

(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2005-508632

(P2005-508632A)

(43) 公表日 平成17年4月7日(2005.4.7)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>C O 7 K 14/47</b>	C O 7 K 14/47	2 G O 4 5
<b>C 1 2 N 1/15</b>	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
<b>C 1 2 N 1/19</b>	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
<b>C 1 2 N 1/21</b>	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
		4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-530811 (P2003-530811)	(71) 出願人	390023526
(86) (22) 出願日	平成14年9月20日 (2002. 9. 20)		メルク エンド カムパニー インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年3月25日 (2004. 3. 25)		MERCK & COMPANY INCORPORATED
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/029931		アメリカ合衆国、ニュージャージー、ローウェイ、イースト リンカーン アヴェニュー 1 2 6
(87) 国際公開番号	W02003/027239	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成15年4月3日 (2003. 4. 3)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	60/325, 129	(74) 代理人	100113332
(32) 優先日	平成13年9月26日 (2001. 9. 26)		弁理士 一入 章夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100114188
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), CA, JP, US		弁理士 小野 誠
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 メラニン凝集ホルモン受容体アンタゴニスト結合タンパク質

## (57) 【要約】

本発明はMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質に関する。本明細書に記載されているMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質はMCH-1Rをベースとし、受容体をMCH結合に対して実質的に不活性とする第2細胞内ループまたはカルボキシ末端への1つ以上の改変を有する。MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質はMCH-1Rアンタゴニストに結合し得るが、高アフィニティーMCH結合を示さず、MCHにより活性化されない。

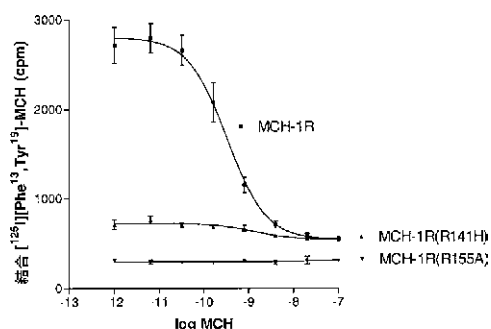


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a)メラニン凝縮ホルモン受容体タイプ1(MCH-1R)をアゴニストによる活性化に対して実質的に不活性とする改変の1つ以上を第2細胞内ループ領域中に有する第1MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質、及び

b)MCH-1Rをアゴニストによる活性化に対して実質的に不活性とする改変の1つ以上をC末端中に有する第2MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質

からなる群から選択されることを特徴とするMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質。

## 【請求項 2】

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質が第1MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質。

## 【請求項 3】

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質が配列番号1のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求の範囲第2項に記載のMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質。

## 【請求項 4】

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質が配列番号2のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求の範囲第2項に記載のMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質。

## 【請求項 5】

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質が配列番号3のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求の範囲第2項に記載のMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質。

## 【請求項 6】

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質が第2MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質。

## 【請求項 7】

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質が配列番号4のアミノ酸配列からなることを特徴とする請求の範囲第6項に記載のMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質。

## 【請求項 8】

請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載のMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むことを特徴とする核酸。

## 【請求項 9】

ヌクレオチド配列が、配列番号5、配列番号6、配列番号7及び配列番号8からなる群から選択されるヌクレオチド配列であることを特徴とする核酸。

## 【請求項 10】

ヌクレオチド配列が配列番号5からなることを特徴とする請求の範囲第9項に記載の核酸。

## 【請求項 11】

ヌクレオチド配列が配列番号6からなることを特徴とする請求の範囲第9項に記載の核酸。

## 【請求項 12】

ヌクレオチド配列が配列番号7からなることを特徴とする請求の範囲第9項に記載の核酸。

## 【請求項 13】

ヌクレオチド配列が配列番号8からなることを特徴とする請求の範囲第9項に記載の核酸。

## 【請求項 14】

核酸が発現ベクターであることを特徴とする請求の範囲第8項～第13項のいずれか1項に記載の核酸。

10

20

30

40

50

## 【請求項 15】

請求の範囲第14項に記載の発現ベクターを含む組換え細胞であって、ヌクレオチド核酸が前記細胞により認識されるプロモーターに機能的に連結していることを特徴とする前記組換え細胞。

## 【請求項 16】

MCH-1Rに結合し得る化合物のスクリーニング方法であって、

- a) 請求の範囲第1項～第7項のいずれか1項に記載のMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質を前記化合物と接触させるステップ、及び
- b) 前記化合物のMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質に結合する能力を測定するステップ

10

を含むことを特徴とする前記スクリーニング方法。

## 【請求項 17】

請求の範囲第15項に記載の組換え細胞をタンパク質が発現ベクターから発現する条件下で増殖させるステップを含むことを特徴とするMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質の作成方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 【背景技術】

## 【0002】

20

本明細書中に引用した文献は本発明に対する従来技術とは認められない。

## 【0003】

視床下部に存在する神経ペプチドは体重コントロールを仲介するときに重要な役割を果たす(Fliegerら, Cell, 92: 437-440(1998))。メラニン凝縮ホルモン(MCH)は、神経ペプチドNEI及びNGEをもコードする視床下部中の大きなプレプロホルモン前駆体の一部として合成される環状19アミノ酸神経ペプチドである(Nahonら, Mol. Endocrinol., 4: 632-637(1990))。MCHは初めサケ下垂体中で同定され、魚ではMCHはメラニン凝集に作用して皮膚色素沈着に影響を及ぼす。マスやウナギでは、MCHはストレス誘発またはCRF刺激ACTH放出に関与することも判明している(Kawauchiら, Nature, 305: 321-323(1983))。

30

## 【0004】

ヒトでは、脳で発現するMCHをコードする2つの遺伝子が同定された(Brettonら, Mol. Brain Res., 18: 297-310(1993))。哺乳動物では、MCHは食物摂取のコントロールに関連する視床下部のニューロン細胞体、例えば外側視床下部の核周囲部細胞体及び不確帯に主に局在している(Kniggeら, Peptides, 17: 1063-1073(1996))。

## 【0005】

薬理的及び遺伝的証拠から、MCH作用の主モードは摂食を促進すること(食欲増進)であることが示唆されている。MCH mRNAは絶食マウス及びラット、ob/obマウスにおいてアップレギュレートされる(Quら, Nature, 380: 243-247(1996))。MCHの脳質内注入(ICV)は摂食を刺激し、MCHはメラノサイト刺激ホルモン(MSH)で見られる減食作用を相殺する(Quら, Nature, 380: 243-247(1996))。MCH欠乏マウスは痩せていて食が細く、高い代謝率を有する(Shimadaら, Nature, 396: 670-673(1998))。MCHを過剰発現するトランスジェニックマウスは過食であり、インスリン耐性及び中度の肥満を呈する(Ludwigら, J. Clin. Invest., 107: 379-386(2001))。

40

## 【0006】

MCH作用は、視床下部-下垂体-軸に対する作用が報告されているように摂食の調節

50

に限定されない (Nahon, Critical Rev. in Neurobiol., 8: 221 - 262 (1994))。MCHはACTHのストレス誘導放出を調節し得る (Nahon, Critical Rev. in Neurobiol., 8: 221 - 262 (1994))。

【0007】

幾つかの文献には、ヒトメラニン凝縮ホルモン受容体 (“MCH-1R”) が記載されている (Chambersら, Nature, 400: 261 - 265 (1999); Saitoら, Nature, 400: 265 - 269 (1999); Bachnerら, FEBS Letters, 457: 522 - 524 (1999); Shimomuraら, Biochemical and Biophysical Research Communications, 261: 622 - 626 (1999))。 10

【発明の開示】

【0008】

本発明はMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質に関する。本明細書に記載されているMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質はMCH-1Rをベースとし、受容体をMCH結合に対して実質的に不活性とする改変の1つ以上を第2細胞内ループまたはカルボキシ末端中に有する。MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質はMCH-1Rアンタゴニストに結合し得るが、高アフィニティーMCH結合を示さず、MCHにより活性化されない。

【0009】

20

従って、本発明の第1主題は、

- a) MCH-1RをMCH結合に対して実質的に不活性とする1つ以上の改変を第2細胞内ループ領域中に有するMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質、及び
  - b) MCH-1RをMCH結合に対して実質的に不活性とする1つ以上の改変をC末端中に有するMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質
- からなる群から選択されるMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質に関する。

【0010】

“MCH結合に対して実質的に不活性” とは、MCH結合が存在するとしても該MCH結合がヒトMCH-1Rに対する結合レベルの約10%以下にすぎないことを指す。別の実施態様では、結合は5%以下であるか検出できない。

30

【0011】

本発明の別の主題は、MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸に関する。本発明の実施態様において、前記核酸は発現ベクターである。

【0012】

本発明の別の主題は、MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質をコードする発現ベクターを含む組換え細胞に関する。MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列は前記細胞により認識されるプロモーターに機能的に結合している。

【0013】

40

本発明の別の主題は、MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質に結合し得る化合物のスクリーニング方法に関する。前記方法は、MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質を化合物と接触させ、前記化合物の前記タンパク質に結合する能力を測定することを含む。

【0014】

本発明の別の態様はMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質の作成方法に関する。前記方法は、MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質をコードする発現ベクターを含む組換え細胞を増殖させることを含む。

【0015】

本発明の他の特徴及び作用効果は、複数の実施例を含めた本明細書中の記載から明らか

50

である。本明細書の実施例は本発明を実施する際に有用な成分及び方法を示すものであり、これらの実施例は本発明を限定するものではない。本明細書の記載に基づいて、当業者は本発明を実施するために有用な他の成分及び方法を特定、使用することができる。

【0016】

(発明の詳細説明)

ヒトMCH-1Rの直接突然変異誘発により、MCH-1Rアンタゴニストに選択的に結合するMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質が生じた。MCH-1Rアンタゴニストは高アフィニティーMCHアゴニスト結合を示さず、MCHにより活性化されない。MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質の用途には、潜在的受容体アンタゴニストのスクリーニング及びタンパク質輸送の研究が含まれる。

10

【0017】

第2細胞内ループ領域中のMCH-1Rを改変したり、カルボキシ末端の一部を欠失することにより各種タイプのMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質が得られた。MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質を生成するための第2細胞内ループ領域に対する改変には1つ以上のアミノ酸の変化が含まれる。

【0018】

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質MCH-1R(R141H)及びMCH-1R(R155A)では、MCH-1Rの第2細胞内ループ領域中の1つのアミノ酸が変化している。MCH-1R(R141H)及びMCH-1R(R155A)のアミノ酸配列を配列番号1及び配列番号2に示す。

20

【0019】

No.141は多くのG結合受容体中に高度に保存されている特徴的な配列であるDRYの中にある。DRY配列はGタンパク質相互作用に關与することが示唆されている(Rosenthalら, J. Biol. Chem., 268:13030-3(1993))。

【0020】

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質MCH-1R(i2/MC4R)は、第2細胞内ループがヒトMC4Rの対応第2細胞内ループで置換されている以外はMCH-1Rを含む。MCH-1R(i2/MC4R)のアミノ酸配列を配列番号3に示す。

