

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2003 -1617

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15.11.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **17.11.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/0004229**

(33) Země priority: **SE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.02.2004**
(Věstník č. 2/2004)

(86) PCT číslo: **PCT/SE2001/002542**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO2002/040052**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 33/08

A 61 K 38/43

A 61 P 11/08

A 61 P 11/06

(71) Přihlašovatel:

AGA AB, Lidingö, SE;

(72) Původce:

Hedenstierna Göran, Djursholm, SE;

Chen Luni, Uppsala, SE;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Inhalace oxidu dusnatého

(57) Anotace:

Použití inhalovatelného plynného oxidu dusnatého (NO) v kombinaci s inhibitorem cyklooxygenasy pro výrobu léčiva pro léčbu plicní vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest u savců, zejména lidí, za účelem zmírnění hypo- nebo non-reaktivity na léčbu plynným oxidem dusnatým nebo pouze donorem oxidu dusnatého a/nebo za účelem zmírnění rebound reakce po ukončení léčby plynným oxidem dusnatým nebo pouze donorem oxidu dusnatého, kde uvedená kombinace je použita v terapeuticky účinném množství pro dosažení relaxace uvedené plicní vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest. Řešení dále popisuje způsob a farmaceutický prostředek pro léčbu plicní vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest za použití výše uvedené kombinace.

Inhalace oxidu dusnatého

Oblast vynálezu

Předkládaný vynález se týká oblastí léčiv pro léčbu plicní vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest u savců, zejména lidí. Přesněji se předkládaný vynález týká léčby jedinců, kteří špatně odpovídají, pokud vůbec, na inhalaci oxidu dusnatého, nebo u kterých dochází k rebound reakci po přerušení inhalace oxidu dusnatého.

Dosavadní stav techniky

Oxid dusnatý relaxuje plicní cévy, zejména tehdy, když jsou kontrahovány při různých onemocněních, jak je uvedeno dále. Oxid dusnatý také relaxuje hladké svaly dýchacích cest (Belvisi MG, Stretton CD, Barnes PJ. Eur. J. Pharmacol. 1992; 210: 221-222), a inhalace exogenního oxidu dusnatého zmírňuje konstrikci dýchacích cest v reakci na různá činidla u laboratorních zvířat a u člověka (Dupuy PM, Shore SA, Drazen JM, Frostell C, Hill WA, Zapol NM. J.Clin. Invest. 1992; 90:421-428; Högman M, Frostell C, Arnberg N, Hedenstierna G. Eur. Respir. J. 1993; 6: 177-180; Högman M, Frostell CG, Hedenström H, Hedenstierna G. Am. Rev. Respir. Dis. 1993; 148:1474-1978). Například, EP 560 928, US 5,485,827, 5,873,359 a WO 92/10228 popisují použití oxidu dusnatého pro léčbu bronchokonstrikce a plicní vasokonstrikce. Bylo však zjištěno, že účinek této léčby má značnou inter- a intra-individuální variabilitu. Dále, ačkoliv může být inhalace NO (INO) účinnou terapií u pacientů s plicní hypertensí, přibližně 1/3 pacientů reaguje málo nebo nereaguje vůbec na INO. Kromě toho bylo pozorováno zhoršení plicní hypertense a oxygenace během pokusů o ukončení INO, což se označuje jako rebound reakce. Také byla

popsána život ohrožující hemodynamická instabilita a úmrtí při přerušení inhalace oxidu dusnatého. Postupné snižování dávky NO prodlužuje terapii NO, ale stále ještě nemusí eliminovat rebound reakci.

Mechanismy odpovědné za hyporeaktivitu a rebound reakci nejsou zcela jasné. Jednou hypotézou je, že inhalace NO může mechanismem negativní zpětné vazby inhibovat endogenní produkci NO spojenou se snížením syntézy NO. Ve studii tvořící základ pro předkládaný vynález se vyvinul zvířecí model, u kterého docházelo k rebound reakci při přerušení inhalace NO infusí endotoxinu po dobu alespoň 3 hodin. Dále, některé objevy naznačují, že rebound reakce není způsobena pouze snížením produkce endogenního NO, ale také - a možné z větším významem - zvýšenou aktivitou vasokonstrikčního Endothelinu 1 (ET-1). Dalším objevem bylo, že existuje negativní korelace mezi reakcí na INO a velikostí rebound reakce. Tak platí, že čím slabší efekt INO, tím silnější rebound reakce. Podobná vazba mezi hypo- nebo non-reaktivitou a rebound fenoménem byla zjištěna Davidsonem a kol. u případů syndromu respirační tísně novorozenců. (D. Davidson, MD; Pediatrics, 104(2): 231-236, 1999).

V našem modelu infuze endotoxinu způsobila dvojfázové zvýšení tlaku v plicní arterii a snížení PaO₂. Nejprve se objevilo za 15-30 minut po zahájení endotoxinové infuze těžké zvýšení plicní hypertense, paralelně se zvýšením koncentrací thromboxanu A₂ (TXA₂) nebo jiných cyklooxygenasových (CCX) produktů. Za druhé, stabilně se období plicní hypertense a hypoxie objevilo za 2,5 hodiny po zahájení endotoxinové infuze, paralelně se zvýšením ET-1.

Několik studií udává, že INO selhala v reversi plicní vasokonstrikce indukované thromboxanovým analogem (Welte M

et al., Acta Physiol Scand 1995, July, 154(3): 395-405).
Ikeda S. et al. (Ikeda S., Shirai M., Shimouchi A., Mm KY.,
Ohsawa N., Ninomiya I., J.Physiology 1999 Feb; 49(1): 89-98)
popsali, že INC v kombinaci s intravenosně podaným
prostacyklinem může produkovat silnější vasodilatační
účinek.

