

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-501657

(P2011-501657A)

(43) 公表日 平成23年1月13日(2011.1.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 B O 6 3
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-527497 (P2010-527497)	(71) 出願人	505045610
(86) (22) 出願日	平成20年10月3日 (2008.10.3)		サントル ナショナル ドウ ラ ルシェ
(85) 翻訳文提出日	平成22年4月27日 (2010.4.27)		ルシュ スィヤンティフィック (セーエヌ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2008/001391		エルエス)
(87) 国際公開番号	W02009/080910		CENTRE NATIONAL DE
(87) 国際公開日	平成21年7月2日 (2009.7.2)		LA RECHERCHE SCIENT
(31) 優先権主張番号	07/06999		IFIQUE (CNRS)
(32) 優先日	平成19年10月5日 (2007.10.5)		フランス国 F-75794 パリ セデ
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ックス 16 リュ ミッシュル-アンジ
			ユ 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 呼吸器系疾患の治療に使用することができる化合物をスクリーニングする方法

(57) 【要約】

本発明は、哺乳動物における呼吸器系疾患の治療に使用することができる候補分子を同定するためのスクリーニング方法の使用に関し、前記スクリーニング方法は、試験分子の存在下における T A S K 2 ポリペプチドの機能的活性が、前記試験分子の不在下における T A S K 2 ポリペプチドの機能的活性と比較して、低減または除去されるかどうかを測定し、試験分子が前記機能的活性を低減または除去する場合に該試験分子は候補分子とみなされることを含むステップを有する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物における中枢神経系の機能障害に起因する呼吸器系疾患の治療に使用することができる候補分子を同定するためのスクリーニング方法の使用であって、前記スクリーニング方法は、試験分子の存在下における T A S K 2 ポリペプチドの機能的活性が、前記試験分子の不在下における T A S K 2 ポリペプチドの機能的活性と比較して低下または除去されるかどうかを測定し、試験分子が前記機能的活性を低減または除去する場合に該試験分子は候補分子とみなされるステップを含むことを特徴とする、使用。

【請求項 2】

T A S K 2 ポリペプチドの機能的活性が低減または除去されるかどうかを測定するステップは、

i) 機能的活性を示す T A S K 2 ポリペプチドを発現する細胞を前記試験分子と接触させること、および

ii) 前記試験分子の存在下で、T A S K 2 ポリペプチドの機能的活性およびその発現のうち少なくともいずれか一方を計測すること

を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記細胞は T A S K 2 ポリペプチドを内在性のものとして発現する、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

前記細胞は T A S K 2 ポリペプチドを組換え型として発現する、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 5】

前記機能的活性は、T A S K 2 ポリペプチドを横断するイオン流の計測、T A S K 2 ポリペプチドを発現する細胞の膜電位の変化の計測、T A S K 2 ポリペプチドを発現する細胞の細胞内イオン濃度の変化の計測、からなる群から選択される計測によって測定される、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】

前記機能的活性は T A S K 2 ポリペプチドを横断するイオン流の計測によって測定され、T A S K 2 ポリペプチドを横断するイオン流はルビジウムイオンの流出である、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

睡眠時無呼吸症候群、呼吸器型の乳幼児突然死症候群、高地に起因する病的呼吸のモデルからなる群から選択される中枢神経系の機能障害に起因する呼吸器系疾患の治療に使用することができる分子の同定における、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳動物の呼吸器系疾患の治療に使用することができる化合物をスクリーニングする方法の使用に関する。特に、本発明は呼吸器系疾患の治療に使用することができる新しい候補分子を同定するために使用可能である。

【0002】

以下の記述において、カッコ内の参照番号 (R e f) は実施例の後に提示された参考文献一覧を指す。

【背景技術】

【0003】

生理的必要性に対する中枢性の呼吸の適応は、主として脳幹にある特殊化した神経細胞の電気的活動の変化を伴う、化学感受性の現象である。これらの呼吸神経細胞は小集団をなして分布し、脳幹内で、尾側延髄球の腹外側部から橋背側部まで及び柱状部を形成している (非特許文献 1 および非特許文献 2)。このような理由から、イオンチャネルの欠損

10

20

30

40

50

が、呼吸器系の生理病理学的状態、例えば高地での長期滞在、または睡眠時無呼吸症候群および乳幼児突然死症候群のような様々な疾病に關与することは驚くべきことではない。

【0004】

哺乳動物では、呼吸は動脈血中の3つの化学的パラメータ：

- i) 二酸化炭素の増加、すなわち高炭酸ガス、
 - ii) 血液pHの低下、すなわちアシドーシス、
 - iii) 血中酸素濃度の低下、すなわち低酸素、
- によって制御される。

【0005】

したがって、呼吸を制御する神経回路網の活動は様々な前記パラメータに適応する（非特許文献3）。

10

上記パラメータの変化は化学受容体を用いて計測される。これらの化学受容体は、頸動脈小体の化学受容体により末梢レベルで、また縫線核および後部菱形核にある中枢性化学受容体により脳幹において、pHおよび動脈CO₂分圧における変化を検出する（非特許文献4）。化学受容体の電気信号は、生物体の生理的必要性に対する呼吸活動の適応に關与する。

【0006】

呼吸の調節不全を伴う障害の中でも、睡眠時無呼吸症候群は重大な公衆衛生上の問題である。この症候群は肥満と関係していることが多い。例えば、米国では約300万人の男性および150万人の女性が睡眠時無呼吸症候群を患っている。この症候群は、非特許文献5において示されるように、例えば心疾患を悪化させることにより、該症候群の患者の健康に対して悪影響を及ぼす可能性がある。

20

【0007】

様々な型の睡眠時無呼吸は、睡眠中の病的な呼吸休止（成人では10秒超過、子どもでは8秒超過）を伴い、脳および末梢組織への酸素供給の低下により低酸素症を引き起こす。睡眠時無呼吸症候群の病因は多様であり、根底にあることが考えられる障害に従って分類可能である。例えば、閉塞性睡眠時無呼吸のサブグループは、適切かつ有効な換気を妨げる上気道の閉塞を特徴とする。中枢性睡眠時無呼吸のサブグループは、脳幹における呼吸調節すなわち一時的にのみ機能する呼吸筋の神経制御の機能不全を特徴とする。混合型無呼吸のサブグループは、閉塞性無呼吸が加わった中枢性無呼吸に相当する。

30

【0008】

興味深いことに、中枢性の無呼吸のうちの1つ（「非高炭酸ガス性の中枢性睡眠時無呼吸」）は、低炭酸ガス血症と呼ばれる動脈血中二酸化炭素濃度の低下をもたらす換気亢進の期間を特徴とする。二酸化炭素の減少はひいては脳幹の呼吸中枢の刺激の失敗を引き起こし、その結果呼吸はより長く休止し、その結果として動脈中酸素濃度の低下が誘発される。

【0009】

明らかに、この型の睡眠時無呼吸の患者では低酸素による呼吸の刺激が遅延する。

呼吸における刺激の低下をもたらすいくつかの要因：例えばアルコールおよび精神安定剤のような呼吸に影響を及ぼす物質、または高地での滞在は、睡眠時無呼吸症候群を悪化させる可能性がある。

40

【0010】

現在、睡眠時無呼吸症候群の治療には外科的処置および上気道を陽圧にするデバイスが必要である。

睡眠時の経鼻的持続気道内陽圧法（nCPAP）で構成される呼吸支援による治療は、臨床症状を改善するための現時点で最も有効な方法である。しかしながら、この治療は、患者がマスクによってシステムに恒久的に接続されることを必要とする。したがって、該技術はあまり実際的ではないという事実から、この技術の治療的成功には限界がある。

【0011】

外科手術およびnCPAP治療に加えて、睡眠時無呼吸の患者の呼吸を改善するために

50

、例えばプロゲステロン、テオフィリン、アセタゾラミドおよびプロトリプチリン (p r o t r i p t y l i n) の使用によるいくつかの薬学的な手法が試みられている。

【 0 0 1 2 】

これらの物質は、少なくとも一部の患者で呼吸を刺激することができるとはいえ、該物質のいずれも睡眠時無呼吸症候群の治療に本当に有効であるとは見出されていない。その上、これらの物質の中には大きな副作用を示すものもある。したがって、多くの製薬企業が睡眠時無呼吸症候群を治療するための新しい分子を捜している。

