

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年11月12日(12.11.2020)



(10) 国際公開番号

WO 2020/226151 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61P 11/14 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 31/357* (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01) *A61K 31/496* (2006.01)
C12Q 1/06 (2006.01) *A61K 31/55* (2006.01)
A61K 33/24 (2019.01) *A61K 31/575* (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01)

(72) 発明者: 堀口 安彦 (**HORIGUCHI Yasuhiko**);
〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号
国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 平
松 征洋 (**HIRAMATSU Yukihiro**); 〒5650871 大
阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法
人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 岩谷 龍 (**IWATANI Ryo**); 〒5300003 大
阪府大阪市北区堂島2丁目1番31号 京
阪堂島ビル6階 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2020/018500

(22) 国際出願日: 2020年5月7日(07.05.2020)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

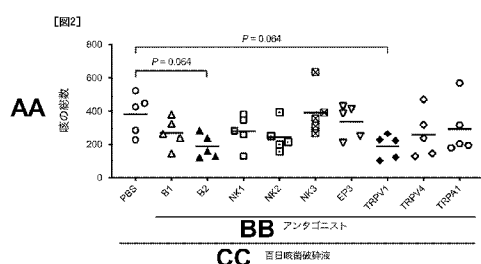
(30) 優先権データ:
特願 2019-087332 2019年5月7日(07.05.2019) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (**OSAKA UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田
市山田丘1番1号 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) **Title:** ANTITUSSIVE FOR PERTUSSIS AND METHOD FOR SCREENING ANTITUSSIVE FOR PERTUSSIS

(54) 発明の名称: 百日咳に対する鎮咳薬および百日咳に対する鎮咳薬のスクリーニング方法



AA Total cough count
BB Antagonist
CC Disrupted *Bordetella pertussis* liquid

(57) **Abstract:** Provided are: an antitussive for pertussis that comprises a bradykinin B2 receptor antagonist or a transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) antagonist as an active ingredient; and a method for screening an antitussive for pertussis, said method comprising a step for selecting a substance that inhibits the activity of a bradykinin B2 receptor or TRPV1.

(57) 要約: ブラジキニンB2受容体アンタゴニストまたはTRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) アンタゴニストを有効成分とする百日咳に対する鎮咳薬、および、ブラジキニンB2受容体またはTRPV1の活性を阻害する物質を選択する工程を含む、百日咳に対する鎮咳薬のスクリーニング方法を提供する。

[続葉有]

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

百日咳に対する鎮咳薬および百日咳に対する鎮咳薬のスクリーニング方法 技術分野

[0001] 本発明は、百日咳に対する鎮咳薬および百日咳に対する鎮咳薬のスクリーニング方法に関するものである。

背景技術

[0002] 百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の気道感染によって起こる呼吸器感染症であり、連続性の咳嗽発作や咳嗽後の嘔吐、吸気性の笛声 (whoop) などの特徴的な症状を呈する。百日咳は、主に発展途上国での乳幼児感染が最も問題視されているが、先進国においても乳幼児期に接種したワクチン効果の減弱した青年・成人層の感染やワクチン成分と抗原性の異なる抗原変異株の出現で患者数が増加しており、いわゆる再興感染症の一つに挙げられている。日本国内では、百日咳は2017年まで小児科定点把握疾患（全国約3,000ヶ所の小児科定点医療機関で集計）に分類され、年間1,500～6,500人が報告されていた。2018年からは、青年、成人層の患者数の増加などの影響を考慮し、全数把握疾患に指定されている。

[0003] 百日咳菌の潜伏期間は7～10日であり、発症から回復までに数週間を必要とする。百日咳の症状は病期により、カタル期（感冒症状、1～2週間）、痙咳期（発作性の咳、3～6週間）、回復期（6週間以降）に分けられる。特に、痙咳期に見られる百日咳特有の咳発作は、患者に多大な負荷を強い、ときに死因に直結する。しかし、その発症機構が現在まで不明であるために、臨床現場では対症療法を持って処置せざるを得ないのが現状である。通常、百日咳の治療には、感染菌の排除のためにエリスロマイシン、クラリスロマイシンなどのマクロライド系抗生物質が用いられるが、典型的な咳発作が認められる痙咳期以降では咳に対する改善効果は期待できない。一般的な去痰薬、鎮咳薬、鎮静薬なども百日咳には有効でないケースが多い。また、咳発作が重

篤化した場合は、人工呼吸管理が必要となるため、入院加療が必要となる。

[0004] これらの背景から、百日咳発症後の咳発作に有効な治療薬が望まれているが、最も効果の期待できる根治治療に繋がる研究は全く進んでいない。この原因として、百日咳菌がヒトのみを宿主とするために、百日咳の咳発作を再現する汎用性の高い動物モデルが確立できていない点が挙げられる。本課題を解決すべく、発明者らは、百日咳菌および菌体破砕液をマウスに経鼻投与し、百日咳の咳発作を再現するマウス百日咳モデルを作製した（特許文献1）。この動物モデルを用いることで、百日咳の治療法を探索するためのスクリーニングが可能となった。

[0005] 一般的な咳発作は、様々な環境要因や内在性化合物によって気道の求心性感覚神経が刺激されることで誘発される神経反射応答である。この咳反射は、神経繊維に分布する多種多様な刺激受容体およびメディエーターが複雑に関連しあって形成されている。例えば、炎症メディエーターの一種であるブラジキニン、恒常発現型であるB2受容体を介して咳発作を誘発する（非特許文献1）。ブラジキニンによる咳発作に関しては、炎症誘導型のB1受容体が関与するとの報告もある（非特許文献2）。これらの受容体を介したブラジキニンによる咳発作は、イオンチャネルであるtransient receptor potential (TRP) V1の活性化により引き起こされることが報告されているが（非特許文献3）、近年の研究により、ブラジキニンにより活性化される他のTRPチャネル（TRPV4、TRPA1など）も咳発作に関与する可能性が指摘されている（非特許文献4）。

[0006] また、プロスタグランジン（PG）類、特にPGE2は、EP受容体（EP1～4）を介してブラジキニンによるTRPの活性化を増強することで咳発作に関与していることが報告されている（非特許文献5）。この他の例として、一酸化窒素やアナンダミドがTRPチャネルの活性化を介して咳発作を引き起こすこと（非特許文献6、7）、サブスタンスPやニューロキニン（NK）A、Bに代表されるペプチド性神経伝達物質タキキニン類がNK受容体（NK1、NK2、NK3など）を介して咳発作を誘発することなどが報告されている（非特許文献8）。

[0007] このように、一般的な咳発作についても、そのメカニズムの全容はいまだ明らかとなっておらず、百日咳における咳発作が、上記の一般的な咳発作に関与する受容体やメディエーターを介して誘発されていることは報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：特開2018-573221

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Fox et al, Nat Med, 1996

非特許文献2：Hirata et al, Eur J Pharmacol, 2003

非特許文献3：Undem et al, Pulm Pharmacol Ther, 2002

非特許文献4：Choi et al, Biomol Ther, 2018

非特許文献5：Mizumura et al, Exp Brain Res, 2009

非特許文献6：De Petrocellis et al, J Biol Chem, 2001

非特許文献7：Jia et al, Br J Pharmacol, 2002

非特許文献8：Widdicombe, Eur Respir J, 1995

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、百日咳における咳発作が関与する受容体を見出し、百日咳に対する鎮咳薬および百日咳に対する鎮咳薬のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明は、上記の課題を解決するために、以下の各発明を包含する。

[1] ブラジキニンB2受容体アンタゴニストまたはTRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) アンタゴニストを有効成分とする百日咳に対する鎮咳薬。