Dále, specificky substituované fenylalkenové kyseliny a
estery, které inhibují bronchokonstrikci indukovanou
leukotrieny nebo kyselinou arachidonovou jsou známe z US
4,536,515 a US 4,537,906.

Konečně, Lipton H.L. et al; "Influence of
cyklooxygenase blockade on a response to isoproterenol,
bradykinin and nitroglycerin in the feline pulmonary
vascular bed"; Prostaglandins; 1984, Vol. 28. No. 2, str.
253-270, popsali, že cyklooxygenasové produkty, jako je
PGI₂, nezprostředkují vasodilatační reakci na isoproterenol,
bradykinin a nitroglycerin plicní vaskulatuře..

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem je značně
překvapivé, že kombinovaná účinná terapie plicní
vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest, tj. terapie,
ve které jsou vedlejší účinky INC, jak jsou popsány výše,
eliminovány nebo významně zmírněny, je možná za použití
způsobu podle předkládaného vynálezu.

Podstata vynálezu

Jedním předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí
vhodných sloučenin, které mohou být použity pro relaxování
dýchacích cest nebo plicních cév u jedinců, kteří jsou hypo-
nebo non-reaktivní na léčbu plynným oxidem dusnatým nebo
pouze donorem oxidu dusnatého.

Jiným předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí vhodných sloučenin pro použití v zabránění snížených relaxačních nebo život ohrožujících účinků oxidu dusnatého, když je použit samostatně, výhodně pro použití v zabránění nebo eliminaci rebound reakce při přerušení inhalace oxidu dusnatého.

Dalším předmětem předkládaného vynálezu je použití čistého inhalovatelného léčiva.

Další předměty předkládaného vynálezu budou odborníkům v oboru jasné po prostudování následujícího popisu.

Výše uvedené předměty, stejně jako další předměty předkládaného vynálezu, stejně jako další předměty, které mohou být prováděny odborníky v oboru podle předkládaného vynálezu, jsou prováděny za použití způsobů a farmaceutických přípravků a jejich použití definovaných v připojených patentových nárocích.

Přesněji, v prvním aspektu předkládaný vynález poskytuje použití inhalovatelného oxidu dusnatého (NO) v kombinaci s inhibítorem cyklooxygenasy (COX) pro výrobu léčiva pro léčbu plicní vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest u savce, zejména u člověka, za účelem zlepšení hypo- nebo non-reaktivity na léčbu plynným oxidem dusnatým nebo pouze donorem oxidu dusnatého a/nebo za účelem zlepšení rebound reakce v případě ukončení léčby plynným oxidem dusnatým nebo pouze donorem oxidu dusnatého, kde uvedená kombinace je použita v terapeuticky účinném množství pro dosažení uvedeného zlepšení.

Tak bylo podle předkládaného vynálezu překvapivě zjištěno, že snížené relaxační účinky exogenního oxidu dusnatého, nebo i život ohrožující účinky po přerušení inhalace oxidu dusnatého, jsou - alespoň částečně - způsobeny cyklooxygenasovými produkty.

Přesněji, bylo zjištěno, že když se inhibitor cyklooxygenasy (COX) použije v kombinaci s oxidem dusnatým, tak je relaxační účinek oxidu dusnatého potencován, nebo je relaxační účinek oxidu dusnatého prodloužen, nebo jsou zlepšeny redukováného účinky oxidu dusnatého samotného, nebo je eliminována nebo zmírněna rebound reakce nastávající po přerušení inhalace oxidu dusnatého.

Podrobný popis předkládaného vynálezu

Kombinace plynného oxidu dusnatého a COX inhibitoru podle předkládaného vynálezu může být použita pro výrobu léčiva pro léčbu všech typů konstrikcí dýchacích cest a plicních cév.

Takové konstrikce mohou být důsledkem traumatu, tukové embolie do plic, syndromu respirační tísně dospělých, vysokohorské nemoci, akutní plicní hypertense po kardiovaskulárním nebo plicním chirurgickém výkonu, persistující plicní hypertense u novorozenců, syndromu perinatální aspirace, syndromu hyalinních membrán, akutní plicní embolie, hypoxie a asthma bronchiale (například status asthmaticus).

Jednou alternativou předkládaného vynálezu je tedy výroba léčiva je tedy výroba léčiva pro léčbu savce, který je hypo- nebo non-reagující na inhalaci samotného plynného oxidu dusnatého. Toto provedení vynálezu má značný klinický

význam, protože ve skupině pacientů léčených inhalovaným oxidem dusnatým existuje velká podskupina hypo- nebo non-reagujících jedinců.

Jiným provedením předkládaného vynálezu je výroba léčiva pro léčbu rebound reakce objevující se po přerušení inhalace NO.

Výhodným provedením předkládaného vynálezu je výroba léčiva pro léčbu bronchokonstrikce, jako je bronchokonstrikce asociovaná s asthma bronchiale, zejména s akutním asthma bronchiale nebo status asthmaticus.

Podle předkládaného vynálezu je oxid dusnatý výhodně použit v plynné, inhalovatelné formě. Inhalace plynného oxidu dusnatého představuje značené zlepšení v terapii, například ve srovnání s non-plynným donorem oxidu dusnatého, protože plyn neobsahuje částice nebo kapičky, které by musely být dispergovány nebo transportovány do respiračního traktu. Plyny mají dlouhou dráhu volné difuze, snadněji pronikají za překážky (jako jsou kontrahované dýchací cesty) než částice nebo kapičky, a rozpouštějí se přímo ve tkáni bez toho, že by způsobovaly bronchospasmus. Příznivé účinky plynného NO na svalový tonus plicních cév a dýchacích cest je pozorován bezprostředně po inhalaci, což činí z NO první obranu proti bronchospasmu, stejně jako proti plicní vasokonstrikci, po které může následovat - pokud je to žádoucí - inhalace činidel s delší dobou účinku.