【0021】

MC4Rはメラノコルチン-4受容体である(Yangら, Biochemistry, 39:14900-11(2000); Gantzら, J. Biol. Chem., 268:15174-9(1993))。MC4Rへの改変は、例えばFraenbergerら, Biochem. Biophys. Res. Commun., 245:490-492(1998)に記載されている。

30

【0022】

C末端欠失の例はMCH-1R(316/EGFP)であり、この場合MCH-1RのC末端37アミノ酸が欠失しており、増強緑色フルオレセンスタンパク質(EGFP)がC末端に付加されている。ヒトソマトスタチン受容体タイプ5へのC末端欠失はHukovicら, Journal of Biological Chemistry, 273:21416-21422(1998)に記載されている。

40

【0023】

MCH-1R(316/EGFP)のアミノ酸配列を配列番号4に示す。EGFP配列はタンパク質輸送の研究を進める。

【0024】

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質の作成

各種のMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質は本明細書に記載されているガイドンスに基づいて入手し得る。ここに記載されているガイドラインにはMCH-1R結合アンタゴニストを作成するために有用な特定突然変異及び領域の同定が含まれる。好ましいMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質はヒトMCH-1R配列に基づく。

50

## 【0025】

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質は、MCHではなくMCHアンタゴニストに結合しなければならない。例えば本明細書に記載されているMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質から出発して改変を加えて各種のMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質を作成することができる。

## 【0026】

ポリペプチド機能を変化させないと予測されるポリペプチドへの改変はアミノ酸R基を考慮してなされ得る。天然アミノ酸の違いはR基の違いに起因する。R基はアミノ酸の各種特性、例えば物理的サイズ、電荷及び疎水性に影響を及ぼす。アミノ酸は、中性及び疎水性（アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン及びメチオニン）、中性及び極性（グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、アスパラギン及びグルタミン）、塩基性（リシン、アルギニン及びヒスチジン）及び酸性（アスパラギン酸及びグルタミン酸）の複数のグループに分割され得る。

## 【0027】

通常、アンタゴニスト結合を維持するためにアミノ酸を置換するとき、類似の特性を有するアミノ酸を交換することが好ましい。特定グループ内でのアミノ酸の置換、例えばロイシンのバリンでの置換、リシンのアルギニンでの置換、グルタミンのアルギニンでの置換は、アンタゴニスト結合を変化させない好適な候補である。

## 【0028】

別の実施態様において、MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質は、(1)配列番号1、2、3、4、または約37アミノ酸の欠失を含むヒトMCH-1Rのいずれかと少なくとも約90%、好ましくは少なくとも約95%の配列類似性を有するか、または(2)配列番号1、2、3、4、または約37アミノ酸の欠失を含むヒトMCH-1Rから最高約20個の改変を含む配列を有する。ポリペプチドの配列類似性はBLAST（援用により本明細書に含まれるとするAltschulら、Nucleic Acids Res., 25:3389-3402(1997)）により調べられ得る。1つの実施態様では、配列類似性は、MATRIX: BLOSUM62、PER RESIDUE GAP COST: 11及びLambda比: 1のパラメータでtBLASTnサーチプログラムを用いて調べられる。

## 【0029】

アミノ酸への改変は付加、欠失及び置換である。別の実施態様では、MCH-1Rペプチドは、配列番号1、2、3、4、または約37アミノ酸の欠失を含むヒトMCH-1Rからの1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または10~20の改変を有する。

## 【0030】

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質は化学的合成を含む方法及び生化学的合成を含む方法のような標準方法を用いて作成され得る。ポリペプチドの化学合成方法は当業界で公知である（例えば、Vincent, 「ペプチド及びタンパク質薬物デリバリー(Peptide and Protein Drug Delivery)」, ニューヨーク州ニューヨーク, Dekker (1990年) 発行を参照されたい）。

## 【0031】

ポリペプチドの生化学的合成方法も当業界で公知である。前記方法ではポリペプチド合成のために核酸鋳型を使用する。タンパク質を産生するために核酸を細胞に導入し、核酸を発現させる方法の例は文献、例えばAusubel, 「分子生物学の現在のプロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」, John Wiley (1987-1998年) 発行及びSambrookら, 「分子クローニング 実験マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年) 発行に記載されている。

## 【0032】

特定のアミノ酸配列から遺伝子コードの公知の縮重を用いて、多種多様のコード化核酸配列を入手することができる。遺伝子コードの縮重は、殆どすべてのアミノ酸がヌクレオ

10

20

30

40

50

チドトリブレット、すなわちコドンのいろいろな組合せによりコードされるために生ずる。アミノ酸は以下のようにコドンによりコードされる：

A = A l a = アラニン：コドン G C A , G C C , G C G , G C U ;

C = C y s = システイン：コドン U G C , U G U ;

D = A s p = アスパラギン酸：コドン G A C , G A U ;

E = G l u = グルタミン酸：コドン G A A , G A G ;

F = P h e = フェニルアラニン：コドン U U C , U U U ;

G = G l y = グリシン：コドン G G A , G G C , G G G , G G U ;

H = H i s = ヒスチジン：コドン C A C , C A U ;

I = I l e = イソロイシン：コドン A U A , A U C , A U U ;

K = L y s = リシン：コドン A A A , A A G ;

L = L e u = ロイシン：コドン U U A , U U G , C U A , C U C , C U G , C U U ;

M = M e t = メチオニン：コドン A U G ;

N = A s n = アスパラギン：コドン A A C , A A U ;

P = P r o = プロリン：コドン C C A , C C C , C C G , C C U ;

Q = G l n = グルタミン：コドン C A A , C A G ;

R = A r g = アルギニン：コドン A G A , A G G , C G A , C G C , C G G , C G U ;

S = S e r = セリン：コドン A G C , A G U , U C A , U C C , U C G , U C U ;

T = T h r = スレオニン：コドン A C A , A C C , A C G , A C U ;

V = V a l = バリン：コドン G U A , G U C , G U G , G U U ;

W = T r p = トリプトファン：コドン U C G ; 及び

Y = T y r = チロシン：コドン U A C , U A U 。

10

20

30

40

50

#### 【 0 0 3 3 】

ヒト M C H - 1 R に基づく M C H - 1 R アンタゴニスト結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列として、

配列番号 5：ヌクレオチド M C H - 1 R ( R 1 4 1 H )、

配列番号 6：ヌクレオチド M C H - 1 R ( R 1 5 5 A )、

配列番号 7：ヌクレオチド M C H - 1 R ( i 2 / M C 4 R )、及び

配列番号 8：ヌクレオチド M C H - 1 R ( 3 1 6 / E G F P )

が例示される。

#### 【 0 0 3 4 】

別の実施態様において、M C H - 1 R アンタゴニスト結合タンパク質をコードする核酸は、

( 1 ) 配列番号 1、2、3、4、または約 3 7 アミノ酸の欠失を含むヒト M C H - 1 R と少なくとも約 9 0 %、好ましくは少なくとも約 9 5 % の配列類似性を有するタンパク質をコードする；

( 2 ) 配列番号 1、2、3、4、または約 3 7 アミノ酸の欠失を含むヒト M C H - 1 R から最高 2 0 個の改変を伴う配列を有するタンパク質をコードする；

( 3 ) 配列番号 5、6、7、8、または約 3 7 C 末端アミノ酸に対応する欠失を含むヒト M C H - 1 R と少なくとも約 9 0 %、好ましくは少なくとも約 9 5 % の配列類似性を有するタンパク質をコードする。

#### 【 0 0 3 5 】

核酸の配列類似性は F A S T A ( 援用により本明細書に含まれるとする P e a r s o n ら , M e t h o d s i n E n z y m o l o g y , 1 8 3 : 6 3 - 9 8 ( 1 9 9 0 ) ) により調べられ得る。1つの実施態様では、配列類似性は、M A T R I X : B L O S U M 5 0、ギャップペナルティーズ：オープン = - 1 2 ; 残基 = - 2 で F A S T A t サーチプログラムを用いて調べられる。

#### 【 0 0 3 6 】

所望の配列を有する核酸は、化学的及び生化学的方法を用いて合成され得る。化学的方法の例は、A u s u b e l , 「分子生物学の現在のプロトコール (Current Protocols in

Molecular Biology)」, John Wiley (1987 - 1998年) 発行及び Sambrookら, 「分子クローニング 実験マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年) 発行に記載されている。

#### 【0037】

生化学的核酸合成方法には、核酸鋳型及び適当な酵素(例えば、DNA及び/またはRNAポリメラーゼ)の使用を含む。前記方法の例には、インビトロ増幅方法(例えば、PCR及び転写に基づく増幅)及びインビボ核酸複製が含まれる。好適な方法は、Ausubel, 「分子生物学の現在のプロトコール(Current Protocols in Molecular Biology)」, John Wiley (1987 - 1998年) 発行、Sambrookら, 「分子クローニング 実験マニュアル(Molecular Cloning, A Laboratory Manual)」, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989年) 発行及び Kacianらの米国特許第5,480,784号明細書に記載されている。

#### 【0038】

本発明の実施態様において、MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質は精製ポリペプチドである。「精製ポリペプチド」は、試料または調製物中に存在する全タンパク質の少なくとも10%を占める。更なる実施態様では、精製ポリペプチドは、試料または調製物中に存在する全タンパク質の少なくとも約50%、少なくとも約75%または少なくとも約95%を占める。「精製ポリペプチド」とは、ポリペプチドが精製を受けていなくてもよいことを指し、例えば化学合成されたが精製されていないポリペプチドも含まれる。

#### 【0039】

(組換え発現)

MCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質は、翻訳システムを用いて適当な宿主または試験管において組換え核酸から発現され得る。好ましくは、組換え発現させたMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質は、MCH-1Rに結合し且つMCH-1Rの活性を調節する化合物をスクリーニングするアッセイにおいて使用される。

#### 【0040】

好ましくは、発現は発現ベクターを用いて宿主細胞において実施される。発現ベクターは、ポリペプチドをコードする組換え核酸と共に適切な転写及びプロセッシングのための調節要素からなる。存在し得る調節要素には、組換え核酸に元々結合している調節要素及び組換え核酸に元々結合していない外因性調節要素が含まれる。外因性プロモーターのような外因性調節要素は特定宿主において組換え核酸を発現するために有用であり得る。

#### 【0041】

一般的に、発現ベクター中に存在する調節要素には、転写プロモーター、リボソーム結合部位、ターミネーター及び任意に存在するオペレーターが含まれる。別の好ましい要素は真核細胞でのプロセッシングのためのポリアデニル化信号である。好ましくは、発現ベクターは宿主細胞での自律複製のための複製起源、選択マーカー、特定数の有用な制限酵素部位及び高コピー数のためのポテンシャルをも含む。発現ベクターの例はクローニングベクター、修飾クローニングベクター、特別に設計されたプラスミド及びウイルスである。