[2] ブラジキニンB2受容体アンタゴニストがイカチバント、デルチバン

トまたはファシチバントである前記〔１〕に記載の鎮咳薬。

〔３〕ブラジキニンＢ２受容体アンタゴニストがイカチバントである前記〔２〕に記載の鎮咳薬。

〔４〕ブラジキニンＢ２受容体アンタゴニストがブラジキニンＢ２受容体と特異的に結合する抗体またはペプチドである前記〔１〕に記載の鎮咳薬。

〔５〕ＴＲＰＶ１アンタゴニストがカプサゼピン、ヨードレシニフェラトキシシン、ルテニウムレッドまたは α -スピナステロールである前記〔１〕に記載の鎮咳薬。

〔６〕ＴＲＰＶ１アンタゴニストがＴＲＰＶ１と特異的に結合する抗体またはペプチドである前記〔１〕に記載の鎮咳薬。

〔７〕ブラジキニンＢ２受容体またはＴＲＰＶ１の活性化を阻害する物質を選択する工程を含む、百日咳に対する鎮咳薬のスクリーニング方法。

〔８〕ブラジキニンＢ２受容体またはＴＲＰＶ１を発現する細胞と被験物質とを接触させる工程と、ブラジキニンＢ２受容体またはＴＲＰＶ１の下流シグナルを測定する工程と、被験物質と接触していない前記細胞において測定した下流シグナルと比較して下流シグナルを低下させる被験物質を選択する工程とを含む、前記〔７〕に記載のスクリーニング方法。

〔９〕ブラジキニンＢ２受容体を発現する細胞と被験物質とブラジキニンを接触させる工程と、ブラジキニンＢ２受容体とブラジキニンとの結合を確認する工程と、被験物質と接触していない前記細胞において測定したブラジキニンＢ２受容体とブラジキニンとの結合と比較して、ブラジキニンＢ２受容体とブラジキニンとの結合を阻害する被験物質を選択する工程とを含む、前記〔７〕に記載のスクリーニング方法。

発明の効果

[0012] 本発明により百日咳に対する鎮咳薬を提供することができる。有効成分として既に臨床使用されているブラジキニンＢ２受容体アンタゴニストを用いることができるので、安全性の高い医薬を提供することができる。また、本発明のスクリーニング方法により、百日咳の鎮咳に有用な物質を取得するこ

とができ、新規な百日咳に対する鎮咳薬を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]マウス（5匹/群）に各種受容体アンタゴニストの腹腔内投与と百日咳菌の菌体破砕液の鼻腔内投与を連続5日間行い（Day0～Day4）、Day4～Day14の毎日、1日1匹当たり5分間の咳発作の回数を計測した結果を示す図である。

[図2]マウス（5匹/群）に各種受容体アンタゴニストの腹腔内投与と百日咳菌の菌体破砕液の鼻腔内投与を連続5日間行い（Day0～Day4）、Day6からDay14における45分間（5分×9日間）の咳発作の総数を示す図である。

[図3A]マウス（5匹/群）に各種受容体アンタゴニストの腹腔内投与と百日咳菌咳誘発因子の鼻腔内投与を連続5日間行い（Day0～Day4）、Day6からDay14における45分間（5分×9日間）の咳発作の総数を示す図である。

[図3B]マウス（5匹/群）に各種受容体アンタゴニストの腹腔内投与と百日咳菌咳誘発因子の鼻腔内投与を連続5日間行い（Day0～Day4）、Day6からDay14における45分間（5分×9日間）の咳発作の総数を示す図である。

[図4]マウスに百日咳菌咳誘発因子の鼻腔内投与を行い、1回目の投与日を0日目（Day0）とし、1回投与群はDay1に、4日間連続投与群はDay4に、5日間連続投与群はDay10に、各マウスの気管支肺胞洗浄液を回収してブラジキニン濃度を測定した結果を示す図である。

[図5A]野生型マウス（n=5）およびKng1遺伝子欠損マウス（n=5）に百日咳菌の鼻腔内投与を連続5日間行い（Day0～Day4）、Day6からDay14における45分間（5分×9日間）の咳発作の総数を示す図である。

[図5B]野生型マウス（n=5）およびKng1遺伝子欠損マウス（n=5）に百日咳菌の菌体破砕液の鼻腔内投与を連続5日間行い（Day0～Day4）、Day6からDay14における45分間（5分×9日間）の咳発作の総数を示す図である。

[図6]野生型マウス（n=5）およびKng1遺伝子欠損マウス（n=5）に百日咳菌の鼻腔内投与を連続5日間行い（Day0～Day4）、Day14に気管および肺を摘出し、各臓器における生菌数を測定した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 〔百日咳に対する鎮咳薬〕

本発明は、ブラジキニンB2受容体アンタゴニストまたはTRPV1 (transient receptor potential vanilloid 1) アンタゴニストを有効成分とする百日咳に対する鎮咳薬を提供する。本発明の鎮咳薬の有効成分は、ブラジキニンB2受容体アンタゴニストまたはTRPV1アンタゴニストであれば特に限定されず、公知のブラジキニンB2受容体アンタゴニストまたはTRPV1アンタゴニストから適宜選択することができる。ブラジキニンB2受容体アンタゴニストとしては、例えば、イカチバント (Icatibant)、デルチバント (Deltibant)、ファシチバント (Fasitibant) などが挙げられる。TRPV1アンタゴニストとしては、例えば、カプサゼピン (Capsazepine)、ヨードレシニフェラトキシシン (Iodoresiniferatoxin)、ルテニウムレッド (Ruthenium red)、 α -スピナステロール (α -Spinasterol) などが挙げられる。

[0015] イカチバントは、遺伝性血管性浮腫治療薬の有効成分として臨床使用されている。イカチバント酢酸塩を含む注射剤が日本において医療用医薬品として承認され、薬価収載されている。本発明に使用するイカチバントはイカチバント酢酸塩であってもよい。イカチバント酢酸塩に関する情報は以下のとおりである。

一般名：イカチバント酢酸塩

化学名：D-Arginyl-L-arginyl-L-prolyl-(R)-4-hydroxy-L-prolylglycyl-3-(thiophen-2-yl)-L-alanyl-L-seryl-(R)-[(1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-yl)carbonyl]-(2S,3aS,7aS)-[(hexahydroindolin-2-yl)carbonyl]-L-arginine triacetate

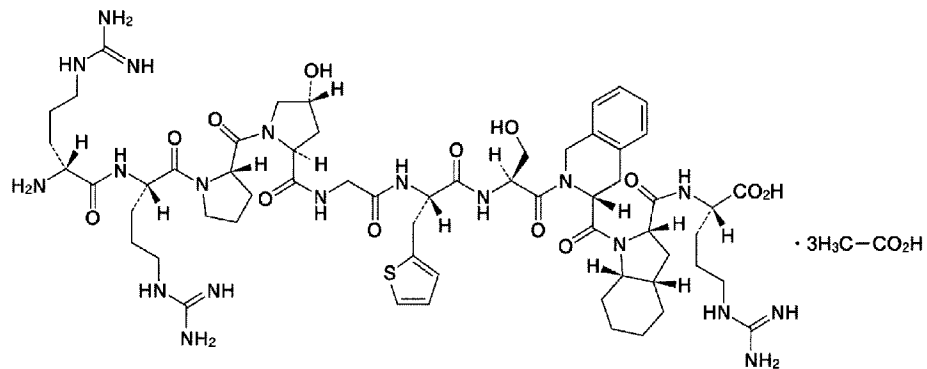
分子式： $C_{59}H_{89}N_{19}O_{13}S \cdot 3C_2H_4O_2$

分子量：1,484.68

構造式：

[0016]

[化1]



[0017] デルチバント（KEGG DRUG エントリ：D03677、CAS登録番号：140661-97-8）は、組成式： $C_{128}H_{194}N_{40}O_{28}S_2$ 、分子量：2805.2912である。

[0018] ファシチバント（CAS登録番号：869939-83-3）は、分子式： $C_{36}H_{49}Cl_2N_6O_6S^+$ 、分子量：764.784、IUPAC Name：[(4S)-4-amino-5-[4-[4-[[2,4-dichloro-3-[(2,4-dimethylquinolin-8-yl)oxymethyl]phenyl]sulfonylamino]oxane-4-carbonyl]piperazin-1-yl]-5-oxopentyl]-trimethylazaniumである。

[0019] カプサゼピンは、カプサイシンのアナログでありTRPV1アンタゴニストとして知られている。カプサゼピンに関する情報は以下のとおりである。

一般名：カプサゼピン

CAS登録番号：138977-28-3

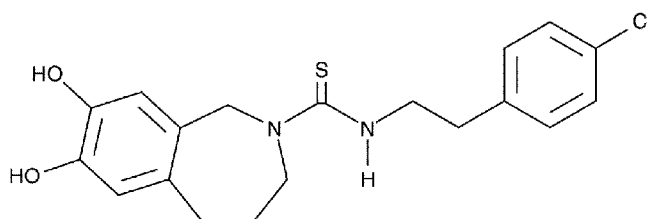
化学名：N-[2-(4-Chlorophenyl)ethyl]-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-2H-2-benzazepine-2-carbothioamide

