



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102470146 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201080032449. 6

(22) 申请日 2010. 07. 12

(30) 优先权数据

2009-168928 2009. 07. 17 JP

2010-128057 2010. 06. 03 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 01. 17

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2010/061768 2010. 07. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/007755 JA 2011. 01. 20

(73) 专利权人 爱沃特株式会社

地址 日本国北海道

(72) 发明人 藤森顺也 马场秀运 村田敏规

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 翟赞琪

(51) Int. Cl.

A61K 33/00(2006. 01)

A61P 9/00(2006. 01)

A61P 27/02(2006. 01)

A61P 27/06(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 01/10406 A2, 2001. 02. 15, 说明书第7页  
第1-2行, 第9页第21-23行, TABLE 1, 说明书  
第15页第10行, 第10页第4-5行.

WO 98/43621 A1, 1998. 10. 08, 权利要求3.

WO 2008/105731 A1, 2008. 09. 04, 权利要求  
1.

审查员 于秀培

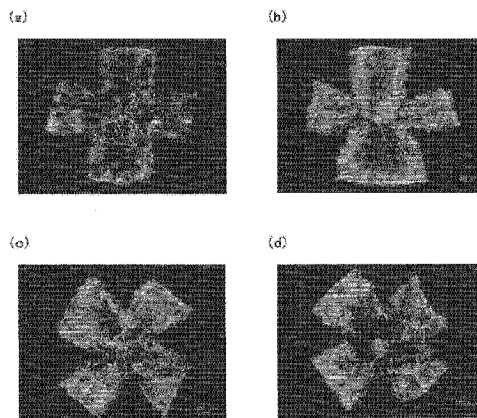
权利要求书1页 说明书17页 附图4页

(54) 发明名称

血管新生控制组合物以及控制血管新生的方法

(57) 摘要

提供一种控制血管新生的组合物,其用于治疗、预防被检体中的与血管新生相伴随的疾病,其中,以有效量含有硝酸盐、亚硝酸盐以及被吸收到被检体中且能够转换成硝酸盐或亚硝酸盐的化合物中的至少一种。还通过如下控制血管新生的方法,提供在内科上控制与血管新生相伴随的疾病特别是眼科疾病中的血管新生、而在不抑制正常的血管新生的情况下能够进行治疗的副作用少、安全性高的对血管新生疾病的治疗、预防有效的组合物、以及使用其的控制血管新生的方法,其中,上述控制血管新生的方法中,将含有有效量的硝酸盐、亚硝酸盐、以及吸收到被检体中且能够转换成硝酸盐或亚硝酸盐的化合物中的至少一种的组合物向被检体给药。



1. 硝酸盐在治疗增殖糖尿病视网膜病的药剂的制造中的用途,该药剂以向被检体给药时提供  $8 \mu \text{ mol/L} \sim 1000 \mu \text{ mol/L}$  的范围内的血浆中硝酸根离子浓度的量,含有硝酸盐,通过将检体中的硝酸根离子浓度维持在有效浓度范围内,来治疗增殖糖尿病视网膜病,所述硝酸盐为碱金属和碱土金属的硝酸盐。

## 血管新生控制组合物以及控制血管新生的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及在治疗、预防与血管新生相伴随的疾病中使用的控制血管新生的组合物、以及控制血管新生的方法。

### 背景技术

[0002] 血管新生 (angiogenesis) 是指以来自组织的成熟血管的内皮细胞增殖以及迁移、重塑作为基本的新的分支血管的形成。近年来,从对于血管新生的细胞生物学的研究途径出发,关于其机理进行了飞跃的阐明。血管新生通过与基于缺血状态的低氧应答,使转录因子 HIF (缺氧诱导因子, hypoxia-inducible factor) 活化,诱导表达 VEGF (血管内皮生长因子, vascular endothelial growth factor) mRNA 而开始。产生的血管内皮增殖因子 VEGF 与在血管内皮细胞中局部存在的 VEGF 受体 (VEGFR) 结合,使细胞内信号传导系统活化。结果,引起细胞外基底膜的分解,经过血管内皮细胞的迁移、增殖、血管内皮细胞的管腔形成、基底膜的形成和周细胞的包围这样的阶段,新生出血管。

[0003] 根据 Murohara T 等, " Nitric oxide and angiogenesis in cardiovascular disease ", Antioxid Redox Signal., Vol. 4, p. 825-831 (2002) (非专利文献 1), 作为与血管新生有关的细胞内信号传导系统, 已知从磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 开始的路径。PI3K 路径中, 确认了内皮型-氧化氮合成酶 (endothelial NO synthase :eNOS) 的活化、基于其的内因性 NO 产生增加, 根据 Noiri E 等, " Podokinesis in endothelial cell migration :role of nitric oxide ", The American Physiological Society, Vol. 274, p. 236-244 (1998) (非专利文献 2)、Ziche M 等, " Nitric Oxide Promotes Proliferation and Plasminogen Activator Production by Coronary Venular Endothelium Through Endogenous bFGF ", Circulation Research, Vol. 80, p. 845-852 (1997) (非专利文献 3)、Dimmeler S 等, " Upregulation of Superoxide Dismutase and Nitric Oxide Synthase Mediates the Apoptosis-Suppressive Effects of Shear Stress on Endothelial Cells ", Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., Vol. 19, p. 656-664 (1999) (非专利文献 4), 目前, 可以认为, 内因性一氧化氮通过血管内皮细胞的增殖、迁移促进作用、细胞凋亡抑制作用, 对血管新生发挥促进作用。

[0004] 临床医学中, 已知血管新生对于创伤治疗以及大量的疾病的进展带来很大影响。作为血管新生相关的疾病, 已知: 早产儿视网膜病、糖尿病视网膜病、老年性黄斑变性、新生血管性青光眼等眼科疾病、风湿性关节炎等炎症性疾病、实体瘤等恶性新生物等, 在这些疾病中, 出现缺乏控制机制的病态的血管新生。眼科疾病中的病态的血管新生的治疗战略一贯是血管新生的抑制、阻碍, 如日本特开 2002-284685 号公报 (专利文献 1)、日本特开 2008-110950 号公报 (专利文献 2) 所公开, 大致分为外科的治疗法和药物治疗法。

[0005] 作为外科的治疗法的代表, 广泛使用激光凝固, 该方法是对于发展的病态不得已进行代偿的组织破坏的方法, 有时引起周边视力的下降、夜间视力的下降、以及色觉的变化。

[0006] 药物治疗中,从血管新生机制的分子生物学的阐明出发,对阻碍与血管新生相关的细胞内信号传导系统的各种阶段的抑制药进行研究、开发。作为 VEGF 抑制药,发明、开发了 VEGF 抗体(贝伐单抗,Bevacizumab)、如日本特开 2008-280356 号公报(专利文献 3)中所记载 VEGF 特异的结合性核酸(哌加他尼钠,Pegaptanib sodium)。这些对于视网膜病中的病态的血管新生的抑制和糖尿病黄斑浮肿有效,但报道了由 VEGF 抗体引起的正常血管的新生抑制、全身的创伤治疗延迟、脑出血、脑血管意外、心肌梗塞以及心绞痛等重大的副作用。

