

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2002 - 335974

(P2002 - 335974A)

(43)公開日 平成14年11月26日(2002.11.26)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 39/395	N 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/395		45/00	4 B 0 6 3
45/00		A 6 1 P 3/00	4 B 0 6 4
A 6 1 P 3/00			171 4 B 0 6 5

審査請求 有 請求項の数 69 O L (全 54数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 190828(P2001 - 190828)

(22)出願日 平成13年6月25日(2001.6.25)

(31)優先権主張番号 60/213909

(32)優先日 平成12年6月26日(2000.6.26)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 397067152

ファイザー・プロダクツ・インク

アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市

イースタン・ポイント・ロード

(72)発明者 メアリー・アン・ヒックマン

アメリカ合衆国コネチカット州06340,グロ

トン,イースタン・ポイント・ロード,ファ

イザー・グローバル・リサーチ・アンド・

ディベロプメント

(74)代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外 5 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規なメラノコルチン - 4 受容体の配列と動物の食欲及び代謝率を調節するのに有用な化合物を
同定するためのスクリーニングアッセイ

(57)【要約】

【課題】 不十分な食物摂取とエネルギー代謝に関連した、食欲関連性の代謝及び繁殖障害を治療するための方法及び治療組成物を提供する。

【解決手段】 イヌ及びネコのメラノコルチン 4 受容体をコードする新規な核酸とその遺伝子産物；メラノコルチン 4 受容体の活性又は発現をモジュレートする化合物を同定するスクリーニングアッセイ；メラノコルチン受容体の活性又は発現をモジュレートする化合物を動物へ投与することを含んでなる、不十分な食物摂取とエネルギー代謝に関連した、食欲関連性の代謝及び繁殖障害を治療するための方法及び治療組成物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 機能性MC4Rをコードする単離核酸、又はその相補体であって、

(a) SEQ ID NO: 1のコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(b) SEQ ID NO: 1のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rのコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；及び

(d) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rのコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列：からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる、前記核酸（但し、前記機能性MC4Rは、ヒト、ブタ、マウス、ラット又はニワトリのものではない）。 20

【請求項2】 機能性MC4Rをコードする単離核酸、又はその相補体であって、

(a) SEQ ID NO: 1のコーディング領域に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(b) SEQ ID NO: 1のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rのコーディング領域に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；及び

(d) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rのコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列：からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる、前記核酸。

【請求項3】 (a) SEQ ID NO: 3によるポリペプチドをコードする；又は(b) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドをコードする：ヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。 40

【請求項4】 前記核酸がSEQ ID NO: 1か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによるヌクレオチド配列を有する、請求項3に記載の単離核酸。

【請求項5】 SEQ ID NO: 1か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンに対し87.4%より多い同 50

一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。

【請求項6】 SEQ ID NO: 3か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドに対し98.2%より多い同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。

【請求項7】 SEQ ID NO: 3か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸1~46、96~123、186~190又は268~279に対応するネコMC4RのECDをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。

【請求項8】 SEQ ID NO: 3か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸70~76、146~165、212~244又は302~333に対応するネコMC4RのCDをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。

【請求項9】 機能性MC4Rをコードする単離核酸、又はその相補体であって、

(a) SEQ ID NO: 2のコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(b) SEQ ID NO: 2のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rのコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；及び

(d) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rのコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列：からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる、前記核酸（但し、前記機能性MC4Rは、ヒト、ブタ、マウス、ラット又はニワトリのものではない）。 40

【請求項10】 機能性MC4Rをコードする単離核酸、又はその相補体であって、

(a) SEQ ID NO: 2のコーディング領域に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(b) SEQ ID NO: 2のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rのコーディング領域に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする

ヌクレオチド配列；及び

(d) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rのコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列：からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる、前記核酸。

【請求項11】 (a) SEQ ID NO:4によるポリペプチドをコードする；又は(b) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドをコードする：ヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。