分子式： $C_{19}H_{21}ClN_2O_2S$

分子量：376.9

構造式：

[0020] [化2]



- [0021] ヨードレシニフェラトキシンは、CAS登録番号：535974-91-5、分子式： $C_{37}H_{39}IO_9$ 、分子量：754.614、IUPAC Name：[(1R, 2R, 6R, 10S, 11R, 13S, 15R, 17R)-13-benzyl-6-hydroxy-4, 17-dimethyl-5-oxo-15-prop-1-en-2-yl-12, 14, 18-trioxapentacyclo[11.4.1.01, 10.02, 6.011, 15]octadeca-3, 8-dien-8-yl]methyl 2-(4-hydroxy-3-iodo-5-methoxyphenyl)acetateである。
- [0022] ルテニウムレッドは、CAS登録番号：11103-72-3、分子式： $Cl_6H_{46}N_{14}O_2Ru_3$ 、分子量：790.374である。
- [0023] α -スピナステロールは、CAS登録番号：481-18-5、分子式： $C_{29}H_{48}O$ 、分子量：412.702、IUPAC Name：(3S, 5S, 9R, 10S, 13R, 14R, 17R)-17-[(E, 2R, 5S)-5-ethyl-6-methylhept-3-en-2-yl]-10, 13-dimethyl-2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-olである。
- [0024] ブラジキニンB 2受容体アンタゴニストは、ブラジキニンB 2受容体と特異的に結合する抗体またはペプチドであってもよい。抗体またはペプチドがブラジキニンB 2受容体と結合することにより、本来のリガンドの結合を阻害することができる。同様に、TRPV1アンタゴニストは、TRPV1と特異的に結合する抗体またはペプチドであってもよい。抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよい。また、完全な抗体分子でもよく、抗原に特異的に結合し得る抗体フラグメント（例えば、Fab、Fab'）₂、Fab'、Fv、scFv等）でもよい。抗体はヒト型キメラ抗体またはヒト化抗体であってもよい。抗体およびペプチドは、いずれも公知の方法により製造することができる。
- [0025] 本発明の鎮咳薬は、ブラジキニンB 2受容体アンタゴニストまたはTRPV1アンタゴニストを有効成分とし、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、経口投与のための製剤としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などが挙げられる。これらの製剤は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。

。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。非経口投与のための製剤としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。このような注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記有効成分を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製される。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノール等）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン界面活性剤（例えば、ポリソルベート80、HCO-50等）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。直腸投与に用いられる坐剤は、上記有効成分を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

[0026] このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。有効成分がペプチドまたは抗体である場合、薬学的に許容される担体とともに製剤化された注射剤または輸液として、非経口投与経路、例えば、静脈内、筋肉内、皮膚内、腹腔内、皮下または局所に投与することが好ましい。

[0027] 本発明の鎮咳薬には、有効成分を0.001～50質量%、好ましくは0.01～10質量%、更に好ましくは0.1～1質量%含有することができる。本発明の鎮咳薬の投与量は、疾患の重篤度、患者の年齢、体重、性別、既往歴、有効成分の種類などを考慮して、適宜設定される。約65～70kgの体重を有する平均的なヒトを対象とした場合、1日当たり0.02mg～4000mg程度が好ましく、0.1mg～200mg程度がより好ましい。1日当たりの総投与量は、単一投与量であっても分割投与量であっても

よい。

[0028] [スクリーニング方法]

本発明は、百日咳に対する鎮咳薬またはその候補物質のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法は、ブラジキニン B 2 受容体または T R P V 1 の活性化を阻害する物質を選択する工程を含むものであればよい。

[0029] ブラジキニン B 2 受容体は G タンパク質共役型受容体であり、三量体 G タンパク質の $G_{i/o}$ 、 $G_{q/11}$ および G_s が共役している。そのためブラジキニン B 2 受容体へのブラジキニンの結合により、 $G_{i/o}$ の下流ではホスホリパーゼ A 2 の活性化を通じてプロスタグランジン (PGI_2 や PGE_2 など) が生成される。 $G_{q/11}$ を通じてはホスホリパーゼ C β ($PLC\beta$) が活性化され、ホスファチジルイノシトール 2 リン酸の分解によるジアシルグリセロールとイノシトール 3 リン酸の生成、それに続いて細胞内カルシウム濃度の上昇とプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化が起こる (Choi and Hwang, Biomol. Ther. 26:255-267, 2018)。 G_s の下流ではアデニル酸サイクラーゼの活性化により cAMP が生成される (Liebmann et al, Biochem. J. 313:109-118, 1996)。

[0030] T R P V 1 は陽イオンチャネルであり、カプサイシンなどのリガンドの結合、熱刺激、酸などの複数の痛み刺激により開口し、陽イオン (Na^+ 、 Ca^{2+} など) が細胞外から細胞内に流入することで脱分極が引き起こされる。その結果として生じた活動電位が信号として中枢へと伝えられ、咳嗽反射や疼痛などを惹起する。

[0031] 本発明のスクリーニング方法に供される被験物質は特に限定されず、核酸、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、細胞培養上清、植物抽出液、哺乳動物の組織抽出液、血漿等であってもよい。被験物質は、新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。これらの被験物質は塩を形成していてもよい。被験物質の塩としては、生理学的に許容される酸や塩基との塩が好ましい。

[0032] 本発明のスクリーニング方法は、例えば以下の工程（１）～（３）を含むものであってもよい。

（１）ブラジキニンＢ２受容体またはＴＲＰＶ１を発現する細胞と被験物質とを接触させる工程、

（２）ブラジキニンＢ２受容体またはＴＲＰＶ１の下流シグナルを測定する工程、および

（３）被験物質と接触していない前記細胞において測定した下流シグナルと比較して下流シグナルを低下させる被験物質を選択する工程。

[0033] 工程（１）において、ブラジキニンＢ２受容体を発現する細胞としては、脊髄後根神経節（ＤＲＧ：dorsal root ganglion）ニューロン、線維芽細胞、レチノイン酸により神経細胞に分化させたＰ１９細胞、神経芽細胞腫とグリオーマのハイブリッド細胞株ＮＧ１０８－１５、ブラジキニンＢ２受容体を強制発現させた株化細胞（例えば、HEK293、CHO等）などを使用することができる。ＴＲＰＶ１を発現する細胞としては、脊髄後根神経節（ＤＲＧ）ニューロン、線維芽細胞、神経芽細胞腫とグリオーマのハイブリッド細胞株ＮＧ１０８－１５、ＴＲＰＶ１を強制発現させた株化細胞（例えば、HEK293、CHO等）などを使用することができる。

[0034] 工程（１）において、細胞と被験物質を接触させる方法は、例えば、細胞を培養するための培養液に被験物質を添加する方法などが挙げられる。なお、被験物質を接触させない対照群を設けることが好ましい。

[0035] 工程（２）において、ブラジキニンＢ２受容体の下流シグナルとしては、アラキドン酸、プロスタグランジン、イノシトールリン酸、ジアシルグリセロール、ｃＡＭＰなどが挙げられ、これらを測定することにより、ブラジキニンＢ２受容体の活性化を評価することができる。ＴＲＰＶ１の下流シグナルとしては、活動電位の発生、細胞内Ｃａ²⁺濃度の上昇、神経ペプチド（例えば、ニューロキニンＡ、サブスタンスＰ、カルシトニン遺伝子関連ペプチド等）の遊離抑制などが挙げられる。それゆえ、活動電位、細胞内Ｃａ²⁺濃度、神経ペプチド濃度を測定することにより、ＴＲＰＶ１の活性化を評価す

ることができる。上記評価項目の測定方法は、公知の測定方法から適宜選択することができる。

[0036] 工程（３）では、被験物質と接触していない前記細胞において測定した下流シグナルと比較して下流シグナルを低下させる被験物質を選択する。被験物質が下流シグナルを低下させる程度は特に限定されないが、例えば、被験物質を接触させていない細胞における下流シグナルと比較して９０％以下、８０％以下、７０％以下、６０％以下、５０％以下、４０％以下、３０％以下に減少させる被験物質を選択してもよい。