【 0 0 1 3 】

これまで、研究者らは、呼吸を刺激すると思われる T A S K 1 カリウムチャンネル阻害剤の開発に関心を寄せてきた。T A S K 1 チャンネルは、T A S K 1、T A S K 2 および T A S K 3 チャンネルを含むファミリーに属している。該チャンネルは、4つの膜貫通ドメインおよび2つのチャンネルドメインを備えた K + チャンネル (K 2 P チャンネル) である (非特許文献 6)。これらのチャンネルは、モノマー、ヘテロダイマーおよびホモダイマーの形で活性を有する (非特許文献 7、非特許文献 8 および非特許文献 9)。これらのチャンネルは K + 電流を生じ、該 K + 電流は、外界の酸性化により、かつ G タンパク質共役型受容体の活性化後に抑制される (非特許文献 1 0)。該チャンネルは揮発性麻酔薬 (例えばハロタン、イソフルラン) によって活性化される (非特許文献 1 1 を参照)。

【 0 0 1 4 】

T A S K 1 チャンネルは、脳、副腎、血管および心臓に豊富である。T A S K 1 の「ノックアウト」マウスでなされた観察に基づいて、T A S K 1 の遺伝的不活性化は、アルドステロン分泌障害、動脈性高血圧および心電図変化をもたらすことが見出された。さらに、肺高血圧症も観察される場合がある。これらの様々な理由から、T A S K 1 阻害剤の使用は、治療的処置に関して受け入れやすい解決法であるようには思われない。

【 0 0 1 5 】

近年、二重変異型 T A S K 1 / T A S K 3 マウスにおいて高炭酸ガスに応答した中枢性化学感受性は維持される一方、縫線核の化学感受性は排除されることが示された (非特許文献 1 2)。

【 0 0 1 6 】

用語「乳幼児突然死症候群」は、説明のつかない幼い子どもの死亡例に使用され、1歳未満の子どもの死亡の主因である。ほとんどの場合、死因は明らかには特定されないが、呼吸障害が主な役割を果たすようである。リスクを有する子どもについて、呼吸監視システムは利用可能であるが、薬物治療はまだ存在していない。

【 0 0 1 7 】

高地では、低酸素により換気の増大がもたらされ、換気の増大は次に動脈血中二酸化炭素の減少 (低炭酸ガス血症) を引き起こし、その結果動脈血 p H が増大する (呼吸性アルカローシス)。呼吸性アルカローシスは呼吸の調節に影響し、特に睡眠相においては不規則な状態の呼吸をもたらす。呼吸性アルカローシスを抑制することができる物質 (例えばアセタゾラミド) は、腎臓による炭酸水素塩の排泄を増大させることによって動脈血 p H の低下をもたらす。高地での呼吸の状態および随伴症状を改善することが示されている。しかしながら、アセタゾラミドの使用は、例えば電解質のホメオスタシスを乱すことによって副作用を引き起こす可能性がある。

【 0 0 1 8 】

要するに、これらの呼吸器系疾患を治療することが現時点で知られている物質はほとんどなく、既知の物質は有効性が不十分であるか、または長期間の治療における使用を制限する副作用を示す。その上、研究者らは呼吸器系疾患の治療用の新たな候補物質を実証する手段を有していない。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 9 】

【 非特許文献 1 】 R i c h t e r D W , S p y e r K M (2 0 0 1) “ S t u d y i

10

20

30

40

50

- ng rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models". Trends Neurosci, 24, 464 - 472 (Ref 1)
- 【非特許文献2】Feldman JL, Del Negro (2006) "Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm". Nat Rev Neurosci, 7, 232 - 242. (Ref 2)
- 【非特許文献3】Feldman JL et al. (2003) "Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity". Annu Rev Neurosci, 26, 239 - 266 (Ref 3) 10
- 【非特許文献4】Severson et al. (2003) "Midbrain serotonergic neurons are central pH chemoreceptors". Nat Neurosci, 6, 1139 - 1140. (Ref 4)
- 【非特許文献5】Namen et al. (2002) "Increase in Physician-reported sleep apnea: the National Ambulatory Medical Care Survey". Chest 121(6): 1741 - 1747 (Ref 5)
- 【非特許文献6】Goldstein SA et al. (2005), "International Union Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationship of two-Potassium channels". Pharmacol Rev, 57, 527 - 540. (Ref 6) 20
- 【非特許文献7】Czirjak G, Enyedi P (2001), "Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two pore domain potassium channel subunits". J Biol Chem, 277, 5426 - 5432. (Ref 7)
- 【非特許文献8】Kang D et al. (2004), "Functional expression of TASK-1/TASK-3 heteromers in cerebral granule cells". J. Physiol, 554, 64 - 77 (Ref 8) 30
- 【非特許文献9】Berg AP et al. (2004), "Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KNCK3) and TASK-3 (KNCK9) subunits". J. Neurosci, 24, 6693 - 6702 (Ref 9)
- 【非特許文献10】Mathie A (2007) "Neuronal two pore domain potassium channels and their regulation by G protein coupled receptors". J. Physiol, 578, 377 - 385 (Ref 10) 40
- 【非特許文献11】Patel AJ, Honore E (2001) "Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels". Trends Neurosci, 24, 339 - 346 (Ref 11)
- 【非特許文献12】Mulkey et al. (2007) "TASK channel determine pH sensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemosensitivity". J Neurosci, 27, 14049 - 14058. (Ref 12) 50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

したがって、呼吸器系疾患の治療のための新たな候補分子を同定するために使用することが可能な、新たな手段が現実に必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0021】

発明の説明

本発明は特に、哺乳動物の呼吸器系疾患の治療のための候補分子を同定するために使用可能なスクリーニング方法の提供により前述の必要性に対処するものであり、前記スクリーニング方法は、試験分子の存在下におけるTASK 2ポリペプチド(KCNK5)の機能的活性が、前記試験分子の非存在下における前記TASK 2ポリペプチドの機能的活性と比較して低下または除去されるかどうかを測定することで構成されるステップを含む。

10

【0022】

本発明の手法の適用時にTASK 2の活性が低下することが見出されるか、または除去される場合、その試験分子は哺乳動物の呼吸器系疾患の治療のための候補分子であるとみなされる。

【0023】

本発明の発明者らは、KCNK5とも呼ばれるTASK 2チャンネルが脳幹の呼吸中枢のある領域内に存在し、呼吸において驚くべき役割を果たすことを事実上最初に実証した。新生児マウスから得られた脳幹調製物での*in vitro*の実験は、酸素欠乏時に呼吸活動の激しい低下を示す。この低下は、TASK 2チャンネルを無効化したマウスから得られた脳幹調製物では観察されない。したがって、TASK 2の阻害または欠如は酸素欠乏からの保護をもたらす。このデータは、ある種の神経細胞における上記チャンネルの発現が直接的または間接的に化学受容に関係していることを示す。

20

【0024】

本発明の発明者らはまた、直接的または間接的に化学受容に関係することが知られているある種の神経細胞における、上記TASK 2チャンネルの発現も実証した。

本発明者らはさらに、不活性なTASK 2チャンネルについて無効化した突然変異型マウス(TASK 2ノックアウトマウス)は、低酸素時に、野生型マウスが強い呼吸抑制を示すのに対して顕著な呼吸維持を示すことを実証した。これらの結果は、マウスにおいて、*in vivo*では、TASK 2チャンネルの不活性化は低酸素時の換気応答を大きく変更し、結果として呼吸を刺激することを実証している。

30

【0025】

興味深いことに、*in vitro*の細胞培養システムの使用により、低酸素に対するTASK 2プロモータの感度に起因してTASK 2の発現が低酸素の数時間後に低下することが実証された(Brazier et al. (2005) "Cloning of the human TASK-2 (KCNK5) promoter and its regulation by chronic hypoxia". *Biochem Biophys Res Commun* 336: 1251-1258 (Ref 13))。

40

【0026】

そのため、低酸素(例えば高地滞在時)への適応には、TASK 2チャンネルの発現低下による身体の防御機構が含まれる可能性がある。しかしながら、この生理的適応には恐らく数時間を要し、短時間の低酸素への即時型反応には機能しない。