【請求項12】 前記核酸がSEQ ID NO:2か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによるヌクレオチド配列を有する、請求項11に記載の単離核酸。

【請求項13】 SEQ ID NO:2か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンに対し81.3%より多い同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。

【請求項14】 SEQ ID NO:4か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドに対し98.1%より多い同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。

【請求項15】 SEQ ID NO:4か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸1~46、98~124、187~191又は268~279に対応するイヌMC4RのECDをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。

【請求項16】 SEQ ID NO:4か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸69~77、147~163、216~244又は302~333に対応するイヌMC4RのCDをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸。

【請求項17】 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載の核酸を含んでなるヌクレオチドベクター。

【請求項18】 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載の核酸を、前記ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドの発現を制御するヌクレオチド調節要素と機能的に関連して含んでなる、発現ベクター。

【請求項19】 請求項1、2、3、4、5、6、7、

8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載の核酸を含んでなる、遺伝子操作された宿主細胞。

【請求項20】 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載の核酸を含んでなる、遺伝子操作された宿主細胞であって、前記核酸が宿主細胞における前記ヌクレオチド配列の発現を制御するヌクレオチド調節要素と機能的に関連している、前記宿主細胞。

【請求項21】 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載の核酸によりコードされる、実質的に純粋なポリペプチド。

【請求項22】 (a) SEQ ID NO:3；
(b) SEQ ID NO:4；

(c) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローン；

(d) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローン；

(e) SEQ ID NO:3か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸1~46、96~123、186~190又は268~279に対応するネコMC4RのECD；

(f) SEQ ID NO:4か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸1~46、98~124、187~191又は268~279に対応するイヌMC4RのECD；

(g) SEQ ID NO:3か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸70~76、146~165、212~244又は302~333に対応するネコMC4RのCD；又は

(h) SEQ ID NO:4か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸69~77、147~163、216~244又は302~333に対応するイヌMC4RのCD：のアミノ酸配列を含んでなる、実質的に純粋なポリペプチド。

【請求項23】 請求項21に記載のポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体。

【請求項24】 (a) 請求項18に記載の発現ベクターで形質転換されて組換えポリペプチドを発現する宿主細胞を培養すること；及び(b) 組換えポリペプチドを細胞培養物から回収すること：を含んでなる、組換えポリペプチドを製造する方法。

【請求項25】 請求項21に記載のポリペプチドと担体を含んでなる組成物。

【請求項26】 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載のポリヌクレオチドをサンプル中に検出する方法であって、

(a) サンプルを、ポリヌクレオチドに結合して複合体を形成する化合物と、複合体を形成するのに十分な時間接触させること；及び(b) 複合体が検出されたなら、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載のポリヌクレオチドが検出されるように、複合体を検出すること： 10

【請求項27】 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載のポリヌクレオチドをサンプル中に検出する方法であって、

(a) サンプルを、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載のポリヌクレオチドにそのような条件下でアニールする核酸プライマーと接触させること；及び 20
(b) ポリヌクレオチドが増幅されたなら、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載のポリヌクレオチドが検出されるように、アニールされたポリヌクレオチドを増幅させること：を含んでなる、前記方法。

【請求項28】 ポリヌクレオチドが機能性MC4RをコードするRNA分子である、請求項27に記載の方法であって、アニールされたRNA分子をcDNAポリヌクレオチドへ逆転写させることをさらに含む、前記方法。

【請求項29】 請求項21に記載のポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、

(a) 化合物を、請求項21に記載のポリペプチドと、ポリペプチド/化合物の複合体を形成するのに十分な時間接触させること；及び(b) ポリペプチド/化合物の複合体が検出されたなら、請求項21に記載のポリペプチドに結合する化合物が同定されるように、複合体を検出すること：を含んでなる、前記方法。

