

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7686578号
(P7686578)

(45)発行日 令和7年6月2日(2025.6.2)

(24)登録日 令和7年5月23日(2025.5.23)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	33/00 (2006.01)	A 6 1 K	33/00
A 6 1 K	31/7004(2006.01)	A 6 1 K	31/7004
A 6 1 K	31/047(2006.01)	A 6 1 K	31/047
A 6 1 P	33/00 (2006.01)	A 6 1 P	33/00
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	31/12
請求項の数 15 (全102頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-572283(P2021-572283)	(73)特許権者	521529581
(86)(22)出願日	令和2年6月2日(2020.6.2)		サーティー レスピラトリー リミテッド
(65)公表番号	特表2023-510662(P2023-510662 A)		THIRTY RESPIRATORY LIMITED
(43)公表日	令和5年3月15日(2023.3.15)		イギリス国 W1K 6PL ロンドン レッドプレイス1
(86)国際出願番号	PCT/GB2020/051329		1 Red Place, London
(87)国際公開番号	WO2020/245574		W1K 6PL, United Kingdom
(87)国際公開日	令和2年12月10日(2020.12.10)	(74)代理人	100090398
審査請求日	令和5年5月31日(2023.5.31)		弁理士 大淵 美千栄
(31)優先権主張番号	1907971.4	(74)代理人	100090387
(32)優先日	令和1年6月4日(2019.6.4)		弁理士 布施 行夫
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(72)発明者	ヒュー センプル ムンロー
(31)優先権主張番号	1915277.6		イギリス国 W1K 6PL ロンドン レッドプレイス1
(32)優先日	令和1年10月22日(2019.10.22)		最終頁に続く
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 窒素酸化物を生成するための方法および組成物、ならびに気道を介して窒素酸化物を送達するためのそれらの使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

鼻、口、気道、肺の粘膜および組織の治療において、1つ以上の亜硝酸塩をプロトン源と反応させることにより一酸化窒素を生成するための治療および／または手術に使用するための組み合わせまたは組成物である物質であって、該組み合わせとは別個の物質または組成物を近接させて一緒に使用することであり、

前記組み合わせまたは組成物が、

(i) 1つ以上の亜硝酸塩；

(ii) クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、これらの塩、およびこれらの組み合わせ；アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル（アスコルビルパルミテート）、3-0-エチルアスコルビン酸、6-0-オクタノイルアスコルビン酸、6-0-ドデカノイルアスコルビン酸、6-0-テトラデカノイルアスコルビン酸、6-0-オクタデカノイルアスコルビン酸および6-0-ドデカンジオイルアスコルビン酸から選択される1つ以上の酸を含むプロトン源；および

(iii) 1つ以上の有機ポリオール、ここで、前記1つ以上の有機ポリオールは、エリスリトール、トレイトール、アラビトール、キシリトール、リビトール、マンニトール、ソルビトール、ガラクトール、フシトール、イジトール、イノシトール、およびそれらの組み合わせから選択される；

を含み、

ここで、前記治療および／または手術は、被験体の鼻、口、気道または肺を介して前記

被験体に前記組み合わせまたは組成物を投与することを含み；および（i）それを必要とする被験体、例えばヒト被験体または他の哺乳類被験体、の微生物感染、例えば細菌、ウイルス、真菌、微小寄生虫感染またはそれらの任意の組み合わせ、を治療する方法、もしくは（ii）例えば被験体のある場所での微生物、例えば細菌、ウイルス、真菌細胞および／または微小寄生虫の数を減少させるため、その増殖を防止するため、またはその増殖速度を制限するための抗菌方法である、物質。

【請求項 2】

前記 1 つ以上の亜硝酸塩が、 LiNO_2 、 NaNO_2 、 KNO_2 、 RbNO_2 、 CsNO_2 、 FrNO_2 、 AgNO_2 、 $\text{Be}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ra}(\text{NO}_2)_2$ 、およびそれらの任意の混合物、任意で前記 1 つ以上の亜硝酸塩が、 NaNO_2 、 KNO_2 、またはそれらの混合物から選択される、請求項 1 に記載の物質。

10

【請求項 3】

前記 1 つ以上の亜硝酸塩、または 1 つ以上の亜硝酸塩を含有する NO_x 生成反応系の任意の成分が、

（i）乾燥形態、例えば粒子状乾燥形態で存在する、または

（ii）水性担体、例えば水性液体またはゲルの溶液中に存在し、前記溶液中の亜硝酸イオンのモル濃度が約 0.001 M ～ 約 5 M の範囲内である、請求項 1 または請求項 2 に記載の物質。

【請求項 4】

20

前記 1 つ以上の亜硝酸塩またはそれを含有する NO_x 生成反応系の任意の成分の pH が緩衝されている、請求項 1 ないし請求項 3 のいずれか一項に記載の物質。

【請求項 5】

前記プロトン源の前記 1 つ以上の酸が、クエン酸、その塩、およびそれらの組み合わせから選択され、および／または、アスコルビン酸またはその塩である、請求項 1 ないし請求項 4 のいずれか一項に記載の物質。

【請求項 6】

前記プロトン源、またはその成分の一部、または前記プロトン源を含有する NO_x 生成反応系の任意の成分が、

（i）乾燥形態、例えば粒子乾燥形態で存在し、または

（ii）水性担体、例えば水性液体またはゲルの溶液中に存在し、任意に、前記溶液中のプロトン源のモル濃度が約 0.001 M ～ 約 5 M の範囲内である、請求項 1 ないし請求項 5 のいずれか一項に記載の物質。

30

【請求項 7】

前記プロトン源の pH が緩衝されており、好ましくは約 3 ～ 約 9、例えば約 4 ～ 約 8、例えば約 5 ～ 約 8 の pH に緩衝されている、請求項 1 ないし請求項 6 のいずれか一項に記載の物質。

【請求項 8】

前記 1 つ以上の有機ポリオールが、アラビトール、キシリトール、マンニトール、ソルビトール、およびその任意の組み合わせから選択される、請求項 1 ないし請求項 7 のいずれか一項に記載の物質。

40

【請求項 9】

前記 1 つ以上の有機ポリオール、または前記 1 つ以上の有機ポリオールを含有する NO_x 生成反応系の任意の成分が、

（i）乾燥形態、例えば粒子乾燥形態で存在し、または

（ii）水性担体、例えば水性液体またはゲルの溶液中に存在し、任意に、前記溶液中の 1 つ以上の有機ポリオールの総モル濃度が約 0.001 M ～ 約 5 M の範囲内である、請求項 1 ないし請求項 8 のいずれか一項に記載の物質。

【請求項 10】

（a） NO_x 生成反応の開始時または開始前の、ポリオール成分中または反応溶液中の

50

任意の1つ以上の有機ポリオールは、前記亜硝酸塩成分中または前記反応溶液中の前記亜硝酸イオンの総モル濃度の約0.05～約3倍、例えば約0.1～約2倍、例えば約0.25～約1.5倍である；または

(b) NO_x生成反応の開始時または開始前の、ポリオール成分中または反応溶液中の任意の1つ以上の有機ポリオールは、前記プロトン源成分中または前記反応溶液中の前記プロトン源の総モル濃度の約0.05～約3倍、例えば約0.1～約2倍、例えば約0.25～約1.5倍である、請求項1ないし請求項9のいずれか一項に記載の物質。

【請求項11】

希釈剤、担体、賦形剤、甘味料、味マスキング剤、増粘剤、粘稠化剤、湿潤剤、フィルム形成剤、潤滑剤、結合剤、乳化剤、可溶化剤、安定化剤、着色剤、着臭剤、塩、コーティング剤、抗酸化剤、活性薬剤、防腐剤、およびそれらの任意の組合せから選択される1つ以上の追加成分をさらに含む、請求項1ないし請求項10のいずれか一項に記載の物質。

【請求項12】

請求項1ないし請求項11のいずれか一項に記載の物質であって、

— 1つ以上の亜硝酸塩は、1つ以上のアルカリ金属またはアルカリ土類金属亜硝酸塩、例えば、亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウム、またはそれらの任意の組み合わせを含む；

— プロトン源は、アスコルビン酸またはアスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液；クエン酸またはクエン酸／クエン酸塩緩衝液；またはそれらの2つ以上の任意の組み合わせを含む；

— 前記アスコルビン酸またはアスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液、クエン酸またはクエン酸／クエン酸塩緩衝液、またはそれらの2つ以上の任意の組み合わせの分子は、ポリマーまたは高分子に共有結合していない；

— NO_x生成反応の開始時または開始前の、ポリオール成分中または反応溶液中の1つ以上の有機ポリオールは、亜硝酸イオンの総モル濃度の0.05～3倍である；

— NO_x生成反応の開始時または開始前の、ポリオール成分中または反応溶液中の1つ以上の有機ポリオールは、プロトン源成分中または反応溶液中のプロトン源の総モル濃度の0.05～3倍である；

— 反応混合物と細胞または動物の皮膚、器官または他の組織との接触を伴わない用途では、NO_x生成反応の開始前、特に直前のプロトン源のpHは3.0～9.0の範囲である；

— 反応混合物と細胞または動物の皮膚、器官または他の組織との接触を含む用途では、NO_x生成反応の開始前、特に直前のプロトン源のpHは4.0～8.0の範囲である；

— 反応混合物と、動物被験体の鼻、口、気道または肺との接触を含む用途では、NO_x生成反応の開始前、特に直前のプロトン源のpHは5.0～8.0の範囲である；

— 標的とする微生物は、アクチノマイセス、バシラス、バルトネラ、ボルデテラ、ボレリア、ブルセラ、カンピロバクター、クラミジア、クラミドフィラ、クロストリジウム、コリネバクテリウム、エンテロコッカス、エスキリキア、フランシセラ、ヘモフィルス、ヘリコバクター、レジオネラ、レプトスピラ、リステリア、マイコバクテリウム、マイコプラズマ、ナイセリア、シュドモナス、リケッチア、サルモネラ、赤痢菌、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌、トレポネマ、ウレアプラズマ、ビブリオ、エルシニア属、またはこれらの組み合わせのリストにある細菌種；アスペルギルス、プラストミセス、カンジダ、コクシジオイデス、クリプトコッカス、ヒストプラズマ、ムコルミセテス、ニューモシスチス、スポロトリクス、タラロマイセス、またはこれらの任意の組み合わせのリストにある真菌種；インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、ノロウイルス、ロタウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、RSウイルス(RSV)、アストロウイルス、肝炎ウイルス、およびこれらの組み合わせのリストにあるウイルス；ならびに肉質虫、鞭毛虫、繊毛虫、孢子虫、およびそれらの任意の組み合わせのリストにある原虫群；例えば、SARS-CoV、SARS-CoV-2、Mycobacterium tu

10

20

30

40

50

berculosis、Mycobacterium abscessusを含む非tuberculosisマイコバクテリウム、Pseudomonas aeruginosa、それらの抗生物質耐性株から選択される、請求項1ないし請求項11のいずれか一項に記載の物質。

【請求項13】

1つ以上の有機ポリオールが還元剤を含まない（すなわち、排除する）、請求項1ないし請求項12のいずれか一項に記載の物質。

【請求項14】

前記治療が、被験体におけるライノウイルス、SARS-CoV、SARS-CoV-2、Mycobacterium tuberculosisまたはインフルエンザの感染の治療または予防であり、任意に、前記被験体がヒトである、請求項1ないし請求項13のいずれか一項に記載の物質。

【請求項15】

前記治療が、

(i) 被験体におけるライノウイルスの感染の治療または予防であり、または

(ii) 被験体におけるSARS-CoV (SARS) の感染の治療または予防であり、または

(iii) 被験体におけるSARS-CoV-2 (COVID-19) の感染の治療または予防であり、または

(iv) 被験体におけるMycobacterium tuberculosis (結核菌) の感染の治療または予防であり、または

(v) 被験体におけるインフルエンザの感染の治療または予防であり、

任意で、(i)～(v)のいずれかにおける前記被験体がヒトである、請求項14に記載の物質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体を生成するための方法および組成物、ならびに、例えば一酸化窒素に応答する障害を治療するために、気道を介してヒトおよび動物被験体に一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体を送達するためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

一酸化窒素(NO)および一酸化窒素前駆体は、潜在的な医薬品として広く研究されている。一酸化窒素は血管内皮細胞によって合成・放出される強力な血管拡張物質であり、特に血管局所抵抗や血流の調節に重要な役割を果たしている。哺乳動物細胞において、一酸化窒素は主に、L-アルギニンの酵素的酸化によってL-シトルリンと共に産生される。一酸化窒素はまた、NOシンターゼ酵素とは独立しているように見えるメカニズムによって皮膚から放出される。一酸化窒素はまた、血小板や白血球の凝集および接着の両方の阻害、細胞増殖の阻害、スーパーオキシドラジカルの捕捉、ならびに内皮層透過性の調節にも関与する。癌治療における一酸化窒素の役割は、Biochemistry (Moscow), 63 (7), 802-809 (1998) で考察されており、その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる。一酸化窒素は、J. Clin. Invest. 99 (12), 2818-2825 (1997) のF. C. Fangによって概説され、国際公開第95/22335号および国際公開第02/20026号(アバディーン大学)に記載されるように、抗菌特性を有することが示されており、その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる。一酸化窒素、他の窒素酸化物およびそれらの前駆体の生成のためのシステムの他の公知の使用および適用は、本発明の説明において以下に与えられる。

【0003】

一酸化窒素、他の窒素酸化物、およびそれらの前駆体の、処理のための生物および細胞

10

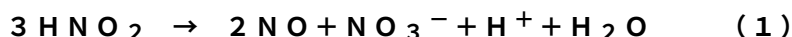
20

30

40

50

への効率的な生成ならびに送達に関連して、実質的な問題が残っている。一酸化窒素を生成するために広く採用されているシステムは、無機酸を用いて亜硝酸塩を酸性化して、最初は出発亜硝酸塩と比べて等モル量の亜硝酸 (HNO_2) を生成することに依拠しており、次いで、この亜硝酸は、水素イオンおよび水とともに一酸化窒素および硝酸塩に容易に分解する。この分解は、下記式 (1) で表される：



【0004】

NOの収率を最大にしようとするために、亜硝酸の形成が一般的に好まれる約4未満のpHで、亜硝酸塩の酸性化を実施することが従来続けられていた。しかしながら、pH<4の使用は、酸が動物組織と接触しているin vivoでの使用には適していない。より高いpHは細胞および生体系に対してより安全であるが、4を超えるpHでは従来の系がNOの満足な収率が得られなかった。pH4を超えて生成されるNOの量を増加させようとするためには大量の亜硝酸塩が必要とされ、これは治療用途において非実用的であり、非経済的である。また、亜硝酸の半減期が短いため、式(1)で表される変換は容易に制御できず、治療用の一酸化窒素の制御放出は困難である。1つ以上の亜硝酸塩とプロトン源との間の反応は一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体を生成し、本明細書では「NO_x生成反応」または「NO_xを生成する反応」などと呼ばれ、「NO_x」は亜硝酸塩、特に一酸化窒素、他の窒素酸化物、およびそれらの前駆体の酸性化の生成物を、個々におよび集合的に任意の組み合わせで言及するために使用される。生成されたNO_xの各成分はガスとして放出され得るか、または反応混合物中の溶液中に通過し得るか、または最初に溶液中に通過し、続いてガスとして放出され得るか、またはそれらの任意の組み合わせであることが理解される。

【0005】

国際公開第00/53193号（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、プロトン源がアスコルビン酸であり、皮膚虚血を治療し、そして創傷治癒を促進するためのクリームまたは軟膏が記載されている。実施例1には、KY JellyTMに基づくゲルが記載されており、実施例7では、ゲルを皮膚と直接接触させた場合と、皮膚を膜で保護した場合の両方で試験した。アスコルビン酸の使用は有意な皮膚炎症を回避すると主張した（国際公開第00/53193号、第2頁）。しかしながら、実際には、ゲルが皮膚に直接接触した場合、ゲルの低いpHによる皮膚炎症の程度は不十分であり、膜が存在する場合、皮膚保護膜はゲルの効果を弱めた。その結果、ゲルは市販されていない。国際公開第00/53193号の組成物は、ポリオールを含まない。

【0006】

国際公開第02/20026号（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、プロトン源がクエン酸またはサリチル酸であり、皮膚の薬物耐性感染症を治療するための皮膚製剤が記載されている。亜硝酸塩含有組成物および酸含有組成物はツインバレルディスペンサーから分配され、次いで、これらの組成物は混合されて、酸を亜硝酸塩と反応させ、その後、皮膚上に広げられる。プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールは任意の防腐剤であることが教示されており、グリセリン（グリセロール）は亜硝酸塩組成物とともに使用するための任意のチキソトロピー剤であることが教示されている。プロピレングリコールを、それぞれクエン酸および亜硝酸塩の一对のクリーム中で使用し、これらをin situで混合して、酸と亜硝酸塩との間の反応を開始させた（例えば、国際公開第02/20026号、実施例3、製剤1）。グリセロールを、セトステアリルアルコールと共に、クエン酸および亜硝酸塩それぞれの一对のローション中で使用し、これをin situで混合して、酸と亜硝酸塩との反応を開始させた（例えば、国際公開第02/20026号、実施例3、製剤3）。反応混合物の好ましいpHは、望ましくない皮膚炎症を引き起こすと予想される5以下、特に4以下のpHである。鼻スプレーもまた教示されており、これは、より高いpHを使用して敏感な鼻粘膜を刺激することを避けることができるように、アスコルビン酸塩またはアスコルビルパルミテートなどの還元酸を使用することができる。しかしながら、より高いpHはその反応を遅くすることが認められている（

国際公開第02/20026号、第16頁、第2段落）。

【0007】

米国特許第6103275号明細書（2000年8月15日公開）（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、亜硝酸塩を酸性化するために、マレイン酸などのpKaが1～4の有機酸とともにアスコルビン酸などの還元剤を使用することが記載されている。粘性（ゲル）組成物は、局所使用のための反応生成物の放出を遅らせるために使用される。酸および亜硝酸塩は一酸化窒素の生成が開始されるまで分離したままであり、還元剤は第1および第2のゲルの少なくとも1つに含まれると記載されている。この方法を使用すべきpH範囲は特定されていない。しかしながら、緩衝液成分が酸と呼ばれるという事実はこれらの化合物が主としてプロトン化形態で存在することを示し得、従って、組成物のpHは実質的に4未満であるべきである。1～4のpKaを有する酸の存在はそのpHでの製剤の良好な緩衝能力を保証するが、そのような酸の組み込みは亜硝酸塩を一酸化窒素に変換する連続効率が維持されるようなレベルでpHが維持されることを保証する便利な方法であり、低いpHは皮膚との接触で実質的な望ましくない皮膚刺激を引き起こすことが予想される。米国特許第6103275号明細書の組成物は、ポリオールを含まない。

10

【0008】

国際公開第2003/013489号（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）において、3%ポリビニルアルコール（PA）がin situで一緒に混合されるべき、クエン酸および亜硝酸塩それぞれのゲルベースとして提案された（国際公開第2003/013489号、実施例7）。しかしながら、試験データ（国際公開第2003/013489号、表11および12）は、PAおよびPA組成物を一緒に混合または使用することなく、安定なゲルを形成することができなかったことを示す。最終組成物に至らなかった上記の提案とは別に、国際公開第2003/013489号の組成物はポリオールを含まない。

20

【0009】

米国特許出願公開第2005/0037093号明細書（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、亜硝酸反応に基づく一酸化窒素生成組成物が記載されており、ポリビニルアルコール、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールを含む任意の賦形剤に言及している。

30

【0010】

中国特許出願公開第101028229号明細書（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、亜硝酸塩と酸との反応によって一酸化窒素を生成する化粧品が記載されている。とりわけグリセリン、プロピレングリコールおよびモノステアリン酸グリセリンを添加剤として任意に使用することが教示されている。トリヒドロキシエチルアミンは、特定の実施例における成分としてさらに言及されている。

【0011】

中国特許出願公開第101062050号明細書（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、亜硝酸塩と酸との反応によって一酸化窒素を生成する毛髪成長促進剤が記載されている。とりわけグリセリン、プロピレングリコールおよびモノステアリン酸グリセリンを添加剤として任意に使用することが教示されている。D-パントテニルアルコールおよびパンテノールとイノシトールとの組み合わせは、特定の実施例における成分として言及されている。

40

【0012】

国際公開第2008/110872号（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、例えば、ポリオールおよびポリエチレングリコールから選択される極性溶媒を任意に含有する発泡性一酸化窒素供与体組成物が記載されている（段落[0055]および[0056]）。特定のポリオールは、プロピレングリコール、ブタンジオール、ブテンジオール、ブチンジオール、ペンタンジオール、ヘキサンジオール、オクタンジオール、ネオペンチルグリコール、2-メチル-1,3-プロパンジオール、ジエチレングリ

50

コール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ジブロピレングリコール、ジブチレングリコール、グリセリン、ブタン-1, 2, 3-トリオール、ブタン-1, 2, 4-トリオールおよびヘキサ-1, 2, 6-トリオールであると記載されている。ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール1000 (PEG1000)、PEG4000、PEG6000およびPEG8000は、任意のさらなる成分として多くのポリマー剤のリストに記載されている（段落[0062]）。グリセロール（グリセリン）、プロピレングリコール、ヘキシレングリコール、ジエチレングリコールおよびプロピレングリコールなどのポリオール、ならびにエチレングリコール、ヘキシレングリコール、他のグリコール、ならびにポリエチレングリコールも、段落[0190]および[0191]において任意の浸透促進剤として言及されている。

10

【0013】

国際公開第2009/019498号（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、亜硝酸塩およびプロトン源に追加の成分として、1~4のpKaを有さない非チオール還元剤の使用が記載されている。非チオール還元剤の例は、ヨウ化物アニオン、ブチル化ヒドロキノン、トコフェロール、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β-カロテンであると述べられている。ブチル化ヒドロキノンとは別に、国際公開第2009/019498号の組成物はポリオールを含まない。

【0014】

国際公開第2014/188174号および国際公開第2014/188175（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、プロトン源が三次元ポリマーマトリックスに共有結合したペンダントカルボン酸およびスルホネート基を含むヒドロゲルであり、皮膚病変のための包帯システムおよび経皮送達システムが記載されている。皮膚接触一次層は、亜硝酸塩が吸収されるポリプロピレンメッシュである。メッシュを皮膚上に置き、ヒドロゲルを最上層としてメッシュ上に重ねると、酸および亜硝酸塩の反応生成物は、許容できない皮膚刺激なしに皮膚に良好に送達されることが見出される。国際公開第2014/188175号には、例えば、ポリビニルアルコールから形成され、亜硝酸塩を含有する溶解性フィルムで代替の皮膚接触一次層が開示されている。両方の参考文献において、ヒドロゲルがグリセロールを含み得ることが教示されており、その目的は記載されていない。しかしながら、グリセロールが可塑剤としてこのタイプのヒドロゲルに添加されることは周知である（例えば、国際公開第00/06215号、第14頁参照、その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）。これらの文献には、特定のヒドロキシル含有成分、特に1-チオグリセロール、エリソルベート、アスコルビン酸およびブチル化ヒドロキノンが存在しないことが好ましいことが開示されている。

20

30

【0015】

米国特許出願公開第2014/0335207号明細書（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、「亜硝酸塩媒体」と「酸性化媒体」との混合時に一酸化窒素を生成する局所混合物が記載されている。「亜硝酸塩媒体」の特定の実施形態が段落[0050]~[0055]に個々に記載され、亜硝酸塩は1つ以上のポリオール成分と共に存在する。段落[0054]および[0055]に記載される一般的な亜硝酸塩媒体は、グリセリン、ステアリン酸グリセリル、カプリリルグリコール、エチルヘキシルグリセリンおよびヘキシレングリコールから選択されるポリオールを含有し、他のパラグラフに記載される特定の実施形態は上記のいくつかおよびブチレングリコールを含有する。これらのポリオールが段落[0056]~[0062]に記載される「酸性化媒体」の実施形態の成分でもある。

40

【0016】

米国特許出願公開第2015/0030702号明細書（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、亜硝酸塩-酸反応に基づく皮膚包帯剤が記載されている。皮膚包帯剤は、ヒドロキノンまたはブチル化ヒドロキノンなどの非チオール還元剤を含む。皮膚包帯剤は、例えばポリビニルアルコールまたはポリエチレングリコールなどの親水性ポリマーを含むヒドロゲルを含み得る。

50

【0017】

米国特許出願公開第2017/0209485号明細書（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、発泡体または血清担体中で一酸化窒素を局所的に適用するための装置および方法が記載されている。表面張力および／またはより低い蒸気圧を増加させるための任意の添加剤としてのグリセロールおよび（特定されていない）「グリセロール様成分」の使用は、段落【0070】に記載されている。

【0018】

米国特許出願公開第2019/0134080号明細書（その開示は参考文献として本明細書に組み込まれる）には、少なくとも1つの亜硝酸塩反応物を含む第1の溶液と、少なくとも1つの酸性反応物を含む第2の溶液とを含む複数部分の組み合わせから形成される発泡体として、一酸化窒素生成システムを皮膚に局所的に適用するための組成物および方法が記載されている。発泡体として組み合わせの成分を保持し、通気し、分配するための装置も記載されている。表面張力および／またはより低い蒸気圧を増加させるための任意の添加剤としてのグリセロールの使用が言及されている（段落【0068】）。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

本発明は、1種以上の有機ポリオールが存在下で、亜硝酸塩酸性化剤として有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸から選択される1種以上の酸を含むプロトン源を使用して、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体（まとめて NO_x と呼ぶ）を、これまでよりも効率的に、かつ高められた反応出力で生成することができるという本発明者らの驚くべき発見に基づく。さらに、亜硝酸塩酸性化剤として有機還元酸を使用するこのような反応系の抗菌的に有効な反応生成物は、生理学的に許容可能なpH、例えば、1つ以上の有機ポリオールの使用の有無にかかわらず、約5～約8の間のpHで送達可能であることが見出され、*in vivo*抗菌活性などの有益な生理学的活性を有する組成物として、このようなpHで作動する反応系を、直接送達のために利用可能にする。本発明の基礎をなす一酸化窒素生成方法は生理学的に有効な量の一酸化窒素、任意に窒素の他の酸化物、および／または任意にそれらの前駆体を、長期間、例えば約2時間を超えて、例えば約5時間を超えて、例えば約10時間を超えて、任意に NO_x ガス生成の最初の強いバーストの後に生成し、医学および他の用途において潜在的に有意な使用をもたらすことが見出された。初期の強いバーストが必要とされない場合、対象への反応混合物の投与は NO_x 生成反応の開始後のある期間、例えば、 NO_x 生成反応の開始後約10分、30分、または1時間以上後に行うことができる。

【課題を解決するための手段】

【0020】

本発明は、添付の特許請求の範囲によって定義され、以下の説明に開示される本発明のより一般的な発明の進歩の特定の実施形態である。添付の特許請求の範囲によって定義される本発明は、 NO 生成反応が行われる組み合わせおよび組成物、ならびにその反応のガス生成物の、被験者の鼻、口、気道または肺を介するヒトまたは動物被験者への送達に関する、一般的な発明の進歩の適用に関する。開示に関連して本明細書で説明されるすべての態様、例、実施形態、および選好は添付の特許請求の範囲で定義され、添付の特許請求の範囲によって定義されるように、本発明に等しく、互いに独立して適用可能である。

【0021】

本開示は、一酸化窒素および任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体を生成するためのシステム、方法、組み合わせ、キット、および組成物を提供する。そのシステム、方法、組み合わせ、キットおよび組成物は、反応物として、1つ以上の亜硝酸塩および有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸から選択される1つ以上の酸を含有するプロトン源を含む。そのシステム、方法、組み合わせ、キットおよび組成物は、1つ以上の有機ポリオールをさらに含む。還元酸（すなわち、カルボン酸還元酸および非カルボン酸還元酸）の使用は、一酸化窒素および任意選択で他の窒素酸化物およ

び／または任意選択でそれらの前駆体を、4よりいくらか高いpH、例えば5～8の範囲で生成することを可能にする。本開示はさらに、抗菌使用のためのシステム、方法、組み合わせ、キット、および組成物を提供し、ここで、1つ以上の有機ポリオールは任意であり、反応は5～8の範囲のプロトン源の出発pHで行われる。

【0022】

第1の態様によれば、本開示は一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体を生成するための方法であって、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体を生成するのに適した反応条件下で、有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸から選択される1つ以上の酸を含むプロトン源と1つ以上の亜硝酸塩を反応させることを含み、該反応が1つ以上の有機ポリ

10

オールの存在下で行われる方法を提供する；

以下の1つ以上によって特徴付けられる：

(a) 1つ以上の有機ポリオールは、反応出力増強量で存在する；

(b) プロトン源は、三次元ポリマーマトリックスに共有結合したペンダントカルボン酸基を含むヒドロゲルのみではない；

(c) 1つ以上の有機ポリオールは、グリセロールのみではない；

(d) 1つ以上の増粘剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、グリセロールのみではない；

(e) 1つ以上の可塑剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、グリセロールのみではない；

20

(f) 1つ以上の有機ポリオールは、ポリビニルアルコールのみではない；

(g) 1つ以上の増粘剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、ポリビニルアルコールのみではない；

(h) 上記(b)～(g)のいずれか1つ以上において、「のみではない」という用語は「含まない」と置き換えられる；

(i) 1つ以上の有機ポリオールは、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリンモノステアレート（グリセリルステアレート）、トリヒドロキシエチルアミン、D-パントテニルアルコール、パンテノール、イノシトールと組み合わせたパンテノール、ブタンジオール、ブテンジオール、ブチンジオール、ペンタンジオール、ヘキサンジオール、オクタンジオール、ネオペンチルグリコール、2-メチル-1, 3-プロパンジオール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ジプロピレングリコール、ジブチレングリコール、ブタン-1, 2, 3-トリオール、ブタン-1, 2, 4-トリオール、ヘキサン-1, 2, 6-トリオール、ヘキシレングリコール、カプリリルグリコール、ここに挙げたもの以外のグリコール、ヒドロキノン、ブチル化ヒドロキノン、1-チオグリセロール、エリソルベート、エチルヘキシルグリセリン、それらの任意の組み合わせ、または上記のいずれかとグリセロールおよび／またはポリビニルアルコールとの任意の組み合わせ、のみではない；

30

(j) 1つ以上の有機ポリオールは、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリンモノステアレート（グリセリルステアレート）、トリヒドロキシエチルアミン、D-パントテニルアルコール、パンテノール、イノシトールと組み合わせたパンテノール、ブタンジオール、ブテンジオール、ブチンジオール、ペンタンジオール、ヘキサンジオール、オクタンジオール、ネオペンチルグリコール、2-メチル-1, 3-プロパンジオール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ジプロピレングリコール、ジブチレングリコール、ブタン-1, 2, 3-トリオール、ブタン-1, 2, 4-トリオール、ヘキサン-1, 2, 6-トリオール、ヘキシレングリコール、カプリリルグリコール、ここに挙げたもの以外のグリコール、ヒドロキノン、ブチル化ヒドロキノン、1-チオグリセロール、エリソルベート、エチルヘキシルグリセリン、それらの任意の組み合わせ、または上記のいずれかとグリセロールおよび／またはポリビニルアルコールとの任意の組み合わせ、を含まない。

40

【0023】

50

本開示の第1の態様に係る方法によって調製される一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体は、本開示の第2の態様を構成する。

【0024】

第3の態様によれば、本開示は、有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸から選択される1つ以上の酸を含むプロトン源を使用し、1つ以上の有機ポリオールとの反応出力増強量の存在下で反応を実施することを含む、1つ以上の亜硝酸塩とプロトン源との反応の出力を増強して、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体の他の酸化物を生成する方法を提供する。反応の出力の増強は1つ以上の有機ポリオールを含まないが、同じ条件下で行われる反応と比較される。

【0025】

第4の態様によれば、本開示は、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体を生成するために、1つ以上の亜硝酸塩とプロトン源との反応混合物中で、1つ以上の有機ポリオールを使用して、その反応の出力を増強することを提供する。ここで、プロトン源は、有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸から選択される1つ以上の酸を含む。反応の出力の増強は1つ以上の有機ポリオールを含まないが、同じ条件下で行われる反応と比較される。

【0026】

第5の態様によれば、本開示は、1つ以上の亜硝酸塩をプロトン源と反応させることによって、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体を生成するための組み合わせ、キットまたは組成物を提供する。この組み合わせ、キットまたは組成物は以下を含む：

(i) 1つ以上の亜硝酸塩；

(ii) 有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸から選択される1つ以上の酸を含むプロトン源

(iii) 1つ以上の有機ポリオール；

以下の1つ以上によって特徴付けられる：

(a) 1つ以上の有機ポリオールは、反応出力増強量で存在する；

(b) プロトン源は、三次元ポリマーマトリックスに共有結合したペンダントカルボン酸基を含むヒドロゲルのみではない；

(c) 1つ以上の有機ポリオールは、グリセロールのみではない；

(d) 1つ以上の増粘剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、グリセロールのみではない；

(e) 1つ以上の可塑剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、グリセロールのみではない；

(f) 1つ以上の有機ポリオールは、ポリビニルアルコールのみではない；

(g) 1つ以上の増粘剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、ポリビニルアルコールのみではない；

(h) 上記(b)～(g)のいずれか1つ以上において、「のみではない」という用語は「含まない」と置き換えられる；

(i) 1つ以上の有機ポリオールは、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリンモノステアレート（グリセリルステアレート）、トリヒドロキシエチルアミン、D-パントテニルアルコール、パンテノール、イノシトールと組み合わせたパンテノール、ブタンジオール、ブテンジオール、ブチンジオール、ペンタンジオール、ヘキサジオール、オクタンジオール、ネオペンチルグリコール、2-メチルー1,3-プロパンジオール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ジプロピレングリコール、ジブチレングリコール、ブタン-1,2,3-トリオール、ブタン-1,2,4-トリオール、ヘキサン-1,2,6-トリオール、ヘキシレングリコール、カプリリルグリコール、ここに挙げたもの以外のグリコール、ヒドロキノン、ブチル化ヒドロキノン、1-チオグリセロール、エリソルベート、エチルヘキシルグリセリン、それらの任意の組み合わせ、または上記のいずれかとグリセロ

10

20

30

40

50

ールおよび／またはポリビニルアルコールとの任意の組み合わせ、のみではない；

(j) 1つ以上の有機ポリオールは、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリンモノステアレート（グリセリルステアレート）、トリヒドロキシエチルアミン、D-パントテニルアルコール、パンテノール、イノシトールと組み合わせたパンテノール、ブタンジオール、ブテンジオール、ブチンジオール、ペンタンジオール、ヘキサンジオール、オクタンジオール、ネオペンチルグリコール、2-メチル-1, 3-プロパンジオール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ジプロピレングリコール、ジブチレングリコール、ブタン-1, 2, 3-トリオール、ブタン-1, 2, 4-トリオール、ヘキサン-1, 2, 6-トリオール、ヘキシレングリコール、カプリリルグリコール、ここに挙げたもの以外のグリコール、ヒドロキノン、ブチル化ヒドロキノン、1-チオグリセロール、エリソルベート、エチルヘキシルグリセリン、それらの任意の組み合わせ、または上記のいずれかとグリセロールおよび／またはポリビニルアルコールとの任意の組み合わせ、を含まない。

【0027】

プロトン源が3次元ポリマーマトリックスに共有結合したペンダントカルボン酸基を含むヒドロゲルを含み、組み合わせまたはキットが2つ以上の別個の組成物を含む場合、1つ以上のポリオールは、ヒドロゲルと直接接触または混合して別個の組成物中に存在しないことが好ましい。

【0028】

本開示の第5の態様の組み合わせ、キットまたは組成物の化学物質は、例えば、上記の成分(i)、(ii)および(iii)、ならびに任意選択で水および／またはpH緩衝液から本質的になり得る。「から本質的になる」という表現は、例えば、上記の成分(i)、(ii)および(iii)、ならびに任意選択で水および／またはpH緩衝液の効果が悪影響を受けない限り、少量の1つ以上の追加の成分の存在を可能にすることができる。そのような1つ以上の追加成分の総量は、適切には、組み合わせ、キットの化学成分、または組成物の約20重量または体積%未満、例えば約15重量または体積%未満、例えば約10重量または体積%未満、例えば約5重量または体積%未満であってもよい。

【0029】

組み合わせ、キットまたは組成物の化学物質は、例えば、上記の成分(i)、(ii)および(iii)、任意選択で水および／またはpH緩衝液、および／または組み合わせ、キットの化学成分、または組成物の約20重量または体積%未満、例えば約15重量または体積%未満、例えば約10重量または体積%未満、例えば約5重量または体積%未満の量の1つ以上の追加成分からなってもよい。

【0030】

第6の態様によれば、本開示は、以下を含む組み合わせ、キットまたは組成物を調製する方法を提供する：

(i) 1つ以上の亜硝酸塩；

(ii) 有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸から選択される1つ以上の酸を含むプロトン源；および

(iii) 1つ以上の有機ポリオール；

これは、成分(i)、(ii)および(iii)を相互に近接させて組み合わせまたはキットを形成するか、または混合物にして組成物を形成することを含む；

以下の1つ以上によって特徴付けられる：

(a) 1つ以上の有機ポリオールは、反応出力増強量で存在する；

(b) プロトン源は、三次元ポリマーマトリックスに共有結合したペンダントカルボン酸基を含むヒドロゲルのみではない；

(c) 1つ以上の有機ポリオールは、グリセロールのみではない；

(d) 1つ以上の増粘剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、グリセロールのみではない；

(e) 1つ以上の可塑剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、グリセロー

10

20

30

40

50

ルのみではない；

(f) 1つ以上の有機ポリオールは、ポリビニルアルコールのみではない；

(g) 1つ以上の増粘剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、ポリビニルアルコールのみではない；

(h) 上記(b)～(g)のいずれか1つ以上において、「のみではない」という用語は「含まない」と置き換えられる；

(i) 1つ以上の有機ポリオールは、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリンモノステアレート（グリセリルステアレート）、トリヒドロキシエチルアミン、D-パントテニルアルコール、パンテノール、イノシトールと組み合わせたパンテノール、ブタンジオール、ブテンジオール、ブチンジオール、ペンタンジオール、ヘキサンジオール、オクタンジオール、ネオペンチルグリコール、2-メチル-1, 3-プロパンジオール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ジプロピレングリコール、ジブチレングリコール、ブタン-1, 2, 3-トリオール、ブタン-1, 2, 4-トリオール、ヘキサン-1, 2, 6-トリオール、ヘキシレングリコール、カプリリルグリコール、ここに挙げたもの以外のグリコール、ヒドロキノン、ブチル化ヒドロキノン、1-チオグリセロール、エリソルベート、エチルヘキシルグリセリン、それらの任意の組み合わせ、または上記のいずれかとグリセロールおよび／またはポリビニルアルコールとの任意の組み合わせ、のみではない；

(j) 1つ以上の有機ポリオールは、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリンモノステアレート（グリセリルステアレート）、トリヒドロキシエチルアミン、D-パントテニルアルコール、パンテノール、イノシトールと組み合わせたパンテノール、ブタンジオール、ブテンジオール、ブチンジオール、ペンタンジオール、ヘキサンジオール、オクタンジオール、ネオペンチルグリコール、2-メチル-1, 3-プロパンジオール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ジプロピレングリコール、ジブチレングリコール、ブタン-1, 2, 3-トリオール、ブタン-1, 2, 4-トリオール、ヘキサン-1, 2, 6-トリオール、ヘキシレングリコール、カプリリルグリコール、ここに挙げたもの以外のグリコール、ヒドロキノン、ブチル化ヒドロキノン、1-チオグリセロール、エリソルベート、エチルヘキシルグリセリン、それらの任意の組み合わせ、または上記のいずれかとグリセロールおよび／またはポリビニルアルコールとの任意の組み合わせ、を含まない。

【0031】

本明細書で使用される「組み合わせ」という表現は、近接させて一緒に使用される別個の物質または組成物（「成分」と呼ばれる）を指す。成分を近接させることは、複数の段階で達成することができ、それによって最初に一部であるが全てではない成分と一緒にサブコンビネーションまたは部分的な組み合わせにし、その後、1つ以上のさらなる成分または他のサブコンビネーションまたは部分的な組み合わせと近接させる。「近接」は、密接な混合物、溶液または懸濁物を含むことができ、または密接な混合物、溶液または懸濁物にならない物理的近接を意味することができ、例えば、キット内の別個の容器中で、後の便利な使用のために一緒に提供される。例えば、亜硝酸塩成分およびプロトン源成分はそれぞれ、1つ以上の亜硝酸塩（またはそれらのいくつか）および有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸（またはそれらのいくつか）から選択される1つ以上の酸を含み、別々にまたはキットの別個の容器中に貯蔵され得、混合によって使用するために一緒にされて、 NO_x 生成反応を開始し得る。1つ以上の有機ポリオールは、亜硝酸塩成分およびプロトン源成分の一方または両方において供給されてもよく、または NO_x 生成反応が開始されるときにも混合される有機ポリオール成分において別々に供給されてもよい。1つ以上のいずれの成分も、それ自体、複数の部分および複数の容器中に存在し得る。例えば、亜硝酸塩とプロトン源が同じ溶液中にあり、したがって反応することができるので、 NO_x 生成反応が直ちに開始されるように、組み合わせを近接させることができる。あるいは、例えば、亜硝酸塩およびプロトン源が乾燥粉末混合物中にあるか、または NO_x 生成反応が開始する前に（例えば、組み合わせが接触する粘膜からの）水を必要とするカプ