[0007] 另外,根据 Eyal B 等, " T2-TrpRS Inhibits Preretinal Neovascularization and Enhances Physiological Vascular Regrowth in OIR as Assessed by a New Method of Quantification " , Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol. 47, p. 2125-2134(2006)(非专利文献 5),尝试进行通过使用了一氧化氮合成酶抑制药的内源性一氧化氮的产生抑制而带来的病态血管新生的抑制,然而,通过强力地抑制一氧化氮这样的在生理上发挥重要作用的分子,预测到作为视网膜病的原疾病的糖尿病的恶化、血压上升、心肌梗塞以及心绞痛等各种全身的副作用出现。

[0008] 另外,对于 VEGF 抑制药等眼血管治疗药而言,为了减轻全身的副作用而通过玻璃体内注射给药,因此,对患者的负担也大,不用说注射时的眼组织损伤,连晶状体以及视网膜组织也通常具有细菌感染的风险。

[0009] 以往技术文献

[0010] 专利文献 1:日本特开 2002-284685 号公报

[0011] 专利文献 2:日本特开 2008-110950 号公报

[0012] 专利文献 3:日本特开 2008-280356 号公报

[0013] 非专利文献 1:Murohara T 等, " Nitric oxide and angiogenesis in cardiovascular disease " , Antioxid Redox Signal., Vol. 4, p. 825-831(2002)

[0014] 非专利文献 2:Noiri E 等, " Podokinesis in endothelial cell migration:role of nitric oxide " , The American Physiological Society, Vol. 274, p. 236-244(1998)

[0015] 非专利文献 3:Ziche M 等, " Nitric Oxide Promotes Proliferation and Plasminogen Activator Production by Coronary Venular Endothelium Through Endogenous bFGF " , Circulation Research, Vol. 80, p. 845-852(1997)

[0016] 非专利文献 4:Dimmeler S 等, " Upregulation of Superoxide Dismutase and Nitric Oxide Synthase Mediates the Apoptosis-Suppressive Effects of Shear Stress on Endothelial Cells " , Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., Vol. 19, p. 656-664(1999)

[0017] 非专利文献 5:Eyal B 等, " T2-TrpRS Inhibits Preretinal Neovascularization and Enhances Physiological Vascular Regrowth in OIR as Assessed by a New Method of Quantification " , Investigative Ophthalmology & Visual Science, Vol. 47, p. 2125-2134(2006)

[0018] 非专利文献 6:Katsumi Y 等, " Metabolic Fate of Nitric Oxide " , Int Arch Occup Environ Health, Vol. 46, p. 71-77(1980)

[0019] 非专利文献 7:Zhi H 等, " Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control " , The Journal of Clinical

Investigation, Vol. 115, p. 2099-2107 (2005)

[0020] 非专利文献 8:Lois E. H. Smith 等, " Oxygen-Induced Retinopathy in the Mouse", Invest Ophthalmol Vis Sci. Vol. 35, p. 101-111 (1994)

### 发明内容

[0021] 如上所述,与血管新生相伴随的眼科疾病的以往的治疗法的主流是伴随补偿的组织破坏的外科的治疗、或者正常血管新生的抑制、严重的全身性副作用、以及细菌感染的风险高的玻璃体内药物治疗,无法确立令人满意的外科的治疗法以及内科的治疗法。

[0022] 本发明是为了解决上述课题而进行的,其目的在于提供在内科上控制与血管新生相伴随的疾病特别是眼科疾病中的血管新生、能够在不抑制正常的血管新生的情况下进行治疗的副作用少、安全性高的对血管新生疾病的治疗、预防有效的组合物,以及使用其的控制血管新生的方法。

[0023] 为了解决上述课题,本发明人进行了深入的研究,结果发现硝酸盐、亚硝酸盐在医药上允许的安全的给药量下,具有控制血管新生过程的作用。可知,控制特别是眼科疾病中的血管新生,在不抑制正常的血管新生的情况下抑制病态的血管新生,这些化合物作为早产儿视网膜病、糖尿病视网膜病(特别是增殖糖尿病视网膜病)、老年性黄斑变性、新生血管性青光眼等眼科疾病治疗、预防药剂有用,从而完成了本发明。即,本发明如下。

[0024] 本发明为一种控制血管新生的组合物,用于治疗、预防被检体中的与血管新生相伴随的疾病,其特征在于,含有有效量的硝酸盐、亚硝酸盐、以及被吸收到被检体中且能够转换成硝酸盐或亚硝酸盐的化合物中的至少一种。

[0025] 本发明的组合物,优选是通过将被检体中的硝酸根离子浓度维持在有效浓度范围内来控制血管新生的组合物。

[0026] 本发明的组合物,优选以向被检体给药时提供  $8 \mu\text{mol/L} \sim 1000 \mu\text{mol/L}$  的范围内的血浆中硝酸根离子浓度的量,含有硝酸盐、亚硝酸盐以及上述化合物中的至少一种。

[0027] 本发明中,与血管新生相伴随的疾病优选为选自早产儿视网膜病、糖尿病视网膜病、老年性黄斑变性、新生血管性青光眼中的至少任一种眼科疾病。

[0028] 本发明的组合物,优选为医药用组合物,或选自健康食品、功能性食品、特定保健用食品以及营养补助食品中的至少任一种。

[0029] 本发明还提供一种控制血管新生的方法,其中,向被检体给予组合物,所述组合物含有硝酸盐、亚硝酸盐以及被吸收到被检体中且能够转换成硝酸盐或亚硝酸盐的化合物中的至少一种作为有效成分。

[0030] 本发明的方法,优选通过将被检体中的硝酸根离子浓度维持在有效浓度范围内来控制血管新生。

[0031] 本发明的方法,优选使被检体中的血浆中硝酸根离子浓度在  $8 \mu\text{mol/L} \sim 1000 \mu\text{mol/L}$  的范围内。

[0032] 根据本发明,提供在内科上控制与血管新生相伴随的疾病特别是眼科疾病中的血管新生、能够在不抑制正常的血管新生的情况下进行治疗的副作用少、安全性高的对血管新生疾病的治疗、预防有效的组合物,以及使用其的控制血管新生的方法。

### 附图说明

[0033] 图 1 是由实验例 1 的结果得到的视网膜血管的荧光造影照片,图 1(a) 表示给予  $15 \mu\text{mol/kg}$  的亚硝酸钠的情况,图 1(b) 表示给予  $75 \mu\text{mol/kg}$  的亚硝酸钠的情况,图 1(c) 表示给予  $75 \mu\text{mol/kg}$  的硝酸钠给药的情况,图 1(d) 表示给予生理盐水的情况。

[0034] 图 2 是比较在给予生理盐水、 $15 \mu\text{mol/kg}$  硝酸钠、 $15 \mu\text{mol/kg}$  亚硝酸钠、 $75 \mu\text{mol/kg}$  亚硝酸钠的情况时进入玻璃体的异常血管数而示出的图,纵轴为异常血管数(个)。

[0035] 图 3 是表示作为对照给予生理盐水时的视网膜断面的照片。

[0036] 图 4 是由实验例 3 的结果得到的视网膜血管的荧光造影照片,图 4(a) 表示给予  $15 \mu\text{mol/kg}$  的硝酸钠的情况,图 4(b) 表示给予  $15 \mu\text{mol/kg}$  的亚硝酸钠的情况,图 4(c) 表示给予生理盐水的情况。