[0037] 本発明のスクリーニング方法は、例えば以下の工程（ａ）～（ｃ）を含むものであってもよい。

（ａ）ブラジキニンＢ２受容体を発現する細胞と被験物質とブラジキニンを接触させる工程、

（ｂ）ブラジキニンＢ２受容体とブラジキニンとの結合を確認する工程、および

（ｃ）被験物質と接触していない前記細胞において測定したブラジキニンＢ２受容体とブラジキニンとの結合と比較して、ブラジキニンＢ２受容体とブラジキニンとの結合を阻害する被験物質を選択する工程。

[0038] 工程（ａ）のブラジキニンＢ２受容体を発現する細胞には、上記工程（１）のブラジキニンＢ２受容体を発現する細胞と同じ細胞を使用することができる。ブラジキニンＢ２受容体を発現する細胞と被験物質を接触させる方法も、上記工程（１）と同じように行うことができる。

[0039] 工程（ｂ）において、ブラジキニンＢ２受容体とブラジキニンとの結合を確認する方法は特に限定されず、ブラジキニンＢ２受容体とブラジキニンとの結合レベルを確認できる公知の方法を適宜選択して使用することができる。例えば、ＥＬＩＳＡ法、蛍光偏光法などを好適に用いることができる。

[0040] 工程（ｃ）では、被験物質と接触していない前記細胞において測定したブラジキニンＢ２受容体とブラジキニンとの結合と比較して、ブラジキニンＢ２受容体とブラジキニンとの結合を阻害する被験物質を選択する。被験物質

がブラジキニン B 2 受容体とブラジキニンとの結合レベルを低下させる程度は特に限定されないが、例えば、被験物質を接触させていない場合の両者の結合レベルと比較して、90%以下、80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下に減少させる被験物質を選択してもよい。

[0041] 本発明のスクリーニング方法により選択された被験物質は、百日咳に対する鎮咳薬の有効成分として有用である。また、本発明のスクリーニング方法により選択された被験物質は、百日咳に対する鎮咳薬の有効成分の候補物質として有用であり、更なるスクリーニングを経て、百日咳に対する鎮咳薬の有効成分となる可能性を有する。

実施例

[0042] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0043] [実施例 1：咳発作に関与する受容体のアンタゴニストによる百日咳発作抑制の検討]

1-1 実験材料および方法

(1) 百日咳菌の菌体破砕液の調製

百日咳菌18323株を0.8%ハイポリペプトン、1%グリセロール、15%馬脱繊維血液を含むBorder-Gengou寒天培地 (Becton Dickinson) に播種し、37℃で3日間培養した。複数のコロニーをStainer-Scholte液体培地 (Stainer, J Gen Microbiol, 1970) に懸濁し、OD₆₅₀=0.2となるように調整した後、37℃で12～14時間振とう培養した。菌液をBioruptor (Cosmo Bio) を用いて超音波破砕した後、遠心し (12,000×g、5分、4℃)、上清を0.22μmフィルター (Millex-GV; Merck Millipore) でろ過することにより菌体を完全に除去した。この溶液を百日咳菌の菌体破砕液とし、Micro BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質濃度を決定した後、マウスへの投与に使用するまで-80℃で保存した。

[0044] (2) アンタゴニスト

咳発作に関与する受容体のアンタゴニストとして、以下の9種類を使用した。

- ・ブラジキニンB1受容体アンタゴニスト：Des-Arg9-[Leu8]-Bradykinin（ペプチド研究所）
- ・ブラジキニンB2受容体アンタゴニスト：イカチバント（ペプチド研究所）
- ・TRPV1アンタゴニスト：カプサゼピン（富士フィルム和光純薬工業）
- ・TRPV4アンタゴニスト：HC-067047（シグマアルドリッチ）
- ・TRPA1アンタゴニスト：HC-030031（富士フィルム和光純薬工業）
- ・EP3アンタゴニスト：L-798106（シグマアルドリッチ）
- ・NK1受容体アンタゴニスト：スパンチド（ペプチド研究所）
- ・NK2受容体アンタゴニスト：GR159897（R&D Systems）
- ・NK3受容体アンタゴニスト：SB222200（シグマアルドリッチ）

各アンタゴニストは、濃度が200 nmol/mlとなるようにPBSを用いて用時調製した。

[0045] （3）実験スケジュール

7週齢のC57BL/6J雄マウス（日本クレア）をイソフルランで麻酔し、アンタゴニスト溶液300 μ lを腹腔内投与した（5匹/群）。対照群（5匹/群）として、PBS 300 μ lを同様に投与した。アンタゴニストの投与直後に、PBSで1mg/ml（タンパク質濃度）に希釈した百日咳菌の菌体破砕液50 μ lをマウスの鼻腔内に投与した。アンタゴニストおよび百日咳菌の菌体破砕液の投与は、5日間連続して行った。1回目の投与日を0日目（Day0）とし、Day4からDay14までのマウスの咳発作を以下の要領で測定した。すなわち、マウスを個別の観察用ケージに入れ、マイクロホン接続ビデオカメラを用いて、ケージ内のマウスの様子を1日1匹当たり5分間撮影した。撮影した動画をAdobe Premiere Pro Cs5.5（Adobe Systems）で再生し、咳音とマウスの動作、および表示される音声波形を併せて発咳を確認し、その回数を計測した。統計学的解析はPrism8（GraphPad Software）を使用し、One-way ANOVAおよびTukey法により有意差検定を実施した。

[0046] 1-2 結果

結果を図1および図2に示した。図1は、Day4からDay14までの毎日の各群のマウスの咳発作回数の平均値を示した図である。図1から、Day7にはすべての群のマウスに咳発作が誘発され、Day10までにピークに達した後、Day14にかけて徐々に減少する傾向が見られた。アンタゴニスト投与群のうち、B2受容体アンタゴニスト（イカチバント）およびTRPV1アンタゴニスト（カプサゼピン）を投与した群では、他の群と比較し、ピーク時の咳発作回数が少ない傾向を示した。

[0047] 図2は、Day6からDay14における45分間（5分×9日間）の咳発作の総数を示した図である。図1の結果と同様に、B2受容体アンタゴニスト（イカチバント）およびTRPV1アンタゴニスト（カプサゼピン）を投与したマウスでは、対照群であるPBS投与マウス群より咳発作の総数が少ない傾向を示した（ $P=0.064$ ）。一方、他の7種類のアンタゴニストではこの傾向は見られなかった（ $P>0.3$ ）。以上の結果から、B2受容体アンタゴニストおよびTRPV1アンタゴニストは百日咳菌による咳発作を抑制できると考えられた。

[0048] [実施例2：咳発作に関与する受容体のアンタゴニストによる百日咳発作抑制の検討]

2-1 実験材料および方法

(1) 百日咳菌咳誘発因子の調製

百日咳菌の咳誘発因子である百日咳毒素（Pertussis toxin; PT）、Virulence-associated gene 8 (Vag8)、Lipooligosaccharide (LOS) は以下のように調製した。

PTは、Stainer-Scholte液体培地で培養した百日咳菌18323株の培養上清より精製した（Skelton et al, J Clin Microbiol, 1990）。

[0049] Vag8は、大腸菌に産生させ、精製したりコンビナントタンパク質を用いた。Vag8発現ベクターを作製するために、百日咳菌18323株のゲノムDNAを鋳型として、プライマーセット（CACAAACAGCTCGAGTTTCTGGGCGATGTC（配列番号1）およびAAGCTTGAATTCCTACCCGATCGAATGCAG（配列番号2））を用いたPCRによりV

ag8のパッセンジャー領域を増幅した。このPCR産物をpCold II-HAT (Suzuki et al, Microbiol Immunol, 2017) のXhoIおよびEcoRIサイトに挿入し、大腸菌BL21 (DE3) 株へ導入した。1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside を添加し、15℃、24時間培養することでVag8の発現を誘導した後、菌を10 mM イミダゾール含有Buffer A (50 mM sodium phosphate、300 mM NaCl、pH8.0) 中で超音波処理により溶菌した。遠心後の上清をニッケル樹脂 (His-Select Nickel Affinity Gel; シグマアルドリッチ) に吸着させた後、300 mM イミダゾール含有Buffer Aを用いて、Vag8を抽出した。Vag8画分に含まれるイミダゾールは、PBSを用いた透析により除去した。PTおよびVag8のタンパク質濃度は、Micro BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) を用いて決定した。