【請求項30】 請求項21に記載のポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、

(a) 化合物を、請求項21に記載のポリペプチドと、ポリペプチド/化合物の複合体を形成するのに十分な時間、複合体がレポーター遺伝子配列の発現を誘導する細胞において、接触させること；及び(b) ポリペプチド/化合物の複合体が検出されたなら、請求項21に記載のポリペプチドに結合する化合物が同定されるように、レポーター遺伝子配列の発現を検出することによって複合体を検出すること：を含んでなる、前記方法。

【請求項31】 請求項21に記載のポリペプチドの活性をモジュレートする方法であって、当該ポリペプチド 50

を発現する細胞を、当該ポリペプチドの活性をモジュレートする化合物と前記活性をモジュレートするのに十分な時間接触させることを含んでなる、前記方法。

【請求項32】 MC4Rの拮抗薬をスクリーニングして同定する方法であって、

(a) 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞系を、MC4R作動薬の存在下で試験化合物と接触させること；及び(b) 試験化合物がこの細胞系に対するMC4R作動薬の結合及び細胞性効果を阻害するかどうかを決定すること：を含んでなり、この細胞系に対するMC4R作動薬の結合と細胞性効果を両方阻害する化合物として拮抗薬が同定される、前記方法。

【請求項33】 MC4Rの作動薬をスクリーニングして同定する方法であって、

(a) 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15又は16に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞系を、MC4R作動薬の存在下及び不在下で試験化合物と接触させること；

(b) MC4R作動薬の存在下で、試験化合物がこの細胞系に対するMC4R作動薬の結合を阻害するかどうかを決定すること；及び

(c) MC4R作動薬の不在下で、試験化合物がこの細胞系に対するMC4R作動薬の細胞性効果を模倣するかどうかを決定すること：を含んでなり、この細胞系に対するMC4R作動薬の結合を阻害するが細胞性効果を模倣する試験化合物として作動薬が同定される、前記方法。

30 【請求項34】 前記細胞系が遺伝子操作された細胞系である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 MC4Rの拮抗薬をスクリーニングして同定する方法であって、

(a) 請求項21に記載のポリペプチドをランダムペプチドライブラリーと、ポリペプチドがこのライブラリー内の1つ又はそれ以上のペプチド種を認識して結合するように接触させること；

(b) ポリペプチド/ペプチドの結合物を単離すること；

40 (c) 工程(b)で単離されたペプチドの配列を決定すること；及び

(d) 試験化合物がMC4R作動薬の結合及び細胞性効果を阻害するかどうかを決定すること：を含んでなり、MC4R作動薬の結合及び細胞性効果を両方阻害するペプチドとして拮抗薬が同定される、前記方法。

【請求項36】 MC4Rの作動薬をスクリーニングして同定する方法であって、

(a) 請求項21に記載のポリペプチドをランダムペプチドライブラリーと、ポリペプチドがこのライブラリー内の1つ又はそれ以上のペプチド種を認識して結合する

ように接触させること；

(b) ポリペプチド/ペプチドの結合物を単離すること；

(c) 工程(b)で単離されたペプチドの配列を決定すること；及び

(d) MC4R作動薬の不在下でこのペプチドがMC4R作動薬の細胞性効果を模倣するかどうかを決定すること：を含んでなり、MC4Rポリペプチドに対するMC4R作動薬の結合を阻害するが、MC4R作動薬の細胞性効果を模倣するペプチドとして作動薬が同定される、前記方法。

【請求項37】 請求項21に記載のポリペプチドの活性をモジュレートする方法であって、当該ポリペプチドを、当該ポリペプチドの活性をモジュレートする化合物と前記活性をモジュレートするのに十分な時間接触させることを含んでなる、前記方法。

【請求項38】 MC4Rの内因性酵素活性を動物においてモジュレートする方法であって、前記内因性酵素活性をモジュレートするのに有効な量のMC4Rリガンドを動物へ投与することを含んでなる、前記方法。