[0037] 图 5 是由实验例 4 的结果得到的视网膜血管的荧光造影照片,图 5(a) 表示给予硝普钠(SNP) 的情况,图 5(b) 表示给予硝酸甘油(NTG) 的情况,图 5(c) 表示给予  $15 \mu\text{mol/kg}$  的亚硝酸钠的情况。

[0038] 图 6 是由实验例 5 的结果得到的视网膜血管的荧光造影照片,图 6(a) 表示给予 VEGF 抗体的情况,图 6(b) 表示给予  $15 \mu\text{mol/kg}$  的亚硝酸钠的情况。

[0039] 图 7 表示由实验例 6 的结果得到的将  $15 \mu\text{mol/kg}$  的亚硝酸钠在小鼠的颈部皮下给药的情况下的血浆中硝酸根离子浓度的时间推移。

### 具体实施方式

[0040] 一直以来,硝酸盐在包括土壤的自然界中广泛分布,主要是通过绿叶蔬菜的摄取而吸收到人体中。硝酸盐被消化管良好地吸收,进入体循环的硝酸盐的约 25% 被分泌到唾液中。唾液中的硝酸盐的一部分(约 30%) 通过口腔内细菌而被还原成亚硝酸盐,而后直接被消化管再吸收,或者通过胃酸还原至一氧化氮,再被消化管再吸收。有报道称,健康成人的血浆中硝酸根离子浓度为  $10 \mu\text{mol/L} \sim 71 \mu\text{mol/L}$ ,血浆中亚硝酸根离子浓度为  $0.15 \mu\text{mol/L} \sim 1 \mu\text{mol/L}$ 。

[0041] 本发明人发现,早产儿、接受高浓度氧治疗的被检体、糖尿病患者以及高血压症患者等均同样出现血浆中硝酸根离子浓度以及亚硝酸根离子浓度下降,在这些血浆中通过使离子浓度恢复至正常值、或者提高至治疗有效浓度,能够控制血管新生。即,本发明的组合物是为了维持血管新生的恒常性而原本应该处于体内补充硝酸根离子以及亚硝酸根离子的组合物,因此,即使对于新生儿也能够极其安全地应用。

[0042] 本发明的组合物为一种控制血管新生的组合物,其用于治疗、预防被检体中的与血管新生相伴随的疾病,其中,以在与血管新生相伴随的疾病的预防中有效的量,含有硝酸盐、亚硝酸盐以及被吸收到被检体中且能够转换成硝酸盐或亚硝酸盐的化合物中的至少一种(以下,将这些总称为“有效成分”)。

[0043] 本发明中的硝酸盐、亚硝酸盐只要是由无机阴离子(硝酸根离子: $\text{NO}_3^-$ 、亚硝酸根离子: $\text{NO}_2^-$ ) 和阳离子形成的医药上允许的盐即可,例如,作为阳离子,可以使用碱金属、碱土金属或者有机碱。例如,作为碱金属,优选为钠、钾,作为碱土金属,优选为钙、镁,作为有机碱,优选为精氨酸、赖氨酸。

[0044] 另外,本发明中的被吸收到被检体中且能够转换成硝酸盐或亚硝酸盐的化合物是

指通过口服给药、非口服给药被吸收,迅速地进行代谢,以硝酸盐或亚硝酸盐的形式循环全身的化合物。作为这样的化合物,如 Katsumi Y 等, " Metabolic Fate of Nitric Oxide " , Int Arch Occup Environ Health, Vol. 46, p. 71-77 (1980) (非专利文献 6) 中所记载,可以列举一氧化氮等氮氧化物。

[0045] 需要说明的是,关于本发明的组合物,对于硝酸盐,报道了特别严重的副作用,对于亚硝酸盐,报道了作为急性以及亚急性毒性的高铁血红蛋白血症。但是,发挥本发明的效果的亚硝酸盐给药量,为与啮齿类中报道的高铁血红蛋白血症相关的最大无作用量(亚硝酸钠为 84mg/kg/天)的约 1/8 以下,即使对于新生儿也能够提供安全的治疗法。

[0046] 本发明中的利用硝酸盐以及亚硝酸盐的血管新生控制机制,如上所述,内因性一氧化氮具有血管内皮细胞的增殖、迁移促进作用,对血管新生发挥重要的作用,因此,可以推测例如 Zhi H 等, " Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control " , The Journal of Clinical Investigation, Vol. 115, p. 2099-2107 (2005) (非专利文献 7) 所记载的与在组织缺血状态下进行的从亚硝酸根离子向一氧化氮的转换机制相关。但是,如后述的实验例 4 所证明,在硝普钠(SNP)和硝酸甘油(NTG)等常用一氧化氮供体药中,没有观察到视网膜病的恶化、或者血管新生控制效果,因此,本发明的该效果是限定于硝酸盐以及亚硝酸盐的极其特异的药理作用。即,本发明的利用硝酸盐以及亚硝酸盐的血管新生控制效果,并不是简单地通过一氧化氮的供给量增加引起的效果,可以推测,与由本发明人发现的利用硝酸盐的生体内一氧化氮的产生控制以及血管内皮增殖因子(VEGF)的表达控制机制相关。

[0047] 本发明的组合物,优选为通过将被检体中的硝酸根离子浓度维持在有效浓度范围内来控制血管新生。由此,能够控制眼科疾病、炎症性疾病以及恶性新生物中的血管新生,特别是对于选自早产儿视网膜病、糖尿病视网膜病、老年性黄斑变性、新生血管性青光眼中的至少任一种眼科疾病中的血管新生的控制有效。根据这样的本发明的组合物,能够在不抑制正常的血管新生的情况下抑制病态的血管新生,抑制视网膜中的无血管区的减少、在玻璃体内中的病态的血管新生。

[0048] 在此考虑到:亚硝酸盐被血红蛋白迅速氧化,大部分以硝酸盐的形式在血液中存在(亚硝酸根离子为硝酸根离子的 5% 以下),以及如上所述两盐肠-唾液腺循环等能够在被检体内相互地转换,因此例如,本发明的组合物的治疗有效浓度在血浆中能够以硝酸根离子浓度进行规定。即,本发明的组合物优选,以向被检体给药时提供在  $8 \mu\text{mol/L} \sim 1000 \mu\text{mol/L}$  的范围内(优选  $16 \mu\text{mol/L} \sim 400 \mu\text{mol/L}$  的范围内、更优选  $32 \mu\text{mol/L} \sim 200 \mu\text{mol/L}$  的范围内)的血浆中硝酸根离子浓度的量,含有有效成分。在向被检体给药时,血浆中硝酸根离子浓度低于  $8 \mu\text{mol/L}$  的情况下,无法充分地发挥血管新生的控制效果,有可能导致疾病的治疗、预防变得不充分,相反在向被检体给药时血浆中硝酸根离子浓度超过  $1000 \mu\text{mol/L}$  的情况下,有时偶尔造成在视网膜病等中出血倾向上升。需要说明的是,关于该血浆中硝酸根离子浓度,可以通过使用高效液相与血浆中夹杂成分分离,直接通过吸光光度测定法、或应用格里斯法等来确定。

