

(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2013-533310

(P2013-533310A)

(43) 公表日 平成25年8月22日 (2013. 8. 22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 7 6
A 6 1 P 11/06 (2006. 01)	A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 11/00 (2006. 01)	A 6 1 P 11/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 9/12 (2006. 01)	A 6 1 K 9/12	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/4706 (2006. 01)	A 6 1 K 31/4706	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-524091 (P2013-524091)
 (86) (22) 出願日 平成23年7月27日 (2011. 7. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年3月26日 (2013. 3. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/045537
 (87) 国際公開番号 W02012/021291
 (87) 国際公開日 平成24年2月16日 (2012. 2. 16)
 (31) 優先権主張番号 61/405, 883
 (32) 優先日 平成22年10月22日 (2010. 10. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/371, 946
 (32) 優先日 平成22年8月9日 (2010. 8. 9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510043043
 ユニバーシティー オブ メリーランド、
 ボルティモア
 アメリカ合衆国、メリーランド 2120
 1, ボルティモア、ウエスト レキシント
 ン ストリート 620, 4階
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 (74) 代理人 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者 スティーヴン ビー・リゲット
 アメリカ合衆国メリーランド州21218
 . ボルティモア、ノースチャールズストリ
 ート3909

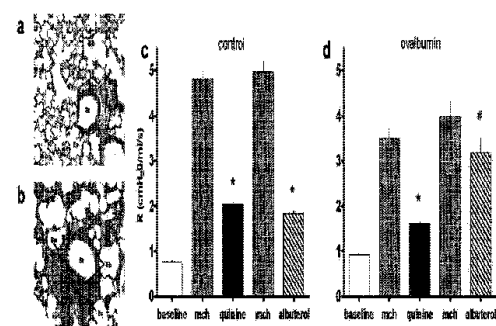
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 苦味物質を使用して閉塞性肺疾患を処置する方法

(57) 【要約】

処置を必要とする対象に苦味物質を投与することにより、例えばぜん息及びCOPDのような閉塞性肺疾患を処置するために、気道拡張を増強し、かつ／又は気道収縮を軽減するための方法が本明細書に記載される。また、苦味物質受容体の機能を調節する化合物を同定する方法も本明細書に記載される。

Figure 12



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、処置を必要とする対象に投与し、それにより対象における閉塞性肺疾患を処置することを含む、対象における閉塞性肺疾患又は状態を処置する方法。

【請求項 2】

閉塞性肺疾患又は状態が、ぜん息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、気腫又は気管支炎である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

苦味物質が、アリストコール酸、クロロキン、コルヒチン、デナトニウム、キニーネ、サッカリン、サリシン、ストリキニーネ及びヨヒンビンからなる群より選択される化合物である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

医薬組成物が吸入剤の形態にある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

対象がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、処置を必要とする対象に投与し、それにより対象におけるぜん息を処置することを含む、対象におけるぜん息を処置する方法。

【請求項 7】

苦味物質が、アリストコール酸、クロロキン、コルヒチン、デナトニウム、キニーネ、サッカリン、サリシン、ストリキニーネ及びヨヒンビンからなる群より選択される化合物である、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 8】

医薬組成物が吸入剤の形態にある、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

対象がヒトである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、処置を必要とする対象に投与し、それにより対象における COPD を処置することを含む、対象における COPD を処置する方法。

30

【請求項 11】

苦味物質が、アリストコール酸、クロロキン、コルヒチン、デナトニウム、キニーネ、サッカリン、サリシン、ストリキニーネ及びヨヒンビンからなる群より選択される化合物である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

医薬組成物が吸入剤の形態にある、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

対象がヒトである、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、処置を必要とする対象に投与し、それにより対象における気管支炎を処置することを含む、対象における気管支炎を処置する方法。

40

【請求項 15】

苦味物質が、アリストコール酸、クロロキン、コルヒチン、デナトニウム、キニーネ、サッカリン、サリシン、ストリキニーネ及びヨヒンビンからなる群より選択される化合物である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

医薬組成物が吸入剤の形態にある、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

対象がヒトである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

50

苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、気管支拡張を必要とする対象に投与し、それにより対象における気管支拡張を誘発することを含む、対象における気管支拡張を誘導する方法。

【請求項 19】

苦味物質が、アリストコール酸、クロロキン、コルヒチン、デナトニウム、キニーネ、サッカリン、サリシン、ストリキニーネ及びヨヒンビンからなる群より選択される化合物である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

医薬組成物が吸入剤の形態にある、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

対象がヒトである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、気道平滑筋（A S M）弛緩を必要とする対象に投与し、それにより対象における気道平滑筋を弛緩させることを含む、対象における気道平滑筋を弛緩させる方法。

【請求項 23】

苦味物質が、アリストコール酸、クロロキン、コルヒチン、デナトニウム、キニーネ、サッカリン、サリシン、ストリキニーネ及びヨヒンビンからなる群より選択される化合物である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

医薬組成物が吸入剤の形態にある、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

対象がヒトである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

対象における気管支収縮又は気管支痙攣を処置又は予防する方法であって、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、該処置又は予防を必要とする対象に投与し、それにより気管支収縮又は気管支痙攣を処置又は予防することを含む、上記方法。

【請求項 27】

苦味物質が、アリストコール酸、クロロキン、コルヒチン、デナトニウム、キニーネ、サッカリン、サリシン、ストリキニーネ及びヨヒンビンからなる群より選択される化合物である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

医薬組成物が吸入剤の形態にある、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

対象がヒトである、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 30】

気道平滑筋細胞を、苦味物質受容体に結合する試験化合物と接触させる工程、及び試験化合物が気道平滑筋細胞を弛緩させるか否かを決定する工程を含み、ここで平滑筋細胞を弛緩させる化合物は気道平滑筋を弛緩させるための化合物として同定される、気道平滑筋を弛緩させるための化合物を同定する方法。

【請求項 31】

気道平滑筋細胞の弛緩が、気道平滑筋細胞における苦味物質受容体仲介シグナル伝達の増加を検出することにより検出される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

苦味物質受容体仲介シグナル伝達の増加が、気道平滑筋細胞における細胞内カルシウム放出の増加又は細胞内 I P 3 の増加を検出することにより検出される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

苦味受容体の調節剤を同定するための方法であって：

（a）苦味受容体を天然で発現する気道細胞を試験化合物と接触させる工程、及び

10

20

30

40

50

(b) 苦味受容体の活性を測定する工程を含み、

ここで苦味受容体の活性を増加させる化合物は苦味受容体のアゴニストであり、そして苦味受容体の活性を減少させる化合物は苦味受容体のアンタゴニストである、上記方法。

【請求項 3 4】

苦味物質受容体の活性の変化が、試験化合物と接触していない気道平滑筋細胞と比較した、気道平滑筋細胞における細胞内カルシウム放出の変化又は細胞内 I P 3 の変化により検出される、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

苦味受容体のアンタゴニストである化合物を同定する方法であって：

10

(a) 苦味受容体を天然で発現する気道細胞を、試験化合物と、そして苦味物質と接触させる工程、及び

(b) 苦味受容体の活性を測定する工程を含み、

ここで苦味物質と接触したが試験化合物とは接触していない細胞における苦味受容体の活性と比較して、苦味受容体の活性を阻害する試験化合物を苦味受容体のアンタゴニストと同定する、上記方法。

【請求項 3 6】

苦味受容体の活性が、細胞内カルシウム放出の変化又は細胞内 I P 3 の変化を測定することにより測定される、請求項 3 5 に記載の方法。

20

【請求項 3 7】

試験化合物が、苦味物質の前に、後に、又は苦味物質と同時に加えられる、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

気道細胞が気道平滑筋細胞又は非線毛気道上皮細胞である、請求項 3 3 又は 3 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

連邦政府による資金提供を受けた研究の陳述

30

本発明は、国立衛生研究所に認められた助成番号 H L 0 4 5 9 6 7 及び H L 0 7 1 6 0 9 で政府支援を受けて行われた。政府は本発明に所定の権利を有する。

【0002】

分野

気道平滑筋細胞の表面上に発現された苦味物質受容体に結合する化合物を投与することにより、例えば閉塞性肺疾患を処置するために、気道拡張を増加させ、かつ／又は気道収縮を減少させるための方法が本明細書において提供される。また、苦味物質受容体の機能を調節する化合物を同定する方法も本明細書において提供される。

【背景技術】

【0003】

40

背景

世界中で 3 億人の個体がぜん息及び慢性閉塞性肺疾患 (C O P D) に同時に罹患している。両方の疾患に由来する罹患率及び死亡率の主な原因は気道閉塞であり、これはしばしば、気管支／気管支樹の活発に収縮した平滑筋に起因する (非特許文献 1)。C O P D における気道抵抗は喫煙に由来する構造的変化に起因して変動する程度の可逆性を有するが、C O P D 及びぜん息の治療は両方とも気管支収縮性受容体に特異的なアンタゴニスト及び気道平滑筋 (A S M) を弛緩させる受容体に特異的なアゴニストを含む (非特許文献 2、3)。

【0004】

収縮及び弛緩を調節する A S M の主要な受容体シグナル伝達ファミリーは G タンパク質

50

共役受容体（GPCR）である（非特許文献3）。気道緊張の調節をもたらすGPCR経路を同定し、それによりぜん息及びCOPDについての新しい処置方策を提供するための努力が続けられている。両方の疾患の発生数が増えつつあり、そして少なくとも全ての患者の二分の一は現在利用可能な薬剤では十分に制御されていないので、このような努力が必要とされている（非特許文献4、5）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Vignola, A.M., Bonsignore, G., Chanez, P. & Bousquet, J. Fatal Asthma 139-155 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998)

10

【非特許文献2】Billington, C.K. & Penn, R.B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir. Res.* 4, 2-24 (2003).

【非特許文献3】Green, S.A. & Liggett, S.B. The Genetics of Asthma 67-90 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1996)

【非特許文献4】Drazen, J.M., Silverman, E.K. & Lee, T.H. Heterogeneity of therapeutic responses in asthma. *Br. Med. Bull.* 56, 1054-1070 (2000).

【非特許文献5】Malmstrom, K. et al. Oral montelukast, inhaled beclomethasone, and placebo for chronic asthma. A randomized, controlled trial. Montelukast/Beclo methasone Study Group. *Ann. Intern. Med.* 130, 487-495 (1999)

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ぜん息及びCOPDのような閉塞性気道疾患の処置におけるさらなる治療選択肢に対する満たされていない必要性が存在する。特定の G_q -共役経路を拮抗し、それにより気管支痙攣を減少させる可能性のある薬物の改善においていくらかの進展があったが、 β -アゴニストが依然として唯一の実用的な直接的気管支拡張薬である。ぜん息及びCOPDのような閉塞性肺疾患を処置するための新しい手段の発見及び開発が緊急に必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

30

要旨

第一の局面において、対象（subject）における閉塞性肺疾患又は状態を処置する方法が本明細書において提供され、この方法は、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、処置を必要とする対象に投与することを含む。特定の局面において、閉塞性肺疾患又は状態は、例えばぜん息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、気腫又は気管支炎であり得る。

【0008】

第二の局面において、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、気管支拡張を必要とする対象に投与することを含む、対象における気管支拡張を誘発する方法が本発明において提供される。

【0009】

40

第三の局面において、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、気道平滑筋（ASM）弛緩を必要とする対象に投与することを含む、対象における気道平滑筋を弛緩させる方法が本明細書において提供される。

【0010】

第四の局面において、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、気管支収縮又は気管支痙攣の処置又は予防を必要とする対象に投与することを含む、気管支収縮又は気管支痙攣を対象における処置又は予防する方法が本明細書において提供される。

【0011】

上記の方法の特定の局面において、苦味物質は、アリストコール酸（aristocholic acid）、クロロキン、コルヒチン、デナトニウム、キニーネ、サッカリン

50

、サリシン、ストリキニーネ及びヨヒンビンのような化合物であり得る。上記の方法のさらに他の局面において、医薬組成物は吸入剤又は他の送達方法、例えば経口送達の形態であり得、そして対象はヒトでも他の動物でもよい。

【0012】

第五の局面において、気道平滑筋細胞を、苦味物質受容体に結合する試験化合物と接触させること、及び試験化合物が気道平滑筋細胞を弛緩させるか否かを決定することを含み、ここで平滑筋細胞を弛緩させる化合物は気道平滑筋を弛緩させるための化合物として同定される、気道平滑筋を弛緩させるための化合物を同定する方法が本明細書において提供される。例えば、気道平滑筋細胞の弛緩は、気道平滑筋細胞における苦味物質受容体仲介シグナル伝達の増加を、例えば気道平滑筋細胞における細胞内カルシウム放出の増加又は細胞内IP₃の増加を検出することにより検出され得る。

10

【0013】

第六の局面において、苦味物質受容体の調節剤を同定するための方法が本明細書において提供され、この方法は、苦味受容体を天然で発現する気道細胞を試験化合物と接触させること、及び苦味受容体の活性を測定することを含み、ここで苦味受容体の活性を増加させる化合物は苦味受容体のアゴニストであり、そして苦味受容体の活性を減少させる化合物は苦味受容体のアンタゴニストである。例えば、苦味物質受容体の活性の変化は、試験化合物と接触していない気道平滑筋細胞と比較して、気道平滑筋細胞における細胞内カルシウム放出の変化又は細胞内IP₃の変化により検出される。

20

【0014】

第七の局面において、苦味受容体のアンタゴニストである化合物を同定する方法が本明細書において提供され、この方法は、苦味受容体を天然で発現する気道細胞を、試験化合物と、かつ苦味物質と接触させること、及び苦味受容体の活性を測定することを含み、ここで苦味物質と接触したが試験化合物とは接触していない細胞における苦味受容体の活性と比較して、苦味受容体の活性を阻害する試験化合物を苦味受容体のアンタゴニストと同定する。例えば、苦味受容体の活性は、細胞内カルシウム放出の変化又は細胞内IP₃の変化を測定することにより測定される。試験化合物は、苦味物質の前に、後に、又は苦味物質と同時に加えられ得る。

【0015】

本明細書において記載されるスクリーニング方法において、気道細胞は気道平滑筋細胞でも非線毛気道上皮細胞でもよい。

30

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】多様な構造の苦味物質がヒト気道平滑筋細胞において $[Ca^{2+}]_i$ の増加を惹起する。培養初代ASM細胞にFluo-4 AMをロードして研究を行った。(a, b) 5~6回の実験からのサッカリン及びクロロキンに対する一過性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇及び用量応答曲線、(c) 1.0 mMの苦味物質(アリストコール酸、クロロキン、コルヒチン、デナトニウム、キニーネ、サッカリン、サリシン、ストリキニーネ及びヨヒンビン)、気管支収縮性G_q-共役アゴニストヒスタミン(0.1 mM)、及びブラジキニン(0.01 mM)、並びに1.0 mMの甘味物質スクラロース(sucralose)及びSC45647に対する最大 $[Ca^{2+}]_i$ 応答。結果は4~6回の実験からのものである。
* , 基礎に対して $P < 0.01$; # , デナトニウムに対して $P < 0.05$ 。(d) $[Ca^{2+}]_i$ 応答はPLC阻害剤U73122及び $\beta\gamma$ アンタゴニストガレインにより除去され、そしてIP₃受容体アンタゴニスト2APBにより減衰する。これらの研究を細胞外カルシウムを存在させずに行った。示される結果は少なくとも3回行われたうちの1つの代表的な実験からのものである。

40

【図2】免疫細胞学によるヒト気道平滑筋細胞での苦味受容体及び他のタンパク質の発現。細胞切片を他所³¹に記載される標準的な方法により処理し、そして抗血清を、示されたタンパク質を同定するために利用した。抗血清はT2R10、44、及び7、ガストデューシン及びBK_{Ca}に対して特異的なものであった。そのmRNAがRT-PCRにより十

50

分豊富に見出されたT2R10及びT2R44のタンパク質発現(表2を参照のこと)を、ヒトASMで赤いシグナルとして検出し、一方でそのmRNAが検出されなかったT2R7はシグナルを示さなかった。2行目のネガティブコントロールは、抗血清が存在しない場合のバックグラウンドシグナルを表す。核をDAPI蛍光からの青色により同定した。ガストデュシン及びBK_{Ca}タンパク質も示されるように同定した。(結果は3回の実験の代表であり、実験あたり>100個の細胞を撮像した、倍率60X。)