#### 【0042】

各種宿主において適当レベルのポリペプチド発現を与える発現ベクターは当業界で公知である。当業界で公知の哺乳動物発現ベクターには、pcDNA3 (Invitrogen)、pMC1neo (Stratagene)、pXT1 (Stratagene)、pSG5 (Stratagene)、EBO-pSV2-neo (ATCC 37593)、pBPV-1 (8-2) (ATCC 37110)、pDBPV-MNTneo (342-12) (ATCC 37224)、pRSVgpt (ATCC 37199)、pRSVneo (ATCC 37198)、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pUCTag (ATCC 37460)、pCI-neo (Promega) 及びラム



ダ - Z D 3 5 ( A T C C 3 7 5 6 5 ) が含まれる。当業界で公知の細菌発現ベクターには、p E T 1 1 a ( N o v a g e n )、ラムダ g t 1 1 ( I n v i t r o g e n )、p c D N A I I ( I n v i t r o g e n ) 及び p K K 2 2 3 - 3 ( P h a r m a c i a ) が含まれる。当業界で公知の真菌細胞発現ベクターには、p Y E S 2 ( I n v i t r o g e n ) 及びピチア発現ベクター ( I n v i t r o g e n ) が含まれる。当業界で公知の昆虫細胞発現ベクターには、B l u e B a c I I I ( I n v i t r o g e n ) が含まれる。

#### 【 0 0 4 3 】

組換え宿主細胞は原核または真核細胞であり得る。組換え宿主細胞の例には、細菌細胞 (例えば、大腸菌)、真菌細胞 (例えば、酵母)、哺乳動物細胞 (例えば、ヒト、ウシ、ブタ、サル及びげっ歯動物) 及び昆虫細胞 (例えば、ショウジョウバエ及びカイコ由来細胞系) が含まれる。市販されている哺乳動物細胞系には、L細胞 L - M ( T K . s u p . - ) ( A T C C C C L 1 . 3 )、L細胞 L - M ( A T C C C C L 1 . 2 )、2 9 3 ( A T C C C R L 1 5 7 3 )、R a j i ( A T C C C C L 8 6 )、C V - 1 ( A T C C C C L 7 0 )、C O S - 1 ( A T C C C R L 1 6 5 0 )、C O S - 7 ( A T C C C R L 1 6 5 1 )、C H O - K 1 ( A T C C C C L 6 1 )、3 T 3 ( A T C C C C L 9 2 )、N I H / 3 T 3 ( A T C C C R L 1 6 5 8 )、H e L a ( A T C C C C L 2 )、C 1 2 7 I ( A T C C C R L 1 6 1 6 )、B S - C - 1 ( A T C C C C L 2 6 ) 及び M R C - 5 ( A T C C C C L 1 7 1 ) が含まれる。

#### 【 0 0 4 4 】

特定宿主での発現を高めるために、例えば宿主のコドン使用を考慮するように配列番号 5、6、7 または 8 に示す配列を修飾することが有用であり得る。異なる生物のコドン使用は当業界で公知である ( A u s u b e l , 「分子生物学の現在のプロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)」, J o h n W i l e y , 1 9 8 7 - 1 9 9 8 , 追補 3 3 , A p p e n d i x 1 C 参照)。

#### 【 0 0 4 5 】

発現ベクターは標準方法を用いて宿主細胞に導入され得る。前記方法の例には、形質転換、トランスフェクション、リポフェクション、プロトプラスト融合及びエレクトロポレーションが含まれる。

#### 【 0 0 4 6 】

M C H - 1 R アンタゴニスト結合タンパク質をコードする核酸は、発現ベクターを使用しなくても、例えばタンパク質をコードする組換え核酸を細胞ゲノムに導入することにより細胞において発現され得る。更に、m R N A は各種の無細胞系 (例えば、小麦胚芽抽出物及び網状赤血球抽出物) 及び細胞系 (例えば、カエル卵母細胞) において翻訳され得る。m R N A の細胞系への導入は、例えばマイクロインジェクションにより実施され得る。

#### 【 0 0 4 7 】

##### 機能的アッセイ

機能的 M C H - 1 R 及び M C H アゴニストを含むアッセイを使用することにより潜在的 M C H - 1 R アンタゴニストの M C H - 1 R 活性を調節する能力が簡単に評価される。M C H アゴニストの使用により M C H - 1 R 活性が分かる。

#### 【 0 0 4 8 】

組換え発現した M C H - 1 R を使用すると、受容体活性を簡単に測定できる。例えば、M C H - 1 R は通常は受容体を発現しない細胞系、例えば H E K 2 9 3、C O S 7 または C H O において発現ベクターにより発現され得る。この場合、発現ベクターを含まないかまたは M C H - 1 R をコードしない発現ベクターを含む同一細胞系がコントロールとなり得る。

#### 【 0 0 4 9 】

機能的アッセイは、各化合物を単独でまたは各種化合物を含む調製物を用いて実施され得る。1 つ以上の化合物が M C H - 1 R 活性に影響を与えるように複数の化合物を含む調製物を化合物の小群に分けて、M C H - 1 R 活性に影響を与える化合物を同定することができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 0 】

M C H - 1 R 活性の調節

M C H - 1 R アンタゴニストは、M C H - 1 R 活性を更に研究するための道具として、患者に有利な効果を与えるための物質としての用途を含めた各種用途を有する。M C H - 1 R アンタゴニストの有利な効果には、患者において体重減少、ガン（例えば、結腸癌または乳癌）治療、疼痛緩和、糖尿病治療、ストレス緩和及び性機能不全治療の1つ以上の達成が含まれる。

## 【 0 0 5 1 】

患者は哺乳動物、好ましくはヒトである。患者が必ずしも病気または疾患を有している必要はない。患者には、予防的に治療されるもの及び病気または疾患を患っているものが含まれる。

10

## 【 0 0 5 2 】

過剰体重により、高血圧、糖尿病、異脂肪血症、心血管疾患、胆石、骨関節炎及び特定のガンを含めた各種疾患が引き起こされる。体重減少は、例えば前記病気の可能性を軽減するため、前記疾患の治療の一部として使用され得る。減量は、例えば食欲低下、代謝率の上昇、脂肪摂取の減量及び炭水化物要求の低下の1つ以上により達成され得る。

## 【 0 0 5 3 】

過体重患者には、ボディ・マス指数（B M I）の正常体重範囲の上限よりも約10%以上、20%以上、30%以上または50%以上多い体重を有する患者が含まれる。“正常”体重範囲は当業界で公知であり、患者の年令、身長及び身体タイプのような要因が考慮される

20

B M I は患者自身の身長 / 体重の比である。B M I は体重（k g）を身長（m）の二乗で割って計算することにより求められる。B M I の正常範囲は19 ~ 22である。

## 【 0 0 5 4 】

M C H - 1 R 調節化合物はキットとして提供され得る。前記キットは通常活性化合物を投与剤型で含む。剤型は、1日以上にわたり定期的に、例えば1日1 ~ 6回患者に投与したときに有利な効果を得ることができるよう十分量の活性化合物を含有している。好ましくは、キットは（例えば、肥満または過体重を治療するための）体重減少またはストレス緩和のための剤型の使用及び特定期間服用すべき剤型の量を指示する使用説明書をも含む。

30

## 【 0 0 5 5 】

治療のための投与

医薬投与に関するガイドラインは、いずれも援用により本明細書に含まれるとする R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 第18版, G e n n a r o 編, M a c k P u b l i s h i n g ( 1 9 9 0 年 ) 発行及び M o d e r n P h a r m a c e u t i c s , 第2版, B a n k e r 及び R h o d e s 編, M a r c e l D e k k e r , I n c . ( 1 9 9 0 年 ) に概説されている。

## 【 0 0 5 6 】

適当な官能基を有する M C H - 1 R 活性化合物は酸性塩または塩基性塩として製造され得る。（水または油に溶解または分散し得る生成物の形態の）医薬的に許容され得る塩には、例えば無機または有機の酸または塩基から形成されるような慣用の非毒性塩または第4級アンモニウム塩が含まれる。前記塩の例には、酸付加塩（例えば、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、硫酸水素塩、酪酸塩、クエン酸塩、ショウノウ酸塩、ショウノウスルホン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、ジグルコン酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、フマル酸塩、グルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、半硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサ酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシエタンスルホン酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、シュウサン塩、パモ酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、3 - フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシル酸塩及び

40

50

ウンデカン酸塩)及び塩基酸塩(例えば、アンモニウム塩、アルカリ金属塩(例:ナトリウム塩及びカリウム塩)、アルカリ土類金属塩(例:カルシウム塩及びマグネシウム塩)、有機塩基との塩(例:ジシクロヘキシルアミン塩、N-メチル-D-グルカミン)及びアミノ酸(例:アルギニン及びリシン)との塩)が含まれる。

#### 【0057】

MCH-1R 活性化合物は、経口、経鼻、注射及び経粘膜を含めた各種ルートにより投与され得る。懸濁液として経口投与される活性成分は製薬業界で公知の方法に従って製造され得、増量剤として微晶質セルロース、懸濁剤としてアルギン酸またはアルギン酸ナトリウム、増粘剤としてメチルセルロース及び矯味/矯臭剤を含み得る。即時放出性錠剤として、前記組成物は微晶質セルロース、リン酸ジカルシウム、スターチ、ステアリン酸マ

10

#### 【0058】

鼻エアゾールまたは吸入により投与するとき、前記組成物は製薬業界で公知の方法に従って製造され得る。ベンジルアルコールまたは他の好適な保存剤、バイオアビリティーを高めるための吸収促進剤、フルオロカーボンまたは他の可溶化/分散剤を使用して生理食塩溶液として製造され得る。

#### 【0059】

投与ルートには、静注(ボラス及び注入)、腹腔、皮下、場合により閉塞を加える局所、または筋肉内形態が含まれ得る。当業界の公知の注射溶液または懸濁液は、好適な非毒性で非経口的に許容され得る希釈剤または溶媒(例えば、マンニトール、1,3-ブタンジオール、水、リンゲル液または等張性塩化ナトリウム溶液)を含む。分散/湿潤及び懸濁剤には、無菌無刺激性固定油(例えば、合成モノ-またはジグリセリド)及び脂肪酸(例えば、オレイン酸)が含まれる。

20

#### 【0060】

座薬の形態で直腸投与する場合、好適な刺激性賦形剤(例えば、カカオ脂、合成グリセリドエステルまたはポリエチレングリコール)を使用する。前記賦形剤は常温で固体であるが薬物を放出するために直腸腔で液化及び/または溶解する。

#### 【0061】

治療のための好適に投与レジメは、患者の年令、体重、性別及び医学的状态;治療する状態の重篤度;投与ルート;患者の腎機能及び肝機能;及び使用する特定化合物を含めた当業界で公知の要因を考慮して設計され得る。

30

#### 【0062】

毒性なしに効果を与える範囲内の薬物の濃度を得る際の最適精度には、標的部位への薬物アベイラビリティの薬物動態に基づくレジメが必要である。このためには、薬物の分布、平衡及び消失を考慮する。成人患者の1日用量は0.01~1,000mgの範囲であると予想される。