[0049] 本发明的组合物作为医药用组合物,可以是作为医药的制剂,另外,可以应用作为选自健康食品、功能性食品、特定保健用食品以及营养补助食品中的至少任一种的所谓的辅助品等。

[0050] 本发明的组合物由于硝酸盐、亚硝酸盐容易在水中溶解,从消化管的吸收性良好,因此,不论非口服、口服,均能够使用多种的给药形式。作为非口服的给药路径,能够通过包含例如静脉内、腹腔内、肌肉内、皮下、肺内、鼻腔内、外用局部的多种路径进行给药,作为剂型,可以列举注射剂、吸入剂等。另一方面,作为口服给药剂型,可以列举片剂、胶囊剂、颗粒剂、散剂、内用液剂等,通过这些制剂制备为胃崩解剂、肠溶剂、或者释放控制型,能够在消化管的期望部位释放硝酸盐以及亚硝酸盐。这些制剂,可以使用广泛使用的制剂技术,注意配合变化,使用医药上允许的医药品添加物形成制剂。需要说明的是,硝酸盐、亚硝酸盐的生物学的半衰期短,为 3 小时~5 小时,因此,进行释放控制的制剂是使用发挥本发明的效果的剂型。

[0051] 本发明的组合物的给药量,根据年龄、体重、疾病的程度、给药形式或给药路径而不同,但只要能够发挥上述药理作用、并且所产生的副作用在能够允许的范围内,则没有特别的限定。作为具体的给药量,例如,在小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型中皮下注射亚硝酸钠  $15 \mu\text{mol/kg/天}$  时,最大血浆中硝酸根离子浓度达到  $100 \mu\text{mol/L}$  上下,能够在不抑制正常的视网膜血管新生的情况下抑制病态的血管新生。

[0052] 另外,本发明的组合物的给药期间没有特别的限定,如后述的实验例 3 中所证明,本发明的组合物,能够控制血管新生过程,在不抑制正常的血管新生的情况下抑制病态的血管新生,因此,优选在病态的血管新生产生后尽可能早地给药。例如,对于为了治疗、预防而应用本发明的组合物的与血管新生相伴随的疾病为选自早产儿视网膜病、糖尿病视网膜病、老年性黄斑变性、新生血管性青光眼中的至少任一种眼科疾病的情况而言,优选从观察到伴随眼科疾病的病态的血管新生的症候的时间点开始,进行给药直至正常血管的新生充分进行、组织缺血状态缓和。

[0053] 另外,将本发明的组合物用于预防也是有效的,在早产儿视网膜病的情况下,从氧治疗中开始给予本药剂,另外,在糖尿病视网膜病的情况下,从观察到视网膜血管的出血、浮肿的时间点开始给药本药剂,由此,能够防止症状的恶化。

[0054] 本发明还提供一种控制血管新生的方法,其中,向被检体给予将含有硝酸盐、亚硝酸盐、以及被吸收到被检体中且能够转换成硝酸盐或亚硝酸盐的化合物中的至少一种作为有效成分的组合物。本发明的方法中的细节,关于本发明的组合物与上述同样。

[0055] 本发明的方法中,关于本发明的组合物与上述同样,优选通过将被检体中的硝酸根离子浓度维持在有效浓度范围内来控制血管新生,优选使被检体中的血浆中硝酸根离子浓度为  $8 \mu\text{mol/L} \sim 1000 \mu\text{mol/L}$  的范围内。

[0056] 另外,本发明的方法可以期待对与血管新生相伴随的疾病的的治疗以及创伤的治疗,特别是与血管新生相伴随的疾病,优选为选自早产儿视网膜病、糖尿病视网膜病、老年性黄斑变性、新生血管性青光眼中的至少任一种眼科疾病,此时,本发明的组合物向被检体的给药,优选从眼底检查中观察到病态的血管新生的症候的时间点开始,进行给药直至正常血管的新生充分进行、组织缺血状态缓和。

[0057] 以下,列举实验例对本发明进行更加详细地说明,但本发明并不限于这些。

[0058] < 实验例 1:硝酸盐、亚硝酸盐的视网膜无血管区改善效果的评价 >

[0059] 通过作为在体内的视网膜血管新生疾病的病态模型广泛使用的小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型,评价硝酸钠或者亚硝酸钠的视网膜无血管区改善效果。

[0060] (被试化合物注射液的制备)

[0061] 将作为被试化合物的硝酸钠或亚硝酸钠溶解在注射用生理盐水中,制备  $3 \mu\text{mol/L} \sim 15 \mu\text{mol/L}$  的被试化合物注射液。

[0062] (实验方法)

[0063] 实验动物使用 C57BL/6J 小鼠 (SLC)。小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型基于 Smith 等的方法 (例如, 参照 Lois E. H. Smith 等, "Oxygen-Induced Retinopathy in the Mouse", Invest Ophthalmol Vis Sci. Vol. 35, p. 101-111 (1994) (非专利文献 8)) 进行。将新生仔鼠从出生后第 7 日 (P7) 至第 12 日 (P12) 与母小鼠一起在通过氧控制装置 (PRO-OX110、Reming Bioinstruments Co 制) 控制为高氧 ( $75 \pm 1\% \text{O}_2$ ) 状态的笼内饲养。在出生后第 12 日 (P12) 将新生仔鼠放回至大气压条件下 ( $21\% \text{O}_2$ ), 饲养至出生后第 17 日 (P17), 由此, 引起视网膜血管新生。在出生后第 7 日 (P7) ~ 第 16 日 (P16) 的 10 日期间, 1 日 1 次颈部皮下注射硝酸钠或者亚硝酸钠  $15 \mu\text{mol/kg}$  或  $75 \mu\text{mol/kg}$ 。另外, 作为对照, 代替被试化合物同样地皮下注射注射用生理盐水。

[0064] 在出生后第 17 日 (P17) 通过给予苯巴比妥使小鼠深度麻醉, 从左心室将分子量  $2 \times 10^6$  的荧光素结合右旋糖苷 (FITC-dextran; Sigma 制) 以  $50\text{mg/animal}$  进行全身灌流。灌流后, 摘下眼球, 在 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中固定 4 小时 ~ 12 小时。固定后, 从眼球中切除角膜以及晶状体, 用微型钳子除去残存的玻璃体动脉。将视网膜在显微镜下剥离后, 形成扁平状态, 用 VECTASHIELD (Vector Laboratories Inc 制) 包埋, 制作视网膜伸展标本。

[0065] (视网膜无血管区的评价法)

[0066] 视网膜平置 (フラットマウント) 标本在荧光倒置显微镜下 (オリンパス IX71) 使用高感光度 CCD 照相机进行拍摄。对于获得的图像, 使用 Photoshop CS4 extended 计算出视网膜总面积以及视网膜无血管区面积, 通过下式计算出视网膜无血管区面积比。

[0067] 视网膜无血管区面积比 = 视网膜无血管区面积 ( $\mu\text{m}^2$ )  $\div$  视网膜总面积 ( $\mu\text{m}^2$ )  $\times 100$

[0068] (结果以及效果)