【0027】

このような短時間の低酸素の場合には、TASK 2の薬理的な不活性化が、TASK 2発現の負の調節という防御機構を先取りする助けとなる可能性がある。

さらに、複数の化学感受性呼吸神経細胞群において発現することにより呼吸の調節に同

50

様に関与すると思われるTASK 1チャンネルおよびTASK 3チャンネル(Sirois et al. (2000) "The TASK-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetic". J. Neurosci, 20, 6347-6354 (Ref 14))とは対照的に、中枢神経系におけるTASK 2の発現は極めて低く、呼吸回路由来の特定の神経細胞群に限定されている(Reyes Ret al. (1998) "Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney". J. Biol Chem, 273, 30863-30869 (Ref 15))。さらに、TASK 2は、TASK 1が非常に強く発現する心臓においては発現しないかまたは発現が非常に弱い。したがって、TASK 2の中枢神経系における極めて限定された発現および心臓における事実上の発現欠如は、TASK 2を特異的に抑制するためには大きな利点である。

【0028】

TASK 2のペプチド配列、細胞膜における構成およびコード遺伝子は、国際公開第00/27871号パンフレット(PCT/IB99/01886、CNRSに帰属、1999年11月9日出願、2000年5月に公開)に記載されている。この文献には、ヒトおよびマウスにおけるTASK 2の細胞分布、成体の腎臓におけるTASK 2 mRNAの分布、TASK 2の染色体地図、トランスフェクションされたCOS細胞およびツメガエル卵母細胞におけるTASK 2の発現、pHに対するTASK 2電流の感度、ならびにpHによるTASK 2の調節、ならびにTASK 2の生物物理学的かつ薬理学的特性についても記載されている。これらの要素を、本発明を理解しかつ適用するために本願において使用することができる。

【0029】

「呼吸器系疾患」とは、中枢神経系の機能障害に起因する呼吸障害、特に、脳幹にある脳の呼吸中枢の機能不全に関係した任意の呼吸障害を指す。

呼吸器系疾患の中では、限定するものではないが：睡眠時無呼吸症候群、呼吸器型の乳幼児突然死症候群、高地に起因する病的呼吸のモデル、オンディーヌの呪いすなわち先天性中枢性低換気症候群、薬物による(例えばバルビツール酸系薬物またはモルヒネ系薬物の吸収による)偶発的または自発的な中毒に起因する障害、全身麻酔に関係した呼吸抑制、急性呼吸不全および重度の低酸素血症を挙げることができる。

【0030】

「試験分子」とは、TASK 2チャンネルの活性またはその発現を低減または除去するかどうかが測定するために本発明の方法によって試験される分子を指す。

「候補分子」とは、本発明の適用によりTASK 2チャンネルの活性またはその発現を低減または除去するとして同定された分子を指す。

【0031】

本発明は、ヒトであれ動物であれ哺乳動物の呼吸器系疾患の治療用候補分子を同定することができる。

本発明を適用するための試験分子は、例えば分子バンクで無作為に、または例えばイオンチャンネルと一体化することができる生物学的に許容可能な分子の中から、選択可能である。

【0032】

TASK 2活性を低減または除去すると思われる試験分子として、本発明者らは例えば、キニーネ、キニジン、クロフィリウム、リドカイン、ピバカイン、ドキサプラム、およびハロタンのような揮発性麻酔薬を挙げることができる。

【0033】

候補分子として、本発明者らは、例えばTASK 2に対する抗体も挙げることができる。この抗体は当業者によく知られた技術によって生産可能である。この抗体は、例えば

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体またはF a bフラグメントであってよい。

【0034】

「機能的活性」とは、カリウムチャンネルが細胞膜を通り抜けるイオンの移動を実施および制御する能力を指す。

本発明によれば、T A S K 2の機能的活性を測定するステップは、イオンチャンネルの活性を測定するための当業者によく知られた方法のうちの一つによって実施可能である。例を挙げると、該ステップは、国際公開第05/054866号パンフレット(PCT/E P / 2004/012823、パイエル・ヘルスケアAG、2004年11月12日出願、2005年6月16日に公開)の文献中にK C N K 2チャンネルについて記載されているような方法で構成されてもよいし、前述の文献の国際公開第00/27871号パンフレットにT A S K 2、T W I K 1、T R E K 1およびT A S K 1チャンネルについて記載されているような方法で構成されてもよいし、または国際公開第02/00715号パンフレット(PCT/I B 01/01436、C N R S、2001年6月27日出願、2002年1月3日に公開)に記載のT R E K 2チャンネルについて記載されているような方法で構成されてもよい。

10

【0035】

本発明によれば、T A S K 2ポリペプチドの機能的活性が低減または除去されるかどうかを測定することから構成されるステップは、

i) 機能的活性を示すT A S K 2ポリペプチドを発現する細胞を前述の試験分子と接触させること、および

i i) 前述の試験分子の存在下で、T A S K 2ポリペプチドの機能的活性またはその発現のうち少なくともいずれか一方を計測すること、を含むことができる。

20

【0036】

このステップの適用例は前述の3つの文献に具体的に記載されている。

本発明によれば、T A S K 2ポリペプチドを発現する細胞は、該ポリペプチドを内在性のものとして発現してもよいし、組換え型として発現してもよい。本発明を適用するために細胞でこのポリペプチドを発現させるのに使用可能な方法は、例えば国際公開第00/27871号パンフレット(C O S細胞またはツメガエル卵母細胞)およびその他前述の文献に記載されている。

30

【0037】

一般に、本発明によれば、機能的活性は、T A S K 2ポリペプチドを横断するイオン流、T A S K 2ポリペプチドを発現する細胞の膜電位の変化、T A S K 2ポリペプチドを発現する細胞の細胞内イオン濃度の変化、からなる群から選択された1つまたはいくつかのパラメータによって計測可能である。本発明で使用可能なチャンネルの機能的活性の計測の例は、例えば前述の3つの文献それぞれにおいて提示されている。

【0038】

本発明によれば、機能的活性は、例えばT A S K 2ポリペプチドを横断するイオン流の計測によって測定可能であり、T A S K 2ポリペプチドを横断するイオン流は、例えばルビジウムイオンの流出であってよい。好ましくは、T A S K 2ポリペプチドを横断するイオン流は、ルビジウムイオンの流出の測定により計測され、これは例えば、例としてはギルらの2007年の文献(G i l l S e t a l . (2 0 0 7 " A c e l l - b a s e d r b (+) - f l u x a s s a y o f t h e k v 1 . 3 p o t a s s i u m c h a n n e l " . A s s a y D r u g D e v T e c h n o l 5 , 3 7 3 8 0 (R e f 1 6)) に示されているような、原子吸光分析法により測定可能である。

40

【0039】

本発明によれば、T A S K 2の活性を好ましくは少なくとも10%、好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは75%、90%または100%低減する試験分子は、T A S K 2の活性を低減するための候補分子として同定される。

50

【0040】

特に、本発明は、睡眠時無呼吸症候群、呼吸器型の乳幼児突然死症候群、高地に起因する病的呼吸のモデルからなる群から選択された呼吸器系疾患の治療のための候補分子の同定を可能にする。

【0041】

候補分子の同定における次のステップは、例えば呼吸障害を示す動物モデルまたは呼吸器系疾患を引き起こす状態に置かれた動物モデルに候補分子を投与した後に、呼吸器系疾患に対する前記分子の効果を検討するステップであってよい。

【0042】

したがって、本発明の別の態様は、呼吸器系疾患の治療用組成物の調製のために、TASK 2ポリペプチドの機能的活性を調整するかまたは発現を阻害するかのうち少なくともいずれか一方の分子の使用に関する。

【0043】

本発明の1つの変更形態によれば、TASK 2の遺伝子発現を増大、低減または除去することができる分子を探索するために分子をスクリーニングすることも可能である。例えば、該スクリーニングは、試験される各分子について、TASK 2をコードするmRNAのレベルまたは生成されたTASK 2を測定することで構成される。これは当業者によく知られた任意の方法によって測定可能である。該方法は定性的方法で構成されてもよいし、定量的方法で構成されてもよい。本発明で使用することができる測定方法は、例えば国際公開第05/054866号、同第00/27871号および同第02/00715号パンフレットに見出すことができる。TASK 2をコードするmRNAまたはTASK 2の存在は、例えば、当業者によく知られた免疫化学的方法のうちの一つにより、例えばイムノアッセイ、ウェスタンブロット法、または免疫組織化学分析法により測定可能である。