Nicméně, podle jiného provedení je oxid dusnatý podán ve formě donoru oxidu dusnatého, tj. ve formě sloučeniny, která uvolňuje oxid dusnatý. Známé sloučeniny uvolňující oxid dusnatý použitelné při provádění předkládaného vynálezu jsou nitroso nebo nitrosylové sloučeniny, jako je S-nitroso-

N-acetylpenicilamin, S-nitroso-L-cystein a nitrosoguanidin, které se vyznačují tím, že obsahují -NO skupinu, která je spontánně uvolňována nebo jinak transferována ze sloučenina za fyziologických podmínek, jako jsou podmínky v plicích. Dalšími sloučeninami jsou sloučeniny, ve kterých je NO navázán na komplex přechodného kovu a jako takový je snadno uvolňován nebo přenášen ze sloučeniny za fyziologických podmínek, a mezi takové sloučeniny patří nitroprussid, NO-ferredoxin nebo komplex NO-hem. Dalšími vhodnými sloučeninami obsahujícími dusík jsou sloučeniny, které jsou metabolizovány endogenními enzymy respiračního a/nebo cévního systému za vzniku NO radikálu, jako je například arginin, glycerol-trinitrát, isoamylnitrit, anorganický dusitan, amid a hydroxylamin. Typy sloučenin uvolňujících oxid dusnatý a způsoby pro jejich syntézu jsou dobře známy v oboru. Výhodně je donorem oxidu dusnatého sloučenina, která uvolňuje oxid dusnatý takovým způsobem, že jsou ovlivněny pouze dýchací cesty a plicní cévy.

Donor oxidu dusnatého použitý v předkládaném vynálezu může být podán jako prášek (tj. jemně dělený pevný materiál, buď samostatně nebo ve směsi s biologicky kompatibilním nosičem, nebo s jednou nebo více dalšími terapeutickými sloučeninami) nebo jako kapalina (tj. rozpuštěný nebo suspendovaný v biologicky kompatibilním kapalném nosiči, volitelně ve směsi s jednou nebo více dalšími terapeutickými sloučeninami), a výhodně je inhalován v nebulizované formě (výhodně obsahující částice nebo kapičky mající průměr menší než 10 μm). Práškové a kapalné nosiče jsou nosiče běžně používané v tradičních inhalačních léčivech pro asthma a tak jsou dobře známy v oboru. Optimální dávky mohou být určeny postupy dobře známými odborníkům v oboru.

Inhibitorem cyklooxygenasy použitým v předkládaném

vynálezu může být jakákoliv sloučenina vhodná pro použití u savce, zejména u člověka, která může být podána vhodným způsobem. Experimenty provedené v předkládaném vynálezu jsou experimenty s neselektivním COX-inhibitorem. Nicméně, zdá se, že blokáda COX-2 enzymu zesiluje a prodlužuje efekt INC. Blokáda COX-1 a COX-2 enzymů může oslabit rebound reakci. Použití neselektivních COX blokátorů je proto užitečné, ale výhodných účinků může být dosaženo i při použití selektivnějších COX-blokátorů.

Nicméně, některými COX inhibitory, které mohou být použity v předkládaném vynálezu, jsou: diklofenak; aceklofenak; nabumeton; meloxicam; meklofenamik; nimesulid; paracetamol; rofecoxib; celecoxib; DuP 697 (5-brom-2-(4-fluorfenyl)-3-[4-(methylsulfonyl)-fenyl]thiofen); nebo GR 32191 (kyselina ((IR- α (Z), 2 β , 3 β , 5 α))-(+)-7-5(((1.1'-bifenyl)-4-yl)-methoxy)-3-hydroxy-2-(1-piperidinyl)-cyklopentyl)-4-heptenová); flosulid (nebo cGP 28238); NS 398 (N-(2-(cyklohexyloxy)-4-nitrofenyl)-methansulfonamid); L-745,337 (N-(6-[(2,4-difluorfenyl)thio]-2,3-dihydro-1-oxo-1H-inden-5-yl)methansulfonamid); DFU ((5,5-dimethyl-3-(3-fluorfenyl)-4-(4-methylsulfonyl)fenyl-2(5H)-furanon); HN-56249 ((3-2,4-dichlorthiofenoxi)-4-methylsulfonylamino-benzensulfonamid); JTE-522 ((4-(4-cyklohexyl-2-methyloxazol-5-yl)-2-fluorbenzensulfonamid); aspirin; indometacin; a ibuprofen.

Z těchto konkrétních sloučenin se aspirin, indometacin a ibuprofen zdají být více selektivními pro COX-1 inhibici, zatímco ostatní sloučeniny (alespoň většina z nich) jsou více selektivní pro COX-1 a COX-2 inhibici nebo v podstatě stejně selektivní pro COX-2 inhibici. Použity mohou být též jejich adiční soli s kyselinami.