#### 【実施例】

#### 【0063】

以下、本発明のさまざまな特徴を更に説明するために実施例を提示する。これらの実施例は本発明を実施するのに有用な方法も例示する。これらの実施例は本発明を限定するものではない。

40

#### 【0064】

実施例1:MCH-1R(R141H)、MCH-1R(R155A)、MCH-1R(316/EGFP)の構築

MCH-1R アンタゴニスト結合タンパク質をヒトMCH-1Rを改変することにより作成した。QuickChange 部位特異的突然変異誘発キット(カリフォルニア州ラホヤに所在のStratagene)を製造業者のプロトコルに従って用いて改変させた。簡単に説明すると、鋳型プラスミドを変性させ、変異オリゴプライマーをアニーリングする。その後、PfuTurbo DNAポリメラーゼの非鎖置換作用を用いて、プライマ

50

ーを延長し、ニックを入れた環状鎖に導入する。このステップを熱サイクリングにより繰り返す。反応の最後に、メチル化非変異親DNA鋳型をDpnIで消化し、環状ニックDNAを超コンピテントXL-1 Blue大腸菌細胞に形質転換し、変異プラスミドを修復、増幅させる。

【0065】

以下の変異プライマーの組合せを使用した。

【0066】

【化1】

R141H+: 5'-CCATGGCCATTGACCACTACCTGGCCACTGTCC-3' (配列番号9)

10

R141H-: 5'-GGACAGTGGCCAGGTAGTGGTCAATGGCCATGG-3' (配列番号10)

R155A+: 5'-CTCTTCCACGAAGTTCGCGAAGCCCTCTGTGGCC-3' (配列番号11)

R155A-: 5'-GGCCACAGAGGGCTTCGCGAACTTCGTGGAAGAG-3' (配列番号12)

Δ316/EGFP+:

20

5'-TTTGTGTACATCGTGCTCTGTGAGGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGG-3'

(配列番号13)

Δ316/EGFP-:

5'-CCCGGGCCCGCGGTACCGTCGACCTCACAGAGCACGATGTACAC

AAA-3' (配列番号14)

【0067】

以下の鋳型を使用した。

【0068】

30

【化2】

MCH-1R(R141H): pcDNA3/MCH-1R

MCH-1R(R155A): pcDNA3/MCH-1R

MCH-1R(Δ316/EGFP): pEGFP-N3-MCH-1R

【0069】

実施例2: MCH-1R(i2/MC4R)の構築

MCH-1R(i2/MC4R)をPCRベースの突然変異により作成した。生じたMCH-1Rアンタゴニスト結合タンパク質はTM3とTM4の間に以下のアミノ酸配列を含む: . . . D R Y F T I F Y A L Q Y H N I M T V K R A T L V I C L (配列番号15)。元のMCH-1R配列の代わりに挿入した新しい配列に下線を付した。

40

【0070】

実施例3: ラジオリガンド結合の分析

膜結合アッセイを、一時的にトランスフェクトしたHEK293-AEQ17細胞から作成した膜調製物を用いて実施した。HEK293-AEQ17細胞(トランスフェクションの前日に3~5×10<sup>6</sup>細胞をT75フラスコで平板培養した)に、Lipofectamine2000(メリーランド州ロックビルに所在のGibco BRL)を製造業者の指示に従って用いてプラスミドDNAを一時的にトランスフェクトした。2日後、膜を低張性溶菌により作成し、液体窒素中で凍結させ、-80で保存した。

50

## 【0071】

シンチレーション近接アッセイ (SPA) を用いて、受容体含有膜に対する [ $^{125}$ I] Phe<sup>13</sup> Tyr<sup>19</sup> - MCH (~2000 Ci/ミリモル; マサチューセッツ州ボストンに所在の NEN Life Sciences) の特異的結合を測定した。SPA を 96 ウェル Opti Plates (コネティカット州メリデンに所在の Packard) においてコムギ胚凝集素 - ポリビニルトルエンビーズ (イリノイ州アーリントンハイツに所在の Amersham Corp.) を用いて実施した。各ウェルには、SPA ビーズ (0.25 mg)、膜タンパク質 (2~4  $\mu$ g) 及び結合緩衝液 (200  $\mu$ l) を含めた。結合緩衝液は 50 mM トリス HCl (pH 7.4)、8 mM MgCl<sub>2</sub>、12% グリセロール、0.1% BSA (ミズーリ州セントルイスに所在の Sigma) 及びプロテアーゼ阻害剤 [4  $\mu$ g/ml のロイペプチン (ミズーリ州セントルイスに所在の Sigma)、40  $\mu$ g/ml のバシトラシン (ミズーリ州セントルイスに所在の Sigma)、5  $\mu$ g/ml のアプロチニン (インディアナ州インディアナポリスに所在の Roche Molecular Biochem.) 及び 100  $\mu$ M の AEB SF (インディアナ州インディアナポリスに所在の Roche Molecular Biochem.)] を含んでいた。

## 【0072】

アッセイは膜調節物に対して最適化した。HEK293 - AEQ17 / MCH - 1R 膜の場合には 1  $\mu$ g / ウェルの膜で > 6 x 特異的結合ウィンドーを与えた。特異的結合は、総結合と 500 nM の非標識 MCH の存在下で実施した非特異的結合の差として定義される。ビーズを膜で 20 分間被覆し、96 ウェルに分配し、DMSO 中に異なる濃度で含まれる試験化合物 (最終 DMSO 濃度は 1~2%) を添加した後、ウェルに 25 nCi の [ $^{125}$ I] Phe<sup>13</sup> Tyr<sup>19</sup> - MCH を添加した。室温で 3 時間平衡後、プレートを Top Count (コネティカット州メリデンに所在の Packard) で測定した。IC<sub>50</sub> を Prism 3.0 (カリフォルニア州サンジェゴに所在の Graph Pad Software) を用いて計算した。

## 【0073】

[ $^{125}$ I] Phe<sup>13</sup> Tyr<sup>19</sup> - MCH アゴニスト結合研究の結果を図 1 及び 2 に示す。図 1 は MCH - 1R (R141H) 及び MCH - 1R (R155A) に対するアゴニスト結合を示す。図 2 は MCH - 1R (316 / EGFP) に対するアゴニスト結合を示す。

## 【0074】

実施例 4：機能的活性化分析

MCH - 1R アンタゴニスト結合タンパク質の機能的活性化をエクオリンアッセイで調べた。タンパク質を安定なリポーター細胞系 HEK293 - AEQ17 に導入した。前記細胞系では細胞内カルシウムの可動性をカルシウム結合時のクラゲエクオリンのバイオルミネセンスにより検出され得る。

## 【0075】

バイオルミネセンスは Luminoskan RT ルミノメーター (メリーランド州ゲザーズバーグに所在の Labsystems Inc.) を用いて検出した。HEK293 - AEQ17 細胞を、10% ウシ胎児血清、500 mg/ml G418、25 mM Hepes を補充した D-MEM / 高グルコース培地 (メリーランド州ロックビルに所在の Life Technologies) において 37、湿潤雰囲気中 5% CO<sub>2</sub> で維持した。

## 【0076】

HEK293 - AEQ17 細胞 (トランスフェクションの前日に 3~5 x 10<sup>6</sup> 細胞を T75 フラスコで平板培養した) に、LipofectAmine 2000 (メリーランド州ロックビルに所在の Gibco BRL) を製造業者の指示に従って用いて MCH - 1R アンタゴニスト結合タンパク質プラスミドを一時的にトランスフェクトした。2 日後、細胞を還元条件 (ECB 緩衝液中 300  $\mu$ M 還元グルタチオン: 140 mM NaC

10

細胞を回収し、ECB培地で1回洗浄し、500,000細胞/mlに再懸濁した。次いで、細胞懸濁液100ml ( $5 \times 10^4$ 細胞に対応)を96ウェル試験プレートに注入し、積分発光(integrated light emission)を30秒間0.5秒単位で記録した。次いで、溶菌緩衝液(0.1% 最終トリトンX-100濃度)(20 $\mu$ l)を注入し、積分発光を10秒間0.5秒単位で記録した。各ウェルの“分画応答(fractional response)”値は、トリトンX-100溶菌応答を含めた総積分ルミセセンスに対する初期投与に対する積分応答の比を求めることにより計算した。

MCH-1R アントゴニスト結合タンパク質の MCH-1R アントゴニストへの結合能力は一般的方法及び本明細書に記載されている方法を用いて評価することができる。例えば、標識アントゴニストを使用するように上記実施例 3 に記載されている方法を修飾することができる。

MCH-1Rアンタゴニストの例は、援用により本明細書に含まれるとする2001年8月8日に出願された米国特許出願第60/310,928号明細書に記載されている。ペプチドアンタゴニストには、次の構造（“\*”は環化（S-S）を示す）を有する化合物が含まれる。

【化 3】

Ac-Gva-Cys-Met-Leu-D-Nle-Arg-Val-Tyr-Ava-Ava-Cys- NH<sub>2</sub> (配列番号17).

“ G v a ” はデス - アミノ - アルギニン ( 5 - グアニジノ吉草酸としても公知 ) を表す。  
“ A v a ” は 5 - アミノ吉草酸を表す。 D - N l e は D - ノルロイシンを表す。

配列番号 1 ~ 8 の配列を以下に示す。

【 0 0 8 3 】

## 【化 4】

*MCH-1R(R141H)* (配列番号 1):

MDLEASLLPTGPNASNTSDGPDNLTSAGSPRTGSGSYINIIMPSVFGTICLLGIIG  
NSTVIFAVVKKSKLHWCNNVPDIFIINLSVVDLLFLLGMPFMIHQLMGNGVWH  
FGETMCTLITAMDANSQFTSTYILTAMAIDHYLATVHPISSTKFRKPSVATLVI  
CLLWALSFSITPVWLYARLIPFPGGAVGCGIRLPNPDTDLYWFTLYQFFLAFA  
LPFVVITAAYVRILQRMTSSVAPASQRSIRLRTKRVTRTAIAICLVFFVCWAPY  
YVLQLTQLSISRPTLTFVYLYNAAISLGYANSCLNPFVYIVLCETFRKRLVLSV  
KPAAQGQLRAVSNAQTADEERTESKGT

10

*MCH-1R(R155A)* (配列番号 2):

MDLEASLLPTGPNASNTSDGPDNLTSAGSPRTGSGSYINIIMPSVFGTICLLGIIG  
NSTVIFAVVKKSKLHWCNNVPDIFIINLSVVDLLFLLGMPFMIHQLMGNGVWH  
FGETMCTLITAMDANSQFTSTYILTAMAIDRYLATVHPISSTKFAKPSVATLVI  
CLLWALSFSITPVWLYARLIPFPGGAVGCGIRLPNPDTDLYWFTLYQFFLAFA  
LPFVVITAAYVRILQRMTSSVAPASQRSIRLRTKRVTRTAIAICLVFFVCWAPY  
YVLQLTQLSISRPTLTFVYLYNAAISLGYANSCLNPFVYIVLCETFRKRLVLSV  
KPAAQGQLRAVSNAQTADEERTESKGT