【0044】

本発明のスクリーニングは細胞を用いる系で行われてもよいし、細胞を用いない系で行われてもよい。TASK 2を発現する任意の細胞を使用することができる。TASK 2ポリペプチドは、その細胞内で本来発現されるものであってもよいし、当業者によく知られた遺伝子組換え技術により細胞内に導入されてもよい。本発明において使用可能な遺伝子組換えプロトコルの例は、前述の3つの文献に記載されている。

【0045】

したがって、この変更形態によれば、候補分子は例えば、チャンネルの転写を阻止すると思われる、TASK 2（またはKCNK5）をコードするポリヌクレオチド配列の相補配列であってよい。

【0046】

レトロウイルス、アデノウイルス、ワクチンウイルスもしくはヘルペスウイルス、または他の細菌ウイルスに由来する発現ベクターを使用して、標的とする器官、組織または細胞集団に相補的ヌクレオチド配列を送達することができる。当業者によく知られた方法を、TASK 2をコードする遺伝子のポリヌクレオチドに相補的な核酸配列を発現するベクターの構築に使用することができる（Scott JK, Smith GP (1990) "Searching for peptide ligands with an epitope library". Science, 249: 386-390 (Ref 17)）。当業者によく知られた方法を使用して、TASK 2をコードする配列と転写および翻訳を制御する要素とを含んでいる発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、in vitroの組換えRNA技術、合成技術およびin vivoの遺伝子組換えが含まれる。前述の3つの文献には、本発明の適用のためのベクターの構築に使用可能な方法について記載されている。

【0047】

他の利点については、添付の図面を参照しながら例証として提供された以下の実施例を読めば明らかとなる。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】吻側延髄球の腹側に存在するTASK 2チャンネルの写真。

【図2】中枢性化学感受性の機構におけるTASK 2チャンネルの介在を*in vitro*で実証する以下の実施例2の実験結果を表すヒストグラム。図中、縦軸は呼吸リズムの頻度を表し（毎分のサイクル数で表示）、横軸はこの実施例で使用された様々な試験を表す。白色のバーは野生型マウスで得られた結果、黒色のバーは突然変異型TASK 2マウスで得られた結果に相当する。

【図3】呼吸の機構におけるTASK 2チャンネルの介在を*in vitro*で実証する以下の実施例3の実験結果を表すヒストグラム。図中、縦軸は1分間あたりの呼吸の流量すなわちMVを体重1gあたりのml/分で表し、横軸はこの実施例で適用された様々な試験を表す。

【図4】ヒトのTASK 2チャンネルをコードするDNAでトランスフェクションしたHEK細胞上でのTASK 2電流（強度I、ピコアンペア（pA））の「パッチクランプ」記録を示す図。

【図5】成体マウスの脳幹に存在するTASK 2チャンネルの位置について説明する図。A：全脳、顔面神経運動核（VII）近辺の脳幹の腹側面、ならびに後部菱形核および顔面周囲呼吸群（RTN/pfRG）を示す拡大図。B～E：冠状断面におけるTASK 2発現細胞の位置。B：中脳、背側縫線（DR）。C：吻側橋、外側上オリブ核（LSO）。D：尾側橋、腹側面（RTN/pfRG）および小細胞網状核（PCrTA）。E：吻側延髄球、VIIの尾側末端部。F：脳幹の矢状断面におけるTASK 2発現細胞の分布を示す簡略図。その他の略語：3N、動眼神経核；4V、第4脳室；7N、顔面神経核；10N、迷走神経背側運動核；12N、舌下神経核；Amb、疑核；AP、最後野；CIC、尾側下丘核；ILL、中間外側絨帯核；I0、下オリブ核；me5、三叉神経中脳路；Sol、孤束核。

【図6】覚醒マウスでの高炭酸ガスおよび短期間の低酸素への応答における、プレチスモグラフ技術によって計測された呼吸の適応を示す図。この適応は野生型マウスまたはTASK 2無効化マウスにおいて類似している。図中、縦軸は、体重1gあたりのml/分で表示される1分間あたりの呼吸の流量（MV）、呼吸頻度（RF）、および現在の体積（VT）を表し、横軸は、この実施例で使用された様々な試験を時間の関数として表す。

【図7】AおよびBは、長期間の低酸素への応答における、プレチスモグラフ技術によって計測された呼吸の適応を示す図。野生型マウスで観察された大幅な呼吸抑制は、TASK 2無効化マウスでは全く存在しない。Aでは、縦軸は、現在の体積（VT）、呼吸頻度（RF）、およびml/分/gで表示される1分間あたりの呼吸の流量（MV）を表し；横軸は、この実施例で使用された様々な試験を時間の関数として表す。Bでは、同じパラメータがより長い時間尺度で表わされている；TE、呼気時間。Cでは、様々な時点（Bで最下行に示した1、2、3および4）における個々の動物についての原データ線の例が表わされている。低酸素の雰囲気への変化の直後に、野生型マウスおよび突然変異型マウスは呼吸の増大を示す（時点2）。この応答の後、野生型マウスでのみ観察される抑制（時点3）が続く。12時間の低酸素の後（時点4）、換気状態はすべてのマウスにおいて同様である。

【図8】低酸素環境に12時間維持されたマウスの腎臓および脳幹におけるTASK 1、TASK 2およびエリスロポエチン（EPO）のメッセンジャーRNAの発現を表すヒストグラム。このヒストグラムは定量的PCRの結果（1群当たりマウス8匹）で構成されている。

【図9】A：1日齢のマウスの顔面神経運動核の周囲に位置する帯域（後部菱形核および顔面周囲呼吸群）および全脳におけるTASK 2の発現を示す図。上記帯域は「一括（en bloc）」記録技術で保存される。B：延髄球の構造および橋の最尾側部分の構造が保存されている「一括」調製物の略図。頸根C4に配置された電極は、呼吸活動を表す横隔神経の活性を記録するために使用することができる。C：吸気相（TI）および呼

10

20

30

40

50

気相 (T E) の大きさ、表面および持続時間を計測するために使用された吸気バーストの暗号化 (C 4) および積分 (C 4) の例を示す図。 D : 野生型 (t a s k 2 + / +) または突然変異型 (t a s k 2 - / -) マウスの「一括」調製物について得られた酸素正常状態 (対照) および酸素欠乏状態における呼吸活動 (C 4) の例を示す図。 E : 野生型 (N T) 、ヘテロ接合型 (t a s k 2 + / -) またはホモ接合型 (t a s k 2 - / -) のマウスに関する、対照条件、酸素欠乏、呼吸性もしくは代謝性のアシドーシスおよびアルカローシスにおける呼吸頻度 (R F) を示すヒストグラム。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 9 】

実施例

10

実施例 1 : 脳幹神経細胞における T A S K 2 発現の実証

本実施例の実験は、脳幹の呼吸中枢に属する主要な神経構造体に T A S K 2 チャネルが存在することを実証する。これらの実験はヘテロ接合突然変異型の成体マウス (T A S K 2 + / -) を用いて実行された。無効化される T A S K 2 遺伝子には、酵素 (ガラクトシダーゼ) をコードする配列への置換が行われる。この酵素のおかげで、加水分解されると青変する基質として X G a l を使用する古典的な組織化学的検出技術によって、正常に T A S K 2 チャネルを発現する細胞を容易に同定することが可能である。

【 0 0 5 0 】

パラホルムアルデヒドを用いた固定処置の後、神経組織の試料が採取され、次いで、クライオスタットを用いて得た厚さ 3 0 μ m の脳幹横断切片に対して X G A L 検出技法が行われる。この反応が終わると、 T A S K 2 チャネルを発現する細胞は青く着色される (図 1 の矢印) 。

20

【 0 0 5 1 】

得られた結果から、脳幹の個々の帯域における T A S K 2 発現細胞の存在が明らかとなる。例として、図 1 は吻側延髄球の腹側面に存在する T A S K 2 チャネルを示している。同図は、吻側延髄球の腹側面 (後部菱形核、 R T N) の神経細胞に X g a l 標識が存在することを示す横断切片である。