【図3】ASM細胞のポリクローナルT2R10抗血清とのインキュベーションによるT2R10の遮断は、ストリキニーネ促進[Ca²⁺]_i増加を阻害する。細胞を2時間、示された力価(1:200~1:25)のT2R10及びT2R7抗血清、1:50力価のアイソタイプ特異的IgG、又は培地のみ(コントロール)とともにインキュベートした。[Ca²⁺]_iをT2R10アゴニストストリキニーネ(1mM)により刺激した。T2R10抗血清はストリキニーネ促進[Ca²⁺]_i増加を減少させた。IgGもT2R7に対する抗血清(ASMにおいて発現されない)も、[Ca²⁺]_i刺激に対して有意な効果を有していなかった。*, コントロールに対してP<0.01。

【図4】苦味物質は非cAMP依存性様式で気管支拡張を惹起する。(a)β-アゴニストイソプロテレノール(iso)並びに苦味受容体アゴニストのクロロキン(chloro)、デナトニウム(denat)、及びキニーネについての弛緩の用量-応答曲線(1.0mMアセチルコリンを用いて収縮したインタクトなマウス気管から誘導された)(n=7回の実験)。(b)クロロキン及びキニーネは、1.0mMのセロトニンにより収縮したインタクトなマウス気管を弛緩させる(n=4回の実験)。(c)培養ヒトASM細胞を1.0mMクロロキンと共に示された時間、又は30μMイソプロテレノールと共に15分間インキュベートし、そしてcAMPをラジオイムノアッセイにより測定した。クロロキンにより促進されたcAMP蓄積の証拠はなかった(n=3回の実験)。挿入図: 培養ヒトASM細胞を1.0mMのクロロキン若しくはサッカリン(sacc)、又は10μMのフォルスコリン(forsk)に曝露し、そして細胞抽出物を免疫ブロットして、cAMP促進事象であるPKA媒介VASPリン酸化を確認した(上のバンド)。cAMP産生を刺激するフォルスコリンは、上のバンドにより示されるようにVASPのリン酸化を生じた。クロロキンもサッカリンもVASPリン酸化を促進せず、cAMP測定と一致していた。(d)イソプロテレノール及びクロロキンに対する気道弛緩応答は相加的である。インタクトなマウス気管を1.0mMアセチルコリン(ach)を用いて収縮させ、これをクロロキン(200μM)又はイソプロテレノール(30μM)、又は両方の薬物を加えた場合に浴中で維持した。クロロキン曝露の後、軟骨輪(rings)を洗浄し、次いで同じ用量のアセチルコリンで再誘発した。*, アセチルコリン単独に対してP<0.05; #, アセチルコリン+イソプロテレノール、又はクロロキン単独に対してP<0.01。結果は4回の実験からのものである。

【図5】苦味物質はベースライン気道張力を弛緩させる。マウス気管軟骨輪を約5mNの静止張力(passive tension)に配置して1.0mMのクロロキン、デナトニウム、又はキニーネに曝露した。結果は4回の実験からのものである。*, ベースラインに対してP<0.05。

【図6】苦味物質はヒト気道平滑筋を弛緩させる。外科標本から得た肉眼で見て正常な肺組織に由来する第四世代気管支からの軟骨輪を実施例に記載されるように取り付けた。軟骨輪を5mNの静止張力に設定し、1.0mMアセチルコリンを用いて連続的に収縮させ、次いで1mMのクロロキン若しくはサッカリン、又は10μMのイソプロテレノールに曝露した。3個体からの6つの軟骨輪を用いて行われた個々の実験からの結果を示す。

【図7】単離された気道平滑筋は、単細胞力学により評価して、苦味物質に応答する。(a)イソプロテレノール(Iso)、クロロキン(Chloro)及びサッカリン(Sacc)は単離されたASM細胞を弛緩させるがヒスタミン(Hist)は収縮させる。(b)単離されたASM細胞における1mMサッカリンに対する弛緩応答は、PLCβ阻害剤U73122(1μM)、100nMのBK_{Ca}アンタゴニストイベリオトキシン(IbTx)及びカリブドトキシン(ChTx)により阻害されるが、100nMのPKA阻

10

20

30

40

50

害剤H89により影響を受けない。(c)単離されたマウス気道における1mM Chloroに対する弛緩応答は100nM IbTxにより阻害される。結果は行われた5～8回の実験の代表である。

【図8】タブシガルジンによるSRカルシウムの枯渇は、ヒトASM細胞における $[Ca^{2+}]_i$ の苦味物質刺激を除去する。細胞を担体(コントロール)又は10 μ Mタブシガルジンで30分間処理し、そして苦味物質媒介 $[Ca^{2+}]_i$ 放出を実施例に記載されるように測定した。SR貯蔵に由来する $[Ca^{2+}]_i$ の増加も刺激する G_q -共役受容体リガンドブラジキニン及びヒスタミンをコントロールとして使用した。全てのアゴニストに対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答はタブシガルジン処理により除去された。4回行われたものの代表の単一の実験からのトレースを示す。

【図9】タブシガルジンによるSRカルシウムの枯渇は、インタクトなマウス気管軟骨輪のクロロキン媒介弛緩を除去する。軟骨輪を約5mNの静止張力に配置して、示されるように10 μ Mタブシガルジンと共にプレインキュベートせずに、又はプレインキュベートして担体、クロロキン(3.0mM)、又はアセチルコリン(1.0mM)に曝露した。白いバーはそれぞれタブシガルジンが存在しない場合又は存在下での洗浄後のベースライン張力を示す。結果は4回の実験からのものである。*, 対を成すベースライン張力に対して $P < 0.01$ 。

【図10】苦味物質は、イベリオトキシシンに対して感受性であるASM細胞において膜過分極を惹起する。細胞に、記載されるような¹⁹蛍光ベースの膜電位感受性色素をロードし、そして実施例に記載されるように示された薬剤を加えた後にデータを取得した(一番上のトレース=KCl; 上から二番目のトレース=hist; 一番下のトレース=chloro; 下から二番目のトレース=sacc)。蛍光の増加は脱分極を示し、減少は過分極を示す。a) 60mM KCl及び1.0 μ Mヒスタミンへの曝露は予期された脱分極を生じた。苦味物質サッカリン及びクロロキン(1mM)は過分極を惹起した。結果は4回行われたうちの単一の実験からのものである。b) 100nMの特異的BK_{Ca}チャネルアンタゴニストイベリオトキシシン(IbTX)とのプレインキュベーションは、両方の苦味物質からの膜過分極を阻害した。結果は4回の実験からのピーク応答を表す。*, ビヒクルコントロールに対して $P < 0.01$ 。

【図11】サッカリンはASM細胞において局所的 $[Ca^{2+}]_i$ 応答を優先的に引き起こす。(a, c) Fluo-3をロードした細胞の連続的共焦点像は、0.3mMサッカリンへのASM細胞の曝露の際の細胞周辺における局所的 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の活性化を示し、そして1.0 μ Mヒスタミンへの曝露では $[Ca^{2+}]_i$ の全体的な増加を示す。画像はバックグラウンドを差し引いた後のFluo-3蛍光であり、そしてベースラインは疑似カラーにより符号化された強度で正規化されている(F/F_0)。矢印は局所 $[Ca^{2+}]_i$ 「ホットスポット」を強調している。(b, d)局所的一過性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を関心領域(ROI)において測定した。サッカリンは末梢端(ROI 1)において急速な Ca^{2+} 上昇を活性化したが、細胞の中心部(ROI 2, 3)ではより小さく穏やかな $[Ca^{2+}]_i$ 増加であった。ヒスタミン応答(ROI 4-7)は非同期的であり、そして細胞全体を通して観察された。(e)共焦点ラインスキャン画像化は、末梢部位においてサッカリンにより活性化された空間時間分解局所 $[Ca^{2+}]_i$ 事象を示す。走査線(白い破線)を、左のパネルに示されるように細長いASM細胞の一端で細胞膜に対して平行に1 μ m以内に配置した。矢印は、分離した領域内のより明確な増加の前に生じるいくつかの局所的 $[Ca^{2+}]_i$ 事象を示す。一番下のパネルはラインスキャンから生じた空間的に平均した正規化蛍光シグナル(F/F_0)である。結果は5回行われたうちの1つの代表的な実験である。画像を構築するために利用したデータ取得数については方法を参照のこと。

【図12】苦味受容体アゴニストはぜん息のマウスモデルにおいて気管支収縮を軽減する。(a, b) コントロール及びオボアルブミン負荷マウス肺の切片からの顕微鏡写真は、オボアルブミン負荷気道における気道の好酸球性炎症、上皮肥厚及び及び基底膜肥厚を示す(ヘマトキシリン及びエオシン染色、倍率40X)。Br, 気管支; Bm, 基底膜; Eo, 好酸球; Ep, 上皮; Bl, 血管。コントロール(c)及びオボアルブミン負荷マ

10

20

30

40

50

ウス (d) における気道抵抗をベースラインで測定し、そして気管支収縮期の間に与えられたエアロゾル化メタコリン (mch)、キニーネ又はβ-アゴニスト アルブテロールに応じて測定した (n = 5 回の実験)。*, メタコリンに対して $P < 0.01$; #, メタコリンに対して $P < 0.05$ 。

【図 13】ヒト気道平滑筋細胞を使用した、様々な用量の公知の苦味受容体アゴニストクロロキンに対するヒト気道平滑筋細胞における一過性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇。

【図 14】ヒト気道平滑筋細胞を使用した、クロロキン (公知の苦味受容体アゴニスト) についての用量-応答曲線。効力 (potency) を 70 マイクロモル濃度と算出した。有効性 (efficacy) を 84, 317 蛍光単位の純変化と算出した。

【図 15】固定濃度 (1 mM) の各化合物を使用したヒト気道平滑筋細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 刺激についての苦味受容体アゴニストのスクリーニング。

【図 16】様々な用量の公知の苦味受容体アゴニスト キニーネに対する H292 細胞における一過性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇。キニーネの用量を凡例と逆の順序で示す。すなわち、50 秒における最低のトレースが 100 mU であり、次の上のトレースが 500 uM であり、以後そのようにして 50 秒における一番上のトレースは 2.5 mM である。

【図 17】H292 細胞を使用したキニーネ (公知の苦味受容体アゴニスト) についての $[Ca^{2+}]_i$ 刺激用量-応答曲線。効力を 703 マイクロモル濃度と算出し、そして、有効性を 133, 201 蛍光単位と算出した。

【図 18】H292 細胞を使用したクロロキン (公知の苦味受容体アゴニスト) についての $[Ca^{2+}]_i$ 刺激用量-応答曲線。効力を 74 マイクロモル濃度と算出し、そして有効性を 37, 136 蛍光単位と算出した。

【図 19】様々な用量の公知の苦味受容体アゴニスト クロロキンに対する BEAS2B 細胞における一過性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇。

【図 20】BEAS2B 細胞を使用したクロロキン (公知の苦味受容体アゴニスト) に対する $[Ca^{2+}]_i$ 刺激用量-応答曲線。効力を 90 マイクロモル濃度と算出し、そして有効性を 13, 995 蛍光単位と算出した。

【発明を実施するための形態】

【0017】

詳細な説明

例えばぜん息及び COPD のような閉塞性肺疾患を処置するための、気道拡張を増加させる新規な方法が本明細書において提供される。本発明の処置方法は、苦味受容体が単離されたヒト気道平滑筋 (ASM) において発現されるという予期しない発見に基づく。舌上の苦味の受容体は植物ベースの毒素を回避するために発達したと考えられている^{9,10}。これらの受容体は G タンパク質共役受容体 (GPCR) であり、少なくとも 25 の受容体サブタイプからなり、通常は他の苦味受容体と重複するアゴニストのレパートリーをそれぞれが認識して、重複した広く同調した回避及び拒絶のネットワークを作っている^{9,11,13}。ASM 上の苦味受容体の発見により、本発明者らは、これらの気道受容体における環境性吸入抗原の作用が痙攣及び気管支収縮をもたらすことにより、特定の気管支痙攣性障害、例えば職業性ぜん息¹⁴が引き起こされるのかもしれないという仮説を最初に立てることとなった。この考えは、苦味受容体が舌の分化した味覚細胞における $[Ca^{2+}]_i$ の増加と対になっており、かつこのシグナルが ASM 細胞におけるヒスタミン、アセチルコリン及びブラジキニンのような公知の気管支収縮性 GPCR でも見られる²という事実に基づくものであった。本明細書に開示される様々なアプローチを使用して、苦味物質が ASM 細胞において $[Ca^{2+}]_i$ を増加させることも見出された。しかし逆説的に、本発明者らは、苦味受容体アゴニストが気管支拡張剤であり、いずれの公知の治療剤よりも有意に高い有効性を有するということを発見した。これらの受容体は、ホスホリパーゼ C (PLC) の受容体生成 $G\beta\gamma$ 活性化、及び細胞表面 K^+ チャネルを開いて膜過分極を生じる分割された一過性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を含む新規な機構により ASM における弛緩応答を変換する。以下の実施例において詳細に考察されるこれらの知見は、本明細書において特許請求される本発明の基礎である。

10

20

30

40

50

【0018】

本発明の様々な局面において、苦味物質が気道平滑筋の弛緩及び気管支拡張を誘発すること、並びに苦味物質の対象への投与が気管支収縮に関連する状態及び疾患を処置するために使用され得るという新しい知見に基づく処置方法が提供される。従って、一局面において本発明は、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、処置を必要とする対象に投与することを含む、対象における閉塞性肺疾患又は状態を処置する方法を提供する。第二の局面において、本発明は、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、気管支拡張を必要とする対象に投与することを含む、対象における気管支拡張を誘発する方法を提供する。第三の局面において、本発明は、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、気道平滑筋（ASM）弛緩を必要とする対象に投与することを含む、対象におけるASMを弛緩させる方法を提供する。第四の局面において、本発明は、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、気管支収縮又は気管支痙攣の処置又は予防を必要とする対象に投与することを含む、対象における気管支収縮又は気管支痙攣を処置又は予防する方法を提供する。関連する局面において、本発明は、気道平滑筋を弛緩させるための化合物を同定する方法を提供し、この方法は、気道平滑筋細胞を、苦味物質受容体に結合する試験化合物と接触させること、及び試験化合物が気道平滑筋細胞を弛緩させるか否かを決定することを含み、ここで平滑筋細胞を弛緩させる化合物は気道平滑筋を弛緩させるための化合物として同定される。

10

【0019】

上記の本発明の局面の各々において、苦味物質（BT）のアイデンティティは方法の成功に決定的ではないが、特定のBTが特定の方法において、かつ特定の状態及び疾患の処置において、他のBTよりも有効だろうということは想定される。非毒性であり、苦味受容体を活性化する多くの公知の合成薬剤がある¹⁰。そして好ましい治療プロフィールを有し得る多くの植物由来苦味物質及びそれらの代謝産物が存在する¹⁰。「苦味受容体」、「苦味物質受容体」及び同類のものは、当該分野で知られているように、かつ／又は例えば Chandrashekar et al., Cell 100:703-711 (2000); Adler et al., Cell 100:693-702 (2000); Chandrashekar et al. Nature 444:288-294 (2006); 若しくは Contea et al., Cytogenet. Genome Res. 98:45-53 (2002) において記載されるように、T2R又はTAS2R受容体を意味する。「苦味物質」は、合成でも天然に存在するものでも、気道平滑筋細胞の表面上に存在する苦味物質受容体に結合し、そしてそのような結合を介して、気道平滑筋細胞を弛緩させる化合物を意味し；このような化合物はいずれも、本明細書に記載される方法における使用のための苦味物質として考慮される。本発明の医薬組成物及び方法において使用され得る苦味物質の例としては、限定されないが、以下の1つ又はそれ以上が挙げられる：アリストコール酸（aristocholic acid）、クロロキン、コルヒチン、デナトニウム、キニーネ、サッカリン、サリシン、ストリキニーネ及びヨヒンビン。

20

30

【0020】

このような苦味物質は1つ又はそれ以上の苦味受容体の「アゴニスト」であり、そしてこのような上記（such such）アゴニストのそれらの同族苦味受容体への結合は、本明細書に記載されるような周知の方法により検出され得る。苦味受容体「アンタゴニスト」は、アゴニストの苦味受容体への結合を阻害し、かつ／又はそうでなければ苦味受容体アゴニストのそれらの同族受容体への結合により開始される生化学的シグナル伝達カスケードを阻害する。結合の減少及び／又は苦味受容体シグナル伝達の阻害は部分的でも完全でもよい。従って苦味アンタゴニストは、食料品、医薬品、及び他の経口摂取製品における苦味を部分的に又は完全に減少させ得るか又はマスクし得る。