セル化粒子として存在するために、NO_x生成反応が直ちに開始されず、開始前に1つ以上のさらなる工程または作用が起こるように、組み合わせを近接させてもよい。

【0032】

実施形態において、開示の第1～第6の態様は互いに独立して、上述の特徴(a)のみ、特徴(b)のみ、特徴(c)のみ、特徴(d)のみ、特徴(e)のみ、特徴(f)のみ、特徴(g)のみ、(b)のみを指す特徴(h)、(c)のみを指す特徴(h)、(d)のみを指す特徴(h)、(e)のみを指す特徴(h)、(f)のみを指す特徴(h)、(g)のみを指す特徴(h)、特徴(a)と(b)のみ、特徴(a)と(b)のみを指す特徴(h)、特徴(a)と(c)のみ、特徴(a)と(c)のみを指す特徴(h)、特徴(a)と(d)のみ、特徴(a)と(d)のみを指す特徴(h)、特徴(a)と(e)のみ、特徴(a)と(e)のみを指す特徴(h)、特徴(a)と(f)のみ、特徴(a)と(f)のみを指す特徴(h)、特徴(a)と(g)のみ、特徴(a)と(g)のみを指す特徴(h)、特徴(b)と(c)のみ、特徴(b)と(c)のみを指す特徴(h)、特徴(b)と(d)のみ、特徴(b)と(d)のみを指す特徴(h)、特徴(b)と(e)のみ、特徴(b)と(e)のみを指す特徴(h)、特徴(b)と(f)のみ、特徴(b)と(f)のみを指す特徴(h)、特徴(a)と(b)と(c)と(f)のみ、特徴(a)と(b)と(c)と(f)のみを指す特徴(h)、(a)～(g)の特徴のすべて、または特徴(a)および(b)と特徴(c)～(g)のすべてを指す特徴(h)、によって特徴付けられてもよい。

10

【0033】

他の実施形態では、本発明の第1から第6の態様が互いに独立して、上述の特徴(c)と(f)と(i)のみ、特徴(c)と(f)と(j)のみ、特徴(i)と特徴(c)および(f)を指す特徴(h)、特徴(j)と特徴(c)および(f)を指す特徴(h)、特徴(d)と(g)と(i)のみ、特徴(d)と(g)と(j)のみ、特徴(i)と特徴(d)および(g)を指す特徴(h)、特徴(j)と特徴(d)および(g)を指す特徴(h)、特徴(e)と(f)と(i)のみ、特徴(e)と(f)と(j)のみ、特徴(i)と特徴(e)および(f)を指す特徴(h)、または特徴(j)と特徴(e)および(f)を指す特徴(h)、によって特徴付けられてもよい。

20

【0034】

本開示の第1～第6の態様は、特徴(a)～(g)のすべて、特徴(a)と(b)と特徴(c)～(g)のすべてを指す特徴(h)、特徴(c)と(f)と(i)のみ、特徴(c)と(f)と(j)のみ、特徴(i)と特徴(c)および(f)を指す特徴(h)、特徴(j)と特徴(c)および(f)を指す特徴(h)、特徴(d)と(g)と(i)のみ、特徴(d)と(g)と(j)のみ、特徴(i)と特徴(d)および(g)を指す特徴(h)、特徴(j)と特徴(d)および(g)を指す特徴(h)、特徴(e)と(f)と(i)のみ、特徴(e)と(f)と(j)のみ、特徴(i)と特徴(e)および(f)を指す特徴(h)、特徴(j)と特徴(e)および(f)を指す特徴(h)、によって特徴付けられることが好ましい。特徴(c)と(f)がその開示を特徴付ける場合、特徴(d)、(e)および(g)は不必要であり、その場合、特徴(d)、(e)および(g)（または特徴(d)、(e)および(g)を指す特徴(h)）はリストから省略され、特徴(c)と(f)（または特徴(c)および(f)を指す特徴(h)）を特徴とする例として考慮されてもよい。

30

【0035】

本明細書で使用される「1つ以上の有機ポリオール反応出力増強量」とは、1つ以上の有機ポリオールの量が、NO_x生成反応からの一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体の少なくとも1つの量および／または出力期間を、同じ条件下ではあるが1つ以上の有機ポリオールなしで反応が行われた場合よりも高くすることを意味する。「量」とは特に、出発反応系において反応するために利用可能な亜硝酸塩1グラム当たりの、放出されたガスの一酸化窒素の総質量を意味する。本発明の基礎をなす実験研究は、放出されたガスの一酸化窒素、任意選択で他のガスの量を測定

40

50

し、これらも増強されることを見出した。このことから、発生した NO_x の総質量は本発明によって増強されると考えられるので、「量」は反応混合物中の溶液中に通過する一酸化窒素の総質量ならびに NO_x 反応生成物の総質量も含むと理解される。「出力時間」とは特に、反応が完了する前の反応において、ガス状の一酸化窒素、任意選択で他のガスの少なくとも1つが放出される時間の長さを意味する。「1つ以上の有機ポリオール」の反応出力増強量」という用語の詳解において上で説明したのと同じ理由のために、「出力期間」という用語は、一酸化窒素が反応混合物中の溶液中を通過する時間の長さ、および NO_x 反応生成物が生成される時間の長さも含むと考えられる。よく知られているように、最終的に亜硝酸塩はプロトン源との反応によって使い果たされ、 NO_x 生成反応中に上昇する pH はその最大値に達し、反応は停止する。本発明の第1の態様の方法は、 NO_x 生成反応の収率を、特に、しかし排他的ではなく、生成される NO の量、例えば生成される NO の量を、例えば少なくとも約5%、例えば少なくとも約10%、例えば少なくとも約25%、例えば最大で約150%、例えば最大で約125%、例えば最大で約100%、例えば最大で約75%の向上度まで向上させることが好ましい。本発明の第1の態様の方法は、反応が完了する前に、少なくとも1つの一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体、好ましくは一酸化窒素が、反応が少なくとも約5%、例えば少なくとも約10%完了する前に、反応中に発生する時間の長さを増強することが好ましい。本発明を用いて、少なくとも1つの一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体、好ましくは一酸化窒素、および最も好ましくはガス状の一酸化窒素が放出され、特に有効量で放出される時間を、少なくとも約2時間、例えば少なくとも約5時間、例えば最大で約10時間以上まで増強することができる。一酸化窒素の発生のこの時間の増強は、例えば、ポリオール成分を使用せずに同量の一酸化窒素を発生させる期間の約150%までの増強度以上まで、例えば約125%までの増強度まで、例えば約100%までの増強度まで、例えば約75%までの増強度まで、を表すことができる。

【0036】

一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択で前駆体の生成は、任意の目的のためであってよい。治療目的および非治療目的の両方が、以下に例示され、詳解される。

【0037】

第7の態様によれば、本開示は、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体を標的位置、例えば任意の細胞、器官、表面、構造、対象、またはその内部空間に送達する治療的または非治療的方法を提供する。この方法は、(a) 標的位置またはその近傍に、本開示の第5の態様による組み合わせまたは組成物を投与すること；または(b) 本開示の第1または第3の態様による方法を使用すること、または開示の第4の態様による使用を実施すること、または開示の第5の態様による組み合わせ、キットまたは組成物を使用して、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体を生成し、それによって生成された一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体を標的位置またはその近傍に送達すること；または(c) 本開示の第2の態様による一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／またはそれらの前駆体をターゲット位置またはその近傍へ送達すること、を含む。

【0038】

本開示の第7の態様の方法は、例えば、それを必要とする被験体における微生物感染を治療する方法であってもよい。被験体は、例えば、ヒト被験体または他の哺乳動物被験体であってもよい。微生物感染は、例えば、細菌、ウイルス、真菌、微生物、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。

【0039】

本開示の第7の態様の方法は、例えば、被験体に対して行われる血管拡張の方法であってもよい。被験体は、例えば、ヒト被験体または他の哺乳動物被験体であってもよい。

【0040】

本開示の第7の態様の方法は、例えば、抗菌方法であってもよい。抗菌方法は、ある場所で微生物、例えば細菌、ウイルス、真菌細胞および／または微小寄生生物の数を減少させること、その増殖を防止すること、またはその増殖速度を制限することであり得る。このような方法の標的となる微生物は、例えば、プランクトン細胞または粒子であってもよく、またはバイオフィームまたは他のコロニーとして存在してもよい。本開示によって標的とされる微生物の任意の集団は、プランクトン性であろうとなかろうと、1つの微生物種または菌株からなることができ、または2つ以上の種または菌株を含むことができる。

【0041】

第8の態様によれば、本開示は治療に使用するための、本開示の第5の態様による組み合わせ、キットまたは組成物、あるいは本開示の第2の態様による一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体を提供する。

【0042】

本開示の第8の態様による使用のための、組み合わせ、キットもしくは組成物、または一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体は、例えば、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体を被験体またはその内部空間に送達する治療方法において使用するためのものであってもよい。この方法は、(a)被験体もしくはその内部空間、またはその近傍に、本開示の第5の態様による組み合わせまたは組成物を投与すること；または(b)本開示の第1または第3の態様による方法を使用すること、または開示の第4の態様による使用を実施すること、または開示の第5の態様による組み合わせ、キットまたは組成物を使用して、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体を生成し、それによって生成された一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体を被験体もしくはその内部空間、またはその近傍に送達すること；または(c)本開示の第2の態様による一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／またはそれらの前駆体を被験体もしくはその内部空間、またはその近傍へ送達すること、を含む。

【0043】

本開示によれば、我々は、驚くべきことに、3日後に*M.abscessus*が100%まで殺菌されること、および／または*M.tuberculosis*、H1N1インフルエンザウイルス、SARS-CoVウイルスおよびSARS-CoV-2ウイルスが死滅することは、プロトン源が5～8の範囲の初期pHを有するクエン酸（有機カルボン酸）またはアスコルビン酸（有機非カルボン酸還元酸）である場合にも提供されることから明らかなように、静菌効果および殺生物効果の点で良好な抗菌活性があることがわかった。本明細書における「初期pH」という用語は、その初期pHに影響を与える反応混合物の他の成分が存在する前の、任意の所望のpH緩衝液を含む、プロトン源の最初に形成された水溶液のpHを指す。この抗菌効果は、1つ以上の有機ポリオール、例えばマンニトールまたはソルビトールの存在によって増強されるように見えるが、1つ以上の有機ポリオールの存在に依存しない。酸（例えばクエン酸またはアスコルビン酸）が5～8の範囲の初期pHを有するNO_x生成反応生成物からの強力な抗菌効果の発見は特に驚くべきことであり、結核、多剤耐性結核および非結核性マイコバクテリア感染症を含む、治療が困難なものおよび／または抗生物質に耐性のあるものを含む呼吸器および肺感染症の治療における有望な適用を提供する。このような感染症の治療は、反応混合物またはその成分もしくは前駆体を含む噴霧水性組成物を5～8の範囲のpHで吸入することによって提案されることができる。「広域スペクトル」治療（治療的および／または予防的治療、ならびに病原体の拡散を防止するための生物および無生物の表面および空間のin vitro治療を含む）として知られる、細菌、ウイルス、真菌、および寄生虫の群のうちの1つ以上からの病原体を含む可能性のある複数の病原体を含む感染の治療もまた、本発明によって可能になる。

【0044】

第9の態様によれば、本開示は、(a)標的とされる微生物、もしくはその近傍、また

10

20

30

40

50

は微生物に感染した被験体もしくはそのような被験体の内部空間に、本開示の第5の態様による組み合わせまたは組成物を投与すること；または（b）本開示の第1または第3の態様による方法を使用すること、または本開示の第4の態様による使用を実施すること、または本開示の第5の態様による組み合わせ、キットまたは組成物を使用して、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体を生成し、それによって生成される一酸化窒素、任意選択で窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体を、標的とされる微生物、もしくはその近傍、または微生物に感染した被験体もしくはそのような被験体の内部空間に送達すること；または（c）本開示の第2の態様による一酸化窒素、任意選択で窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体を、標的とされる微生物、もしくはその近傍、または微生物に感染した被験体もしくはそのような被験体の内部空間に送達すること、を含む第7の態様による抗菌方法の改変を提供する。

10

ただし、pHに影響を及ぼすNO_x生成反応混合物の他の成分が存在する前に、任意の所望の緩衝液を含むプロトン源の水溶液の初期pH、または1つ以上の亜硝酸塩との反応の開始時の反応混合物のpHは、5～8の範囲であり、1つ以上のポリオールは任意であり、省略されてもよい。

【0045】

本開示の第9の態様による方法を実施する際に、本開示の第5または第8の態様による組み合わせ、キット、または組成物を使用して、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体を生成することができる；

ただし、pHに影響を及ぼすNO_x生成反応混合物の他の成分が存在する前に、任意の所望の緩衝液を含むプロトン源の水溶液の初期pH、または1つ以上の亜硝酸塩との反応の開始時の反応混合物のpHは5～8の範囲であり、1つ以上のポリオールは任意であり、省略されてもよい。

20

【0046】

本開示の第9の態様の方法は、例えば、それを必要とする被験体における微生物感染を治療する方法であってもよい。被験体は、例えば、ヒト被験体または他の哺乳動物被験体であってもよい。微生物感染は、例えば、細菌、ウイルス、真菌、微小寄生虫感染、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。微生物感染は、粘膜を含む被験体の皮膚上にあってもよい。微生物感染は、被験者の内部空間、例えば本発明によれば、被験者の鼻、口、気道、肺、または肺胸膜の内膜にあってもよい。

30

【0047】

ヒトまたは動物の体に投与される本開示のすべての態様において使用される成分および混合物、ならびにヒトまたは動物の体に投与される任意の担体および賦形剤は、好ましくは、投与時の組織の刺激および炎症を最小限にするために、生体適合性および／または薬学的に受容可能である。

【0048】

本開示による組み合わせ、キットおよび組成物は、以下により詳細に記載される、様々な適切な装置およびデバイスとともに保存および使用され得る。本開示による方法は、以下により詳細に説明されるように、そのような装置およびデバイスを使用して適切に実行され得る。

40

【0049】

本開示の任意の1つ以上の態様に関して、具体的に説明されるすべての実施形態、例、および選好は、本開示の任意の1つまたは複数の他の態様に適用可能であると理解されるべきである。さらに、本開示の一態様による任意の方法または使用は必要に応じて、任意の他の態様による組み合わせ、キットまたは組成物を使用して実施されてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】実施例1の異なる反応条件における、経時的に放出された一酸化窒素（亜硝酸mg当たりのnmol NO）の累積プロットを示す。

【図2】実施例2に記載される種々の試験の結果を示す。

50

【図 3】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 4】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 5】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 6】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 7】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 8】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 9】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 10】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 11】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 12】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 13】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 14】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 15】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 16】実施例 2 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 17】S I F T - M S 測定に使用される装置の概略を示す。

【図 18】公知の抗生物質、カルボン酸溶液、カルボン酸-亜硝酸塩溶液およびカルボン酸-亜硝酸塩-ポリオール溶液の組み合わせの *M. abscessus* に対する抗菌活性に関する、実施例 3 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 19】公知の抗生物質、カルボン酸溶液、カルボン酸-亜硝酸塩溶液およびカルボン酸-亜硝酸塩-ポリオール溶液の組み合わせの *M. abscessus* に対する抗菌活性に関する、実施例 3 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 20】公知の抗生物質、カルボン酸溶液、カルボン酸-亜硝酸塩溶液およびカルボン酸-亜硝酸塩-ポリオール溶液の組み合わせの *M. abscessus* に対する抗菌活性に関する、実施例 3 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 21】公知の抗生物質、カルボン酸溶液、カルボン酸-亜硝酸塩溶液およびカルボン酸-亜硝酸塩-ポリオール溶液の組み合わせの *M. abscessus* に対する抗菌活性に関する、実施例 3 に記載される種々の試験の結果を示す。

【図 22-1】クエン酸、亜硝酸ナトリウムおよびマンニトールを含有する溶液についての多数の臨床分離株培養物 (clinical isolate cultures) に対する最小発育阻止濃度 (MIC) に関する、実施例 4 に記載の試験の結果を示す。

【図 22-2】クエン酸、亜硝酸ナトリウムおよびマンニトールを含有する溶液についての多数の臨床分離株培養物 (clinical isolate cultures) に対する最小発育阻止濃度 (MIC) に関する、実施例 4 に記載の試験の結果を示す。

【図 23】ポリオールを含むおよび含まないカルボン酸-亜硝酸塩溶液についての緑膿菌に対する抗菌活性に関する、実施例 5 に記載の試験の結果を示す。

【図 24】T H P - 1 細胞における *M. tuberculosis* HN 878 に対する抗菌活性に関する、実施例 6 に記載の試験の結果を示す。

【図 25】T H P - 1 細胞における *M. tuberculosis* HN 878 に対する抗菌活性に関する、実施例 6 に記載の試験の結果を示す。

【図 26】T H P - 1 細胞における *M. tuberculosis* HN 878 に対する抗菌活性に関する、実施例 6 に記載の試験の結果を示す。

【図 27】T H P - 1 細胞における *M. tuberculosis* HN 878 に対する抗菌活性に関する、実施例 6 に記載の試験の結果を示す。

【図 28】M D C K 細胞中の H 1 N 1 インフルエンザ A ウイルスに対する細胞毒性 (LDH 細胞毒性アッセイ) および抗菌活性に関する、実施例 7 に記載の試験の結果を示す。(a) MOI=0.002 (●) および MOI=0.02 (■) の希釈範囲 (横軸は亜硝酸塩モル濃度である) で、細胞毒性が灰色で示され、細胞毒性スケールは右側にある (0.015M までの測定亜硝酸塩濃度での細胞毒性は LDH コントロールの 1% 以下であった); (b) オセルタミビル (1 μM) と比較した、MOI=0.002 および亜硝酸塩濃度 0.15M、0.015M および 0.0015M でのプレート写真を示す。前文に列挙したプレートの順序は、図中のプレート

10

20

30

40

50

の左から右への順序と同じである（２つの実験があり、それぞれの対応する実験のプレートを上下に示す）。プレートのオセルタミビル対のすぐ右側にあるプレートの右端の対は、ウイルスコントロールである。細胞毒性を、LDHコントロールの％（感染後２４時間での３回のLDHアッセイの平均）として、試験プレートの各対の下に示す。

【図２９】類似の条件下（実施例３に記載）で、アミカシンおよび陰性コントロールと比較した、水酸化ナトリウムを使用してpH 5.8に緩衝化された亜硝酸ナトリウム、クエン酸、およびマンニトールの酸性溶液のM.abscessusを死滅させる有効性の試験の結果を示す。

【図３０】ヒト被験体における肺感染症の治療に使用するための実施例１０に記載される本発明の実施形態を概略的な形態で示す。

【図３１】吸入されたガス状一酸化窒素（図３１の左側）と比較した、本発明による液体NO生成製剤と肺組織との間の接点（図３１の右側）を示す。

【図３２】実施例８のLDH細胞毒性アッセイの結果を示す（実験１および２）。データは、２つの実験の平均＋標準偏差（SD）として表される。SDは灰色のエラーバーとして示されている。最大LDH活性（細胞＋溶解緩衝液）を１００％に設定し、すべてのサンプル結果をこの値と比較した。LDH陽性コントロールは、キットからの陽性コントロールであった。黒色のバー（２時間のインキュベーション）はそれぞれの場合におけるバーの各対の左手のバーであり、赤色のバー（２４時間のインキュベーション）は、それぞれの場合におけるバーの各対の右手のバーである。

【図３３】MOI 3.0での実施例８（実験１）のSARS-CoV-2に対する抗ウイルス試験の結果を示す。実験１では、SARS-CoV-2を用いて４つの感染多重度（MOIs）で１つのウイルス収量減少アッセイを実施し、接種ウイルスの逆滴定を用いて確認した。MOI 3で接種された細胞の場合、滴定後、ウイルスコントロールウェル中で2.1 log₁₀ TCID₅₀/mlが検出された。SARS-CoV-2収量の減少は、試験した条件のいくつかについて観察され得る。２４時間のインキュベーション後、最低３種類のMOIs（すなわち、0.3、0.03および0.003）では、ほとんどウイルスが検出されなかった。おそらく、Vero E6細胞上での２４時間の複製は、高レベルの子孫ウイルスを得るのに十分ではない。データは、２回の滴定の平均＋標準偏差（SD）として表される。SDはエラーバーとして示されている。クロロキンおよび細胞コントロールlog₁₀ TCID₅₀/ml値を有する水平点線レベルは、アッセイの検出限界（LOD）である。

【図３４】実施例８のSARS-CoV-2に対する抗ウイルス試験の結果（実験２）を示す。（a）がMOI 3.0であり、（b）がMOI 0.3である。この方法は、製剤が実験２の製剤であり、子孫ウイルスのレベルを増加させるために２４時間ではなく４８時間インキュベーションを行ったこと以外は、これらのMOIsにおける実験１の部分に対応する。データは、２回の滴定の平均＋標準偏差（SD）として表される。SDはエラーバーとして示されている。クロロキンおよび細胞コントロールlog₁₀ TCID₅₀/ml値を有する水平点線レベルは、アッセイの検出限界（LOD）である。

【図３５】MOI 3.0での実施例９のSARS-CoV-2に対する抗ウイルス試験の結果を示す。クリスタルバイオレットでの細胞単層染色の前に、２枚のプレートを顕微鏡でチェックし、細胞変性効果（CPE）についてスコア付けした。CPEは、下にある単層の頂部上の細胞破片の形態で、これらのプレート中に存在することが検出された。顕微鏡で検査した２枚のプレートの結果を示す。データは、条件当たりの単一滴定である。残りのプレートについては、クリスタルバイオレット染色後には細胞単層の密度が高すぎるために、CPEをスコア化することができなかった。細胞コントロールlog₁₀ TCID₅₀/ml値を有する水平点線レベルは、アッセイの検出限界（LOD）である。

【発明を実施するための形態】

【００５１】

ここで、本開示の態様を、特定の実施形態を参照して詳細に説明する。以下に記載される特定の実施形態は、そのような態様と明らかに不適合でない限り、本開示の態様のいずれにも適用され得る。特定の実施形態はまた、そうすることができない場合を除いて、他

10

20

30

40

50

のすべての特定の実施形態と組み合わせることができる。

【0052】

亜硝酸塩および亜硝酸塩成分

本開示の態様は、1つ以上の亜硝酸塩の使用を含む。以下において、「亜硝酸塩成分」は、1つ以上の亜硝酸塩自体、および1つ以上の亜硝酸塩を含む一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物、および／または任意選択でそれらの前駆体を生成するための反応系の任意の成分を包含する。

【0053】

亜硝酸塩の選択は特に限定されない。本開示の組成物において使用され得る亜硝酸塩の具体例としては、アルカリ金属亜硝酸塩またはアルカリ土類金属亜硝酸塩が挙げられる。いくつかの実施形態において、1つ以上の亜硝酸塩は、 LiNO_2 、 NaNO_2 、 KNO_2 、 RbNO_2 、 CsNO_2 、 FrNO_2 、 AgNO_2 、 $\text{Be}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Sr}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Mn}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ba}(\text{NO}_2)_2$ 、 $\text{Ra}(\text{NO}_2)_2$ 、およびそれらの任意の混合から選択される。

【0054】

特定の実施形態では、亜硝酸塩は、 NaNO_2 または KNO_2 である。一実施形態では、亜硝酸塩は、 NaNO_2 である。

【0055】

一実施形態では、亜硝酸塩成分は、乾燥形態で、任意選択で粉末などの粒子形態で、本開示で使用するために提供されてもよい。必要に応じて、亜硝酸塩成分は、例えば、1つ以上の亜硝酸塩とプロトン源との間の反応を制御または遅延させる目的で、カプセル化またはマイクロカプセル化されてもよい。乾燥形態および／またはカプセル化は、単独で、または本開示による一酸化窒素を生成するための反応の他の成分との混合物で、亜硝酸塩成分の貯蔵を補助し得る。さらに、乾燥形態および／またはカプセル化は、単独で、または本開示による一酸化窒素を生成するための反応の他の成分との混合物で、亜硝酸塩成分の、医療デバイスなどの小さな物体への組み込みを補助し得る。このような物体としては、例えば、創傷包帯、包帯、血管および他のステント、カテーテル、ペースメーカー、除細動器、心臓補助デバイス、人工弁、電極、整形外科用ねじおよびピン、ならびに他の薄い医療用および／または移植可能な物品および吸入器（ハンドヘルドおよび噴霧器）が挙げられる。詳細については、以下の「成分の任意選択でのカプセル化（例えば、マイクロカプセル化）」と題するセクションを参照されたい。

【0056】

必要に応じて、亜硝酸塩成分は、任意選択でカプセル化またはマイクロカプセル化されて、乾燥粉末または結晶として、またはゲルまたは他の担体系、例えば水性担体、例えば水性ゲルまたはその溶液とともに存在することができる。乾燥または粉末形態の亜硝酸塩成分は、便宜上、水の添加によって使用前に溶液に調製することができる。 NO_x 生成反応混合物の任意の他の成分の添加前（例えば、直前）、特に酸性化前（例えば、直前）における亜硝酸塩溶液中の亜硝酸イオンのモル濃度は、約 0.001 M ～ 約 5 M の範囲であり得る。いくつかの実施形態では、 NO_x 生成反応混合物の任意の他の成分の添加前（例えば、直前）、特に酸性化前（例えば、直前）における亜硝酸塩溶液中の亜硝酸イオンのモル濃度は約 0.01 M ～ 約 2 M の範囲である。いくつかの実施形態では、 NO_x 生成反応混合物の任意の他の成分の添加前（例えば、直前）、特に酸性化前（例えば、直前）における亜硝酸塩溶液中の亜硝酸イオンのモル濃度は約 0.1 M ～ 約 2 M の範囲である。より具体的な実施形態では、 NO_x 生成反応混合物の任意の他の成分の添加前（例えば、直前）、特に酸性化前（例えば、直前）の亜硝酸塩溶液中の亜硝酸イオンのモル濃度は約 0.2 M ～ 約 1.6 M の範囲である。実施形態において、 NO_x 生成反応混合物の任意の他の成分の添加の前（例えば、直前）、および特に酸性化の前（例えば、直前）の亜硝酸塩溶液中の亜硝酸イオンのモル濃度は、 $0.8 \sim 1.2\text{ M}$ の範囲であり得る。例えば、 NO_x 生成反応混合物の任意の他の成分の添加の前（例えば、直前）、および特に有機カルボン酸成分との組み合わせの前（例えば、直前）における亜硝酸塩溶液中の亜硝酸イオンの

10

20

30

40

50

モル濃度は、約 0.8 M、約 0.9 M、約 1.0 M、約 1.1 M、約 1.2 M、約 1.5 M または約 1.7 M であり得る。

【0057】

NO_x 生成反応混合物の 2 つ以上の前駆体溶液を組み合わせることは、当業者に周知のように、各溶液中の各溶質の濃度の希釈または溶質の組み合わせを引き起こすことに留意されたい。例えば、溶質 A および B の 2 つの 1 M 溶液の等量を混合することは、A の濃度を 0.5 M に変化させ、B の濃度を 0.5 M に変化させる。特に明記しない限り、本明細書に記載される亜硝酸塩の濃度は、液体、すなわち溶液として添加される NO_x 生成反応混合物の任意の他の成分を添加する前（例えば直前）の初期溶液中の亜硝酸塩の濃度である。NO_x 生成反応混合物中の実際の濃度は、反応混合物の成分およびそれがどのように調製されたかを知ることによって容易に導き出すことができる。

10

【0058】

必要に応じて、亜硝酸塩成分は、乾燥形態または担体液体で、1 つ以上のポリオールまたはそのようなポリオールのいくつかを含むことができる。

【0059】

亜硝酸塩成分が、ゲルまたは他の担体系、例えば水性担体中に、例えば水性ゲルまたは水溶液として貯蔵されることが望まれる場合、亜硝酸塩を含有する系は、貯蔵中の亜硝酸塩の分解を防止するために適切な pH に緩衝されることが好ましい。約 6 ~ 9、例えば約 7 の pH が好ましい。

【0060】

亜硝酸塩成分は、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でこれらの前駆体を生成することが望まれるまで、プロトン源と接触させないことが好ましい。このため、亜硝酸塩成分は、好ましくはキット、装置またはデバイスのリザーバーまたは容器内に保持される。しかしながら、代わりに、亜硝酸塩成分の乾燥成分、プロトン源、および 1 つ以上のポリオールを乾燥組成物、例えば粒子状混合物として保持し、水または他の適切な溶媒もしくは液体担体を単に添加することによって反応を開始することが可能である。

20

【0061】

亜硝酸塩は、薬学的に許容される等級の亜硝酸塩であってもよい。いくつかの実施形態では、亜硝酸塩は薬局方グレードである。言い換えれば、亜硝酸塩は、亜硝酸塩についての 1 つ以上の現行の薬局方承認基準に準拠し得る。例えば、亜硝酸塩は、米国薬局方（USP）、欧州薬局方または日本薬局方のうちの 1 つ以上の亜硝酸塩の承認基準に準拠し得る。

30

【0062】

特定の実施形態では、使用される亜硝酸塩がその特性に以下の制限のうちの 1 つ以上を有する：

(i) 亜硝酸塩は、約 0.02 重量%、約 0.01 重量% または約 0.001 重量% 以下の炭酸ナトリウムを含有する；

(ii) 亜硝酸塩は、約 10 ppm (0.001 重量%) 以下のアンチケーキング剤、例えばアルキルナフタレンスルホン酸ナトリウムを含有する；

40

(iii) 亜硝酸塩は、白色からオフホワイトの固体である；

(iv) 亜硝酸塩は、関連する米国薬局方の関連する方法に従って測定された陽イオンについての同定で陽性を有する；

(v) 亜硝酸塩は、関連する米国薬局方の該当する方法に従って測定された亜硝酸塩の同定試験で陽性を有する；

(vi) 亜硝酸塩は、亜硝酸塩を約 97 重量% 以上または 98 重量% 以上、および／または亜硝酸塩を 102 重量% 以下または 101 重量% 以下含有し、これは、例えば、イオンクロマトグラフィー（例えば、抑制された導電率検出と組み合わせたイオンクロマトグラフィー）によって決定されるような、関連する USP 熱量測定法によって任意に決定される；

50

(v i i) 亜硝酸塩は、25℃の10%溶液中で測定した場合、約7～約9、または約8～約9のpHを有し、任意選択で、関連する米国薬局方に従っておよび／またはpH計を使用して測定される；

(v i i i) 亜硝酸塩の乾燥減量は、約0.25重量%以下または約0.01重量%以下である；

(i x) 亜硝酸塩は、カールフィッシャー法で測定した場合に、約0.5重量%以下の含水量を有する；

(x) 亜硝酸塩中の重金属含量は、約10ppm以下であり、任意選択で、亜硝酸塩中の重金属含量は、約10ppm以下である；

(x i) 亜硝酸塩は、約0.4重量%以下の硝酸塩を含有し、亜硝酸塩が亜硝酸ナトリウムである場合には約0.4重量%以下の硝酸ナトリウムを含有し、亜硝酸塩が亜硝酸カリウムである場合には約0.4重量%以下の硝酸カリウムを含有する；

(x i i) 亜硝酸塩は、約0.005重量%以下または約0.001重量%以下の不溶性物質を含有する；

(x i i i) 亜硝酸塩は、約0.005重量%以下の塩化物を含有する；

(x i v) 亜硝酸塩は、約0.01重量%以下の硫酸塩を含有する；

(x v) 亜硝酸塩は、約0.001重量%以下の鉄を含有する；

(x v i) 亜硝酸塩は、約0.01重量%以下のカルシウムを含有する；

(x v i i) 亜硝酸塩が亜硝酸カリウムでない場合、亜硝酸塩は約0.005重量%以下または約0.001重量%以下のカリウムを含有し、亜硝酸塩が亜硝酸ナトリウムでない場合、約0.005重量%以下または約0.001重量%以下のナトリウムを含有する；

(x v i i i) 亜硝酸塩は、約0.1重量%以下、約5000ppm以下、約1000ppm以下、約500ppm以下、約100ppm以下または約10ppm以下の有機揮発性化合物を含有する；

(x i x) 亜硝酸塩は、約0.1重量%以下、約5000ppm以下、約1000ppm以下、約500ppm以下、約100ppm以下または約10ppm以下のエタノールを含有する；

(x x) 亜硝酸塩は、約3000ppm以下、約1000ppm以下、約500ppm以下、約100ppm以下または約10ppm以下のメタノールを含有する；

(x x i) 亜硝酸塩は、約50ppm以下、約25ppm以下、約20ppm以下、約10ppm以下、約7.9ppm以下、約8ppm以下、約6ppm以下、約5.6ppm以下、または約2.5ppm以下の不揮発性有機炭素を含有する；

(x x i i) 亜硝酸塩は、約0.05ppm以下の水銀を含有する；

(x x i i i) 亜硝酸塩は、約2ppm以下または約0.2ppm以下のアルミニウムを含有する；

(x x i v) 亜硝酸塩は、約3ppm以下または約1ppm以下のヒ素を含有する；

(x x v) 亜硝酸塩は、約0.003重量%以下または約0.001重量%以下のセレンを含有する；

(x x v i) 亜硝酸塩中の微生物負荷の総好気性菌数は、約100CFU/g以下である；

(x x v i i) 硝酸塩中の酵母及びカビの総数は、約20CFU/g以下である；

(x x v i i i) 亜硝酸塩は、約0.25EU/mg以下または0.018EU/mg以下の細菌内毒素を含有し；そして

(x x i x) 亜硝酸塩は約0.1ppm未満のリン酸塩（例えば、リン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウムまたはリン酸三ナトリウム）を含有し、好ましくは、亜硝酸塩は検出可能な量のリン酸塩を含有しない。

【0063】

特定の実施形態では、亜硝酸塩が(i)～(x x i x)の特徴のうちの2つ以上を有する。さらなる実施形態では、亜硝酸塩が(i)～(x x i x)の特徴のうちの5つ以上を有する。なおさらなる実施形態では、亜硝酸塩が(i)～(x x i x)の特徴のうちの1

10

20

30

40

50

0以上を有する。なおさらなる実施形態では、亜硝酸塩が(i)～(xxix)の特徴のうちの15以上を有する。いくつかの実施形態では、亜硝酸塩が(i)～(xxix)の特徴のうちの20以上を有する。特定の実施形態では、亜硝酸塩が(i)～(xxix)の特徴の全てを有する。より具体的な実施形態では、亜硝酸塩が(i)～(xxix)の特徴の全てを有する亜硝酸ナトリウムである。

【0064】

いくつかの実施形態では、亜硝酸塩は、任意選択で、関連するUSP熱量測定法によって決定されるように、例えば抑制された導電率検出と組み合わせたイオンクロマトグラフィーなどのイオンクロマトグラフィーによって決定されるように、亜硝酸塩を約97重量%～約101重量%の範囲で含有する。別の実施形態では、亜硝酸塩は、任意選択で、関連するUSP熱量測定法によって任意に決定されるように、例えば抑制された導電率検出と組み合わせたイオンクロマトグラフィーなどのイオンクロマトグラフィーによって決定されるように、約98重量%～約102重量%の範囲の亜硝酸塩を含有する。

【0065】

特定の実施形態において、亜硝酸塩は、以下の特徴を有する：

- (i) 亜硝酸塩は、約0.02重量%以下の炭酸ナトリウムを含有する；
- (ii) 亜硝酸塩は、約10ppm以下のアンチケーキング剤を含有する；
- (vi) 亜硝酸塩は、USP熱量測定法によって測定した場合に、亜硝酸塩を約97重量%以上および／または亜硝酸塩を101重量%以下含有する；
- (viii) 亜硝酸塩の乾燥減量は、約0.25重量%以下である；
- (ix) 亜硝酸塩は、約0.5重量%以下の含水量を有する；
- (x) 亜硝酸塩中の重金属含量は、約10ppm以下である；
- (xi) 亜硝酸塩は、約0.4重量%以下の硝酸塩を含有する；
- (xii) 亜硝酸塩は、約0.005重量%以下の不溶性物質を含有する；
- (xiii) 亜硝酸塩は、約0.005重量%以下の塩化物を含有する；
- (xiv) 亜硝酸塩は、約0.01重量%以下の硫酸塩を含有する；
- (xv) 亜硝酸塩は、約0.001重量%以下の鉄を含有する；
- (xvi) 亜硝酸塩は、約0.01重量%以下のカルシウムを含有する；
- (xviii) 亜硝酸塩は、約5000ppm以下、約1000ppm以下、約500ppm以下、約100ppm以下または約10ppm以下の有機揮発性化合物を含有する；
- (xxi) 亜硝酸塩は、約10ppm以下または約2.5ppm以下の不揮発性有機炭素を含有する；
- (xxii) 亜硝酸塩は、約0.05ppm以下の水銀を含有する；
- (xxiii) 亜硝酸塩は、約2ppm以下のアルミニウムを含有する；
- (xxiv) 亜硝酸塩は、約3ppm以下のヒ素を含有する；
- (xxv) 亜硝酸塩は、約0.003重量%以下のセレンを含有する；
- (xxvi) 亜硝酸塩中の微生物負荷の総好気性菌数は、約100CFU/g以下である；
- (xxviii) 硝酸塩中の酵母及びカビの総数は、約20CFU/g以下であり；そして
- (xxviii) 亜硝酸塩は、約0.25EU/mg以下の細菌内毒素を含有する。

【0066】

これらの実施形態では、亜硝酸塩は、亜硝酸ナトリウムであってもよく、約0.005重量%以下のカリウムを含有する。好ましくは、亜硝酸ナトリウムはまた、以下の制限の1つ以上を有する：

- (iii) 亜硝酸ナトリウムは、白色からオフホワイトの固体である；
- (iv) 亜硝酸ナトリウムは、関連する米国薬局方の関連する方法に従って測定されたナトリウムについての同定で陽性を有する；
- (v) 亜硝酸ナトリウムは、関連する米国薬局方の該当する方法に従って測定された亜硝酸塩の同定試験で陽性を有する；
- (vii) 亜硝酸ナトリウムは、25℃の10%溶液中で測定した場合に、約7～約9

、または約8～約9のpHを有し、任意選択で、関連する米国薬局方に従っておよび／またはpH計を使用して測定される；

(xix) 亜硝酸ナトリウムは、約0.1重量%以下、約5000ppm以下、約1000ppm以下、約500ppm以下、約100ppm以下または約10ppm以下のエタノールを含有する；

(xx) 亜硝酸塩は、約3000ppm以下、約1000ppm以下、約500ppm以下、約100ppm以下または約10ppm以下のメタノールを含有し；そして

(xxix) 亜硝酸塩は、約0.1ppm未満のリン酸塩（例えば、リン酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、またはリン酸三ナトリウム）を含有し、好ましくは、亜硝酸塩は検出可能な量のリン酸塩を含有しない。

【0067】

(i)～(xxix)の特徴は、米国薬局方XXXII(2009)の関連方法に従って決定することができる。(i)～(xxix)の特徴を決定するための方法は、国際公開第2010/093746号に提供されており、その開示はその全体の参照により本明細書に組み込まれる。(i)～(xxix)の特徴の1つ以上を有する亜硝酸ナトリウムを調製する方法は、国際公開第2010/093746号にも記載されている。

【0068】

1つ以上の有機カルボン酸およびプロトン源成分を含むプロトン源

本開示の態様は、有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸から選択される1つ以上の酸を含有するプロトン源を含む。以下において、「プロトン源成分」という用語は、

【0069】

このセクションでは、有機カルボン酸をより詳細に例示する。

【0070】

本明細書における「有機カルボン酸」は、分子中に1個以上の-COOH基を含有する任意の有機酸を指す。有機カルボン酸は、直鎖であってもよく、分岐鎖であってもよい。カルボン酸は、飽和であってもよく、不飽和であってもよい。カルボン酸は、脂肪族であってもよく、芳香族であってもよい。カルボン酸は、非環式であってもよく、環式であってもよい。カルボン酸は、ビニル性カルボン酸であってもよい。

【0071】

有機カルボン酸は、1個以上の置換基、例えば1個以上のヒドロキシル基を有していてもよい。本開示で使用する可以使用のヒドロキシル置換有機カルボン酸の例には、 α -ヒドロキシカルボン酸、 β -ヒドロキシカルボン酸および γ -ヒドロキシカルボン酸が含まれる。

【0072】

1つ以上の有機カルボン酸、または2つ以上の場合はそれらの各々は、好ましくは約7未満、より好ましくは7.0未満の pK_{a1} を有するべきである。

【0073】

1つ以上のカルボン酸は、1つ以上の還元カルボン酸を含んでいてもよく、または1つ以上の還元カルボン酸から構成されていてもよい。

【0074】

カルボン酸は、ヒドロゲルの三次元ポリマーマトリックスを形成するポリマー分子に共有結合したペンダント-COOH基を含有する酸ヒドロゲルであってもよい。このようなヒドロゲルを含有するカルボン酸の例としては、例えば、国際公開第2007/007115号、国際公開第2008/087411号、国際公開第2008/087408号、国際公開第2014/188174号および国際公開第2014/188175号に記載されており、それらの開示はすべて参照により本明細書に組み込まれる。このようなヒドロゲルは、典型的には、三次元ポリマーマトリックスに共有結合した酸または塩形態のペ

10

20

30

40

50

ンダントカルボン酸およびスルホニル基を含む。さらなる詳解については、以下の「成分のための他のリザーバー：ヒドロゲル」と題するセクションを参照されたい。

【0075】

しかしながら、有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸から選択される1つ以上の酸の少なくとも1つは、ポリマーまたは高分子、例えばヒドロゲルの三次元ポリマーまたは高分子マトリックスを形成するポリマーまたは高分子に共有結合していないことが一般に好ましい。理論に束縛されることを望むものではないが、証拠、例えば、「有機ポリオール」と題されたセクションで以下に詳解される、ポリオールの立体異性に対する効果の依存性の証拠は、1つ以上の亜硝酸塩とプロトン源との反応の出力を増強するための本開示の効果が少なくとも部分的には酸性化反応の際に亜硝酸塩およびプロトンと相互作用する有機ポリオール分子の効果によって達成されることを示唆し、これはポリオール分子の影響下での反応中に配向および再配置するための反応分子の移動性が重要であり得ることを意味する。本開示の第8の態様におけるように、ポリオールが必ずしも存在しなくても、1つ以上の亜硝酸塩とプロトン源との反応における反応物間の同じ移動度が重要であると推測される。