【請求項39】 動物がウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、イヌ又はネコである、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 前記MC4R受容体に対するリガンドがMC4R作動薬である、請求項38に記載の方法。

【請求項41】 前記MC4R受容体に対するリガンドがMC4R拮抗薬である、請求項38に記載の方法。

【請求項42】 前記MC4Rのエピトープと免疫特異的に結合するモノクローナル抗体である、請求項41に記載の拮抗薬。

【請求項43】 前記MC4Rの酵素活性が増加される、請求項38に記載の方法。

【請求項44】 前記MC4Rの酵素活性が減少される、請求項38に記載の方法。

【請求項45】 トランスジェニック動物であって、請求項1又は9に記載の核酸がそのゲノムに含まれて発現されるトランス遺伝子である、前記動物。

【請求項46】 請求項21に記載のポリペプチドをコードするゲノム配列の発現が妨げられているか又は抑えられている、トランスジェニック動物。

【請求項47】 MC4Rリガンドの有効量を動物へ投与することを含んでなる、動物の食欲及び/又は代謝率をモジュレートする方法。

【請求項48】 動物が食欲関連又は代謝性の障害を有する、請求項47に記載の方法。

【請求項49】 障害が、食欲、給餌行動又は体重における減少、又は代謝率における増加を引き起こすか、又はそれにより引き起こされるか、又は特徴づけられ、リガンドがMC4R拮抗薬である、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 障害が、食欲、給餌行動又は体重にお

*ける増加、又は代謝率における減少を引き起こすか、又はそれにより引き起こされるか、又は特徴づけられ、リガンドがMC4R作動薬である、請求項48に記載の方法。

【請求項51】 動物が産後の雌ブタ又は乳用牛である、請求項49に記載の方法。

【請求項52】 動物が伴侶動物である、請求項48に記載の方法。

【請求項53】 動物が家畜動物である、請求項48に記載の方法。

【請求項54】 動物が家禽動物である、請求項48に記載の方法。

【請求項55】 動物が搬送又は密集のストレスに病んでいる、請求項49に記載の方法。

【請求項56】 動物が泌乳している、請求項49に記載の方法。

【請求項57】 動物が妊娠している、請求項47に記載の方法。

【請求項58】 障害が悪液質、無食欲又は離乳誘導性の食思不振及び成長遅延である、請求項49に記載の方法。

【請求項59】 障害が代謝性障害である、請求項49に記載の方法。

【請求項60】 代謝性障害が糖尿病である、請求項59に記載の方法。

【請求項61】 障害が疾患である、請求項49に記載の方法。

【請求項62】 疾患が癌、腎不全、心臓病、内毒素血症、発熱、肝脂質症、感染症又は炎症である、請求項61に記載の方法。

【請求項63】 動物が肥満している、請求項50に記載の方法。

【請求項64】 MC4Rリガンドが医薬組成物の一部である、請求項47に記載の方法。

【請求項65】 MC4Rリガンドの有効量を動物へ投与することを含んでなる、動物の繁殖能力を増加させる方法。

【請求項66】 MC4Rリガンドの有効量を動物へ投与することを含んでなる、動物の成長能力を増加させる方法。

【請求項67】 リガンドが医薬組成物の一部である、請求項47に記載の方法。

【請求項68】 調製物が経口、経皮、又は徐放性の皮下インプラント/ペレットにより投与される、請求項67に記載の方法。

【請求項69】 MC4Rリガンドを含んでなる医薬組成物を含んでなるキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】発明の分野

