元的化学発光および電子常磁性共鳴分光法によって測定した。S-ニトロソ-ヘモグロビンおよび鉄-ニトロシル-ヘモグロビンのベースラインレベルは検出限界（ <50 nMまたはヘムあたり0.0005% NO）にあり、動脈-静脈間の勾配はなかった。プロトコルのパートIIでの亜硝酸塩注入ののち、鉄-ニトロシル-ヘモグロビンおよびS-ニトロソ-ヘモグロビンの静脈レベルは両方とも著しく上昇した（図4A）。両NO-ヘモグロビンアダクトの形成は、血管床にかけて、10秒未満の半循環時間で起こった。鉄-ニトロシルおよびS-ニトロソ-ヘモグロビンとして計測され、静脈レベルから動脈レベルを差し引き、その差を血流で乗じることによって定量化したNO形成の速度は、局所亜硝酸塩濃度を希釈する血流の増大に続発して起こる亜硝酸塩の静脈濃度の有意な低下にもかかわらず、運動中に大幅に増大した（図4A；反復測定ANOVAによる。鉄-ニトロシル-ヘモグロビンの場合、 $P=0.006$ 、およびS-ニトロソ-ヘモグロビンの場合、 $P=0.02$ ）。

【0146】

図4Aは、ベースラインでの亜硝酸塩注入中、亜硝酸塩注入中および亜硝酸塩注入とともに運動した場合の、静脈レベルから動脈レベルを差し引いた結果を血流で乗じることによって定量化した鉄-ニトロシル-ヘモグロビン（黒い四角）およびS-ニトロソ-ヘモグロビン（赤い円）の形成を示す。亜硝酸塩注入中、両NO-ヘモグロビンアダクトの形成はヒト循環中のヘモグロビン酸素飽和度と逆相関していた（鉄-ニトロシル-ヘモグロビンの場合、 $r=-0.7$ 、 $p<0.0001$ 、S-ニトロソ-ヘモグロビンの場合、 $r=-0.45$ 、 $p=0.04$ ）（図4B）。ヘモグロビン酸素飽和度は、肘窩静脈からコオキシメトリーによって計測した。すべての数値の星印は、対応t検定または反復測定分散分析による $P<0.05$ を意味する。

【0147】

亜硝酸塩とデオキシヘモグロビンとの反応からフリーNOラジカルが形成しうるかどうかを判定するため、化学発光NO分析装置（Seivers, Boulder, CO）と直列に配した、ヘリウムでパージした遮光反応容器中、100および200 μ M亜硝酸塩を脱酸素化赤血球（ヘム中で合計660および1000 μ Mを含有する容量5mL）と反応させた。図5Aおよび5Bに示すように、脱酸素化赤血球の溶液への亜硝酸塩の注入は、気相へのNO解放を生じさせた。同じ条件下で緩衝剤対照中での亜硝酸塩からの放出はなく、亜硝酸塩を酸素化赤血球（酸素21%および100%）に添加しても、有意に少ないNOしか放出されなかった。5mL反応量中でのNO生成の観察された速度（120秒で計算した、亜硝酸塩注入ののち増大した定常状態NO生成の曲線下面積の評価によって決定）は、毎秒47 pMのNO生成（全血中、毎秒300~500 pMの推定NO生成量に相当）と合致していた。この実験系におけるNO形成速度をインビボでのNO形成速度として考えることはできないが、実験は、二つの重要な概念と合致していた。1) 遊離NO画分は、残留ヘム基による自動捕捉を逃れることができる。これは、亜硝酸塩がデオキシヘモグロビンとの反応によってのみNOに転換され、その「脱離基」が、NOの掃去および不活性化を抑制するメト（三価鉄）ヘムタンパク質であるという理由でのみ可能である可能性が高い（Doyle et al., J Biol Chem 256, 12393-12398, 1981）、2) NO生成の速度は嫌気性条件下で増大し、亜硝酸塩-デオキシヘモグロビン反応と合致するものである。

【0148】

前記明細書では、本発明をその特定の好ましい態様に関して記載し、例示のために多く

の詳細を述べたが、当業者には、本発明がさらなる態様をとることができ、本発明の基本原理を逸することなく本明細書に記載した特定の詳細を大幅に変更できることが自明であろう。