Složky použité v předkládaném vynálezu mohou být podány za použití komerčně dostupných inhalačních zařízení. Stlačený NO plyn může být získán od komerčních dodavatelů, typicky jako směs 200-2000 ppm NO v čistém plynném N₂. Uvedený NO-N₂ plyn může být dodáván do inhalovaného vzduchu v dávce 1 - 100000 nmol/min nebo může být smísen se vzduchem, kyslíkem nebo jiným vhodným nosným plynem nebo směsí plynů, obvykle je v uvedené směsi potom přítomen v koncentraci 1 ppm až 180 ppm. Pro inhalace během delší doby se obvykle použije dávka 1-40 ppm, zatímco pro kratší inhalace se použije dávka 1-80 ppm nebo 1-180 ppm, pokud se žádá okamžitý efekt. V posledním uvedeném případě jsou zejména výhodné dávky 20-80 ppm (např. 40-80 ppm) nebo 40-180 ppm, v příslušném pořadí. Protože jsou další podrobnosti týkající se inhalace NO uvedeny v různých přihláškách, například v EP 560 928 B1, jsou tyto přihlášky uvedeny jako odkazy v předkládaném vynálezu.

Oxid dusnatý a inhibitor cyklooxygenasy mohou být podány sekvenčně v jakémkoliv pořadí, nebo mohou být podány simultánně, a v takovém případě jsou obě složky podány buď samostatně ve stejnou dobu, nebo ve formě prostředku obsahujícího jak uvedený oxid dusnatý, tak uvedený inhibitor cyklooxygenasy.

Inhibitor cyklooxygenasy může být podán stejným způsobem jako NO, ale také může být podán jiným způsobem vhodným pro podání farmaceutických prostředků. Mezi takové způsoby patří například sublinguální, orální a rektální podání, aplikace na slizniční povrchy, injekční podání, které může být podkožní, intramuskulární, intravenosní nebo intraperitoneální. Výhodně je inhibitor cyklooxygenasy podán inhalačně. Při tomto způsobu může být podán ve formě prášku (tj. jemně děleného pevného materiálu, buď samotného nebo ve

směsi s biologicky kompatibilním práškovým nosičem, nebo s jednou nebo více terapeutickými sloučeninami), nebo ve formě kapaliny (tj. rozpuštěný nebo suspendovaný v biologicky kompatibilním kapalném nosiči, volitelně ve směsi s jednou nebo více terapeutickými sloučeninami), ale výhodně je inhalován v nebulizované formě (výhodně obsahující částice nebo kapénky mající velikost například menší než 10 μm). Kapalné nosiče a prášky, které jsou vhodné pro použití při inhalaci, jsou běžně používány v tradičních anti-asthmatických terapeutikách a tak jsou dobře známy v oboru.

Inhibitor cyklooxygenasy je použit v terapeuticky účinném množství, kde toto množství je snadno určeno odborníkem v oboru a závisí mimo jiné na typu použité sloučeniny a na způsobu podání. Jak bude odborníkům v oboru jasné, označuje termín "terapeutická" v této souvislosti, stejně jako v celé přihlášce, profylaktickou léčbu, stejně jako již vzniklé onemocnění. Dále, termín "terapeuticky účinný" je použit v tom významu, který je obvyklý v tomto oboru, jak je například definován v EP 560 928 B1, ačkoliv obecně je v tomto specifickém případě inhibitor cyklooxygenasy terapeuticky účinný, pokud zlepšuje negativní efekty vyskytující se při použití plynného oxidu dusnatého samotného. Například, pokud je touto sloučeninou diklofenak, tak je účinný, když je podán v celkové dávce 50-150 mg/den pro dospělého, když se použije orálních tablet, čípků, intramuskulární injekce nebo intravenózní infuze. Toto odpovídá dávce přibližně 0,1 až 5 mg/kg tělesné hmotnosti, například 0,15 až 3 mg/kg tělesné hmotnosti, když je použit ve formě aerosolu. Nicméně, efektu může být někdy dosaženo při použití nižších dávek a někdy jsou nutné dávky vyšší. Pro ostatní sloučeniny může být toto dávkování použito jako základ pro stanovení vhodných dávek.

Ve druhém aspektu předkládaného vynálezu je poskytnut způsob pro léčbu plicní vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest u savce, zejména u člověka, který je určen k eliminaci hypo- nebo non-reaktivity na léčbu plynným oxidem dusnatým nebo donorem oxidu dusnatého a/nebo pro eliminaci rebound reakce po ukončení léčby plynným oxidem dusnatým nebo pouze donorem oxidu dusnatého. V uvedeném způsobu je savci potřebujícímu takovou léčbu inhalačně podán oxid dusnatý (NO), ve formě plynného oxidu dusnatého nebo donoru oxidu dusnatého, v kombinaci s inhibitorem cyklooxygenasy, kde uvedená kombinace použita v množství terapeuticky účinném pro dosažení uvedené eliminace.

Specifická a výhodná provedení uvedené metody jsou výhodná a specifická provedení popsána v použití předkládaného vynálezu.

Konečně, ve třetím aspektu předkládaný vynález poskytuje farmaceutický prostředek pro léčbu plicní vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest u savce, zejména u člověka, který je určen k eliminaci hypo- nebo non-reaktivity na léčbu plynným oxidem dusnatým nebo donorem oxidu dusnatého a/nebo pro eliminaci rebound reakce po ukončení léčby plynným oxidem dusnatým nebo pouze donorem oxidu dusnatého. V uvedeném způsobu je savci potřebujícímu takovou léčbu inhalačně podán oxid dusnatý (NO), ve formě plynného oxidu dusnatého nebo donoru oxidu dusnatého, v kombinaci s inhibitorem cyklooxygenasy, kde uvedená kombinace použita v množství terapeuticky účinném pro dosažení uvedené eliminace.

Při odkazech na specifická a výhodná provedení se též míní uvedená specifická a výhodná provedení předkládaného

vynálezu.