20

*MCH-1R(i2/MC4R)* (配列番号 3)

MDLEASLLPTGPNASNTSDGPDNLTSAGSPRTGSGSYINIIMPSVFGTICLLGIIG  
NSTVIFAVVKKSKLHWCNNVPDIFIINLSVVDLLFLLGMPFMIHQLMGNGVWH  
FGETMCTLITAMDANSQFTSTYILTAMAIDRY**FTIFYALQYHNIMTVKR**  
ATLVICLLWALSFSITPVWLYARLIPFPGGAVGCGIRLPNPDTDLYWFTLYQFF  
LAFALPFVVITAAYVRILQRMTSSVAPASQRSIRLRTKRVTRTAIAICLVFFVC  
WAPYYVLQLTQLSISRPTLTFVYLYNAAISLGYANSCLNPFVYIVLCETFRKRL  
VLSVKPAAQGQLRAVSNAQTADEERTESKGT

30

*MCH-1R( $\Delta$ 316/EGFP)* (配列番号 4)

MDLEASLLPTGPNASNTSDGPDNLTSAGSPRTGSGSYINIIMPSVFGTICLLGIIG  
NSTVIFAVVKKSKLHWCNNVPDIFIINLSVVDLLFLLGMPFMIHQLMGNGVWH  
FGETMCTLITAMDANSQFTSTYILTAMAIDRYLATVHPISSTKFRKPSVATLVI  
CLLWALSFSITPVWLYARLIPFPGGAVGCGIRLPNPDTDLYWFTLYQFFLAFA  
LPFVVITAAYVRILQRMTSSVAPASQRSIRLRTKRVTRTAIAICLVFFVCWAPY  
YVLQLTQLSISRPTLTFVYLYNAAISLGYANSCLNPFVYIVLCEVDGTAGPGSI  
ATMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTT

40

GKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKD  
DGNKYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMA  
DKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSAL  
SKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK

【 0 0 8 4 】

M C H - 1 R ( R 1 4 1 H ) ( 配 列 番 号 5 ) : スタートコドン、ストップコドン及び変異ヌクレオチドが強調されている。

【 0 0 8 5 】

10

【 化 5 】

ATGGACCTGGAAGCCTCGCTGCTGCCCCACTGGTCCCAATGCCAGCAACAC  
CTCTGATGGCCCCGATAACCTCACTTCGGCAGGATCACCTCCTCGCACGG  
GGAGCATCTCCTACATCAACATCATCATGCCTTCGGTGTTCGGCACCATCT  
GCCTCCTGGGCATCATCGGGAACCTCCACGGTCATCTTCGCGGTCGTGAAG  
AAGTCCAAGCTGCACTGGTGCAACAACGTCCCCGACATCTTCATCATCAA  
CCTCTCGGTAGTAGATCTCCTCTTTCTCCTGGGCATGCCCTTCATGATCCA  
CCAGCTCATGGGCAATGGGGTGTGGCACTTTGGGGAGACCATGTGCACCC  
TCATCACGGCCATGGATGCCAATAGTCAGTTCACCAGCACCTACATCCTG  
ACCGCCATGGCCATTGACCACTACCTGGCCACTGTCCACCCCATCTCTTCC  
ACGAAGTTCGGAAGCCCTCTGTGGCCACCCTGGTGATCTGCCTCCTGTGG  
GCCCTCTCCTTCATCAGCATCACCCCTGTGTGGCTGTATGCCAGACTCATC  
CCCTTCCCAGGAGGTGCAGTGGGCTGCGGCATACGCCTGCCCAACCCAGA  
CACTGACCTCTACTGGTTCACCCTGTACCAGTTTTTCCTGGCCTTTGCCCTG  
CCTTTTGTGGTCATCACAGCCGCATACGTGAGGATCCTGCAGCGCATGAC  
GTCCTCAGTGGCCCCCGCCTCCCAGCGCAGCATCCGGCTGCGGACAAAGA  
GGGTGACCCGCACAGCCATCGCCATCTGTCTGGTCTTCTTTGTGTGCTGGG  
CACCTACTATGTGCTACAGCTGACCCAGTTGTCCATCAGCCGCCCGACCC  
TCACCTTTGTCTACTTATAACAATGCGGCCATCAGCTTGGGCTATGCCAACA  
GCTGCCTCAACCCCTTTGTGTACATCGTGCTCTGTGAGACGTTCCGCAAAC  
GCTTGGTCCTGTTCGGTGAAGCCTGCAGCCCAGGGGCAGCTTCGCGCTGTC  
AGCAACGCTCAGACGGCTGACGAGGAGAGGACAGAAAGCAAAGGCACCT  
GATAC

20

30

【 0 0 8 6 】

M C H - 1 R ( R 1 4 1 A ) ( 配 列 番 号 6 ) : スタートコドン、ストップコドン及び変異ヌクレオチドが強調されている。核酸配列 ( スタートコドン、ストップコドン及び変異ヌクレオチドが強調されている。

40

【 0 0 8 7 】

【 化 6 】

ATGGACCTGGAAGCCTCGCTGCTGCCCCACTGGTCCCAATGCCAGCAACAC  
CTCTGATGGCCCCGATAACCTCACTTCGGCAGGATCACCTCCTCGCACGG



GGAGCATCTCCTACATCAACATCATCATGCCTTCGGTGTTCGGCACCATCT  
 GCCTCCTGGGCATCATCGGGAACCTCCACGGTCATCTTCGCGGTCGTGAAG  
 AAGTCCAAGCTGCACTGGTGCAACAACGTCCCCGACATCTTCATCATCAA  
 CCTCTCGGTAGTAGATCTCCTCTTTCTCCTGGGCATGCCCTTCATGATCCA  
 CCAGCTCATGGGCAATGGGGTGTGGCACTTTGGGGAGACCATGTGCACCC  
 TCATCACGGCCATGGATGCCAATAGTCAGTTCACCAGCACCTACATCCTG  
 ACCGCCATGGCCATTGACCGCTACCTGGCCACTGTCCACCCCATCTCTTCC  
 ACGAAGTTCGCGAAGCCCTCTGTGGCCACCCTGGTGATCTGCCTCCTGTG  
 GGCCCTCTCCTTCATCAGCATCACCCCTGTGTGGCTGTATGCCAGACTCAT  
 CCCCTTCCCAGGAGGTGCAGTGGGCTGCGGCATACGCCTGCCCAACCCAG  
 AACTGACCTCTACTGGTTCACCCTGTACCAGTTTTTCCTGGCCTTTGCCCT  
 GCCTTTTGTGGTCATCACAGCCGCATACGTGAGGATCCTGCAGCGCATGA  
 CGTCCTCAGTGGCCCCCGCCTCCCAGCGCAGCATCCGGCTGCGGACAAAG  
 AGGGTGACCCGCACAGCCATCGCCATCTGTCTGGTCTTCTTTGTGTGCTGG  
 GCACCCTACTATGTGCTACAGCTGACCCAGTTGTCCATCAGCCGCCCCGAC  
 CCTCACCTTTGTCTACTTATACAATGCGGCCATCAGCTTGGGCTATGCCAA  
 CAGCTGCCTCAACCCCTTTGTGTACATCGTGCTCTGTGAGACGTTCCGCAA  
 ACGCTTGGTCTGTGCGGTGAAGCCTGCAGCCCAGGGGCAGCTTCGCGCTG  
 TCAGCAACGCTCAGACGGCTGACGAGGAGAGGACAGAAAGCAAAGGCAC  
 CTGATAC

10

20

MCH-1R (i2/MC4R) (配列番号7) : スタートコドン、ストップコドン及び変異ヌクレオチドが強調されている。

【0088】

【化7】

30

**ATGGACCTGGAAGCCTCGCTGCTGCCCCACTGGTCCCAATGCCAGCAACAC**  
**CTCTGATGGCCCCGATAACCTCACTTCGGCAGGATCACCTCCTCGCACGG**  
 GGAGCATCTCCTACATCAACATCATCATGCCTTCGGTGTTCGGCACCATCT  
 GCCTCCTGGGCATCATCGGGAACCTCCACGGTCATCTTCGCGGTCGTGAAG  
 AAGTCCAAGCTGCACTGGTGCAACAACGTCCCCGACATCTTCATCATCAA  
 CCTCTCGGTAGTAGATCTCCTCTTTCTCCTGGGCATGCCCTTCATGATCCA  
 CCAGCTCATGGGCAATGGGGTGTGGCACTTTGGGGAGACCATGTGCACCC  
 TCATCACGGCCATGGATGCCAATAGTCAGTTCACCAGCACCTACATCCTG  
 ACCGCCATGGCCATTGACCGCTAC**TTTACTATCTTCTATGCTCTCCAGTACC**  
**ATAACATTATGACAGTTAAGCGGGGCCACCCTGGTGATCTGCCTCCTGTGGG**  
 CCCTCTCCTTCATCAGCATCACCCCTGTGTGGCTGTATGCCAGACTCATCC  
 CCTTCCCAGGAGGTGCAGTGGGCTGCGGCATACGCCTGCCCAACCCAGAC

40

ACTGACCTCTACTGGTTCACCCTGTACCAGTTTTTCCTGGCCTTTGCCCTGC  
CTTTTGTGGTCATCACAGCCGCATACGTGAGGATCCTGCAGCGCATGACG  
TCCTCAGTGGCCCCCGCCTCCCAGCGCAGCATCCGGCTGCGGACAAAGAG  
GGTGACCCGCACAGCCATCGCCATCTGTCTGGTCTTCTTTGTGTGCTGGGC  
ACCCTACTATGTGCTACAGCTGACCCAGTTGTCCATCAGCCGCCCCGACCCT  
CACCTTTGTCTACTTATAACAATGCGGCCATCAGCTTGGGCTATGCCAACAG  
CTGCCTCAACCCCTTTGTGTACATCGTGCTCTGTGAGACGTTCCGCAAACG  
CTTGGTCCTGTCGGTGAAGCCTGCAGCCCAGGGGCAGCTTCGCGCTGTCA  
GCAACGCTCAGACGGCTGACGAGGAGAGGACAGAAAGCAAAGGCACCTG  
ATAC

10

## 【 0 0 8 9 】

MCH - 1 R ( 3 1 6 / E G F P ) ( 配列番号 8 ) : MCH - 1 R 及び E G F P に対するスタートコドン及びストップコドンが強調されている。12アミノ酸リンカー配列を示す。