【0076】

有機カルボン酸は、例えば、サリチル酸、アセチルサリチル酸、酢酸、クエン酸、グリコール酸、マンデル酸、酒石酸、乳酸、マレイン酸、リンゴ酸、安息香酸、ギ酸、プロピオン酸、 α -ヒドロキシプロパン酸、 β -ヒドロキシプロパン酸、 β -ヒドロキシ酪酸、 β -ヒドロキシ- β -酪酸、ナフトエ酸、オレイン酸、パルミチン酸、パモ酸（エンボニン酸）、ステアリン酸、マロン酸、コハク酸、フマル酸、グルコヘプトン酸、グルクロン酸、ラクトビオン酸、ケイ皮酸、ピルビン酸、オロチン酸、グリセリン酸、グリチルリチン酸、ソルビン酸、ヒアルロン酸、アルギン酸、シュウ酸、これらの塩、およびこれらの組み合わせから選択され得る。特定の実施形態では、有機カルボン酸は、クエン酸、その塩、およびそれらの組み合わせから選択される。特定の一実施形態では、有機カルボン酸は、クエン酸またはその塩である。カルボン酸は、例えば、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、アクリル酸とメタクリル酸とのコポリマー、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、または乳酸とグリコール酸とのコポリマーなどのポリマーまたは重合カルボン酸であってもよく、またはそれらを含んでもよい。本明細書で使用される「有機カルボン酸」という用語は、有機カルボン酸の一部または全部のエステル、またはそれらの一部または全部の塩も包含するが、それらは本発明による使用の際にプロトン源として作用することができる。

【0077】

1つ以上の亜硝酸塩とプロトン源との接触直前のプロトン源のpHを緩衝して、pHを既知の範囲内に制御し、亜硝酸塩が消費されるに伴いpHの上昇速度を制限することが好ましい。詳細については、以下の「pH制御；任意の緩衝系」と題するセクションを参照されたい。特に、プロトン源である少なくとも1つの有機カルボン酸が、その共役塩基とともに適切に存在し得ることが想定される。酸およびその共役塩基は、水性担体中で適切に緩衝液を形成し得る。緩衝液は、 NO_x 生成反応が進行するにつれて、それによって所望のpHが維持されるように、好ましくは約3~9、例えば約4~8、好ましくは生理学的接触のためにまたは生細胞および生物との接触のために約5~約8の範囲のpHが選択され得る。共役塩基は、存在する場合、別々に添加されてもよく、または酸および／または塩基、好ましくは無機酸および／または無機塩基を使用してpHを調整することによってプロトン源からin situで生成されてもよい。

【0078】

pHに影響を及ぼす NO_x 生成反応混合物の他の成分が添加される前（例えば、直前）に、任意の所望の緩衝液を含むプロトン源の水溶液の初期pH、または1つ以上の亜硝酸塩との反応の開始時の反応混合物のpHは、約3~9、例えば約4~8、例えば約5~8の範囲が適切である。プロトン源に関連して本明細書で使用される「初期pH」とは、pHに影響を及ぼす NO_x 生成反応混合物の他の成分（一部を含むがその全ての成分ではない）が添加される前（例えば、直前）の任意の所望の緩衝液を含むプロトン源の水溶液の

pHを意味する。乾燥粉末プロトン源材料またはプロトン源の水溶液の他の前駆体は、所望の初期pHを有する水溶液をもたらす適切な量で使用される。

【0079】

プロトン源成分をゲルまたは他の担体系、例えば水性担体中に、例えば水性ゲルまたは水溶液として貯蔵することが望まれる場合、プロトン源を含有する系を適切なpHに緩衝して、酸性度を維持するのを防ぎ、貯蔵中のプロトン源の分解を防止することが好ましい。約3～6、例えば約3～5のpHが好ましい。必要に応じて、プロトン源成分を使用する直前に塩基を添加することによってpHを上昇させることができる。

【0080】

例えば、クエン酸に対する不耐性を有する患者もいる。患者は治療前に酸に対する不耐性の可能性について試験されるべきであり、それに応じて酸成分が選択されるべきである。

【0081】

一実施形態では、プロトン源成分またはその一部は、本開示で使用するために、乾燥形態で、任意選択で粉末などの粒子形態で提供することができる。必要に応じて、プロトン源成分またはその一部は、例えば、1つ以上の亜硝酸塩とプロトン源との反応を制御または遅延させる目的で、カプセル化またはマイクロカプセル化されてもよい。カプセル化形態は、プロトン源が通常、室温で液体またはゲル状態を有する場合に特に使用され得る。乾燥形態および／またはカプセル化は、単独で、または本開示による一酸化窒素を生成するための反応の他の成分との混合物中で、プロトン源の貯蔵を補助し得る。さらに、乾燥形態および／またはカプセル化は、単独で、または本開示による一酸化窒素を生成するための反応の他の成分との混合物中で、プロトン源成分の医療デバイスなどの小さい物体への組み込みを補助し得る。このような物体としては、例えば、創傷包帯、包帯、血管および他のステント、カテーテル、ペースメーカー、除細動器、心臓補助デバイス、人工弁、電極、整形外科用ねじおよびピン、ならびに他の薄い医療用および／または移植可能な物品が挙げられる。詳細については、以下の「成分の任意選択でのカプセル化（例えば、マイクロカプセル化）」と題するセクションを参照されたい。

【0082】

必要に応じて、任意選択でカプセル化またはマイクロカプセル化された、1つ以上の有機カルボン酸は、乾燥粉末または結晶として、またはゲルまたは他の担体系、例えば水性担体、例えば水性ゲルまたはその溶液とともに、プロトン源成分中に存在することができる。乾燥または粉末形態の有機カルボン酸を含有するプロトン源成分は、水を添加することにより、便宜上使用前に溶液に調製されることができる。NO_x生成反応混合物の任意の他の成分の添加前（例えば、直前）、および特に亜硝酸塩との反応の開始前（例えば、直前）の、このような溶液中の全プロトン源（存在する任意の有機非カルボン酸還元酸を含む）のモル濃度は、約0.001M～約5Mの範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、NO_x生成反応混合物の任意の他の成分の添加前（例えば、直前）、および特に亜硝酸塩との反応の開始前（例えば、直前）の、このような溶液中の全プロトン源のモル濃度は、約0.01M～約2Mの範囲である。いくつかの実施形態では、亜硝酸塩との反応の開始前のこのような溶液中の全プロトン源のモル濃度は、約0.1M～約2Mの範囲である。より具体的な実施形態では、亜硝酸塩との反応の開始前のこのような溶液中の全プロトン源のモル濃度は、約0.2M～約1.6Mの範囲である。実施形態において、亜硝酸塩との反応の開始前のこのような溶液中の全プロトン源のモル濃度は、0.8～1.2Mの範囲であってもよい。例えば、亜硝酸塩との反応の開始前のこのような溶液中の全プロトン源のモル濃度は、約0.8M、約0.9M、約1.0M、約1.1M、約1.2M、約1.5Mまたは約1.7Mであってもよい。

【0083】

本明細書で使用される「全プロトン源のモル濃度」、「全プロトン源の濃度」などは、プロトン（H⁺）供与体部分またはプロトン（H⁺）供与体部分の少なくとも1つ（2つ以上存在する場合）が主にプロトン化される、すなわちモル基準で50%を超えてプロトン化されるpHで、本発明によるプロトン源として使用される有機カルボン酸および／ま

10

20

30

40

50

たは有機非カルボン酸のいずれかの濃度を指すものと理解されるべきである。言い換えれば、 NO_x 生成反応の開始前に pH をより高い pH に調整し、それによってプロトン化の程度を低下させた場合、全プロトン源のモル濃度または濃度は、それに応じて低下したとみなされるべきではない。

【0084】

NO_x 生成反応混合物の2つ以上の前駆体溶液を組み合わせることは、当業者に周知のように、各溶液中の各溶質または溶質の組み合わせの濃度の希釈を引き起こすことに留意されたい。例えば、溶質 A および B の2つの 1 M 溶液の等量を混合することは、A の濃度を 0.5 M に変化させ、B の濃度を 0.5 M に変化させる。特に明記しない限り、本明細書に記載されるプロトン源の濃度は、液体、例えば溶液として添加される NO_x 生成反応混合物の任意の他の成分の添加前（例えば、直前）の初期溶液中の濃度である。 NO_x 発生反応混合物中の実際の濃度は、反応混合物の成分およびそれがどのように調製されたかを知ることによって容易に導き出すことができる。

【0085】

乾燥または粉末形態のプロトン源成分は、水を添加することによって、便宜上使用前に溶液に調製することができる。

【0086】

必要に応じて、1つ以上の有機カルボン酸は、乾燥形態または担体液体で、1つ以上のポリオールまたはそのようなポリオールのいくつかとの混合物または溶液中に存在してもよい。

【0087】

亜硝酸塩成分は、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体を生成することが望まれるまで、プロトン源と反応性接触させないことが好ましい。このため、プロトン源成分またはその一部は、好ましくはキット、装置またはデバイスのリザーバーまたは容器内に保持される。しかしながら、代替的に、1つ以上の亜硝酸塩または亜硝酸塩成分、プロトン源および1つ以上のポリオールの乾燥成分を、乾燥組成物、例えば微粒子混合物として保持し、水または他の適切な溶媒または液体担体を単に添加することによって反応を開始することができる。

【0088】

1つ以上の有機非カルボン酸還元酸を含むプロトン源成分

1つ以上の有機カルボン酸を含むかまたはそれからなるプロトン源成分の上記の詳解は、1つ以上の有機非カルボン酸還元酸を含むかまたはそれからなるプロトン源成分に同様に適用される。本セクションでは、有機非カルボン酸還元酸をより詳細に例示する。

【0089】

本明細書における「有機非カルボン酸還元酸」とは、分子中に $-\text{COOH}$ 基を含まない任意の有機還元酸を指す。有機非カルボン酸還元酸は、直鎖であってもよく、分岐鎖であってもよい。非カルボン酸還元酸は、飽和であってもよく、不飽和であってもよい。非カルボン酸還元酸は、脂肪族であってもよく、芳香族であってもよい。非カルボン酸還元酸は、非環式であってもよく、環式であってもよい。非カルボン酸還元酸は、ビニル性であってもよい。

【0090】

1つ以上の有機非カルボン酸還元酸、または2つ以上の場合はそれらの各々は、好ましくは約 7 未満、より好ましくは 7.0 未満の pK_{a1} を有するべきである。

【0091】

上記で説明した理由のため、一般に、有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸から選択される1つ以上の酸の少なくとも1つが、ポリマー分子、例えばヒドロゲルの三次元ポリマーマトリックスを形成するポリマー分子に共有結合していないことが好ましい。

【0092】

有機非カルボン酸還元酸は、例えば、アスコルビン酸；パルミチン酸アスコルビル（アスコルビルパルミテート）；3-O-エチルアスコルビン酸、他の3-アルキルアスコル

10

20

30

40

50

ビン酸、6-オクタノイルアスコルビン酸、6-ドデカノイルアスコルビン酸、6-テトラデカノイルアスコルビン酸、6-オクタデカノイルアスコルビン酸および6-ドデカンジオイルアスコルビン酸などのアスコルビン酸誘導体；還元酸などの酸性還元体；エリソルビン酸；シュウ酸；それらの塩；およびそれらの組み合わせから選択されてもよい。特定の一実施形態では、有機非カルボン酸還元酸は、アスコルビン酸またはその塩である。

【0093】

有機非カルボン酸還元酸は、1個以上の置換基、例えば1個以上のヒドロキシル基を有していてもよい。本開示で使用するができるヒドロキシル置換有機非カルボン酸還元酸の例には、酸性還元体、例えば還元酸（2,3-ジヒドロキシ-2-シクロペンタノン）が含まれる。

【0094】

1つ以上の亜硝酸塩とプロトン源との接触後のプロトン源および／または反応混合物のpHは、既知の範囲内のpHを制御し、亜硝酸塩が消費されるに伴ってpHの上昇を制御するために緩衝されることが好ましい。詳細については、以下の「pH制御；任意の緩衝系」と題するセクションを参照されたい。特に、プロトン源である少なくとも1つの有機非カルボン酸還元酸が、その共役塩基とともに適切に存在し得ることが想定される。酸およびその共役塩基は、水性担体中で適切に緩衝液を形成し得る。緩衝液は、NO生成反応が進行するにつれて、それによって所望のpHが維持されるように、好ましくは約3～9、例えば約4～8の範囲のpH、好ましくは生理学的接触のためにまたは生細胞および生物との接触のために約5～約8の範囲のpHが選択され得る。共役塩基は、存在する場合、別々に添加されてもよく、または酸および／または塩基、好ましくは無機酸および／または無機塩基を使用してpHを調整することによってプロトン源からin situで生成されてもよい。

【0095】

pHに影響を及ぼすNO_x生成反応混合物の他の成分が添加される前（例えば、直前に、任意の所望の緩衝液を含むプロトン源の水溶液の初期pH、または1つ以上の亜硝酸塩との反応の開始時の反応混合物のpHは、約3～9、例えば約4～8、例えば約5～8の範囲が適切である。乾燥粉末プロトン源材料またはプロトン源の水溶液の他の前駆体は、所望の初期pHを有する水溶液をもたらす適切な量で使用される。

【0096】

プロトン源成分をゲルまたは他の担体系、例えば水性担体中に、例えば水性ゲルまたは水溶液として貯蔵することが望まれる場合、プロトン源を含有する系を適切なpHに緩衝して、酸性度を維持するのを防ぎ、貯蔵中のプロトン源の分解を防止することが好ましい。約3～6、例えば約3～5のpHが好ましい。必要に応じて、プロトン源成分を使用する直前に塩基を添加することによってpHを上昇させることができる。

【0097】

シュウ酸のようないくつかの還元酸は有毒である。酸成分は、それに応じて選択されるべきである。

【0098】

1つ以上の有機非カルボン酸還元酸は、上記の方法で、1つ以上の有機カルボン酸に加えて、またはその代わりに、1つ以上の有機非カルボン酸還元酸をプロトン源成分に使用することができる。詳細については、「1つ以上の有機カルボン酸およびプロトン源成分を含むプロトン源」のセクションを参照されたい。

【0099】

有機ポリオールおよび有機ポリオール成分

本開示の態様は、1つ以上の有機ポリオールを含む。以下では、「有機ポリオール成分」または「ポリオール成分」という用語は、有機ポリオール自体、および有機ポリオールを含有する、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体を生成するための反応系の任意の成分を包含する。

【0100】

本明細書における「有機ポリオール」とは、特に亜硝酸塩反応のためのプロトン源ではなく、糖または多糖ではない2つ以上のヒドロキシル基を有する有機分子を指す。ここで、「糖」および「多糖」という用語は、オリゴ糖、グリカンおよびグリコサミノグリカンを含む。したがって、有機ポリオールは、約7以上、例えば7.0以上の pK_{a1} を有する。

【0101】

ここで、「有機ポリオール」は、還元剤を除くことが好ましい。したがって、全ての態様の中の本発明の一実施形態において、有機ポリオールは還元剤を除く。2つ以上のヒドロキシル基を有し、糖類または多糖類ではない有機分子である還元剤の例は、チオグリセロール（例えば、1-チオグリセロール）、ヒドロキノン、ブチル化ヒドロキノン、アスコルビン酸、アスコルビン酸塩、エリソルビン酸およびエリソルビン酸塩である。チオグリセロール（例えば、1-チオグリセロール）、ヒドロキノン、ブチル化ヒドロキノン、アスコルビン酸塩およびエリソルビン酸塩は還元剤であるため、「有機ポリオール」から除くことが好ましい。とにかく、アスコルビン酸およびエリソルビン酸は、特に亜硝酸塩反応のプロトン源であるため、「有機ポリオール」から除かれる。誤解を避けるために、我々はプロトン源、例えばアスコルビン酸および／またはエリソルビン酸である還元剤が、本発明のプロトン源から、またはプロトン源成分、組み合わせ、キット、組成物、使用、方法、もしくは本発明の任意の他の部分から、ならびにそれらがプロトン源として存在する場合に実施される手段から除かれないことを確認する。

【0102】

有機ポリオールは、環式であってもよく、非環式であってもよく、または1つ以上の環式有機ポリオールと1つ以上の非環式有機ポリオールとの混合物であってもよい。例えば、1つ以上の有機ポリオールは、2つ以上のOH基によって置換された1つ以上のアルカン、2つ以上のOH基によって置換された1つ以上のシクロアルカン、2つ以上のOH基によって置換された1つ以上のシクロアルキルアルカン、およびそれらの任意の組み合わせから選択されてもよい。最も好ましくは、有機ポリオールは、OH以外のいずれの置換基も有しない。

【0103】

好ましくは、1つ以上の有機ポリオールは、1つ以上の非環式有機ポリオールである。好ましい1つ以上の非環式有機ポリオールは、4、5、6、7、8、9、10、11または12個の炭素原子を有する糖アルコールから選択される。好ましい1つ以上の非環式有機ポリオールは、アルジトール、例えば4、5、6、7、8、9、10、11または12個の炭素原子を有するアルジトールから選択される。1つ以上の有機ポリオールは、サポニン、サポゲニン、ステロイドまたはステロイド配糖体を含まないことが好ましい。

【0104】

あるいは、1つ以上の有機ポリオールは、1つ以上の環式有機ポリオールであってもよい。これらの実施形態において、1つ以上の環式有機ポリオールは、環式糖アルコールまたは環式アルジトールであってもよい。例えば、1つ以上の環式ポリオールは、4、5、6、7、8、9、10、11または12個の炭素原子を有する環式糖アルコール、または4、5、6、7、8、9、10、11または12個の炭素原子を有する環式アルジトールであってもよい。環式ポリオールの具体例は、イノシトールである。

【0105】

いくつかの実施形態では、1つ以上の有機ポリオールは、7つ以上のヒドロキシル基を有する。特定の実施形態では、1つ以上の有機ポリオールは、7個以上のヒドロキシル基を有する糖アルコールまたはアルジトールである。より特定の実施形態では、1つ以上の有機ポリオールは、9個以上のヒドロキシル基を有する。さらなる実施形態では、1つ以上の有機ポリオールは、9個以上のヒドロキシル基を有する糖アルコールまたはアルジトールである。いくつかの実施形態では、1つ以上の有機ポリオールは、20個以下のヒドロキシル基を有する。特定の実施形態では、1つ以上の有機ポリオールは、20個以下の

ヒドロキシル基を有する糖アルコールまたはアルジトールである。より特定の実施形態では、1つ以上の有機ポリオールは、15個以下のヒドロキシル基を有する。さらなる実施形態では、1つ以上の有機ポリオールは、15個以下のヒドロキシル基を有する糖アルコールまたはアルジトールである。1つ以上の有機ポリオールは、7～20の範囲、より具体的には9～15の範囲の数のヒドロキシル基を有してもよい。特定の実施形態では、1つ以上の有機ポリオールは、9、12、15または18個のヒドロキシル基を含む。

【0106】

好ましくは、1つ以上の有機ポリオールは、例えば、1つ以上の単糖単位および1つ以上の非環式糖アルコール単位を含む（からなる）糖アルコール化合物である。1つ以上の有機ポリオールは、例えば、1つ以上の単糖単位および1つ以上の非環式糖アルコール単位の直鎖、または1つ以上の単糖単位および1つ以上の非環式糖アルコール単位の分岐鎖を含む（からなる）糖アルコール化合物であってもよい。

【0107】

本明細書で使用される単糖単位は、化合物中の少なくとも1つの他の単位（別の単糖単位または非環式糖アルコール単位）に共有結合された単糖を指す。本明細書で使用される非環式糖アルコール単位は、化合物中の少なくとも1つの他の単位（単糖単位または別の非環式糖アルコール単位）に共有結合された非環式糖アルコールを指す。化合物中の単位は、エーテル結合を介して結合されていてもよい。いくつかの実施形態では、1つ以上の単糖単位は、グリコシド結合を介して化合物の他の単位に共有結合している。特定の実施形態において、単糖単位の各々は、グリコシド結合を介して化合物の他の単位に共有結合される。特定の実施形態では、糖アルコール化合物は、単糖またはオリゴ糖グリコンおよび非環式糖アルコールアグリコンを有するグリコシドである。

【0108】

好ましい非環式糖アルコール単位は、4、5、6、7、8、9、10、11または12個の炭素原子を有する糖アルコール単位である。特定の実施形態では、非環式糖アルコール単位は、エリスリトール、トレイトール、アラビトール、キシリトール、リビトール、マンニトール、ソルビトール、ガラクトール、フシトール、イジトールおよびボレミトールの単位からなる群より選択される。

【0109】

特定の実施形態では、1つ以上の単糖単位は、 C_5 または C_6 の単糖単位である。言い換えれば、単糖単位の1つ以上は、ペントースまたはヘキソース単位である。より特定の実施形態では、それぞれの単糖単位は、 C_5 または C_6 の単糖単位である。特定の実施形態では、1つ以上の糖アルコール単位は、 C_5 または C_6 の糖アルコール単位である。より特定の実施形態では、それぞれ糖アルコール単位は、 C_5 または C_6 の糖アルコール単位である。

【0110】

特定の実施形態では、糖アルコール化合物は、例えば、 n 個の単糖単位および m 個の非環式糖アルコール単位からなり、ここで、 n は1以上の整数であり、 m は1以上の整数であり、 $(n+m)$ は10以下である。特定の実施形態では、糖アルコール化合物は、例えば、1つの非環式糖アルコール単位で末端化された n 個の単糖単位の鎖を含み（からなり）、ここで、 n は1～9の整数である。これらの実施形態において、単糖単位の鎖は、グリコシド結合によって共有結合されてもよい。特定の実施形態では、各単糖単位は、グリコシド結合によって別の単糖単位または非環式糖アルコール単位に共有結合している。特定の実施形態において、糖アルコール化合物は、例えば、1つの非環式糖アルコール単位で末端化された1、2または3の単糖単位の鎖を含む（からなる）。1、2、3つまたはそれぞれの単糖単位は、 C_5 または C_6 の単糖単位であってもよい。非環式糖アルコール単位は、 C_5 または C_6 の糖アルコール単位であってもよい。糖アルコール化合物の例としては、イソマルト、マルチトールおよびラクチトール（ $n=1$ ）；マルトリイトール（ $n=2$ ）；およびマルトテトライトール（ $n=3$ ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0111】

このような糖アルコール化合物は、二糖類またはオリゴ糖類に由来する糖アルコールとして説明することができる。本明細書で使用されるオリゴ糖とは、3～10個の単糖単位からなる糖をいう。二糖類またはオリゴ糖類に由来する糖アルコールは、二糖類、オリゴ糖類または多糖類（例えば、加水分解および水素化から）から（例えば、水素化によって）合成され得るが、二糖類、オリゴ糖類または多糖類から合成される化合物に限定されない。例えば、二糖類に由来する糖アルコールは、単糖および糖アルコールの脱水反応から形成され得る。1種以上の有機ポリオールは、二糖類、三糖類または四糖類に由来する糖アルコールであってもよい。二糖類に由来する糖アルコールの例としては、イソマルト、マルチトールおよびラクチトールが挙げられるが、これらに限定されない。三糖類に由来する糖アルコールの例としては、マルトトリイトールが挙げられるが、これに限定されない。四糖類に由来する糖アルコールの例としては、マルトテトライトールが挙げられるが、これに限定されない。

10

【0112】

適切な有機ポリオールとしては、エリスリトール、トレイトール、アラビトール、キシリトール、リビトール、マンニトール、ソルビトール、ガラクトール、フシトール、イジトール、イノシトール、ボレミトール、イソマルト、マルチトール、ラクチトール、マルトトリイトール、マルトテトライトール、ポリグリシトール、およびそれらの任意の組み合わせから選択される任意のものが挙げられる。グリセロールを使用することができ、存在する場合、好ましくは1つ以上の他の有機ポリオール、例えばエリスリトール、トレイトール、アラビトール、キシリトール、リビトール、マンニトール、ソルビトール、ガラクトール、フシトール、イジトール、イノシトール、ボレミトール、イソマルト、マルチトール、ラクチトール、マルトトリイトール、マルトテトライトール、ポリグリシトール、またはそれらの任意の組み合わせとともに存在する。

20

【0113】

多くの有機ポリオールは、1つ以上のキラル中心を有するので、立体異性体の形態で存在する。有機ポリオールのすべての立体異性体および光学異性体および異性体混合物は、本開示および特許の範囲内に含まれることが意図される。特に、すべてのキラル有機ポリオールおよびそれらのすべての混合物のD体および／またはL体を使用することができる。

【0114】

興味深いことに、本開示におけるポリオールの使用の効果は、立体化学に依存することが見出された。したがって、本開示において使用するための1つ以上の有機ポリオールの光学異性体形態または光学異性体混合物の選択は、亜硝酸塩とプロトン源との反応の結果に、少なくとも生成されるNOの量に関して影響を及ぼし得る。

30

【0115】

例えば、ソルビトールは、マンニトールの立体異性体であり、1つのヒドロキシル基の配向が互いに異なる。以下の実施例2Dおよび2E（図5および6）に示すように、亜硝酸塩とプロトン源との反応の出力に対するソルビトールおよびマンニトールの効果は、他の点では同一の反応系において異なる。

【0116】

特定の実施形態では、有機ポリオールは、アラビトール、キシリトール、マンニトール、ソルビトールおよびそれらの任意の組み合わせの群から選択される。アラビトールは、DまたはL-アラビトールまたはそれらの混合物であってもよい。キシリトールは、DまたはL-キシリトールまたはそれらの混合物であってもよい。ソルビトールは、DまたはL-ソルビトールまたはそれらの混合物であってもよい。マンニトールは、DまたはL-マンニトールまたはそれらの混合物であってもよい。

40

【0117】

特定の実施形態では、1つ以上のポリオールは、本明細書に記載のシステム、方法、組み合わせ、キット、および組成物が結核感染症または結核菌の数を減少させるための抗菌法の処置において使用される場合、例えば、本明細書に記載の1つ以上の単糖単位および1つ以上の非環式糖アルコール単位（二糖類またはオリゴ糖類に由来する糖アルコールを

50

含む)を含む(からなる)糖アルコール化合物である。

【0118】

一実施形態では、有機ポリオール成分は、乾燥形態で、任意選択で粉末などの粒状形態で、本開示に使用するために提供されてもよい。必要に応じて、有機ポリオールは、例えば、1つ以上の亜硝酸塩とプロトン源との反応におけるポリオールの関与を制御または遅延させる目的で、カプセル化またはマイクロカプセル化されてもよい。カプセル化形態は、有機ポリオールが通常、室温で液体またはゲル状態を有する場合に特に使用され得る。乾燥形態および／またはカプセル化は、単独または本開示による一酸化窒素を生成するための反応の他の成分との混合物中で、有機ポリオール成分の貯蔵を補助することができる。さらに、乾燥形態および／またはカプセル化は、単独または本開示による一酸化窒素を生成するための反応の他の成分との混合物中で、有機ポリオール成分の医療デバイスなどの小さい物体への組み込みを補助することができる。このような物体としては、例えば、創傷包帯、包帯、血管および他のステント、カテーテル、ペースメーカー、除細動器、心臓補助デバイス、人工弁、電極、整形外科用ねじおよびピン、ならびに他の薄い医療用および／または移植可能な物品が挙げられる。詳細については、以下の「成分の任意選択でのカプセル化(例えば、マイクロカプセル化)」と題するセクションを参照されたい。

10

【0119】

あるいは、有機ポリオール成分は、担体媒体、例えば水性担体液体またはゲル担体を含んでもよい。有機ポリオールが室温で通常液体である場合、それは、追加の担体成分なしでそのまま使用されてもよく、または1つ以上の担体添加剤、例えば水と混合して使用されてもよい。

20

【0120】

必要に応じて、任意選択でカプセル化またはマイクロカプセル化された、1つ以上の有機ポリオールは、乾燥粉末または結晶として、またはゲルまたは他の担体系、例えば水性担体、例えば水性ゲルまたはその溶液と組み合わせ、ポリオール成分中に存在することができる。乾燥または粉末形態の有機ポリオールを含有するポリオール成分は、便宜上、水の添加によって使用前に溶液に調製することができる。亜硝酸塩との反応の開始前のこのような溶液中の1つ以上のポリオールの合計のモル濃度は、溶液中の各ポリオールの飽和限界までの任意の濃度であり得る。例えば、1つ以上のポリオールの総モル濃度は、約0.001M~約5Mの範囲であり得る。いくつかの実施形態では、亜硝酸塩との反応の開始前のこのような溶液中の1つ以上のポリオールの総モル濃度が約0.01M~約2Mの範囲である。いくつかの実施形態では、亜硝酸塩との反応の開始前のこのような溶液中の1つ以上のポリオールの総モル濃度が約0.1M~約2Mの範囲である。より特定の実施形態では、亜硝酸塩との反応の開始前のこのような溶液中の1つ以上のポリオールの総モル濃度が約0.2M~約1.6Mの範囲である。実施形態において、亜硝酸塩との反応の開始前のこのような溶液中の1つ以上のポリオールの総モル濃度が0.8~1.2Mの範囲であり得る。例えば、亜硝酸塩との反応の開始前のこのような溶液中の1つ以上のポリオールの総モル濃度は、約0.8M、約0.9M、約1.0M、約1.1M、約1.2M、約1.5Mまたは約1.7Mであり得る。

30

【0121】

NO_x生成反応混合物の2つ以上の前駆体溶液を組み合わせることは、当業者に周知のように、各溶液中の各溶質の濃度の希釈または溶質の組み合わせを引き起こすことに留意されたい。例えば、溶質AおよびBの2つの1M溶液の等量を混合することは、Aの濃度を0.5Mに変化させ、Bの濃度を0.5Mに変化させる。特に明記しない限り、本明細書に記載される有機ポリオールの濃度は、液体として添加されるNO_x生成反応混合物の任意の他の成分、例えば溶液の添加前(例えば、直前)の初期溶液中の濃度である。NO_x発生反応混合物中の実際の濃度は、反応混合物の成分およびそれがどのように調製されたかを知ることによって容易に導き出すことができる。

40

【0122】

乾燥または粉末形態のポリオール成分は、便宜上、水を添加することによって使用前に

50

溶液に調製することができる。

【0123】

必要に応じて、ポリオールは、乾燥形態または担体液体で、1つ以上の亜硝酸塩またはプロトン源もしくはそのようなプロトン源のいくつかとの混合物または溶液中に存在することができる。

【0124】

亜硝酸塩が使用前に、反応の他の成分から分離して一酸化窒素を生成するように保たれる特定の実施形態では、亜硝酸塩成分が1つ以上のポリオールを含むことができる。これらの実施形態において、有機カルボン酸成分は、ポリオールを実質的に含まなくてもよい。代替の実施形態では、有機カルボン酸成分は、1つ以上のポリオールを含む。これらの実施形態において、亜硝酸塩成分は、ポリオールを実質的に含まなくてもよい。さらなる実施形態では、有機カルボン酸成分および亜硝酸塩成分がそれぞれ、1つ以上のポリオールを含んでいてもよく、これらは2つの成分の間と同じであっても異なってもよい。

【0125】

別の実施形態では、有機カルボン酸成分および亜硝酸成分は、ポリオールを実質的に含まなくてもよく、1つ以上のポリオールは、別個のポリオール成分に含まれてもよい。

【0126】

反応混合物中の亜硝酸塩、プロトン源および任意選択のポリオールの相対濃度

NO_x生成反応の開始時（または開始前）のポリオール成分または反応溶液中の任意選択の1つ以上の有機ポリオールの総モル濃度は、亜硝酸イオンの総モル濃度の約0.05～約3倍、例えば、亜硝酸成分または反応溶液中の亜硝酸イオンの総モル濃度の約0.1～約2倍、例えば約0.25～約1.5倍、例えば約0.3～約1.2倍であってもよい。1つ以上の有機ポリオールと亜硝酸イオンとの間の同じ相対モル濃度は、本発明による組み合わせまたはキットの構成要素において、または本発明による組成物において、NO_x生成反応の開始前（例えば、直前）に適切に提供される。

【0127】

NO_x生成反応の開始時（または開始前）のポリオール成分または反応溶液中の任意選択の1つ以上の有機ポリオールの総モル濃度は、プロトン源の総モル濃度の約0.05～約3倍、例えば、プロトン源成分または反応溶液中のプロトン源の総モル濃度の約0.1～約2倍であることが適切であり得る。1つ以上の有機ポリオールとプロトン源との間の同じ相対モル濃度は、本発明による組み合わせまたはキットの構成要素において、または本発明による組成物において、NO_x発生反応の開始前（例えば、直前）に適切に提供される。

【0128】

任意選択の追加成分

本開示で使用するための組み合わせ、キットまたは組成物は、一連の希釈剤、担体および賦形剤に組み込まれてもよく、および／または1つ以上の追加成分、特に、それが使用される組み合わせ、キットまたは組成物に1つ以上の特定の利益を提供することを目的とした機能的成分とともに提供されてもよい。このような希釈剤、担体、賦形剤および／または追加成分は、一般に、in vivoでの使用が所望される場合、生理学的に適合性である。

【0129】

適切な生理学的に適合する希釈剤、担体および／または賦形剤の例としては、ラクトース、デンプン、リン酸二カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、セルロース誘導体、クロスカルメロースナトリウム、グルコース、ゼラチン、スクロース、炭酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウムなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0130】

一般的に言えば、目的とされる投与様式に応じて、医薬製剤は、本発明の組み合わせもしくは組成物、またはその成分を約0.005重量%～約95重量%、好ましくは約0.5重量%～約50重量%含有する。このような投薬形態を調製する実際の方法は、公知で

10

20

30

40

50

あるか、または当業者に明らかである。

【0131】

賦形剤は、一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれらの前駆体の送達のために、反応体および／または反応生成物が標的部位に送達されることになる、目的とされる使用または投与経路に応じて、公知の賦形剤から選択されてもよい。例えば、クリーム、ローションおよび軟膏は、亜硝酸塩を、クリーム、ローションおよび軟膏基剤または他の増粘剤および粘稠化剤（例えば、Eudragit L100、カーボポール、カルボキシメチルセルロースまたはヒドロキシメチルセルロース）などの賦形剤に組み込むことによって処方されてもよい。プロトン源は、カーボポール、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、メチルセルロースから選択される賦形剤中に、または水性基剤中に組み込まれてもよい。フィルムを形成することが所望される場合、フィルム形成賦形剤、例えばプロピレングリコール、ポリビニルピロリドン（ポビドン）、ゼラチン、グアーガムおよびセラックが使用されてもよい。

10

【0132】

任意の追加成分は、例えば、甘味剤、味マスキング剤、増粘剤、粘稠化剤、湿潤剤、潤滑剤、結合剤、フィルム形成剤、乳化剤、可溶化剤、安定化剤、着色剤、着臭剤、塩、コーティング剤、抗酸化剤、活性薬剤および防腐剤から選択され得る。このような成分は、当技術分野で周知であり、それらの詳細な説明は当業者にとって必要ではない。湿潤剤、乳化剤、潤滑剤、結合剤、可溶化剤等の補助物質の例としては、例えば、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、アカシアゴム、ポリビニルピロリドン、シクロデキストリン誘導体、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンアセテート、トリエタノールアミンオレエート等が挙げられる。甘味剤または味マスキング剤は、例えば、味、後味、知覚される不快な塩味、酸味または苦味に有益に影響する、糖、サッカリン、アスパルテーム、スクラロース、ネオテームまたは他の化合物を含んでもよく、これは、経口または吸入製剤がレシピエントを刺激する傾向を減少させる（例えば、咳や喉の痛み、または他の望ましくない副作用（例えば、送達用量を減少させ得るか、または処方された治療レジメンに対する患者のコンプライアンスに悪影響を及ぼし得る））。特定の味マスキング剤は、1つ以上の亜硝酸塩と錯体を形成し得る。増粘剤、粘稠化剤およびフィルム形成剤の例は、上記に与えられている。

20

【0133】

活性薬剤および他の追加成分、例えば希釈剤、担体および賦形剤として役立つものの選択は、関連する疾患または病状の治療レジメンに対する適合性、ならびに本開示による組み合わせまたは組成物の所望の投与経路によって決定され得る。Martindale、第39版（2017年）、Merck Index、第15版（2013年）、Goodman & Gilmanの“The Pharmacological Basis of Therapeutics”、第13版（2017年）、The British National

30

Formulary on line (<https://bnf.nice.org.uk/>)、Remington:「The Science & Practice of Pharmacy」、第22版（2012年）、またはPhysician's Desk Reference、第71版（2017年）などの標準参考文献を参考にすることができる。

【0134】

本開示による成分および組成物を治療目的で動物（ヒトを含む）被験体に投与することができる投与経路の例としては、局所（例えば、クリーム、ローション、ゲル、軟膏、ペースト、エモリエント、スプレー）、耳、鼻（例えば、スプレー）、膣、直腸（例えば、座薬）、経口（例えば、ミスト、スプレー、マウスウォッシュ、エアロゾル）、経腸（例えば、錠剤、パステル、トロッチ剤、カプセル、シロップ剤、エリキシル剤）および非経口（例えば、注射液）、眼、耳、鼻または咽喉（例えば、点滴）、または気道または肺を介するもの（例えば、ミスト、エアロゾル、粉末吸入）が含まれる。

40

【0135】

本開示による成分および組成物に組み込まれるか、または本開示による成分および組成物とともに投与することができる活性薬剤の例は、抗生物質、ステロイド、麻酔薬（例え

50

ば、リグノカイン（リドカイン）、アメトカイン（テトラカイン）、キシロカイン、ブピバカイン、プリロカイン、ロピバカイン、ベンゾカイン、メピバカイン、コカイン、またはそれらの任意の組み合わせ）、鎮痛剤、抗炎症剤（例えば、非ステロイド性抗炎症剤（NSAIDs））、抗感染症薬、ワクチン、免疫抑制剤、抗けいれん薬、抗認知症薬、プロスタグランジン、解熱剤、抗真菌薬、抗ウイルス薬、血管拡張剤または血管収縮剤、日焼け止め剤（例えば、PABA）、抗ヒスタミン剤、エストロゲン、プロゲステロンまたはアンドロゲンなどのホルモン、抗脂漏薬、 α または β 遮断薬（blockers）、ビタミン、皮膚軟化剤、酵素、マスト細胞安定剤（Mast cell stabilizers）、殺疥癬虫薬（scabicides）、殺シラミ薬、瘢痕化剤、角質溶解剤、潤滑剤、麻薬、シャンプー、抗にきび剤、やけど治療剤、クレンジング剤、脱臭剤、脱色剤、おむつ発疹治療製品、エモリエント剤、保湿剤、光増感剤、ポイズンアイビーまたはポイズンオークもしくはウルシ（sumac）製品、日焼け治療剤、タンパク質、ペプチド、プロテオグリカン、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド（DNA、RNAなど）、ミネラル、成長因子、タール含有製剤、蜂蜜含有製剤（例えば、マヌカハニーを含有する製剤）、いぼ治療剤、湿潤包帯、創傷ケア製品、またはそれらの任意の組み合わせを含む。

【0136】

特定の例は、イブプロフェン、インドメタシン、ジクロフェナク、アセチルサリチル酸、アセトアミノフェン、プロプラノロール、メトプロロール、およびオキシドロンなどの鎮痛薬；甲状腺放出ホルモン；エストロゲン、プロゲステロンおよびテストステロンなどの性ホルモン；インスリン；ベラパミル；バソプレッシン；ヒドロコルチゾン；スコポリタミン；ニトログリセリン；硝酸イソソルビド；テルフェナジンなどの抗ヒスタミン；クロニジン；ニコチン；シクロスポリン、メトトレキサート、アザチオプリン、ミコフェニル酸、シクロホスファミド、TNF- α アンタゴニストおよび抗IL5、抗IL4Ra、抗-IL6、抗-IL13、抗-IL17、抗-IL23サイトカインモノクローナル抗体などの非ステロイド性免疫抑制剤；抗けいれん薬；およびアパモルヒネやリバスチグミンなどのアルツハイマー病、認知症、および／またはパーキンソン病用の薬を含む。必要に応じて、任意の追加成分のいずれかを、例えばその放出を制御または遅延させる目的で、カプセル化またはマイクロカプセル化してもよい。詳細については、以下の「成分の任意選択でのカプセル化（例えば、マイクロカプセル化）」と題するセクションを参照されたい。

【0137】

成分の任意選択でのカプセル化（例えば、マイクロカプセル化）

本開示において使用するための組み合わせ、キットおよび組成物の成分の少なくともいくつかは、カプセル化されてもよく、例えばマイクロカプセル化されてもよい。

【0138】

NO生成のためのマイクロカプセル化成分の使用は、化学的に安定な形態である前駆体からの比較的不安定な化合物（例えば、NO）が生成することを引き延ばすので、有用である。複数のマイクロカプセル化された反応物および／または1つ以上の任意の追加成分は、乾燥環境で容易に混合および互いに接触させることができ、NOの生成は、単に、前駆体混合物に少量の水を供給することによって開始することができる。あるいは、マイクロカプセル化された反応物および／または1つ以上の任意の追加成分のこのような混合物は、被験体（例えば、皮膚、粘膜表面）に直接適用されてもよく、または本発明に従って、被験体の鼻、口、気道および／または肺に適用されてもよい。ここで、生理学的環境自体は、治療量のNOの放出を引き起こすために十分な水を提供する。さらなる利点は、マイクロカプセル化された反応物および／または1つ以上の任意選択での追加成分によって占められる体積が比較的小さく、その結果、それらは医療デバイスのような小さい物体に容易に組み込まれ得ることである。このような物体としては、例えば、創傷包帯、包帯、血管および他のステント、カテーテル、ペースメーカー、除細動器、心臓補助デバイス、人工弁、電極、整形外科用ねじおよびピン、ならびに他の薄い医療用および／または移植可能な物品が挙げられる。