Předkládaný vynález bud nyní popsán na následujících příkladech, které nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Byly provedeny pokusy pro určení efektu COX inhibitoru, diklofenaku, společně s inhalací NO, přesněji na rebound reakci po ukončení uvedené inhalace.

Materiály a metody

Zvířata

Animal Research Ethics Committee of Uppsala University schválil pokus. Použilo se 26 prasat ze švédského chovu o hmotnosti 24–29 kg. Před transportem z farmy se prasatům podala sedace neuroleptikem, azaperonem (STRESNIL, Janssen, Belgium), 40 mg intramuskulárně (im). Anestésie byla indukována atropinem im (0,04 mg/kg), tiletaminem/zolazepamem (ZOLETIL, Virbac Laboratories) (6 mg/kg) a xylzry (ROMPUN, Bayer AG, Germany) (2,2 mg/kg). Po indukci se zavedla kanyla do ušní žíly a injikoval se opiát (FENTANYL, Antigen Pharmaceuticals Ltd, Roscrea, Ireland) (5 µg/kg). Svalová relaxace se provedla pancuroniem (PAVULON, Organon Technika AB, Goteborg, Sweden) (0,2 µg/kg). Anestésie se udržovala kontinuální infusí hypnotika (chlomethiazol, HEMINEVRIN, Astra, Södertälje, Sweden) (400 mg/hodinu), pancuronia (2 mg/hodinu) a fentanylu (50 µg/hodinu). Pokud bylo potřeba, podávaly se opakované dávky fentanylu 0,2–0,5 mg i.v. Hloubka anestésie se považovala za dostatečnou, pokud kožní incise nezpůsobovaly změny v srdeční frekvenci nebo krevním tlaku. Předem ohřátý (38°C)

isotonický fyziologický roztok se podával pro hydrataci 500 ml/hodinu. Zvířata se uložila na záda (vleže na zádech) na zbytek pokusu.

Po indukci anestezie se provedla tracheotomie a zavedla se tracheální kanyla s manžetou (vnitřní průměr 6 mm). Ventilátor s řízením objemu (Siemens 900c) se použil pro mechanickou ventilaci. Čidla zabudovaná do ventilátoru zaznamenávaly tlak v dýchacích cestách a minutovou ventilaci. Respirační frekvence byla udržována na 20 dechách za minutu s dávkováním takovým, aby bylo dosaženo konečného CO_2 (PetCO_2) mezi 36 a 41 mm Hg (4,8-5,4 kpa). Inspirační doba byla 25%; koncová inspirační pauza 5% respiračního cyklu, a konečný expirační tlak (PEEP) 5-cm H_2O . Vdechovaná frakce kyslíku (FIO_2) byla 0,5.

Katetrizace a analýza krve

Katetr se třemi lumen zakončený balónkem (Swan Ganz no.7F) se zavedl cestou pravé zevní jugulární žíly do plicní arterie za účelem odběru krve a měření tlaku. Katetr s větším průměrem lumen se zavedl do kontralaterální jugulární žíly pro infusi a jeho konec byl uložen v horní duté žíle. Pravá arteria carotis se kanylovala pro odběr krve a měření arteriálního krevního tlaku.

Arteriální, centrální venosní a plicní arteriální katetry se napojily na vhodné záznamové zařízení (Sorenson Transpac Transducers, Abbott Critical Care Systems, Ill, USA) a tlaky se zaznamenávaly na Marquette 7010 monitoru (Marquette Electronics Inc., WI USA). Zaznamenával se průměrný arteriální tlak (MAP), průměrný tlak v plicní arterii (MPAP), srdeční puls (HR), centrální venosní tlak (CVP), plicní kapilární tlak (PCWP) a srdeční výdej (Qt). Tlaky v dýchacích cestách se registrovaly z ventilátoru.

Cévní tlaky se zprůměrovaly pro celý respirační cyklus a střední hrudních se použil jako nulový referenční bod.

Qt se měřil termodiluční metodou: 10 ml ledově chladného izotonického roztoku se injikovalo jako bolus a vypočetl se Qt (počítač pro určení srdečního výdeje Marquette 7010, Marquette Electronics Inc., WI, USA). Pro každé měření se podaly alespoň tři injekce a vypočetl se průměr. Injekce se podaly náhodně během respiračního cyklu. Při každém měření se zaznamenával expirační minutový objem. Vzorky smíšené venosní krve a arteriální krve se odebíraly pro analýzu krevních plynů (ABL 3, Radiometer, Copenhagen, Denmark), saturace kyslíkem a koncentrace hemoglobinu (OSM 3, Radiometer, Copenhagen, Denmark). Ve stejnou dobu se odebralo 5 ml arteriální krve a plasma se separovala pro biochemickou analýzu (viz dále).

Poškození plic

Akutní plicní poškození se indukovalo intravenosní infusí endotoxinu 25 $\mu\text{g/kg/hodinu}$ po dobu 3 hodin a poto po zbytek pokusu rychlostí 10 $\mu\text{g/kg/hodinu}$.

Protokol

30 minut po chirurgickém výkonu se provedla základní měření hemodynamických parametrů, odebraly se vzorky krve a odebrala se krev pro následnou biochemickou analýzu. Akutní poškození plic se vytvořilo intravenosní infusí endotoxinu (LPS, E. coli 0111:B4, Sigma Chemicals, St Louis, Mo, USA) 25 $\mu\text{g/kg/hodinu}$ po dobu 3 hodin. Reakce se měřila v 30, 60, 120, a 150 minutě po zahájení infuse endotoxinu. Zvířata se rozdělila do tří skupin pro analyzování potenciálního synergního efektu COX inhibitoru na INO. Prasata byla rozdělena do "skupiny s bloádou cyklooxygenasy (COX)" a

"skupiny bez blokády" a "kontrolní skupiny".