[0069] 图 1 是由实验例 1 的结果得到的视网膜血管的荧光造影照片, 图 1(a) 表示  $15 \mu\text{mol/kg}$  的亚硝酸钠给药的情况, 图 1(b) 表示  $75 \mu\text{mol/kg}$  的亚硝酸钠给药的情况, 图 1(c) 表示  $75 \mu\text{mol/kg}$  的硝酸钠给药的情况, 图 1(d) 表示生理盐水给药的情况。另外, 将各种情况下的视网膜无血管区面积、视网膜总面积以及计算出的视网膜无血管区面积比的平均值示于表 1。

[0070]

表1

	视网膜无血管区面积( $\mu\text{m}^2$ )	视网膜总面积( $\mu\text{m}^2$ )	视网膜无血管区面积比
15 $\mu\text{mol/kg}$ 亚硝酸钠	417863.94	6483871.44	6.44%
75 $\mu\text{mol/kg}$ 亚硝酸钠	571705.28	5711629.25	10.01%
75 $\mu\text{mol/kg}$ 硝酸钠	842271.02	6629478.87	12.7%
生理盐水	1058286.827	6502029.511	16.28%

[0071] 在视网膜血管新生疾病的病态模型中,关于硝酸盐,与对照组比较确认到约 20% 的视网膜无血管区的减少,关于亚硝酸盐,与对照组比较确认到约 40%~60% 的视网膜无

血管区的减少。由这些结果可知,硝酸盐以及亚硝酸盐在不抑制正常的视网膜血管新生的情况下控制病态的血管新生,具有改善视网膜无血管区的效果。

[0072] < 实验例 2 :病态的血管新生抑制效果的评价 >

[0073] 通过小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型,评价硝酸钠以及亚硝酸钠的病态的血管新生抑制效果。

[0074] (被试化合物注射液的制备)

[0075] 将作为被试化合物的硝酸钠或亚硝酸钠溶解在注射用生理盐水中,制备  $3 \mu\text{mol/L} \sim 15 \mu\text{mol/L}$  的被试化合物注射液。

[0076] (实验方法)

[0077] 实验动物使用 C57BL/6J 小鼠 (SLC)。小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型的制作基于实验例 1 进行。从出生后第 7 日 (P7) ~ 第 16 日 (P16) 的 10 日期间,1 日 1 次颈部皮下注射硝酸钠或亚硝酸钠  $15 \mu\text{mol/kg}$  或  $75 \mu\text{mol/kg}$ 。另外,作为对照,同样地皮下注射注射用生理盐水代替被试化合物。

[0078] 在出生后第 17 日 (P17) 通过给予苯巴比妥使小鼠安乐死,与视神经一起摘下眼球。将眼球在生理盐水中清洗,切除其余的组织,在 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中固定 12 小时。固定后,将眼球依次浸渍到 70% ~ 100% 的上升乙醇系列中,进行脱水,石蜡包埋。将所得到的石蜡块以  $50 \mu\text{m}$  间隔、与视神经平行地切割成厚度  $4 \mu\text{m}$  的薄片,用苏木紫、曙红染色 (HE 染色) 后,通过倒置显微镜 (オリンパス IX71) 观察视网膜薄切标本,计数将内界膜破碎并进入到玻璃体中的病态的血管数。

[0079] (结果以及效果)

[0080] 图 2 是将在生理盐水、 $15 \mu\text{mol/kg}$  硝酸钠、 $15 \mu\text{mol/kg}$  亚硝酸钠、 $75 \mu\text{mol/kg}$  亚硝酸钠给药的情况下进入玻璃体的异常血管数进行比较而示出的图,纵轴为异常血管数 (个)。另外,图 3 是表示作为对照的生理盐水给药的情况下的视网膜断面的照片。图 3 中可知,在用箭头表示的部分中,出现将视网膜内界膜破碎并进入到玻璃体侧的异常血管。由图 2 所示的图可知,将视网膜内界膜破碎并进入到玻璃体中的病态的血管数,随着硝酸钠或亚硝酸钠的给药而减少。另外,具有病态的血管数随着亚硝酸盐给药量的增加而减少的倾向,在  $75 \mu\text{mol/kg}$  亚硝酸盐给药组中,与对照组比较观察到约 30% 的病态的血管的减少。由这些结果可知,硝酸盐以及亚硝酸盐具有在不抑制正常的血管新生的情况下抑制玻璃体内的病态的血管新生的效果。

[0081] < 实验例 3 :硝酸盐、亚硝酸盐的视网膜血管新生控制效果的评价 >

[0082] 在小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型中,75% 氧给药后,从出生后第 12 日 (P12) 开始将新生仔鼠放回到室内空气中,饲养至出生后第 17 日 (P17),由此,引起视网膜血管新生。通过从视网膜血管新生的开始时 (P12) 进行硝酸钠或亚硝酸钠给药,对本发明的血管新生控制效果进行更加明确地研究。

[0083] (被试化合物注射液的制备)

[0084] 将作为被试化合物的硝酸钠或亚硝酸钠溶解在注射用生理盐水中,制备  $3 \mu\text{mol/ml}$  的被试化合物注射液。

[0085] (实验方法)

[0086] 小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型的制作、视网膜血管荧光造影法以及视网膜伸

展标本的制作法基于实验例 1 进行。但是,在出生后第 12 日 (P12) ~第 16 日 (P16) 的 10 日期间 1 日 1 次颈部皮下注射硝酸钠或亚硝酸钠  $15 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 。另外,作为对照,同样的期间皮下注射注射用生理盐水代替被试化合物。

[0087] (视网膜无血管区的评价法)

[0088] 基于实验例 1 计算。

[0089] (结果以及效果)

[0090] 图 4 是由实验例 3 的结果得到的视网膜血管的荧光造影照片,图 4(a) 表示  $15 \mu\text{mol}/\text{kg}$  的硝酸钠给药的情况,图 4(b) 表示  $15 \mu\text{mol}/\text{kg}$  的亚硝酸钠给药的情况,图 4(c) 表示生理盐水给药的情况。另外,将各种情况下的视网膜无血管区面积、视网膜总面积以及计算出的视网膜无血管区面积比的平均值示于表 2。

[0091]

表2

	视网膜无血管区面积( $\mu\text{m}^2$ )	视网膜总面积( $\mu\text{m}^2$ )	视网膜无血管区面积比
15 $\mu\text{mol/kg}$ 硝酸钠	506451.72	5782966.84	8.76%
15 $\mu\text{mol/kg}$ 亚硝酸钠	621218.70	6688088.68	9.3%
生理盐水	1060520.67	6629788.95	16.0%

[0092] 在从视网膜血管新生开始给予硝酸钠或亚硝酸钠的情况下,观察到与对照组比较约 40%的视网膜无血管区的减少。由该结果可知,硝酸盐以及亚硝酸盐具有如下效果:控

制血管新生过程,在不抑制正常的血管新生的情况下抑制病态的血管新生,使视网膜无血管区减少。

[0093] < 实验例 4 :亚硝酸盐与广泛使用的一氧化氮供体药的视网膜无血管区改善效果的比较 >

[0094] 使用小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型,对于作为心绞痛和降压药广泛使用的一氧化氮供体药,考察视网膜无血管区改善效果的有无,明确本发明的效果的特异性。