【 0 0 5 2 】

多くの研究で示されるように、この帯域は、体液 (血液、脳脊髄液すなわち C S F) の化学的変動に应答した中枢性化学感受性すなわち換気の適応において基本的な役割を果たす。これらのチャネルが呼吸の制御に関与する重要な帯域において特有の位置にあることから、 T A S K 2 に作用する手法による呼吸の特異的調整を検討することが可能である。

30

【 0 0 5 3 】

実施例 2 : 呼吸の適応の中枢機構における T A S K 2 チャネルの介在の i n v i t r o での実証

本実施例において、本発明者らは、野生型マウス (活性を有する T A S K 2 チャネル) と、活性を有する T A S K 2 チャネルを発現しない (「 T A S K 2 - / - 」) 突然変異型 T A S K 2 マウスとを使用した。上記マウスは、公開状態で米国サンフランシスコの W . スカルネス (W . S K A R N E S) 研究室によって最初に作られた。該マウスは、遺伝的背景を C 5 7 B I / 6 J として戻し交配された後、本発明者らの研究室で飼育および繁殖が行われた。

40

【 0 0 5 4 】

本実施例の実験は、酸素欠乏時の呼吸活動の変化を実証する。これらの実験は、「一括」調製により 1 ~ 3 日齢のマウスを用いて単離された脳幹調製物に対して i n v i t r o で実行された。

【 0 0 5 5 】

野生型マウスまたは突然変異型マウス (T A S K 2 - / -) の脳幹を氷中で直ちに切り分け、周囲組織から単離し、次いでカルボゲン (9 5 % O 2 、 5 % C O 2) 中で平衡化した人工 C S F (C S F a) の中に入れる。脊髄分節 C 4 の前根は横隔膜に神経を分布さ

50

せる横隔神経の起始部にある。この神経根を、調製物により自然に生じた周期的な呼吸活動を収集するためにガラス電極の内側に取り入れる。根 C 4 の電気的活動は、呼吸のパラメータ（頻度、大きさ、持続時間）を後に分析するために、フィルタ処理され、増幅され、視覚化され、コンピュータに保存される。この試験は、CSFa またはその化学組成物に溶解される気体の量を変化させることと、呼吸活動を比較することとで構成された。

【0056】

図2は、本実施例（「一括」調製物：野生型マウスおよびTASK 2 - / - マウスにおいて記録された横隔神経の根 C 4 の呼吸頻度および電気的活動）の実験結果を表すヒストグラムである。対照：人工CSFを95%O₂、5%CO₂の中で平衡化。酸素欠乏：95%N₂、5%CO₂。縦軸は呼吸の周期的活動の頻度（1分間あたりのサイクル数で表す）を、横軸は本実施例で使用される様々な試験を表す。白色のバーは野生型マウスで得られた結果、黒色のバーは突然変異型TASK 2 マウスの結果に相当する。

10

【0057】

得られた結果は、対照条件（95%O₂、5%CO₂）では野生型動物と突然変異型TASK 2 マウスとの間に呼吸頻度の差がないことを実証している。酸素欠乏条件（酸素を含まない気体：95%N₂、5%CO₂で平衡化されたCSFa）では、野生型マウスの呼吸頻度は約40%減少する。低酸素性呼吸抑制と呼ばれるこの古典的な反応は、突然変異型のTASK 2 - / - マウスでは観察されない（統計比較、***：p < 0.001）。

【0058】

これらの実験は、酸素欠乏にさらされたマウスの*in vitro*での呼吸活動は、TASK 2 チャネルをコードする遺伝子を無効化した後では有意に頻度が高いことを実証している。したがって、呼吸抑制の状態では、TASK 2 に作用する手法による中枢性の呼吸活動の回復を検討することが可能である。

20

【0059】

実施例3：呼吸の機構におけるTASK 2 チャネルの介在の*in vivo*での実証
本実施例においても、本発明者らは野生型マウスおよび突然変異型TASK 2 マウスを使用した。

【0060】

マウスの呼吸はプレチスモグラフ（フランス国所在のEMKAテクノロジーズ）で計測された。

30

図3は、低酸素（8%O₂）への長期曝露による野生型マウスおよびTASK 2 - / - マウスの換気反応を示す本実施例の実験結果を表すヒストグラムである。この図では、縦軸は、ml / 分 / g で表された1分間あたりの呼吸の流量（MV）を表し、横軸は本実施例で使用された様々な試験を表す。白色のバーは野生型マウスで得られた結果、黒色のバーは突然変異型TASK 2 マウスで得られた結果に相当する。

【0061】

様々な酸素への曝露条件について試験した。1分間あたりの呼吸の流量（ml / 分 / g）が、対照（con）（21%酸素）および海拔6500mの高地に相当する8%酸素の低酸素状態において計測された。低酸素は1～6時間について試験された。

40

【0062】

低酸素は、すべての動物において呼吸の一過性の増加を引き起こした（末梢化学受容器の刺激に伴う呼吸亢進）（図示せず）。第2に、低酸素への長期曝露は呼吸運動の低下すなわち抑制を引き起こし、これは野生型マウスでのみ観察された。最初の呼吸亢進に続く動脈血中二酸化炭素の低減は、野生型マウス（図1のヒストグラム中で白色）においてその呼吸の低減の重要な要因であった。

【0063】

しかしながら、TASK 2 チャネルが無効化された動物は低酸素の期間全体にわたって持続的な換気状態を示した。

TASK 2 チャネルが不活性化された後では、低炭酸ガス（呼吸性アルカローシス）

50

の状態にあるときを含めて低酸素が呼吸の強力な刺激であることは明らかである。呼吸性アルカローシスはもはや中枢神経系のTASK 2チャンネルを活性化することができない可能性が高い。

【0064】

これらの実験の結果は、TASK 2ノックアウトマウスが低酸素時に野生型マウスと比較して呼吸の増大を示すことを明示している。

したがって、TASK 2の阻害は呼吸器系疾患の治療の手段であるように思われる。

【0065】

結論として、TASK 2カリウムチャンネルの不活性化は、低酸素状態において呼吸を刺激する手段であると考えられ、先行技術で使用される治療方法とは異なる新しい戦略である。

10

【0066】

実施例4：脳幹におけるTASK 2の発現位置

この実験で使用されるマウスおよび条件は、実施例1と同一である。

TASK 2^{-/-}マウスの作製に使用されたベクターは、Mitchell K J et al. (2001) "Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development". Nat Genet, 28, 241-249 (Ref 18)に記載されているようなガラクトシダーゼをコードする遺伝子を含んでいる。TASK 2細胞の発現は、TASK 2^{-/+}マウスにおいて活性を促すTASK 2プロモータを使用して視覚化された。驚くべきことに、Xgalによる特異的標識は脳幹のわずかな領域に限定されている。TASK 2を発現する細胞は、脳の他の領域には見出されなかった。

20

【0067】

延髄球に見出される標識は、腹側面の腹外側部に限定されている。

TASK 2を発現する細胞は、門の前方500-700 μmから顔面神経運動核(VII)の吻側極へ、1.5 mm以上にわたって伸びる両側性の柱状部を形成する。これらの細胞は、脳幹の表面の周縁帯域、および柔組織中100~300 μmの深さに位置する塊を形成する(図5を参照)。この領域は、後部菱形核および顔面周囲呼吸群(RTN/pfRG)が集まっている顔面周囲領域に相当する。

30

【0068】

橋では、TASK 2を発現する細胞は、外側上オリブ(図5C)、小細胞網状核(図5D)、ならびに背側縫線核および中間外側絨帯において観察される。尾側下丘では部分的な標識が検出される。

【0069】

標識は、横隔膜運動核に相当する頸髄では検出されなかった。

実施例1および本実験において実証されるように、TASK 2チャンネルは、吻側延髄球の腹側面、特に後部菱形核(RTN)および顔面周囲呼吸群(pfRG)に相当する領域に存在する。

【0070】

得られた結果は、脳幹の個別の帯域におけるTASK 2発現細胞の存在を実証する。呼吸の制御に参与する重要な帯域中で上記チャンネルが1か所に位置することから、TASK 2に作用する手法による呼吸の特異的な調整を検討することが可能である。