## 【 0 0 9 0 】

## 【 化 8 】

ATGGACCTGGAAGCCTCGCTGCTGCCCACTGGTCCCAATGCCAGCAACAC  
CTCTGATGGCCCCGATAACCTCACTTCGGCAGGATCACCTCCTCGCACGG  
GGAGCATCTCCTACATCAACATCATCATGCCTTCGGTGTTCGGCACCATCT  
GCCTCCTGGGCATCATCGGGAACCTCCACGGTCATCTTCGCGGTCGTGAAG  
AAGTCCAAGCTGCACTGGTGCAACAACGTCCCCGACATCTTCATCATCAA  
CCTCTCGGTAGTAGATCTCCTCTTTCTCCTGGGCATGCCCTTCATGATCCA  
CCAGCTCATGGGCAATGGGGTGTGGCACTTTGGGGAGACCATGTGCACCC  
TCATCACGGCCATGGATGCCAATAGTCAGTTCACCAGCACCTACATCCTG  
ACCGCCATGGCCATTGACCGCTACCTGGCCACTGTCCACCCCATCTCTTCC  
ACGAAGTTCCGGAAGCCCTCTGTGGCCACCCTGGTGATCTGCCTCCTGTGG  
GCCCTCTCCTTCATCAGCATCACCCCTGTGTGGCTGTATGCCAGACTCATC  
CCCTTCCCAGGAGGTGCAGTGGGCTGCGGCATACGCCTGCCCAACCCAGA  
CACTGACCTCTACTGGTTCACCCTGTACCAGTTTTTCCTGGCCTTTGCCCTG  
CCTTTTGTGGTCATCACAGCCGCATACGTGAGGATCCTGCAGCGCATGAC  
GTCCTCAGTGGCCCCCGCCTCCCAGCGCAGCATCCGGCTGCGGACAAAGA  
GGGTGACCCGCACAGCCATCGCCATCTGTCTGGTCTTCTTTGTGTGCTGGG  
CACCTACTATGTGCTACAGCTGACCCAGTTGTCCATCAGCCGCCCCGACCC  
TCACCTTTGTCTACTTATAACAATGCGGCCATCAGCTTGGGCTATGCCAACA  
GCTGCCTCAACCCCTTTGTGTACATCGTGCTCTGTGAGgtcgacgggtaccgggccc  
gggatccatgccaccATGGTG AGCAAGGGCG AGGAGCTGTT CACCGGGGTG  
GTGCCCATCC TGGTCGAGCT GGACGGCGAC GTAAACGGCC

20

30

40

ACAAGTTCAG CGTGTCCGGC GAGGGCGAGG GCGATGCCAC  
 CTACGGCAAG CTGACCCTGA AGTTCATCTG CACCACCGGC  
 AAGCTGCCCCG TGCCCTGGCC CACCCTCGTG ACCACCCTGA  
 CCTACGGCGT GCAGTGCTTC AGCCGCTACC CCGACCACAT  
 GAAGCAGCAC GACTTCTTCA AGTCCGCCAT GCCCGAAGGC  
 TACGTCCAGG AGCGCACCAT CTTCTTCAAG GACGACGGCA  
 ACTACAAGAC CCGCGCCGAG GTGAAGTTCG AGGGCGACAC  
 CCTGGTGAAC CGCATCGAGC TGAAGGGCAT CGACTTCAAG  
 GAGGACGGCA ACATCCTGGG GCACAAGCTG GAGTACAACT  
 ACAACAGCCA CAACGTCTAT ATCATGGCCG ACAAGCAGAA  
 GAACGGCATC AAGGTGAACT TCAAGATCCG CCACAACATC  
 GAGGACGGCA GCGTGCAGCT CGCCGACCAC TACCAGCAGA  
 ACACCCCCAT CGGCGACGGC CCCGTGCTGC TGCCCGACAA  
 CCACTACCTG AGCACCCAGT CCGCCCTGAG CAAAGACCCC  
 AACGAGAAGC GCGATCACAT GGTCCTGCTG GAGTTCGTGA  
 CCGCCGCCGG GATCACTCTC GGCATGGACG AGCTGTACAA GTAA

10

20

## 【 0 0 9 1 】

他の実施態様も上記した請求の範囲の範囲内である。幾つかの実施態様を例示乃至説明してきたが、本発明の趣旨及び範囲を逸脱しない範囲で各種変更をなし得る。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 9 2 】

【 図 1 】 MCH - 1 R ( R 1 4 1 H ) 及び MCH - 1 R ( R 1 5 5 A ) に対する [ <sup>1 2 5</sup> I ] Phe<sup>1 3</sup> Tyr<sup>1 9</sup> - MCH 結合を示す。

【 図 2 】 MCH - 1 R ( 3 1 6 / E G F P ) に対する [ <sup>1 2 5</sup> I ] Phe<sup>1 3</sup> Tyr<sup>1 9</sup> - MCH 結合を示す。

30

【 図 3 】 MCH による MCH - 1 R ( R 1 4 1 H ) の機能的活性化の欠乏を示す。機能的活性化は細胞内カルシウムの可動性を測定することにより調べた。

【 図 4 】 MCH による MCH - 1 R ( R 1 5 5 A ) の機能的活性化の欠乏を示す。機能的活性化は細胞内カルシウムの可動性を測定することにより調べた。

【 図 5 】 MCH による MCH - 1 R ( i 2 M C 4 R ) の機能的活性化の欠乏を示す。機能的活性化は細胞内カルシウムの可動性を測定することにより調べた。

【 図 6 】 MCH による MCH - 1 R ( 3 1 6 / E G F P ) の機能的活性化の欠乏を示す。機能的活性化は細胞内カルシウムの可動性を測定することにより調べた。

## 【 配列表 】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Merck &amp; Co., Inc.

<120> MELANIN-CONCENTRATING HORMONE RECEPTOR  
ANTAGONIST BINDING PROTEIN

&lt;130&gt; 20782 PCT

&lt;150&gt; 60/325,129

&lt;151&gt; 2001-09-26

&lt;160&gt; 17

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 353

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; MCH-1R antagonist binding protein

&lt;400&gt; 1

```

Met Asp Leu Glu Ala Ser Leu Leu Pro Thr Gly Pro Asn Ala Ser Asn
 1           5           10           15
Thr Ser Asp Gly Pro Asp Asn Leu Thr Ser Ala Gly Ser Pro Pro Arg
 20           25           30
Thr Gly Ser Ile Ser Tyr Ile Asn Ile Ile Met Pro Ser Val Phe Gly
 35           40           45
Thr Ile Cys Leu Leu Gly Ile Ile Gly Asn Ser Thr Val Ile Phe Ala
 50           55           60
Val Val Lys Lys Ser Lys Leu His Trp Cys Asn Asn Val Pro Asp Ile
 65           70           75           80
Phe Ile Ile Asn Leu Ser Val Val Asp Leu Leu Phe Leu Leu Gly Met
 85           90           95
Pro Phe Met Ile His Gln Leu Met Gly Asn Gly Val Trp His Phe Gly
100           105           110
Glu Thr Met Cys Thr Leu Ile Thr Ala Met Asp Ala Asn Ser Gln Phe
115           120           125
Thr Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Ala Met Ala Ile Asp His Tyr Leu Ala
130           135           140
Thr Val His Pro Ile Ser Ser Thr Lys Phe Arg Lys Pro Ser Val Ala
145           150           155           160
Thr Leu Val Ile Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ser Phe Ile Ser Ile Thr
165           170           175
Pro Val Trp Leu Tyr Ala Arg Leu Ile Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val
180           185           190
Gly Cys Gly Ile Arg Leu Pro Asn Pro Asp Thr Asp Leu Tyr Trp Phe
195           200           205
Thr Leu Tyr Gln Phe Phe Leu Ala Phe Ala Leu Pro Phe Val Val Ile
210           215           220
Thr Ala Ala Tyr Val Arg Ile Leu Gln Arg Met Thr Ser Ser Val Ala
225           230           235           240

```

10

20

30

```

Pro Ala Ser Gln Arg Ser Ile Arg Leu Arg Thr Lys Arg Val Thr Arg
      245      250      255
Thr Ala Ile Ala Ile Cys Leu Val Phe Phe Val Cys Trp Ala Pro Tyr
      260      265      270
Tyr Val Leu Gln Leu Thr Gln Leu Ser Ile Ser Arg Pro Thr Leu Thr
      275      280      285
Phe Val Tyr Leu Tyr Asn Ala Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Ala Asn Ser
      290      295      300
Cys Leu Asn Pro Phe Val Tyr Ile Val Leu Cys Glu Thr Phe Arg Lys
      305      310      315      320
Arg Leu Val Leu Ser Val Lys Pro Ala Ala Gln Gly Gln Leu Arg Ala
      325      330      335
Val Ser Asn Ala Gln Thr Ala Asp Glu Glu Arg Thr Glu Ser Lys Gly
      340      345      350
Thr

```

10

```

<210> 2
<211> 353
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> MCH-1R antagonist binding protein

```

```

<400> 2
Met Asp Leu Glu Ala Ser Leu Leu Pro Thr Gly Pro Asn Ala Ser Asn
 1      5      10      15
Thr Ser Asp Gly Pro Asp Asn Leu Thr Ser Ala Gly Ser Pro Pro Arg
      20      25      30
Thr Gly Ser Ile Ser Tyr Ile Asn Ile Ile Met Pro Ser Val Phe Gly
      35      40      45
Thr Ile Cys Leu Leu Gly Ile Ile Gly Asn Ser Thr Val Ile Phe Ala
      50      55      60
Val Val Lys Lys Ser Lys Leu His Trp Cys Asn Asn Val Pro Asp Ile
      65      70      75      80
Phe Ile Ile Asn Leu Ser Val Val Asp Leu Leu Phe Leu Leu Gly Met
      85      90      95
Pro Phe Met Ile His Gln Leu Met Gly Asn Gly Val Trp His Phe Gly
      100      105      110
Glu Thr Met Cys Thr Leu Ile Thr Ala Met Asp Ala Asn Ser Gln Phe
      115      120      125
Thr Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Ala Met Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala
      130      135      140
Thr Val His Pro Ile Ser Ser Thr Lys Phe Ala Lys Pro Ser Val Ala
      145      150      155      160
Thr Leu Val Ile Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ser Phe Ile Ser Ile Thr
      165      170      175
Pro Val Trp Leu Tyr Ala Arg Leu Ile Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val
      180      185      190
Gly Cys Gly Ile Arg Leu Pro Asn Pro Asp Thr Asp Leu Tyr Trp Phe
      195      200      205
Thr Leu Tyr Gln Phe Phe Leu Ala Phe Ala Leu Pro Phe Val Val Ile
      210      215      220
Thr Ala Ala Tyr Val Arg Ile Leu Gln Arg Met Thr Ser Ser Val Ala
      225      230      235      240

```

20

30

```

Pro Ala Ser Gln Arg Ser Ile Arg Leu Arg Thr Lys Arg Val Thr Arg
      245      250      255
Thr Ala Ile Ala Ile Cys Leu Val Phe Phe Val Cys Trp Ala Pro Tyr
      260      265      270
Tyr Val Leu Gln Leu Thr Gln Leu Ser Ile Ser Arg Pro Thr Leu Thr
      275      280      285
Phe Val Tyr Leu Tyr Asn Ala Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Ala Asn Ser
      290      295      300
Cys Leu Asn Pro Phe Val Tyr Ile Val Leu Cys Glu Thr Phe Arg Lys
      305      310      315      320
Arg Leu Val Leu Ser Val Lys Pro Ala Ala Gln Gly Gln Leu Arg Ala
      325      330      335
Val Ser Asn Ala Gln Thr Ala Asp Glu Glu Arg Thr Glu Ser Lys Gly
      340      345      350
Thr