【0139】

反応物および／または1つ以上の任意選択での追加成分のカプセル化またはマイクロカプセル化のための製造方法の一例は、反応物の溶融物またはポリマー溶液および／または1つ以上の任意選択での追加成分の噴霧乾燥であり、ポリマーマトリックス内に分散された材料を含む個々の粒子の微砕粉末を製造する。パンコーティング、空気懸濁コーティング、遠心押出、繊維紡糸、繊維押出、ノズル振動、イオノトロピックゲル化、コアセルベーション相分離、界面架橋、in-situ重合、およびマトリックス重合などの他のカプセル化またはマイクロカプセル化方法を使用することもできる。カプセル化ポリマーは、好ましくは生体適合性である。このようなポリマーには、エチルセルロース、ゼイン（トウモロコシおよびトウキビを含む特定の草種に見出されるプロラミン種子貯蔵タンパク質）、キトサン、ヒアルロン酸およびアルギン酸などの天然ポリマー、または生分解性ポリエステル、ポリ無水物、ポリ（オルトエステル）、ポリホスファゼン、または多糖が含まれる（Parkら、Molecules 10(2005)、第141～161頁を参照されたい）。上記のように1つの化学物質がマイクロカプセル化された組成物は、医薬および他の薬剤の送達として周知である。ShalabyおよびJamiolkowskiらの米国特許第4130639号明細書；BuchholzおよびMeduskiらの米国特許第6491748号明細書を参照されたい。しかしながら、このような組成物の実質的に全てにおいて、マイクロカプセル化されるのは治療剤であり、治療剤はマイクロカプセル化された試薬の反応によって生成されない。しかしながら、従来技術の教示の適切な修正は、当業者の技術の範囲内である。一酸化窒素放出ポリマーは、NO付加物／供与体を含む医療用物品として記載されている。例えば、Arnoldの米国特許第7829553号明細書（疎水性ポリマーに結合した炭素系ジアゼニウムジオレート）；Knappの米国特許第7135189号明細書（ニトロソチオール前駆体および一酸化窒素供与体）を参照されたい。

10

20

【0140】

pH制御；任意選択での緩衝系

組成物は、制御されたpH値を有してもよい。特に、組成物は、3.0～8.0の範囲、より具体的には4.0～8.0の範囲のpH値を有してもよい。より具体的な実施形態では、組成物は、4.0～7.4の範囲のpH値を有する。さらにより具体的な実施形態では、組成物が4.0～6.0の範囲のpHを有してもよい。これらの実施形態において、組成物は、4.5～6.0の範囲のpHを有してもよい。

30

【0141】

組成物のpHは、任意の公知の方法で制御されてもよい。特定の実施形態において、有機カルボン酸成分または有機還元酸成分のpHは、亜硝酸成分と組み合わせる前に制御される。いくつかの実施形態では、有機カルボン酸成分または有機還元酸成分は、緩衝液を含む。緩衝液は、薬理学的に許容される緩衝液（例えば、リン酸緩衝液）であってもよい。

【0142】

いくつかの実施形態では、緩衝液は、有機カルボン酸または有機非カルボン酸還元酸と、その塩対応物とを混合することによって形成される。例えば、有機カルボン酸成分は、有機カルボン酸および有機カルボン酸の塩を含むことができる。有機非カルボン酸還元酸成分は、有機非カルボン酸還元酸および有機非カルボン酸還元酸の塩を含むことができる。特定の実施形態では、有機カルボン酸成分は、クエン酸およびクエン酸塩を含む。他の実施形態では、有機カルボン酸成分または有機還元酸成分は、アスコルビン酸およびアスコルビン酸塩を含む。いくつかの実施形態では、有機カルボン酸成分は、有機カルボン酸およびさらなる有機酸の塩を含む。例えば、有機カルボン酸成分は、クエン酸およびアスコルビン酸塩を含むことができる。なおさらなる実施形態では、有機カルボン酸成分は、有機カルボン酸、有機カルボン酸の塩、および有機カルボン酸の塩をさらに含むことができる。例えば、有機カルボン酸成分としては、クエン酸、クエン酸塩およびアスコルビン酸塩が挙げられる。

40

【0143】

他の実施形態では、緩衝液は、酸（プロトン化形態）がその塩対応物と混合して共存す

50

るように、有機カルボン酸または有機非カルボン酸還元酸のpHを調整することによって形成される。これは、in situで緩衝系を生成するような量で、強無機塩基および任意選択で強無機酸を、有機カルボン酸または有機非カルボン酸還元酸に添加することによって適切に達成される。適切な強無機塩基の例としては、水酸化ナトリウム、水酸化リチウム、水酸化カリウム、水酸化ルビジウムおよび水酸化セシウムが挙げられる。適切な強無機酸の例としては、塩酸、硫酸、臭化水素酸および硝酸が挙げられる。

【0144】

緩衝液は、特に、本開示による組み合わせまたは組成物が本発明による鼻、口、気道または肺への投与の場合のように、細胞または動物（ヒトを含む）の皮膚、粘膜または他の組織と接触する場合、1つ以上の生理学的緩衝液を含むことができる。適切な生理学的に適合する緩衝剤の例としては、約5～約9のpH範囲の緩衝液、例えば、2-アミノ-2-メチル-1, 3-プロパンジオール、N-2-アミノエタンスルホン酸（ACES）、N-（2-アセトアミド）-イミノジ酢酸（ADA）、N-（1, 1-ジメチル-2-ヒドロキシエチル）-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（AMPSO）、N, N-ビス（2-ヒドロキシエチル）-2-アミノエタンスルホン酸（BES）、N, N-ビス（2-ヒドロキシエチル）グリシン（BICINE）、2-ビス（2-ヒドロキシエチル）アミノ-2-（ヒドロキシメチル）-1, 3-プロパンジオール（BIS-TRIS）、1, 3-ビス〔トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ〕-プロパン（BIS-TRISプロパン）、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸（CHES）、3-（N, N-ビス〔2-ヒドロキシエチル〕アミノ）-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（DIPSO）、4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジンプロパンスルホン酸（EPPS）、ジグリシン、N-（2-ヒドロキシエチル）ピペラジン-N'-（4-ブタンスルホン酸）（HEPBS）、4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジリエタンスルホン酸（HEPES）、3-（N-モルホリノ）プロパンスルホン酸（MOPS）、3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（MOPSO）、ピペラジン-N, N'-ビス（2-エタンスルホン酸）（PIPES）、ピペラジン-1, 4-ビス（2-ヒドロキシ-3-プロパンスルホン酸無水物（POPSO）、二塩基性リン酸ナトリウム、一塩基性リン酸ナトリウム、二塩基性リン酸カリウム、一塩基性リン酸カリウム、〔トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ〕プロパンスルホン酸（TAPS）、2-ヒドロキシ-3-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ〕-1-プロパンスルホン酸（TAPSO）、2-〔（2-ヒドロキシ-1, 1-ビス（ヒドロキシメチル）エチル）アミノ〕エタンスルホン酸（TES）、N-〔トリ（ヒドロキシメチル）-メチル〕グリシン（トリシン）、または2-アミノ-2-（ヒドロキシメチル）-1, 3-プロパンジオール（TRIZMA）が挙げられる。

【0145】

組成物の浸透圧

特に、皮膚、粘膜、または本発明に従ってヒトまたは動物被験体の鼻、口、気道または肺との接触を生じる経路によって、生理学的系に送達される亜硝酸塩、プロトン源、有機ポリオール、またはそれらの任意の組み合わせの任意の溶液の溶質強度は、被験体の器官および組織のいずれも望ましくない脱水を回避するように制御されるべきである。

【0146】

1キログラムの溶媒に溶解した溶質のモル数として定義される浸透圧（Osm）は、キログラム当たりの浸透圧（Osmol/kg）として表すことができる。本開示に従ってヒトまたは動物被験体に投与されるいずれの溶液の浸透圧は、一般に、約100～約5000mOsmol/kg、例えば、約100、200、300、400、500、600、700、800、900または1000～約2000、2250、2500、2750、3000、3250、3500、3750、4000、4250、4500、4750または5000mOsmol/kgの範囲であるべきである。

【0147】

NO_xの生成を開始する成分の混合

NO_xの生成を開始するためにNO_x生成システムの成分が混合される順序は、それによって生成するNO_xを使用する結果に影響を及ぼし得ることが分かった。この効果の証拠を以下の実施例6に示す。

【0148】

この実施例では、本発明者らは、THP-1細胞中の細菌*M. tuberculosis* HN878を死滅させるための本発明による組成物の効力が、一方では亜硝酸塩、プロトン源および有機ポリオール成分が使用される形態の組成物において所望されるよりも高い濃度で所望される割合で最初に混合され、次いで、その濃縮物が使用される組成物となるように適切に水で希釈されるか、他方では亜硝酸塩、プロトン源および有機ポリオール成分が使用される形態の組成物について所望される濃度で所望される割合で最初に混合されるかによって、異なることを実証する。

10

【0149】

さらに、成分をどのように混合するかは、抗菌効果に関してより良好な結果をもたらすことは予測不可能である。一般に、使用される組成物となるように相対的に濃縮されたプレミックスを希釈することは、THP-1細胞中の*M. tuberculosis* HN878に対してより良好な抗菌効果を生じ得ると思われるが、いくつかの場合には成分が使用のために所望の濃度で最初に混合される方法ほど良好でない結果を生じる。

【0150】

したがって、本発明の一実施形態では、NO_x生成組成物を調製する方法は、亜硝酸塩、プロトン源および有機ポリオール成分を、使用されるべき形態の組成物において所望よりも高い濃度で所望の割合で混合して、濃縮物プレミックスを形成し、続いて、その濃縮物プレミックスを、適切に水で希釈して、使用される組成物を提供することを含む。

20

【0151】

したがって、本発明の別の実施形態では、NO_x生成組成物を調製する方法は、使用される組成物を提供するために、亜硝酸塩、プロトン源および有機ポリオール成分を、使用される形態の組成物について所望の濃度で所望の割合で混合することを含む。

【0152】

好ましい実施形態

本開示の第1から第8の態様の好ましい実施形態は、以下のうちの1つ以上が存在するものである：

30

- 1つ以上の亜硝酸塩は、1つ以上のアルカリ金属またはアルカリ土類金属亜硝酸塩、例えば、亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウム、またはそれらの任意の組み合わせを含む（例えば、含有する、またはそれらから本質的になる、またはそれらのみからなる）；
- プロトン源は、アスコルビン酸またはアスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液；クエン酸またはクエン酸／クエン酸塩緩衝液；またはそれらの2つ以上の任意の組み合わせを含む（例えば、含有する、またはそれらから本質的になる、またはそれらのみからなる）；
- 前記アスコルビン酸またはアスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液、クエン酸またはクエン酸／クエン酸塩緩衝液、またはそれらの2つ以上の任意の組み合わせの分子は、ポリマーまたは高分子に共有結合していない；
- 1つ以上の有機ポリオールは、1分子あたり4～12個の炭素原子および4～12個のOH基を有する直鎖糖アルコールまたはアルジトール；例えば、ソルビトール；マンニトール；アラビトール；キシリトール；またはこれらの2つ以上の任意の組み合わせを含む（例えば、含有する、またはそれらから本質的になる、またはそれらのみからなる）；
- 1つ以上の有機ポリオールは、例えば、1つの非環式アルコール単位で末端化された1、2、または3個の単糖単位の鎖を含む（例えば、からなる）糖アルコール化合物であり、任意選択で、1、2、3個またはそれぞれの単糖単位は、C₅またはC₆の単糖単位であり、および／または非環式アルコール単位は、C₅またはC₆の糖アルコール単位、例えばイソマルト、マルチトール、ラクチトール、マルトトリイトール、マルトテトライトールである；

40

50

- － NO_x 生成反応の開始時または開始前のポリオール成分中または反応溶液中の 1 つ以上の有機ポリオールの総モル濃度は、亜硝酸塩成分中または反応溶液中の亜硝酸塩イオンの総モル濃度の 0.05 ～ 3 倍である；
- － NO_x 生成反応の開始時または開始前のポリオール成分中または反応溶液中の 1 つ以上の有機ポリオールの総モル濃度は、プロトン源成分中または反応溶液中のプロトン源の総モル濃度の 0.05 ～ 3 倍である；
- － 反応混合物と細胞または動物（ヒトを含む）の皮膚（粘膜を含む）、器官または他の組織との接触を伴わない用途では、NO 生成反応の開始前、特に直前のプロトン源の pH は 3.0 ～ 9.0 の範囲である；
- － 反応混合物と細胞または動物（ヒトを含む）の皮膚（粘膜を含む）、器官または他の組織との接触を含む用途では、NO 生成反応の開始前、特に直前のプロトン源の pH は 4.0 ～ 8.0 の範囲である；
- － 反応混合物と、本発明に従って、動物（ヒトを含む）被験体の鼻、口、気道または肺との接触を含む用途では、NO 生成反応の開始前、特に直前のプロトン源の pH は 5.0 ～ 8.0 の範囲である；
- － 標的とする微生物は、「抗菌薬使用のための標的」とのセクションの下に列挙される微生物、例えば、これらに限定されないが、インフルエンザウイルス、SARS-CoV、SARS-CoV-2、Mycobacterium tuberculosis、Mycobacterium abscessus、Pseudomonas aeruginosa、それらの抗生物質耐性株から選択される。

【0153】

本開示の第 9 の態様の好ましい実施形態は、以下のうちの 1 つ以上が存在するものである：

- － 1 つ以上の亜硝酸塩は、1 つ以上のアルカリ金属またはアルカリ土類金属亜硝酸塩、例えば、亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウム、またはそれらの任意の組み合わせを含む（例えば、含有する、またはそれらから本質的になる、またはそれらのみからなる）；
- － プロトン源は、アスコルビン酸またはアスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液；クエン酸またはクエン酸／クエン酸塩緩衝液；またはそれらの 2 つ以上の任意の組み合わせを含む（例えば、含有する、またはそれらから本質的になる、またはそれらのみからなる）；
- － 前記アスコルビン酸またはアスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液、クエン酸またはクエン酸／クエン酸塩緩衝液、またはそれらの 2 つ以上の任意の組み合わせの分子は、ポリマーまたは高分子に共有結合していない；
- － 1 つ以上の有機ポリオールは、1 分子あたり 4 ～ 12 個の炭素原子および 4 ～ 12 個の OH 基を有する直鎖糖アルコールまたはアルジトール；例えば、ソルビトール；マンニトール；アラビトール；キシリトール；またはこれらの 2 つ以上の任意の組み合わせを含む（例えば、含有する、またはそれらから本質的になる、またはそれらのみからなる）；
- － 1 つ以上の有機ポリオールは、例えば、1 つの非環式アルコール単位で末端化された 1、2、または 3 個の単糖単位の鎖を含む（例えば、からなる）糖アルコール化合物であり、任意選択で、1、2、3 個またはそれぞれの単糖単位は、C₅ または C₆ の単糖単位であり、および／または非環式アルコール単位は、C₅ または C₆ の糖アルコール単位、例えばイソマルト、マルチトール、ラクチトール、マルトトリイトール、マルトテトライトールである；
- － NO_x 生成反応の開始時または開始前のポリオール成分中または反応溶液中の 1 つ以上の有機ポリオールの総モル濃度は、亜硝酸塩成分中または反応溶液中の亜硝酸塩イオンの総モル濃度の 0.05 ～ 3 倍である；
- － NO_x 生成反応の開始時または開始前のポリオール成分中または反応溶液中の 1 つ以上の有機ポリオールの総モル濃度は、プロトン源成分中または反応溶液中のプロトン源の総モル濃度の 0.05 ～ 3 倍である；
- － 反応混合物と細胞または動物（ヒトを含む）の皮膚（粘膜を含む）、器官または他の組織との接触を伴わない用途では、NO 生成反応の開始前、特に直前のプロトン源の pH

10

20

30

40

50

は 3.0～9.0 の範囲である；

－ 反応混合物と細胞または動物（ヒトを含む）の皮膚（粘膜を含む）、器官または他の組織との接触を含む用途では、NO生成反応の開始前、特に直前のプロトン源のpHは4.0～8.0の範囲である；

－ 反応混合物と、本発明に従って、動物（ヒトを含む）被験体の鼻、口、気道または肺との接触を含む用途では、NO生成反応の開始前、特に直前のプロトン源のpHは5.0～8.0の範囲である；

－ 標的とする微生物は、「抗菌薬使用のための標的」とのセクションの下に列挙される微生物、例えば、これらに限定されないが、インフルエンザウイルス、SARS-CoV、SARS-CoV-2、Mycobacterium tuberculosis、Mycobacterium abscessus、Pseudomonas aeruginosa、それらの抗生物質耐性株から選択される。

【0154】

組み合わせおよび組成物

NOx生成反応は、多くの方法で開始することができる。それらは、一般に、NOx生成反応が開始できる条件下で、1つ以上の亜硝酸塩とプロトン源とを接触させることを特徴とする。

【0155】

反応は、組み合わせの別々の成分を組み合わせることによって開始することができる。この組み合わせは、in vitroで達成されることができ、得られた組成物は、被験体に投与されてもよく、または本開示に従って処置される任意の表面に適用されてもよい。あるいは、放出ガスが被験体に投与されてもよく、または本開示に従って処置される任意の表面に適用されてもよい。さらに、得られる組成物の両方の使用は、組成物が被験体に投与されるか、またはガスのいくつかの発生が起こった後に処置される任意の表面に適用されるように、時間的に間隔を置いて進行してもよい。

【0156】

この組み合わせは、例えば、最初に混合される成分の乾燥粉末形態とともに段階的であってもよく、次いで、水または別の液体担体媒体と混合されて、反応を開始させてもよい。あるいは、成分の乾燥粉末形態は、最初に水または別の液体担体媒体と個別に混合され、続いて2つ以上の液体が混合されて、反応を開始させてもよい。

【0157】

あるいは、本開示によるNOx生成反応の成分の少なくともいくつかは、単一の組成物中に混合物として存在してもよく、NOx生成反応は組成物上で開始される。NOx生成反応を開始させる1つの可能な方法は、例えば、反応を開始する重要な成分または添加剤、例えば組成物の成分が乾燥形態またはカプセル化形態である場合には水；または組成物の成分がプロトン源を欠いている場合にはプロトン源、を添加することであることができる。

【0158】

本開示によるキットは、典型的にはNOx生成反応が起こらない状況下で、本開示による組合せまたは本開示による組成物の1つ以上の成分を含む。キットの各剤は、典型的には容器内に保持され、容器はNOx生成反応を開始するために必要とされる混合を容易にするために、別個であってもよく、または適合されてもよい。キットのユーザーによって他の必要な成分に導入される必要がある、NOx生成反応を開始するための重要な開始成分は、例えば、亜硝酸塩成分、プロトン源成分、またはポリオール成分のうちの1つであってもよく、または追加分、典型的には、ユーザーによって供給されてもよい水などの一般に入手可能な成分であってもよい。

【0159】

本特許において定義および記載される、組み合わせおよび組成物のパラメータは、典型的にはpH、濃度、および浸透圧などの物理的パラメータを含む。可能な限り、これらは、NOx生成反応の開始前に測定されるべきである。pHパラメータは、特に明記しない限り、NOx生成反応の開始を目的とした濃度での脱イオン水中のプロトン源のpHを指

10

20

30

40

50

す。溶液の濃度は、特に明記しない限り、他の成分と混合して NO_x 生成反応を開始する前の濃度を指す。典型的には、亜硝酸塩と有機カルボン酸または有機還元酸とが混合時に反応して一酸化窒素ガスを生成する場合、 NO_x 生成反応が進行している間にそのようなパラメータを容易に測定することはできない。

【0160】

さらに、反応混合物中の成分の濃度は、混合前の組み合わせの各成分の濃度に必ずしも対応しないことに留意されたい。例えば、本開示による NO_x 生成反応を開始させるための組成物は、予め調製された溶液として一緒に添加されたほぼ等しい体積の亜硝酸塩成分およびプロトン源成分から形成されると仮定する。その実施形態では、混合したときの反応組成物は、亜硝酸塩成分の濃度の半分の亜硝酸塩濃度およびプロトン源成分の濃度の半分のプロトン源濃度を有する。

10

【0161】

組み合わせおよび組成物の各成分は、 NO_x 生成反応の間または後に、系の目的とされる使用に従って、任意の適切な物理的形態であることができる。例えば、組み合わせおよび組成物の各成分は、各々、液体、ゲル、またはフィルムの形態であってもよく、その結果、 NO_x 生成反応混合物は同様に、液体、ゲル、またはフィルムの形態である。液体は、気道または肺への吸入のために噴霧され得るように適合されてもよい。 NO_x 生成混合物が口または咽喉に適用されることを目的とする場合、組み合わせおよび組成物の各成分は、マウスウォッシュまたは飲料の形態であってもよい。あるいは、 NO_x 生成反応混合物が局所投与において皮膚に適用されることを目的とする場合、組み合わせおよび組成物の各成分は、軟膏、ローション、またはクリームの形態であってもよい。

20

【0162】

多成分系、キットおよびディスペンサー

本明細書中に記載される多成分系は、本開示に従って定義され、および本明細書中に記載されるように、任意選択でポリオール成分とともに、亜硝酸塩成分およびプロトン源成分を含むことができる。多成分系中の成分は、互いに接触するように適合され、反応混合物および／または放出ガスは、使用前に成分を保持するための適切な容器またはリザーバーの手段によって、および成分を混合し、反応混合物および／または放出ガスを分配し、一般に前記混合および分配を制御するための手段によって分配される。1つの好ましい実施形態では、反応混合物は、気流に同伴される液滴のミストまたはエアロゾルの形態で分配されてもよい。

30

【0163】

本開示のキットおよびディスペンサーは、一般に、使用前に成分を保持するための容器の少なくともいくつか、成分を混合し、反応混合物および／または放出ガスを分配し、一般に前記混合および分配を制御するための少なくとも1つのデバイスまたは他の手段、ならびに使用前にキットまたはディスペンサーの容器に含まれる成分（存在する場合）を含む。使用のための指示、または使用のための指示が見出され得る場所への指示（例えば、使用のためのオンライン指示）は、適切に存在し得る。このようなキットおよびディスペンサーは、本開示のさらなる態様を構成する。

【0164】

本開示のキットは、成分を混合し、反応混合物および／または放出ガスを分配し、そして一般に前記混合および分配を制御するための容器および手段の比較的単純な集合物であってもよい。このようなキットは、研究目的で、または混合および分配操作における広範囲の変動が予想され、許容される場合に適切に提供され得る。

40

【0165】

本開示の他のキットは、本開示の1つ以上のディスペンサーとともに、（任意選択でユーザーによって供給される水または他の一般に入手可能な成分とともに、 NO_x 生成反応を開始するためにユーザーによって必要とされる組み合わせおよび／または組成物である）消耗品を含む、1つ以上の容器のより複雑化された集合物であってもよい。

【0166】

50

本開示のディスペンサーは、一般に、反応混合物、反応混合物を含む担体、および／または放出ガスを分配する繰り返される同様の動作に適合される。ディスペンサーは、NO_xを生成する反応混合物または放出ガスを含む組成物をディスペンサーから運び出し、それをターゲットに導くためのポンプまたは噴射システムを含むことができる。噴射システムは、加圧および／または液化ガスを使用することができ、医療用には、例えば加圧空気または加圧／液化ブタンなど、薬学的に許容されるかまたは生体適合性であることが適切である。あるいは、使用者の肺からの吸引を使用して、NOを生成する反応混合物または放出ガスを含む組成物をディスペンサーから運び出し、それをターゲットに向けてもよい。本開示において使用されるディスペンサーは、ユーザーがディスペンサーを作動させることができる、手で操作可能なトリガーまたはボタンなどのアクチュエーター装置を好適に備えてもよい。このようなディスペンサーは、専門家、研究者、消費者、または患者の使用に適合させることができ、それに対応して、ターゲットが治療される意図された経路を容易にするように適合させることができる。

10

【0167】

広範囲のキットおよびディスペンサー装置が原則として知られており、これは、使用前に成分を保持し、成分を混合し、または前記混合を容易にし、反応混合物および／または放出ガスを含む組成物を分配し、一般に前記混合および分配を制御し、または前記制御を容易にするために使用または容易に適合させることができる。

【0168】

例：

20

－ シリンジ、例えばツインバレル分配シリンジ。

－ 少なくとも亜硝酸塩成分とプロトン源成分とを混合し、NO_x生成反応または放出ガスを含む組成物を分配するための、例えばポンプ作用容器、圧搾作用容器または振とう作用容器、例えば2つの容器を含む、容器システム。そのようなシステムは、米国特許出願公開第2019/0134080号明細書に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

－ 水溶液中で使用する前に成分を保持し、その成分を混合し、液体反応混合物を噴霧化し、ヒトの肺に吸入するために液体反応混合物を噴霧し、これを分配し、前記混合および分配を一般に前記混合および分配を制御するための装置。例としては、ソフトミスト吸入器、ジェット噴霧器、超音波噴霧器および振動メッシュ噴霧器が挙げられる。亜硝酸塩の酸性化による噴霧NO_x生成反応媒体の吸入に適した噴霧器、液滴サイズ、助剤、包装形態などの選択は、国際公開第03/032928号および国際公開第2009/086470号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

30

－ 上記装置は、予め混合された液体反応混合物が噴霧器に装填された後、それを噴霧し、ヒトの肺に吸入するためにこれを分配し、前記混合および分配を一般に制御するように配置されることができる。

－ 水溶液中で使用する前に成分を保持し、その成分を混合し、ヒトの肺に吸入するために液体反応混合物をエアロゾル化し、これを分配し、前記混合および分配を一般に制御するための装置。例としては、定量吸入器が挙げられる。亜硝酸塩の酸性化による噴霧NO_x生成反応媒体の吸入に適した液滴サイズ、助剤、包装形態などの選択は、国際公開第03/032928号および国際公開第2009/086470号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

40

－ 一酸化窒素放出溶液を上気道に噴霧するための技術および装置は、米国特許第9730956号明細書に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

－ 乾燥粉末形態で使用する前に成分を保持し、それをヒトの肺に吸入するために分配するための装置。例としては、乾燥粉末吸入器(DPI)が挙げられ、これは単回用量カプセルとして、または複数回用量乾燥粉末吸入器として、リザーバー粉末または複数回用量の別個のプリスターのいずれかとして処方することができる。亜硝酸塩の酸性化によって *in situ* でNOを生成するための、肺内の反応媒体を提供するための乾燥粉末組み合わせの吸入に適した粉末粒径、助剤、包装形態などの選択は、国際公開第2009/08647

50

0号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

— 溶液形態で使用する前に成分を保持し、それらを通気し、皮膚消毒剤の使用または皮膚障害を治療するための泡状として分配するためのディスペンサーは、米国特許出願第2013/0200109号明細書、米国特許第7066356号明細書、および米国特許出願第2019/0134080号明細書に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる；

— 成分を保持し、それらを被験体の皮膚に分配するための経皮パッチアセンブリは、国際公開第2014/188175号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0169】

本開示の組み合わせおよび組成物または放出ガスの用量は、治療される疾患、障害もしくは病態（医学的治療の場合）または所望の効果（非医学的治療の場合）、必要とされる治療の重症度、ならびに治療される被験体の病態、年齢および健康、または非医学的治療の場合、治療される標的の性質に応じて、広い範囲で変化し得る。医学的治療の場合、最終的に、医師は、使用されるべき適切な投薬量を決定する。非医学的治療の場合、当業者は、妥当な試験による関連文献のレビューによって、適切な用量および治療方法を研究することができるのであろう。

【0170】

いくつかの実施形態では、NO_x生成反応が起こっている組成物、またはそこから放出されたガスは、亜硝酸塩成分とプロトン源成分とを組み合わせた後600秒以内に、標的位置、例えば、微生物細胞、生体組織、器官、構造、または被験体に投与することができる。このようにして、ターゲット位置は、一酸化窒素の大きなバーストに曝されることができる。

【0171】

いくつかの実施形態では、NO_x生成反応が起こっている組成物は、in situで、または無生物の表面および空間を含む、微生物細胞、生体組織、器官、構造または被験体の上、内部、または近傍などの標的位置もしくはその近傍で、形成することができる。これらの実施形態では、投与は、亜硝酸塩成分とプロトン源成分とを組み合わせた後、実質的に0秒である。他の実施形態では、組成物は、亜硝酸塩成分とプロトン源成分とを組み合わせた後、0秒を超え600秒未満の範囲で標的位置またはその近傍に投与される。より具体的な実施形態では、組成物は、0～120秒の範囲で投与される。なおさらなる実施形態において、組成物は、0～60秒の範囲で投与される。

【0172】

他の実施形態では、NO_x生成反応が起こっている組成物、またはそこから放出されたガスは、亜硝酸塩成分とプロトン源成分とを組み合わせた後、標的位置またはその近傍、例えば、微生物細胞、生体組織、器官、構造、または被験体に600秒を超えて、例えば2000秒を超えて、例えば4000秒を超えて、例えば8000秒を超えて投与することができる。その場合、標的位置、例えば微生物細胞、生体組織、器官、構造、または被験体は、必ずしも一酸化窒素の大きなバーストに曝されなくてもよいが、抗菌効果などの有益な特性を依然として経験し得る。これらの実施形態では、NO_x生成反応が起こっている組成物、またはそこから放出されたガスは、亜硝酸塩成分とプロトン源成分とを合わせてから48時間後まで投与することができる。特定の実施形態では、組成物またはそれから放出されるガスは、亜硝酸塩成分とプロトン源成分とを組み合わせた後、数週間または数ヶ月まで、例えば約6ヶ月まで、または約2ヶ月まで、または約1ヶ月まで、または約3週間まで、または約2週間まで、または約1週間まで、または約3日まで、または24時間まで投与することができる。

【0173】

NO_x生成反応が起こっている組成物、またはそこから放出されたガスは、適切に貯蔵されている場合には、亜硝酸塩成分とプロトン源成分とを組み合わせから48時間を超えて経過した後に投与することができる。例えば、組成物は、例えば真空下で、密閉された

10

20

30

40

50

容器内に貯蔵されてもよい。密閉容器中での貯蔵は、典型的には亜硝酸塩と有機カルボン酸または有機還元酸とを組み合わせた後、24時間以内に行われる。組成物は、亜硝酸塩成分とプロトン源成分とを組み合わせた後、600秒以内に、密閉容器内に貯蔵されてもよい。このようにして、ある割合の一酸化窒素ガスを保持することができる。NO_x生成組成物が低温、例えば約-30℃～約+10℃の範囲の温度、例えば約1℃～約10℃の範囲の温度で貯蔵される場合、ガスの発生速度を実質的に遅くすることができ、組成物の非常に長い貯蔵時間を利用可能にする。

【0174】

特定の実施形態では、エアロゾルディスペンサーは、液体形態の亜硝酸塩成分（例えば、水溶液）を含有する第1のリザーバーと、液体形態のプロトン源成分（例えば、水溶液）を含有する第2のリザーバーとを有する複数のリザーバーを含むことができる。この実施形態では、各成分が前記亜硝酸塩およびプロトン源成分が混合される前、その間、またはその後、噴射剤と適切に混合されてもよい。

10

【0175】

別の特定の実施形態では、ディスペンサーは、本開示の組成物を含むシングルバレルシリンジであってもよい。組成物の粘度は、手動操作によって、またはシリンジの動力操作によって、シリンジから分配され得るように選択されてもよい。例えば、組成物は、液体またはゲルであってもよい。

【0176】

別の特定の実施形態では、ディスペンサーは、亜硝酸塩成分を含有する第1のバレルと、プロトン源成分を含有する第2のバレルとを有するマルチバレルシリンジであってもよい。成分の粘度は、手動動作によって、またはシリンジの動力操作によって、シリンジから分配され得るように選択されてもよい。例えば、各成分は、独立して、液体またはゲルであってもよい。

20

【0177】

成分のための他のリザーバー：ヒドロゲル

本開示のいくつかの態様において、分子リザーバー、例えばヒドロゲルを使用することができる。ヒドロゲルは、その乾燥重量の何倍もの水、他の水性液体または他の非水親水性液体を吸収および保持する能力を有する、高度に水和され、通常は架橋された、三次元ポリマー（ホモポリマーまたはコポリマー）または高分子ネットワークである。液体の吸収は、通常、ヒドロゲルの膨潤を伴う。ポリマーまたは高分子に共有結合した成分の化学基を適切に選択することによって、他の特別な化学的特性を有する酸性ヒドロゲルまたはヒドロゲルを調製することができる。

30

【0178】

本開示においてプロトン源成分として作用することができるヒドロゲルは公知である。このような酸性-COOH基含有ヒドロゲルの例は、例えば、国際公開第2007/007115号、国際公開第2008/087411号、国際公開第2008/087408号、国際公開第2014/188174号、および国際公開第2014/188175号、ならびにそれらにおいて参照される文献に記載されており、これらの全ての開示は参照により本明細書に組み込まれる。NO_x生成と併せた医薬の経皮送達を含む、NO_x生成を使用するスキンケアにおけるこのようなヒドロゲルの使用は、特に、国際公開第2014/188174号および国際公開第2014/188175号に記載されている。このようなヒドロゲルの具体例としては、アクリル酸、メタクリル酸、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸（ATBS、Vinati Organics Ltdから入手可能）およびそれらの塩の、ホモポリマーおよびコポリマーが挙げられる。（メタ）アクリル酸を含むかまたはそれからなるモノマーから形成されるポリマーは、本開示に従ってプロトン源として使用するためのペンダントカルボン酸基を含む。

40

【0179】

したがって、例えば、多成分系は、プロトン源成分を含み、任意選択で有機ポリオールをさらに含む第1の酸性ヒドロゲルパッドまたは層成分を含むことができ、他の成分は亜

50

硝酸塩成分であってもよい。亜硝酸塩成分は、例えば、溶解した亜硝酸塩を含有する液体媒体であってもよい。このようにして、ヒドロゲルパッドまたは層の表面を亜硝酸塩成分と接触させて、 NO_x 生成反応を開始させることができる。あるいは、亜硝酸塩成分は、固体担体とヒドロゲルとの間の接触時に、ヒドロゲルの吸収された液体中に溶解することができる形態の亜硝酸塩を含むパッドまたは層のような固体担体であってもよい。

【0180】

典型的には、固体担体パッドまたは層は、一酸化窒素の拡散に対して透過性（完全に透過性または少なくとも半透過性）である。このようにして、固体担体パッドまたは層とヒドロゲルとを組み合わせると、亜硝酸塩成分とプロトン源成分とを組み合わせると、一酸化窒素が治療領域に拡散することができる。固体担体パッドまたは層は、例えば、メッシュ、不織布パッド、フィルム、発泡体、アルギン酸塩層または膜であってもよい。

10

【0181】

特定の実施形態では、固体担体層はメッシュである。メッシュは、特定の物質が通過する穴または間隙の格子を形成する、固体、典型的には可撓性の、多数の接続されたストランドであってもよい。メッシュは、織布であってもよく、不織布であってもよい。いくつかの実施形態では、メッシュは不織布である。

【0182】

固体担体層、例えばメッシュは、ポリマー材料で作ることができる。適切なポリマー材料の例としては、ビスコース、ポリアミド、ポリエステル、ポリプロピレンまたはそれらの混紡が挙げられるが、これらに限定されない。ポリマー材料は、例えば、その親水性を増加させるために処理されてもよい。特定の実施形態では、固体キャリア層は、ポリプロピレンメッシュである。

20

【0183】

特定の実施形態では、固体担体は吸収性であり、亜硝酸塩成分は固体担体中に少なくとも部分的に吸収され（absorbed）、吸収（imbibed）または含浸される（impregnated）。吸収された（absorbed）、吸収された（imbibed）、または含浸された（impregnated）亜硝酸塩成分は、（乾燥された）固体であってもよく、または固体担体内の水溶液中にあってよい。

【0184】

特定の実施形態では、固体担体は2つ以上の層を含み、亜硝酸塩成分は少なくとも1つの層に吸収され（absorbed）、吸収され（imbibed）、または含浸され（impregnated）、または少なくとも1つの外層上にコーティングされる。例えば、固体担体は、2、3、4、5、6、7、8、9、10以上の層（例えば、ポリプロピレンメッシュ層）を含むことができ、これは、乾燥形態および／または溶液形態の1つ以上の亜硝酸塩で吸収され（absorbed）、吸収され（imbibed）、含浸され（impregnated）、またはコーティングされる。

30

【0185】

酸性ヒドロゲルは、内部のプロトン化されたペンダント酸性基の大量供給により自然の緩衝作用を持ち、そこから H^+ イオンが吸収された水性媒体を介して移動し、 NO_x 生成反応中にヒドロゲル構造の表面のペンダント酸性部分が脱プロトン化されるにつれて、その表面で相対的に酸性のpHを維持することができる。

40

【0186】

非酸性（例えば、中性または塩基性）ヒドロゲルも知られており、本開示で使用するために、亜硝酸塩成分および／またはポリオール成分を吸収させ、含有させることができる。プロトン源成分は、ヒドロゲルと接触させた液体媒体中に提供されるプロトン源によって、および／または固体担体中に吸収され（absorbed）、吸収され（imbibed）、含浸され（impregnated）、またはその上にコーティングされるプロトン源によって、そのようなヒドロゲルと接触させることができる。このようなヒドロゲルでは、亜硝酸塩成分、プロトン源成分、またはポリオール成分のいずれも、ヒドロゲルのポリマーまたは高分子ネットワークに共有結合していないことが提供されてもよく、例えば、本開示に必要なす

50

すべての成分は、亜硝酸塩成分およびプロトン源成分が NO_x 生成反応の開始が望まれるまで一緒に反応してはならないことを考慮して、ヒドロゲル中に吸収され、ヒドロゲル内の水性媒体中に含有されてもよいが、ヒドロゲルのポリマーまたは高分子に共有結合していない。

【0187】

ヒドロゲルパッドまたは層の厚さは、0.5～2 mmの範囲であってもよい。いくつかの実施形態では、ヒドロゲルパッドまたは層の厚さは、1～2 mmの範囲である。特定の実施形態では、ヒドロゲルパッドまたは層の厚さは、1.0～1.6 mmの範囲である。

【0188】

プロトン源成分に関して上述した特徴は、一般にプロトン源成分として作用する任意の酸性ヒドロゲルに同様に適用される。従って、例えば、ヒドロゲルは、ヒドロゲルのpHを4.0～9.0、または5.0～8.0の範囲に維持するための緩衝液を含んでもよい。

【0189】

いくつかの実施形態では、ヒドロゲルはバリア層を含んでもよい。バリア層は、典型的にはポリウレタンフィルムなどのポリマーフィルムであり、ヒドロゲルの外表面上に配置される。使用に際して、バリア層は、典型的には組み合わされた多成分系と大気との間のバリアを提供するために、例えば被験者の皮膚に対してヒドロゲルの反対側の表面上に配置される。ヒドロゲルに隣接するバリアフィルムの表面は、典型的には隣接するヒドロゲル表面よりも大きな表面積を有する。このようにして、バリア層は、ヒドロゲルの周囲を越えて延在することができる。これらの実施形態では、バリア層は、使用時にヒドロゲルを、例えば被験者の皮膚に接着するために、その周辺縁部の周りに接着剤を有してもよい。

【0190】

特定の実施形態では、本開示は以下を含む2成分系を提供する：

a) 1つ以上の亜硝酸塩（例えば、 NaNO_2 ）で吸収され、含浸され、またはコーティングされた1つ以上のメッシュ；および

b) 有機カルボン酸および有機非カルボン酸還元酸から選択される1つ以上を含有するプロトン源を含むヒドロゲル；

ここで、成分（a）は成分（b）とは別であり、1つ以上の成分（a）および（b）は1つ以上の有機ポリオールをさらに含む。

（a）1つ以上の有機ポリオールは、反応出力増強量で存在する；

（b）プロトン源は、三次元ポリマーマトリックスに共有結合したペンダントカルボン酸基を含むヒドロゲルのみではない；

（c）1つ以上の有機ポリオールは、グリセロールのみではない；

（d）1つ以上の増粘剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、グリセロールのみではない；

（e）1つ以上の可塑剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、グリセロールのみではない；

（f）1つ以上の有機ポリオールは、ポリビニルアルコールのみではない；

（g）1つ以上の増粘剤が使用される場合、1つ以上の有機ポリオールは、ポリビニルアルコールのみではない；

（h）上記（b）～（g）のいずれか1つ以上において、「のみではない」という用語は「含まない」と置き換えられる；

（i）1つ以上の有機ポリオールは、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリンモノステアレート（グリセリルステアレート）、トリヒドロキシエチルアミン、D-パントテニルアルコール、パンテノール、イノシトールと組み合わせたパンテノール、ブタンジオール、ブテンジオール、ブチンジオール、ペンタンジオール、ヘキサンジオール、オクタンジオール、ネオペンチルグリコール、2-メチル-1,3-プロパンジオール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ジプロピレングリコール、ジブチレングリコール、ブタン-1,

10

20

30

40

50

2, 3-トリオール、ブタン-1, 2, 4-トリオール、ヘキサン-1, 2, 6-トリオール、ヘキシレングリコール、カプリリルグリコール、ここに挙げたもの以外のグリコール、ヒドロキノン、ブチル化ヒドロキノン、1-チオグリセロール、エリソルベート、エチルヘキシルグリセリン、それらの任意の組み合わせ、または上記のいずれかとグリセロールおよび／またはポリビニルアルコールとの任意の組み合わせ、のみではない；

(j) 1つ以上の有機ポリオールは、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセリンモノステアレート（グリセリルステアレート）、トリヒドロキシエチルアミン、D-パントテニルアルコール、パンテノール、イノシトールと組み合わせたパンテノール、ブタンジオール、ブテンジオール、ブチンジオール、ペンタンジオール、ヘキサンジオール、オクタジオール、ネオペンチルグリコール、2-メチル-1, 3-プロパンジオール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ジプロピレングリコール、ジブチレングリコール、ブタン-1, 2, 3-トリオール、ブタン-1, 2, 4-トリオール、ヘキサン-1, 2, 6-トリオール、ヘキシレングリコール、カプリリルグリコール、ここに挙げたもの以外のグリコール、ヒドロキノン、ブチル化ヒドロキノン、1-チオグリセロール、エリソルベート、エチルヘキシルグリセリン、それらの任意の組み合わせ、または上記のいずれかとグリセロールおよび／またはポリビニルアルコールとの任意の組み合わせ、を含まない。