40

【0021】

本発明により包含される閉塞性肺疾患及び状態は、急性でも慢性でも、対象の肺中へ、かつ／又は肺からの気流の欠陥を特徴とする呼吸器の状態又は疾患を含む。閉塞性肺疾患

50

及び状態としては、例えばぜん息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、気腫及び気管支炎に加えて、嚢胞性線維症、気管支拡張症、細気管支炎、及びアレルギー性気管支肺アスペルギルス症が挙げられる。本明細書に記載されるように苦味物質を投与することにより処置又は予防され得る別のこのような閉塞性肺疾患又は状態としては、例えば喫煙又は腐食性化学物質のような有害化合物の吸入により；呼吸器感染症により；又は敗血症、若しくは食物（例えば落花生）、薬物（例えばペニシリン）、昆虫の刺創若しくは咬傷、花粉、カビ、イエダニ、ラテックス若しくは他の物質に対するアレルギー反応により引き起こされるようなアナフィラキシーにより；又は気管支収縮若しくは気管支痙攣の他の要因により引き起こされ得る気管支収縮又は気管支痙攣が挙げられる。例えば苦味物質は、運動又は大気汚染により誘発される気管支痙攣を予防（又は処置）するために投与され得る。別の例において、苦味物質は呼吸管の配置により誘発される気管支痙攣を予防（又は処置）するために管の配置前又は配置中に投与され得る。本発明の苦味物質は、例えば低酸素環境（例えば海拔数千フィート）における酸素摂取量を改善するため、又は運動能力を改善するために、気管支拡張を増加させることが望ましいかもしれない状況において、健常個体に投与され得る。

10

【0022】

本発明の実施態様の各々において、処置を受ける対象はヒト又は非ヒト動物、例えば非ヒト霊長類、鳥類、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、コンパニオンアニマル、例えばイヌ、ネコ若しくは齧歯類、又は他の哺乳動物である。いくつかの実施態様において、対象はヒトである。

20

【0023】

苦味物質を含む本発明の医薬組成物は、苦味物質のアイデンティティによって、1つ又はそれ以上の担体、希釈剤及び添加剤（例えば、薬学的に許容しうる担体、希釈剤又は添加剤）を含んでいてもよい。「薬学的に許容しうる」は、生物学的にも他の点でも有害でない物質、すなわち、有害な生物学的影響を引き起こすことも、それが含まれる医薬組成物のいずれの構成要素とも有害な様式で相互作用することもなく、苦味物質とともに個体に投与され得る物質を意味する。このような組成物を対象に投与するための適切な製剤又は組成物を提供するために従来の薬務が使用され得る。これらの用語は、細胞培地を具体的に除外する。適切な希釈剤（乾燥及び液状の医薬製剤の両方について）は当業者に周知であり、そしてこれらとしては、食塩水、緩衝化食塩水、デキストロース（例えば水中5%デキストロース）、水、グリセロール、エタノール、プロピレングリコール、ポリソルベート80（Tween-80TM）、ポリ（エチレン）グリコール300及び400（PEG300及び400）、PEG化ヒマシ油（例えば、Cremophor EL）、ポロキサマー407及び188、シクロデキストリン又はシクロデキストリン誘導体（HPCD（（2-ヒドロキシプロピル）-シクロデキストリン）及び（2-ヒドロキシエチル）-シクロデキストリンを含む；例えば米国特許出願公開20060194717号を参照のこと）が挙げられる。

30

【0024】

担体は、医薬製剤の文脈において、活性成分の対象への送達を改善及び／又は延長する化合物及び物質である。担体は、制御放出技術を使用して、薬物のインビボでの活性を延長させるか又は対象における薬物の放出を遅らせるために役立ち得る。担体はまた、対象における薬物代謝を減少させ得、かつ／又は薬物の毒性を低減し得る。担体はまた、薬物の送達を対象における特定の細胞又は組織を対象にするために使用され得る。一般的な担体（親水性担体及び疎水性担体の両方）としては、脂肪エマルジョン、脂質、PEG化リン脂質（phospholipids）、リボソーム及びリボスフェア（lipospheres）、ミクロスフェア（生分解性ポリマー又はアルブミンで作られているものを含む）、ポリマーマトリックス、生体適合性ポリマー、タンパク質-DNA複合体、タンパク質複合体、赤血球、小胞及び粒子が挙げられる。

40

【0025】

医薬組成物に含められる添加剤は、例えば薬物の性質、及び投与様式によって異なる目

50

的を有する。一般的に使用される添加剤の例としては、限定することなく、以下が挙げられる：安定化剤、可溶化剤、及び界面活性剤、緩衝剤及び保存料、等張化剤、増量剤、滑沢剤（例えばタルク又はシリカ、及び脂肪、例えば植物ステアリン、ステアリン酸マグネシウム、又はステアリン酸）、乳化剤、懸濁化剤又は粘性剤、不活性希釈剤、フィラー（例えばセルロース、第二リン酸カルシウム、植物脂肪及び油脂、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、ソルビトール、炭酸カルシウム、及びステアリン酸マグネシウム）、崩壊剤（例えば架橋ポリビニルピロリドン、グリコール酸ナトリウムデンプン、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、結合剤（例えば、デンプン、ゼラチン、セルロース、メチルセルロース又は変性セルロース、例えば微結晶性セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、糖類、例えばスクロース及びラクトース、又は糖アルコール、例えばキシリトール、ソルビトール若しくはマルチトール、ポリビニルピロリドン及びポリエチレングリコール）、湿潤剤、抗菌剤、キレート剤、コーティング（例えばセルロースフィルムコーティング、合成ポリマー、シェラック、トウモロコシタンパク質ゼイン又は他の多糖類、及びゼラチン）、保存料（ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC、レチニルパルミテート、及びセレン、システイン、メチオニン、クエン酸及びクエン酸ナトリウム、並びにメチルパラベン及びプロピルパラベンを含む合成保存料）、甘味料、芳香剤、矯味矯臭剤、着色剤、投与補助剤、並びにそれらの組み合わせ。

【0026】

本発明の医薬組成物は、鼻腔吸入でも頬側吸入でも、肺投与のために製剤化され得る。医薬組成物の単位投薬量は、加圧パック若しくはネブライザからのエアロゾルスプレーの形態で、又は気化器を介して都合よく送達され得る。医薬組成物は製剤化散剤として送達されてもよく、そして散剤組成物はガス注入粉末吸入器デバイスを用いて吸入され得る。吸入のための送達システムの一例は 定量吸入（MDI）エアロゾルであり、これは本発明の医薬組成物の、適切な噴霧剤（例えばHFA-134a（1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン）を含むフルオロカーボン又は炭化水素中の乾燥懸濁剤又は湿性液剤として製剤化され得る。噴霧剤は、1つ又はそれ以上の安定化添加剤、例えばエタノール及びオレイン酸も含み得る。さらに、いずれの他の適切な投与経路も使用され得、例えば、限定されないが、静脈内、非経口、口腔粘膜経由（transbuccal）、経皮（transdermal）、経皮（transcutaneous）、皮下、鼻腔内、エアロゾル、又は経口投与である。治療用製剤は液状の液剤形態でも懸濁剤形態でもよく；例えば、経口投与については、製剤は錠剤又はカプセル剤の形態であり得；鼻腔内製剤については、散剤、点鼻薬、又はエアロゾルの形態；経皮製剤については、クリーム剤、又は皮膚に適用するためのパッチ上に広げられた形態であり得る。

【0027】

医薬製剤中の苦味物質の有効量は、使用される苦味物質及び並びに処置される状態又は疾患、さらには対象の年齢及び他に摂取される薬剤のような因子によって変わる。有効投薬量は、典型的には当該分野で周知であるように担当医によって設定されるだろう。しかし単位用量で対象に送達される苦味物質の濃度は、一般的には約0.05mgから約100mgの範囲に及び、又はこの範囲内の値である。苦味物質は組み合わせて（例えば2つ又はそれ以上の苦味物質）、かつ／又は1つ若しくはそれ以上の苦味物質でない化合物（例えば、限定されないがアルブテロールのようなベータアゴニスト）と組み合わせて投与され得る。本明細書において提供される1つの非限定的な例において、イソプロテレノール及びクロロキンに対する気道弛緩応答は相加的であり；したがって、いくつかの状況下では、この組み合わせをそれを必要とする対象に投与することが適切であり得る。

【0028】

本明細書で使用される用語「用量」、「投薬量」、「単位用量」、「単位投薬量」、「有効用量」及び関連する用語は、所望の治療効果（例えば、気管支拡張又は気道の弛緩）を生じるように計算された活性成分（苦味物質）の所定の量を含有する物理的に別個の単位を指す。これらの用語は治療有効量及び本明細書において開示される方法の示された目的を達成するために十分な量と同義である。

10

20

30

40

50

【0029】

本明細書で使用される用語「処置する」、「処置すること」、及び「処置」はそれらの通常及び慣例の意味を有し、そして対象における閉塞性肺疾患又は状態の症状を寛解させること、対象における閉塞性肺疾患又は状態の症状の再発を遮断すること又は寛解させること、対象における閉塞性肺疾患又は状態の症状の重症度及び／又は頻度を減少させることの1つ又はそれ以上を含む。本明細書において使用される「処置」は、患者又は対象がより容易に呼吸できるように、少なくとも部分的に、かつ少なくとも一時的に、気管支収縮（又は気管支痙攣）を軽減すること又は気管支拡張を増加させることを含む。処置は、医薬組成物が投与されていない対象に対して、約1%～約100%だけ寛解させること、遮断すること、低減すること、減少させること又は阻害することを意味する。好ましくは、寛解させること、遮断すること、低減すること、減少させること又は阻害することは、医薬組成物が投与されていない対象に対して約100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、又は1%である。

10

【0030】

本明細書で使用される用語「予防する」、「予防すること」、及び「予防」はそれらの通常及び慣例の意味を有し、そして対象における閉塞性肺疾患又は状態の症状を予防すること、対象における閉塞性肺疾患又は状態の症状の再発を阻止すること、及び対象における閉塞性肺疾患又は状態の症状の頻度を減少させることの1つ又は以上を含む。本明細書で使用される「予防」は、患者又は対象における呼吸が阻害されないように、少なくとも部分的に、かつ少なくとも一時的に、気管支収縮（又は気管支痙攣）を阻止することを含む。予防は、医薬組成物が投与されていない対象に対して、対象における約100%、99%、98%、97%、96%、95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%又は1%の保護であり得る。予防は、医薬組成物の投与の後、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、若しくは24時間、又はそれ以上持続する。

20

【0031】

平滑筋細胞の表面上の苦味物質受容体を活性化し、それにより気道平滑筋を弛緩させることにより気道平滑筋を弛緩させる方法が本明細書において提供される。苦味物質受容体は、受容体を苦味物質と接触させることにより活性化され得る。活性化され得る苦味物質受容体としては、例えば、T2R10；T2R14；T2R44；T2R5；T2R4；T2R48；T2R3；T2R49；T2R45；T2R50；T2R47；T2R9；T2R13；TAS2R55；TAS2R46；TAS2R1；TAS2R8が挙げられる。本明細書において提供される方法のいずれかにおいて、上述の苦味物質受容体の1つ又はそれ以上が活性化され得る。苦味物質は、様々な刺激により引き起こされるか若しくは疾患若しくは状態の原因となっている気管支痙攣若しくは気管支収縮を予防若しくは処置するため；気管支拡張を増加させるため；かつ／又は気道平滑筋を弛緩させることが望ましいであろう様々な疾患及び状態を処置するために使用され得る。

30

【0032】

例えば、本発明は、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、処置を必要とする対象に投与することを含む、対象におけるぜん息を処置する方法を提供する。

40

【0033】

別の例において、本発明は、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、処置を必要とする対象に投与することを含む、対象におけるCOPDを処置する方法を提供する。

【0034】

さらに別の例において、本発明は、苦味物質を含む治療有効量の医薬組成物を、処置を必要とする対象に投与することを含む、対象における気管支炎を処置する方法を提供する。

【0035】

50

これらの局面の各々において、医薬組成物は吸入剤の形態であり得、又はいずれかの周知の方法（例えば、限定されないが、経口、静脈内、頬側、経皮など）により全身投与され得る。これらの局面の各々において、医薬組成物は好ましくは吸入剤の形態である。

【0036】

気道平滑筋細胞を、苦味物質受容体に結合する試験化合物と接触させること、及び試験化合物が気道平滑筋細胞を弛緩させるか否かを決定することを含み、ここで平滑筋細胞を弛緩させる化合物は気道平滑筋を弛緩させるための化合物として同定される、気道平滑筋を弛緩させるための化合物を同定する方法もまた本明細書において提供される。試験化合物が結合し得る苦味物質受容体としては、例えば、T2R10；T2R14；T2R44；T2R5；T2R4；T2R48；T2R3；T2R49；T2R45；T2R50；T2R47；T2R9；T2R13；TAS2R55；TAS2R46；TAS2R1；TAS2R8が挙げられ得る（表2のと通りの命名法；代替の命名については表3を参照のこと）。本明細書において提供される方法のいずれかにおいて、苦味物質は上述の苦味物質受容体の1つ又はそれ以上に結合し得る。

10

【0037】

苦味受容体アゴニストである化合物を同定する方法も本明細書において提供される。

【0038】

苦味受容体アンタゴニストである化合物を同定する方法も本明細書において提供される。

20

【0039】

苦味受容体アゴニスト及びアンタゴニストの同定

苦味受容体が気道細胞（例えば、気道平滑筋細胞及び非線毛気道上皮細胞）の表面上で発現されるという本発明者らの発見は、苦味受容体アゴニスト及びアンタゴニストとして役立つ化合物を同定するための新しいスクリーニングアプローチを提供する。苦味受容体アゴニストは、本明細書に記載されるように、例えば気道平滑筋を弛緩させるため、及び苦味受容体を活性化させることが望ましいであろういずれかの他の用途のために使用され得る。苦味受容体アンタゴニストは多くの用途を見出し、例えば食物及び飲料；薬物、栄養補助食品、及び栄養補給剤；口腔ケア製品などにおける苦味を減少させるかマスクするための成分として含まれる。本明細書に記載される方法により同定された候補苦味受容体アンタゴニストを、周知の方法により、例えば候補苦味受容体アンタゴニストを消耗品又は他の経口摂取される製品と混合し、そしてそれらの製品を苦味の知覚に敏感な人々による味覚試験にかけることにより、さらに評価され得る。

30

【0040】

試験化合物はいずれかの合成又は天然に存在する分子であり得る。化合物は、化合物のライブラリ、例えば、限定されないが、当該分野で周知であるような、コンビナトリアル化合物ライブラリ又は天然に存在する化合物（例えば、限定されないが、ペプチド、タンパク質、糖類、炭水化物、ヌクレオチド、核酸、脂質及び／又はそれらの誘導体若しくは混合物）のライブラリから同定され得る。試験化合物には、苦味受容体アゴニスト又はアンタゴニストとの構造類似性が既知である化合物が含まれ得る。当業者は、合成及び天然の化学化合物ライブラリーの多くの商業的供給源があることを理解するだろう（例えば、限定されないが：TimTec USA, Princeton BioMolecular Research, Aurora Fine Chemicalsなど）。コンビナトリアルライブラリー及び他の化合物ライブラリーを製造及びスクリーニングするための多数の方法が当該分野で周知である。例えば、米国特許第7,393,65号；米国特許公開第2010/0129833号；及び米国特許公開第2010/0113548号（これはそれぞれその全体が参照により本明細書に加入される）を参照のこと。

40

【0041】

苦味受容体の試験化合物（すなわち可能性のあるアゴニスト又はアンタゴニスト）の結合はいずれかの適切なアプローチにより検出され得る。例えば、苦味物質の苦味受容体への結合は、ホスファチジルイノシトール（PI）のホスホリパーゼC媒介加水分解を介す