[0095] (被试化合物注射液、比较例注射液的制备)

[0096] 将作为被试化合物的亚硝酸钠溶解到注射用生理盐水中,制备  $3 \mu\text{mol/ml}$  的被试化合物注射液。作为比较例,选择作为非酶的一氧化氮供体药的确普钠 (SNP) 以及作为酶的一氧化氮供体药的硝酸甘油 (NTG)。将 SNP 二水合物溶解到注射用生理盐水中,制备  $0.4 \mu\text{mol/ml}$  的比较例注射液。另外,关于 NTG,使用硝酸甘油注 50mg “HK”(光制药)以原液的状态作为比较例注射液。

[0097] (实验方法)

[0098] 小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型的制作、视网膜血管荧光造影法以及视网膜伸展标本的制作基于实验例 1 进行。出生后第 7 日 (P7) ~ 第 16 日 (P16) 的 10 日期间 1 日 1 次颈部皮下注射亚硝酸钠、SNP 以及 NTG,分别给药  $15 \mu\text{mol/kg}$ 、 $2 \mu\text{mol/kg}$ 、 $20 \mu\text{mol/kg}$ 。

[0099] (视网膜无血管区的评价法)

[0100] 基于实验例 1 计算。

[0101] (结果以及效果)

[0102] 图 5 是由实验例 4 的结果得到的视网膜血管的荧光造影照片,图 5(a) 表示确普钠 (SNP) 给药的情况,图 5(b) 表示硝酸甘油 (NTG) 给药的情况,图 5(c) 表示  $15 \mu\text{mol/kg}$  的亚硝酸钠给药的情况。另外,将各种情况下的视网膜无血管区面积、视网膜总面积以及计算出的视网膜无血管区面积比的平均值示于表 3。

[0103]

表3

	视网膜无血管区面积( $\mu\text{m}^2$ )	视网膜总面积( $\mu\text{m}^2$ )	视网膜无血管区面积比
SNP 给药	1076584.43	6443554.78	16.7%
NTG 给药	1456421.33	6817842.90	21.36%
15 $\mu\text{mol/kg}$ 亚硝酸钠	417863.94	6483871.44	6.44%

[0104] 在视网膜血管新生疾病的病态模型中,关于 SNP,与亚硝酸盐给药组比较观察到约 2.5 倍的视网膜无血管区的增大,另外关于 NTG,观察到约 3.3 倍的视网膜无血管区的增大。SNP 以及 NTG 均没有观察到作为视网膜病的典型症状的无血管区的改善,因此可知,本发明的效果是硝酸盐、亚硝酸盐特异的效果。

[0105] < 实验例 5 :作为视网膜病治疗药的亚硝酸盐与 VEGF 抑制药的比较 >

[0106] 使用小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型,对于亚硝酸盐和进行性大肠癌或老年性黄斑变性的治疗中使用的 VEGF 抗体的视网膜病改善效果进行比较。

[0107] (被试化合物注射液、比较例注射液的制备)

[0108] 将作为被试化合物的亚硝酸钠溶解到注射用生理盐水中,制备  $3 \mu\text{mol}/\text{ml}$  的被试化合物注射液。作为比较例,将小鼠单克隆的 VEGF 抗体 (SANTACRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. 制) 浓缩,制备  $500 \mu\text{g IgG}/\text{ml}$  的比较例注射液。

[0109] (实验方法)

[0110] 小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型的制作、视网膜血管荧光造影法以及视网膜伸展标本的制作基于实验例 1 进行。在出生后第 7 日 (P7) ~ 第 16 日 (P16) 的 10 日期间 1 日 1 次颈部皮下注射亚硝酸钠  $15 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 。另外,在氧给药结束时 (生后第 12 日) 切开小鼠眼睑,通过安装有 33G 注射针的微量注射器将 VEGF 抗体从角膜边缘注入玻璃体内。

[0111] (视网膜无血管区的评价法)

[0112] 基于实验例 1 计算。

[0113] (结果以及效果)

[0114] 图 6 是由实验例 5 的结果得到的视网膜血管的荧光造影照片,图 6(a) 表示 VEGF 抗体给药的情况,图 6(b) 表示  $15 \mu\text{mol}/\text{kg}$  的亚硝酸钠给药的情况。另外,将各种情况下的视网膜无血管区面积、视网膜总面积以及计算出的视网膜无血管区面积比的平均值示于表 4。

[0115]

表4

	视网膜无血管区面积( $\mu\text{m}^2$ )	视网膜总面积( $\mu\text{m}^2$ )	视网膜无血管区面积比
VEGF抗体	1186758.21	6357103.66	18.7%
15 $\mu\text{mol/kg}$ 亚硝酸钠	621218.70	6688088.68	9.3%

[0116] 从视网膜无血管区的减少出发评价亚硝酸盐和 VEGF 抗体的视网膜病改善效果时, VEGF 抗体给药组的视网膜无血管区的比例为 18.7%, 相对于此, 亚硝酸盐给药组为

9.3%，观察到显著的视网膜无血管区的减少。由该结果可知，在 VEGF 抗体的血管新生抑制作用中没有选择性，不仅抑制病态的血管新生也抑制正常血管的新生。相对于此，亚硝酸盐由于在不抑制正常的血管新生的情况下抑制病态的血管新生，因此，具有使视网膜的无血管区减少的效果。本发明与 VEGF 抗体比较，如上所述，全身的副作用少，在视网膜中没有残留无血管区，即使在能够进行治疗的方面也优良。

[0117] < 实验例 6 :产生血管新生控制效果的最佳血浆中硝酸根离子浓度的推测 >

[0118] 使用小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型，推测通过本发明的组合物给药对与血管新生相伴随的眼科疾病观察到显著的治疗、预防效果的情况下的最佳的血浆中硝酸根离子浓度。

[0119] (被试化合物注射液的制备)

[0120] 将作为被试化合物的硝酸钠或亚硝酸钠溶解在注射用生理盐水中，制备  $3 \mu\text{mol/L} \sim 15 \mu\text{mol/L}$  的被试化合物注射液。

[0121] (实验方法)

[0122] 实验动物使用 C57BL/6J 小鼠 (SLC)。小鼠高氧负荷视网膜血管新生模型的制作基于实验例 1 进行。在 75% 氧给药结束时的出生后第 12 日 (P12) 通过颈部皮下注射，以本发明中观察到显著的治疗、预防效果的给药量即  $15 \mu\text{mol/kg}$ 、 $75 \mu\text{mol/kg}$  以及  $150 \mu\text{mol/kg}$  进行硝酸钠或亚硝酸钠单次给药。给药后，经时地在异氟烷麻醉下从小鼠腹部大动脉采集血液  $150 \mu\text{l}$ 。血浆中硝酸根离子浓度的测定，通过使用下述条件的正相色谱柱的离子交换色谱法进行。

[0123] (离子交换色谱法条件)

[0124] ● 分离色谱柱: Asahipak NH2P-50 4E (4.6mm×250mm)

[0125] ● 保护色谱柱: Inertsil NH2 (5  $\mu\text{m}$ ) (4mm×10mm)