【0191】

疑いを避けるために、本開示の態様に関連して上述した特徴(a)～(h)の実施形態および選好は、この実施形態にも同様に適用されることがここで確認される。

【0192】

このようなシステムは、例えば、成分(a)および(b)を組み合わせることでNO_x生成反応を開始することによって使用されてもよい。次いで、このような組み合わせは、ヒトまたは動物の体の治療または他の処置（例えば、局所適用による）において使用されてもよい。その使用は、国際公開第2014/188174号および国際公開第2014/188175号に記載の通りであってもよく、または以下に記載の通りであってもよい。このシステムは、以下に記載されるように、非医療用途において使用されてもよい。そのシステムが被験体の皮膚（粘膜を含む）に接触する局所医療用途に使用される場合、1つ以上のメッシュは、皮膚接触層であってもよい。

【0193】

治療または手術における使用

本開示に従ってNO_x生成反応が進行している組成物、およびそれから放出したガスは、治療および／または予防療法、疾患、障害および病態を矯正するための手術、美容整形、ヒト、獣医学および手術を含む再建手術を含む、治療および手術における多くの用途を有する。組成物またはそれから放出したガスによる治療に応答する身体的な不調または異常が不安、うつ病または別の精神疾患もしくは障害を引き起こすかまたは悪化させる場合、身体状態の治療、予防または緩和はそれに対応して精神状態を治療、予防または緩和することができ、それによって、本開示の使用は精神保健分野にも及ぶ。

【0194】

一酸化窒素および一酸化窒素生成組成物の多くの生理学的効果およびそれに基づく医療法が文献に報告されており、その結果、多くの治療法が開発されている。以下の非網羅的なリストは、例示として提供される。列挙された使用ならびに列挙されていない他の使用は、本開示および特許に包含される。

一酸化窒素による血管の拡張による血液供給の上昇および／または血圧の低下（van Faassen et al, Med. Res. Rev., 2009年9月；29(5)、683-741頁を参照）；

高血圧患者における血圧を低下させ、血管コンプライアンスを改善し、上皮機能を回復させるための経口一酸化窒素サプリメントの急性効果は、Houston et al. in J. Clin. Hypertens. (Greenwich)、2014年7月、16(7)、524-529頁に記載されている；

血液供給の低下による損傷からの組織の一酸化窒素による保護(van Faassen et al, Med. Res. Rev., 2009年9月；29(5)、683-741頁を参照）；

一酸化窒素含有神経ニューロン、例えば消化管や勃起組織などの平滑筋上で活性を示す一酸化窒素含有神経ニューロンにおける神経伝達物質としての一酸化窒素の作用 (Toda et al、Pharmacol. Ther、2005年5月；106(2)、233-266頁を参照)；

血管の恒常性を助ける、血管平滑筋の収縮と成長、血小板凝集および内皮への白血球の付着の一酸化窒素による阻害 (Dessey and Ferron、Current Medical Chemistry - Anti-inflammatory and Anti-allergy Agents in Medical Chemistry、2004年；3(3)、207-216頁参照)；

心収縮性および心拍数を減少させるための一酸化窒素の作用 (Navin et al、J. Cardiovascular Pharmacology、2002年；39(2)、298-309頁を参照)；

毛細血管および肺拡張を促進するためのクリティカルな新生児ケア、例えば新生児患者における原発性肺高血圧症の治療、および胎便吸引後 (Barrington et al、The Cochrane Database of Systematic Reviews、2017年；1、CD000399 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17375630>)；また、Chotigeat et al、J. Med. Assoc. Thai、2007年；90(2)、266-271頁；また、Hayward et al、Cardiovascular Research、1999年；43(3)、628-638頁を参照)；

糖尿病患者における血管障害、内皮機能障害、血管炎症、神経障害、非治癒性潰瘍の予防、および下肢切断を必要とする危険性の軽減 (nfb University Studdies - “Nitric Oxide Holds Promise for Dibetes”、<http://www.nfb.org/Images/nfb/Publications/vod/vod212/vodspr0613.htm>を参照)；

急性肺損傷、急性呼吸窮迫症候群及び重症肺高血圧症における低酸素血症の改善、可逆的な低酸素血症性呼吸窮迫の原因に対する治療 (Mark et al、N. Eng. J. Med、2005年12月22日、353(25)、2683-2695頁を参照)；

肺塞栓症に続発した急性右室不全患者における救済療法としての一酸化窒素の投与 (Summerfield et al、2011年；Respir. Care 57(3)、444-448頁を参照)；

狭心症の治療、パラコート中毒および他の心血管障害の作用 (Abrams、The American Journal of Cardiolody、1996年、77(13)、31C-37C頁を参照)；

膀胱収縮機能不全の治療 (Moro et al、Eur. J. Pharmacol、2012年1月、445-449頁；また、Andersson et al、Br. J. Pharmacol、2008年、153(7)、1438-1444頁を参照)；

急性および慢性肺感染および敗血症の治療 (Fang et al、Nature Reviews. Microbiology、2004年10月；2(10)、820-832頁；また、Goldfarb et al、Critical Care Medicine、2007年1月；35(1)、290-292頁を参照)；

一酸化窒素を含む毒性反応性窒素中間体 (R N I s) は、Mycobacterium tuberculosis に対する活性化マウスマクロファージの抗マイコバクテリア作用におけるエフェクター分子として示唆されている (Chan et al、J. Exp. Med、1992年4月、1111-1122頁を参照)；

ガス状一酸化窒素は、嚢胞性線維患者における抗生物質耐性菌および真菌性肺感染症の治療に有効である可能性がある (Deppisch et al、2016年2月9日；“Gaseous nitric oxide to treat antibiotic resistant bacterial and fungal lung infections in patients with cystic fibrosis: a Phase I clinical study”、DOI 10.1007/s15010-016-0879-xを参照)；

一酸化窒素は皮膚疾患のための潜在的な局所用広域スペクトル抗菌剤として報告されており、耐性発現の可能性は低い (B L Adler and A J Friedman、Future Sci. OA、2015年；1(1)、FS037を参照)；

一酸化窒素は神経伝達物質であり、神経活動や、雌雄の回避学習から生殖器勃起に至るまで様々な機能に関連している (Kim et al、J. Nutrition、2004年、134、28735頁を参照)；

男性のインポテンスおよび勃起機能不全を治療するための一酸化窒素の使用は、Sullica n et al、Cardiovascular Research、1999年8月、43(3)、658-665頁に記載されている；

10

20

30

40

50

創傷治癒を補助し、虚血再かん流傷害を軽減し、手術からの心臓および肺の回復を補助し、血管手術からの回復を補助し、整形外科手術からの術後回復を補助するための外科的補助剤として一酸化窒素が使用される可能性が報告されている(A Krausz and A J Friedman、Future Sci. OA、2015年；1(1)、FS056を参照)；

NOの抗菌効果および創傷治癒効果は、国際公開第95／22335号およびHardwick et al、2001年、Clin. Sci. 100、395-400頁に記載されている；

欧州特許第1411908号明細書（アバディーン大学）は、一酸化窒素がアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)を含む爪下感染を治療するのに有効であることを示すと言われているデータを報告している；

Tinea Pedis (Athlete's Foot) (Weller et al、J. Am. Acad. Dermatol、1998年4月、38(4)、559-563頁を参照) のような真菌性皮膚感染症の治療のための皮膚へのNOx生成組成物の局所適用；

ウイルス性皮膚感染症の治療のための皮膚へのNOx生成組成物の局所適用（国際公開第99／44622号を参照）；

血管収縮が根本的な問題である病態、例えばレイノー症候群（レイノー現象としても知られている）の治療のための皮膚へのNOx生成組成物の局所適用（Tucker et al、Lancet、1999年11月13日、354、9191、1670-1675頁を参照）；

末梢虚血およびレイノー現象、手術後の創傷およびやけどのような創傷のような関連する病態の治療のための皮膚表面での一酸化窒素の局所産生を生じるための薬剤としての酸性化亜硝酸塩の使用は、国際公開第2000／053193号に記載されている；

ヒトの創傷を治療するための液体一酸化窒素放出溶液（NORS）の使用は、米国特許第9730956号明細書（Stenzlerら）によって特許請求されている。NORSはまた、抗細菌、抗真菌および／または抗ウイルス特性を有すると主張され、*Acetobacter baumannii*、メチシリン耐性*Staphylococcus aureus*、*Escherichia coli*および*Mannheimia haemolytica*に対する抗細菌効果を示すといわれるデータが提供される。H1N1インフルエンザウイルス、感染性牛鼻気管炎ウイルス、牛呼吸器合胞体ウイルスおよび牛パラインフルエンザ3ウイルスに対するNORSの抗ウイルス効果を示すといわれるデータが提供される。*Trichophyton rubrum*および*Trichophyton mentagrophytes*に対するNORSの抗真菌効果を示すといわれるデータが提供される；

Chou S-H et al、左心室圧負荷ラットにおけるET-1、eNOSおよびcGMPの肺発現に対するバンド除去の影響、Exp. Biol. Med. 2005年、231、954-959頁；

Gladwin MT et al、低酸素シグナル伝達、細胞保護、および血管拡張に寄与する血管内分泌一酸化窒素リザーバーとしての亜硝酸塩、Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2006年、291、H2026-H2035頁；

Hunter CJ、et al、吸入噴霧亜硝酸塩（Inhaled nebulized nitrite）は、低酸素感受性NO依存性選択的肺血管拡張薬である、Nat. Med. 2004年、10、1122-1127頁；

Ozaki M et al、内皮からの一酸化窒素による低酸素肺血管リモデリングの減少、Hypertension、2001年、37、322-327頁；

Rubin LJ、2006年、肺動脈性肺高血圧症、Proc. Am. Thorac. Soc. 3、111-115頁；

Yellon D.M. et al、2007年、心筋再かん流障害（Myocardial Reperfusion Injury）、N. Engl. J. Med.、357、1121-1135頁；

Duranski M. R. et al、心臓および肝臓のin vivo虚血・再かん流時の亜硝酸塩の細胞保護効果、J. Clin. Invest.、2005年、115、1232-1240頁；

Jung K-H et al、亜硝酸ナトリウムの早期静脈内注入は、in vivo虚血・再かん流損傷から脳を保護する、Stroke、2006年、37、2744-2750頁；

Esme H. et al、再かん流誘発性肺損傷における再かん流期間中に与えられる補足的な一酸化窒素ドナーの有益な効果、Thorac. Cardiovasc. Surg.、2006年、54、477-483頁；

ヒトの皮膚品質を改善するための薬剤としてNOを放出するための酸性化亜硝酸塩の使用は、中国特許出願第101028229号明細書に記載されている；

10

20

30

40

50

ヒトの毛髪成長を促進し、脱毛症を予防または治療するための薬剤としてNOを放出するための酸性化亜硝酸塩の使用は、中国特許出願第101062050号明細書に記載されている。

【0195】

一酸化窒素の生理学的効果の他の一般的な詳解は、例えば、Lancaster et al、Proc Natl Acad Sci、1996年、91、8137-8141頁；Ignarro et al、Proc Natl Acad Sci、1987年、84、9265-9269頁に記載されており；Brent、J Cell Science、2003年、116、9-15頁；Murad、N Engl J Med、2006年、355、2003-2011頁に概説されている。

【0196】

NOの送達のために公表されている薬理学的形態は、Butler and Feelisch、Circulation、2008年、117、2151-2159頁に概説されている。

【0197】

上記で引用した刊行物の各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0198】

本開示は、一酸化窒素および一酸化窒素生成システムの全ての治療的および外科的使用に適用可能であり、これには上記の参考文献に公開された特定の治療および外科的使用、ならびに全ての他の公開された治療および外科的使用、ならびに一酸化窒素の生理学的効果および一酸化窒素生成反応の生成物の基礎となる知識に基づく治療および外科的使用が挙げられるが、これらに限定されない。

【0199】

血管拡張

血管拡張を誘導する一酸化窒素の特性は、本開示の組み合わせおよび組成物、ならびにそれらから放出される気体を使用する多くの治療を特徴づける。

【0200】

血管拡張に反応する疾患、障害および病態の特定の例には、虚血および皮膚病変に関連する病態が含まれるが、これらに限定されない。

【0201】

組織虚血に関連する病態には、レイノー症候群、重度の原発性血管けいれん、および組織虚血、例えば手術、敗血症性ショック、放射線照射または末梢血管疾患（例えば、糖尿病および他の慢性全身性疾患）によって引き起こされる組織虚血が含まれる。

【0202】

手術の結果としての組織虚血に関連する病態の治療または予防において使用される場合、本開示の組み合わせまたは組成物、または本開示を使用してNOx生成反応から放出される一酸化窒素は、手術の前、間、または後に被験体に投与されてもよい。組み合わせ、組成物、または放出ガスは、手術部位に、または手術部位の近傍に投与することができる。この組織虚血の治療または予防を使用できる外科的処置の例には、移植手術、組織または臓器移植手術、冠状動脈手術、けい動脈カテーテル法、化学薬品等の全身薬を投与するための留置動脈または静脈カテーテルを提供する手術、有茎または回転皮弁を含むがこれらに限定されない美容整形手術、以前の外科手術と同じ部位で切開が行われる再手術、皮膚および／または下層組織の血流が不十分な領域で、または併発疾患（動脈硬化症または糖尿病患者など）の結果として血流が不十分と予想される場合に行われる外科手術、血管を損傷または外傷した場合の手術、皮膚または皮下の動静脈奇形を除去または矯正する手術が含まれる。

【0203】

例えば、組み合わせ、組成物、または放出ガスは、本開示による組み合わせ、組成物、または放出ガスを器官に投与することによって、器官の虚血性再かん流損傷の治療または予防において使用され得る。器官は、心臓（例えば、心筋虚血を予防または治療するため）、脳（例えば、脳虚血および梗塞（脳卒中）を治療または予防するため）、肺（例えば、肺の虚血性再かん流障害を治療または予防するため）、腎臓（例えば、腎臓の虚血性再

10

20

30

40

50

かん流障害を治療または予防するため）、および肝臓（例えば、肝臓の虚血性再かん流障害を治療または予防するため）から選択される1つ以上であってよい。手術は、器官の移植であってもよい。組み合わせ、組成物または放出ガスの投与は、虚血の発症後に行われてもよく、または予防的であってもよい。

【0204】

経皮薬物送達の使用

薬物の経皮送達を誘導する一酸化窒素の特性は、本開示の組み合わせおよび組成物、ならびにそれらから放出されるガスの別の重要な有用性を表す。

【0205】

国際公開第02/17881号および国際公開第2014/188175号（これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）には、一酸化窒素およびそれから放出されるガスを生成するための組み合わせおよび組成物の経皮薬物送達のための使用が記載されており、このような使用のためのこれらの刊行物に記載される同じ条件、好み、および例は、本開示の組み合わせおよび組成物、ならびにそれから放出されるガスにも適用可能である。

10

【0206】

典型的には、本開示の組合せおよび組成物は、被験体に経皮的に送達される1つ以上の薬学的に活性な薬剤を含み、被験体の皮膚に適用するための局所用の組み合わせまたは組成物の形態として提供される。使用することができる薬学的に活性な薬剤の例については、上記の「任意の追加成分」と題されたセクションを参照されたい。

20

【0207】

適切な局所用の組み合わせは、亜硝酸塩含有メッシュおよび別個のプロトン源含有ヒドロゲルを含むことができ、上記の「組成物または組成物系のための他のリザーバー；ヒドロゲル」のセクションで説明されているように、この2つは被験体の皮膚上で一緒に使用されるように適合される。ポリオールおよび薬学的に活性な薬剤は、組み合わせの1つ以上の別個の成分中に提供されてもよく、またはヒドロゲル中に組み込まれてもよく、またはこれらの選択肢の任意の組み合わせがポリオールおよび薬学的に活性な薬剤のためにそれぞれ使用されてもよい。

【0208】

創傷、皮膚病変、およびやけどの治療

血管拡張および薬物の経皮送達を誘導し、微生物の増殖を死滅または予防する一酸化窒素の特性は、創傷、皮膚病変およびやけどの治療において、本開示の組み合わせおよび組成物ならびにそこから放出されるガスの別の重要な有用性をもたらした。

30

【0209】

本開示を用いて治療可能な病態には、潰瘍、皮膚ドナー部位、手術創（術後）熱傷（熱傷、表層熱傷、部分層熱傷および全層熱傷など）、裂傷および擦過傷が含まれる。創傷は、慢性のことも急性のこともある。潰瘍は、動脈または静脈起源など、様々な起源のものがある。潰瘍の例には、脚潰瘍、例えば慢性脚潰瘍または急性脚潰瘍、褥瘡、例えば慢性褥瘡または急性褥瘡、静脈性潰瘍および糖尿病性足潰瘍のような糖尿病に関連する潰瘍が含まれる。

40

【0210】

国際公開第2014/188174号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）には、一酸化窒素およびそれから放出されるガスを生成するための組み合わせおよび組成物の創傷、皮膚病変、およびやけどを治療するための使用が記載されており、この公報に記載される同じ条件は、本開示の組み合わせおよび組成物ならびにそれから放出されるガスにも適用可能である。

【0211】

典型的には、本開示の組み合わせおよび組成物は、1つ以上の薬学的に活性な薬剤を含み、被験体の皮膚に適用するための局所用の組み合わせまたは組成物の形態として提供される。使用することができる薬学的に活性な薬剤の例については、上記の「任意の追加成

50

分」と題されたセクションを参照されたい。創傷、皮膚病変およびやけどの治療のために、1つ以上の薬学的に活性な薬剤は、鎮痛剤および／または麻酔剤（例えば、局所麻酔剤）（例えば、慢性疼痛、急性疼痛または神経障害性疼痛を軽減するための鎮痛剤および／または麻酔剤）、抗菌剤、消毒剤、抗炎症剤および抗瘢痕剤から適切に選択され得る。

【0212】

適切な局所用の組み合わせは、亜硝酸塩含有メッシュおよび別個のプロトン源含有ヒドロゲルを含むことができ、上記の「組成物または組成物系のための他のリザーバー；ヒドロゲル」のセクションで説明されているように、この2つは被験体の皮膚上で一緒に使用されるように適合される。ポリオールおよび薬学的に活性な薬剤は、組み合わせの1つ以上の別個の成分中に提供されてもよく、またはヒドロゲル中に組み込まれてもよく、またはこれらの選択肢の任意の組み合わせがポリオールおよび薬学的に活性な薬剤のためにそれぞれ使用されてもよい。

【0213】

抗菌薬の局所使用

抗菌用途では治療的に有効なNO用量が少なく、例えば数百ppmと低く、例えば100～600ppmとすることができるが（例えば、Ghaffari et al, Nitric Oxide Biology and Chemistry, 2009年、14、21-29頁、その開示は参照により本明細書に組み込まれる）、一酸化窒素の有効性は皮膚接触が維持される時間に実質的に依存する(Ormerod et al, BMC Research Notes, 2011年、4、458-465頁、その開示は参照により本明細書に組み込まれる）。

【0214】

一酸化窒素のゆっくりとした局所放出のための提案が公表されている（例えば、米国特許第6103275号明細書を参照）。しかしながら、得られる局所NO用量は1時間未満持続し、これは、乏しい局所抗菌作用を提供する。「多成分系、キットおよびディスペンサー」と題するセクションで上述したように、また以下の実施例に示すように、本開示は局所および非局所投与システムの両方において、はるかに長いNO投薬期間を可能にし、実質的な臨床的利点をもたらす。

【0215】

特に、本開示の組み合わせおよび組成物は、NO_x生成反応が始まった後（「初期バースト」）、最初の約200～500秒で一酸化窒素の強力な出力を提供することを可能にし、続いて、ガスの発生が停止するかまたは有効レベル未満に低下する前に、任意選択で、長時間にわたって延在する一酸化窒素のよりゆっくりとした放出（「テール」）を提供することを可能にすることが見出された。本開示の組み合わせおよび組成物によって放出されるNO用量は、公表された最小有効抗菌用量を超え、本開示の組み合わせおよび組成物ならびにそれから放出されるガスの潜在的に有効な局所抗菌使用をもたらす。

【0216】

局所用抗菌剤適用のためのNO_x生成組み合わせおよび組成物の製剤は、先行技術、例えば米国特許出願公開第2014/0056957号明細書に十分に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれ、そのような製剤は、本開示の組み合わせおよび組成物にも適用可能である。別の適切な局所用組み合わせは、亜硝酸塩含有メッシュおよび別個のプロトン源含有ヒドロゲルを含むことができ、上記の「組成物または組成物系のための他のリザーバー；ヒドロゲル」のセクションで説明されているように、この2つは被験体の皮膚上で一緒に使用されるように適合される。ポリオールおよび薬学的に活性な薬剤は、組み合わせの1つ以上の別個の成分中に提供されてもよく、またはヒドロゲル中に組み込まれてもよく、またはこれらの選択肢の任意の組み合わせがポリオールおよび薬学的に活性な薬剤のためにそれぞれ使用されてもよい。

【0217】

その他の経皮的または局所的治療

一酸化窒素および一酸化窒素生成組成物の他の局所適用は、発毛を刺激すること、ならびにインポテンスおよび勃起不全を治療することを含む。

【0218】

本開示の組み合わせおよび組成物は、このような治療のための局所適用のために処方されることができる。

【0219】

局所用包帯および包帯システム、例えば創傷包帯

局所的治療では、治療が適用されている間、皮膚の治療された領域を覆うかまたは保護することが望ましいことが多い。これは、創傷の汚染を防止するのを助け、治癒過程から膿または残屑を除去するのを助け、入浴またはシャワーの際に、または衣服との接触を通して、または被験者の通常の活動の結果として、治療組成物の損失を防止または制限し、処置領域をノックまたは擦れに対して緩衝することができる。

10

【0220】

この目的のために、局所用包帯または包帯システム、例えば、創傷包帯または包帯システムに治療を組み込むことが一般的である。包帯、または包帯システムの少なくとも1つの構成の一部は、典型的には水不透過性または水透過性であってもよく、任意選択で皮膚接着部分、および任意選択でガーゼまたはパッド層などの他の層を備えることができるバッキングシートを含む。

【0221】

さらなる態様では、本開示は、本開示の第5の態様による組み合わせまたは組成物を含む、局所包帯、例えば創傷または皮膚包帯、または包帯システムを提供し、包帯または包帯システムの少なくとも1つの構成は、バッキングシートと、任意選択で1つ以上の他の層、例えばガーゼおよびパッド層から選択される層とを含む。本開示の第5の態様による組み合わせまたは組成物は、適切にはバッキングシートの皮膚に向けられた側に配置され、包帯が皮膚に適用され、NO_x生成反応が開始されると、所望の皮膚領域がNO_x生成反応混合物またはそこから放出されるガスで治療されるように配置される。

20

【0222】

包帯または包帯システムは、使用前に、密封された無菌パックで適切に提供されてもよい。

【0223】

鼻、口、気道および肺への使用

血管拡張および薬物の経皮送達を誘導し、微生物を殺すかまたはその増殖を防止するという一酸化窒素の性質は、鼻、口、気道および肺の粘膜および組織の治療、および／またはヒトまたは動物被験体に本発明の組み合わせおよび組成物を送達するための投与経路としての鼻、口、気道および肺の使用において、本発明の組み合わせおよび組成物ならびにそれから発生したガスの別の重要な有用性をもたらした。

30

【0224】

本発明を用いて治療可能な病態は、例えばインフルエンザ、SARS-CoVまたはSARS-CoV-2のようなウイルス感染、肺動脈高血圧、移植に関与する心臓、脳および臓器の虚血性再かん流障害、慢性閉塞性肺疾患（COPD）（特に肺気腫、慢性気管支炎）、重度の喘息、ウイルス性および細菌性誘発増悪を含む喘息、難治性（非可逆性）喘息、肺炎、結核、非結核性マイコバクテリア感染症、他の細菌性およびウイルス性肺感染症、例えば気道のウイルス感染後の二次的細菌感染を含む。

40

【0225】

国際公開第2009/086470号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）には、一酸化窒素を生成させるための噴霧された液体の組み合わせおよび組成物ならびにそれから放出されるガスの、鼻、口、気道および肺の疾患を治療するための使用、および／またはそのような組み合わせおよび組成物をヒトまたは動物被験体に送達するための投与経路としての鼻、口、気道および肺の使用が記載されており、そのような使用についてその公表に記載される同じ条件、好みおよび例は、本発明の組み合わせおよび組成物ならびにそれから放出されるガスにも適用可能である。

【0226】

50

典型的には、鼻、口、気道および肺への送達のための本発明の組み合わせおよび組成物は、1つ以上の薬学的に活性な薬剤を含む。使用することができる薬学的に活性な薬剤の例については、上記の「任意の追加成分」と題されたセクションを参照されたい。

【0227】

鼻、口、気道または肺の送達経路を介して本発明を実施するために、2つの原理的な送達方法が可能である。第1は、本発明の組み合わせまたは組成物が、鼻、口、気道または肺に直接送達される方法である。第2は、本発明を用いてNO_x生成反応から放出されたガスが、本発明の組み合わせまたは組成物が患者の身体に入ることなく、鼻、口、気道または肺に送達される方法である。

【0228】

1. 鼻、口、気道、もしくは肺への直接的な組み合わせまたは組成物の送達

組み合わせまたは組成物、またはそれらの成分は、乾燥固体形態で鼻、口、気道、または肺に直接送達されてもよく、それによって粘膜の流体が固体成分材料を溶解し、NO_x生成反応を開始する。

【0229】

組み合わせの成分は、別々にまたは一緒に投与されてもよい。1つの好ましい実施形態では、プロトン源またはその少なくとも1つの成分は、残りの成分の前に投与されてもよく、その結果、相対的に酸性の環境が粘膜において確立され、これは、亜硝酸塩成分がin situでプロトン源成分と接触する場合に、NO_x生成反応の迅速な開始を補助する。

【0230】

組み合わせの任意の乾燥成分、または乾燥組成物の鼻、口、気道、または肺への直接的な送達は、乾燥粉末吸入器を使用する乾燥粉末吸入によって適切に行われてもよく、1つ以上の乾燥粉末成分（例えば、1つ以上の、亜硝酸塩成分、プロトン源成分およびポリオール成分）、またはその乾燥粉末組成物の治療有効用量を被験体に送達し、乾燥粉末吸入器は、6ミクロン未満の体積平均直径の粒子を含むエアロゾルを被験体に送達する。乾燥粉末吸入器は、乾燥粉末吸入器が1つ以上の乾燥粉末成分または乾燥粉末組成物の吸入呼吸あたり約0.1mg〜約100mgを、6ミクロン未満の体積平均直径の粒子で被験体に送達するように、乾燥粉末を装填した単回または複数回投与を実施するようにされてもよい。

【0231】

さらに、または代わりに、その組み合わせもしくは組成物、またはそれらの成分は、亜硝酸塩成分、プロトン源成分およびポリオール成分のうちの1つ以上の溶液の液滴のミストまたはスプレーとして、鼻、口、気道、または肺に直接送達されてもよい。

【0232】

本明細書に記載される本発明の実施形態は、一般に、被験体の鼻、口、気道または肺への直接送達に適用可能である。限定するものではないが、例えば組み合わせもしくは組成物、またはそれらの成分は、1つ以上の生理学的に適合する希釈剤、担体および／または賦形剤とともに、および／または1つ以上の追加成分、1つ以上の特定の利益を提供することを目的とする特定の機能成分とともに提供されて、被験体の鼻、口、気道または肺に直接投与されてもよい。適切な生理学的に適合する希釈剤、担体および／または賦形剤の例としては、ラクトース、デンプン、リン酸二カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、セルロース誘導体、クロスカルメロースナトリウム、グルコース、ゼラチン、スクロース、炭酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウムなどが挙げられるが、これらに限定されない。必要に応じて、少量の非毒性補助物質、例えば、湿潤剤、乳化剤、潤滑剤、結合剤、および可溶化剤、例えば、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、アラビアゴム、ポリビニルピロリドン、シクロデキストリン誘導体、ソルビタンモノラウレート、酢酸トリエタノールアミン、オレイン酸トリエタノールアミンなどが存在してもよい。一般的に言えば、目的とされる投与様式に応じて、医薬製剤は、本発明の組み合わせもしくは組成物またはその成分を約0.005重量%〜約95重量%、好ましくは約0.5重量%〜約50重量%含有する

10

20

30

40

50

。このような投薬形態を調製する実際の方法は、公知であるか、または当業者に明らかである。例えば、Martindale、第39版（2017年）、the Merck Index、第15版（2013年）、Goodman & Gilmanの“The Pharmacological Basis of Therapeutics”、第13版（2017年）、the British National Formulary on-line (<https://bnf.nice.org.uk/>)、Remington: “The science & Practice of Pharmacy”、第22版（2012年）、またはthe Physician's

Desk Reference、第71版（2017年）を参照されたい。

【0233】

1つの好ましい実施形態では、被験体の鼻、口、気道または肺に送達するための組み合わせまたは組成物は、液体、懸濁されるべき固体、乾燥粉末、凍結乾燥物、または他の組成物を含むバイアルのような単位投薬形態の形態をとり、この組み合わせまたは組成物は、NO_x生成反応の成分とともに、希釈剤（例えば、ラクトース、スクロース、リン酸ニカルシウムなど）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムなど）；結合剤（例えば、デンプン、アラビアガム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロース、セルロース誘導体など）を適切に含むことができる。

【0234】

組み合わせの成分、または液滴形態の組成物を含むいずれの液滴の、鼻、口、気道または肺への直接的な送達は、噴霧器を使用する吸入によって、1つ以上の液体成分（例えば、亜硝酸塩成分、プロトン源成分およびポリオール成分の1つ以上）の治療有効用量、または液体形態の組成物を被験体に送達することによって適切に行われてもよく、ここで、噴霧器は、5ミクロン体積平均直径未満の粒子を含有するエアロゾルを被験体に送達する。噴霧器は、噴霧器が5ミクロン未満の体積平均直径の液滴、好ましくは約2～約5 μmの範囲のサイズを有する液滴で、1つ以上の液体成分または液体形態の組成物の吸入呼吸当たり約0.1 mg～約100 mgを被験体に送達するように、組み合わせまたは液体組成物の液体成分を装填した単回または複数回投与に適合されてもよい。

【0235】

一実施形態では、噴霧器は、組み合わせの成分を含む液滴のエアロゾルの形成、または主に約2～約5ミクロンの空力学的直径（MMAD）を有する液滴形態の組成物の形成を可能にすることに基づいて選択される。

【0236】

一実施形態では、組み合わせの成分を含む液滴の送達量、または液滴形態の組成物は、肺外疾患および全身性疾患も治療するために、肺病理学、呼吸器感染症および／または肺外、全身性分布に対する治療効果を提供する。

【0237】

以前には、2つのタイプの噴霧器、ジェットおよび超音波は、2～4 μmのサイズを有するエアロゾル粒子を生成し、送達することができることが示されている。これらの粒子サイズは、中気道沈着、したがって、緑膿菌、大腸菌、エンテロバクター属、肺炎桿菌、クレブシエラ・オキシトカ、プロテウス・ミラビリス、シュドモナス・エルギノーザ、セラチア・マルセッセンス、インフルエンザ菌、バークホルデリア・セパシア、ステノトロホモナス・マルトフィリア、アルカリゲネス・キシロソキシダンス、黄色ブドウ球菌および多剤耐性緑膿菌のようなグラム陰性菌によって引き起こされる肺細菌感染症の治療に最適であることが示されている。しかしながら、特別に処方された溶液が使用されない限り、これらの噴霧器は、典型的には治療効果を得るために十分な量の薬物を投与するために、より大きな容量を必要とする。ジェット噴霧器は、水溶液のエアロゾル液滴への空気圧破壊を利用する。超音波噴霧器は、圧電結晶による水溶液の剪断を利用する。しかしながら、典型的にはジェット噴霧器は臨床条件下では約10%しか効率的ではなく、一方、超音波噴霧器は約5%しか効率的ではない。従って、噴霧器内に多量の薬物が配置されているにもかかわらず、肺に蓄積され、吸収される医薬の量は10%の一部である。より小さい粒子サイズまたは遅い吸入速度は、深部肺沈着を可能にする。適応症、例えば、抗菌活性のための中気道沈着、または肺動脈高血圧および全身送達のための中および／または

肺胞沈着に応じて、中肺および肺胞沈着の両方が、本発明のために所望され得る。噴霧器を使用する製剤送達のための組成物および方法の例示的な開示は、例えば、振動メッシュ噴霧器を使用するエアロゾル化ミスト送達の技術、プロトコルおよび特徴付けの説明を含む、米国特許出願公開第2006/0276483号明細書に見出すことができる。米国特許出願公開第2006/0276483号明細書の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0238】

したがって、一実施形態では、振動メッシュ噴霧器を使用して、好ましい実施形態では組み合わせの成分を含む液体液滴のエアロゾルまたは液滴形態の組成物を送達する。振動メッシュ噴霧器は、ダイヤフラムと流体接触する液体貯蔵容器と、吸気弁および呼気弁とを備える。一実施形態では、送達される液体製剤の約1～約5 mlを貯蔵容器に入れ、エアロゾル発生器を駆動させて、約1～約5 μ mの体積平均直径の間で選択された粒子サイズの霧化エアロゾルを生成する。

10

【0239】

したがって、例えば、好ましい実施形態では、任意選択で本発明による1つ以上の有機ポリオールを含む、亜硝酸塩成分配合物またはプロトン源成分、これらの1つまたは両方は、液体噴霧化吸入器中に配置され、約1～約5 μ mの体積平均直径の粒子サイズが生成されている約1～約5 mlの投薬溶液から約7～約700 mg、好ましくは約1～約5 ml中約17.5～約700 mg、より好ましくは約1～約5 ml中約17.5～約350 mg、好ましくは約1～約5 ml中約0.1～約300 mg、より好ましくは約1～約5 ml中約0.25～約90 mg、を送達する用量で調製される。

20

【0240】

非限定的な例によって、組み合わせの成分を含む噴霧液体、または液滴形態の組成物は、記載された呼吸可能な送達用量で、約20分未満、好ましくは約10分未満、より好ましくは約7分未満、より好ましくは約5分未満、より好ましくは約3分未満、場合によっては最も好ましくは約2分未満で、投与されてもよい。

【0241】

非限定的な例によって、他の状況では、組み合わせの成分を含む噴霧化された液体、または液滴形態の組成物は、より長い期間にわたって投与された場合、改善された忍容性を達成してもよく、および／または曲線下面積（AUC）の形状増強特性を示してもよい。これらの条件下で、記載された呼吸可能な送達用量は、約2分を超え、好ましくは約3分を超え、より好ましくは約5分を超え、より好ましくは約7分を超え、より好ましくは約10分を超え、場合によっては約10～約20分である。

30

【0242】

別個の成分製剤の例は、（i）約6より大きいpH、例えば約6～約8の範囲、例えば約7のpHを有する水溶液中の亜硝酸塩；および（ii）水溶液中のプロトン源成分を含んでもよく、少なくとも2つの別個の液体溶液成分（i）および（ii）を混合してNO_x生成組成物を形成することができ、これはヒト患者または獣医の被験体への送達のために噴霧器を装填するために使用され得る。

【0243】

水性および他の非加圧液体システムについては、組み合わせまたは組成物の成分をエアロゾル化するために、種々の噴霧器（小容量噴霧器を含む）が利用可能である。圧縮駆動噴霧器は、ジェット技術を組み込み、圧縮空気を使用して液体エアロゾルを生成する。このようなデバイスは、例えば、Healthdyne Technologies社；Invacare社；Mountain Medical Equipment社；Pari Respiratory社（Midlothian, VA）；Mada Medical社；Puritan-Bennet；Schuco社；DeVilbiss Health Care社、およびHospitak社から市販されている。超音波噴霧器は、呼吸可能な液滴を生成するために圧電結晶の振動の形態の機械的エネルギーに依存し、例えばOmron Healthcare社およびDeVilbiss Health Care社から市販されている。振動メッシュ噴霧器は、呼吸可能な液滴を生成するために圧電パルスまたは機械パルスのいずれかに依存する。本明細書に記載される亜硝酸塩（nitrite）、

40

50

亜硝酸塩 (nitrite salt)、または亜硝酸塩供与化合物もしくは一酸化窒素供与化合物とともに使用するための噴霧器の他の例としては、米国特許第 4 2 6 8 4 6 0 号明細書；米国特許第 4 2 5 3 4 6 8 号明細書；米国特許第 4 0 4 6 1 4 6 号明細書；米国特許第 3 8 2 6 2 5 5 号明細書；米国特許第 4 6 4 9 9 1 1 号明細書；米国特許第 4 5 1 0 9 2 9 号明細書；米国特許第 4 6 2 4 2 5 1 号明細書；米国特許第 5 1 6 4 7 4 0 号明細書；米国特許第 5 5 8 6 5 5 0 号明細書；米国特許第 5 7 5 8 6 3 7 号明細書；米国特許第 6 6 4 4 3 0 4 号明細書；米国特許第 6 3 3 8 4 4 3 号明細書；米国特許第 5 9 0 6 2 0 2 号明細書；米国特許第 5 9 3 4 2 7 2 号明細書；米国特許第 5 9 6 0 7 9 2 号明細書；米国特許第 5 9 7 1 9 5 1 号明細書；米国特許第 6 0 7 0 5 7 5 号明細書；米国特許第 6 1 9 2 8 7 6 号明細書；米国特許第 6 2 3 0 7 0 6 号明細書；米国特許第 6 3 4 9 7 1 9 号明細書；米国特許第 6 3 6 7 4 7 0 号明細書；米国特許第 6 5 4 3 4 4 2 号明細書；米国特許第 6 5 8 4 9 7 1 号明細書；米国特許第 6 6 0 1 5 8 1 号明細書；米国特許第 4 2 6 3 9 0 7 号明細書；米国特許第 5 7 0 9 2 0 2 号明細書；米国特許第 5 8 2 3 1 7 9 号明細書；米国特許第 6 1 9 2 8 7 6 号明細書；米国特許第 6 6 4 4 3 0 4 号明細書；米国特許第 5 5 4 9 1 0 2 号明細書；米国特許第 6 0 8 3 9 2 2 号明細書；米国特許第 6 1 6 1 5 3 6 号明細書；米国特許第 6 2 6 4 9 2 2 号明細書；米国特許第 6 5 5 7 5 4 9 号明細書；米国特許第 6 6 1 2 3 0 3 号明細書が挙げられ、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0244】

本明細書中に記載される液滴形態の組み合わせまたは組成物の成分を含む液滴とともに使用され得る噴霧器の市販品の例は、Aerogen (Aerogen社製、ゴールウェイ、アイルランド) によって製造される、Respirgard II (登録商標)、Aeroneb (登録商標)、Aeroneb (登録商標) Pro、AeroEclipse XL (登録商標) および Aeroneb (登録商標) Go; Aradigm によって製造される AERx (登録商標) および AERx Essence™; Respironics 社 (マリーズビルmペンシルバニア州、アメリカ合衆国) によって製造される、Porta-neb (登録商標)、Freeway Freedom™、SideStream、SideStream Plus、Ventstream および I-neb、ならびに PARI, GmbH (PARI Respiratory Equipment 社、ミッドロジアン、バージニア州、アメリカ合衆国; PARI GmbH、シュタルンベルク、ドイツ国) によって製造される、PARI LC-Plus (登録商標)、PARI LC-Star (登録商標)、PARI LC-Sprint (登録商標) および e-Flow™ を含む。これらの噴霧器のいずれも、製造業者の仕様に従って、フェースマスクまたはマウスピースのいずれかとともに使用することができる。さらなる非限定的な例により、米国特許第 6 1 9 6 2 1 9 号明細書は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0245】

一実施形態では、可溶性またはナノ薬剤粒子を含有する水性製剤が提供される。水性エアロゾル製剤の場合、薬剤は、約 0.67 mg/ml ~ 約 700 mg/ml の濃度で存在してもよく；特定の好ましい実施形態では、亜硝酸塩が 1 ml 当たり約 0.667 mg 亜硝酸アニオン ~ 約 100 mg 亜硝酸アニオンの濃度で存在する。このような製剤は、肺の適切な領域への効果的な送達を提供し、より濃縮されたエアロゾル製剤は、大量の薬剤が非常に短時間で肺に送達されることを可能にするというさらなる利点を有する。一実施形態では、製剤は、十分に耐性のある製剤を提供するように最適化される。したがって、特定の好ましい実施形態は、亜硝酸塩 (亜硝酸ナトリウム、亜硝酸カリウムまたは亜硝酸マグネシウムなど) を含み、良好な味、pH が約 4.7 ~ 約 6.5、浸透圧が約 100 ~ 約 3600 mOsmol/kg、および任意の特定のさらなる実施形態では、約 30 ~ 約 300 mM の浸透圧イオン (例えば、塩化物、臭化物) 濃度を有するように製剤化される。

【0246】

一実施形態では、エアロゾル製剤の調製に使用される溶液または希釈剤は、約 4.5 ~ 約 9.0、好ましくは約 4.7 ~ 約 6.5 (例えば、酸性混合物として)、または単一バイアル構成として約 7.0 ~ 約 9.0 の pH 範囲を有する。この pH 範囲は、本明細書の他の箇所に記載されるような特定の実施形態による味マスキング剤の含有と同様に、忍容