1. Ve skupině s blokádou cyklooxygenasy trvala infuse endotoxinu tři hodiny a potom byla zahájena inhalace 30 ppm INO. Neselektivní COX inhibitor Diklofenak (Sigma D6899) v salinickém roztoku (300 mg/kg) se podal jako iv bolus 30 minut před inhalací NO. Před přerušением INO o 30 minut později se provedlo měření hemodynamických parametrů a výměny plynů a odebrala se krev pro biochemickou analýzu. Měření se provedla také tehdy, když byl NO odebrán na 5, 10, 15, 30 minut pro ověření příznaků rebound reakce. Inhalace NO potom pokračovala po dobu další půl hodiny (tj. čtyři hodiny po zahájení infuse endotoxinu) a potom se inhalace znovu ukončila. Výsledky byly studovány ve stejných časech jako předtím. Toto bylo provedeno proto, aby se se vidělo, zda reakce na INO zůstává nebo se změnila a jestli je jakákoliv rebound reakce silnější než předtím nebo jestli se objevila znovu.

2. Ve skupině bez blokády nebyl podán COX inhibitor. Protokol byl jinak stejný jako ve skupině s blokádou cyklooxygenasy. Od 5 prasat byly odebrány sternotomií ve 4 časech (před, během a po inhalaci NO) během pokusu vzorky plicní tkáně.

3. Kontrolní skupině byla podána stejná infuse endotoxinu, ale nedostaly ani INO, ani COX inhibitor. Kontrolní prasata byla vyšetřována na začátku a v dobách odpovídajících začátku a konci aplikace INO, a na konci pokusu, 5 hodin po zahájení podávání endotoxinu.

Doba pokusu od zahájení aplikace endotoxinu byla tedy 300 minut (pět hodin) a celková doba pokusu, včetně anestezie, přípravy a základních měření před endotoxinem

byla přibližně 7 hodin.

Podávání NO a měření NO v respirovaném vzduchu

NO, 1000 ppm v N₂, se smísil se směsí O₂/N₂, a napojil se na vstup do ventilátoru s nízkým průtokem. Inspirovaný vzduch procházel přes zásobník obsahující natronové vápno pro absorpci jakéhokoli NO₂. Koncentrace inspirovaného NO a NO₂ se měřily za použití chemiluminiscence (9841 NO_x, Lear Siegler Measurement Controls Corporation, Englewood CC, USA) v inspiračním traktu ventilačních trubic. Vdechovaný NO byl nastaven na 30 ppm a vdechovaný NO₂ byl nižší než 0,5 ppm.

Expres COX-1 a COX-2 stanovená Westernovou hybridizací

Bločky plicní tkáně se propláchly PBS při 4 °C. Celkový protein plicní tkáně se extrahoval homogenizací (Ultra-Turrax, Jenke a Xunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Germany) v 5 objemech ledově chladného 0,05 M Tris pufru (pH 7,4) obsahujícího 0,5 mM fenylmethyl-sulfonylfluoridu pro inhibici proteolýzy. Odebral se supernatant a ten se uskladnil při -80 °C do analýzy. Koncentrace celkového proteinu v supernatantu se určila Lowryho metodou. Potom se frakce obsahující protein frakcionovala elektroforesou na dodecylsíransulfát-polyakrylamidovém gelu a elektroforeticky se přenesla na nitrocelulosovou membránu. Skvrna se blokovala 5% BSA v TBS přes noc při 4 °C a potom se inkubovala s anti-COX-1 (1:2500, Cayman Chemical, MI, USA, Ca 160108), COX-2 (1:1500, Cayman Chemical, MI, USA, Ca 160108) v TBS obsahujícím 1% BSA přes noc při 4 °C. Po 5 promytích v TBS se skvrny inkubovaly s anti-králičím imunoglobulinem G (IgG) konjugovaným s křenovou peroxidasou (ředění 1:2500, Vector Laboratories, Burlingame, USA) pro detekci ET-1. Skvrny se promyly 5-krát v TBS a komplex antigen-protilátka se detekoval na fotografickém filmu, za

použití činidla se zesílenou chemiluminiscencí (Amersham, Arlington Heights, IL, USA). Všechny pokusy se provedly třikrát a proužky z každého pokusu se analyzovaly za použití programu od National Institutes of Health (NIH) Image 1.6 C pro statistickou analýzu.

Plasmatický TXB2

Krev se odebrala do předem vychlazených zkumavek obsahujících EDTA (10 mM konečná koncentrace) a odstředila se (10 min, 40°C). Měření koncentrace TXB2 se provedla za použití komerčně dostupného enzymového imunotestu. (Thromboxane B2 ETA kit, Cayman Chemical, MI, USA, Ca 519031). Sérum se odebralo z každé testované zkumavky a uskladnilo se při -70 °C do stanovení TXB2. Pro zajištění toho, že jsou všechny vzorky bez obsahu organických rozpouštědel, se sérum přečistilo před přidáním do testovací jamky. Přečištění TXB2 se provedlo podle návodu Cayman Chemical, kdy nejprve se přidalo do každého vzorku 10000 cpm tritiem-značeného TXB2 (3H-TXB2) a potom 2 ml ethanolu, potom se provedlo mísení při 4 °C po dobu 5 minut a odstředění při 1500 g po dobu 10 minut pro odstranění vysrážených proteinů. Odebral se supernatant a ten se smísil s ultra-čistou vodou. Vzorek se nechal projít přes C-18 kolonu s reverzní fází. 10% eluátu se odebralo pro scintilační detekci.