```

10

```

<210> 3
<211> 353
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> MCH-1R antagonist binding protein

```

```

<400> 3
Met Asp Leu Glu Ala Ser Leu Leu Pro Thr Gly Pro Asn Ala Ser Asn
 1      5      10      15
Thr Ser Asp Gly Pro Asp Asn Leu Thr Ser Ala Gly Ser Pro Pro Arg
      20      25      30
Thr Gly Ser Ile Ser Tyr Ile Asn Ile Ile Met Pro Ser Val Phe Gly
      35      40      45
Thr Ile Cys Leu Leu Gly Ile Ile Gly Asn Ser Thr Val Ile Phe Ala
      50      55      60
Val Val Lys Lys Ser Lys Leu His Trp Cys Asn Asn Val Pro Asp Ile
      65      70      75      80
Phe Ile Ile Asn Leu Ser Val Val Asp Leu Leu Phe Leu Leu Gly Met
      85      90      95
Pro Phe Met Ile His Gln Leu Met Gly Asn Gly Val Trp His Phe Gly
      100      105      110
Glu Thr Met Cys Thr Leu Ile Thr Ala Met Asp Ala Asn Ser Gln Phe
      115      120      125
Thr Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Ala Met Ala Ile Asp Arg Tyr Phe Thr
      130      135      140
Ile Phe Tyr Ala Leu Gln Tyr His Asn Ile Met Thr Val Lys Arg Ala
      145      150      155      160
Thr Leu Val Ile Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ser Phe Ile Ser Ile Thr
      165      170      175
Pro Val Trp Leu Tyr Ala Arg Leu Ile Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val
      180      185      190
Gly Cys Gly Ile Arg Leu Pro Asn Pro Asp Thr Asp Leu Tyr Trp Phe
      195      200      205
Thr Leu Tyr Gln Phe Phe Leu Ala Phe Ala Leu Pro Phe Val Val Ile
      210      215      220
Thr Ala Ala Tyr Val Arg Ile Leu Gln Arg Met Thr Ser Ser Val Ala
      225      230      235      240

```

20

30

Pro Ala Ser Gln Arg Ser Ile Arg Leu Arg Thr Lys Arg Val Thr Arg  
 245 250 255  
 Thr Ala Ile Ala Ile Cys Leu Val Phe Phe Val Cys Trp Ala Pro Tyr  
 260 265 270  
 Tyr Val Leu Gln Leu Thr Gln Leu Ser Ile Ser Arg Pro Thr Leu Thr  
 275 280 285  
 Phe Val Tyr Leu Tyr Asn Ala Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Ala Asn Ser  
 290 295 300  
 Cys Leu Asn Pro Phe Val Tyr Ile Val Leu Cys Glu Thr Phe Arg Lys  
 305 310 315 320  
 Arg Leu Val Leu Ser Val Lys Pro Ala Ala Gln Gly Gln Leu Arg Ala  
 325 330 335  
 Val Ser Asn Ala Gln Thr Ala Asp Glu Glu Arg Thr Glu Ser Lys Gly  
 340 345 350  
 Thr

10

<210> 4  
 <211> 567  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> MCH-1R antagonist binding protein

<400> 4  
 Met Asp Leu Glu Ala Ser Leu Leu Pro Thr Gly Pro Asn Ala Ser Asn  
 1 5 10 15  
 Thr Ser Asp Gly Pro Asp Asn Leu Thr Ser Ala Gly Ser Pro Pro Arg  
 20 25 30  
 Thr Gly Ser Ile Ser Tyr Ile Asn Ile Ile Met Pro Ser Val Phe Gly  
 35 40 45  
 Thr Ile Cys Leu Leu Gly Ile Ile Gly Asn Ser Thr Val Ile Phe Ala  
 50 55 60  
 Val Val Lys Lys Ser Lys Leu His Trp Cys Asn Asn Val Pro Asp Ile  
 65 70 75 80  
 Phe Ile Ile Asn Leu Ser Val Val Asp Leu Leu Phe Leu Leu Gly Met  
 85 90 95  
 Pro Phe Met Ile His Gln Leu Met Gly Asn Gly Val Trp His Phe Gly  
 100 105 110  
 Glu Thr Met Cys Thr Leu Ile Thr Ala Met Asp Ala Asn Ser Gln Phe  
 115 120 125  
 Thr Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Ala Met Ala Ile Asp Arg Tyr Leu Ala  
 130 135 140  
 Thr Val His Pro Ile Ser Ser Thr Lys Phe Arg Lys Pro Ser Val Ala  
 145 150 155 160  
 Thr Leu Val Ile Cys Leu Leu Trp Ala Leu Ser Phe Ile Ser Ile Thr  
 165 170 175  
 Pro Val Trp Leu Tyr Ala Arg Leu Ile Pro Phe Pro Gly Gly Ala Val  
 180 185 190  
 Gly Cys Gly Ile Arg Leu Pro Asn Pro Asp Thr Asp Leu Tyr Trp Phe  
 195 200 205  
 Thr Leu Tyr Gln Phe Phe Leu Ala Phe Ala Leu Pro Phe Val Val Ile  
 210 215 220  
 Thr Ala Ala Tyr Val Arg Ile Leu Gln Arg Met Thr Ser Ser Val Ala  
 225 230 235 240

20

30

20

30

```
<400> 5
atggacctgg aagcctcgct gctgccact ggtcccaatg ccagcaacac ctctgatggc      60
ccgataacc tcacttcggc aggatcacct cctcgcaagg ggagcatctc ctacatcaac      120
atcatcatgc ctctgggtgt cggcaccatc tgcttcctgg gcatcatcgg gaactccacg      180
```



```

gtcatcttcg cggtcgtgaa gaagccaag ctgcactggt gcaacaacgt ccccgacatc 240
ttcatcatca acctctcggt agtagatctc ctctttctcc tgggcatgcc ctcatgatc 300
caccagctca tgggcaatgg ggtgtggcac tttggggaga ccatgtgcac cctcatcacg 360
gcatatgatg ccaatagtca gttcaccagc acctacatcc tgaccgccat ggccattgac 420
cactacctgg ccactgtcca ccccatctct tccacgaagt tcgggaagcc ctctgtggcc 480
acctgttgta tctgctctct gtgggcccct tccttcacat gcatcacccc tgtgtggctg 540
tatgccagac tcaccccctt cccaggaggt gcagtgggct gcggcatacg cctgcccac 600
ccagacactg acctctactg gttcacccctg taccagtttt tcttggcctt tgccctgcct 660
tttgtgtgca tcacagccgc atacgtgagg atcctgcagc gcatgacgtc ctcatgtggc 720
ccgcctccc agcgcagcat cgggtgctg acaaagaggg tgaccgcgac agccatcgcc 780
atctgtctgg tcttctttgt gtgctgggca cctactatg tgctacagct gaccagttg 840
tccatcagcc gcccgacct cactttgtc tacttataca atgctggccat cagcttgggc 900
tatgccaaac gctgctcaa cccctttgtg tacatcgtgc tctgtgagac gttccgcaaa 960
cgcttggctc tgtcgggtgaa gcctgcagcc caggggcagc ttgcgctgt cagcaacgct 1020
cagacggctg acgaggagag gacagaaagc aaaggcacct gatac 1065

```

10

```

<210> 6
<211> 1065
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> MCH-1R antagonist binding protein

```

```

<400> 6
atggacctgg aagcctcgct gctgcccact ggtcccaatg ccagcaaac cctctgatggc 60
cccgataacc tcacttcggc aggatcacct cctcgcacgg ggagcatctc ctacatcaac 120
atcatcatgc cttcgggtgt cggcaccatc tgctcctggt gcatcatcgg gaactccacg 180
gtcatcttcg cggtcgtgaa gaagccaag ctgcactggt gcaacaacgt ccccgacatc 240
ttcatcatca acctctcggt agtagatctc ctctttctcc tgggcatgcc ctcatgatc 300
caccagctca tgggcaatgg ggtgtggcac tttggggaga ccatgtgcac cctcatcacg 360
gcatatgatg ccaatagtca gttcaccagc acctacatcc tgaccgccat ggccattgac 420
cgctacctgg ccactgtcca ccccatctct tccacgaagt tcgggaagcc ctctgtggcc 480
acctgttgta tctgctctct gtgggcccct tccttcacat gcatcacccc tgtgtggctg 540
tatgccagac tcaccccctt cccaggaggt gcagtgggct gcggcatacg cctgcccac 600
ccagacactg acctctactg gttcacccctg taccagtttt tcttggcctt tgccctgcct 660
tttgtgtgca tcacagccgc atacgtgagg atcctgcagc gcatgacgtc ctcatgtggc 720
ccgcctccc agcgcagcat cgggtgctg acaaagaggg tgaccgcgac agccatcgcc 780
atctgtctgg tcttctttgt gtgctgggca cctactatg tgctacagct gaccagttg 840
tccatcagcc gcccgacct cactttgtc tacttataca atgctggccat cagcttgggc 900
tatgccaaac gctgctcaa cccctttgtg tacatcgtgc tctgtgagac gttccgcaaa 960
cgcttggctc tgtcgggtgaa gcctgcagcc caggggcagc ttgcgctgt cagcaacgct 1020
cagacggctg acgaggagag gacagaaagc aaaggcacct gatac 1065

```

20

```

<210> 7
<211> 1065
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> MCH-1R antagonist binding protein

```

```

<400> 7
atggacctgg aagcctcgct gctgcccact ggtcccaatg ccagcaaac cctctgatggc 60
cccgataacc tcacttcggc aggatcacct cctcgcacgg ggagcatctc ctacatcaac 120

```

30

```

atcatcatgc cttcgggtgtt cggcaccatc tgccctcctgg gcatcatcgg gaactccacg 180
gtcatctctc cggctcgtgaa gaagtccaag ctgcactggg gcaacaacgt ccccgacatc 240
ttcatcatca acctctcggg agtagatctc ctctttctcc tgggcatgcc ctccatgac 300
caccagctca tgggcaatgg ggtgtggcac tttggggaga ccatgtgcac cctcatcacg 360
gccatggatg ccaatagtca gttcaccagc acctacatcc tgaccgccat ggccattgac 420
cgctacttta ctatcttcta tgcctccag taccataaca ttatgacagt taagcgggccc 480
acctgggtga tetgcctcct gtgggcccctc tccttcatca gcatcacccc tgtgtggctg 540
tatgccagac tcatcccttt cccaggaggt gcagtgggct gcggcatacg cctgcccaac 600
ccagacactg acctctactg gttcaccctg taccagtttt tcctggcctt tgccctgcct 660
tttgtgggtc tcacagccgc atacgtgagg atcctgcagc gcatgacgtc ctcatgtggc 720
cccgcctccc agcgcagcat ccggctgcgg acaaagaggg tgaccgcgac agccatcgcc 780
atctgtctgg tcttctttgt gtgctgggca cctactatg tgctacagct gaccagttg 840
tccatcagcc gcccgacct cacccttctc tacttataca atgcggccat cagcttgggc 900
tatgccaaac gctgcctcaa ccccttctgt tacatcgtgc tctgtgagac gttccgcaaa 960
cgcttgggtc tgtcgggtgaa gctgcagcc caggggcagc ttccgcgtgt cagcaacgct 1020
cagacggctg acgaggagag gacagaaagc aaaggcacct gatac 1065

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 1704

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; MCH-1R antagonist binding protein

&lt;400&gt; 8