10

20

30

40

50

性を改善する。エアロゾルが酸性または塩基性のいずれかである場合、それは気管支けいれんおよび咳を引き起こし得る。pHの安全な範囲は相対的であり、一部の患者は軽度の酸性エアロゾルに耐えることができるが、他の患者は気管支けいれんを経験する。約4.5未満のpHを有するいずれのエアロゾルも、典型的には気管支けいれんを誘発する。約4.5～約5.5のpHを有するエアロゾルは、時折気管支けいれんを引き起こす。約8を超えるpHを有するいずれのエアロゾルも、身体組織が一般にアルカリ性エアロゾルを緩衝することができないので、低い忍容性を有し得る。約4.5未満および約8.0を超える制御されたpHを有するエアロゾルは、典型的には重篤な気管支けいれん咳および炎症反応を伴う肺刺激を生じる。これらの理由および患者における気管支けいれん、咳または炎症の回避のために、エアロゾル製剤の最適pHは、約5.5～約8.0であると決定された。

10

【0247】

その結果、一実施形態では、本明細書に記載されるような使用のためのエアロゾル製剤は、約4.5～約7.5のpHに調整され、酸性混合物の最も好ましいpH範囲は約4.7～約6.5であり、単一バイアル構成の最も好ましいpH範囲は約7.0～約8.0である。非限定的な例として、本明細書に開示される特定の実施形態によって、組成物はまた、pH緩衝液またはpH調整剤、典型的には有機酸または塩基から調製される塩、および好ましい実施形態において、本明細書に記載されるような酸性賦形剤（例えば、クエン酸などの非還元酸またはクエン酸ナトリウムなどのクエン酸塩）または上記および表1を参照して記載されるクエン酸または他の緩衝剤などの緩衝剤を含んでもよい。したがって、これらおよび他の代表的な緩衝液は、クエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、酢酸、またはフタル酸の有機酸塩、Tris、トロメタミン、塩酸塩、またはリン酸緩衝液を含んでもよい。

20

【0248】

多くの患者は、苦味、塩味、甘味、金属感覚を含む様々な化学的味覚に対する感受性が増大している。十分に耐性のある薬剤の製品を作製するために、味マスキング剤および賦形剤、浸透圧調整剤、ならびに甘味料を添加することによって、味マスキングを達成することができる。

【0249】

多くの患者は、様々な化学薬品に対する感受性が高く、気管支けいれん、喘息またはその他の咳の偶発症の発生率が高い。それらの気道は、特に、低張性または高張性および酸性またはアルカリ性の条件、ならびに塩化物などのいずれの透過性イオンの存在に対しても敏感である。これらの状態の不均衡または特定の濃度値を超える塩化物の存在は、気管支けいれんまたは炎症事象および／または咳をもたらし、これは、吸入可能な製剤での治療を大きく損なう。これらの条件の両方は、本明細書中に開示される特定の実施形態によって、調節されたpH、浸透圧および味マスキング剤の有利な使用なしに、気管支内空間へのエアロゾル化された薬剤の効率的な送達を妨げ得る。

30

【0250】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される亜硝酸塩化合物（または別個の実施形態では、亜硝酸塩供与化合物または一酸化窒素供与化合物）の水溶液の浸透圧は、賦形剤を提供することによって調節される。場合によっては、塩化物、臭化物、または別のアニオンなどのある量の透過性イオンは、エアロゾル化された亜硝酸塩の成功した有効な送達を促進することができる。しかしながら、本明細書中に開示される亜硝酸塩成分について、そのような透過性イオンの量は、他の薬剤化合物のエアロゾル化投与に典型的に使用される量よりも低くてもよいことが発見された。

40

【0251】

気管支けいれんまたは咳反射は、すべての場合において、所与の浸透圧を有するエアロゾル化のための希釈剤の使用によって改善されるわけではない。しかしながら、これらの反射はしばしば、希釈剤のオスモル濃度が特定の範囲内である場合、十分に制御および／または抑制され得る。安全かつ許容される治療化合物のエアロゾル化のための好ましい溶

50

液は、約30mM～約300mM、好ましくは約50mM～約150mMの範囲の塩化物濃度で、約100～約3600mOsmol/kgの総浸透圧を有する。この浸透圧は、気管支けいれんを制御し、透過性アニオンとしての塩化物濃度は咳を制御する。これらは両方とも透過性イオンであるので、臭化物またはヨウ化物アニオンを塩化物の代わりに用いることができる。さらに、重炭酸塩は、塩化物イオンを置換してもよい。

【0252】

ナノ粒子薬物分散液はまた、凍結乾燥されて、経鼻または肺送達に適した粉末を得ることができる。このような粉末は、表面改質剤を有する凝集ナノ薬剤粒子を含有してもよい。このような凝集体は、呼吸可能な範囲内のサイズ、例えば約2～約5ミクロンのMMADを有することができる。

【0253】

2. NO生成反応から放出されたガスの鼻、口、気道または肺への送達

患者の肺に計量された量の一酸化窒素を送達するための吸入器は周知である。一般的に言えば、一酸化窒素は、オフサイトで生成され、使用のために特殊な送達デバイスに接続された加圧シリンダー中で病院または診療所に送達される。INOMax Therapy systemは、例えば、(BOC Healthcare、UK、<https://www.bochealthcare.co.uk/en/products-and-services/products-and-services-by-category/medical-gases/inomax/inomax.html>)に記載されている。略語INOMax（吸入一酸化窒素）は、一般に、INOMax Therapy systemのシリ

ンダーに使用され、そして送達デバイスのためのINOventに使用される。INOMax Therapy systemの評価は、例えばKimse et al、Chest、1998年6月、113(6)、1650-1657頁に公開されている。この刊行物の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0254】

本発明の第1の態様による方法は、専用のNO製造設備で適切に実施することができ、本発明の第2の態様によるガス生成物は、通常の方法で加圧シリンダー内にユーザーへ提供される。次いで、加圧ガスシリンダーは、公知の方法で、分配、モニタリング、投与、混合および送達装置とともに使用される。

【0255】

抗菌薬使用の標的

上述したように、本開示のNOx生成反応およびそれから放出されるガスは、潜在的に広範囲の微生物に対して殺菌効果または静生物効果を有し、多くの抗菌用途につながる。

【0256】

微生物は、例えば、細菌細胞、ウイルス粒子および／または真菌細胞、または微小寄生虫から選択される任意の1つ以上であることができ、個々の細胞、生物、またはコロニーであることができる。細菌細胞、ウイルス粒子および／または真菌細胞または微小寄生虫は、宿主生物上または宿主生物中に、例えば、ヒトまたは他の動物の腸内微生物として、またはヒトまたは他の動物の細菌感染において存在することができる。細菌、および／または真菌細胞、および／またはウイルス粒子、および／または微小寄生虫は、in vitro、in vivo、またはex vivoであってもよい。

【0257】

本開示は、被験体の皮膚病変部位における微生物感染症の治療または予防に特に有用であることができる。本開示は、免疫抑制された被験体における微生物感染症の予防の処置において特に有用であり得る。

【0258】

微生物が細菌感染、真菌感染、ヒトまたは他の動物のウイルス性または微小寄生虫性感染で存在する場合、その感染は、例えば、感冒、インフルエンザ、結核、SARS、COVID-19、肺炎または麻疹のような疾患との関連であってもよい。

【0259】

1. 細菌細胞

本細菌は、病原性細菌種であってもよい。微生物感染症は、グラム陽性およびグラム陰

10

20

30

40

50

性、好気性および嫌気性、抗生物質感受性および抗生物質耐性細菌を含む病原性細菌種によって引き起こされる感染症であってもよい。

【0260】

本発明を使用して標的とすることができる細菌種の例には、アクチノマイセス、バシラス、バルトネラ、ボルデテラ、ボレリア、ブルセラ、カンピロバクター、クラミジア、クラミドフィラ、クロストリジウム、コリネバクテリウム、エンテロコッカス、エスケリキア、フランシセラ、ヘモフィルス、ヘリコバクター、レジオネラ、レプトスピラ、リステリア、マイコバクテリウム、マイコプラズマ、ナイセリア、シュードモナス、リケッチア、サルモネラ、赤痢菌、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌、トレポネーマ、ウレアプラズマ、ビブリオ、またはエルシニア属の種が含まれる。それらの任意の組み合わせもまた、本発明によって標的化されることができる。

10

【0261】

特定の実施形態では、微生物は、コリネバクテリウム、マイコバクテリウム、レンサ球菌、ブドウ球菌、シュードモナス、またはそれらの任意の組み合わせの病原性種であってもよい。

【0262】

より特定の実施形態では、標的とされる微生物は、アクチノマイセス・イスラエリ、炭疽菌、バクテロイデス・フラジリス、百日咳菌、ボレリア・ブルグドルフェリ、ボレリア・ガリニ；ボレリア・アフゼリ；ボレリア・レカレンティス；ブルセラ・アボルタス；ブルセラ・カニス；ブルセラ・メリテンシス；ブルセラ・スイス；カンピロバクター・ジェジュニ；肺炎クラミジア；クラミジア・トラコーマ；オウム病クラミジア；ボツリヌス菌；クロストリジウム・ディフィシル；ウェルシュ菌；破傷風菌；コリネバクテリウム・ジフテリア；エーリキア・カニス；エーリキア・チャフェンシス；エンテロコッカス・ファエカリス；エンテロコッカス・フェシウム；腸管毒素原性大腸菌（ETEC）、腸管病原性大腸菌、腸管侵入性大腸菌（EIEC）、および腸管出血性大腸菌（EHEC）などの大腸菌O157を含む大腸菌；H7；野兔病菌；インフルエンザ菌；ヘリコバクター・ピロリ；肺炎桿菌；レジオネラ・ニューモフィラ；レプトスピラ属細菌；リステリア・モノサイトゲネス；マイコバクテリウム・レプラエ；マイコバクテリウム・ツベルクロシス；マイコバクテリウム・アブセサス；マイコバクテリウム・ウルセランス；肺炎マイコプラズマ；淋菌；髄膜炎菌；緑膿菌；ノカルディア・アステロイデス；リケッチア・リケッチア；チフス菌；サルモネラ・ティフィムリウム；ソンネイ赤痢菌；志賀赤痢菌；黄色ブドウ球菌；表皮ブドウ球菌；スタフィロコッカス・サブロフィティカス；B群溶血性レンサ球菌；肺炎レンサ球菌；A群溶血性レンサ球菌；ストレプトコッカス・ビリダンス；梅毒トレポネーマ；ビブリオ・コレレ（コレラ菌）；ペスト菌；およびこれらの組み合わせから選択されることができる。

20

30

【0263】

特に、微生物は、肺炎クラミジア、炭疽菌、コリネバクテリウム・ジフテリア、インフルエンザ菌、マイコバクテリウム・レプラエ、マイコバクテリウム・ツベルクロシス、マイコバクテリウム・アブセサス、マイコバクテリウム・ウルセランス、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、肺炎レンサ球菌、またはそれらの組み合わせから選択されてもよい。

40

【0264】

微生物は、抗生物質耐性または抗生物質感受性の病原性細菌種、または細菌種の抗生物質耐性または抗生物質感受性株であってもよい。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）およびメチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）を処置するための一酸化窒素の使用は、例えば、国際公開第02/20026号に記載され、その開示は参照によって本明細書に組み込まれる。本発明を用いて殺菌または処置され得る抗生物質耐性または抗生物質感受性病原性細菌種の例としては、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）またはメチシリン感受性黄色ブドウ球菌（MSSA）が挙げられる。

【0265】

2. 真菌細胞

50

微生物は、病原性真菌種であってもよい。微生物感染は、病原性酵母を含む病原性真菌種によって引き起こされる感染であってもよい。

【0266】

本発明を使用して標的化され得る真菌種の例としては、アスペルギルス、ブラストミセス、カンジダ（例えば、カンジダ・オーリス）、コクシジオイデス、クリプトコッカス（特に、クリプトコッカス・ネオフォルマンズまたはクリプトコッカス・ガッティ）、ヒストプラズマ、ムコルミセテス、ニューモシスチス（例えば、ニューモシスチス・イロベチイ）、スポロトリクス、タラロマイセス、またはこれらの任意の組み合わせの種が挙げられる。

【0267】

真菌感染症の例には、アスペルギルス症（アレルギー性気管支肺アスペルギルス症など）、足白癬（水虫）、病原性カンジダ属による感染症、腔酵母菌感染症、足の爪の真菌感染症やおむつかぶれ、股部白癬（ジョックかゆみ）、体部白癬（白癬）などがある。

【0268】

3. ウイルス粒子

微生物は、ウイルス粒子であってもよい。感染は、病原性ウイルスによって引き起こされることがある。

【0269】

本発明を使用して標的とされ得るウイルスの例には、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、ノロウイルス、ロタウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、RSウイルス（RSV）、アストロウイルス、および肝炎ウイルスが含まれる。特に、本発明の組成物は、H1N1インフルエンザウイルス、感染性牛鼻気管炎ウイルス、牛呼吸器合胞体ウイルス、牛パラインフルエンザ3ウイルス、SARS-CoV、SARS-CoV-2、およびこれらの任意の組合せから選択される群の1つによって引き起こされる感染の治療または予防に使用されてもよい。

【0270】

特に、本発明は、ウイルス感染によって引き起こされる疾患または障害の治療に適用されることができる。本発明によって標的とされ得るこのような疾患の例には、呼吸器ウイルス疾患、胃腸ウイルス疾患、発疹性ウイルス疾患、肝ウイルス疾患、皮膚ウイルス疾患、出血性ウイルス疾患、および神経ウイルス疾患が含まれる。

【0271】

呼吸器ウイルス感染症には、インフルエンザ、ライノウイルス（すなわち、感冒ウイルス）、RSウイルス、アデノウイルス、コロナウイルス感染症（例えばCOVID-19など）、および重症急性呼吸器症候群（SARS）がある。胃腸ウイルス疾患には、ノロウイルス感染症、ロタウイルス感染症、アデノウイルス感染症およびアストロウイルス感染症が含まれる。発疹性ウイルス疾患には、麻疹、風疹、水痘、带状疱疹、バラ疹、天然痘、第5病およびチクングンヤウイルス病が含まれる。肝ウイルス疾患には、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、D型肝炎およびE型肝炎がある。皮膚のウイルス性疾患には、性器疣贅、口腔ヘルペス、性器ヘルペスおよび伝染性軟属腫などの疣贅がある。出血性ウイルス疾患には、エボラ、ラッサ熱、デング熱、黄熱、マールブルグ出血熱およびクリミア・コンゴ出血熱がある。本発明を用いて標的化され得る神経ウイルス疾患には、ポリオ、ウイルス性髄膜炎、ウイルス性脳炎および狂犬病が含まれる。

【0272】

4. 寄生微生物

微生物は、寄生微生物（ミクロパラサイト）であってもよい。感染は、病原性の寄生微生物によって引き起こされることがある。

【0273】

本発明を用いて標的とされ得る寄生微生物の例には、原虫が含まれる。

【0274】

特に、本発明は、肉質虫（例えばアメーバ、例えばEntamoeba histolyticaまたはEnt

10

20

30

40

50

amoeba disparなどのエントアメーバ属)、鞭毛虫(例えば、GiardiaおよびLeishmaniaなどの鞭毛虫)、繊毛虫(例えば、Balantidiumなどの繊毛虫)、孢子虫(例えば、PlasmodiumおよびCryptosporidium)、およびそれらの任意の組み合わせの原虫群を標的とすることができる。

【0275】

本発明を用いて治療され得る寄生虫感染には、マラリア、アメーバ赤痢およびリーシュマニア症(例えば、皮膚リーシュマニア症、粘膜皮膚リーシュマニア症または内臓リーシュマニア症)が含まれる。

【0276】

ヒト／動物の宿主または被験体

被験体は、動物またはヒト被験体であることができる。本明細書における「動物」という用語は、一般にヒトを含むことができるが、「動物」という用語が「動物またはヒト被験体」などの語句に現れる場合、文脈から特に非ヒト動物を指すこと、または「ヒト」という言及は単に、疑いを避けるために動物がヒトかもしれないというという選択肢を特定するものであることが理解されるであろう。

【0277】

特定の実施形態では、被験体は、ヒト被験体である。ヒト被験体は、乳児または成人被験体であってもよい。

【0278】

特定の実施形態では、被験体は、脊椎動物被験体である。脊椎動物は、Agnatha(無顎魚)、Chondrichthyes(軟骨魚)、Osteichthyes(骨魚)、Amphibia(両生類)、Reptilia(は虫類)、Aves(鳥類)、Mammalia(哺乳類)のいずれかであってもよい。特定の実施形態では、被験体は、哺乳類または鳥類の動物被験体である。

【0279】

特定の実施形態では、被験体は、動物の家畜種である。動物の家畜種は、次のいずれかに該当する：

- ー ヒトの生態的地位に適合した共生動物(例えば、イヌ、ネコ、モルモット)
- ー 食料のために求められまたは飼育されている餌動物または家畜(例えば、牛、羊、豚、ヤギ)；および
- ー 主としてドラフト目的の動物(例えば、ウマ、ラクダ、ロバ)

【0280】

家畜の例としては、アルパカ、アダックス、バイソン、ラクダ、カナリア、カピバラ、ネコ、ウシ(バリウシを含む)、ニワトリ、クビワペッカリー、シカ(ダマジカ、ニホンジカ、クチジロシカ、およびオジロシカを含む)、イヌ、ロバ、ハト(dove)、カモ、エランド、エルク、エミュー、フェレット、ガヤル、ヤギ、ガチョウ、ホロホロチョウ、モルモット、ネジツノカモシカ、ウマ、ラマ、ミンク、ムース、ネズミ、ラバ、ジャコウウシ、ダチョウ、オウム、ブタ、ハト(pigeon)、ウズラ、ウサギ、ラット(アフリカアシネズミを含む)、トナカイ、シロオリックス、ヒツジ、シチメンチョウ、シチメンチョウ、水牛、ヤク、およびコブウシが挙げられるが、これらに限定されない。

【0281】

動物／ヒト宿主または被験体の器官、構造および内部空間

本開示の組成物または多成分系が投与される器官は限定されない。器官の例としては、皮膚、および呼吸器系、泌尿生殖器系、心血管系、消化器系、内分泌系、排泄器系、リンパ系、免疫系、外皮系、筋肉系、神経系、生殖系、および骨格系の器官が挙げられる。

【0282】

心血管系の器官の例としては、心臓、肺、血液および血管が挙げられる。消化器系の例としては、唾液腺、食道、胃、肝臓、胆嚢、脾臓、腸、結腸、直腸および肛門が挙げられる。内分泌系の器官の例は、視床下部、下垂体、松果体または松果腺、甲状腺、副甲状腺および副腎、すなわち副腎(adrenal glands)を含む。排泄器系の器官の例としては、腎臓、尿管、膀胱および尿道が挙げられる。リンパ系の器官の例としては、リンパ液、リ

10

20

30

40

50

ンパ節および血管が挙げられる。免疫系の器官の例としては、扁桃腺、アデノイド、胸腺および脾臓が挙げられる。外皮系の器官の例としては、哺乳類の皮膚、毛髪および爪、ならびに魚、は虫類、および鳥類のうろこ、鳥類の羽が挙げられる。神経系の器官の例としては、脳、脊髄および神経が挙げられる。生殖系の器官の例としては、卵巣、卵管、子宮、外陰部、膣、精巣、精管、精嚢、前立腺および陰茎などの性器が挙げられる。骨格系の器官の例としては、骨、軟骨、靱帯および腱が挙げられる。

【0283】

ヒト被験体の空洞は、限定されるものではないが、口、鼻、耳、咽喉、呼吸器、肺、胃腸管、頭蓋腔または脊椎腔のような背側体腔、または胸腔、腹腔または骨盤腔のような腹側体腔を含む。鼻、口、気道および肺の投与経路は、本発明の特徴である。

【0284】

表面のin vitro抗菌治療

本開示の成分および組成物、ならびに本開示によるNO_x生成反応からの放出ガスは、in vitroで抗菌処理を適用するために使用されてもよい。「in vitro」とは、たとえそれが最終的に医療用途を意図しているとしても、治療される表面が生物ではないことを意味する。

【0285】

そのような有用性の例には、病原体の拡散を低減または防止するために、外科用器具、皮下注射針、および他の医療デバイスを使用前に滅菌するための方法、ならびに病院または診療所または他のどこかでの表面の洗浄または処置が含まれる。

【0286】

他の例は、人工器官、およびステント（例えば、冠状動脈ステント）、外科用スクリュー、ロッド、プレートおよびスプリント、整形外科用インプラント、心臓ペースメーカー、インスリン注入デバイス、カテーテル、オストミー器具、眼内レンズ、人工内耳、電氣的疼痛軽減インプラント、埋め込み型避妊具、神経刺激装置、人工心臓弁、電極、静脈内点滴および薬物送達デバイスなどの埋め込み型デバイスを、該デバイスを被験体の体内に配置する前に滅菌するための方法を含む。

【0287】

必要に応じて、本開示の成分または組成物は、人工器官または埋め込み型デバイスの表面上にコーティングされることができる。それによって、NO_x生成反応において放出されたNOは、他の組織または器官にかん流するか、または人工器官または埋め込み型デバイスの近傍において他の生理学的効果を発揮することができる。

【0288】

本開示の成分または組成物を含むコーティングなどの機能性コーティングの組み込みを含む、人工器官または埋め込み型デバイスの表面を生体適合性にするための技術は、当業者に周知である。例えば、Gultepe et al, Advanced Drug Delivery Reviews, 2010年3月8日、62(3)、305-315頁；ならびに米国特許第5702754号明細書および米国特許第6270788号明細書を参照されたい。その中で言及される刊行物のすべての開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0289】

無生物表面のより一般的な抗菌処理のための組成物および方法は、当技術分野で周知であり、本明細書での詳細な説明を必要としない。抗菌組成物は、例えば、ヘルスケア産業、食品サービス産業、肉加工産業、および個人消費者による民間セクターにおいて使用される。抗菌性クレンジング組成物は、典型的には水および／またはアルコール担体中に、1つ以上の活性抗菌剤またはその成分、界面活性剤、および1つ以上の他の成分、例えば、染料、香料、pH調整剤、増粘剤、皮膚調整剤などを含有する。広域スペクトル消毒剤または抗菌剤組成物は、表面上の一連の病原体の病原体量を減少させることを目的とする。典型的には、組成物は液体であり（または使用前に固体プレミックスから液体となるように構成され）、液体は任意の所望の濃度に調節後、適切には水の添加によって、処理されるべき表面上に、しばしば布または他の拭き取り装置の補助により、広げられるかまた

10

20

30

40

50

は噴霧され、次いで、乾燥させるために放置されてもよく、または拭き取られてもよい。従来の組成物および表面処理方法は、原則として本発明とともに使用されることで適用可能であり、活性抗菌剤は、本発明によるNO_x生成組成物またはその成分であるか、またはそれを含む。

【0290】

本発明に関連して使用され得る公知の抗菌性組成物および使用方法のさらなる詳解および例については、例えば、米国特許第6110908号明細書；米国特許第5776430号明細書；米国特許第5635462号明細書；米国特許第6107261号明細書；米国特許第6034133号明細書；米国特許第6136771号明細書；米国特許第8034844号明細書；欧州特許出願公開第0505935号明細書；および国際公開第98/01110号；国際公開第95/32705号；国際公開第95/09605号；および国際公開第98/55096号；を参照されたい。これらの内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0291】

ヒトおよび／または動物の幸福を改善するための使用

上述の医療用途に加えて、本開示は、ヒトまたは動物被験体における非治療的適用において使用されることができる。非治療的適用は、被験体が健康であるか、またはその適用が被験体の診断された疾患、障害、または状態を治療することを標的としないという点で、治療的適用と区別される。

【0292】

非治療的適用には、被験体の幸福または幸福感を改善すること、または被験体の代謝効率または免疫活性を高めることを目的とし、その結果、被験体が正常に機能し、または将来の感染と闘うことがより良好にできるようにする処置が含まれ得る。非治療的適用はまた、被験体の認知機能を補助するか、または信頼感および制御感を生じさせる処置を包含する。

【0293】

このような非治療的適用における使用のために、本開示の組み合わせおよび組成物は、医薬製剤と同様に、または非医薬的方法で製剤化されてもよい。医薬製剤に類似した製剤のさらなる詳細については、上記の「任意の追加成分」と題されたセクションを参照されたい。非医薬製剤は、適切には食品添加物、栄養補助食品製剤、食品、飲料および飲料添加物を含むことができる。食品および飲料に添加されるように適合された製剤は、適切には液体または粉末の形態であることができる。栄養補助製剤は、適切には錠剤、カプセルまたは経口摂取可能な液体の形態であることができる。

【0294】

上述の「治療または手術における使用」と題されたセクションで述べたように、本開示の内科的および／または外科的使用は、より高い幸福または自信の観点から、患者に二次的利益を提供することができる。

【0295】

植物用途

生きている植物または死んでいる植物に対する一酸化窒素の有益な効果が知られている。本開示は、方法、装置、組み合わせ、キット、組成物、使用、およびそこから放出されるガスの、生きている植物または死んでいる植物に有益な効果を提供するための適用を含む。

【0296】

植物における一酸化窒素および一酸化窒素生成システムの公知の使用の例には、以下のものが含まれる：

切り花および植物の萎れの一酸化窒素による予防または遅延（Siegel-Itzkovich、BMJ、1999年；319(7205)、274頁；Mur et al、2013年；“Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge”、AoB PLANTS doi:10.1093/aob/pla/pls052

10

20

30

40

50

(<https://doi.org/10.1093%2Faobpla%2Fpls052>)を参照されたい)；

植物と病原体の相互作用の一酸化窒素による調節、植物の過敏反応の促進、窒素固定根粒における生物との共生、側根および不定根と根毛の発生、ならびに気孔開口の制御 (Mur et al、2013年；上記参照)；

植物における抗酸化剤および活性酸素種応答における一酸化窒素の役割 (Verma et al、2013年；“Nitric oxide (NO) counteracts cadmium-induced cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species (ROS) in Brassica juncea: cross-talk between ROS, NO and antioxidant responses”；BioMetalsを参照されたい)；

オーキシン、サイトカイニンおよび他の植物ホルモンのシグナル伝達経路における一酸化窒素の役割 (Liu et al、Proceedings of National Academy of Sciences、2013年；110(4)、1548-1553頁を参照されたい)。

【0297】

上記で引用した刊行物の各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0298】

さらに、本開示の一酸化窒素生成システムおよびそれから放出されるガスの抗菌効果は、「治療または手術における使用」、「抗菌薬の局所使用」、「鼻、口、気道および肺への使用」および「抗菌薬使用の標的」と題されるセクションに特に記載されているが、これらに限定されず、植物の微生物感染の標的化に等しく適用可能であり、本開示はまた、このような使用にも及ぶ。

【0299】

植物における一酸化窒素および一酸化窒素生成システムの、上記の公知の使用および他のすべての使用は、本開示および／または一酸化窒素、任意選択で他の窒素酸化物および／または任意選択でそれによって生成されるそれらの前駆体を使用する一酸化窒素生成反応とともに使用される場合、本開示のさらなる態様を構成する。

【0300】

処理される植物は、特に作物または家庭用植物、すなわちヒトによって栽培される植物種であってもよい。

【0301】

作物には、穀物、野菜、果物などの食用作物、キニーネなどの薬学的に活性な成分のための作物、綿または亜麻などの繊維用作物、ゴムおよび木材などの他の材料のための作物、ならびにバラおよびチューリップなどの花のための作物が含まれるが、これらに限定されない。

【0302】

ヒトの食物消費のための作物のさらなる例としては、イネ、コムギ、サトウキビおよび他の糖類作物、トウモロコシ (maize) (トウモロコシ (corn))、大豆油、ジャガイモ、パーム油、キャッサバ、食用豆 (legume pulses)、ヒマワリ種子油、ナタネ油、マスタード油、ソルガム、キビ、落花生、豆、サツマイモ、バナナ、大豆、綿実油、ピーナッツ、落花生油、ヤムイモ、トマト、ブドウ、タマネギ、リンゴ、コーヒー、マンゴー、マングスチン、グアバ、チリ、コショウ、お茶、キュウリ、オレンジ、クルミ、アーモンド、ニンジン、カブ、ココナッツ、タンジェリン、レモン、ライム、イチゴ、およびヘーゼルナッツの作物を生産するための作物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0303】

実施例

以下の非限定的な実施例は、本発明のさらなる例示のために提供される。

【0304】

実施例1および2で使用した材料、装置および方法 溶液

0.1および1Mクエン酸 (Health Supplies Limited、Thornton Heath、UK)、0.1Mクエン酸ナトリウム (Fisher Scientific、Loughborough、UK)、1M亜硝酸ナトリウム (Sigma Aldrich、Dorset、UK)、0.5および1Mソルビトール (Special

10

20

30

40

50

Ingredients、Chesterfield、UK)、0.5および1M D-マンニトール (Sigma Aldrich、Dorset、UK)、3M水酸化ナトリウム (Fisher Scientific、Loughborough、UK)、および0.1および1M L-アスコルビン酸 (ICN、Biomedicals Inc、Oshio、US) は、適切な質量を脱イオン水に溶解することにより調製した。脱イオン水 (18.2 MΩ) は、Arium Mini lab water system (Sartorius、Germany) から入手した。

【0305】

クエン酸／クエン酸塩緩衝液を2つの方法によって調製した：

1. Sigma Aldrich、2018年(<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>) に記載された容量を用いて、0.1Mクエン酸および0.1Mクエン酸ナトリウムの原液を滴下する；

10

2. 0.1Mまたは1M調製用の既知の質量のクエン酸を少量の脱イオン水に溶解し、次いで3M水酸化ナトリウムおよび脱イオン水の原液を滴下して、所望の緩衝溶液pH (pH3～pH6.2) を達成する。

【0306】

アスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液を、方法1では、クエン酸およびクエン酸ナトリウムの代わりにアスコルビン酸およびアスコルビン酸ナトリウムを用いて同様に調製した。

【0307】

ポリオール含有は、既知の質量の亜硝酸ナトリウムをポリオールの原液 (例えば、ソルビトールまたはマンニトール) で溶解することによって達成された。

20

【0308】

緩衝溶液および原液の成分の添加順序は重要ではなく、任意の混合順序を使用することができる。

【0309】

すべての標準溶液を調製から48時間以内に使用した。校正緩衝液は、脱イオン水に溶解したフタル酸塩 (pH4) およびリン酸塩 (pH7) の錠剤 (Fisher Scientific UK Ltd、Leicestershire、UK) を用いて調製された。

【0310】

選択イオンフローチューブ質量分析 (SIFT-MS) のスタートアップおよび検証

30

Voice200選択イオンフローチューブ質量分析(SIFT-MS)(Syft Technologies Ltd、New Zealand)を、本報告書に記載されるすべてのガス分析に使用した。この装置は、キャリアガスとしてヘリウム (BOC、Surrey、UK) を使用する。

【0311】

分析の前に、SIFT-MSは、簡単なスタートアップ手順で使用できるように準備された。装置を待機モードから解除され、毛細管現象が動作の許容範囲内にあることを確認するために、一連の圧力チェックを行った。その後、ベンゼン、トルエン、エチルベンゼン、およびキシレンを含有する製造業者の校正ガス標準(Syft Technologies Ltd、New Zealand)を用いて、自動検証手順を行った。最後に、10ppmの二酸化窒素標準(Air Products PLC、Surrey、UK) を用いて、社内の性能チェックを行った。

40

【0312】

NO生成の手順

SIFT-MS装置、反応チャンバーおよびガス経路を、図17に示すように設定した。

【0313】

反応チャンバー内の温度を、HT1温度スマートセンサー (SensorPush、New York、US) を用いて連続的にモニターした。反応チャンバー、シリコンシール付きの670mLプラスチック (ビスフェノールAフリー (BPAフリー)) クリップロックタブ (Tesco、Welwyn Garden City、UK) をポンプに取り付け、湿った空気をチャンバー内およびSIFT-MS入口キャピラリー上で連続的に循環させた。加湿は、Vernon、W.、およびWhitby、L.、1931年、The quantitative humidification of air in laboratory exper

50

iments、Trans. Faraday Soc. 27、248-255頁に記載されていると同様の方法で、脱イオン水を含有する2つのDreschelボトルを通して空気をポンプ輸送することによって達成した。このシステムを、使用前に30分間均等化させた。NO、NO₂およびHONOのリアルタイム検知および定量化のために、連続的なSIFT-MSスキャンを開始した。これらの化合物について安定したベースライン読み取り値(>2分間の一定濃度)が観察されたら、サンプルを反応チャンバーに入れ、3時間モニターした。

【0314】

SIFT-MSの検証後、120℃に加熱された毛細管入口延長部を、T接合部を介して反応チャンバーの出口に取り付け、SIFT-MSが反応チャンバーから流出するガスをリアルタイムでサンプリングすることを可能にした。

【0315】

サンプルは、RKW-Group (Frankenthal, Germany) 製の約0.3 cm×0.3 cmのカーデッド不織布20グラム/平方メートル(20 gsm)ポリプロピレンメッシュを秤量ボート(〜3 mg)中で秤量することによって調製した。これを、10 μLの試験溶液またはコントロール溶液の液滴をメッシュの中心に添加した後に再秤量した(液滴がメッシュに浸漬されることを確実にした)。最後に、秤量ボート内の装填されたメッシュを反応チャンバー内に配置し、緩衝溶液の最終的な10 μLの液滴をメッシュの中心にピペットで移した。反応チャンバーを迅速に密封し、SIFT-MS界面で窒素種の生成を瞬時に観察した。

【0316】

発生ガスの解析

生成されたガスを、SIFT-MSの選択されたイオンモードを使用して分析し、スキャンをそれぞれ1000秒間続く連続バッチで行った。次の生成物の質量を繰り返しスキャンした：亜硝酸については30 m/z、亜硝酸については48 m/z、二酸化窒素については46 m/z、および一酸化窒素については30 m/z。これらの測定は、ヒドロニウム(H₃O⁺)、ニトロシウム(NO⁺)、およびジオキシゲニル(O₂⁺)の3種のカチオン前駆体を用いて行なった。空気は660 ml/分でチャンバーを通じて流れ、SIFT-MS入口は2.7 ml/分の流速でこの空気流をサンプリングした。

【0317】

すべての実施例におけるpH測定

ガラス電極、LE438プローブを有する5つの簡易pHメーター(Mettler Toledo, Switzerland)を、すべてのpH測定に使用した。この電極の精度は、第2のpHメーター、ハンドヘルド205プローブ(Testo, Alton, US)を用いて保証した。新鮮な校正緩衝液を、pHメーターの毎日の校正のために使用した。

【0318】

実施例1

1 Mポリオールを含むおよび含まない、斜方晶系1 M亜硝酸ナトリウムを含有するメッシュと接触させる、1 M/c、pH 3のクエン酸を用いた一酸化窒素の生成

SIFT-MS装置、反応チャンバー、およびガス経路は、上述のように、図17に示すように設定した。

【0319】

1 Mマンニトールおよび1 Mソルビトールをそれぞれ含有する1 M亜硝酸ナトリウムの2つの試験溶液を、上記のようにメッシュに吸収させて、2つの試験メッシュを作製した。

【0320】

ポリオールを含まない1 M亜硝酸ナトリウムのコントロール溶液を、上記のようにメッシュに吸収させてコントロールメッシュを作製した。

【0321】

上記の2つの方法1および2のいずれかによって調製され、約3のpHを有する1 Mクエン酸/クエン酸塩緩衝液の緩衝溶液を、各試験における試験メッシュおよびコントロールメッシュにそれぞれ添加して、上記のようにガス生成を開始した。

10

20

30

40

50

【0322】

その結果を表1に示す。

【0323】

データは、1 M/c. pH 3 のクエン酸と接触させた 1 M 亜硝酸ナトリウム吸収メッシュは、メッシュに 1 M マンニトールまたは 1 M ソルビトールが含まれている場合（マンニトールはソルビトールよりも大きな効果を有する）、ポリオールが存在しない場合よりも著しく大量の一酸化窒素を生成したことを示す。

【0324】

実施例 2

一酸化窒素の生成に及ぼす種々のカルボン酸、酸濃度、pH およびポリオールの効果に関する研究

有機酸、pH およびポリオールを以下のように変化させて、試料を上記のように調製した：

【0325】

10

20

30

40

50

【表 1】

実験	各試験の実施においてメッシュに吸収された試験溶液	コントロールの実施でメッシュに吸収されたコントロール溶液	メッシュへの緩衝液の添加（ここで、代替緩衝液は関連する図中に報告されるように、別々の実施において使用されることが示される）
A（図 2）	1 M 亜硝酸ナトリウム	-	1 M クエン酸／クエン酸塩（pH 約 3） 1 M アスコルビン酸／アスコルビン酸塩（pH 約 3）
B（図 3）	1 M ソルビトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 1 M マンニトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 1 M キシリトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 1 M アラビトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム	1 M 亜硝酸ナトリウム	1 M クエン酸／クエン酸塩（pH 約 3）
C（図 4）	1 M ソルビトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 1 M マンニトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 1 M キシリトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 1 M アラビトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム	1 M 亜硝酸ナトリウム	1 M アスコルビン酸／アスコルビン酸塩（pH 約 3）
D（図 5）	0.5 M ソルビトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 0.5 M マンニトール	-	1 M クエン酸／クエン酸塩（pH 約 3）

10

20

30

40

50

	ルを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 0.5 M キシリトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 0.5 M アラビトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム		
E (図 6)	0.5 M ソルビトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 0.5 M マンニトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 0.5 M キシリトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 0.5 M アラビトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム	-	1 M アスコルビン酸 / アスコルビン酸塩 (pH 約 3)
F (図 7)	1 M アラビトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム	-	0.5 M クエン酸 / クエン酸塩 (pH 約 3) 0.5 M アスコルビン酸 / アスコルビン酸塩 (pH 約 3)
G (図 8)	1 M マンニトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム	-	0.5 M クエン酸 / クエン酸塩 (pH 約 3) 0.5 M アスコルビン酸 / アスコルビン酸塩 (pH 約 3)
H (図 9)	1 M ソルビトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 1 M マンニトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム 1 M キシリトールを含む 1 M 亜硝酸ナトリウム	1 M 亜硝酸ナトリウム	1 M クエン酸 / クエン酸塩 (pH 約 3) 1 M アスコルビン酸 / アスコルビン酸塩 (pH 約 3)

10

20

30

40

50

	1 Mアラビトールを含む1 M亜硝酸ナトリウム		
I (図10)	0.5 Mソルビトールを含む1 M亜硝酸ナトリウム 0.5 Mマンニトールを含む1 M亜硝酸ナトリウム 0.5 Mキシリトールを含む1 M亜硝酸ナトリウム 0.5 Mアラビトールを含む1 M亜硝酸ナトリウム	—	1 Mクエン酸／クエン酸塩 (pH約3) 1 Mアスコルビン酸／アスコルビン酸塩 (pH約3)
J (図11)	0.5 Mマンニトールを含む1 M亜硝酸ナトリウム	1 M亜硝酸ナトリウム	0.5 Mクエン酸／クエン酸塩 (pH約3)
K (図12)	0.5 Mマンニトールを含む1 M亜硝酸ナトリウム	1 M亜硝酸ナトリウム	0.5 Mクエン酸／クエン酸塩 (pH約4.8)
L (図13)	0.5 Mマンニトールを含む1 M亜硝酸ナトリウム	1 M亜硝酸ナトリウム	0.5 Mクエン酸／クエン酸塩 (pH約6.2)
M (図14)	1 Mグリセロールを含む1 M亜硝酸ナトリウム 2 Mグリセロールを含む1 M亜硝酸ナトリウム	1 M亜硝酸ナトリウム	1 Mクエン酸／クエン酸塩 (pH約2)
N (図15)	1 Mマンニトールを含む1 M亜硝酸ナトリウム 1 Mソルビトールを含む1 M亜硝酸ナトリウム 1 Mマンニトールおよび1 Mグリセロールを含む1 M亜硝酸ナトリウム 1 Mソルビトールおよび1 Mグリセ	1 M亜硝酸ナトリウム	1 Mクエン酸／クエン酸塩 (pH約2)

	ロールを含む1 M亜硝酸ナトリウム		
O (図16)	0.5 Mマンニトールを含む1 M亜硝酸ナトリウム	1 M亜硝酸ナトリウム	1 Mクエン酸／クエン酸塩 (pH 5.8)

SIFT-MS装置、反応チャンバー、およびガス経路は、上述のように、図17に示すように設定した。

【0327】

上記の試験溶液を上記のようにメッシュに吸収させて、試験メッシュを作製した。

【0328】

使用する場合、ポリオールを含まない1M亜硝酸ナトリウムのコントロール溶液を上記のようにメッシュに吸収させてコントロールメッシュを作製した。

【0329】

上記の2つの方法1および2のいずれかによって調製され、上記のpHを有する上記の緩衝溶液または各緩衝溶液を、各試験で添加し、使用される場合、各試験においてコントロールメッシュを添加して、上記のガスの生成を開始した。

【0330】

その結果を図2～図13に示す。図中の「通常(normal)」とは、ポリオールが存在しないことを示す。

【0331】

図2は、ポリオールの非存在下でクエン酸／クエン酸塩緩衝液またはアスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液(pH約3)によって生成されるNO放出速度を比較する。グラフは、クエン酸／クエン酸塩緩衝液がより高い初期バーストを生成し、放出がアスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液よりも高いレベルでより長く持続することを明確に示している。クエン酸／クエン酸塩緩衝液は約55000ppbにピークを示すが、アスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液は約28000ppbにピークを示す。

【0332】

図3は、ポリオールを含むおよび含まないクエン酸／クエン酸塩緩衝液および亜硝酸塩系に関する。ポリオール濃度は1Mである。ポリオールの存在下では、ポリオールが存在しない場合と比較して、放出速度、初期バースト、およびその結果としての経時的放出が変化する。キシリトールおよびマンニトールが最も高いピークを生成し、次にソルビトール、ポリオールなし、アラビトールが続く。500～1000秒の領域では、キシリトールおよびアラビトールが最も高い出力を有し、次にマンニトール、ソルビトール、ポリオールなしが続く。バーストのピーク；マンニトール＝キシリトール(約64000ppb)>ソルビトール(約53000ppb)>ポリオールなし(約50000ppb)>アラビトール(約40000ppb)。