[0126] ● 流动相: 10mM 磷酸二氢钠、150mM 高氯酸钠、pH5.0

[0127] ● 流速: 0.7ml/分钟

[0128] ● 检测波长: 210nm

[0129] (结果以及效果)

[0130] 图 7 表示由实验例 6 的结果得到的将  $15 \mu\text{mol/kg}$  的亚硝酸钠在小鼠的颈部皮下给药的情况下的血浆中硝酸根离子浓度的时间推移。另外，将硝酸钠  $15 \mu\text{mol/kg}$ 、 $75 \mu\text{mol/kg}$  以及  $150 \mu\text{mol/kg}$  在颈部皮下给药的情况下的最高血浆中硝酸根离子浓度的平均值示于表 5。

[0131] 表 5

[0132]

	单次给药后的最高血浆中酸离子浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )
15 $\mu\text{mol/kg}$ 硝酸钠	135.38
75 $\mu\text{mol/kg}$ 硝酸钠	194.9
150 $\mu\text{mol/kg}$ 硝酸钠	390.26

[0133] 由图 7 可知，亚硝酸盐在给药后 1 小时以内进入血中，其大部分迅速地通过血红蛋白氧化成硝酸盐，在全身循环。即，本发明中，为了即使将含有亚硝酸盐的组合物向被检体给药的情况下也得到本发明的治疗、预防效果，代替测定微量的血浆中亚硝酸根离子浓

度,能够以在血浆中硝酸根离子浓度的测定以及管理代用。由表 5 的结果可知,得到本发明的治疗、预防效果的最佳的最高血浆中硝酸根离子浓度在硝酸钠 150  $\mu\text{mol/kg}$  给药的情况下,其值为约 400  $\mu\text{mol/L}$ 。

[0134] 应该认为本次公开的实施方式以及实验例在所有方面为例示,没有进行限制。本发明的范围并不是上述的说明,而通过权利要求示出,是指包括在与权利要求同等的含义以及范围内的所有变更。