本発明は、イヌ及びネコのメラノコルチン4受容体をコ

ードする新規な核酸とその遺伝子産物に関する。さらに、本発明は、本発明の新規メラノコルチン4受容体の活性又は発現をモジュレートする化合物を同定するスクリーニングアッセイに関する。本発明はまた、メラノコルチン受容体の活性又は発現をモジュレートする化合物を動物へ投与することを含んでなる、不適切な食物摂取を治療するための方法及び治療組成物に関する。1つの側面では、本発明は、本発明の新規メラノコルチン4受容体の活性又は発現に拮抗する化合物を投与することを含んでなる、伴侶動物(コンパニオンアニマル)、家畜又は家禽の食欲を増進させるためにメラノコルチン4受容体の活性又は発現に拮抗する方法及び組成物に関する。もう1つの側面では、本発明は、本発明の新規メラノコルチン4受容体の活性又は発現を作動する化合物を投与することを含んでなる、例えばネコやイヌのような伴侶動物の肥満を治療するためにメラノコルチン4受容体の活性又は発現を作動する方法及び組成物に関する。

【0002】背景技術

伴侶動物や農業動物の世話や飼育において食欲の調節は実用上大変重要である。脂肪の代謝及び蓄積を含む、動物の体重に影響を及ぼす要因のなかで、農業に使用される動物が遭遇する条件に特に敏感であるのが食欲である。食欲が乏しいと、栄養摂取が低下し、動物の直面する健康リスクを増加させる。例えば、産後の雌ブタや乳牛は給餌行動の減退を病む場合がある。このことは、泌乳や繁殖能力に対し負の効果を及ぼす。搬送や密集のストレスも動物の栄養摂取を減少させ、それにより体重の損失を招く場合がある。新生動物の発育が低栄養摂取により制限される場合があり、このことがその動物の一生を通して存続し得る有害な効果を引き起こすという証拠がある。食欲に関連した疾患及び病態には伴侶動物も罹患する。一方の極端では、ネコ及びイヌの様々な病態、特に癌、腎不全及び心臓病は、食欲不振や基礎代謝率の上昇を引き起こす場合がある。他方の極端では、多くの伴侶動物が肥満を病んでいる。

【0003】精力的な研究があるにもかかわらず、動物の食欲調節については依然としてほとんど理解されていない。解剖レベルでは、食物摂取及び全身代謝率を制御することによって、視床下部が脂肪の蓄積を調節する。視床下部の腹内側核(以下、「VMH」)又は前室傍核(以下、「PVN」)を実験的に切除すると、過度の肥満を生じる。Bray et al., 1990, *Frontiers in Neuroendocrinology* 11: 128-181。逆に、外側視床下部への損傷は体脂肪を減少させる。同上。

【0004】最近の研究活動は、食欲、体脂肪蓄積、エネルギー代謝及び栄養バランスを調節する分子メカニズムに集中している。それにより、多くの内分泌、神経内分泌及び代謝物メディエーターが関与する複雑なフィードバックシステムが明らかになった。Flier et al., 1991 *Cell* 92: 437-440。現在、食欲調節及びエネルギー

代謝においてメラノコルチンが果たす役割を理解しようとする試みがなされている。メラノコルチン(プロ-オピオメラノコルチンの翻訳後プロセッシングから生じる多種多様なペプチド産物)は、広範囲の生理学的作用を有することが知られている。副腎皮質の機能(例、副腎皮質刺激ホルモン(以下、「ACTH」)とメラニン細胞(例、メラニン細胞刺激ホルモン(以下、「MSH」))に対する周知の効果とは別に、メラノコルチンは、行動、学習及び記憶、心臓血管系の制御、痛覚消失、体温調節、及びプロラクチン、黄体形成ホルモン及び生体アミンを含む他の神経ホルモン剤の放出に影響を及ぼすことが示されている。さほど重要ではないが、メラノコルチンは、免疫調節及び神経栄養上の特性を有し、分娩関連の事象に関わることが確かめられている。