50

るイノシトール酸リン酸（IP₃）の増加のような細胞内事象を開始する。次いでIP₃は細胞内カルシウム貯蔵の放出を刺激する。従って、このような変化を検出するための周知の方法を使用して、細胞質カルシウム濃度の変化又は第二メッセンジャーレベルの変化が、苦味受容体アゴニスト又はアンタゴニストを同定するために使用され得る。本明細書において記載される方法に加えて、このような有用な方法の例については例えば米国特許第7,393,654号；米国特許公開第2010/0129833号；及び米国特許公開第2010/0113548号（これらはそれぞれその全体が参照により本明細書に加入される）を参照のこと。「苦味受容体の活性を測定すること」は、苦味受容体により達成される生化学的シグナル伝達の変化（例えば、細胞内カルシウム放出、IP₃レベル、又は他のシグナル伝達分子レベルの変化）を測定すること、又は苦味物質受容体への苦味物質の結合の量を測定することを意味する。例えば、苦味受容体に対するアンタゴニストは、既知の苦味物質のその同族受容体への結合を阻害する能力、又は例えば細胞内カルシウム放出、IP₃生成などにより証明されるような生化学的シグナル伝達における苦味物質が媒介する増加を阻害する能力により同定され得る。反対に、苦味物質受容体アゴニストは、苦味物質受容体に結合するその能力、及び／又は本明細書に記載され、そして当該分野で周知であるような苦味物質が媒介する生化学的シグナル伝達を刺激するその能力により同定される。苦味物質アゴニスト及びアンタゴニストを検出するためのこのような周知のアッセイの例については、例えば、米国特許第7,393,654号；米国特許公開第2010/0129833号；及び米国特許公開第2010/0113548号を参照のこと。

10

20

【0042】

さらに、本明細書に記載されるように、苦味受容体アゴニスト及びアンタゴニストは、気道平滑筋細胞を弛緩させるそれらの能力（苦味受容体アゴニストの場合）、又はこのような弛緩を阻害するそれらの能力（苦味受容体アンタゴニストの場合）により同定され得る。苦味受容体媒介活性の少なくとも10%の増加は苦味受容体アゴニストを同定する。アゴニスト媒介苦味受容体活性の少なくとも10%の減少は苦味受容体アンタゴニストを同定する。このような変化は、例えば少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、10%などの変化であり得る。

【0043】

一例において、細胞をマルチウェルディッシュで増殖させ、蛍光ベースのカルシウム指示薬色素をロードし、そして試験化合物を添加し、続いて細胞内カルシウム $[Ca^{2+}]_i$ 放出の変化を示す蛍光の変化をモニタリングする。試験化合物には、既知の苦味受容体アゴニスト又はアンタゴニストに対して構造的類似性を有するものが含まれ得る。

30

【0044】

苦味受容体アゴニストとして役立つ化合物で細胞を処理した場合、 $[Ca^{2+}]_i$ の用量依存性上昇が観察される。用量-応答曲線から、効力（最大応答の50%が生じる場合の有効濃度；EC₅₀としても知られる）及び有効性（最大 $[Ca^{2+}]_i$ 応答）がその化合物について確認され得る。

【0045】

苦味受容体のアンタゴニストは、これらの細胞における $[Ca^{2+}]_i$ のアゴニスト活性化を遮断するそれらの能力によりそれ自体特異的に同定される。従って、苦味受容体へのアンタゴニストの結合は単独で調べた場合は $[Ca^{2+}]_i$ の変化を生じないか、又は減少をもたらすだろう。苦味受容体アンタゴニストを同定するための実験は、提案されているアンタゴニスト及び苦味受容体の既知のアゴニストで細胞を処理することにより行われる。既知のアゴニストからの $[Ca^{2+}]_i$ シグナルと提案されているアンタゴニスト化合物の存在下でのそのアゴニストからのシグナルとを比較することにより、アゴニストの受容体へのアクセスを遮断するように作用しているという証拠が得られ、これはアンタゴニストであることを示す。様々な用量の提案されているアンタゴニストを使用することにより、効力（上で定義される）及び有効性（ここではアゴニストシグナルの最大阻害と定義される）が明らかにされる。

40

50

【0046】

具体例は、苦味受容体アゴニスト アセスルファームKを800マイクロモル濃度の固定濃度で、多様な濃度の味覚受容体アンタゴニストGIV3727 (TAS2R31でアンタゴニストであることが知られている)と共に使用し、そしてGIV3727の濃度を増加させながら $[Ca^{2+}]_i$ シグナルの大きさの減少を観察することである。この具体例において、アッセイは例えば、初代ヒト気道平滑筋細胞又はH292細胞(両方ともTAS2R31を発現するので)を用いて行われ得る。

【0047】

一般に、苦味受容体のアゴニスト及びアンタゴニストについてのアッセイは、1つ又はそれ以上の苦味受容体を発現する気道細胞(例えば、気道平滑筋細胞又は非線毛気道上皮細胞)のいずれかの供給源を用いて行われ得る。例えば、初代ヒト気道平滑筋細胞は、S A Green et al. (Influence of beta2- adrenergic receptor genotypes on signal transduction in human airway smooth muscle cells. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 13:25-33, 1995)(その全体が参照により本明細書に加入される)において記載されるようにヒト組織から得られ得る。

10

【0048】

本明細書において記載されるスクリーニング方法において使用され得る初代平滑筋細胞の別の供給源は、Lonza Research Solutionsからのカタログ番号CC-2576(及び他のもの)である。さらに、当業者には当然のことながら、Lonzaは正常及び疾患の気道上皮細胞並びに気道平滑筋細胞の供給元である。Lonzaはまた正常及び疾患の気道線維芽細胞を提供し、これもまた、選択された細胞型が1つ又はそれ以上の興味のある苦味受容体を発現する限り、本発明のスクリーニング方法において使用され得る。

20

【0049】

本明細書に記載される方法において有用である別の細胞株は、不死化ヒト気管支上皮細胞株BEAS-2B(アメリカ培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)カタログ番号CRL-9609)である。H292(NCI-H292としても知られる;アメリカ培養細胞系統保存機関カタログ番号CRL-1848)は、多数の型の苦味受容体を発現するヒト肺粘液性類表皮癌由来の誘導された細胞である(例えば表1を参照のこと)。適切な場合、気道細胞はまた、本明細書に記載され、かつ当該分野で周知であるように、気管軟骨内でそれらを使用して試験され得る。

30

【0050】

【表 1】

表 1ーリアルタイムPCRによるH292細胞における苦味受容体
についてのmRNAの発現

受容体	比 <i>CHRM3</i>
<i>TAS2R14</i>	1.040 ± .289
<i>TAS2R31</i>	0.811 ± .326
<i>TAS2R10</i>	0.755 ± .294
<i>TAS2R3</i>	0.459 ± .260
<i>TAS2R38</i>	0.437 ± .192
<i>TAS2R4</i>	0.303 ± .126
<i>TAS2R5</i>	0.301 ± .042
<i>TAS2R30</i>	0.230 ± .154
<i>TAS2R46</i>	0.205 ± .083
<i>TAS2R19</i>	0.197 ± .135
<i>TAS2R1</i>	0.186 ± .176
<i>TAS2R50</i>	0.164 ± .093
<i>TAS2R8</i>	0.102 ± .102
<i>TAS2R13</i>	0.101 ± .037
<i>TAS2R40</i>	0.096 ± .076
<i>TAS2R20</i>	0.075 ± .050
<i>TAS2R43</i>	ND
<i>TAS2R9</i>	ND
<i>TAS2R39</i>	ND
<i>TAS2R45</i>	ND
<i>TAS2R7</i>	ND
<i>TAS2R16</i>	ND
<i>TAS2R42</i>	ND
<i>TAS2R60</i>	ND
<i>TAS2R41</i>	ND
<i>CHRM3</i>	1.0 (参照)

結果はM3ムスカリン受容体 (*CHRM3*) の発現に対して正規化されている。
ND, 不検出; 結果は3〜6回の実験から (f r o) のものである。

【0051】

さらに、必要に応じて、いずれかの非ヒト細胞、例えばマウス又はラット初代気道細胞が使用され得、初代細胞分離株、樹立細胞株、又は気管軟骨として使用され得る。いずれかの他の動物種も必要に応じて使用され得る（限定されないが、イヌ、ウシ、ブタ、霊長類などが挙げられる）。当業者は、本明細書に記載される方法における使用のために適切な細胞供給源を同定する方法を理解するだろう。

【実施例】

【0052】

方法

[Ca^{2+}]_i、cAMP及び膜電位の測定。初代ヒトASM細胞を商業的供給源 (Clonetics) から入手し、そして3〜8継代で細胞を使用して実験しながら記載されるように維持した³¹。これらの細胞は以前に確認されたように³¹、>95%の気道平滑筋からなるものであった。[Ca^{2+}]_iの変化を検出するために、96ウェルプレートに付着した細胞 (80,000細胞/ウェル) に、プロベネシドと共にFluo-4 AM (BD Biosciences) を1時間37℃でロードした。受容体アゴニストを示された濃度で37℃にて自動化ピペット操作システムにより三連で加え、そしてFlex Station II (Molecular Devices) を使用して485nmで

の励起により 525 nm のシグナルが生じた。データを 1.5 秒ごとに 60 秒間取得した。別の記載がなければ、研究は 1.5 mM カルシウムを含有する培地で行った。いくつかの研究において、ASM を、 4×10^6 細胞及び siRNA 4 μ g を使用してエレクトロポレーション (Nucleofector, Lonza) により、T2R10 siRNA (Invitrogen) 又はスクランブル配列 siRNA コントロールでトランスフェクトした。24 時間後に細胞を $[Ca^{2+}]_i$ アッセイのために 96 ウェルプレートに移した。cAMP 測定のために、ヒト ASM 細胞を 24 ウェルディッシュにプレーティングし、アゴニストを示された時間、37°C で三連で加え、そして溶解緩衝液を加えて急速凍結させることにより反応を停止させた。サンプルをアセチル化し、そして cAMP を、以前に記載されたように³²、高感度¹²⁵I-cAMP ベースのラジオイムノアッセイにより測定した。VASP リン酸化状態を、非リン酸化形態及びリン酸化形態に特異的な抗体 (Alexis Biochemicals) を使用して全細胞溶解物のウェスタンブロットにより確認した。ASM 細胞全体の膜電位に対する苦味物質の効果を、膜電位感受性蛍光色素 (Molecular Devices) を使用して、記載されるように¹⁹⁹ 6 ウェルプレート形式で 50,000 細胞/ウェルを用いて測定した。励起は 530 nm であり、そして発光は 565 nm で得られた。データをリアルタイムで 300 秒間集め、相対的蛍光単位として示す。

10

【0053】

エキスピボでのインタクトな気道の生理学。全てのマウス研究は動物実験委員会 (Animal Care and Use Committee) により認可されており、そしてヒト組織研究は、メリーランド大学 (Baltimore) の治験審査委員会 (Institutional Review Board) により認可された。約 60 日齢の FVB/N マウスから、気管の 5 mm 切片を切除し、そして以前に記載されたように³³、等長性 (isometric) ミオグラフィシステム (Radnoti) において調べた。手短には、固定ワイヤと変換器連結ワイヤとの間に取り付けた気管軟骨を、Krebs 緩衝液中に 37°C で 95% O_2 、5% CO_2 から通気して維持した。5 mN の静止張力を各軟骨輪について確立し、これは GPCR アゴニストからの収縮及び弛緩を調べるための長さ-張力の最適な関係をもたらすということを本発明者らは示した³⁴。示された範囲の用量又は単一濃度を使用して実験を行った。適切な場合は、Krebs 緩衝液を用いて 3 回 2.5 ml 交換することにより薬物の洗い流しを達成した。弛緩研究のために、軟骨輪を、固定濃度を使用してアセチルコリンのような薬剤を用いて収縮させ、これを複数の用量のイソプロテレノール又は苦味物質を加える間維持した。外科標本から新たに得られたヒト組織からの第四次気管支を、肉眼で病理のない領域から切開し、軟骨輪を上記の方法と類似した方法で調製し試験した。

20

30

【0054】

磁気ツイスティングサイトメトリー (Magnetic twisting cytometry)。ベースライン細胞剛性の動的変化を、以前に詳細に記載されるように¹⁵、磁気ツイスティングサイトメトリーを使用して単離されたヒト ASM 細胞の収縮及び弛緩の指標として測定した。手短には、接着性ヒト ASM 細胞に結合された Arg-Gly-Asp 被覆強磁性マイクロビーズを水平方向に磁化し、次いで時間内に正弦波的に変動している垂直方向に整列された均一な磁場で回転させる。正弦波的に回転する (twisting) 磁場は、ビーズの回転 (rotation) 及び旋回変位の両方を引き起こし：次いでこのような強制的なビーズの運動は、細胞により生じる内部応力により妨げられる。生じた振動トルクに対応したビーズの側方変位を、約 5 nm の空間分解能で検出し、そしてビーズ変位に対する固有トルクの比を計算し、そして細胞剛性としてパスカル/nm (Pa/nm) の単位で表した。それぞれ個々の ASM 細胞について、ベースライン剛性を最初の 60 秒間測定し、そして薬物添加後に、次の 540 秒間連続的に剛性を測定した。いくつかの実験において、GPCR アゴニストを加える前に、細胞をビヒクル又は阻害剤に 10 分間予め曝露した (イベリオトキシン 10 nM、カリブドトキシン 10 nM、H89 100 nM、又は U73122 1 μ M)。各細胞について、アゴニスト刺激の

40

50

前に剛性をそのベースライン剛性に対して正規化した。

【0055】

領域的かつ局所的 $[Ca^{2+}]_i$ シグナルの共焦点像。領域的かつ局所的 $[Ca^{2+}]_i$ シグナルを、膜透過性 $[Ca^{2+}]_i$ 感受性蛍光色素 Fluo-3 アセトキシメチルエステル (Fluo-3 AM) を使用して以前に記載されたように^{35,36}可視化した。培養ヒト ASM に $5\mu M$ Fluo-3 AM (20% プルロニック酸 (pluronic acid) を含む DMSO に溶解した) を 30~45 分間、室温で (約 22°C) ロードした。細胞を (mM で) 137 NaCl、5.4 KCl、2 $CaCl_2$ 、1 $MgCl_2$ 、10 HEPES、及び 10 グルコースを含有する Tyrode 液 (pH 7.4 (NaOH で調整)) で洗浄して細胞外 Fluo-3 AM を除去し、そして 15~30 分間細胞チャンパーに置いて細胞質の色素の脱エステル化を完了させた。Fluo-3 AM を 488 nm で励起し、そして蛍光を >505 nm で測定した。2次元画像を $0.22\mu m$ /ピクセル、 512 ピクセル/ライン、 256 ライン/画像で 0.5 秒ごとに 1 回スキャンした。ラインスキャン画像を $0.075\mu m$ /ピクセル、 512 ピクセル/ラインで 2 ms 間隔で 10,000 ライン/画像を収集した。画像を IDL ソフトウェアパッケージを使用したアルゴリズムで処理した。各共焦点像の蛍光シグナル (F) から最初にバックグラウンドを差し引いて、 F/F_0 に関して正規化した (ここで F_0 は薬物適用前のベースライン蛍光である)。 $[Ca^{2+}]_i$ シグナルの大きさを、擬比率 (pseudo-ratio) 法³⁷により絶対 $[Ca^{2+}]_i$ に対してさらに校正した。典型的な画像フィールドは 2~4 個の細胞を含み、そして各実験について 10 フィールドを調べた。

【0056】

T2R 発現。全 RNA をヒト ASM 細胞から抽出し、そして $2\mu g$ RNA、オリゴ dT プライマー、及びモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素を使用して逆転写を行った。リアルタイム PCR を、以前に詳細に記載された方法³⁸を使用して、25 の T2R に特異的なプライマー (Applied Biosystems)、示された他の GPCR、及び GAPDH を用いて、Applied Biosystems 7300 リアルタイム PCR システムを使用して行った。データを $\Delta\Delta C_T$ 法を使用して ADRB2 を参照として使用して解析した³⁹。T2R10、14、44、5、4 及び 48 に対するプライマーから誘導された PCR 産物を配列解析して、示されたヒト T2R であることを確認した。免疫細胞学を、記載されるように³¹固定化細胞を使用して行った。抗血清力価は：T2R (Thermo Scientific) 1:300、ガストデューシン (Santa Cruz) 1:500 及び BK_{Ca} (Sigma) 1:100 であった。

【0057】

オボアルブミン感作及び肺機能試験。6 週齢 BALB/c マウスの感作を、 $200\mu l$ ミョウバン中 $100\mu g$ オボアルブミン、又はミョウバンのみ (コントロール) の腹腔内注射により 0 日目及び 14 日目に行った。次いで 19、21 及び 24 日目に、マウスを 1.0% エアロゾル化オボアルブミンに曝露した。最後の曝露の 24 時間後にマウスを鎮静させ、挿管し、そして以前に記載されるように⁴⁰ flexiVent システム (SCIREQ) を換気及び気道抵抗の測定のために利用した。換気は、一回換気量 $240\mu l$ 及び呼気終末陽圧 $2.5\text{ cm H}_2\text{O}$ で 150 呼吸/分であった。安定化した後、持続気道抵抗がベースラインより約 5 倍高くなるまでマウスをエアロゾル化メタコリンの用量 (ネブライザで 2.0、4.0、8.0 及び 16 mg/ml) に曝露した。最後のアセチルコリン吸入の 3 分後に、苦味物質キニーネ ($150\mu g$) 若しくはデナトニウム ($200\mu g$)、又は β -アゴニストアルブテロール ($3.0\mu g$) をエアロゾルにより 10 秒間かけて投与した。抵抗測定 (R_{aw} , $\text{cm H}_2\text{O/ml/秒}$) を実験の間中、30 秒ごとに行なった。