【0333】

図4は、ポリオールを含むおよび含まない場合の、アスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液および亜硝酸塩系に関する。ポリオール濃度は1Mである。バーストのピーク；マンニトール(約40000ppb)>アラビトール(約35000ppb)>キシリトール＝ポリオールなし(約30000ppb)>ソルビトール(約23000ppb)、すなわち図3のクエン酸／クエン酸塩緩衝系とは異なる順列となっている。

【0334】

図5は、ポリオールを含むおよび含まない場合の、クエン酸／クエン酸塩緩衝液および亜硝酸塩系に関する(マンニトールの線とほぼ同じバーストのピークを有する「ポリオールなし」の線は、明確にするために省略されている)。ポリオール濃度は0.5Mである。バーストのピーク；アラビトール(約76000ppb)>ポリオールなし＝マンニトール(約48000ppb)>キシリトール＝ソルビトール(約40000ppb)。これは、類似の1Mポリオール・クエン酸／クエン酸塩緩衝系(図3)と比較して異なる順列であり、ポリオール効果がポリオール濃度依存性であることを示していることが分かるであろう。

【0335】

図6は、ポリオールを含むおよび含まない場合の、アスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液および亜硝酸塩系に関する(ソルビトールの線とほぼ同じバーストのピークを有する「ポリオールなし」の線は、明確にするために省略されている)。ポリオール濃度は0

10

20

30

40

50

・5 Mである。バーストのピーク；キシリトール（約50000 ppb）＞マンニトール（約38000 ppb）＞ソルビトール＝ポリオールなし（約30000 ppb）＞アラビトール（約23000 ppb）。類似のクエン酸／クエン酸塩緩衝液（0.5 Mポリオール）およびアスコルビン酸／アスコルビン酸塩（1 Mポリオール）系と比較して、再び異なる順列が観察される（それぞれ図5および図4）。したがって、ポリオールの効果は、ポリオール化学／立体化学およびポリオールモル濃度依存性であることが実証される。

【0336】

図7および図8は、クエン酸／クエン酸塩緩衝液またはアスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液およびポリオール（0.5 M）の存在によるNO放出速度を比較する。これらのグラフは、図2～図6で観察された違いのいくつかを強調している。図7のクエン酸／クエン酸塩緩衝液は約76000 ppbでピークに達するが、アスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液は約22000 ppbでピークに達する。図8のクエン酸／クエン酸塩緩衝液は約48000 ppbでピークに達するが、アスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液は約38000 ppbでピークに達する。

【0337】

図9は、1 Mポリオール濃度についての累積出力を比較する。アスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液の場合、例えば3000秒での差は小さく、マンニトール＞ソルビトール＝アラビトール＞キシリトールの順である。3000秒でのクエン酸／クエン酸塩緩衝液では、キシリトール＞アラビトール＞マンニトール＞ソルビトール＞ポリオールなしの順である。データは、一酸化窒素の出力が例えば、ポリオールなし（3000秒後に亜硝酸塩1 mg 当たり約10000 nmolの累積一酸化窒素の発生を得る曲線E、これは、さらに上昇している）とキシリトール（同じ時間後に亜硝酸塩1 mg 当たり約20000 nmolの累積一酸化窒素の発生を得る曲線A、これもまた上昇している）との間のように、約100%まで、またはそれ以上増加させることができることを示している。

【0338】

図10は、0.5 Mポリオール濃度についての累積出力を比較する。3000秒でのクエン酸／クエン酸塩緩衝液については、アラビトール＞マンニトール＝キシリトール＞ソルビトール＞ポリオールなしの順列である（ソルビトールの線より下にあるクエン酸／クエン酸塩緩衝液についての「ポリオールなし」の線は、明確にするために省略されている）。3000秒でのアスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液では、キシリトール＞マンニトール＞ソルビトール＞アラビトールの順列である。再び、この順列は、1 Mポリオールと比較して異なっている（図9）。

【0339】

図11～図13は、1 Mクエン酸／クエン酸塩緩衝液および亜硝酸ナトリウム（1 M）、マンニトール（0.5 M）および異なるpHでの累積プロットを比較する。pHが上昇するにつれて、差はより小さくなり、pH 6.2では、差は消失した。従って、これらの実験から、ポリオールの効果もpH依存性であることが分かる。

【0340】

図14は、1 M亜硝酸ナトリウム溶液中に存在するグリセロール（1 Mおよび2 M）を含むおよび含まない場合の、クエン酸／クエン酸塩緩衝液（1 M、pH約2）についての累積NO（nmol/cm²メッシュ面積）出力を示す。最初の2000秒にわたって、1 Mおよび2 MグリセロールのNO出力は、ポリオールなしの場合よりもわずかに低い。より長時間では、グリセロール含有製剤は、より大きな出力を有し、2 Mグリセロールはより大きな出力を有する。

【0341】

図15は、亜硝酸塩溶液中のポリオールを含むおよび含まない場合の、クエン酸／クエン酸塩緩衝液（1 M、pH約2）および1 M亜硝酸ナトリウム溶液についての累積NO（nmol/cm²メッシュ面積）出力を示す。プロットは、マンニトール／亜硝酸塩溶液中にグリセロールを含有させると、グリセロールが存在しない場合と比較して出力が減少することを示している。しかしながら、驚くべきことに、マンニトールの場合とは異なり、ソ

ルビトール／亜硝酸塩溶液中にグリセロールを含有させると、グリセロールが存在しない場合の出力と比較してNO出力が増大する。

【0342】

グリセロールを使用した場合、最初に1Mグリセロール溶液を調製し、1Mソルビトールまたは1Mマンニトール溶液を調製するために使用し、次いで1M亜硝酸塩溶液を調製するために使用した。

【0343】

図16は、亜硝酸ナトリウム（1M）溶液中に存在するマンニトール（0.5M）を含むおよび含まない場合の、クエン酸／クエン酸塩緩衝液（1M、pH5.8）についての累積NO出力（mol/mg亜硝酸塩）を示す。プロットは、ポリオール含有が約2000秒の反応時間後に、より大きなNO出力を生じることを示している。

【0344】

図16は、約5を超える、特に約5.5を超える生理学的に重要なpHレベルにおいて、マンニトールはマンニトールを含まない同様の系と比較して一酸化窒素の生成を増強し、10000秒（167分）後に亜硝酸塩1mg当たり1400nmolのNOの累積レベルを提供することを示している。

【0345】

実施例3

ポリオールを含むおよび含まない種々の有機酸および亜硝酸塩溶液を用いたM.abscessus培地に対する活性

材料

4.7gのミドルブルック7H9ブロスベース（Sigma-Aldrich）を900mlの蒸留水でもどし、121℃で15分間オートクレーブした。ミドルブルックADC成長サプリメント（Sigma-Aldrich）をオートクレーブ処理した7H9溶液に添加した（450ml当たり50ml、合計100mlを添加）。

【0346】

1M亜硝酸ナトリウム（Emsure）：清浄なスクリュートップガラス瓶中で、6.9gの亜硝酸ナトリウム粉末を100mlの蒸留水に溶解する。混合物を121℃で15分間オートクレーブする。

【0347】

1Mクエン酸（Sigma-Aldrich）：清浄なスクリュートップガラス瓶中で、19.2gのクエン酸粉末を100mlの蒸留水に溶解する。混合物を121℃で15分間オートクレーブする。

【0348】

1Mアスコルビン酸（Sigma-Aldrich）：17.6gのアスコルビン酸粉末を滅菌ガラス瓶に添加する。滅菌した蒸留水100mlに完全に溶解する。それは、その短い半減期のために、厳密な滅菌技術を用いて毎日調製された。それは、その固有の不安定性のためにオートクレーブ処理されなかったが、使用前に0.2μmフィルターを通して濾過された。

【0349】

1Mクエン酸ナトリウム三塩基性二水和物（Sigma-Aldrich）：清浄なスクリュートップガラス瓶中で、29.4gのクエン酸ナトリウム粉末を100mlの蒸留水に溶解する。混合物を121℃で15分間オートクレーブする。

【0350】

1M L-アスコルビン酸ナトリウム塩（Acros Organics）：清浄なスクリュートップガラス瓶中で、19.8gのアスコルビン酸ナトリウム粉末を100mlの蒸留水に溶解する。混合物を121℃で15分間オートクレーブする。

【0351】

ポリオールを用いた実験のために、D-マンニトール（Sigma-Aldrich）を使用した。ポリオールを上記亜硝酸ナトリウム原液に添加して、以下の原液を調製した：

原液A-1M亜硝酸ナトリウムおよび0.5Mマンニトール

10

20

30

40

50

原液 B-1. 5 M 亜硝酸ナトリウムおよび 0.5 M マンニトール

【0352】

1. 5 M クエン酸の原液も調製した。

【0353】

各成分のモル濃度は、各実験溶液の正確な最終モル濃度を確実にするために希釈因子について調整した。

【0354】

Mycobacterium abscessus (MAB)

実験室リファレンス株である *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977lux を、この実施例におけるすべての実験条件に使用した。

【0355】

方法

50 ml のファルコン管に、チューブ T (試験懸濁液)、チューブ A (酸コントロール)、チューブ C (コントロール) のラベルを付けた。

【0356】

8 ml の 7H9 + ADC サプリメントを各チューブに添加した。次いで、100 μ l の (予め約 3~4 のマクファーランド標準まで成長させた) MAB 懸濁液を添加した。MAB 懸濁液のベースライン相対発光量 (RLU) の読み取りを行った。内容物をボルテックスにより混合した。

【0357】

ポリオール (マンニトール) が存在しない場合のチューブ内容物

チューブ T: 1 ml の亜硝酸ナトリウム (1 M) 溶液をチューブに加え、直ちに 1 ml のクエン酸溶液 (1 M) またはアスコルビン酸溶液 (1 M) を加えて、10 ml 中 0.1 M の最終濃度を得た。内容物を穏やかに反転させて混合し、37°C で 24 時間インキュベートした。

チューブ A: 1 ml のクエン酸溶液 (1 M) またはアスコルビン酸溶液 (1 M) をチューブに加え、滅菌蒸留水 1 ml を加えて最終容量を 10 ml とし、酸に対する 0.1 M 濃度を試験した。内容物を穏やかに反転させて混合し、37°C で 24 時間インキュベートした。

チューブ C: 2 ml の滅菌蒸留水をチューブに加え、総容量を 10 ml とした。これは、最適条件下での増殖を評価するためのコントロールである。内容物を穏やかに反転させて混合し、37°C で 24 時間インキュベートした。

【0358】

ポリオール (マンニトール) が存在する場合のチューブ T の内容物

マンニトールが存在する場合、管 T の内容物は以下の通りであった:

1. チューブ T: 1 ml の亜硝酸ナトリウム (1 M) + マンニトール (0.5 M) および 1 ml のクエン酸 (1 M)

2. チューブ T: 1 ml の亜硝酸ナトリウム (1.5 M) + マンニトール (0.5 M) および 1 ml のクエン酸 (1 M)

3. チューブ T: 1 ml の亜硝酸ナトリウム (1 M) + マンニトール (0.5 M) および 1 ml のクエン酸 (1.5 M)

【0359】

RLU を 30 分、60 分および 24 時間のインキュベーションで測定して、T、A および C 溶液の活性を評価した。

【0360】

24 時間のインキュベーション後、チューブ C、チューブ A およびチューブ T をコロニビア血液寒天 (VWR Chemicals) 上にプレーティングした。プレート を 37°C で 72 時間インキュベートした。コロニー形成単位 (CFU) を、インキュベーションの 3、5 および 7 日目に読み取った。全ての作業は、CL2 実験室施設内の CL2 生物学的安全キャビネットの中で行われた。

【0361】

10

20

30

40

50

その結果を図18～図21に示す。

【0362】

図18は、0.1Mクエン酸および0.1M亜硝酸塩の溶液（チューブT）が、pH値6.0、6.5、7.0および7.4の0.1Mクエン酸のみの溶液（チューブA）と比較して、pH5および5.5の7日後にM.abscessusの培養を撲滅し、M.abscessusの培養を減少させるのに有効であることを示している。また、図18は、0.1Mアスコルビン酸および0.1M亜硝酸塩の溶液（チューブT）が、pH値6.5、7.0および7.4でアスコルビン酸のみの溶液（チューブA）と比較して、pH値5.0、5.5および6.0で7日後にM.abscessusの培養を撲滅し、M.abscessusの培養を減少させるのに有効であることを示している。

10

【0363】

図19a)は、0.1Mクエン酸および0.1M亜硝酸塩の溶液が、3日間のインキュベーション後にM.abscessusの培養物のCFUを減少させるのに有効であり、0.05Mマンニトールを含む0.1Mクエン酸および0.1M亜硝酸塩の溶液が、3日間のインキュベーション後にM.abscessusの培養をほぼ完全に撲滅するのに有効であることを示している。図19b)は、マンニトールを含まない0.1Mクエン酸および0.1M亜硝酸塩の溶液が、5日間のインキュベーション後にM.abscessusの減少したCFUを維持するのに有効であることを示している。また、この図は、0.05Mマンニトールを含む0.1Mクエン酸および0.1M亜硝酸塩の溶液が、5日間のインキュベーション後のM.abscessusのCFUを減少させるのに有効であることを示す。

20

【0364】

図20a)は、0.15Mクエン酸および0.1M亜硝酸塩の溶液が、3日間のインキュベーション後にM.abscessusの培養物のCFUを減少させるのに有効であり、0.05Mマンニトールを含む0.15Mクエン酸および0.1M亜硝酸塩の溶液が、3日間のインキュベーション後にM.abscessusの培養物を撲滅するのに有効であることを示している。図20b)は、マンニトールを含まない0.15Mクエン酸および0.1M亜硝酸塩の溶液が、5日間のインキュベーション後にM.abscessusの減少したCFUを維持するのに有効であることを示している。また、この図は、0.05Mマンニトールを含む0.15Mクエン酸および0.1M亜硝酸塩の溶液が、5日間のインキュベーション後にM.abscessusの培養物を撲滅するのに有効であることを示している。

30

【0365】

図21は、0.1Mクエン酸および0.15M亜硝酸塩の溶液が、3日間のインキュベーション後にM.abscessusの培養物のCFUを減少させ、5日間のインキュベーション後にM.abscessusの培養物のCFUの減少を維持するのに有効であることを示している。また、この図は、0.05Mマンニトールを含む0.1Mクエン酸および0.15M亜硝酸塩の溶液が、インキュベーションの3日および5日後にM.abscessusの培養物を撲滅するのに有効であることを示している。

【0366】

実施例4

一連の臨床分離株培養物におけるMycobacterium abscessus (Mabs)およびMycobacterium tuberculosis(Mtb)に対するカルボン酸-亜硝酸塩-ポリオール溶液の最小発育阻止濃度(MIC)

40

健常ボランティア

末梢血試料は、書面によるインフォームドコンセント（倫理承認参照REC No.12/WA/148）を提供した健常ボランティアから採取した。

【0367】

マイコバクテリア株

Mycobacterium abscessus (ATCC 19977) およびMycobacterium tuberculosis(H37RV)株の両方は、相対発光量(RLU)の測定を可能にする細菌ルシフェラーゼ(L

50

u x) 遺伝子カセット (l u x C D A B E)、ならびに細菌生存の従来のコロニー形成単位 (C F U) 測定を含んだ。

【 0 3 6 8 】

【表 2】

一般試薬

	参照記号	供給業者
2 4 ウェル細胞培養クラスター	3526	Costar Corning 社、米国
C D 1 4 マイクロビーズ、ヒト	130-150-201	Miltenyi Biotec 社、英国
クエン酸	791725	Sigma 社、英国
コロンビア血液寒天プレート	100253ZF	vWR 社、英国
デカナール	D7384	Sigma 社、英国
ダルベッコ改変イーグル培地－高グルコース	D6429	Sigma 社、英国
FLUOstar Omega		BMG Labtech 社、英国
ウシ胎児血清	P30-3702	Pan-Biotech 社、英国
GloMax-96 ルミノメーター		Promega 社、英国
マンニトール	M4125	Sigma 社、英国
ミドルブルック 7 H 1 1 寒天プレート	PP4080	E&O Labs 社、英国
ミドルブルック 7 H 9 プロス	M0178	Sigma 社、英国
<i>Mycobacterium abscessus</i>	19977	ATCC
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	H37RV	ATCC
ペニシリンストレプトマイシン	P0781	Sigma 社、英国
組換えヒト G M－C S F	300-03	PeproTech EC 社、英国
組換えヒト I F N γ	300-02	PeproTech EC 社、英国
亜硝酸ナトリウム	1.06549.0500	Merck 社、独国

【 0 3 6 9 】

処置条件

処置 1：クエン酸 0.15 M、亜硝酸ナトリウム 0.1 M および マンニトール 0.05 M

処置 2：クエン酸 0.1 M、亜硝酸ナトリウム 0.15 M および マンニトール 0.05 M

【 0 3 7 0 】

微量液体希釈法最小発育阻止濃度 (M I C)

M. abscessus および M. tuberculosis に対する各処置の M I C は、抗菌薬感受性試験のための臨床検査標準協会が作成したガイドライン (M07-A9) に従って行った。各処置の倍数希釈をプレート全体で行い、プレートを 37℃ でインキュベートし、M a b については 3 日目および 7 日目、M t b については 14 日目および 21 日目に読み取った。試験は

、二重に行った。

【0371】

全ての作業は、CL2実験室施設内のCL2生物学的安全キャビネットで行った。

【0372】

M.abscessusに対する1.5 Mクエン酸、1 M亜硝酸ナトリウムおよび0.5 Mマンニトール溶液の最小発育阻止濃度は、4.7 mMであることがわかった。さらに、M.tuberculosisに対する1.5 Mクエン酸、1 M亜硝酸ナトリウムおよび0.5 Mマンニトール溶液の最小発育阻止濃度は、2.3 mMであることがわかった。

【0373】

M.abscessusに対する1 Mクエン酸、1.5 M亜硝酸ナトリウムおよび0.5 Mマンニトール溶液の最小発育阻止濃度は、3.1 mMであることがわかった。さらに、M.tuberculosisに対する1 Mクエン酸、1.5 M亜硝酸ナトリウムおよび0.5 Mマンニトール溶液の最小発育阻止濃度は、1.6 mMであることがわかった。

【0374】

最小発育阻止濃度 (MIC) は、英国ケンブリッジ大学のフロート研究所(<https://www.flotolab.com/>) のM.abscessus臨床分離株ライブラリーから入手した分離株No. 570、571、573、575、578、579、580、581、582、583、584、585、589、591、592、593、594、595、596、597、598、599、600、601、602、603、604、605、606、607、608、616、617、619、812、825、829、839、845、848、853、857、858、873、894、898、909、919、928、932、942、944、955、956、959、963、964、965、968、975、980、982、985、993、995、1000、1001、1007、1011、1017、1023、1024、1026、1027、1042、1043、1045、1047、1049、1054、1063、1066、1067、1070、1072、1073、1074、1075、1076、1077、1078、1079、1082、1086、1094、1096、1101、1103、1104および1106を用いた微量液体希釈によっても実施した。各個々の分離株を二重に評価した。

【0375】

臨床分離株の試験結果を図22a)、b)に示す。これらのグラフは、分離株のインキュベーションの3、4および5日後に得られた読み取り値を用いて、M.abscessusに対する一酸化窒素のMICを二重に示したものである。プレートはインキュベーションの7日目にも読み取ったが、5日目と比較して差は見られなかった。実験室株ATCC 19977 luxを両方の実験においてコントロールとして使用し、臨床分離株との比較結果を示している。

【0376】

図22は、クエン酸-亜硝酸塩-マンニトール溶液が広範囲の臨床分離株にわたって効果を有することを示している。臨床分離株の大部分についての最小発育阻止濃度は、0.1 Mクエン酸、0.15 M亜硝酸塩および0.05 Mマンニトール溶液について0.02 M以内であり(図22a)、臨床分離株の大部分についての最小発育阻止濃度は、0.15 Mクエン酸、0.1 M亜硝酸塩および0.05 Mマンニトール溶液について0.04 M以内であった(図22b)。

【0377】

両方の図において、特定のサンプルのMICは、異なる日で異なった。これらは、分離サンプルの識別コードの上に複数のドットが表示されているサンプルである。一般的に言えば、この状況では、より低いMICよりもインキュベーションの遅い日より高いMICが観察された。全体として、低クエン酸(0.1 M)と高亜硝酸ナトリウム(0.15 M)との組み合わせ(図22(a))は、高クエン酸(0.15 M)と低亜硝酸ナトリウム(0.1 M)との組み合わせ(図22(b))よりも効果的である。

【0378】

カルボン酸-亜硝酸-ポリオール溶液によるin vitroでのM.abscessusの殺菌を示す追

加データを図 29 に示す。この図では、亜硝酸ナトリウム、水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 5.8 に緩衝化したクエン酸、およびマンニトールの水性製剤の *M. abscessus* 殺菌有効性を、類似の条件下で 24 時間にわたるアミカシンおよび陰性コントロールと比較して示している。

【0379】

実施例 5

ポリオールを含むおよび含まないカルボン酸－亜硝酸塩溶液の *Pseudomonas aeruginosa* に対する抗菌活性

装置および培地

UKAS 校正済みピペット (100～1000 μ L 範囲) – Proline(登録商標) Plus

UKAS 校正済みマルチチャンネルピペット (P300 および P20) – Gilson(登録商標)、英国
ユニバーサルチューブ – SLS 社、英国

校正済み天びん – HR-100A

微生物インキュベーター – Heratherm™、ThermoFisher Scientific 社、英国

トリプトンソイ寒天 (TSA) – Southern Group Laboratories 社、英国

トリプトンソイブイヨン (TSB) – Acumedia(登録商標)、SLS 社、英国

麦芽寒天 – Acumedia(登録商標)、Acumedia(登録商標)、SLS 社、英国

ブレインハートインフュージョンブイヨン (BHIB) – Acumedia(登録商標)、SLS 社、英国

サブローデキストロースブイヨン (SDB) – Acumedia(登録商標)、SLS 社、英国

Dey-Engley 中和剤 (DE-N) – Acumedia(登録商標)、SLS 社、英国

クエン酸 – Sigma 社、英国

亜硝酸ナトリウム – Sigma 社、英国

マンニトール – Sigma 社、英国

ソルビトール – Sigma 社、英国

【0380】

微生物試験

嚢胞性線維症患者から分離された *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 13618

【0381】

【表 3】

製剤

製剤 1	液体	クエン酸 pH 5.2	亜硝酸ナトリウム
製剤 2	液体	クエン酸 pH 6.0	亜硝酸ナトリウム
製剤 3	液体	クエン酸 pH 5.2	亜硝酸ナトリウムとマンニトール
製剤 4	液体	クエン酸 pH 6.0	亜硝酸ナトリウムとマンニトール
製剤 5	液体	クエン酸 pH 5.2	亜硝酸ナトリウムとソルビトール
製剤 6	液体	クエン酸 pH 6.0	亜硝酸ナトリウムとソルビトール
陽性コントロール	液体	N/A	N/A
陰性コントロール	液体	N/A	N/A

濃度 1 – 1 M クエン酸 + 1 M 亜硝酸ナトリウム (0.5 M ポリオールありまたはなし)

濃度 2 – 0.5 M クエン酸 + 1 M 亜硝酸ナトリウム (0.5 M ポリオールありまたはなし)

濃度 3 – 0.5 M クエン酸 + 0.5 M 亜硝酸ナトリウム (0.5 M ポリオールありまたは

なし)

【0382】

Dey-Engley中和剤検証

*Pseudomonas aeruginosa*の24時間培養物をトリプトンソイ寒天(TSA)から採取し、 $1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ CFU mL⁻¹懸濁液を調製するために使用した。これをブレインハートインフュージョンブイヨン(BHI B)中でさらに希釈して、 $1 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4$ CFU mL⁻¹の作業用懸濁液を調製した。

【0383】

開始接種物を連続希釈および広げたプレーティングによって確認した。コントロール(9 mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)および1 mLの接種物)、毒性(9 mLのDey-Engley中和剤(DEN)および1 mLの接種物)、ならびに中和剤効力(8 mLの中和剤、1 mLの試験薬剤および1 mLの接種物)試料を使用して、中和剤の検証を行った。5分間の処理の後、200 μLの懸濁液を各チューブから取り出し、連続希釈し、100 μLをTSA上にプレーティングした。寒天プレートを37 ± 2 °Cで18 ~ 24時間インキュベートした。

【0384】

プランクトン生物に対する抗菌効果

*P.aeruginosa*の24時間培養物をTSAから採取し、 $1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ CFU mL⁻¹懸濁液を調製するために使用した。これをさらにBHI Bで希釈し、 $1 \times 10^6 \pm 5 \times 10^4$ CFU mL⁻¹の作業用懸濁液を調製した。ユニバーサルチューブに8 mLの細菌溶液を充填した。

【0385】

クエン酸溶液1 mLおよび亜硝酸ナトリウム溶液1 mLを各試験剤に添加して、上記のように必要な濃度を得た。溶液を37 ± 2 °Cで24時間インキュベートした。インキュベーション期間の後、各チューブから1 mLを取り出し、9 mLの中和剤を含むチューブに移した。連続希釈およびプレート計数を使用して、生存可能な生物を定量した。

【0386】

その結果を図23に示す。

【0387】

データは、以下の*P.aeruginosa*に対する抗菌効果を示している：

- ポリオール(0.5 M)を含むまたは含まない、亜硝酸塩(1 M)と混合したクエン酸(1 M) (「濃度1」)
- ポリオール(0.5 M)を含むまたは含まない、亜硝酸塩(1 M)と混合したクエン酸(0.5 M) (「濃度2」)
- ポリオール(0.5 M)を含むまたは含まない、亜硝酸塩(0.5 M)と混合したクエン酸(1 M) (「濃度3」)

【0388】

クエン酸溶液は、pH 5.2 (製剤1、3および5) および6.0 (製剤2、4および6) である。製剤1および2はポリオールを含まない；製剤3および4はマンニトールを含む；製剤5および6はソルビトールを含む。

【0389】

pH 5.2では、全ての製剤について良好な効果が示されている。pH 6では、マンニトールを含む製剤がわずかに有効である。

【0390】

実施例6

THP-1細胞における*M.tuberculosis* HN 878に対する亜硝酸塩、有機酸およびポリオールを含む製剤の効力を評価した。

【0391】

製剤

製剤は、以下の表に示すように調製した。調製方法が参照サンプルにおいて接尾辞FC

10

20

30

40

50

によって示される「濃縮液」として記載される場合、これは、最初に製剤が亜硝酸ナトリウム（0.75 M）、ポリオール（0.25 M）および酸（0.5 M）の3つの成分すべてを含有する濃縮プレミックスとして作製され、次いで、蒸留水で希釈されて、表に記載されるように、それぞれの所望の濃度に到達したことを意味する。調製方法が参照サンプルにおいて接尾辞FDによって示される「希釈液」として記載される場合、これは、最初に製剤が所望の濃度で3つの成分すべてを含有するプレミックス、すなわち亜硝酸ナトリウム（0.15 M）、ポリオール（0.05 M）および酸（0.1 M）として調製され、次いで、蒸留水で希釈されて、表に記載されるように、それぞれの所望の濃度に到達したことを意味する。

【0392】

各製剤内で、一連の濃度の亜硝酸ナトリウム、すなわち *M.tuberculosis* HN878 に対する *in vitro* 細菌阻害アッセイのための 16、8、4、2、1、0.5、0.25 および 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を連続希釈によって調製した。

【0393】

10

20

30

40

50

【表 4】

	参照サンプル	準備方法	試験混合物（希釈後の最終モル濃度）		
			亜硝酸 ナトリウム	ポリオール	酸
製剤 1	30RESP001FC	濃縮液	亜硝酸ナトリ ウム 0. 1 5 M	マンニトール 0. 0 5 M	クエン酸／クエ ン酸塩 0. 1 M
	30RESP001FD	希釈液	亜硝酸ナトリ ウム 0. 1 5 M	マンニトール 0. 0 5 M	クエン酸／クエ ン酸塩 0. 1 M
製剤 2	30RESP002FC	濃縮液	亜硝酸ナトリ ウム 0. 1 5 M	ラクチトール 0. 0 5 M	クエン酸／クエ ン酸塩 0. 1 M
	30RESP002FD	希釈液	亜硝酸ナトリ ウム 0. 1 5 M	ラクチトール 0. 0 5 M	クエン酸／クエ ン酸塩 0. 1 M
製剤 3	30RESP003FC	濃縮液	亜硝酸ナトリ ウム 0. 1 M	マンニトール 0. 0 5 M	クエン酸／クエ ン酸塩 0. 1 M
	30RESP003FD	希釈液	亜硝酸ナトリ ウム 0. 1 M	マンニトール 0. 0 5 M	クエン酸／クエ ン酸 0. 1 M
製剤 4	30RESP004FC	濃縮液	亜硝酸ナトリ ウム 0. 1 M	マンニトール 0. 0 5 M	アスコルビン酸 ／アスコルビン 酸塩 0. 1 M
	30RESP004FD	希釈する	亜硝酸ナトリ ウム 0. 1 M	マンニトール 0. 0 5 M	アスコルビン酸 ／アスコルビン 酸塩 0. 1 M

【0394】

MICマクロファージ試験は、THP-1マクロファージ（1）化合物スクリーニングアッセイを用いて行った。

【0395】

マクロファージの調製と培養：THP-1細胞を2週間増殖させた。その後、THP-1細胞を、 5×10^5 細胞/mLの濃度でマクロファージ用の完全DMEM培地に懸濁した。24ウェル組織培養プレートに、細胞を1ウェルあたり2mL（1ウェルあたり 1×10^6 ）で播種した。細胞の1つの24ウェルプレートは、7つの薬物濃度＋未処理コントロールの範囲を3連で試験することを可能にする。薬剤アッセイプレートに加えて、感

染日の細菌取り込みを決定するために、1つの追加のプレート（または少なくとも3つの追加のウェル）を播種した。加湿チャンバー中、5%CO₂、37°Cで細胞をインキュベートした。3日間のアッセイの間、DMEM抗生物質／抗真菌剤を含まない完全培地は変更されなかった。

【0396】

マクロファージ用完全DMEM培地：

ダルベッコ改変イーグル培地（Cellgro 15-017-cv）には、以下が追加されている：

熱不活化ウシ胎児血清（Atlas Biologicals社、Fort Collins、CO、F-0500-A）（10%）

L-929調整培地（10%）

L-グルタミン（Sigma社 G-7513）（2mM）

HEPES緩衝液（Sigma社 H-0887）（10mM）

抗生物質／抗真菌剤（Sigma社 A-9909）（1X）

MEM非必須アミノ酸（Sigma社 M-7145）（1X）

2-メルカプトエタノール（Sigma社 M-6250）（50nM）

【0397】

L-929調整培地：

ATCCのL-929（CCL-1）細胞を、75cm²フラスコ中の55mLのDMEM+10%ウシ胎児血清中に 4.7×10^5 細胞で播種した。細胞をTHP-1細胞で3日間増殖させた。3日目に、上清を回収し、0.45μmフィルターでろ過し、分注して、-20°Cで凍結した。無細胞ろ液を、THP-1感染用のDMEM培地で使用した。

【0398】

THP-1細胞の感染：

0日目に、培地を細胞から除去し、そしてM.tuberculosis HN878を1マクロファージ対10細菌比のMOIで含有する0.2mLの抗生物質／抗真菌剤を含まないDMEMと交換した。組織培養プレートを、インキュベーターに戻すために、閉じたZiplocバグジー内に置いた。インキュベーターに入れたら、バグジーを開封した。細胞を細菌とともに2時間インキュベートした。感染後、細胞の外側に付着した細菌を除去し、各ウェルをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で1回洗浄し、種々の薬物濃度の抗生物質／抗真菌剤を含まない完全DMEM培地2mLを添加した。薬物濃度を調製するために、前の懸濁液10mLを次のチューブの完全培地+血清10mLに添加することにより、連続2倍希釈を行った。組織培養プレートを37°C+5%CO₂でインキュベーターに戻した（薬物は3日間ウェルに残った）。各薬物濃度を3連のウェルで試験した。

【0399】

細胞溶解物のプレーティングおよびTHP-1細胞についての細胞生存率の評価を、感染の2時間後、1日後、2日後および5日後に行った。組織培養培地を全てのウェルから除去し、細胞を1mLのPBSで2回洗浄した。次に、1mLの滅菌二重蒸留水+0.05%Tween-80を各ウェルに添加し、細胞を室温で5～10分間放置した。細胞溶解物を、24ウェル組織培養プレート中の無菌生理食塩水で1：10に連続希釈した。希釈した細胞溶解物を、1／1000希釈工程を経てから、7H11/OADC寒天上にプレーティングした。（細胞の各24ウェルTCプレートには、連続希釈を行うための4つの24ウェルTCプレート、および24の寒天「クワッド」プレートを必要とする）。プレートを32°Cで30日間インキュベートし、コロニーを数えてCFU/mLを決定した。

【0400】

結果

In vitroでのTHP-1 HN878の光学密度結果

細菌を阻害する最も希釈された組成物（すなわち、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125μg/mLとして示されるスケールでの特定の製剤の最大希釈レベル）として報告される最小発育阻止濃度（MIC）

10

20

30

40

50

【表 5】

化合物	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 0 日目	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 1 日目	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 2 日目	MIC ($\mu\text{g/ml}$) 5 日目
製剤 1 (30RESP001FC) 濃縮液	1 6	1 6	1 6	1 6
製剤 1 (30RESP001FD) 希釈液	1 6	1 6	1 6	1 6
製剤 2 (30RESP002FC) 濃縮液	8	8	8	1 6
製剤 2 (30RESP002FD) 希釈液	1 6	8	1 6	1 6
製剤 3 (30RESP003FC) 濃縮液	8	8	8	8
製剤 3 (30RESP003FD) 希釈液	8	1 6	1 6	1 6
製剤 4 (30RESP004FC) 濃縮液	4	4	4	0. 1 2 5
製剤 4 (30RESP004FD) 希釈液	1 6	1 6	0. 2 5	0. 2 5

【0 4 0 1】

その結果を図 2 4 ～ 図 2 7 に示す。

【0 4 0 2】

図 2 4 : M.tuberculosis HN878 に対する 30RESP001FC および FD (濃縮物および希釈物) の有効性を、T H P - 1 細胞において評価した。30RESP001FC (濃縮物) (A)、および 30RESP001FD (希釈物) (B) の製剤の効能を、感染後 2 時間 (0 日目)、1 日目、2 日目、および 5 日目、ならびに $16 \mu\text{g/ml}$ (Δ)、 $8 \mu\text{g/ml}$ (∇)、 $4 \mu\text{g/ml}$ ($\diamond$)、 $2 \mu\text{g/ml}$ ($\circ$)、 $1 \mu\text{g/ml}$ ($\square$)、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ ($\bullet$)、 $0.25 \mu\text{g/ml}$ ($\blacktriangle$)、および $0.125 \mu\text{g/ml}$ ($\blacktriangledown$) での処置後、T H P -

1 マクロファージ中の *M.tuberculosis* HN878 (□) の細胞内殺菌について評価した。図 24 の各プロットにおいて、 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合の△および▽プロット線はそれぞれ、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合の▲および▼プロット線と区別することができ、これは、 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ での処理がより効果的であるためである。言い換えれば、 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合のプロット線は、特に5日目において、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合よりも有意に低いCFU値を示している。同様に、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ での処理はより有効であるので、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合のプロット線□は、処理なしの場合のプロット線□と容易に区別することができる。処置なしの場合のプロット線□のCFU値は、1日後には上昇し、 1×10^4 を超えたままである。

10

【0403】

上記のMIC表および図24において「 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 」と記載されている30RESP001FCおよびFD組成物は、 0.15 M 亜硝酸ナトリウム、 0.05 M マンニトールおよび 0.1 M クエン酸／クエン酸塩（希釈後の最終モル濃度）を含み、8、4、2、1、0.5、0.25 および $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ の組成物は、それぞれ $16 \sim 0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ のオーダーの前の組成物の50%希釈（すなわち、濃度を半分にする）である。

【0404】

THP-1マクロファージを1:10のMOIで *M.tuberculosis* に感染させ、感染から2時間後（0日目）、1、2および5日後に細菌コロニーカウント法（CFU）を用いて細胞内細菌数を測定した。示されている値は、1回の独立した実験から得られた平均値±標準偏差である。特に、未処理のコントロールと比較して、*M.tuberculosis* HN878 に対する30RESP001FCおよびFD（濃縮物および希釈物） $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ での処理において、有効性が増大した（*、 $p < 0.05$ ）。

20

【0405】

図25：*M.tuberculosis* HN878 に対する30RESP002FCおよびFD（濃縮物および希釈物）の有効性を、THP-1細胞において評価した。30RESP002FC（濃縮物）（A）、および30RESP002FD（希釈物）（B）の製剤の効能を、感染後2時間（0日目）、1日目、2日目、および5日目、ならびに $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ (△)、 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ (▽)、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ (◇)、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ (○)、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ (□)、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ (●)、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ (▲)、および $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ (▼) での処置後、THP-1マクロファージ中の *M.tuberculosis* HN878 (□) の細胞内殺菌について評価した。図25の各プロットにおいて、 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合の△および▽プロット線はそれぞれ、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合の▲および▼プロット線と区別することができ、これは、 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ での処理がより効果的であるためである。言い換えれば、 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合のプロット線は、特に5日目において、 $0.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合よりも有意に低いCFU値を示している。同様に、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ での処理はより有効であるので、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合のプロット線□は、処理なしの場合のプロット線□と容易に区別することができる。処置なしの場合のプロット線□のCFU値は、1日後には上昇し、 1×10^4 を超えたままである。

30

40

【0406】

上記のMIC表および図25において「 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 」と記載されている30RESP002FCおよびFD組成物は、 0.15 M 亜硝酸ナトリウム、 0.05 M ラクチトールおよび 0.1 M クエン酸／クエン酸塩（希釈後の最終モル濃度）を含み、8、4、2、1、0.5、0.25 および $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ の組成物は、それぞれ $16 \sim 0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ のオーダーの前の組成物の50%希釈（すなわち、濃度を半分にする）である。

【0407】

THP-1マクロファージを1:10のMOIで *M.tuberculosis* に感染させ、感染から2時間後、1、2および5日後に細菌コロニーカウント法（CFU）を用いて細胞内細菌数を測定した。示されている値は、1回の独立した実験から得られた平均値±標準偏差

50

である。未処理のコントロールと比較して、*M.tuberculosis* HN878に対する、30RESP002FC（濃縮物） $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ならびに30RESP002FD（希釈物） $16\mu\text{g}/\text{ml}$ および $8\mu\text{g}/\text{ml}$ での処理において、有効性が増大した（*、 $p<0.05$ ）。

【0408】

図26：*M.tuberculosis* HN878に対する30RESP003FCおよびFD（濃縮物および希釈物）の有効性を、THP-1細胞において評価した。30RESP003FC（濃縮物）（A）、および30RESP003FD（希釈物）（B）の製剤の効能を、感染後2時間（0日目）、1日目、2日目、および5日目、ならびに $16\mu\text{g}/\text{ml}$ （△）、 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ （▽）、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ （◇）、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ （○）、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ （□）、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ （●）、 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ （▲）、および $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ （▼）での処置後、THP-1マクロファージ中の*M.tuberculosis* HN878（□）の細胞内殺菌について評価した。図26の各プロットにおいて、 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ および $8\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合の△および▽プロット線はそれぞれ、 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合の▲および▼プロット線と区別することができ、これは、 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ および $8\mu\text{g}/\text{ml}$ での処理がより効果的であるためである。言い換えれば、 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ および $8\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合のプロット線は、特に5日目において、 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合よりも有意に低いCFU値を示している。同様に、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ での処理はより有効であるので、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合のプロット線□は、処理なしの場合のプロット線□と容易に区別することができる。処置なしの場合のプロット線□のCFU値は、1日後には上昇し、 1×10^4 を超えたままである。

【0409】

上記のMIC表および図26において「 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ 」と記載されている30RESP003FCおよびFD組成物は、 0.1M 亜硝酸ナトリウム、 0.05M マンニトールおよび 0.1M クエン酸／クエン酸塩（希釈後の最終モル濃度）を含み、8、4、2、1、0.5、0.25および $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ の組成物は、それぞれ $16\sim 0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ のオーダーの前の組成物の50%希釈（すなわち、濃度を半分にする）である。

【0410】

THP-1マクロファージを1：10のMOIで*M.tuberculosis*に感染させ、感染から2時間後、1、2および5日後に細菌コロニーカウント法（CFU）を用いて細胞内細菌数を測定した。示されている値は、1回の独立した実験から得られた平均値±標準偏差である。未処理のコントロールと比較して、*M.tuberculosis* HN878に対する、30RESP003FC（濃縮物） $16\mu\text{g}/\text{ml}$ および $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ならびに30RESP003FDの $16\mu\text{g}/\text{ml}$ での処理において、有効性が増大した（*、 $p<0.05$ ）。

【0411】

図27：*M.tuberculosis* HN878に対する30RESP004FCおよびFD（濃縮物および希釈物）の有効性を、THP-1細胞において評価した。30RESP004FC（濃縮物）（A）、および30RESP004FD（希釈物）（B）の製剤の効能を、感染後2時間（0日目）、1日目、2日目、および5日目、ならびに $16\mu\text{g}/\text{ml}$ （△）、 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ （▽）、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ （◇）、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ （○）、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ （□）、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ （●）、 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ （▲）、および $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ （▼）での処置後、THP-1マクロファージ中の*M.tuberculosis* HN878（□）の細胞内殺菌について評価した。図27の各プロットにおいて、 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ および $8\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合の△および▽プロット線はそれぞれ、 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合の▲および▼プロット線と区別することができ、これは、 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ および $8\mu\text{g}/\text{ml}$ での処理がより効果的であるためである。言い換えれば、 $16\mu\text{g}/\text{ml}$ および $8\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合のプロット線は、特に5日目において、 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ および $0.125\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合よりも有意に低いCFU値を示している。同様に、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ での処理はより有効であるので、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ で処理した場合のプロット線□は、処理なしの場合のプロット線□と容易に区別することができる。処置なしの場合のプロット