[0050] Lipooligosaccharide (LOS) は、ホットフェノール法を用いて、百日咳菌18323株より精製した (Minnick, Infect Immun, 1994)。LOSの精製は、SDS-PAGEおよび銀染色により確認した。LOSの力価 (エンドトキシンユニット: EU) は、リムルスカラーKYテストワコー (富士フィルム和光純薬) を用いて決定した。

[0051] (2) アンタゴニスト

実施例1で使用したアンタゴニストのうち、HC-067047 (TRPV4アンタゴニスト) とL-798106 (EP3アンタゴニスト) を除く7種類のアンタゴニストを使用した。各アンタゴニストは、濃度が67 nmol/mlまたは200 nmol/mlとなるようにPBSを用いて用時調製した。

[0052] (3) 咳発作回数の測定

7週齢のC57BL/6J雄マウス (日本クレア) をイソフルランで麻酔し、アンタゴニスト溶液300 μ lを腹腔内投与した (5匹/群)。対照群 (5匹/群) として、PBS 300 μ lを同様に投与した。腹腔内投与の直後に、PT (200 ng)、Vag8 (500 ng)、LOS (4×10^4 EU) を含むPBS溶液50 μ lをマウスの鼻腔内に投与した。アンタゴニストおよび咳誘発因子の投与は、5日間連続して行った。1回目の投与日を0日目 (Day0) とし、Day4からDay14までのマウスの咳発作を以

下の要領で測定した。マウスを個別の観察用ケージに入れ、マイクロホン接続ビデオカメラを用いて、ケージ内のマウスの様子を1日1匹当たり5分間撮影した。撮影した動画をAdobe Premiere Pro Cs5.5 (Adobe Systems) で再生し、咳音とマウスの動作から咳発作の回数を計測した。結果は、Day 6からDay 14における45分間 (5分×9日間) の咳発作の総数で表している。なお、統計学的解析はPrism8 (GraphPad Software) を使用し、One-way ANOVAおよびTukey法により有意差検定を実施した。

[0053] 2-2 結果

結果を図3Aおよび図3Bに示した。B2受容体アンタゴニスト (イカチバント) およびTRPV1アンタゴニスト (カプサゼピン) を投与した群では、PBS投与群と比較して咳誘発因子によるマウス咳発作の総数が有意に減少した ($P < 0.01$)。一方、B1受容体、TRPA1、NK1受容体、NK2受容体、NK3受容体の各アンタゴニストでは、咳発作の総数に変化は見られなかった。

[0054] [実施例3：百日咳菌咳誘発因子を投与したマウスにおける気管支肺胞洗浄液中のブラジキニン濃度の検討]

3-1 実験材料および方法

7週齢のC57BL/6J雄マウス (日本クレア) をイソフルランで麻酔し、実施例2で調製した百日咳菌咳誘発因子PT (200 ng)、Vag8 (500 ng) およびLOS (4×10^4 EU) を含むPBS溶液50 μ lを鼻腔内に投与した。咳誘発因子の投与回数により以下の3群を設けた (5匹/群)。各群にそれぞれ対照群 (5匹/群) を設け、PBS 50 μ lを同様に投与した。1回目の投与日を0日目 (Day0) とし、1回投与群はDay1に、4日間連続投与群はDay4に、5日間連続投与群はDay10に、以下の要領で各マウスの気管支肺胞洗浄液を回収した。過剰量のペントバルビタールの腹腔内投与により安楽殺したマウスの気管にカテーテルを挿入してPBS 500 μ lを注入し、吸引した。再度、PBSの注入および吸引を行い、回収した液を遠心後 (12,000×g、5分、4℃)、上清を回収して気管支肺胞洗浄液とした。気管支肺胞洗浄液中のブラジキニン濃度および総タンパク濃度は、Mouse Bradykinin ELISA Kit (MyBioSource) およびMicro BCA Protein Assayに

より測定した。結果は、ブラジキニン量 (pg/mg protein) として表している。なお、有意差検定にはTwo-way ANOVAおよびTukey法を用いた。

[0055] 3-2 結果

結果を図4に示した。誘発因子4日間連続投与群は、対照群と比較してブラジキニン濃度の上昇が認められた ($P < 0.01$)。

[0056] [実施例4: Kng1遺伝子欠損マウスを用いた百日咳発作の検討]

4-1 実験材料および方法

(1) Kng1遺伝子欠損マウスの作製

ブラジキニンの前駆体である高分子量キニノーゲンをコードするKng1遺伝子の全長を欠失したKng1^{-/-}マウス (C57BL/6J) を、CRISPR/Cas9システムを用いた以下の方法で作出した (Mashiko et al, Sci Rep, 2013; Abbasi et al, J Cell Sci, 2018)。C57BL/6J間の交配により得られた受精卵にCas9タンパク質 (Thermo Fisher Scientific) および2種類の合成crRNAとtracrRNA (シグマアルドリッチ) のアニーリング産物をエレクトロポレーションにより導入し、代理母マウスに移植することでKng1^{-/-}マウスを作出した。各crRNAは、それぞれKng1遺伝子の5' および3' 領域の配列 (5' 領域: GACCTCAGGAATCTAAATAG (配列番号3)、3' 領域: ACAGAGGCACGGGTGCCACA (配列番号4)) を標的とする。Kng1遺伝子の欠損は、プライマーセット (Kng1-check-S1: CAAC TCAGGCCGTGTGTTTG (配列番号5)、Kng1-check-S2: GCAGAGCCATCCTGAGGAAA (配列番号6)、Kng1-check-AS: ACTCCCCAGCTGCTATCAGA (配列番号7)) を用いたPCRおよびシーケンス解析により確認した。また、高分子量キニノーゲンの欠損は、抗Kng1抗体 (シグマアルドリッチ) を用いたウエスタンブロットにより確認した。

[0057] (2) 百日咳菌およびその菌体破碎液によるKng1^{-/-}マウスの咳発作回数の測定

百日咳菌18323株をStainer-Scholte液体培地で培養し、OD₆₅₀ = 0.03 (1×10^8 CFU/ml) となるように調整した。本菌液50 μ lをメデトミジン (0.3 mg/kg、共立製薬)、ミダゾラム (2 mg/kg、武田テバ)、ブトルファノール (5 m

g/kg、Meiji Seikaファルマ）で麻酔した野生型およびKng1^{-/-}マウス（6-8週齢、オス、5匹/群）の鼻腔内に投与した。上記実施例2（3）に記載の方法と同じ方法で、咳発作回数を測定した。咳発作解析用の撮影が終了した後（Day 14）、過剰量のペントバルビタールの腹腔内投与によりマウスを安楽殺させ、気管および肺を摘出した。それぞれの臓器をPBSに浸し、バイオマッシャーI（ニッピ）およびポリトロンPT1200E（Kinematica）を用いてホモジナイズした後、適宜希釈した溶液をBG培地に塗布、培養、CFUの計測を行い、各臓器における生菌数を算出した。

また、イソフルランにより麻酔した野生型およびKng1^{-/-}マウス（6-8週齢、オス、5匹/群）にPBSで1 mg/mlに調整した百日咳菌の菌体破碎液50 μ lを5日間連続で鼻腔内に投与し、同様に咳発作の回数を測定した。

[0058] 4-2 結果

（1）咳発作回数

百日咳菌を投与したマウスの咳発作回数の結果を図5Aに、百日咳菌の菌体破碎液を投与したマウスの咳発作回数の結果を図5Bに示した。どちらを投与した場合も、Kng1^{-/-}マウスでは、野生型マウスと比較して、咳発作の総数が有意に減少していた。

（2）百日咳菌の生菌数

結果を図6に示した。気管内および肺内の百日咳菌の生菌数は、どちらの臓器でも野生型マウスとKng1^{-/-}マウスの間に有意差は見られなかった。

[0059] 実施例1～4の結果から、百日咳菌は呼吸器におけるブラジキニン濃度を上昇させ、B2受容体およびTPRV1を介して咳発作を引き起こしていることが示された。したがって、B2受容体アンタゴニストおよびTPRV1アンタゴニストは百日咳に対する鎮咳薬の有効成分として有用であることが明らかとなった。