【0005】メラノコルチンは、メラノコルチン受容体(以下、「MCR」)-Gタンパク質共役型受容体のサブファミリーを介してその効果を発揮する。米国特許第5,622,860号。MCRファミリーには5種のサブタイプがあり、脳の様々な領域でほとんど発現される。Adan and Gispen, 1997, *Peptides* 18: 1279-1287。最初にクローン化されたMCRはヒト及びマウスのメラニン細胞MSH受容体、MCR1と、ヒト副腎皮質のACTH受容体、MCR2である。Mountjoy et al., 1992, *Science* 257: 1248-1251; Chhajlani and Wikberg, 1992, *FEBS Lett.* 309: 417-420。引き続き、メラノコルチンの中核ヘプタペプチド配列(即ち、ペプチド配列: MEHFRWG, 標準的な1文字アミノ酸の略号を使用)を認識する、3種のメラノコルチン受容体遺伝子が新たにクローン化された。これら受容体の2種、即ち、MCR3 (Roselli-Reh fuss et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8856-8860; Gantz et al., 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 8246-8250)及びMCR4 (Gantz et al., 1993, 同上; Mountjoy et al., 1994, *Mol. Endo.* 8: 1298-1308)は、主に脳で発現されることが示された。当初MCR2と呼ばれた第五のメラノコルチン受容体は、脳だけでなく多くの末梢臓器で発現される。Chhajlani et al., 1993, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195: 866-873; Gantz et al., 1994, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200: 1214-1220。上記後者3種の受容体のネーティブなりガンドと機能については不明なままである。

【0006】同定されたネーティブなりガンドがない受容体としての「孤児」のような状況と、上記の新規受容体の生理学的な役割が知られていないために、研究者たちは、様々な既知のメラノコルチン(例えば、Roselli-Reh fuss, 1993, 同上; 及びGantz, 1993, 同上、を参照のこと)、又はMSH及びACTHのアミノ酸配列(例えば、Hruby et al., 1995, *J. Med. Chem.* 38: 3454-3461; 及びAdan et al., 1994, *Eur. J. Pharmacol.* 269: 331-337を参照のこと)から派生した作動薬及び拮

抗薬に対して結合及び反応する(例えば、シグナルを伝達する)能力により、その受容体を *in vivo* で特徴づけようとしてきた。もう一つのアプローチでは、機能を仮定するための手段として、メラノコルチン受容体ファミリーのメンバーをその組織分布のパターンに基づいて差別化した。例えば、Gantz et al., 1993, 同上; 及び Mountjoy et al., 1994, 同上、を参照のこと。例えば、MC1R及びMC2Rの発現は、メラニン細胞及び副腎皮質細胞にそれぞれ局在化している。MC3R及びMC4Rは、主に脳において発現されるが、副腎皮質やメラニン細胞では発現されない。MC4Rは、大量のMC3Rが発現される組織である、胎盤では発現されない。

【0007】MC4Rは、7回膜貫通性のGタンパク質共役型受容体(以下、「GPCR」)であり、その上で作動薬の活性化によりcAMPの蓄積が刺激される(米国特許第5,869,257号;米国特許第5,703,220号;Alvarro et al., 1996, Molecular Pharmacology 50: 583-591を参照のこと)。今日まで、MC4Rは、ラット(Alvarro et al., 1996, 同上)、ヒト(Gantz et al., 1993, 同上)、マウス(GenBank 受入れ番号: AB009664)、ニワトリ(GenBank 受入れ番号: AB012211)及びブタ(GenBank 受入れ番号: AB021664)から単離された。脳の海馬領域におけるその発現パターンに基づいて、学習及び記憶におけるMC4Rの役割が提唱された(Gantz et al., 1993, 同上を参照のこと)が、学習された行動の保持に影響を及ぼすことが知られている化合物に対してMC4Rがさして反応しないために、「薬理学上のパラドックス」であると認知された(Mountjoy et al., 1994, 同上)。さらに、Mountjoyは、MC4Rが視覚及び感覚情報の流れをモジュレートすることに関わるか、又は身体運動コントロールの諸相を調整する、及び/又は心臓への自律神経出力をモジュレーションすることに関わる可能性があること示唆した。Mountjoy et al., 1994, 同上。