【図面の簡単な説明】

【0149】

【図1】対象18名におけるベースラインおよび運動中の血行動態および代謝の計測値を示すグラフである。図1Aは、NO合成の阻害なしでの表示値それぞれに対する効果を示す。図1Bは、NO合成を阻害した場合の効果を示す。記号：MAP—平均動脈圧、mmHg；FBF—前腕血流、mL/min/100 mL； O_2 飽和度、%； pO_2 —静脈オキシヘモグロビン飽和度、酸素分圧、mmHg；pH、単位；*= $p<0.05$ 対ベースラインそれぞれ1または2；**= $p<0.01$ 対ベースラインそれぞれ1または2；†= $p<0.05$ 対ベースライン1；††= $p<0.01$ 対初期運動。

10

【図2】健常な対象18名の上腕動脈への重炭酸緩衝生理食塩水中の亜硝酸ナトリウムの注入の効果を示すグラフである。図2Aは、NO合成の阻害なしでの指示値それぞれに対する効果を示す。図2Bは、NO合成を阻害した場合の効果を示す。図1と同じ記号に加えて、亜硝酸塩—静脈亜硝酸塩、 μM ；NO-ヘム—静脈鉄-ニトロシル-ヘモグロビン、 μM ；およびMet Hb—静脈メトヘモグロビン、%；+= $p<0.01$ 対初期運動。

【図3】NO合成を阻害しない場合と阻害する場合とでの、健常な対象10名におけるベースラインおよび運動中の上腕動脈への低用量亜硝酸ナトリウムの注入の効果を示す一連のグラフである。図3Aは、ベースラインおよび5分間の $NaNO_2$ 注入後での前腕血流を示す。図3Bは、低用量亜硝酸塩注入を実施した場合と実施しない場合とでの、ベースラインおよびL-NMMA注入中の、運動ストレスを加えた場合と加えない場合とでの前腕血流を示す。図3Cは、血流計測時における前腕循環からの亜硝酸塩の静脈レベルを示す。図3Dは、ベースラインおよび運動ストレス下の亜硝酸塩注入後のS-ニトロソ-ヘモグロビン（S-NO）および鉄-ニトロシル-ヘモグロビン（Hb-NO）の静脈レベルを示す。

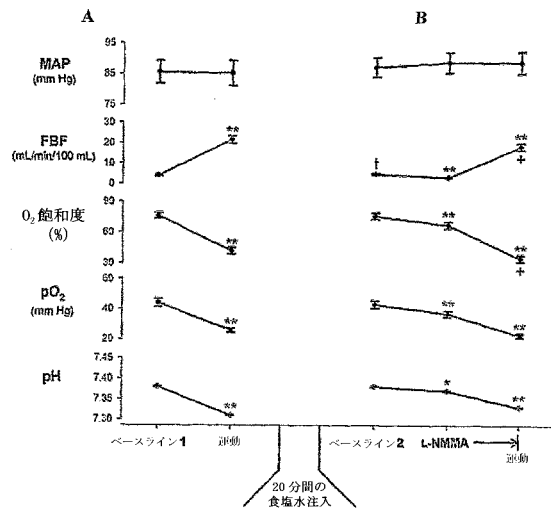
20

【図4】NO-ヘモグロビンアダクトの形成を示す1対のグラフである。図4Aは、鉄-ニトロシル-ヘモグロビンおよびS-ニトロソ-ヘモグロビンの形成を、亜硝酸塩注入した場合および運動とともに亜硝酸塩注入した場合とベースラインを比較して示す。図4Bは、亜硝酸塩注入中のNO-ヘモグロビンアダクトの形成をヒト循環中のヘモグロビン酸素飽和度と比較する。

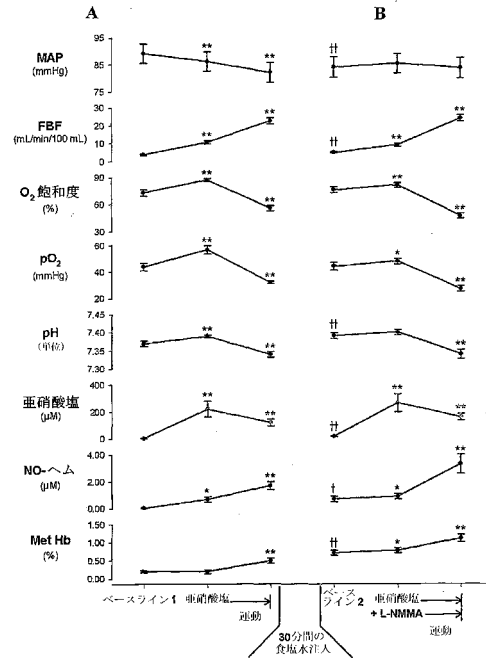
【図5】図5Aは、PBS（「PBS」）、脱酸素化赤血球（「デオキシRBC」）および酸素化赤血球（「オキシRBC」）の溶液への亜硝酸塩注入後のNO放出を示す。図5Bは、PBSと混合した亜硝酸塩（各セット中の第一のバー）ならびに酸素化および脱酸素化赤血球（各セット中それぞれ第二および第三のバー）からのNO形成の速度を示す。