【0058】

統計分析。 $[Ca^{2+}]_i$ 及びエクスビボ気管軟骨研究についての用量応答曲線を、反復非線形 (シグモイド) 最小二乗フィッティングにより解析した。全ての研究からの結果を、対応のある又は非対応の二元配置 t 検定 (paired or unpaired t

wo-way t-test) (試験設計に依存する) を使用して、 $P < 0.05$ を有意とみなして比較した。多重比較が求められる場合、事後 (post-hoc) t 検定を用いる ANOVA を、多重比較についての補正と共に利用した。データを平均値 ± 標準誤差として示す。

【0059】

結果

ヒト ASM は $[Ca^{2+}]_i$ と共役した苦味受容体を発現する。初期の研究は、いくつかの公知の苦味受容体アゴニスト (例えばクロロキン、サッカリン、及びデナトニウム) が培養ヒト ASM 細胞において増加した $[Ca^{2+}]_i$ を惹起することを見出した (図 1 a、b、c)。これらの苦味物質に対する ASM 細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 応答は、ヒスタミン及びブラジキニンのような公知の気管支収縮性 GPCR アゴニストと大きさが類似していることが見出された (図 1 c)。これらの結果は、全ての 25 の公知の T2R 遺伝子に対するプライマーを用いた定量的 RT-PCR 研究を促し、ここで本発明者らは、多数の苦味受容体転写物がヒト ASM において発現したことを確認した。発現を、 β_2 -アドレナリン作用性受容体 (β_2AR) (ASM 緊張の調節との認識された生理学的及び薬理的関連性を有する受容体) についての遺伝子レベルと比較した (表 2-W. Meyerhof et al., Chem Senses 35: 157-170 (2010) に記載される命名法)。ヒト気道平滑筋細胞 (ASM) 上でそれぞれ高レベル及び低レベルで発現されることが公知の 2 つの他の GPCR (ADORA1 及び LTBR) の発現も示す。表 3 は表 2 に示される mRNA 発現レベルを示すが、当該分野で周知である苦味受容体についての代替の命名法を代わりに使用する。2 つの命名法の差異は表 2 と 3 とを比較することにより理解され得る。

【0060】

10

20

【表 2】

表 2ーリアルタイムPCRによるヒトASM細胞における苦味受容体の
mRNA発現

受容体	比 <i>ADRB2</i>	
<i>T2R10</i>	3.967 ± .893	
<i>T2R14</i>	3.519 ± .397	
<i>T2R44</i>	3.415 ± .498	
<i>T2R5</i>	1.767 ± .190	
<i>T2R4</i>	1.457 ± .271	10
<i>T2R48</i>	1.372 ± .249	
<i>T2R3</i>	0.836 ± .079	
<i>T2R49</i>	0.710 ± .202	
<i>T2R45</i>	0.703 ± .118	
<i>T2R50</i>	0.482 ± .033	
<i>T2R47</i>	0.318 ± .060	
<i>T2R9</i>	0.315 ± .034	
<i>T2R13</i>	0.264 ± .037	
<i>TAS2R55</i>	0.263 ± .009	
<i>TAS2R46</i>	0.256 ± .041	
<i>TAS2R1</i>	0.179 ± .027	20
<i>TAS2R8</i>	0.158 ± .007	
<i>T2R39</i>	ND	
<i>T2R43</i>	ND	
<i>T2R7</i>	ND	
<i>T2R40</i>	ND	
<i>T2R16</i>	ND	
<i>T2R38</i>	ND	
<i>T2R41</i>	ND	
<i>T2R60</i>	ND	
<i>T1R1</i>	ND	
<i>T1R2</i>	ND	30
<i>ADRB2</i>	1.0 (参照)	
<i>ADORA1</i>	2.434 ± .446	
<i>LTB4R</i>	0.295 ± .056	

結果は*ADRB2*の発現 (expressio) に対して正規化されている。*ADORA1*及び
*LTB4R*は、ポジティブコントロールとしてGPCRのそれぞれ高レベル発現及び
低レベル発現を示す。ND, 不検出。結果は4～6回の実験からのものである。

【0061】

【表 3】

表 3－苦味受容体の代替の命名法を示す、リアルタイムPCRによる
ヒトASM細胞における苦味受容体のmRNA発現

受容体	比 ADRB2
TAS2R10	3.96 ± .893
TAS2R14	3.51 ± .397
TAS2R31	3.41 ± .498
TAS2R5	1.76 ± .190
TAS2R4	1.45 ± .271
TAS2R19	1.37 ± .249
TAS2R3	0.83 ± .079
TAS2R20	0.71 ± .202
TAS2R45	0.70 ± .118
TAS2R50	0.48 ± .033
TAS2R30	0.31 ± .060
TAS2R9	0.31 ± .034
TAS2R13	0.26 ± .037
TAS2R42	0.26 ± .009
TAS2R46	0.25 ± .041
TAS2R1	0.17 ± .027
TAS2R8	0.15 ± .007
TAS2R39	ND
TAS2R43	ND
TAS2R7	ND
TAS2R40	ND
TAS2R16	ND
TAS2R38	ND
TAS2R41	ND
TAS2R60	ND
TAS1R1	ND
TAS1R2	ND
ADRB2	1.0 (参照)
ADORA1	2.43 ± .446
LTB4R	0.29 ± .056

結果はADRB2の発現に対して正規化されている。ADORA1及びLTB4Rは、ポジティブコントロールとしてGPCRのそれぞれ高レベル発現及び低レベル発現を示す。ND、不検出。結果は4～6回の実験からのものである

【0062】

多数のTAS2R転写物がヒトASMにおいて発現されることが見出され、T2R10、T2R14及びT2R44サブタイプは最も高度に発現された。2つの甘味受容体についての転写物は、最初にアレイにより確認され⁶（T1R1及びT1R2）、RT-PCRにより確認されなかった（表2）。さらなる苦味物質のさらなる選別により、 $[Ca^{2+}]_i$ がアリストコール酸、ストリキニーネ、キニーネ、コルヒチン及びヨヒンビンに応答することが明らかになった（図1c）。重大なことには、2つの甘味受容体アゴニストのスクラロス及びSC45647に対する応答は見られなかった（図1c）。そして、本発明者らは、T2R4を活性化するコルヒチンに対するASMにおける比較的低い応答（RT-PCRにより中間レベルのASM発現剤（expressor））及び排他的にT2R16を発現する¹⁰サリシンに対して応答しないこと（これはRT-PCRによりAS

Mにおいて検出されない)に気付いた。ストリキニーネ(T2R10及び-46を活性化する)に対する強い応答はまた、ASMにおける高い発現を有するT2R10と一致していた。従って、ASMにおいて、苦味物質に対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答は、アゴニスト特異性及びこれらの細胞におけるT2Rサブタイプ発現に基づく順位と一致しており、甘味受容体アゴニストに対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答はない。2つの高度に発現する受容体(T2R10及びT2R44)及びRT-PCRにより検出されなかった受容体(T2R7)に対して特異的なポリクローナル抗血清を使用したヒトASM細胞の免疫細胞学は、前者の2つの受容体の細胞表面発現を明らかにしたが、後者については明らかにならなかった(図2)。これらの研究はまた、これらの細胞におけるガストデューシンの α サブユニットの発現を明らかにした(図2)。

10

【0063】

T2R10特異的 siRNAを用いたASM細胞のトランスフェクションは、T2R10 mRNAをスクランブル siRNAコントロールと比較して $36 \pm 1.8\%$ 減少させ、これはストリキニーネ促進 $[Ca^{2+}]_i$ の $26 \pm 2.0\%$ の減少を伴っていた(コントロールに対して $P < 0.05$)。さらなる研究において、ASM細胞を培地のみで、又はT2R10、T2R7に特異的なポリクローナル抗血清、若しくはアイソタイプ特異的 IgGと共にインキュベートし、次いでストリキニーネ促進 $[Ca^{2+}]_i$ を決定した。T2R10抗血清はストリキニーネ促進 $[Ca^{2+}]_i$ 応答を用量依存性の様式で減少させ(約77%の最大阻害、図3)、このT2Rの発現を示すRT-PCR及び免疫細胞学の結果と一致していた。非特異的効果についてのコントロールとして、T2R7(これはASMにおいて発現されない)に対する抗血清は、同じ力価で $[Ca^{2+}]_i$ 刺激に対して有意な効果を有しておらず、IgGも有意な効果を有していなかった。総合すれば、上記の研究は、ASM細胞でのT2Rの発現を裏付け、そして発現を苦味物質媒介 $[Ca^{2+}]_i$ シグナル伝達と関連付ける。サッカリンにより誘発されるヒトASM細胞における $[Ca^{2+}]_i$ の増加は、細胞外 Ca^{2+} の存在に依存せず、そして応答は $G\beta\gamma$ 阻害剤ガレイン、PLC β 阻害剤U73122により除去され、そしてイノシトール-3-リン酸(IP_3)受容体アンタゴニスト2APBにより部分的に阻害された(図1d)。ASM細胞におけるこれらの結果は舌の特殊化味覚細胞における苦味受容体についてのシグナル伝達と一致し、ここで G_{gust} -関連 $\beta\gamma$ はPLC β を活性化して IP_3 生成を生じ、これが筋小胞体(sarco(endo)plasmic reticulum)上の IP_3 受容体を活性化し、この細胞内貯蔵から Ca^{2+} が放出される⁹。

20

30

【0064】

苦味受容体は気道弛緩を惹起する。ヒトASMにおいて苦味物質のいくつかにより促進される $[Ca^{2+}]_i$ の増加が、気管支収縮性GPCRに対して作用するリガンドの大きさと類似した大きさであったことを考えると、本発明者らは、苦味受容体がASM収縮を惹起すると最初に仮定した。しかし、単離されたインタクトなマウス気道において、クロロキン、デナトニウム及びキニーネは用量依存性弛緩を生じ、最大応答はアセチルコリンにより惹起された活性収縮を $>90\%$ 減少させた(図4a)。これらの同じ実験条件下での完全 β_2AR アゴニスト イソプロテレノールに対する最大弛緩応答は、活動張力の $30 \pm 9.2\%$ の減少であった(図4a)。クロロキン及びキニーネもまた、異なる G_q -受容体アゴニスト(セロトニン、図4b)により収縮された気道を用いて調べ、そして顕著な弛緩も観察された。クロロキン弛緩についての EC_{50} ($93 \pm 4.3 \mu M$ 及び $110 \pm 32 \mu M$)は、収縮がそれぞれアセチルコリンによって刺激されたかセロトニンによって刺激されたかに関わらずほとんど同じであった。さらに、本発明者らは、苦味物質がベースライン気管軟骨張力を約30%弛緩させることを見出した(図5)。ヒト肺組織の非疾患部分から得られた第四次気管支における限られた数の研究において、本発明者らはまた、アセチルコリン収縮軟骨輪でのクロロキン又はサッカリンからの50~80%の弛緩を観察した(図6)。苦味物質媒介気道弛緩は、シクロオキシゲナーゼ阻害剤インドメタシンによっても一酸化窒素シンターゼ阻害剤L-NAMEによっても変更されず、このことは、気道上皮細胞から生じる気管支活性(bronchoactive)リガンドから生

40

50

じる二次的応答よりもむしろASM受容体の直接活性化を示唆した。 β -アゴニストを用いて観察される気道弛緩は、その後のPKA活性化を伴うcAMPの増加と共役する β_2 ARに起因する²。しかし、それぞれ高感度ラジオイムノアッセイにより又は血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質(VASP)のPKA媒介リン酸化により評価して、cAMPにおけるクロロキン促進増加についてもインタクトな培養ASM細胞におけるPKA活性化についても証拠は見出されなかった(図4c)。インタクトな気道を用いた一連の連続した投薬及び休薬の実験において、準最大用量のクロロキンはアセチルコリン媒介収縮の約67%弛緩を生じ、これは、休薬及びアセチルコリンへの再曝露により完全に逆戻りした(図4d)。次いでこれらの気道を最大濃度のイソプロテレノールに曝露して、クロロキンへの前曝露なしに得られた値と同様の値である $29 \pm 4.3\%$ 弛緩を達成した(図4a)。さらに、クロロキン及びイソプロテレノールの両方への曝露は、いずれかの化合物単独を用いて見られた弛緩よりも高い弛緩を生じた(図4d)。これらのデータは、ASM機能的収縮及び弛緩がクロロキンへの前曝露により損なわれないのでクロロキン促進は細胞傷害に起因しないということ、並びに弛緩は β -アゴニストの弛緩に対して相加的であり、弛緩の異なる機構を示唆しているということを示す。

【0065】

苦味受容体は、局在的 Ca^{2+} 放出から BK_{Ca} チャネルを開くことによりASMを弛緩する。総合すれば、これらの逆説的な結果は、苦味受容体アゴニストがASMにおける $[Ca^{2+}]_i$ の増加を惹起するにもかかわらず、それらが気管支拡張剤として作用することを示し、実際に、本発明者らがこれまでに発見した最も有効な気管支拡張剤である。本発明者らは、この細胞型におけるこれらの受容体の $[Ca^{2+}]_i$ に対するシグナル伝達の機構を特徴付けしたが、インタクトな気道における協調した気道応答は予期された気管支収縮と一致しなかった。苦味受容体がASM弛緩を惹起する機構をさらに解明するために、本発明者らは、単離されたヒトASM細胞の剛性の動的変化を測定するために磁気ツイスティングサイトメトリー¹⁵を使用し(図7)、従ってインタクトな組織に存在する未確認の機構からの潜在的な交絡因子を除去した。これらの実験において、ペプチドリinkerにより細胞に結合された磁気粒子は、それぞれベースラインからの予期される弛緩及び収縮を生じるイソプロテレノール曝露及びヒスタミン曝露を用いて、単細胞剛性の高度に定量的な測定をもたらす(図7a)。

【0066】

クロロキン及びサッカリン曝露(図7a)は、この単細胞レベルでASM弛緩を生じ、これらの苦味物質が平滑筋細胞に対して直接作用することを裏付け、そしてこのことはインタクトな気道の協調した弛緩応答における我々の知見と一致する(図4a及び図5)。サッカリンに対する弛緩応答はPKA阻害剤H89により遮断されず(図7b)、cAMP及びVASPリン酸化測定からの結果を裏付けた(図4c)。U73122によるPLCの阻害は、単離されたASMのサッカリン促進弛緩を除去した(図7b)。 $[Ca^{2+}]_i$ の苦味物質促進増加に対するPLC阻害($\beta\gamma$ 阻害剤及び IP_3 受容体アンタゴニストと同様)(図1d)に伴う本発明者らの知見を考慮すると、これらの結果は、ASMにおけるこれらの受容体の弛緩応答が細胞内 Ca^{2+} 放出により引き起こされるか又は細胞内 Ca^{2+} 放出を必要とするということを示した。この考えと一致して、培養ASM細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 放出についてのクロロキンの EC_{50} 値($70 \pm 10 \mu M$ 、図1a)、及びインタクトな気道の弛緩におけるクロロキンの EC_{50} 値($93 \pm 4.3 \mu M$ 、図4a)は事実上同じである。

【0067】

弛緩がSR Ca^{2+} 放出に依存することは、SR Ca^{2+} 再取り込み阻害剤タプシガルジン(SR $[Ca^{2+}]_i$ を枯渇させる)を用いた研究の結果によりさらに支持された。タプシガルジンプレインキュベーションはASM細胞におけるクロロキン及び他の苦味物質が媒介する $[Ca^{2+}]_i$ 刺激を遮断し(図8)、そしてまたインタクトな気道軟骨のクロロキン媒介弛緩も遮断した(図9)。ASMにおける Ca^{2+} 媒介弛緩についての可能性のある機構は、大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル(BK_{Ca})の刺激に起因する過