[0060] なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献およ

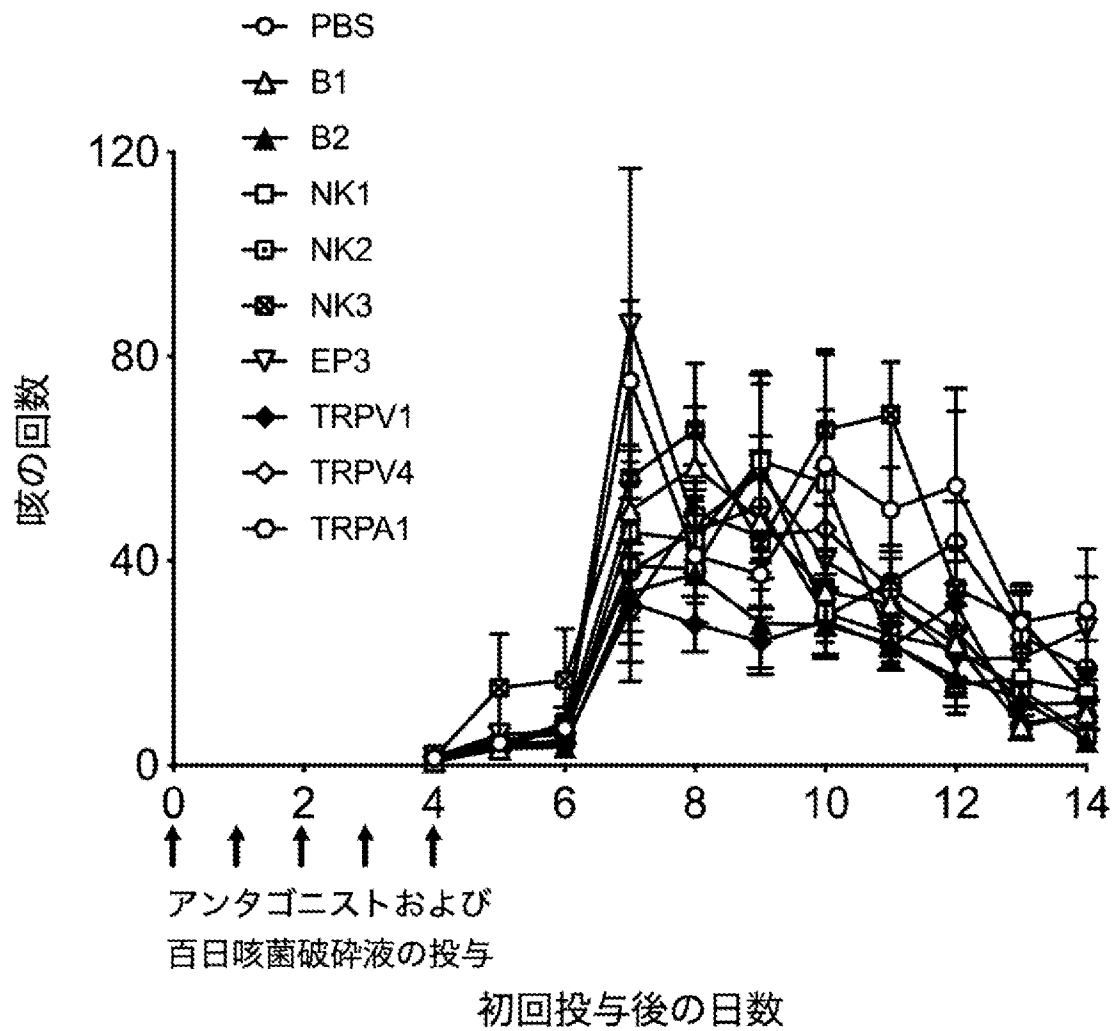
び特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

請求の範囲

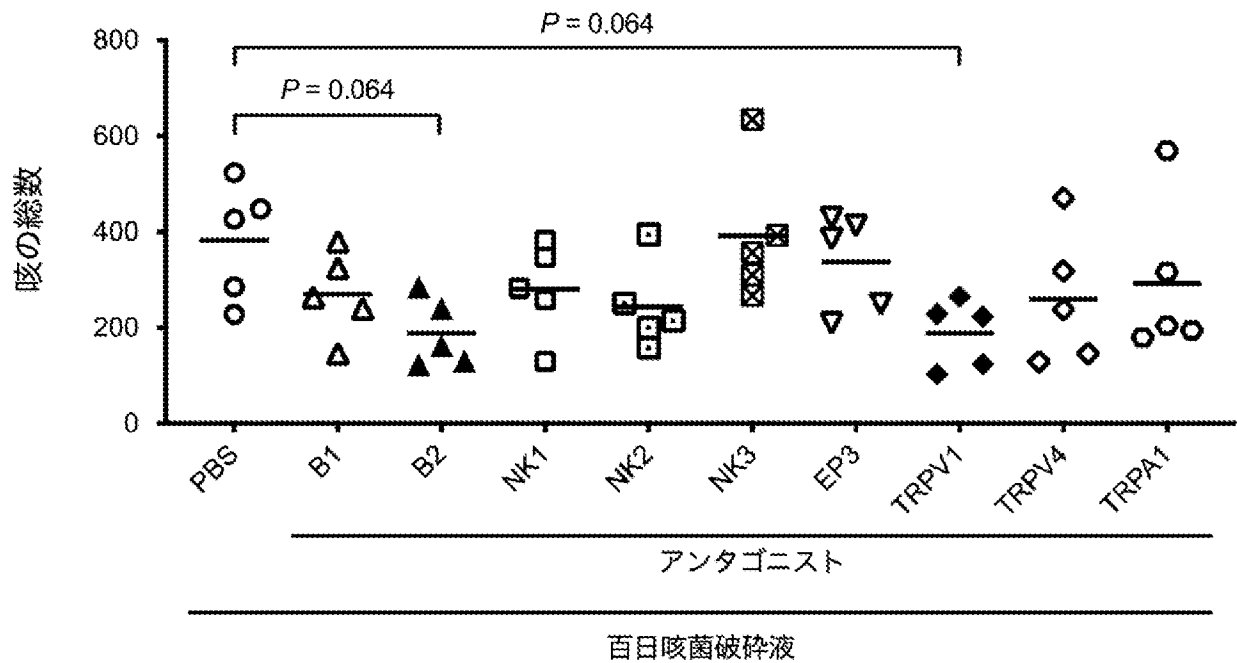
- [請求項1] ブラジキニン B 2 受容体アンタゴニストまたは T R P V 1 (transient receptor potential vanilloid 1) アンタゴニストを有効成分とする百日咳に対する鎮咳薬。
- [請求項2] ブラジキニン B 2 受容体アンタゴニストがイカチバント、デルチバントまたはファシチバントである請求項 1 に記載の鎮咳薬。
- [請求項3] ブラジキニン B 2 受容体アンタゴニストがイカチバントである請求項 2 に記載の鎮咳薬。
- [請求項4] ブラジキニン B 2 受容体アンタゴニストがブラジキニン B 2 受容体と特異的に結合する抗体またはペプチドである請求項 1 に記載の鎮咳薬。
- [請求項5] T R P V 1 アンタゴニストがカプサゼピン、ヨードレシニフェラトキシン、ルテニウムレッドまたは α -スピナステロールである請求項 1 に記載の鎮咳薬。
- [請求項6] T R P V 1 アンタゴニストが T R P V 1 と特異的に結合する抗体またはペプチドである請求項 1 に記載の鎮咳薬。
- [請求項7] ブラジキニン B 2 受容体または T R P V 1 の活性化を阻害する物質を選択する工程を含む、百日咳に対する鎮咳薬のスクリーニング方法。
- [請求項8] ブラジキニン B 2 受容体または T R P V 1 を発現する細胞と被験物質とを接触させる工程と、ブラジキニン B 2 受容体または T R P V 1 の下流シグナルを測定する工程と、被験物質と接触していない前記細胞において測定した下流シグナルと比較して下流シグナルを低下させる被験物質を選択する工程とを含む、請求項 7 に記載のスクリーニング方法。
- [請求項9] ブラジキニン B 2 受容体を発現する細胞と被験物質とブラジキニンを接触させる工程と、ブラジキニン B 2 受容体とブラジキニンとの結合を確認する工程と、被験物質と接触していない前記細胞において測

定したブラジキニン B 2 受容体とブラジキニンとの結合と比較して、
ブラジキニン B 2 受容体とブラジキニンとの結合を阻害する被験物質
を選択する工程とを含む、請求項 7 に記載のスクリーニング方法。