Enzymové imunotesty se provedly dvojmo smísením 50 µl přečištěného vzorku s 50 µl testovacího činidla a 50 µl antiséra na mikroplotně. Po 18 hodinové inkubaci se přidalo 200 µl Ellmansova činidla pro zahájení enzymatické reakce a absorpce jednotlivých zkumavek se měřila o 30 minut později při 405 nm za použití fotometrické čtečky mikroploten (Thermo Max, Molecular Devices). Koncentrace TXB2 ve vzorcích

se stanovily ze standardních křivek získaných nelineární regresí vzhledem k absorpci osmi známých koncentrací TXB2 v rozmezí od 7,5 do 1000 pg/ml. Intra-testový a inter-testový koeficient variace byly $<10\%$. Pro další podrobnosti viz TXB2 Enzyme Immunoassay Kit 519031 v Cayman Chemical manuálu.

Statistická analýza

Průměr a standardní odchylka od průměru se vypočetly pro všechny proměnné za všech testovaných podmínek. Srovnání se provedla za použití analýzy variance (ANOVA) pro opakovaná měření; pro více srovnání se provedly korekce. Rozdíly se považovaly za statisticky významné při $p < 0,05$.

Výsledky

Endotoxinem indukované poškození plic

Základní hemodynamické parametry a arteriální oxygenace byly podobné jako hodnoty změřené v dřívějších pokusech na zdravých prasatech (Freden F. et al., Br J Anaesth, 77(3); 413-8, 1996). Nebyly zjištěny rozdíly mezi třemi skupinami.

Infuse endotoxinu zvýšila MPAP více než dvakrát po 150 minutách infuse ve všech skupinách. PaO2 byl významně snížen, na polovinu základní hodnoty. Dále, srdeční frekvence se zvýšila, zatímco srdeční výdej se snížil. Nebyly pozorovány významné odlišnosti mezi měřeními provedenými ve 3 a 4 hodině po zahájení infuse endotoxinu v UN-COX skupině, a po 3, 4 a 5 hodině v kontrolní skupině.

Inhalace NO a její přerušeni

Ve skupině bez blokády vedla po 3 hodinách infuse endotoxinu inhalace 30 ppm NO k 28% snížení v MPAP a k 54% zvýšení PaO₂. Poté, co se po 30 minutách inhalace NO přerušila, tak se MPAP rychle zvýšil (během 5 minut) na úroveň, která byla o 23% (9 mmHg) vyšší než před inhalací NO; to znamená, že se rozvinula rebound reakce. PaO₂ se rychle snížil na hodnoty před inhalací NO, ale tato hodnota nevykazovala jasný rebound fenomén.

Když se inhalace NO opakovala po 4 hodinách infuse endotoxinu, tak byl pokles v MPAP a zvýšení v PaO₂ slabší a již ne statisticky významné pro PaO₂, než během testu o jednu hodinu dříve. 5 minut po ukončení inhalace NO se MPAP opět významně zvýšil na hodnoty vyšší než před inhalací NO (+26%) a PaO₂ se snížil na hodnoty nižší než před inhalací NO. Tak byla pozorována jasná rebound hypoxemie.

Byl pozorován inverzní vztah mezi zlepšením v PaO₂ při inhalaci NO a velikostí rebound reakce po přerušení inhalace NO. Čím slabší byla odpověď na inhalovaný NO, tím silnější byl pokles PaO₂ po přerušení inhalace NO. Žádný takový vztah nebyl pozorován pro MPAP.

Ve skupině s blokádu COX snižovalo předléčení diklofenakem MPAP. INO významně snižovala MPAP a zvyšovala PaO₂. Nicméně, po přerušení INO nebyla pozorována rebound reakce ani pro MPAP, ani pro PaO₂. Velikost redukce PAP nebyla větší pro kombinaci INO a diklofenaku. Tato kombinace však prodlužovala trvání účinku inhalovaného NO ve srovnání se skupinou bez blokády. Dále, INO produkovala stejné zlepšení v MPAP a PaO₂ ve druhém pokusu jako během prvního pokusu o hodinu dříve, oproti slabší odpovědi na NO ve skupině bez blokády. Opět nebyla po přerušení INO pozorována žádná rebound reakce. Respirační resistance se zvyšovala

během infuze endotoxinu. INO samotná nebránila ani nezmírňovala toto zvýšení. Nicméně, ve skupině s bloádou COX bylo zvýšení resistance významně nižší ($p < 0,01$) a nebylo přítomné zvýšení během INO period.

V kontrolní skupině zůstávaly MPAP a PaO₂ stabilní v průběhu dvou hodin, což odpovídá INO v testovacích skupinách. Proto popisuje srovnání mezi INO a kontrolní skupinou jasněji zlepšení v MPAP a PaO₂ způsobené dvěma INO, rebound reakcí po přerušení INO a efekty COX inhibitoru.

Inhalace nebo přerušení NO neovlivnily COX-1 expresi, ani ve 3, ani v 5 hodině INO pokusu. Expresí COX-2 byla významně zvýšena po 3 hodinách infuze endotoxinu ve skupině bez bloády a další zvýšení bylo patrné v 5 hodině, kdy byly koncentrace téměř 10-násobkem normálních hodnot ($p < 0,01$). 30 minut INO nemělo žádný vliv na expresi, ani během 3 hodinového, ani během 5 hodinového inhalačního testu. Expresí COX-2 zůstávala zvýšená po INO periodách.