分極を介するものである。これらのチャネルはヒト A S M で発現されることが知られており¹⁶（本発明者らが確認した；図 2）、そして気道緊張を調節すると報告されている¹⁷。観察された弛緩が、苦味物質の引き起こした BK_{Ca} の Ca^{2+} 活性化に起因するか否かを調べるために、ヒト A S M 細胞を担体、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルアンタゴニスト カリブドトキシン、又は特異的 BK_{Ca} チャネルアンタゴニスト イベリオトキシンで前処理した。図 7 b に示されるように、単離された細胞で評価して、両方の前処理がサッカリン媒介 A S M 弛緩を除去した。同様の結果がクロロキンで見られた。そして最後に、イベリオトキシンでの前処理もまた単離されたマウス気道におけるクロロキン促進弛緩を減衰させた（図 7 c）。

【0068】

BK_{Ca} 活性化からの A S M の弛緩は、膜過分極に由来すると期待されるだろう¹⁸。A S M 細胞に膜電位感受性蛍光色素¹⁹をロードし、そして図 10 a に示されるように、K C l 及びヒスタミンへの曝露は、期待された膜脱分極を生じた。苦味物質のクロロキン及びサッカリンへの曝露で膜過分極が容易に観察された。さらに、苦味物質促進膜過分極はイベリオトキシンにより完全に阻害された（図 10 b）。従って、A S M 苦味受容体からの高度に効果的な気管支拡張応答は、 BK_{Ca} の $[Ca^{2+}]_i$ 依存性活性化に起因すると思われる、これは収縮を引き起こす $[Ca^{2+}]_i$ のヒスタミン促進増加とは異なる。このことは、ヒスタミン及び苦味物質に対する Ca^{2+} 応答の細胞内分布が異なることを示唆し、そして実際に、高濃度の局在化 $[Ca^{2+}]_i$ が BK_{Ca} 活性化と関連するということが証明されている²⁰。

【0069】

A S M 細胞におけるサッカリン促進 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の特徴を明確にするために、リアルタイム共焦点画像化を F l u o - 3 をロードした細胞で行った（図 11）。示されるように、局在化した $[Ca^{2+}]_i$ シグナルが A S M の細長い端部及び筋細胞膜領域において検出された。この応答は急速であり（例えば、断面の調査では 2.5 秒以内に観察される、図 11 a）、そして強度は筋細胞の中心領域よりも高かった（図 11 b）。A S M 細胞の細胞膜に対して $1 \mu m$ 以内の平行な領域においてラインスキャンモードを使用した場合、空間的かつ時間的に識別できる $[Ca^{2+}]_i$ 事象が、その後の $[Ca^{2+}]_i$ の持続的な局在化した上昇の前に、サッカリンの適用後のごく初期に検出された（図 11 e）。これらの結果は、サッカリンが A S M 細胞における局在化 $[Ca^{2+}]_i$ シグナルを促進するとい

【0070】

苦味物質はぜん息のマウスモデルにおいて気管支収縮に対抗する。集合的に、上記の結果は全て、ぜん息のような可逆性の閉塞性肺疾患を処置するために利用されるかもしれない新規な A S M 弛緩経路を指し示す。この可能性を評価するために、苦味物質をアレルギー性気道炎症及び気管支過敏症のマウスモデルの状況において吸入により投与した。マウスをオボアルブミンに対して感作させ、次いで吸入オボアルブミンに繰り返し曝露し、これは急性気道炎症を生じた（図 12 a、b）。気道抵抗を、これらのインタクトな鎮静して挿管したマウスにおいて、気管支収縮剤メタコリンの吸入への応答後にベースラインで測定し、次いで気管支収縮期中の苦味物質の吸入後に測定した。これらの研究のためのポジティブコントロールには、アルブテロール（ぜん息治療において最も一般的に利用される気管支拡張剤である β -アゴニスト）を吸入させた。オボアルブミン感作マウスにおいて、ベースライン気道抵抗を 5 倍増加させるために必要な吸入メタコリンの濃度は $8 mg/ml$ であり、非感作マウスについての $\geq 16 mg/ml$ と比較すると、気道過敏表現型を裏付けた。吸入されたエアロゾル化キニーネは、正常マウス及び感作マウスにおいて気道抵抗をそれぞれ $53 \pm 2.96\%$ 及び $50 \pm 8\%$ だけ減少させ、閉塞性気道疾患の病態生理学的に関連するモデルにおける有効性を示した（図 12 c、d）。気管支拡張性効果はデナトニウムでも見られ、正常マウスにおいて $44 \pm 6\%$ 、そして感作マウスにおいて

57 ± 4 %に達した。

【0071】

A S M上で発現されるG P C Rは、気道の緊張及び口径を調節するシグナル伝達受容体の主要なファミリーを代表するものである。ぜん息における気道環境内では、多数の局所的に生成されたリガンドが最終的にこれらの受容体に作用して気管支収縮をもたらす。気管支収縮促進性 (p r o - b r o n c h o c o n s t r i c t i v e) G P C RはG_(q)と共役し、[C a²⁺]_iを増加させ、そしてA S M収縮を引き起こす。対照的に、G_(s)と共役したG P C Rはc A M Pを増加させ、A S Mを弛緩させ、そして気管支を拡張し (b r o n c h o d i l a t e)、β-アゴニストの標的であるβ₂A Rは気管支痙攣に対して最も一般的に利用される治療である。気管支収縮及び拡張をもたらす新規なA S M受容体の同定は、ぜん息において効果を現す (a t p l a y) シグナル伝達ネットワークの我々の理解をさらに向上させ、そして新しい治療アプローチを可能にする。本明細書において、本発明者らはT 2 R苦味受容体ファミリーに属するいくつかのG P C RのヒトA S Mでの発現を予期せず見出した。苦味シグナル伝達が嫌悪応答の役目を果たすと考えられてきたことを考えると、本発明者らは、A S Mの苦味受容体が、筋肉を収縮させ、有害な環境から逃避するきっかけとしての息切れを伴って気管支収縮に至ると仮定した。これらの受容体は潜在的に数百の苦味リガンドに応答するので、このシナリオは、特異的リガンドの識別は必須ではなく、むしろ吸入抗原が有害である可能性があるというシグナルの生成のみが必須であるという点において妥当と思われる。これらの考察は、舌の苦味受容体が毒性の植物毒素に起因してどのように発展したかということと一致する^{9, 13}。最近の報告²¹はまた、脈拍頻度 (b e a t f r e q u e n c y) を増加させる気道上皮細胞の運動毛上の苦味受容体を同定し、これは有害吸入剤に対する機械的防御と考えられる。これらの受容体はまた前鼻腔 (a n t e r i o r n a s a l c a v i t y) において見出され、ここでそれらはくしゃみを促進し、そして呼吸数を調節し²²、この場合もやはり有害刺激に対する嫌悪様応答である。他方では、胃腸管の腸内分泌細胞で発現される苦味受容体は、グルコースレベルの恒常性制御を促進するように思われる²³。気管支拡張により、A S M上の苦味受容体は、これらの受容体においてアゴニストであり得²⁴かつ気管支炎又は肺炎の間にグラム陰性菌により分泌される²⁵アシル-ホモセリンラクトンに対して代償的様式で作用し得、それにより気管支痙攣からの保護をもたらす。しかし、本発明者らは、それらのアゴニストの多様な性質、及び[C a²⁺]_i刺激とのそれらの共役に基づいて、A S M上の苦味受容体が職業上のぜん息で見られるような未解明の気管支痙攣の基礎であるかもしれないと最初に考えた。

【0072】

培養A S M細胞の研究において、[C a²⁺]_iの増加は例えばヒスタミンのような古典的な気管支収縮性G P C R活性化からの増加と類似しているので、苦味受容体リガンドに対する収縮性応答のこの予測は当然と思われた。しかし、インタクトな気道において、これらの薬剤は実質的な弛緩を誘発し、それはこれまで臨床上利用されてきた最も有効な気管支拡張剤 (β-アゴニスト イソプロテレノール) よりも高いものであった。弛緩は洗い流しにより容易に可逆性であり、そして気道はメタコリン及びイソプロテレノールへの曝露後にそれぞれ正常に収縮及び拡張されるので、この効果は能動的収縮の喪失をもたらす細胞傷害に起因するものではなかった。苦味物質は、増加した[C a²⁺]_iに対してP L C β及びI P₃受容体依存性の様式を介してシグナル伝達した。さらに、[C a²⁺]_iの苦味物質活性化はG β γ阻害剤により遮断され、これはガストデューシン関連β γサブユニットを介する典型的な苦味受容体のシグナル伝達と一致した。この経路の活性化からの増加した[C a²⁺]_iは、P L C βのG_(q)-共役受容体刺激で観察されたように、A S M収縮を引き起こすと期待されるだろう。

【0073】

本発明者らは、A S M苦味受容体のC a²⁺及びc A M Pに対する二重共役についての可能性を探索し、これは増加した[C a²⁺]_iに直面した際の正味の弛緩を説明するかもしれない。このような二重共役は、膵臓β細胞における甘味受容体について記載されており

²⁶、そして β_2 AR は平滑筋において $[Ca^{2+}]_i$ の増加及び減少を引き起こすることが報告されている^{27,28}。しかし、ASM 細胞において、本発明者らは苦味物質曝露から cAMP 増加も PKA 活性化も検出することができず、そしてこれらの味覚物質からの ASM 弛緩は PKA 阻害剤 H89 により影響を受けなかった。さらに、何かが cAMP レベルを減少させたかもしれない場合にガストデューシン α サブユニットはホスホジエステラーゼ活性を増強すると考えられている²⁹。インタクトな気道におけるさらなる研究は、気道上皮細胞から惹起される 2 つの周知の気管支拡張剤経路 ($PG E_2$ のようなシクロオキシゲナーゼ産物及び一酸化窒素) を排除し、そして単離された ASM の単細胞力学は、苦味物質の効果が ASM に対する直接的な作用によるものであることを示した。興味深いことに、 $[Ca^{2+}]_i$ 刺激及び ASM 弛緩についての用量-応答曲線は同等の EC_{50} 値を示し、この細胞内応答と生理応答との間の関連性を示唆した。そして実際に、SR Ca^{2+} の枯渇は、ASM 細胞 $[Ca^{2+}]_i$ における苦味物質媒介増加の喪失、さらにはインタクトな気道軟骨において観察される弛緩効果を生じた。 $[Ca^{2+}]_i$ の共焦点蛍光画像化は、苦味物質に起因する局在化した増加を示し、これは細胞表面に対して $1\mu m$ 以内の距離で起こる初期カルシウム事象を含んでいた。本発明者らは、 $[Ca^{2+}]_i$ と弛緩との間の密接な関係、ASM 上での BK_{Ca} の公知の発現、及び活性のための膜結合 $[Ca^{2+}]_i$ の必要性により、苦味受容体媒介性で $[Ca^{2+}]_i$ 依存性の BK_{Ca} の開口を考えた。そして実際に、 BK_{Ca} の遮断は、単細胞弛緩、インタクトな気道の弛緩、及び苦味物質に由来する膜過分極を除去した。苦味物質からの制限的な $[Ca^{2+}]_i$ 応答の理由は明確にされないままである。興味深いことに、わずかな脱分極が BK_{Ca} 遮断の状況において苦味物質から観察され、2 つのカルシウムプール (ヒスタミン受容体促進対 $T2R$ 促進) がいくらかの重複を有するかもしれないということを示唆した。それにもかかわらず、ヒスタミン媒介 $[Ca^{2+}]_i$ 増加の正味の効果は脱分極及び収縮であるが、苦味物質については、過分極及び弛緩である。最終的に、いくつかの苦味物質のエアロゾル化投与はアレルギー性炎症のマウスモデルにおいて気道を弛緩させ、この経路が疾患状態において治療的関連性を有することを示した。

【0074】

ぜん息のような閉塞性気道疾患の処置において、さらなる治療選択肢の満たされていない必要性がある。特定の G_q 共役経路を拮抗し、それにより気管支痙攣を減少させる可能性のある薬物の改良においていくらかの進展があったが、 β -アゴニストが依然として唯一の実用的な直接気管支拡張剤である。本明細書において、本発明者らは、苦味受容体に結合する薬剤がインタクトな気道において顕著な気管支拡張を引き起こすことを示し、これはインビトロで β -アゴニストにより促進されるものより約 3 倍高かった。さらに、苦味受容体の効果は β -アゴニストの効果に対して相加的であると思われ、異なる作用機構と一致し、従って組み合わせ治療が使用され得る。苦味受容体は、PKA 媒介受容体脱感作のための部位を欠いており、かつ G-タンパク質共役受容体キナーゼ媒介脱感作の可能性のある少数の部位を有するので、この新しいクラスの気管支拡張剤は、 β -アゴニストを超えるさらなる利益を有し得る。従って、 β -アゴニストで観察された³⁰ものと比較して、苦味受容体アゴニストではタキフィラキシーがより少なく、又は気管支保護が無いかもしれない。

【0075】

本明細書において引用される全ての書類、書籍、取り扱い説明書、論文、特許、公開された特許出願、案内書、要約及び他の参考資料は、それぞれの独立した刊行物又は特許出願が参照により加入されると具体的かつ個々に示されている場合と同じ程度まで、それら全体が参照により加入される。

【0076】

本発明はその具体的な実施例及び実施態様に関連して記載されてきたが、当然のことながら、さらなる改変が可能であり、そして本出願は、概して本発明の原理に従い、かつ本発明が関連する分野内の公知又は慣例の実施内にあり、そして本明細書において上で記述された本質的な特徴に適用され得、かつ添付の特許請求の範囲に従う、本発明からの逸脱

を含む、本発明のいずれの変形、使用又は改変も包含することを意図される。

【0077】

引用文献

1. Vignola, A.M., Bonsignore, G., Chanez, P. & Bousquet, J. Fatal Asthma 139-155 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998).
2. Billington, C.K. & Penn, R.B. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respir. Res.* 4, 2-24 (2003).
3. Green, S.A. & Liggett, S.B. The Genetics of Asthma 67-90 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1996).
4. Drazen, J.M., Silverman, E.K. & Lee, T.H. Heterogeneity of therapeutic responses in asthma. *Br. Med. Bull.* 56, 1054-1070 (2000). 10
5. Malmstrom, K. et al. Oral montelukast, inhaled beclomethasone, and placebo for chronic asthma. A randomized, controlled trial. Montelukast/Beclomethasone Study Group. *Ann. Intern. Med.* 130, 487-495 (1999).
6. Einstein, R. et al. Alternative splicing of the G protein-coupled receptor superfamily in human airway smooth muscle diversifies the complement of receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 5230-5235 (2008).
7. Misior, A.M. et al. Glucocorticoid- and protein kinase A-dependent transcriptome regulation in airway smooth muscle. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 41, 24-39 (2009). 20
8. Bosse, Y., Maghni, K. & Hudson, T.J. 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D3 stimulation of bronchial smooth muscle cells induces autocrine, contractility, and remodeling processes. *Physiol. Genomics* 29, 161-168 (2007).
9. Meyerhof, W. Elucidation of mammalian bitter taste. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 154, 37-72 (2005).
10. Meyerhof, W. et al. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem. Senses* 35, 157-170 (2010).
11. Chandrashekar, J. et al. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell* 100, 703-711 (2000).
12. Adler, E. et al. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100, 693-702 (2000). 30
13. Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Ryba, N.J. & Zuker, C.S. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444, 288-294 (2006).
14. Lombardo, L.J. & Balmes, J.R. Occupational asthma: a review. *Environ. Health Perspect.* 108 Suppl 4, 697-704 (2000).
15. An, S.S., Fabry, B., Trepatt, X., Wang, N. & Fredberg, J.J. Do biophysical properties of the airway smooth muscle in culture predict airway hyperresponsiveness? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35, 55-64 (2006).
16. Martin, G. et al. Interleukin-4 activates large-conductance, calcium-activated potassium (BKCa) channels in human airway smooth muscle cells. *Exp. Physiol.* 93, 908-918 (2008). 40
17. Morin, C., Sirois, M., Echave, V., Gomes, M.M. & Rousseau, E. Functional effects of 20-HETE on human bronchi: hyperpolarization and relaxation due to BKCa channel activation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L1037-L1044 (2007).
18. Kotlikoff, M.I. & Kamm, K.E. Molecular mechanisms of β -adrenergic relaxation of airway smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 115-141 (1996).
19. Baxter, D.F. et al. A novel membrane potential-sensitive fluorescent dye improves cell-based assays for ion channels. *J. Biomol. Screen.* 7, 79-85 (2002).
20. Fakler, B. & Adelman, J.P. Control of K(Ca) channels by calcium nano/micr 50

odomains. *Neuron* 59, 873-881 (2008).