```

atggacctgg aagcctcgct gctgcccact ggtcccaatg ccagcaacac ctctgatggc 60
cccgataaac tcacttgggc aggatcacct cctcgcaagg ggagcatctc ctacatcaac 120
atcatcatgc cttcgggtgtt cggcaccatc tgccctcctgg gcatcatcgg gaactccacg 180
gtcatctctc cggctcgtgaa gaagtccaag ctgcactggg gcaacaacgt ccccgacatc 240
ttcatcatca acctctcggg agtagatctc ctctttctcc tgggcatgcc ctccatgac 300
caccagctca tgggcaatgg ggtgtggcac tttggggaga ccatgtgcac cctcatcacg 360
gccatggatg ccaatagtca gttcaccagc acctacatcc tgaccgccat ggccattgac 420
cgctacttta ctatcttcta tgcctccag taccataaca ttatgacagt taagcgggccc 480
acctgggtga tetgcctcct gtgggcccctc tccttcatca gcatcacccc tgtgtggctg 540
tatgccagac tcatcccttt cccaggaggt gcagtgggct gcggcatacg cctgcccaac 600
ccagacactg acctctactg gttcaccctg taccagtttt tcctggcctt tgccctgcct 660
tttgtgggtc tcacagccgc atacgtgagg atcctgcagc gcatgacgtc ctcatgtggc 720
cccgcctccc agcgcagcat ccggctgcgg acaaagaggg tgaccgcgac agccatcgcc 780
atctgtctgg tcttctttgt gtgctgggca cctactatg tgctacagct gaccagttg 840
tccatcagcc gcccgacct cacccttctc tacttataca atgcggccat cagcttgggc 900
tatgccaaac gctgcctcaa ccccttctgt tacatcgtgc tctgtgaggt cgacggtaac 960
gcgggcccgg gatccatcgc caccatggtg agcaagggcg aggagctgtt caccgggggtg 1020
gtgcccatcc tggctgagctt ggaaggcgac gtaaacggcc acaagttcag cgtgtccggc 1080
gagggcgagg gcgatgccac ctacggcaag ctgacctga agttcatctg caccacgggc 1140
aagctgcccg tgccctggcc caccctcgtg accaccctga cctacggcgt gcagtgtctc 1200
agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgcat gccgaaggc 1260
tacgtccagg agcgcaccat cttcttcaag gacgacggca actacaagac ccgcgccgag 1320
gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac cgcacgagc tgaagggcat cgacttcaag 1380
gaggacggca acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca caacgtctat 1440
atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg ccacaacatc 1500
gaggacggca gcgtgcagct cgcggaccac taccagcaga acacccccat cggcgacggc 1560
cccgtgctgc tgcccgacaa ccactacctg agcaccagc ccgcccctgag caaagacccc 1620
aacgagaagc gcgatcacat ggtcctgctg gagtctgtga ccgcccgcgg gatcactctc 1680
ggcatggacg agctgtacaa gtaa 1704

```

10

20

30

<210> 9  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer  
  
<400> 9  
ccatggccat tgaccactac ctggccactg tcc 33  
  
<210> 10  
<211> 33 10  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer  
  
<400> 10  
ggacagtggc caggtagtgg tcaatggcca tgg 33  
  
<210> 11  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer 20  
  
<400> 11  
ctcttcacag aagttcgga agccctctgt ggcc 34  
  
<210> 12  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer  
  
<400> 12  
ggccacagag ggcttcgga acttcgtgga agag 34  
  
<210> 13  
<211> 47 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer  
  
<400> 13  
tttgtgtaca tegtgtcttg tgaggctgac ggtaccgagg gcccggg 47

<210> 14  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Oligonucleotide primer

<400> 14  
 cccgggcccg cgggtaccgtc gacctcacag agcacgatgt acacaaa

47

<210> 15  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

10

<220>  
 <223> Region between TM3 and TM4 in MCH-1R(i2/MC4R)

<400> 15  
 Asp Arg Tyr Phe Thr Ile Phe Tyr Ala Leu Gln Tyr His Asn Ile Met  
 1 5 10 15  
 Thr Val Lys Arg Ala Thr Leu Val Ile Cys Leu  
 20 25

<210> 16  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

20

<220>  
 <223> MCH-1R antagonist

<221> DISULFID  
 <222> (2)...(11)

<221> ACETYLATION  
 <222> (1)...(1)

<221> AMIDATION  
 <222> (11)...(11)

<221> MOD\_RES  
 <222> (1)...(1)  
 <223> Xaa = des-amino-arginine

30

<221> MOD\_RES  
 <222> (9)...(10)  
 <223> Xaa = 5-aminovaleric acid

<400> 16  
 Xaa Cys Met Leu Gly Arg Val Tyr Xaa Xaa Cys  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> MCH-1R antagonist

<221> DISULFID  
 <222> (2)...(11)

<221> ACETYLATION  
 <222> (1)...(1)

<221> AMIDATION  
 <222> (11)...(11)

<221> MOD\_RES  
 <222> (1)...(1)  
 <223> Xaa = des-amino-arginine

<221> MOD\_RES  
 <222> (5)...(5)  
 <223> Xaa = D-norleucine

<221> MOD\_RES  
 <222> (9)...(10)  
 <223> Xaa = 5-aminovaleric acid

<400> 17  
 Xaa Cys Met Leu Xaa Arg Val Tyr Xaa Xaa Cys  
 1 5 10

10

20

【 図 1 】

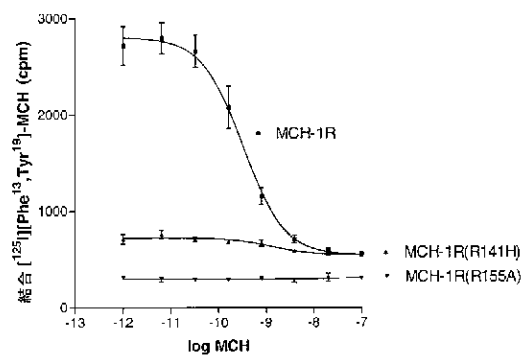


FIG. 1

【 図 2 】

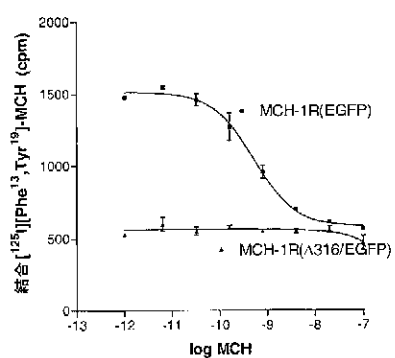


FIG. 2

【 図 3 】

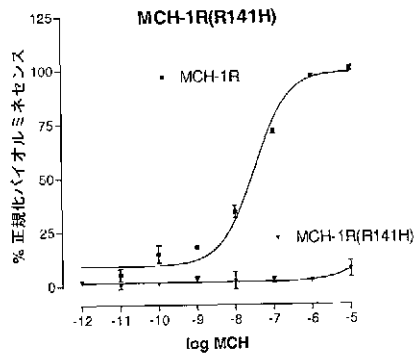


FIG. 3

【 図 4 】

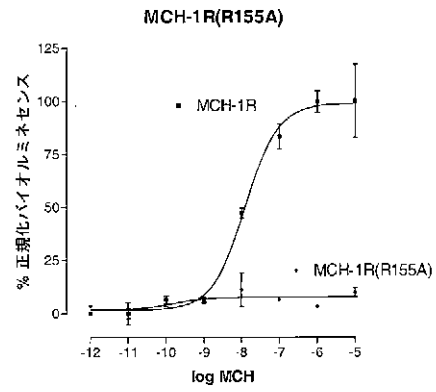


FIG. 4

【 図 5 】

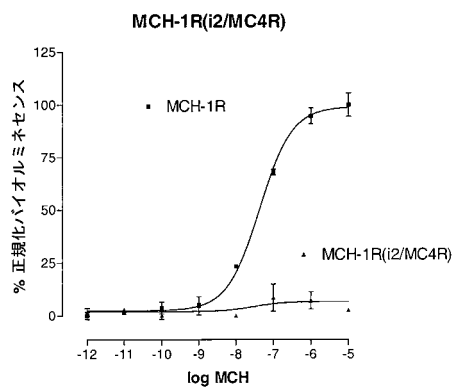


FIG. 5

【 図 6 】

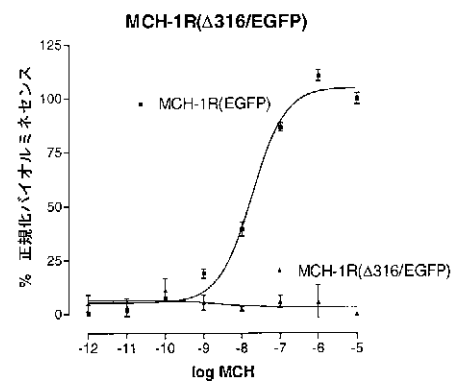


FIG. 6

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/29931

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C07K 1/00; C07H21/04; C12N 1/20; C12P 21/06; G01N 33/567  
 US CL : 530/350; 536/23.5; 514/2; 436/501; 435/7.21, 69.5, 252.3, 320.1

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)  
 U.S. : 530/350; 536/23.5; 514/2; 436/501; 435/7.21, 69.5, 252.3, 320.1

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

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

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FRANDBERG-PA, et al., Human Pigmentation Phenotype: A Point Mutation Generates Nonfunctional MSH Receptor, 1998, Vol 245, pages 490-492, see the Abstract and Figs 1 and 2 wherein it is shown that the R151C mutation has no effect on the binding of the agonist.	1-21

☐ 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	"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
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

06 July 2004 (06.07.2004)

Date of mailing of the international search report

27 SEP 2004

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US  
 Commissioner for Patents  
 P.O. Box 1450  
 Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Michael Brannock

Telephone No. (703) 308-0196

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/29931

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

NCBI: BLAST sequence databases

STN: Medline, BIOSIS

search terms: Melanin concentrating hormone receptor, C-terminal, second intracellular loop, substitution mutation



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ハワード, アンドリュー・デイ

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 パン, ジイ

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 フオン, タン・エム

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 マーシュ, ドナルド・ジエイ

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

(72)発明者 サイラー, アンドレアス・ペー

アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907、ローウエイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02

4B024 AA11 BA80 CA05 DA02 EA04

4B064 AG01 CA19 CC24 DA13

4B065 AA90X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA46

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA50 FA74