Plasmatická koncentrace TXB-2:

V základních hodnotách nebyl pozorován mezi třemi skupinami významný rozdíl. Plasmatická koncentrace TXA₂ se dramaticky zvýšila (6000- 80000 pg/ml) za půl hodiny po zahájení infuze endotoxinu a snížila se na polovinu základní hodnoty ve 3 hodině, bez rozdílů mezi skupinami. Ve skupině bez bloády se plasmatická koncentrace TXA₂ během inhalace nezměnila, ale zvýšila se pět minut po ukončení INO a dosáhla vrcholu v 15 minutě po ukončení INO ($p < 0,05$). Koncentrace zůstávala zvýšená při zahájení druhé INO aplikace o 30 minut později (20000-40000 pg/ml) s dalším zvýšením po druhém ukončení INO. Ve skupině s COX-bloádou se plasmatická koncentrace TXA₂ nezvýšila první inhalací NO

a jejím ukončením. Nebyl pozorován pokles plasmatické koncentrace TXA2 během druh inhalace NO a nebylo pozorováno zvýšení po ukončení inhalace NO.

P a t e n t o v é n á r o k y

1. Použití inhalovatelného oxidu dusnatého (NO), ve formě plynného oxidu dusnatého nebo donoru oxidu dusnatého, v kombinaci s inhibitorem cyklooxygenasy, pro výrobu léčiva pro léčbu plicní vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest u savců, zejména lidí, za účelem zmírnění rebound reakce po ukončení léčby plynným oxidem dusnatým nebo pouze donorem oxidu dusnatého, kde uvedená kombinace je použita v terapeuticky účinném množství pro dosažení takového zmírnění.
2. Použití podle nároku 1, kde uvedená plicní vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest je asociována s klinickým stavem vybraným ze skupiny zahrnující traumatické poranění, tukovou embolií v plicích, acidosu, syndrom respirační tísně dospělých, akutní vysokohorskou nemoc, akutní plicní hypertensi po kardiovaskulárním nebo plicním chirurgickém výkonu, persistující plicní hypertensi u novorozenců, syndrom perinatální aspirace, syndrom hyalinních membrán, akutní plicní embolií, akutní plicní edém, reakce heparin-protamin, hypoxii a asthma bronchiale.
3. Použití podle nároku 2, kde uvedená konstrikce dýchacích cest je asociovaná s asthma bronchiale.
4. Použití podle nároku 3, kde uvedená konstrikce dýchacích cest je asociovaná s akutním asthma bronchiale nebo se status asthmaticus.
5. Použití podle jakéhokoliv z předchozích nároků, kde uvedeným léčivem je inhalační léčivo.
6. Použití podle jakéhokoliv z předchozích nároků, kde se

uvedená výroba týká léčiva pro sekvenční podání uvedeného oxidu dusnatého a uvedeného COX inhibitoru v jakémkoliv pořadí.

7. Použití podle jakéhokoliv z nároků 1-5, kde uvedené léčivo je ve formě prostředku obsahujícího uvedený oxid dusnatý a uvedený inhibitor cyklooxygenasy pro jejich simultánní podání.

8. Použití podle jakéhokoliv z předchozích nároků, kde uvedený inhibitor cyklooxygenasy je vybrán ze skupiny zahrnující diklofenak; aceklofenak; nabumeton; meloxicam; meclofenamic; nimesulid; paracetamol; rofecoxib, celecoxib, DuP 697; GR 32191; flosulid; NS 398; L-745337; DFU; HN-56249; JTE-552; aspirin; indometacin; a ibuprofen; a jejich soli s kyselinami.

9. Použití podle jakéhokoliv z předchozích nároků, kde NO je přítomen v uvedeném léčivu v dávce 1-100 nmol/min.

10. Použití podle jakéhokoliv z předchozích nároků, koncentrace NO, která je inhalována, je v rozmezí 1-180 ppm, výhodně 1-80 ppm, nejlépe 1-40 ppm, kde uvedený NO je přítomen v nosném plynu nebo směsi plynů.

11. Použití podle jakéhokoliv z předchozích nároků, kde uvedený donor oxidu dusnatého je vybrán ze skupiny zahrnující S-nitroso-N-acetylpenicillamin, S-nitrosocystein, nitroprussid, nitrosoguanidin, glycerol-trinitrát, isoamylnitrit, anorganický dusitan, azid a hydroxylamin.

12. Způsob léčby plicní vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest u savců, zejména lidí, za účelem zmírnění "rebound" reakce po ukončení léčby plynným oxidem dusnatým

nebo pouze donorem oxidu dusnatého, v y z n a č u j í c í s e t í m, že savci, který potřebuje takovou léčbu, je inhalačně podán oxid dusnatý (NO), ve formě plynného oxidu dusnatého nebo donoru oxidu dusnatého, v kombinaci s inhibitorem cyklooxygenasy, kde uvedená kombinace je použita v terapeuticky účinném množství pro dosažení uvedeného zmírnění.

13. Způsob podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro použití definované v jakémkoliv z nároků 2-11.

14. Farmaceutický prostředek pro léčbu plicní vasokonstrikce nebo konstrikce dýchacích cest u savců, zejména lidí, za účelem zmírnění rebound reakce po ukončení léčby plynným oxidem dusnatým nebo pouze donorem oxidu dusnatého, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje oxid dusnatý (NO), ve formě plynného oxidu dusnatého nebo donoru oxidu dusnatého, v kombinaci s inhibitorem cyklooxygenasy, kde uvedený oxid dusnatý a uvedený inhibitor cyklooxygenasy jsou použity v terapeuticky účinném množství pro dosažení uvedeného zmírnění.

15. Farmaceutický prostředek podle nároku 14 v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro použití definované v jakémkoliv z nároků 2-11.