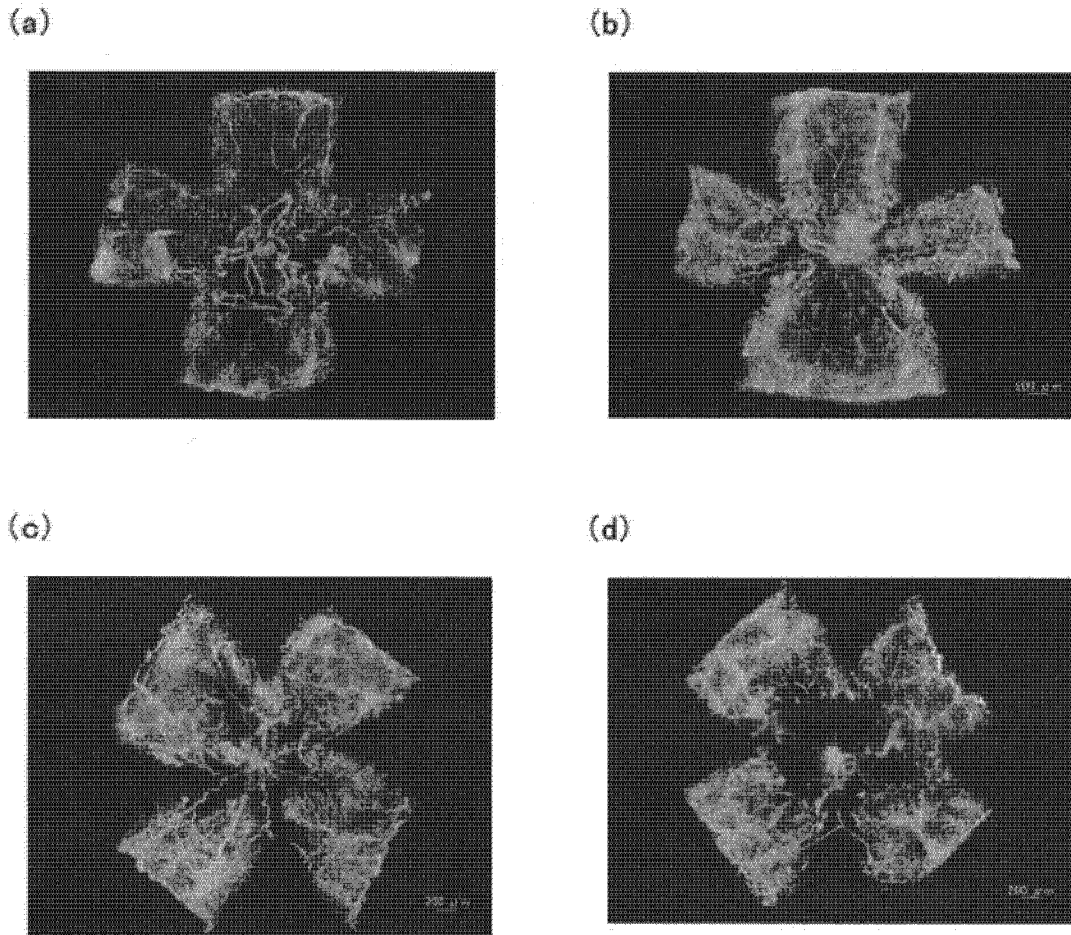


图 1

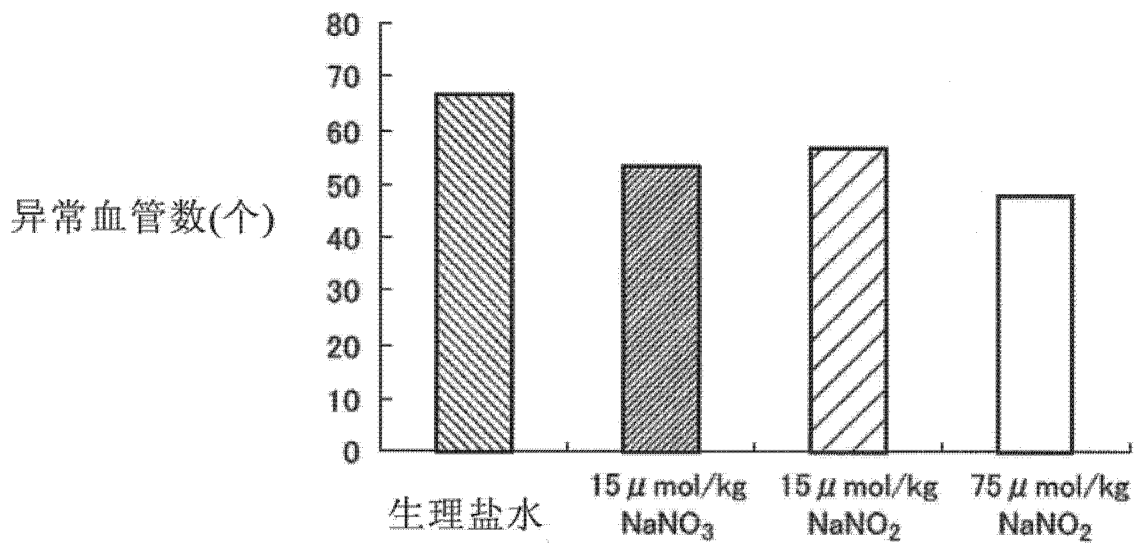


图 2

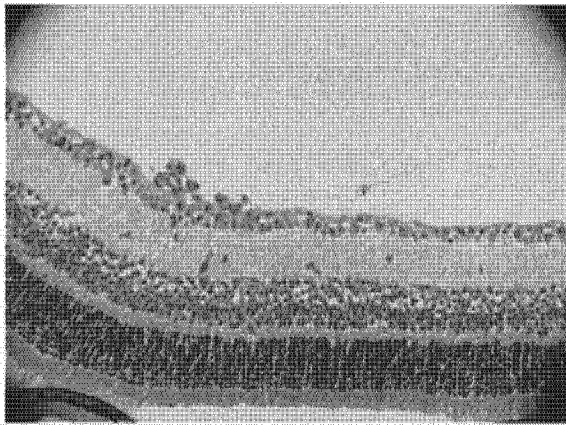


图 3

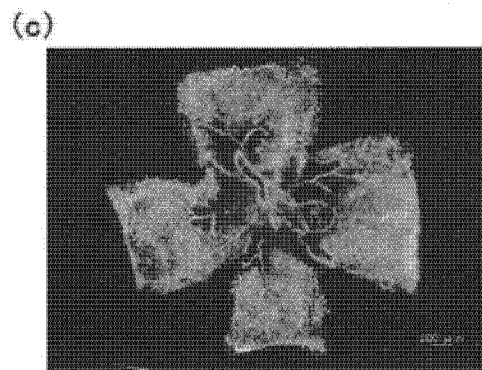
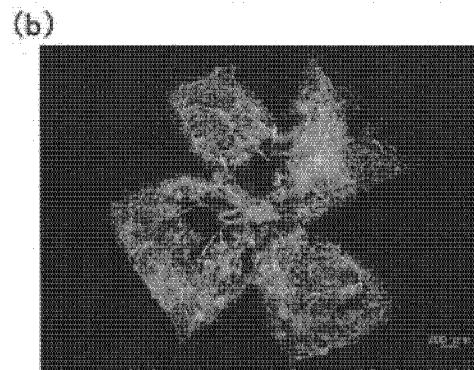
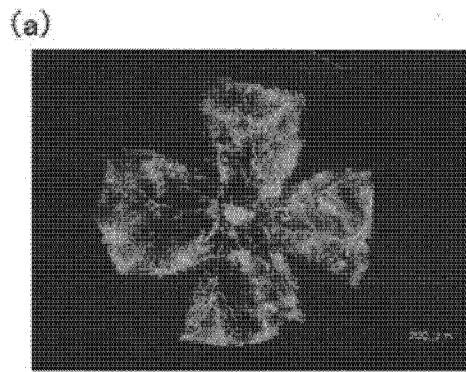
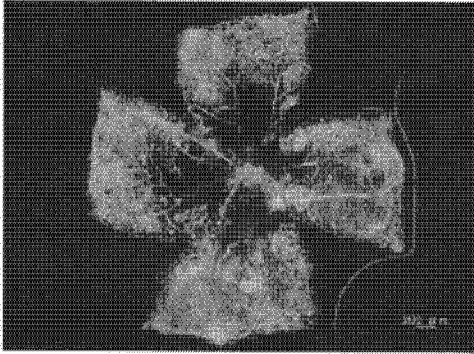
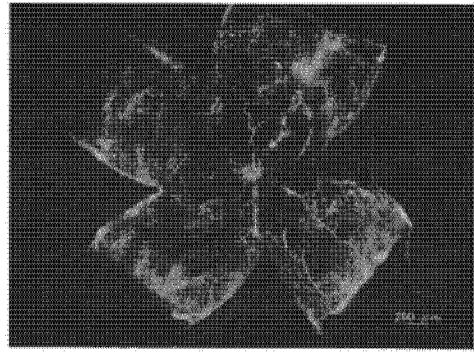


图 4

(a)



(b)



(c)

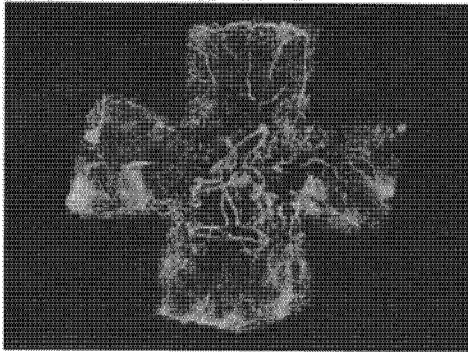
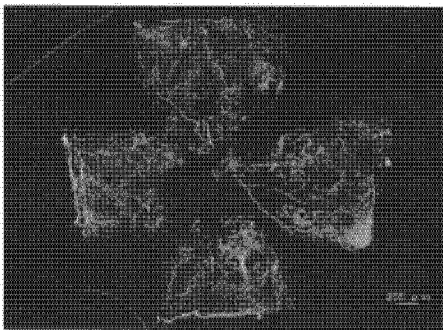


图 5

(a)



(b)

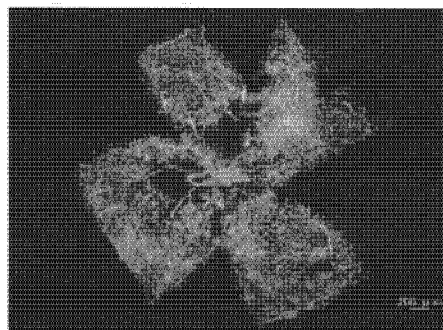


图 6

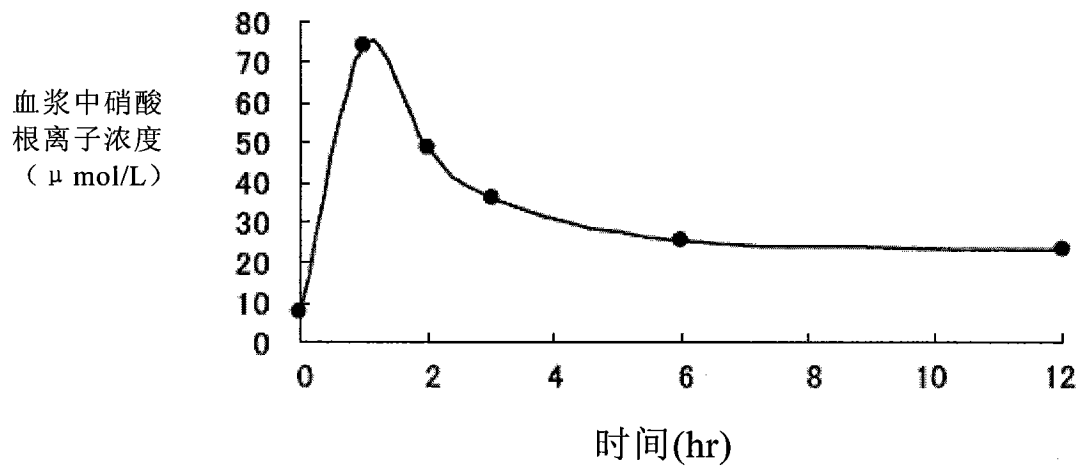


图 7