40

【0071】

実施例5：in vivoにおけるマウスの呼吸に対する低酸素および高炭酸ガスの影響

この実験に使用されるマウスは、上記の実施例2で使用されたものと同一である。

【0072】

この実験では、10匹のTASK 2^{+/+}マウスおよび7匹のTASK 2^{-/-}マウスが使用された。

50

中枢性および末梢性の化学受容器は、血液中のpHおよび気体の変動を検出することにより、呼吸の適応に寄与する(Vizek M et al. (1987) "Biphasic ventilatory response of adult cats to sustained hypoxia has central origin". J Appl Physiol, 63, 1658 - 1664. (Ref 19))。頸動脈小体に位置する末梢性化学受容器細胞は、低酸素に应答した換気の迅速な増大をより特異的に制御する。

【0073】

短期間の低酸素または高炭酸ガスに应答した呼吸の適応について、野生型マウスおよび突然変異型マウス(TASK 2^{-/-})で検討が行われた。

10

マウスの呼吸はプレチスモグラフ(フランス国所在のEMKAテクノロジーズ)を用いて計測された。

【0074】

正常な状態(21%酸素)では、呼吸パラメータはTASK 2^{-/-}および野生型マウスで同一であった。

いずれの種類のマウスも、5%CO₂を含む環境(高炭酸ガス)に应答して同様の呼吸の増大を示した(図6A)。21%から9%への酸素濃度の低下も、両方の種類のマウスで同一の呼吸の増大を引き起こした(図6B)。

【0075】

この低酸素は一過性であり、数分後に最大の呼吸増大がみられた。

20

この実験は、頸動脈小体に位置する末梢性化学感受性細胞の酸素感受性と関係する、短期間の低酸素に应答した正常な呼吸の適応を実証している。突然変異型マウスにおける高炭酸ガスに対する应答にも変化はない。

【0076】

実施例6：TASK 2の転写に対する長期間の低酸素の影響

長期間の低酸素に対する应答についても検討が行われた。この应答は8%酸素で数時間にわたり計測された。

【0077】

この実験で使用されるマウスは、直前の実施例で使用されたマウスと同一である。

8匹のTASK 2^{+/+}マウスおよび7匹のTASK 2^{-/-}マウスがこの実験に使用された。

30

【0078】

2時間の低酸素の間に、対照のマウスにおいて呼吸の低下が観察された(図7A)。ml/分/gで表される1分間あたりの呼吸の流量(MV)についての低酸素による抑制は、特に呼吸頻度(RF)の低下に起因していた。慢性的な低酸素に应答して引き起こされるこの呼吸抑制は、TASK 2^{-/-}マウスには存在しなかった。

【0079】

この実施例は、低酸素に対する初期应答がTASK 2^{-/-}マウスにおいて正常であることを示している。この应答は末梢性化学受容器の刺激に相当する(Takakura A C et al. (2006) "Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats". J. Appl Physiol, 63, 1658 - 1664 (Ref 20))。しかしながら、慢性的な低酸素によって引き起こされる中枢性の呼吸抑制はTASK 2^{-/-}マウスには全く存在しない。

40

【0080】

したがって、この実験は、TASK 2チャンネルが低酸素に対する延髄の感受性にとって重要な要素であることを明白に示している。

本実験および実施例2で実証されたように、TASK 2カリウムチャンネルの不活性化は、呼吸抑制を阻害しかつ低酸素の状態において呼吸を刺激する方法である。したがって

50

、この不活性化は、先行技術で使用される治療方法とは異なる新しい戦略である。

【0081】

パウエルらの文献 (Powell FL et al. (1998) "Time domain of the hypoxic ventilatory response". *Respir Physiol*, 112, 123-134. (1998) (Ref 21)) に記載されているような慢性的な低酸素に対する呼吸の適応について、以下の条件すなわち 5300m の高地に相当する 10% 酸素で 20 時間の条件で検討が行われた。

【0082】

低酸素の最初の 3~4 時間の間、対照のマウスは、呼気時間の延長を伴う呼吸流量の強い抑制および呼吸頻度の低下を示した。この段階の後に、呼気時間の短縮を特徴とする適応段階が続き、10~12 時間後に正常値に戻った (図 8 B および C)。

10

【0083】

低酸素の期間全体において、呼吸パラメータは TASK 2 マウスでは変化しなかった。したがって、これらのマウスは適応後の対照マウスに類似した呼吸の表現型を示した。

【0084】

さらに、TASK 2 の発現が計測された。

マウスは 10% 酸素の環境に 24 時間置かれ、次いで TASK 2 (ならびに対照の TASK 1 およびエリスロポエチン) のメッセンジャー RNA の発現が計測された。

【0085】

RNA は RNeasy (R) Mini キット (キアゲン (Qiagen)) を使用してマウスの腎臓および脳幹から単離された。逆転写については、逆転写酵素 (プロメガ (Promega)) が製造業者提供のプロトコールに従って使用された。リアルタイムのポリメラーゼ連鎖反応は、SYBR (R) グリーン PCR キット (キアゲン) を使用して Light Cycler (R) システム (ロッシュ (Roche)) で実施された。TASK 2、TASK 1 およびエリスロポエチンの遺伝子の転写が計測され、 β -アクトチンの発現に対して標準化された。

20

【0086】

使用したプライマー、およびリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応の実施条件は以下のとおりとした。 β -アクトチン用プライマー：センスプライマー、5' C C A C C G A T C C A C A C A G A G T A C T T 3' (配列番号 1)；アンチセンスプライマー、5' G A C A G G A T G C A G A A G G A G A T T A C T G 3' (配列番号 2)。エリスロポエチン用プライマー：センスプライマー、5' A G A A T G G A G G T G G A A G A A C A G 3' (配列番号 3)；アンチセンスプライマー、5' T G T C T A T A T G A A G C T G A A G G G T 3' (配列番号 4)。TASK 2 用プライマー：センスプライマー、5' G C T T T G G G G A C T T T G T G G 3' (配列番号 5)；アンチセンスプライマー、5' A A A G A G G G A C A G C C A A G C 3' (配列番号 6)。

30

【0087】

プライマーのハイブリダイゼーション温度は 55 °C であった。

結果から、TASK 2 をコードする mRNA の量は低酸素の際に腎臓および脳幹では変化しないことが実証された。(図 8 A および B)。

40

【0088】

よって、TASK 2 遺伝子の転写は長期間の低酸素の間に変化しない。したがって、TASK 2 カリウムチャネルは、低酸素状態において呼吸抑制を阻害しかつ呼吸を刺激するための新しい標的である。先に実証されたように、したがって TASK 2 の不活性化は、先行技術で使用される治療方法とは異なる新しい戦略である。

【0089】

実施例 7：中枢性の呼吸の適応機構における TASK 2 チャネルの介在の *in vivo* の実証

この実験は、実施例 2 で使用されたのと同じ条件およびマウスで実施された。

50

【0090】

この実験は、酸素欠乏、アシドーシスおよびアルカローシスの際の呼吸活動の変化を実証する。

中枢性の化学受容器を含めた新生児マウス由来の脳幹の「一括」調製が行なわれた(図9A~C)。

【0091】

「一括」調製は1~3日齢のマウスについて行なわれた。各マウスはハロタンで麻酔された。脳幹および頸髄が単離されて記録用チャンバ内に移され、腹側部を上向きとして人工脳脊髄液を用いて4ml/分の速度でかん流が行われた。

【0092】

呼吸頻度、吸気バーストの持続時間、呼吸の大きさおよび表面積が計測された。

10匹のTASK₂^{+/+}マウス、8匹のTASK₂^{+/-}マウス、および7匹のTASK₂^{-/-}マウスがこの実験に使用された。

【0093】

基礎となる呼吸頻度は正常な条件下では各個体すべてにおいて同一であった。対照のマウスでは、代謝性または呼吸性アシドーシスにより呼吸頻度の増大(約+40%)が引き起こされ、一方アルカローシスおよび酸素欠乏により呼吸頻度の著しい減少(約-40%)が引き起こされた。

【0094】

TASK₂^{-/-}マウスは、pHの変化に対しては同様の呼吸頻度の低下を示した。しかしながら、酸素欠乏に対する上記反応はTASK₂^{-/-}マウスでは全くみられなかった(図9DおよびE)。