21. Shah, A.S., Ben Shahr, Y., Moninger, T.O., Kline, J.N. & Welsh, M.J. Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science* 325, 1131-1134 (2009).

22. Finger, T.E. et al. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8981-8986 (2003).

23. Wu, S.V. et al. Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2392-2397 (2002).

24. Brockhoff, A., Behrens, M., Massarotti, A., Appendino, G. & Meyerhof, W. Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6236-6243 (2007).

25. Sbarbati, A. et al. Acyl homoserine lactones induce early response in the airway. *Anat. Rec.* 292, 439-448 (2009).

26. Nakagawa, Y. et al. Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS ONE* 4, e5106 (2009).

27. Felbel, J., Trockur, B., Ecker, T., Landgraf, W. & Hofmann, F. Regulation of cytosolic calcium by cAMP and cGMP in freshly isolated smooth muscle cells from bovine trachea. *J. Biol. Chem.* 263, 16764-16771 (1988).

28. Yamaguchi, H., Kajita, J. & Madison, J.M. Isoproterenol increases peripheral $[Ca^{2+}]_i$ and decreases inner $[Ca^{2+}]_i$ in single airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 268, C771-C779 (1995).

29. Yan, W. et al. Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in $IP(3)$ and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C742-C751 (2001). 30. Liggett, S.B. & Green, S.A. Beta₂-Agonists in Asthma Treatment 19-34 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1996).

31. Panebra, A., Schwarb, M.R., Glinka, C.B. & Liggett, S.B. Heterogeneity of transcription factor expression and regulation in human airway epithelial and smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung* 293, L453-L462 (2007).

32. Liggett, S.B. et al. Altered patterns of agonist-stimulated cAMP accumulation in cells expressing mutant β_2 -adrenergic receptors lacking phosphorylation sites. *Mol. Pharmacol.* 36, 641-646 (1989).

33. McGraw, D.W. et al. airway smooth muscle prostaglandin-EP1 receptors directly modulate beta2-adrenergic receptors within a unique heterodimeric complex. *J. Clin. Invest.* 116, 1400-1409 (2006).

34. McGraw, D.W., Almoosa, K.F., Paul, R.J., Kobilka, B.K. & Liggett, S.B. Antithetic regulation by β -adrenergic receptors of Gq-receptor signaling via phospholipase-C underlies the airway β -agonist paradox. *J. Clin. Invest.* 112, 619-626 (2003).

35. Yang, X.R. et al. Multiple ryanodine receptor subtypes and heterogeneous ryanodine receptor-gated Ca^{2+} stores in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 289, L338-L348 (2005).

36. Zhang, W.M. et al. ET-1 activates Ca^{2+} sparks in PASMC: local Ca^{2+} signaling between inositol trisphosphate and ryanodine receptors. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 285, L680-L690 (2003).

37. Cheng, H., Lederer, W.J. & Cannell, M.B. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 262, 740-744 (1993).

44 (1993).

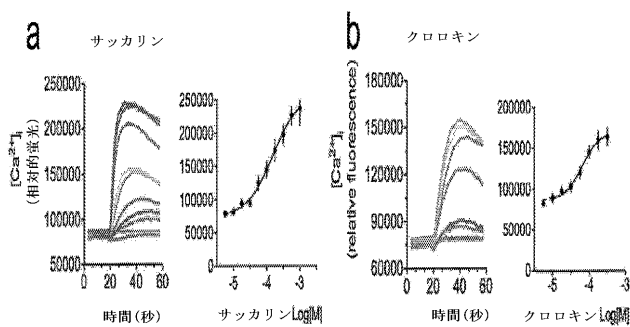
38. Small, K.M. et al. Polymorphisms of the cardiac presynaptic $\alpha 2$ adrenergic receptors: diverse intragenic variability with haplotype-specific functional effects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 13020-13025 (2004).

39. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method. *Methods* 25, 402-408 (2001).

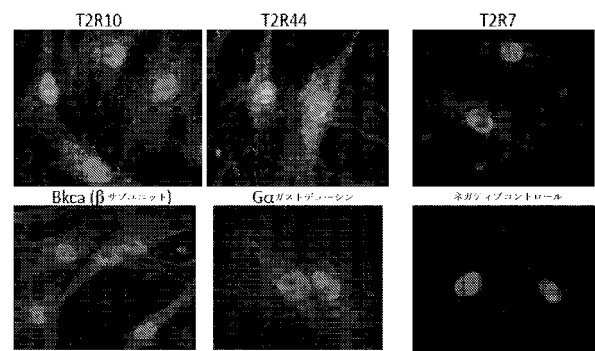
40. McGraw, D.W. et al. Crosstalk between Gi and Gq/Gs pathways in airway smooth muscle regulates bronchial contractility and relaxation. *J. Clin. Invest.* 117, 1391-1398 (2007).

10

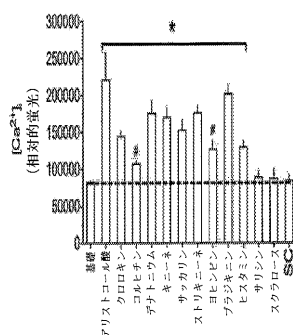
【図 1】



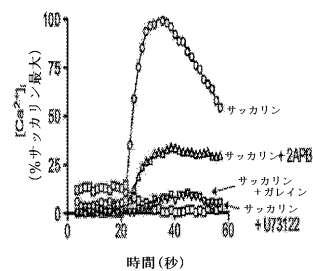
【図 2】



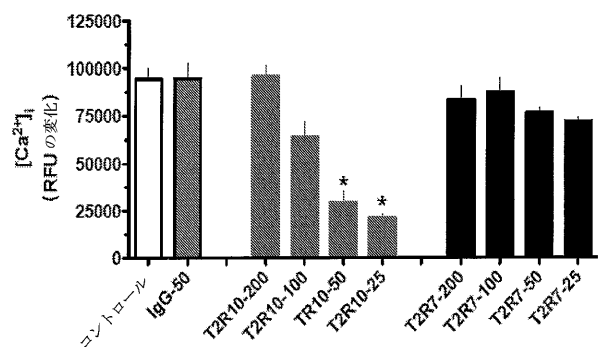
c



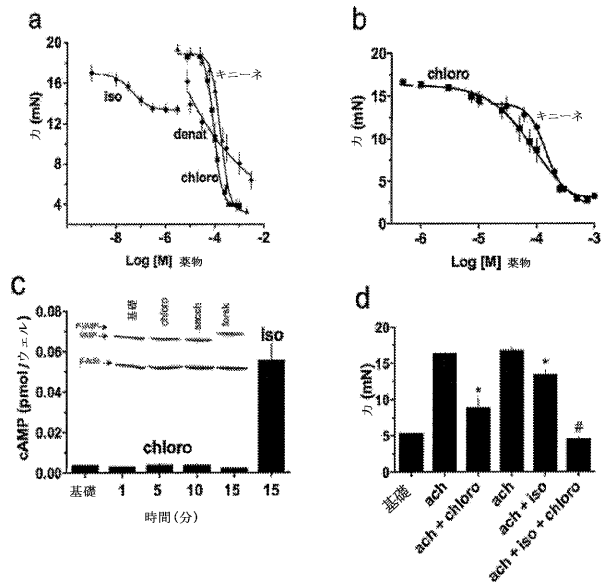
d



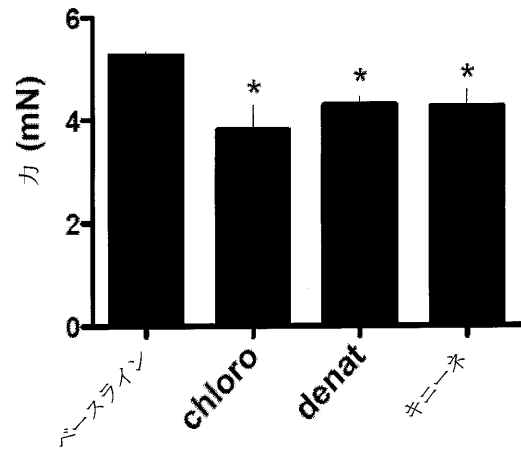
【図 3】



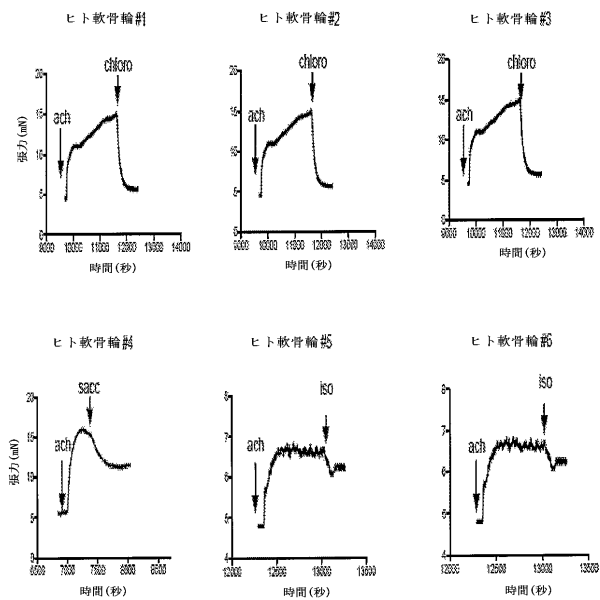
【図 4】



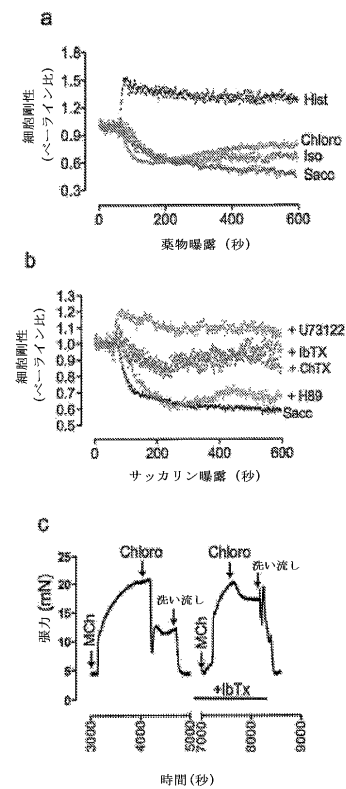
【図 5】



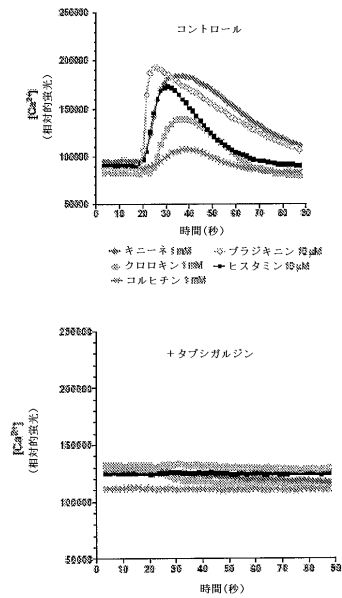
【図 6】



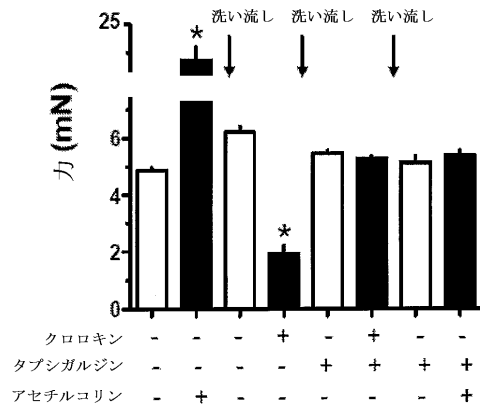
【図 7】



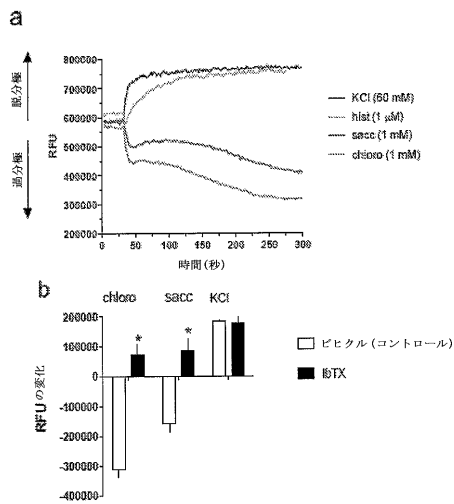
【図 8】



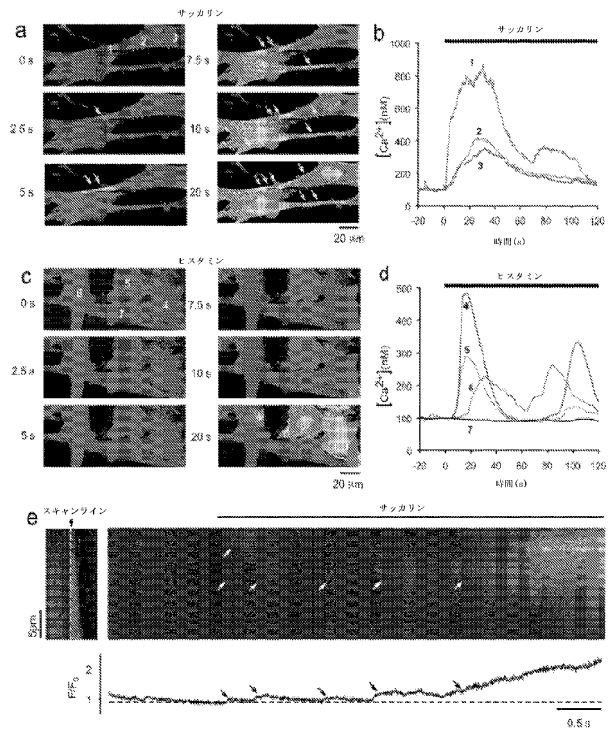
【図 9】



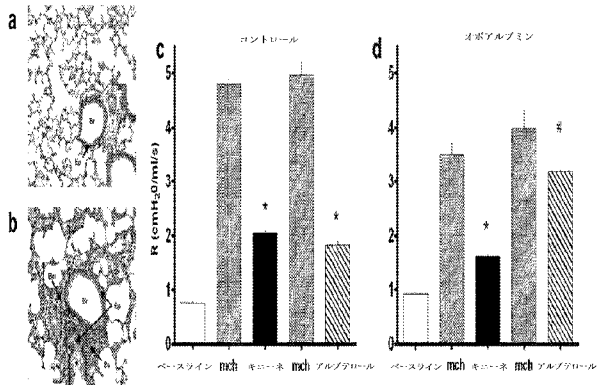
【図 10】



【図 11】

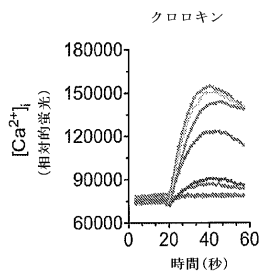


【図 1 2】



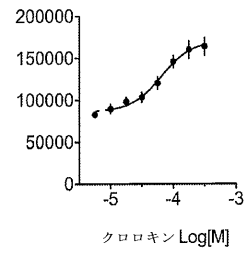
【図 1 3】

ヒト気道平滑筋細胞における苦味物質クロロキンに対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答



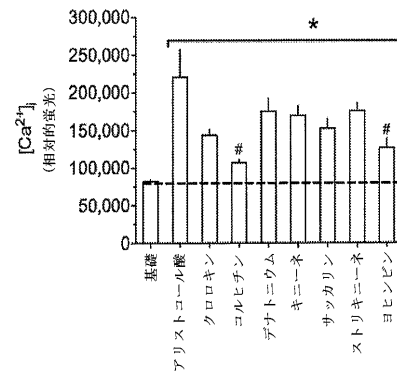
【図 1 4】

ヒト気道平滑筋細胞における苦味物質クロロキンに対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答



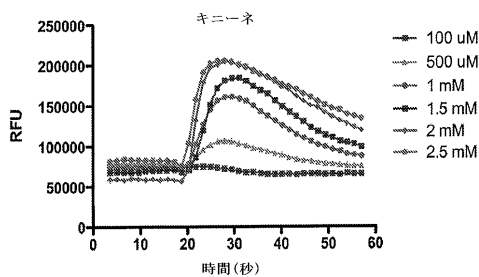
【図 1 5】

読み出しとして細胞内カルシウムの放出を用いたヒト気道平滑筋細胞を使用した苦味物質のスクリーニング



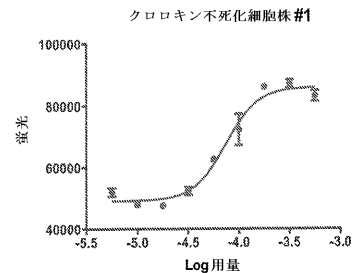
【図 1 6】

H292細胞における苦味物質に対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答



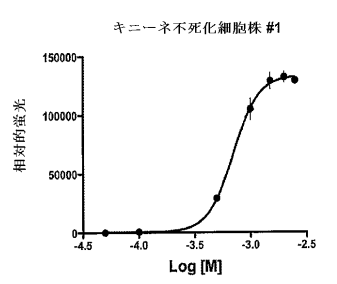
【図 1 8】

H292細胞における苦味物質に対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答



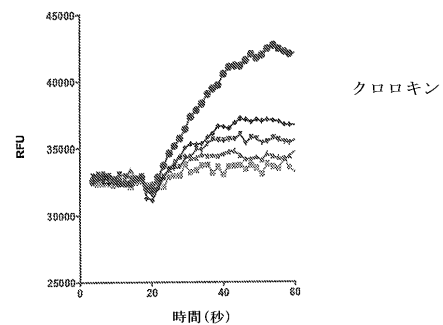
【図 1 7】

H292細胞における苦味物質に対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答



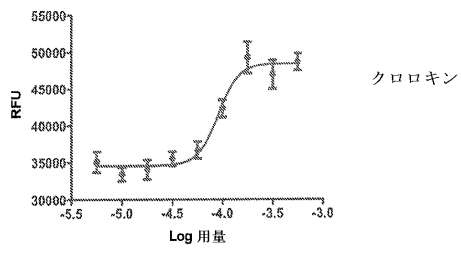
【図 1 9】

ヒト肺気道非線毛上皮細胞株BEAS-2Bにおけるクロロキンに対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答