【0008】証拠が示唆するところでは、MC4Rは食欲及びエネルギーのホメオスタシス調節においてきわめて重要である(米国特許第5,932,779)。第一に、MC4R作動薬及び拮抗薬を中枢に投与すると、マウスの給餌行動を調節し得る(Fan et al., 1997, Nature 385: 165-168)。第二に、アグーチ(agouti)はMC3R及びMC4Rの天然の拮抗薬であり(Moussa and Claycombe, 1999, Obes. Res. 7: 506-514; Fisher et al., 1999, Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 23 Suppl 1: 54-58)、黄色肥満(以下、「Avy」)マウスでは、成体でアグーチタンパク質が異所的に発現することが肥満表現型の原因になると考えられている(Lu et al., 1994, Nature 371: 799-802)。第三に、MC4Rノックアウトマウスは、後に肥満を発症する(Husz

ar et al., 1997, Cell 88: 131-141)。第四に、MC4Rノックアウトマウスは、MSH様作動薬であるMTIの食欲減退効果に抵抗性である(Marsh et al., 1999, Nature Genetics 21:119-122)。しかしながら、上記ノックアウトマウスは、毛様体神経栄養因子(以下、「CNTF」)、副腎皮質刺激ホルモン放出因子(以下、「CRF」)、又はウロコルチンの食欲減退効果、あるいはNPY又はペプチドYY(以下、「PYY」)の食欲増進作用には感受性があり、上記の神経モジュレーターが独立してか又はMC4Rの下流のいずれかで作用することを示している(Marsh et al., 1999, 同上)。第五に、食欲及び生殖機能に対するレプチンの効果に、少なくとも部分的に、MC4Rが介在するという証拠が集まっている(Kask et al., 1998, European Journal of Pharmacology 360: 15-19; Marsh et al., 1999, 同上)。最後に、MC3RでなくMC4Rが、ラットにおいて不十分な給餌の間は視床下部の特定領域においてアップレギュレートされ、食餌誘導性の肥満時にはダウンレギュレートされるらしいことが、*in situ* 定量的オートラジオグラフィにより最近示された(Harrold et al., 1994, Diabetes 43: 267-271; Harrold et al., 1992, Biochem. Biophys. Res. Commun. 258: 574-577)。

【0009】このように、状況証拠は、MC4Rがげっ歯類において食欲及び代謝率を調節することにある役割を果たしている可能性があることを示唆するが、その役割がどんなものなのかは知られていないし、げっ歯類における上記観察事実が伴侶動物及び農業動物の衰弱又は肥満の障害を治療するためにいかに利用し得るかも知られていない。本発明は、例えば、ネコ及びイヌのMC4Rポリペプチド及びペプチド、それをコードする核酸、MC4Rの作動薬及び拮抗薬を同定するためにそれを使用する方法、上記スクリーニングにより同定される作動薬及び拮抗薬、この作動薬及び拮抗薬を含有する医薬組成物、及び、食欲及びそれに関連した障害を治療するためにこの作動薬、拮抗薬及び組成物を使用する方法を提供することによって上記の疑問を明確化することのニーズに対処する。

【0010】発明の要約

本発明は、機能性MC4Rをコードする単離核酸、又はその相補体に関するが、前記核酸は、
(a) SEQ ID NO: 1のコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列;
(b) SEQ ID NO: 1のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列;
(c) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rのコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする

ヌクレオチド配列；及び

(d) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rのコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる。但し、前記機能性MC4Rは、ヒト、ブタ、マウス、ラット又はニワトリのものではない。

【0011】さらに本発明は、機能性MC4Rをコードする単離核酸、又はその相補体に関するが、前記核酸

は、
(a) SEQ ID NO: 1のコーディング領域に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(b) SEQ ID NO: 1のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rのコーディング領域に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする