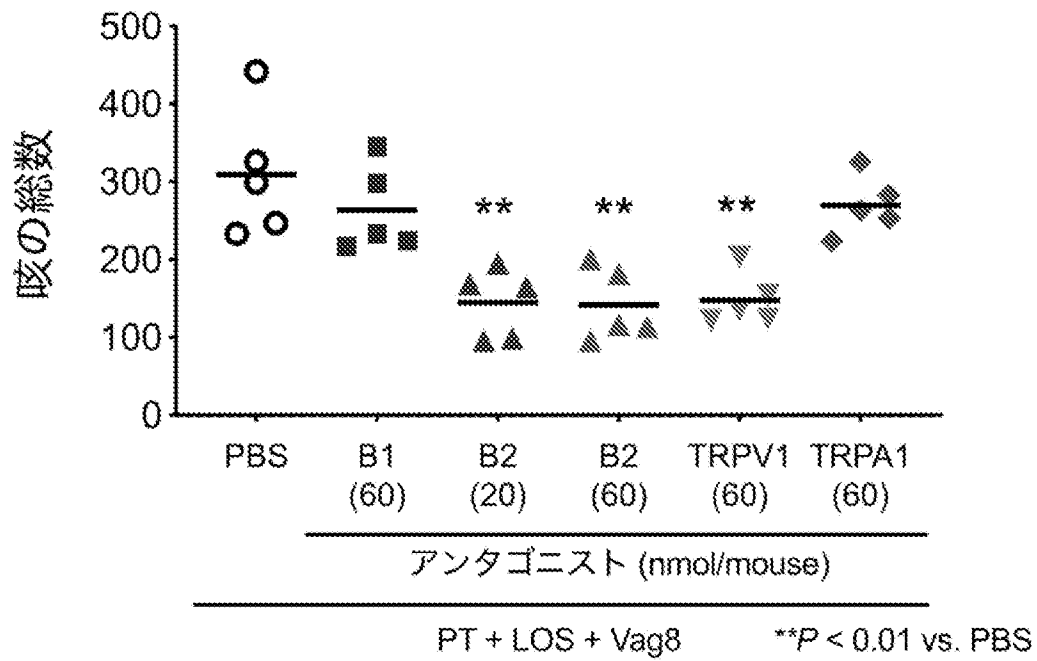
[図1]



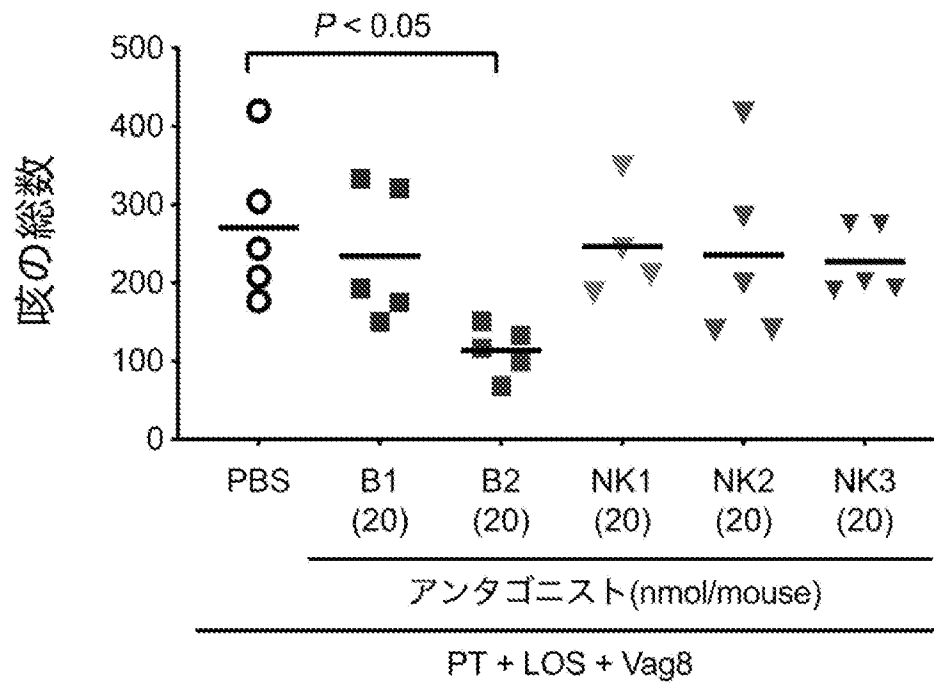
[図2]



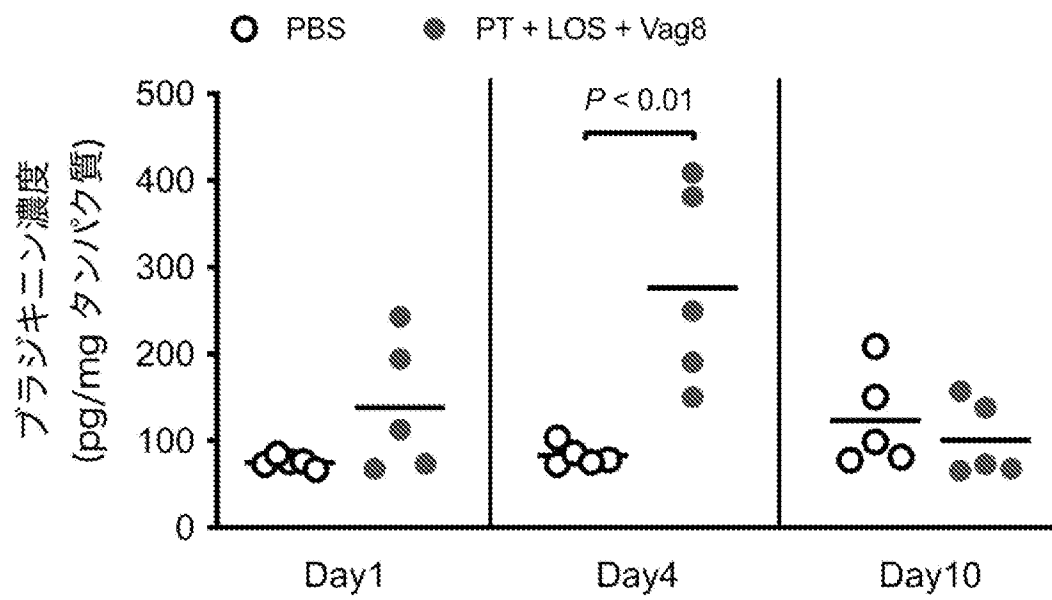
[図3A]



[図3B]



[図4]



[図5A]

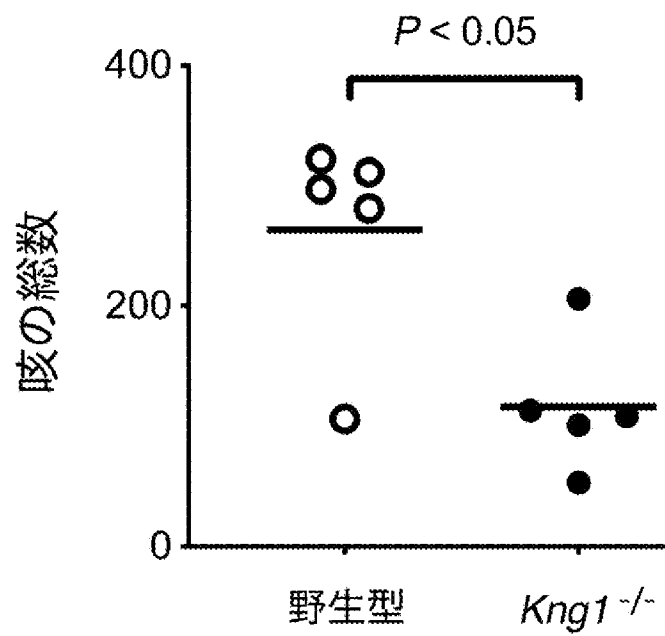


Figure 3 is a scatter plot showing bacterial load (CFU) in the trachea and lung for wild-type and *Kng1*^{-/-} mice. The y-axis represents bacterial load (菌数/器官 (Day14)) on a logarithmic scale from 10⁰ to 10⁷. The x-axis shows four groups: 气管 (Trachea) and 肺 (Lung) for both 野生型 (Wild-type) and *Kng1*^{-/-} mice. In the trachea, bacterial load is significantly lower in *Kng1*^{-/-} mice compared to wild-type. In the lung, bacterial load is significantly higher in *Kng1*^{-/-} mice compared to wild-type.

Organ	Genotype	
气管 (Trachea)	野生型 (Wild-type)	~8,000
		~12,000
		~3,000
		~10,000
	<i>Kng1</i> ^{-/-}	~4,000
		~6,000
		~15,000
		~4,000
肺 (Lung)	野生型 (Wild-type)	~300,000
		~1,500,000
		~600,000
		~300,000
	<i>Kng1</i> ^{-/-}	~400,000
		~1,200,000
		~100,000
		~600,000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/018500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00(2006.01)i; A61P 11/14(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12Q 1/06(2006.01)i; A61K 33/24(2019.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 31/357(2006.01)i; A61K 31/496(2006.01)i; A61K 31/55(2006.01)i; A61K 31/575(2006.01)i

FI: A61K45/00; G01N33/50 Z; G01N33/68; G01N33/15 Z; A61K38/08; A61K38/16; A61K31/496; A61K31/55; A61K31/357; A61K33/24; A61K31/575; A61P43/00 111; A61P11/14; C07K14/705 ZNA; C07K16/28; C12N5/071; C12Q1/06

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)

A61K45/00; A61P11/14; A61P43/00; C07K14/705; C07K16/28; C12N5/071; C12Q1/06; A61K33/24; A61K38/08; A61K38/16; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/68; A61K31/357; A61K31/496; A61K31/55; A61K31/575

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII);
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HEWITT, M. M. et al., "Mechanisms of bradykinin evoked cough", Am J Respir Crit Care Med, 01 May 2010, vol. 181, no. 1, Abstract No. A5548, in particular, section "methods and results"	1-4
Y		1-9
Y	US 2018/0235931 A1 (MENLO THERAPEUTICS INC.) 23.08.2018 (2018-08-23), paragraphs [0040], [0266], [0270], [0271]	1-9

☒ 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 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 July 2020 (01.07.2020)

Date of mailing of the international search report
14 July 2020 (14.07.2020)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/018500

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	平山 良孝、ほか1名、ブラジキニン受容体拮抗薬の開発状況と今後の展開、日薬理誌、2002、vol. 119、pp. 45-53 2. B2 receptor antagonist, (HIRAYAMA, Yoshitaka et al., "Bradykinin antagonist: current status and perspective", Folia Pharmacologica Japonica)	1-9
A	亀井 達也、ほか3名、温度感受性 TRP チャネルを標的とした新規神経障害性疼痛治療戦略、日薬理誌、2012、vol. 140、pp. 196-200、p. 196、right column, paragraph [0003] to p. 197、right column, paragraph [0001], table 1, (KAMEI, Tatsuya et al., "Novel therapeutic approach to neuropathic pain: 'Hot' and 'Cool' TRP-channel family", Folia Pharmacologica Japonica)	1-9
A	JP 10-503092 A (MERCK & CO., INC.) 24.03.1998 (1998-03-24) claims	1-9
A	新澤 直明、ほか1名、百日咳 何故ひどい咳が出るの? -咳発作メカニズム解明のための基礎細菌学的アプローチ-, 臨床とウイルス, 2015, vol. 43, no. 1, pp. 30-36, tables 1, 2, non-official translation (SHINZAWA, Naoaki et al., "Whooping cough, Why do you have a very bad cough? -Basic bacteriological approach to clarify the mechanism of a cough attack-", Clinical virology)	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/018500

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2018/0235931 A1	23 Aug. 2018	WO 2018/136554 A1	
JP 10-503092 A	24 Mar. 1998	US 5750826 A	
		claims	
		WO 1996/003495 A1	
		EP 771348 A1	
		CA 2195678 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 45/00(2006.01)i; A61P 11/14(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 5/071(2010.01)i; C12Q 1/06(2006.01)i; A61K 33/24(2019.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; A61K 38/16(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 31/357(2006.01)i; A61K 31/496(2006.01)i; A61K 31/55(2006.01)i; A61K 31/575(2006.01)i FI: A61K45/00; G01N33/50 Z; G01N33/68; G01N33/15 Z; A61K38/08; A61K38/16; A61K31/496; A61K31/55; A61K31/357; A61K33/24; A61K31/575; A61P43/00 111; A61P11/14; C07K14/705 ZNA; C07K16/28; C12N5/071; C12Q1/06																	
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61K45/00; A61P11/14; A61P43/00; C07K14/705; C07K16/28; C12N5/071; C12Q1/06; A61K33/24; A61K38/08; A61K38/16; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/68; A61K31/357; A61K31/496; A61K31/55; A61K31/575 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2020年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2020年</td> </tr> </table> 国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に利用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2020年	日本国実用新案登録公報	1996-2020年	日本国登録実用新案公報	1994-2020年							
日本国実用新案公報	1922-1996年																
日本国公開実用新案公報	1971-2020年																
日本国実用新案登録公報	1996-2020年																
日本国登録実用新案公報	1994-2020年																
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>HEWITT, M. M. et al., Mechanisms of bradykinin evoked cough, Am J Respir Crit Care Med, 2010.05.01, Vol. 181, No. 1, Abstract No. A5548 特に、MethodsとResultsの項目</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2018/0235931 A1 (MENLO THERAPEUTICS INC.) 23.08.2018 (2018-08-23) [0040], [0266], [0270], [0271]</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>平山 良孝、ほか1名、ブラジキニン受容体拮抗薬の開発状況と今後の展開、日薬理誌、2002, Vol.119, pp.45-53 2. B2受容体拮抗薬</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	HEWITT, M. M. et al., Mechanisms of bradykinin evoked cough, Am J Respir Crit Care Med, 2010.05.01, Vol. 181, No. 1, Abstract No. A5548 特に、MethodsとResultsの項目	1-4	Y		1-9	Y	US 2018/0235931 A1 (MENLO THERAPEUTICS INC.) 23.08.2018 (2018-08-23) [0040], [0266], [0270], [0271]	1-9	A	平山 良孝、ほか1名、ブラジキニン受容体拮抗薬の開発状況と今後の展開、日薬理誌、2002, Vol.119, pp.45-53 2. B2受容体拮抗薬	1-9
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号															
X	HEWITT, M. M. et al., Mechanisms of bradykinin evoked cough, Am J Respir Crit Care Med, 2010.05.01, Vol. 181, No. 1, Abstract No. A5548 特に、MethodsとResultsの項目	1-4															
Y		1-9															
Y	US 2018/0235931 A1 (MENLO THERAPEUTICS INC.) 23.08.2018 (2018-08-23) [0040], [0266], [0270], [0271]	1-9															
A	平山 良孝、ほか1名、ブラジキニン受容体拮抗薬の開発状況と今後の展開、日薬理誌、2002, Vol.119, pp.45-53 2. B2受容体拮抗薬	1-9															
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。																	
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	"&" 同一パテントファミリー文献	"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献				
* 引用文献のカテゴリー	"T" 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"X" 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの																
"E" 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	"Y" 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの																
"L" 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）	"&" 同一パテントファミリー文献																
"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献																	
"P" 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献																	
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日																
01.07.2020	14.07.2020																
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）																
日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	渡部 正博 4U 5801 電話番号 03-3581-1101 内線 3452																

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	亀井 達也、ほか3名、温度感受性TRPチャネルを標的とした新規神経障害性疼痛治療戦略, 日薬理誌, 2012, Vol. 140, pp.196-200 p.196右欄第3段落～p.197右欄第1段落、表1	1-9
A	JP 10-503092 A (メルク エンド カンパニー インコーポレーテッド) 24.03.1998 (1998 - 03 - 24) 特許請求の範囲	1-9
A	新澤 直明、ほか1名、百日咳 何故ひどい咳が出るの? - 咳発作メカニズム解明のための基礎細菌学的アプローチ, 臨床とウイルス, 2015, Vol. 43, No. 1, pp.30-36 表1, 2	1-9

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
 ☒ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式
- b. ☐ 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
 ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
 ☐ 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/018500

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
US	2018/0235931	A1	23.08.2018	WO	2018/136554	A1	
JP	10-503092	A	24.03.1998	US	5750826	A	
				Claims			
				WO	1996/003495	A1	
				EP	771348	A1	
				CA	2195678	A	