線□のCFU値は、1日後には上昇し、 1×10^4 を超えたままである。

【0412】

上記のMIC表および図27において「 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 」と記載されている30RESP004FCおよびFD組成物は、 0.1 M 亜硝酸ナトリウム、 0.05 M マンニトールおよび 0.1 M アルコールビン酸／アスコルビン酸塩（希釈後の最終モル濃度）を含み、8、4、2、1、0.5、0.25および $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ の組成物は、それぞれ16～ $0.125 \mu\text{g}/\text{ml}$ のオーダーの前の組成物の50%希釈（すなわち、濃度を半分にする）である。

【0413】

THP-1マクロファージを1:10のMOIでM.tuberculosisに感染させ、感染から1、2および5日後に細菌コロニーカウント法（CFU）を用いて細胞内細菌数を測定した。示されている値は、1回の独立した実験から得られた平均値±標準偏差である。未処理のコントロールと比較して、M.tuberculosis HN878に対する、30RESP004FC（濃縮物） $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ での処理において有効性が増大した（*、 $p < 0.05$ ）。

10

【0414】

製剤は、MICを超える適切な用量で、M.tuberculosis HN878のin vitro阻害を示すと結論付けられる。

【0415】

製剤を製造する方法は、実施例6の試験において、M.tuberculosis HN878に対するそれらのin vitroでの抗菌効力に影響を及ぼすことにも留意されたい。

20

【0416】

これは、製剤1の $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の効力を、FCバージョンとFDバージョンとの間で比較することによって例示される（図24A対図24B）。FCバージョンの効力は、インキュベーション後少なくとも5日間は強く増加するが、FDバージョンの効力は、同じ期間ではそれほど強く増加しない。これは $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度とは対照的であり、これはFCバージョンとFDバージョンとの間と同様に、同じ期間にわたって非常に類似した優れた効力を示している。

【0417】

製剤2では、異なる挙動が観察される（図25A対図25B）。FDバージョンの $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の効力は、インキュベーション後の最初の2日間はFCバージョンよりも強く増加し、その後変化しないが、インキュベーション後5日までその効力はFDバージョンにおいて優れており、FCにおいて非常に優れている。 $8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の場合、FDバージョンの効力は、インキュベーション後少なくとも5日間、強く優れた効力まで増加するが、FCバージョンの効力は、同じ期間で、それほど強く増加しない。

30

【0418】

したがって、少なくともより高い濃度では、水が添加されて最終的な阻害製剤に到達する段階が、初期の抗菌作用および5日間にわたる殺菌の程度の両方の観点から、製剤の抗菌作用に実質的に影響を及ぼし得ることが示される。一般的に言えば、普遍的ではないが、最初に、亜硝酸ナトリウム、ポリオールおよび酸成分とを所望の相対モル比で、使用に所望されるよりも高い濃度（例えば使用に所望されるよりも少なくとも3倍、例えば使用に所望されるよりも少なくとも5倍多い濃度、例えば使用に所望されるよりも約3倍～約80倍多い濃度）で濃縮されたプレミックスとして製剤を作製し、その後、その濃縮物を希釈して使用する製剤を得ると、インキュベーション後0～5日の期間にわたって、より優れた抗菌作用をもたらす。

40

【0419】

実施例7

H1N1インフルエンザAウイルスに対するカルボン酸－亜硝酸塩－ポリオール溶液の細胞毒性および抗ウイルス活性

実施例6の製剤30RESP001FCにそれぞれ対応するF1C1、F1C2およびF1C3

50

と命名された試験製剤、それらの10倍希釈物およびそれらの100倍希釈物を、オセルタミビル溶液(1 μM)およびウイルスコントロールとともに使用して、MDCK細胞中で24時間後に比較細胞毒性およびH1N1インフルエンザAウイルス死滅効果を得た。細胞毒性は実施例8と同様に、LDH細胞毒性アッセイによって評価した。MDCK細胞中のH1N1インフルエンザAウイルスに対する抗菌活性は、MOI=0.002(●)およびMOI=0.02(■)で、様々な希釈率(横軸は亜硝酸塩モル濃度)で測定され、細胞毒性を灰色で示し、右側に細胞毒性スケール(0.015Mまでの測定された亜硝酸塩濃度での細胞毒性はLDHコントロールの1%以下であった)を示している。プレート写真を、オセルタミビル(1 μM)と比較して、MOI=0.002および亜硝酸塩濃度0.15M、0.015Mおよび0.0015Mで得た。その結果を図28に示す。最後の文章に記載されたプレートの順序は、図中のプレートの左から右への順序と同じである(2つの実験があり、対応する各実験のプレートが上下に示されている)。プレートのオセルタミビル対のすぐ右側にあるプレートの最も右側の対は、ウイルスコントロールである。細胞毒性を、LDHコントロールの%(感染後24時間での3LDHアッセイの平均)として、試験プレートの各対の下に示す。

【0420】

その結果は、亜硝酸塩/クエン酸/ポリオール製剤の適切な用量において、ウイルスが完全に撲滅しており、それがオセルタミビルより明らかに優れていることを示している。亜硝酸塩/クエン酸/ポリオール製剤の同様の抗ウイルス活性が、ライノウイルスおよびRSウイルス(respiratory syncytial virus)でも示されている。

【0421】

これらの結果は、ヒトおよび動物被験体における呼吸器ウイルス感染症の治療的および予防的処置が本発明による亜硝酸塩/酸/ポリオール製剤によって提供されることを示している。

【0422】

実施例8

コロナウイルスSARS-CoV-2に対するカルボン酸-亜硝酸塩-ポリオール溶液の細胞毒性および抗ウイルス活性

材料

試験製剤F1(pH5.8)

pH5.8の亜硝酸ナトリウム、クエン酸およびマンニトール(ポリオール)の水溶液で製剤1(F1)の6つの試験濃度を、1.5M亜硝酸ナトリウム、pH5.8の0.91Mクエン酸/クエン酸塩緩衝液、および0.5Mマンニトール溶液の原液から、以下に記載の方法により調製し、以下の試験組成物を得た：

【0423】

10

20

30

40

50

【表 6】

製剤 1 (F 1)

試験薬	試験製剤中の亜硝酸ナトリウムの濃度 (M)	試験製剤中のクエン酸の濃度 (M) pH 5.8	試験製剤中のポリオールの濃度 (M)
F 1 試験濃度 1 (F1C1)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$ マンニトール
F 1 試験濃度 2 (F1C2)	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.30 \times 10^{-1} \text{M}$	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$ マンニトール
F 1 試験濃度 3 (F1C3)	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-2} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-3} \text{M}$ マンニトール
F 1 試験濃度 4 (F1C4)	$1.5 \times 10^{-3} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-3} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-4} \text{M}$ マンニトール
F 1 試験濃度 5 (F1C5)	$1.5 \times 10^{-4} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-4} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ マンニトール
F 1 試験濃度 6 (F1C6)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-2} \text{M}$ マンニトール

10

【0424】

F 1 で使用されるコントロール

pH 5.8 コントロール製剤を、0.1 M クエン酸 + アッセイ緩衝液 + 細胞から調製した。

20

【0425】

陰性コントロールは、アッセイ緩衝液 + 細胞であった。

【0426】

陽性コントロールは、クロロキン + 細胞であった。

【0427】

試験製剤 F 2 (pH 5.4)

亜硝酸ナトリウム、pH 5.4 のクエン酸およびマンニトール（ポリオール）の水溶液である製剤 2 (F 2) の 6 つの試験濃度を、1.5 M 亜硝酸ナトリウム、0.91 M クエン酸 / クエン酸塩緩衝液 (pH 5.4)、および 0.5 M マンニトール溶液の原液から、以下に記載する方法によって調製し、以下の試験組成物を得た：

30

【0428】

【表 7】

製剤 2 (F 2)

試験薬	試験製剤中の亜硝酸ナトリウムの濃度 (M)	試験製剤中のクエン酸の濃度 (M) pH 5.4	試験製剤中のポリオールの濃度 (M)
F 2 試験濃度 1 (F2C1)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$ マンニトール
F 2 試験濃度 2 (F2C2)	$5.0 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.30 \times 10^{-1} \text{M}$	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$ マンニトール
F 2 試験濃度 3 (F2C3)	$1.5 \times 10^{-2} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-2} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-3} \text{M}$ マンニトール
F 2 試験濃度 4 (F2C4)	$1.5 \times 10^{-3} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-3} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-4} \text{M}$ マンニトール
F 2 試験濃度 5 (F2C5)	$1.5 \times 10^{-4} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-4} \text{M}$	$5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ マンニトール
F 2 試験濃度 6 (F2C6)	$1.5 \times 10^{-1} \text{M}$	$0.91 \times 10^{-1} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-2} \text{M}$ マンニトール

40

【0429】

50

F 2で使用するコントロール

pH 5.4 コントロール製剤を、0.1 M クエン酸 + アッセイ緩衝液 + 細胞から調製した。

【0430】

陰性コントロールは、アッセイ緩衝液 + 細胞であった。

【0431】

陽性コントロールは、クロロキン + 細胞であった。

【0432】

化学試薬

亜硝酸ナトリウム：

グレード：亜硝酸ナトリウム超高純度 Ph Eur、USP、亜硝酸ナトリウム CAS No.7632-00-0、EC番号 231-555-9、超高純度 Ph Eur、USP、Sigma Aldrich 社製、製品コード 1.065441000.

クエン酸：

グレード：クエン酸無水粉末 EMPROVE（登録商標）ESSENTIAL Ph Eur、BP、JP、USP、E 330、FCC、Sigma Aldrich 社製、製品コード 1.002425000.

D-マンニトール：

グレード：EP、FCC、USP 適合性試験を満たす D-マンニトール、Sigma Aldrich 社製、製品コード M8429-100G.

リン酸クロロキン：

グレード：医薬二次標準、Sigma Aldrich 社製、製品コード PHR1258-1G.

【0433】

原液の調製

クエン酸溶液を調製するには、19.2 g のクエン酸に 90 mL の蒸留水を加え、続いて 10 mL の 3 M 水酸化ナトリウムを加え、蒸留水で希釈して pH を調整する（pH 5.4 の場合は 160 mL、pH 5.8 の場合は 190 mL）。別の方法では、19.2 g のクエン酸に 20 mL の蒸留水を加え、続いて 1.2 g の固体水酸化ナトリウムを加え、その後、10 M 水酸化ナトリウムおよび蒸留水を用いて pH を調整し、100 mL とする。溶液は、0.22 µm フィルターを使用するシリンジろ過によって滅菌される。

【0434】

1.0 M 亜硝酸ナトリウム溶液を調製するには、6.9 g の亜硝酸ナトリウムに 100 mL の蒸留水を加えた。1.5 M 亜硝酸ナトリウム溶液を調製するには、10.35 g の亜硝酸ナトリウムに 100 mL の蒸留水を加えた。

【0435】

特定の場合には、9.1 g のマンニトールを加えて、0.5 M の濃度を得た。0.22 µm フィルターを用いたシリンジ濾過により溶液を滅菌する。

【0436】

製剤の調製

亜硝酸塩およびマンニトール溶液と混合する前に、緩衝クエン酸溶液の pH を所望の値に制御する。製剤について述べた pH は、亜硝酸塩およびマンニトール溶液と混合する前に調製した緩衝クエン酸溶液の pH である。

【0437】

製剤を構成するための 1 つの適切な方法は以下の通りである：0.5 M マンニトールを含む亜硝酸ナトリウム（1.5 M）を混合容器に加え、すぐに 1 : 1 混合物（亜硝酸塩 + ポリオール：クエン酸）の pH が制御されたクエン酸溶液を加える。溶液を穏やかに反転させて混合する。混合したら、混合物を密閉容器（例えば、50 mL フェルコン管）中で周囲温度で 5 分間保持する。次いで、0.75 M 亜硝酸塩、マンニトール 0.25 M、およびクエン酸を含む得られた溶液を、アッセイ緩衝液（1.2 倍濃縮）で 5 倍に希釈して、アッセイにおいて亜硝酸塩 0.15 M、マンニトール 0.05 M、および例えばクエン酸 0.1 M の最終試験濃度を得る。1 : 1 混合物の連続希釈（例えば、亜硝酸塩 0.75

10

20

30

40

50

M、マンニトール 0.25 M、クエン酸 0.5 M として出発する混合物) は、蒸留水および／またはアッセイ緩衝液を用いて調製される。全ての製剤濃度は、周囲温度で保存することができる。溶液は、実験ごとに新たに調製される。

【0438】

追加のコントロール

追加のコントロールとして、その目的に適していることが知られており、SNAP 50、SNAP 100、SNAP 200、SNAP 300 および SNAP 400 と示される濃度範囲の S-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン (SNAP) を使用した。SNAP は、NO が in vitro で細胞毒性を示さないことを検証するために、これらの試験において陽性の NO 供与コントロールとして機能する公知の NO 供与体である。SNAP 分子の N-アセチルペニシラミン (NAP) 部分のアッセイに対する潜在的な影響を制御するために、対応する濃度の NAP を NO ブランクコントロールとして使用し、NAP 50、NAP 100、NAP 200、NAP 300 および NAP 400 と表記した。

【0439】

ウイルス

SARS-CoV-2 臨床分離株

【0440】

細胞株

Vero E6

【0441】

アッセイ

LDH アッセイ (細胞毒性) :

CyQUANTTM LDH 細胞毒性アッセイキット、Invitrogen 社 ; Cat No. C20300 および C20301。

組織培養感染量 (TCID₅₀) は、細胞変性効果 (CPE) スコアリングを読み取り値として使用して測定された (ウイルス滴定)。

【0442】

亜硝酸塩製剤 (全ての濃度)、pH 5.8 または pH 5.4 クエン酸コントロール、陰性コントロールおよび陽性コントロール (Keyaerts、E、Biochem Biophys Res Commun、323、264-268 頁 (2004 年) に記載されているようなクロロキン、その内容は参照により本明細書に組み込まれる) の細胞毒性を、Vero E6 細胞に対する亜硝酸塩／コントロール添加の 2 時間後および 24 時間後に試験した。LDH 放出を、2 時間および 24 時間の時点での読み取り値として測定した。各化合物／製剤を、実験当たり 3 回試験した。

【0443】

SARS-CoV-2 阻害 :

0 時間の時点で、Vero E6 細胞を製剤またはコントロールの存在下でウイルスに感染させ、1 時間インキュベートした。このインキュベーション期間の後、接種物を除去し、細胞を洗浄した。次に、新鮮な製剤またはコントロールを洗浄した細胞に添加した。感染後 24 時間で、Vero E6 細胞上清を回収して滴定し、ウイルス滴定を 6 日間インキュベートしてから読み出して、ウイルス収量の減少を測定した。3.0 および 0.3 を含む 4 つの MOI で別々の試験を行ったが、これら 2 つの MOI のみを滴定した。読み出しは、クリスタルバイオレット (細胞単層) 染色、続いて CPE スコアリングによって行った。

【0444】

結果

その結果を図 32 ～ 図 34 に示す。

【0445】

図 32 は、LDH 細胞毒性アッセイの結果を示している (それぞれ試験製剤 1 および 2 を用いた実験 1 および 2 のグラフを組み合わせたもの)。データは、2 つの実験の平均 + 標準偏差 (SD) として表される。SD は灰色のエラーバーとして示されている。最大 LDH 活性 (細胞 + 溶解緩衝液) を 100 % に設定し、すべてのサンプル結果をこの値と比

10

20

30

40

50

較した。LDH陽性コントロールは、キットの陽性コントロールであった。黒色のバー（2時間のインキュベーション）は、それぞれの場合のバーの各対の左側のバーであり、赤色のバー（24時間のインキュベーション）は、それぞれの場合のバーの各対の右側のバーである。

【0446】

図33は、MOI 3.0での実験1のSARS-CoV-2に対する抗ウイルス試験の結果を示している。実験1では、SARS-CoV-2を用いて4つの感染多重度（MOI）で1つのウイルス収量減少アッセイを実施し、接種ウイルスの逆滴定を用いて確認した。MOIが3で接種された細胞については、滴定後、 $2.1 \log_{10}$ TCID₅₀/mlがウイルスコントロールウェル中に検出された。試験した条件のいくつかでは、SARS-CoV-2収量の減少が観察され得る。24時間のインキュベーション後、最も低い3つのMOI（すなわち、0.3、0.03および0.003）ではほとんどウイルスは検出されなかった。おそらく、Vero E6細胞での24時間の複製は、高レベルの子孫ウイルスを得るのに十分ではない。データは、2回の滴定の平均+標準偏差（SD）として表される。SDはエラーバーとして示されている。クロロキンおよび細胞コントロール $\log_{10}$ TCID₅₀/ml値の水平点線レベルは、アッセイの検出限界（LOD）である。

【0447】

図34は、(a) MOI 3.0および(b) MOI 0.3での実験2のSARS-CoV-2に対する抗ウイルス試験の結果を示している。この方法は、製剤が実験2の製剤（種々の濃度での試験製剤2）であること以外は、これらのMOIにおける実験1の部分に対応し、子孫ウイルスのレベルを増加させるために、24時間ではなく48時間インキュベーションを行った。データは、2回の滴定の平均+標準偏差（SD）として表される。SDはエラーバーとして示されている。クロロキンおよびコントロール $\log_{10}$ TCID₅₀/ml値の水平点線レベルは、アッセイの検出限界（LOD）である。

【0448】

考察

NOを生成する水性製剤は、LDHアッセイでは細胞毒性を示さない（図32）。特に、亜硝酸塩、酸、ポリオールの濃度が高い場合、SARS-CoV-2に対するin vitro抗ウイルス作用は印象的であり、クロロキンに匹敵する（図33および図34）。

【0449】

NOを生成する水性製剤は、驚くほど高いpHで有効である。pH 5.4および5.8を試験したが、5.2以下のより低いpHでも有効性を有すると予想される。

【0450】

さらに、データは、有機カルボン酸（例えば、pH 5.4または5.8に緩衝化されたクエン酸）が、NOを生成する製剤の非存在下で、驚くほど低い細胞毒性とSARS-CoV-2に対する高いin vitro抗ウイルス作用を有することを明らかにしている（図32～図34；「クエン酸pH 5.8」および「クエン酸pH 5.4」のバー）。カルボン酸製剤のpHが比較的高いため、それらが気道および肺組織表面に対して非毒性であると予想されるので、肺内活性剤として魅力的な製剤になる。SARS-CoV-2は、SARS-CoVと同じコロナウイルスファミリーに属しており、ウイルス間に類似性があるため、このような有機カルボン酸がSARS-CoVウイルスに対して対応する有効性を示すことも予測することができる。SARS-CoVウイルスは重症急性呼吸器症候群（SARS）の原因となるコロナウイルスであり、2002年と2003年に十分に立証された大流行があった。

【0451】

実施例9

コロナウイルスSARS-CoVに対するカルボン酸-亜硝酸塩-ポリオール溶液の抗ウイルス活性

SARS-CoV-2に対する本発明によって提供される抗ウイルス活性と、SARS-CoVに対する本発明によって提供される抗ウイルス活性との間の類似性を調査するた

10

20

30

40

50

めに、以下の実験を行った。

【0452】

製剤 F1C1、F1C2、F1C3 および F1C4 を、MOI 3.0 で SARS-CoV に対する抗ウイルス活性について試験した。この方法は、実施例 8 に記載された抗ウイルス試験に類似する。クリスタルバイオレットで細胞単層を染色する前に、2 枚のプレートを顕微鏡でチェックし、細胞変性効果 (CPE) についてスコアを付けた。下にある単層の上の細胞破片の形態の CPE が、これらのプレートに存在することがわかった。

【0453】

顕微鏡でチェックした 2 枚のプレートの結果を図 35 に示す。データは条件ごとの単一滴定である。残りのプレートについては、細胞単層が密すぎるため、クリスタルバイオレット染色後に CPE をスコア化することができなかった。細胞コントロール log₁₀ TCID₅₀/ml 値の水平点線レベルは、アッセイの検出限界 (LOD) である。

【0454】

図 35 に示すように、少なくとも製剤 F1C1 および F1C2 は、SARS-CoV に対して優れた *in vitro* 抗ウイルス活性を示した。

【0455】

実施例 10

ヒト用吸入器

本発明による液体組成物を使用するヒト用吸入器の一実施形態を図 30 および図 31 に概略的に示す。

【0456】

吸入器は、圧縮ガスによって適切に駆動され、一般に従来の方法で、吸入器の 1 回の手動作動に应答して、吸入器内のリザーバーから亜硝酸塩／酸／ポリオール製剤の同伴液滴の 1 用量を送達するように構成される。被験体は、通常、吸入器を使用するときに喘息患者によって従来行われているように、吸入器を作動させると同時に吸入する。図 30 に示されるように、1 用量当たり約 3 分の治療時間が適切であり、適切な用量の活性組成物で最大約 2 時間の効果の持続時間を与える。

【0457】

空気中の飛沫は被験体の感染した肺に入り、そこで感染した（例えばウイルスに感染した）肺の膜に接触する。図 31 の右側に、肺粘膜に水性一酸化窒素 (NO) 生成組成物（「水性 NO」）の複数の液滴を堆積させた場合の本発明の効果を示している。図 31 の左側に、水性一酸化窒素 (NO) 生成組成物の代わりに、ガス状一酸化窒素を被験体によって吸入（「吸入一酸化窒素」）場合の対応する効果を示している。

【0458】

示されるように、吸入一酸化窒素が使用される場合、効力は大幅に低減される可能性がある。吸入一酸化窒素の一部は、肺粘膜を通して血流に入る前に被験体によって吐き出されるだけでなく、吸入一酸化窒素の別の一部が吸入された空気中の酸素によって有毒な二酸化窒素 (NO₂) に酸化される。二酸化窒素は、被験体を治療するためのガス状一酸化窒素の利用可能性を枯渇させることに加えて、被験体の肺に悪影響を及ぼす。

【0459】

その結果、本発明による亜硝酸塩／酸／ポリオール製剤を使用することによって、患者の肺への、および肺を介した患者の血流への一酸化窒素のより効率的かつ効果的な送達が達成される。

【0460】

結論

以上、本発明を広く説明したが、これに限定されるものではない。当業者に容易に明らかであるような変形および修正は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。本発明に特許が付与されている特定の管轄区域の法律が添付の特許請求の範囲に相当する技術の不正使用に対する特許の実施を規定している範囲において、特許権者は、当該特許が当該同等の技術を対象としていることを意図している。

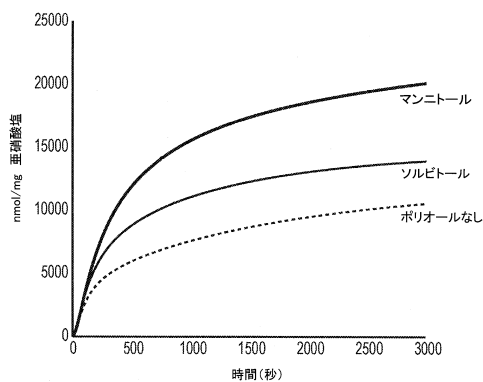
【 0 4 6 1 】

添付の特許請求の範囲の保護範囲の等価物も、適用法により許容される範囲で特許請求の範囲によってカバーされる。例えば、一般的に言えば、本明細書に記載される NO_x 生成反応の成分または成分の一部を混合する順序は、 NO_x 生成反応が早期に開始されない限り、重要ではない。本発明の任意の組み合わせ、キットまたは組成物の必須および非必須成分の任意の混合順序は、カバーされることが意図される。1つ以上の成分が液体形態で、例えば溶液として使用される場合、反応混合物または反応混合物の任意の成分の一部中の溶質（その成分またはそれらの成分を含むが、これらに限定されない）の濃度に対するその成分またはそれらの成分の混合物の効果は、その1つ以上の成分が異なる体積または濃度で固体形態または液体形態で使用される場合と比較して、異なる可能性がある。本発明の組合せ、キットおよび組成物を形成するための成分のすべての等価な濃度および／または物理的形態（固体、液体、溶液）、ならびに前記組み合わせ、キットおよび組成物を調製するための工程のすべての等価な工程および工程の順序の使用は、本明細書に記載または具体的に特許請求されていない場合であっても、適用法によって許容される範囲内で、本特許請求の範囲内にある。

【 図 面 】

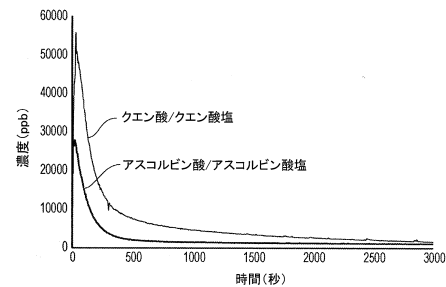
【 図 1 】

亜硝酸ナトリウムmg当たりの異なる水性環境における、亜硝酸ナトリウムと酸（同じ濃度、pH）との反応によって放出された一酸化窒素（nmol/mg亜硝酸塩）の累積プロット



【 図 2 】

ポリオール非存在下においてクエン酸／クエン酸塩緩衝液またはアスコルビン酸／アスコルビン酸塩緩衝液を亜硝酸ナトリウムと反応させることによる一酸化窒素の放出率



10

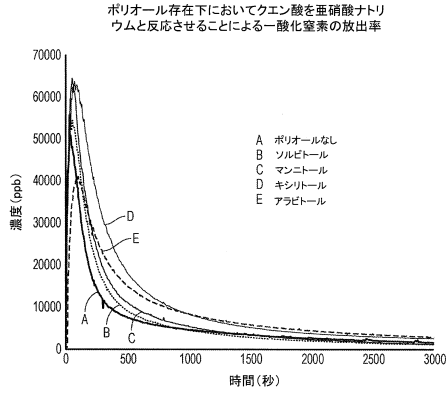
20

30

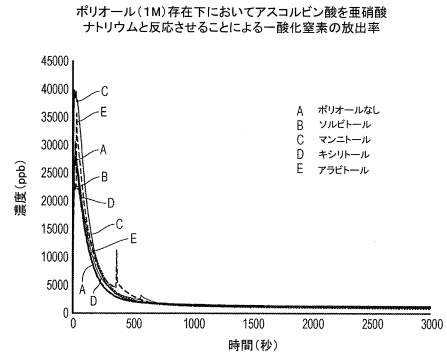
40

50

【図 3】

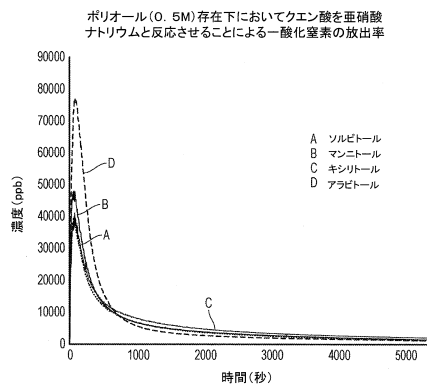


【図 4】

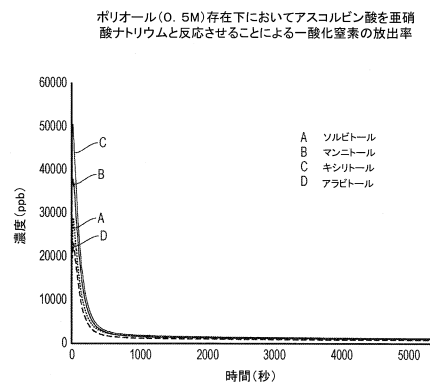


10

【図 5】

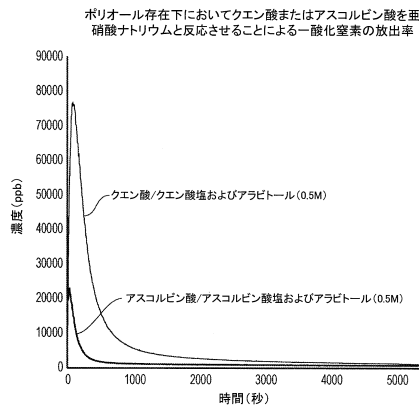


【図 6】

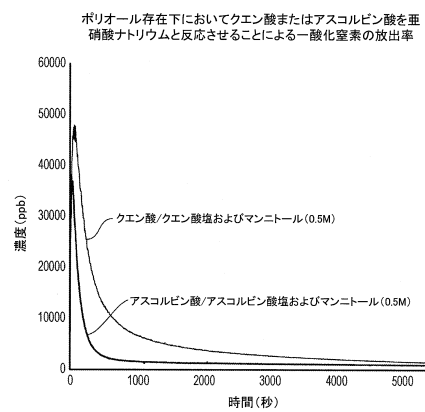


20

【図 7】



【図 8】

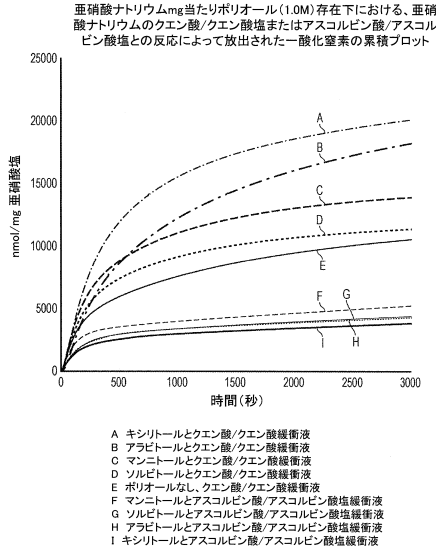


30

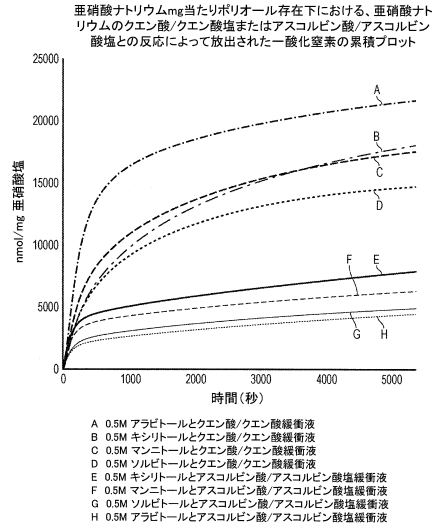
40

50

【図 9】

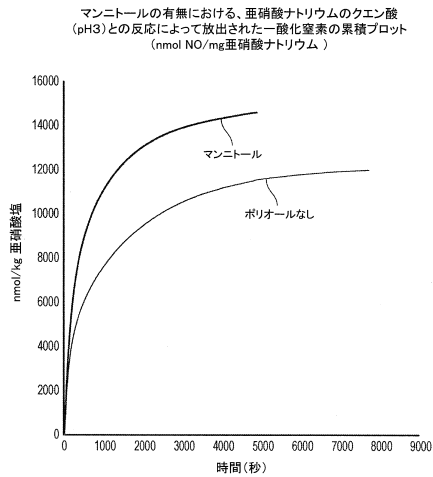


【図 10】

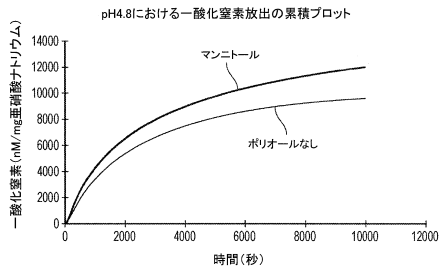


10

【図 11】



【図 12】



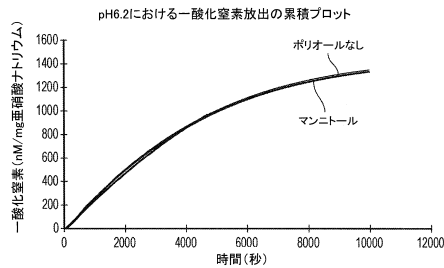
20

30

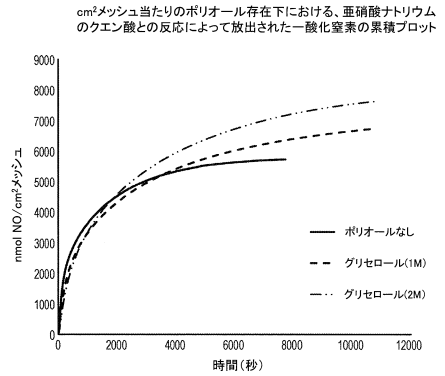
40

50

【図 1 3】

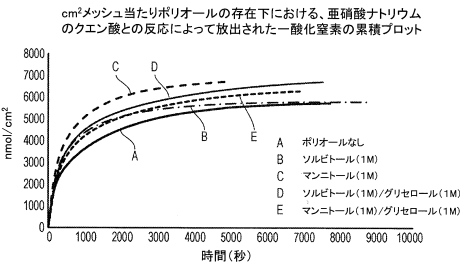


【図 1 4】

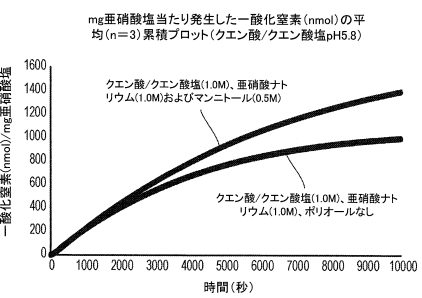


10

【図 1 5】

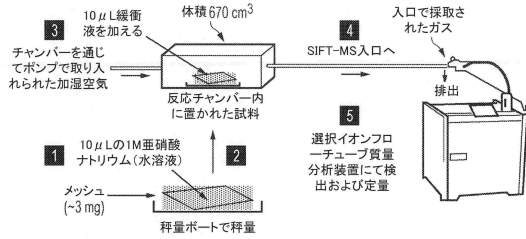


【図 1 6】

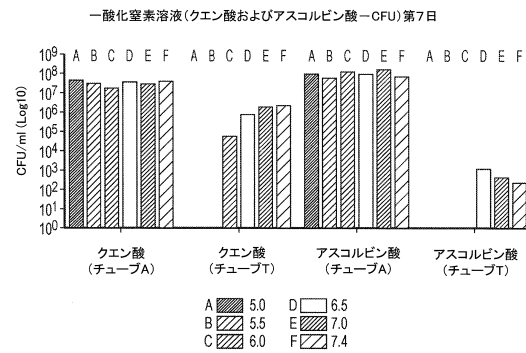


20

【図 1 7】



【図 1 8】

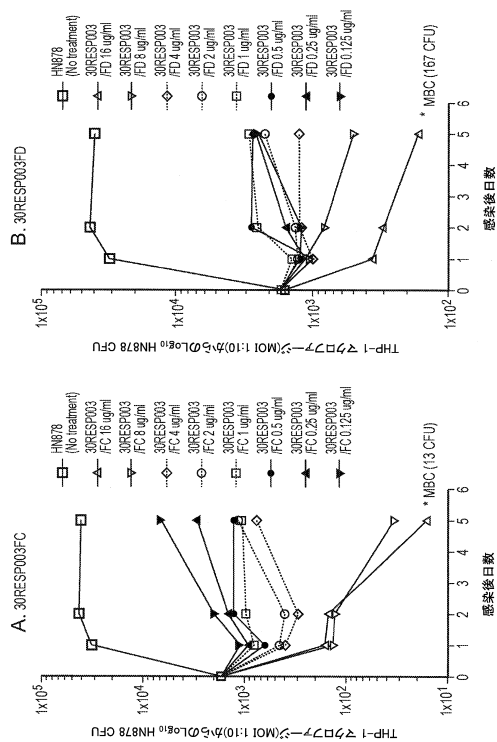


30

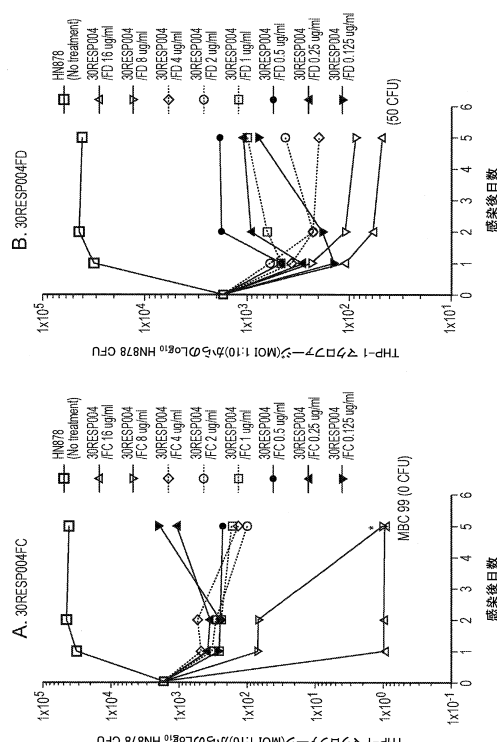
40

50

【図 26】



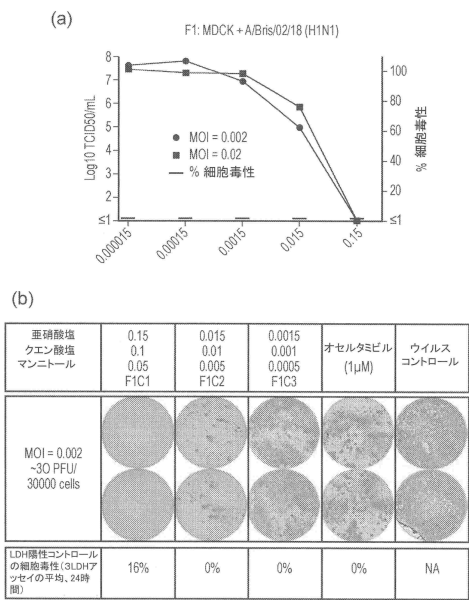
【図 27】



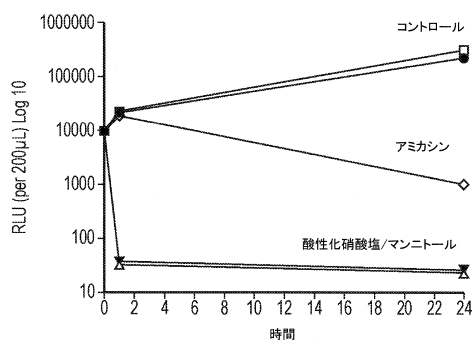
10

20

【図 28】



【図 29】

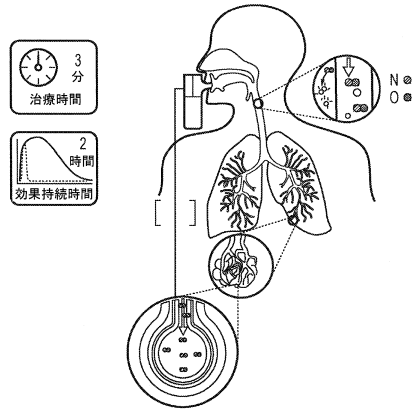


30

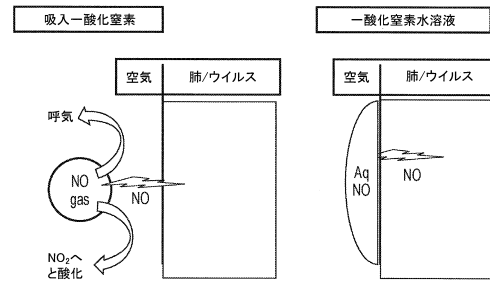
40

50

【図 30】

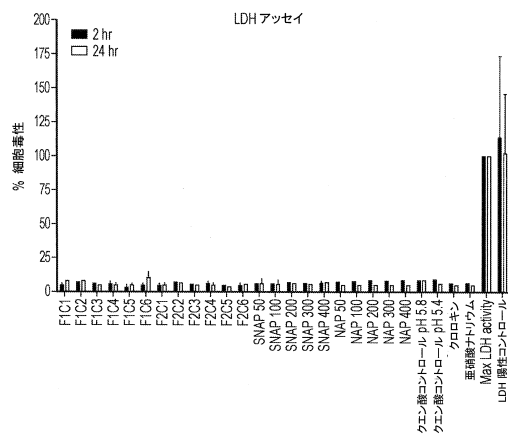


【図 31】

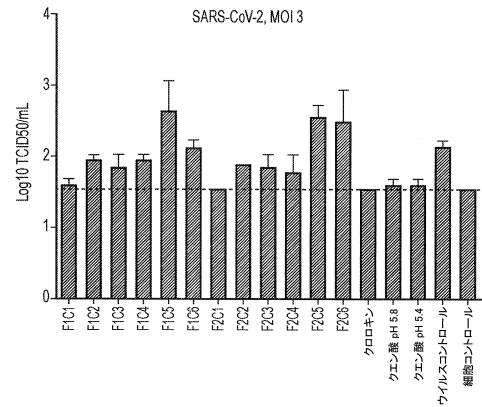


10

【図 32】



【図 33】



20

30

40

50

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
A 6 1 P	31/10	(2006.01)	A 6 1 P	31/10	
A 6 1 K	31/375	(2006.01)	A 6 1 K	31/375	
A 6 1 K	31/194	(2006.01)	A 6 1 K	31/194	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	47/12	(2006.01)	A 6 1 K	47/12	
A 6 1 K	45/06	(2006.01)	A 6 1 K	45/06	

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 2005979.6

(32)優先日 令和2年4月23日(2020.4.23)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

ッドブレイス1 サーティー ホールディングス リミテッド内

(72)発明者 クリストファー バリー ウッド

イギリス国 W1 K 6 P L ロンドン レッドブレイス1 サーティー ホールディングス リミテッド内

審査官 川合 理恵

(56)参考文献 米国特許第05648101 (US, A)

特表2004-508337 (JP, A)

特表2016-518458 (JP, A)

特表2011-507968 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K

A 6 1 P

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)