【0095】

この実験は、TASK₂^{-/-}マウスにおいて、呼吸頻度の変化を伴わない吸気持続時間の増大によって表される、低酸素に対する反応が存在することを示している。

したがって、TASK₂カリウムチャンネルは、低酸素状態における呼吸抑制を阻害しかつ呼吸を刺激するための新しい標的である。

【0096】

実施例8：本発明によるスクリーニングの適用

成人におけるTASK₂の分布、TASK₂の染色体地図、TASK₂の生物物理学的特性および薬理学的特性ならびに外部pHによるTASK₂の調節は、国際公開第00/27871号パンフレットに従って検討された。

【0097】

次のスクリーニングが使用される。HEK細胞(ヒト胎児腎臓細胞)は、lipofectamine(TM)法によってヒトTASK₂チャンネル遺伝子由来の相補的DNAを含んでいるプラスミド(pIRES-CD8-hTASK₂)でトランスフェクションされる。24時間の培養後、電位固定法(全細胞型のパッチクランプ法)を使用してTASK₂電流が記録される。-95Vの自然電位から-80~+45mVの範囲の変数値への電位の急転によって電流が活性化される。

【0098】

電流は、EPC-10増幅器(ヘカ(HEKA))を使用して全細胞型で記録される。「パッチ」ピペットには、95のKグルコナート、30mMのKCl、4.8mMのNa₂HPO₄、1.2mMのNaH₂PO₄、5mMのグルコース、2.38mMのMgCl₂、0.726mMのCaCl₂、1mMのEGTA、3mMのATP、pH7.2の溶液が入っている。外部溶液はリンゲル液すなわち：145mM NaCl、0.4mM KH₂PO₄、1.6mM K₂HPO₄、5mMグルコース、1mM MgCl₂、1.3mM CaCl₂、5mM HEPESS、pH7.4である。

【0099】

様々な薬物を外部浴槽の灌流によって様々な濃度で適用可能であり、該薬物の影響は対照条件と比較した電流の変化によって評価される。

10

20

30

40

50

図4の実施例では、バッチ内に0.9 mMのドキサプラムを適用すると、電位の急転によって証明されるように電流が25%減少することが示されている。

【0100】

【表1】

参考文献

- (Ref 1) Richter DW, Spyer KM (2001) « Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models ». *Trends Neurosci*, 24, 464-472. 10
- (Ref 2) Feldman JL, Del Negro (2006) « Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm ». *Nat Rev Neurosci*, 7, 232-242.
- (Ref 3) Feldman JL et al. (2003) « Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity ». *Annu Rev Neurosci*, 26, 239-266.
- (Ref 4) Severson et al. (2003) « Midbrainserotonergic neurons are central pH chemoreceptors ». *Nat Neurosci*, 6, 1139-1140. 20
- (Ref 5) Namen AM et al. (2002) « Increase Physician-reported sleep apnea: the National Ambulatory Medical Care Survey ». *Chest* 121(6): 1741-1747.
- (Ref 6) Goldstein SA et al. (2005), « International Union Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationship of two-pore potassium channels ». *Pharmacol Rev*, 57, 527-540. 30
- (Ref 7) Czirjak G, Enyedi P (2001), « Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two pore domain potassium channel subunits ». *J Biol Chem*, 277, 54265-5432.
- (Ref 8) Kang D et al. (2004), « Functional expression of TASK1/TASK-3 heteromers in cerebral granule cells. *J. Physiol*, 554, 64-77.
- (Ref 9) Berg AP et al. (2004), « Motoneurons express heteromeric TWIK-related acid sensitive K⁺ (TASK) channels containing TASK-1 (KNCK3) and TASK-3 (KNCK9) subunits ». *J. Neurosci*, 24, 6693-6702. 40
- (Ref 10) Mathie A (2007) « Neuronal two pore domain potassium channels and their regulation by G protein coupled receptors ». *J. Physiol*, 578, 377-385.

【0101】

【表 2】

(Ref 11) Patel AJ, Honore E (2001) « Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels ». *Trends Neurosci*, 24,339-346.

(Ref 12) Mulkey et al. (2007) « TASK channel determine pHsensitivity in select respiratory neurons but do not contribute to central respiratory chemosensitivity ». *J Neurosci*, 27, 14049-14058.

10

(Ref 13) Brazier et al. (2005) « Cloning of the human TASK-2 (KCNK5) promoter and its regulation by chronic hypoxia ». *Biochem Biophys Res Commun* 336:1251-1258.

(Ref 14) Sirois et al. (2000) « The TASK-1 two-pore domain K⁺ channel is a molecular substrate for neuronal effects of inhalation anesthetic ». *J. Neurosci*, 20, 6347-6354.

(Ref 15) Reyes R et al. (1998) « Cloning and expression of a novel pH-sensitive two pore domain K⁺ channel from human kidney ». *J. Biol Chem*, 273, 30863-30869.

20

(Ref 16) Gill S et al. (2007) « A cell-based rb(+)-flux assay of the kv1.3 potassium channel ». *Assay Drug Dev Technol* 5, 373-80.

(Ref 17) Scott JK, Smith GP (1990) « Searching for peptide ligands with an epitope library ». *Science*, 249:386-390.

(Ref 18) Mitchell KJ et al. (2001) « Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development ». *Nat Genet*, 28, 241-249.

30

(Ref 19) Vizek M et al. (1987) « Biphasic ventilatory response of adult cats to sustained hypoxia has central origin ». *J Appt Physiol*, 63, 1658-1664.

(Ref 20) Takakura AC et al. (2006) « Peripheral chemoreceptor inputs to retrotrapezoid nucleus (RTN) CO₂-sensitive neurons in rats ». *J. Appl Physiol*, 63, 1658-1664.

40

(Ref 21) Powell FL et al. (1998) « Time domain of the hypoxic ventilatory response ». *Respir Physiol*, 112, 123-134.

【 図 1 】

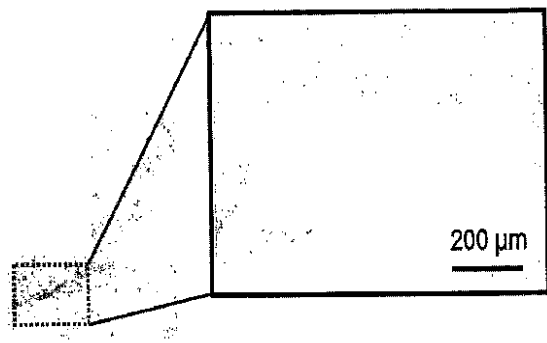
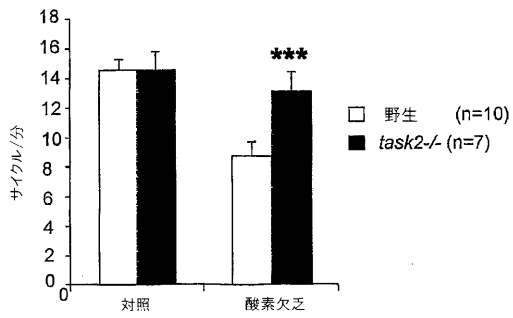
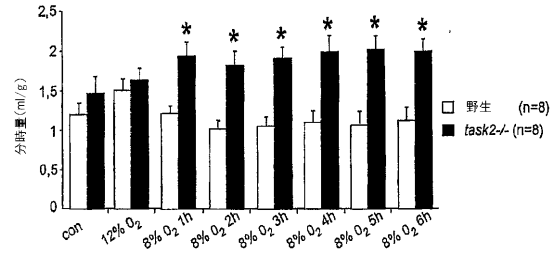


Figure 1

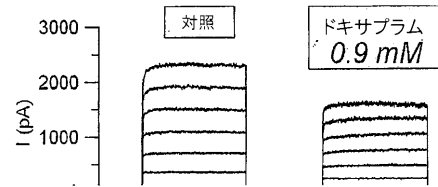
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