30

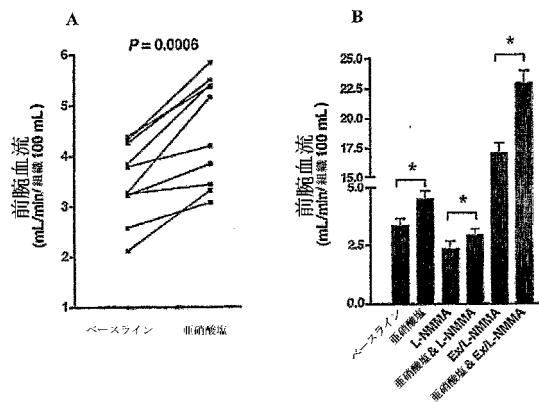
【図 1】



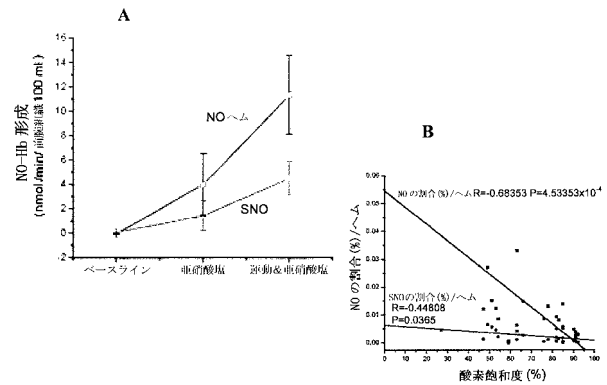
【図 2】



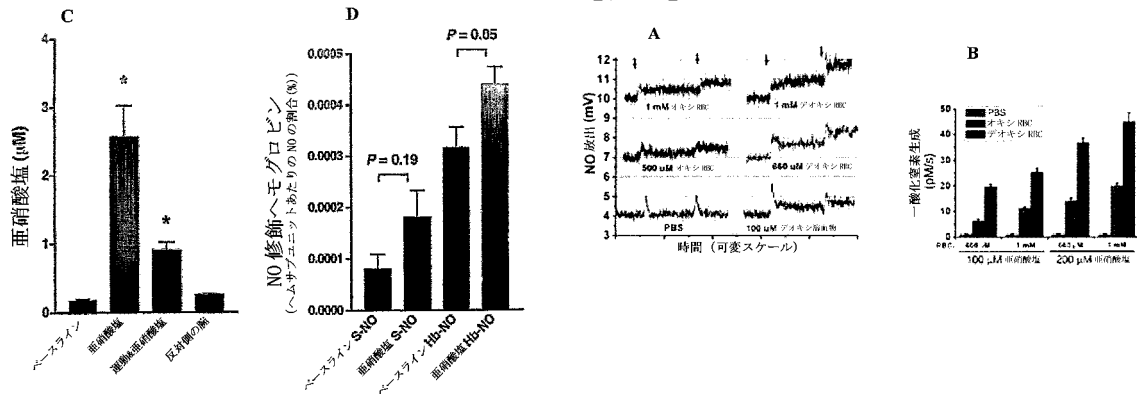
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 グラッドウィン マーク ティー.

アメリカ合衆国 ワシントン ディーシー ノースウェスト ネブラスカ アベニュー 4927

(72)発明者 キャノン リチャード サード

アメリカ合衆国 メリーランド州 ポトマク ケンツデイル ドライブ 9413

(72)発明者 シェクター アラン エヌ.

アメリカ合衆国 メリーランド州 ベテスダ ビーチ アベニュー 5405

合議体

審判長 内藤 伸一

審判官 大宅 郁治

審判官 増山 淳子

(56)参考文献 特表2007-528855 (JP, A)

Eur. J. Pharmacol, 1970, Vol. 11, pp. 29-32.

Br. J. Clin. Pharmacol, 1981, Vol. 11, pp. 57-61.

医学のあゆみ, 1989, Vol. 148, pp. 71-74.

Clinician, 1996, No. 456, pp. 76-80.

医療, 2001, Vol. 55, pp. 212-218.

脳と循環, 2001, Vol. 6, pp. 69-75.

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K33/00

REGISTRY、CAplus、MEDLINE (STN)