【図 20】

ヒト肺気道非線毛上皮細胞株 BEAS-2B における
クロロキンに対する $[Ca^{2+}]_i$ 応答



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2011/045537
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 31/33(2006.01)i, A61K 31/47(2006.01)i, A61K 31/16(2006.01)i, A61K 31/165(2006.01)i, A61K 31/4745(2006.01)i, A61P 11/06(2006.01)i, A61P 11/00(2006.01)i</i>		
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) A61K 31/33; G01N 33/566; C07K 1/00; C07K 14/705; G01N 33/567; A61K 31/49; G01N 33/53; A61K 36/48; C07D 453/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal), PubMed, Google Scholar & Keywords: obstructive lung disease, asthma, COPD, chronic obstructive pulmonary disease, bronchitis, bitter tastant		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009-0074894 A1 (LI XIAODONG et al.) 19 March 2009 See abstract, paragraph [0024], and paragraph [0024]	30-38
A	US 2009-0087866 A1 (LI XIAODONG et al.) 02 April 2009 See abstract and paragraph [0193]	30-38
A	US 7364867 B2 (MARGOLSKEE ROBERT F. et al.) 29 April 2008 See claim 1, column 1 lines 24-26, and column 1 lines 12-14	30-38
A	WO 97-09046 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION) 13 March 1997 See page 1 line 5-6 and page 2 lines 15-20	30-38
A	US 7294474 B2 (ZOLLER M. et al.) 13 November 2007 See claim 36 and claim 45	30-38
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 application or patent 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 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 MARCH 2012 (27.03.2012)		Date of mailing of the international search report 27 MARCH 2012 (27.03.2012)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongss-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, EUN HEE Telephone No. 82-42-481-5590 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2011/045537

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1-29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-29 pertain to a method of treating an obstructive lung disease, asthma, COPD, bronchitis, etc. in a subject and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/045537

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009-0074894 A1	19.03.2009	AU 2001-251258 B2	05.06.2008
		AU 2001-51258 A1	23.10.2001
		AU 2002-318229 B2	13.03.2008
		CA 2403003 A1	18.10.2001
		CA 2452337 A1	23.01.2003
		CN 101397563 A	01.04.2009
		CN 101583717 A	18.11.2009
		CN 1434921 A	06.08.2003
		CN 1434921 C0	31.12.2008
		CN 1610830 A	27.04.2005
		CN 1610830 C0	27.04.2005
		EP 1292827 A1	19.03.2003
		EP 1502112 A2	02.02.2005
		EP 1502112 A4	23.07.2008
		EP 2078081 A2	15.07.2009
		JP 04-551656 B2	16.07.2010
		JP 04-551950 B2	16.07.2010
		JP 2003-530098 A	14.10.2003
		JP 2005-508149 A	31.03.2005
		JP 2009-000109 A	08.01.2009
		JP 2010-042013 A	25.02.2010
		JP 2010-508041 A	18.03.2010
		JP 4551950 B2	29.09.2010
		US 2002-0094551 A1	18.07.2002
		US 2003-0170608 A1	11.09.2003
		US 2004-0163604 A1	26.08.2004
		US 2004-0209313 A1	21.10.2004
		US 2004-0248149 A1	09.12.2004
		US 2005-0069944 A1	31.03.2005
		US 2007-0059759 A1	15.03.2007
		US 2007-0061902 A1	15.03.2007
		US 2007-0061903 A1	15.03.2007
		US 2007-0061904 A1	15.03.2007
		US 2007-0061905 A1	15.03.2007
		US 2007-0061906 A1	15.03.2007
		US 2007-0065870 A1	22.03.2007
		US 2007-0065871 A1	22.03.2007
		US 2007-0065873 A1	22.03.2007
		US 2008-0187936 A1	07.08.2008
		US 2008-0268471 A1	30.10.2008
		US 2008-0305542 A1	11.12.2008
		US 2008-038739 A1	14.02.2008
		US 2009-0093619 A1	09.04.2009
		US 2010-0248360 A1	30.09.2010
		US 2010-0317035 A1	16.12.2010
		US 2011-0136112 A1	09.06.2011
		US 7105650 B2	12.09.2006
		US 7338771 B2	04.03.2008
		US 7393654 B2	01.07.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/045537

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 7396651 B2	08.07.2008
		US 7399601 B2	15.07.2008
		US 7638289 B2	29.12.2009
		US 7704698 B2	27.04.2010
		US 7718363 B2	18.05.2010
		US 7723051 B2	25.05.2010
		US 7723481 B2	25.05.2010
		US 7736862 B2	15.06.2010
		US 7776561 B2	17.08.2010
		US 7785802 B2	31.08.2010
		US 7794859 B2	14.09.2010
		US 7816093 B2	19.10.2010
		US 7893856 B2	08.02.2011
		US 7968693 B2	28.06.2011
		US 8030008 B2	04.10.2011
		US 8030009 B2	04.10.2011
		US 8030468 B2	04.10.2011
		US 8071320 B2	06.12.2011
		WO 01-77676 A1	18.10.2001
		WO 03-006482 A2	23.01.2003
		WO 03-006482 A3	23.01.2003
		WO 2008-057470 A2	15.05.2008
		WO 2008-057470 A3	15.05.2008
		WO 2009-120313 A2	01.10.2009
		WO 2009-120313 A3	30.12.2009
US 2009-0087866 A1	02.04.2009	AU 2006-213039 A1	17.08.2006
		CA 2597085 A1	17.08.2006
		CN 101467040 A	24.06.2009
		EP 1851548 A2	07.11.2007
		JP 2008-537473 A	18.09.2008
		US 2006-0199227 A1	07.09.2006
		US 7407765 B2	05.08.2008
		US 7915003 B2	29.03.2011
		WO 2006-086150 A2	17.08.2006
		WO 2006-086150 A3	17.08.2006
US 7364867 B2	29.04.2008	AU 2001-255455 A8	30.10.2001
		AU 2001-55455 A1	30.10.2001
		CA 2406481 A1	25.10.2001
		EP 1282636 A2	12.02.2003
		EP 1282636 A4	16.06.2004
		EP 1282636 B1	26.08.2009
		JP 2004-507220 A	11.03.2004
		US 2002-0037515 A1	28.03.2002
		US 2006-0292548 A1	28.12.2006
		US 2008-0166743 A1	10.07.2008
		US 2008-0182266 A1	31.07.2008
		US 7341842 B2	11.03.2008
		US 7960127 B2	14.06.2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/045537

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 97-09046 A1	13.03.1997	US 7960128 B2	14.06.2011
		WO 01-79448 A2	25.10.2001
		WO 01-79448 A3	25.10.2001
WO 97-09046 A1	13.03.1997	EP 0851759 A1	08.07.1998
		EP 0851759 A4	06.12.2000
		JP 11-512396 A	26.10.1999
		JP 11-512396 T	26.10.1999
US 7294474 B2	13.11.2007	AU 2001-240086 B2	03.01.2008
		AU 2001-240086 B9	17.09.2001
		AU 2001-240086 B9	03.01.2008
		AU 2001-40086 A1	17.09.2001
		AU 2002-251734 B2	16.08.2007
		AU 2002-326315 B2	05.07.2007
		CA 2402214 A1	13.09.2001
		CA 2433514 A1	22.08.2002
		CA 2451317 A1	09.01.2003
		CN 100489102 C	20.05.2009
		CN 101445800 A	03.06.2009
		CN 101891821 A	24.11.2010
		CN 102242126 A	16.11.2011
		CN 1520516 A	11.08.2004
		CN 1520516 C0	11.08.2004
		CN 1525981 A	01.09.2004
		CN 1525981 C0	01.09.2004
		CN 1543474 A	03.11.2004
		CN 1543474 C0	03.11.2004
		CN 1766108 A	03.05.2006
		CN 1766108 C0	03.05.2006
		EP 1309606 A1	14.05.2003
		EP 1309606 B1	06.08.2008
		EP 1412750 A2	28.04.2004
		EP 1430083 A2	23.06.2004
		EP 1430083 B1	03.09.2008
		EP 1944319 A1	16.07.2008
		EP 1944319 B1	27.01.2010
		EP 1985630 A2	29.10.2008
		EP 1985630 A3	18.02.2009
		EP 2003451 A2	17.12.2008
		EP 2003451 A3	24.12.2008
		EP 2143732 A1	13.01.2010
		EP 2293067 A2	09.03.2011
		EP 2298802 A1	23.03.2011
		EP 2327985 A2	01.06.2011
		JP 2004-513608 A	13.05.2004
		JP 2005-500318 A	06.01.2005
		JP 2005-500817 A	13.01.2005
		JP 2009-225805 A	08.10.2009
		JP 2010-189391 A	02.09.2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2011/045537

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		TW 201006846 A	16.02.2010
		US 2002-0160424 A1	31.10.2002
		US 2003-0008344 A1	09.01.2003
		US 2003-0054448 A1	20.03.2003
		US 2003-0232407 A1	18.12.2003
		US 2004-0132075 A1	08.07.2004
		US 2004-0171042 A1	02.09.2004
		US 2004-0175792 A1	09.09.2004
		US 2004-0175793 A1	09.09.2004
		US 2004-0185469 A1	23.09.2004
		US 2004-0191805 A1	30.09.2004
		US 2004-0191862 A1	30.09.2004
		US 2004-0209286 A1	21.10.2004
		US 2004-0229239 A1	18.11.2004
		US 2005-0032158 A1	10.02.2005
		US 2005-0084932 A1	21.04.2005
		US 2005-0287517 A1	29.12.2005
		US 2006-0014208 A1	19.01.2006
		US 2006-0127977 A1	15.06.2006
		US 2006-0160176 A1	20.07.2006
		US 2007-0292944 A1	20.12.2007
		US 2008-0020424 A9	24.01.2008
		US 2008-0050778 A1	28.02.2008
		US 2008-0213880 A1	04.09.2008
		US 2008-0214784 A1	04.09.2008
		US 2008-0220451 A1	11.09.2008
		US 2008-0233596 A1	25.09.2008
		US 2008-0244761 A1	02.10.2008
		US 2008-0244762 A1	02.10.2008
		US 2008-0248996 A1	09.10.2008
		US 2008-0248997 A1	09.10.2008
		US 2008-0262087 A1	23.10.2008
		US 2008-026404 A1	31.01.2008
		US 2008-038741 A1	14.02.2008
		US 2009-0004676 A1	01.01.2009
		US 2009-0029455 A1	29.01.2009
		US 2009-0053730 A1	26.02.2009
		US 2009-0061458 A1	05.03.2009
		US 2009-0093051 A1	09.04.2009
		US 2009-0098579 A1	16.04.2009
		US 2009-0176657 A1	09.07.2009
		US 2009-0209731 A1	20.08.2009
		US 2009-0215174 A1	27.08.2009
		US 2009-0221000 A1	03.09.2009
		US 2009-0221001 A1	03.09.2009
		US 2009-0221002 A1	03.09.2009
		US 2009-0221067 A1	03.09.2009
		US 2009-0221709 A1	03.09.2009
		US 2009-0221796 A1	03.09.2009
		US 2009-0221797 A1	03.09.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US2011/045537

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2009-0221798 A1	03.09.2009
		US 2009-0233807 A1	17.09.2009
		US 2009-0275125 A1	05.11.2009
		US 2010-0075412 A1	25.03.2010
		US 2010-0330590 A1	30.12.2010
		US 2011-0081658 A1	07.04.2011
		US 2011-201020 A1	18.08.2011
		US 2011-207148 A1	25.08.2011
		US 6955887 B2	18.10.2005
		US 7223551 B2	29.05.2007
		US 7241880 B2	10.07.2007
		US 7244835 B2	17.07.2007
		US 7297543 B2	20.11.2007
		US 7297772 B2	20.11.2007
		US 7301009 B2	27.11.2007
		US 7303886 B2	04.12.2007
		US 7309577 B2	18.12.2007
		US 7344859 B2	18.03.2008
		US 7364903 B2	29.04.2008
		US 7368285 B2	06.05.2008
		US 7419791 B2	02.09.2008
		US 7435552 B2	14.10.2008
		US 7452685 B2	18.11.2008
		US 7507544 B2	24.03.2009
		US 7524637 B2	28.04.2009
		US 7534577 B2	19.05.2009
		US 7588916 B2	15.09.2009
		US 7601513 B2	13.10.2009
		US 7655422 B2	02.02.2010
		US 7705121 B2	27.04.2010
		US 7737254 B2	15.06.2010
		US 7763431 B1	27.07.2010
		US 7772385 B2	10.08.2010
		US 7781181 B2	24.08.2010
		US 7786263 B2	31.08.2010
		US 7790848 B2	07.09.2010
		US 7799905 B2	21.09.2010
		US 7834165 B2	16.11.2010
		US 7842785 B2	30.11.2010
		US 7847080 B2	07.12.2010
		US 7892765 B2	22.02.2011
		US 7906328 B2	15.03.2011
		US 7910322 B2	22.03.2011
		US 7927823 B2	19.04.2011
		US 7927825 B2	19.04.2011
		US 8039590 B2	18.10.2011
		US 8067185 B2	29.11.2011
		US 8067539 B2	29.11.2011
		US 8071719 B2	06.12.2011
		US 8097426 B2	17.01.2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/US2011/045537

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 8119402 B2	21.02.2012
		WO 01-66563 A2	13.09.2001
		WO 01-66563 A3	13.09.2001
		WO 02-064631 A2	22.08.2002
		WO 02-064631 A3	22.08.2002
		WO 03-001876 A2	09.01.2003
		WO 03-001876 A3	09.01.2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/165 (2006.01)	A 6 1 K 31/165	
A 6 1 K 31/425 (2006.01)	A 6 1 K 31/425	
A 6 1 K 31/7004 (2006.01)	A 6 1 K 31/7004	
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 31/4745	
A 6 1 K 31/475 (2006.01)	A 6 1 K 31/475	
A 6 1 K 31/49 (2006.01)	A 6 1 K 31/49	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, 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, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ウェイン シー・エイチ・ワン
アメリカ合衆国メリーランド州 2 1 0 4 3. エリコットシティ. ストックブリッジオーバールック
コート 6 2 1 0

(72)発明者 ディーパック エー・デシュバンド
アメリカ合衆国メリーランド州 2 1 0 4 3. エリコットシティ. ストーンハウスドライブ 8 7 7 1

Fターム(参考) 4C076 AA24 AA93 BB21 CC15 FF68
4C084 AA17 MA13 MA56 NA14 ZA591
4C086 AA01 AA02 BC28 BC81 CB05 CB17 CB24 DA08 EA04 MA01
MA04 MA13 MA56 NA14 ZA59
4C206 AA01 AA02 GA02 GA30 MA01 MA04 MA33 MA76 NA14 ZA59