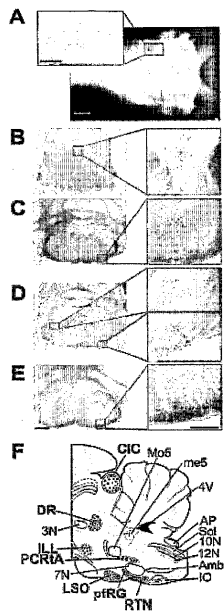
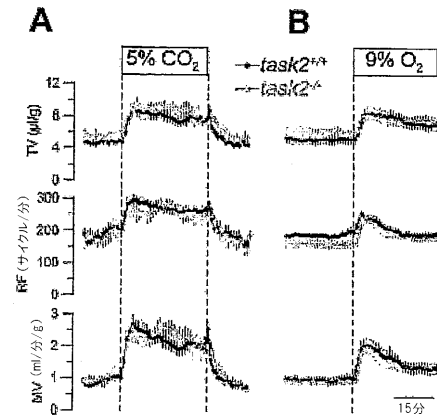
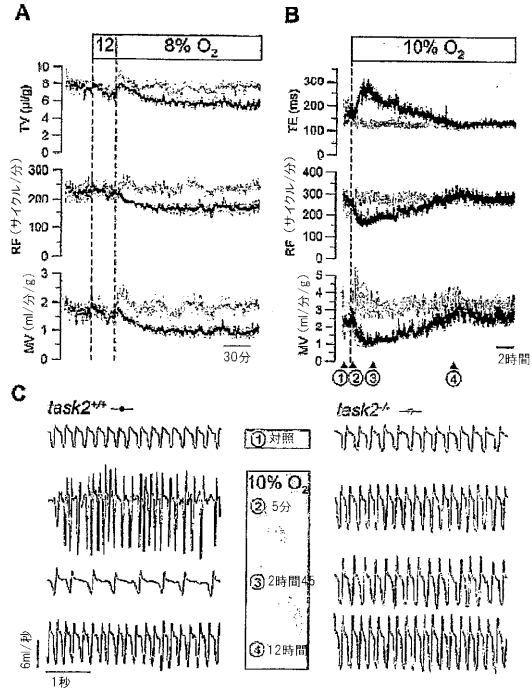


Figure 5

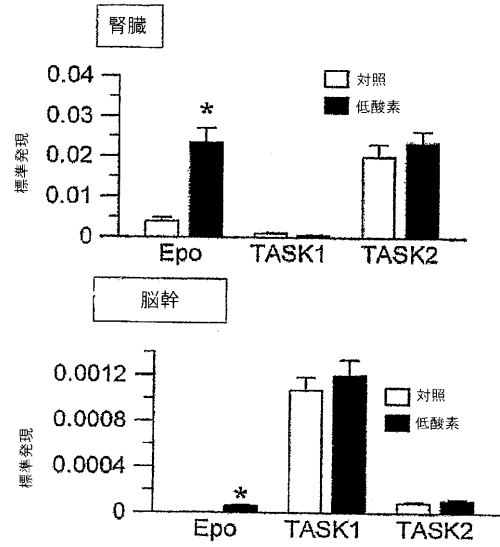
【 図 6 】



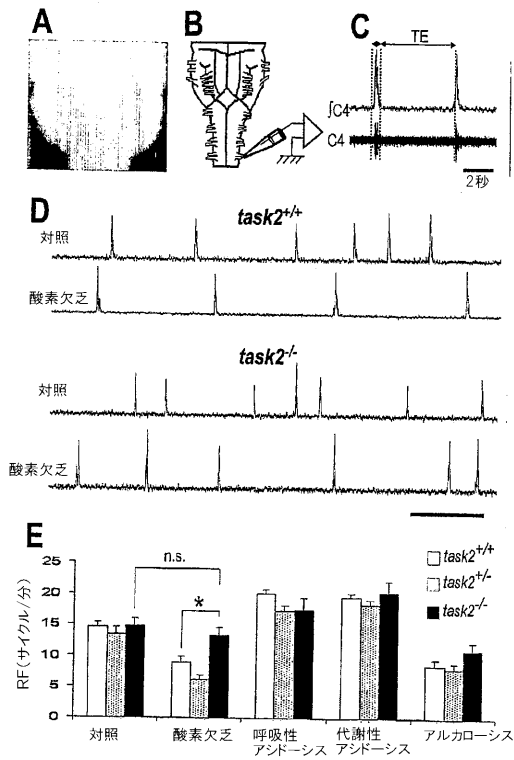
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【配列表】

2011501657000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2008/001391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data; BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/054867 A (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; BRUEGGEMEIER ULF [DE]; GEE) 16 June 2005 (2005-06-16) claims 1-17 page 56, line 3 - line 5 page 56, line 24 - line 35 page 39, line 27 page 40, line 3	1-6
A	NIEMEYER M I ET AL: "Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K ⁺ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 46, 16 November 2001 (2001-11-16), pages 43166-43174, XP009100818 ISSN: 0021-9258 abstract	6
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *8* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 July 2009		Date of mailing of the international search report 20/07/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jenn, Thierry

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/FR2008/001391

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GABRIEL ANJA ET AL: "Localization of the tandem pore domain K+ channel KCNK5 (TASK-2) in the rat central nervous system." BRAIN RESEARCH. MOLECULAR BRAIN RESEARCH, vol. 98, no. 1-2, 31 January 2002 (2002-01-31), pages 153-163, XP2329398 Netherlands (09-12-2001: on-line) ISSN: 0169-328X DOI: 10.1016/S0169-328X(01)00330-8 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2008/001391

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005054867 A	16-06-2005	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale n°
 PCT/FR2008/001391

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
INV. G01N33/68		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	
	no. des revendications visées	
X	WO 2005/054867 A (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; BRUEGGEMEIER ULF [DE]; GEE) 16 juin 2005 (2005-06-16) revendications 1-17 page 56, ligne 3 - ligne 5 page 56, ligne 24 - ligne 35 page 39, ligne 27 page 40, ligne 3	1-6
A	NIEMEYER M I ET AL: "Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K+ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 46, 16 novembre 2001 (2001-11-16), pages 43166-43174, XP009100818 ISSN: 0021-9258 abrégé	6
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/>
Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets	
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
8 juillet 2009	20/07/2009	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Jenn, Thierry	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale n°
 PCT/FR2008/001391

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GABRIEL ANJA ET AL: "Localization of the tandem pore domain K+ channel KCNK5 (TASK-2) in the rat central nervous system." BRAIN RESEARCH. MOLECULAR BRAIN RESEARCH, vol. 98, no. 1-2, 31 janvier 2002 (2002-01-31), pages 153-163, XP2329398 Netherlands (09-12-2001: on-line) ISSN: 0169-328X DOI: 10.1016/S0169-328X(01)00330-8 abrégé	1-7

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2008/001391

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005054867	A	16-06-2005 AUCUN	

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 27/416 (2006.01)		G 0 1 N 27/46	3 8 6 Z	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	A	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 507302276
 ユニヴェルシテ ポール セザンヌ デクス マルセイユ トルワ
 UNIVERSITE PAUL CEZANNE D' AIX MARSEILLE III
 フランス国, 1 3 6 2 8 エクサンプロヴァンス セデックス 1, アベニュー ロベール シ
 ユーマン, 3 番地

(74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣

(74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠

(74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳

(74) 代理人 100149641
 弁理士 池上 美穂

(72) 発明者 バルハニン、ジャック
 フランス国 F - 0 6 0 0 0 ニース アブニュ メンディギューロン 2 7

(72) 発明者 ジェストロー、クリスティアン
 フランス国 F - 1 3 0 1 2 マルセイユ アブニュ デ カイヨル 1 6 9 レジデンス ラ
 モネット バティモン ベ

(72) 発明者 ヴァルト、リヒャルト
 ドイツ連邦共和国 9 3 0 4 7 レーゲンスブルク フレーリヒェ チュルケンシュトラッセ 1
 4

(72) 発明者 ハイツマン、ディルク
 ドイツ連邦共和国 9 3 0 4 7 レーゲンスブルク ノイエ - ヴァーグ - ガッセ 1

(72) 発明者 トーマス、イェルク
 ドイツ連邦共和国 8 9 2 3 1 ノイ ウルム クランケンハウスシュトラッセ 6

F ターム (参考) 2G045 AA40 CB01 DA36 DB30 FB05 GC18
 4B024 AA11 CA04 CA09 DA03 EA04 HA12
 4B063 QA18 QQ20 QQ52 QR48 QR62 QR77 QR80 QS05 QS25 QS34
 QS36 QX02 QX04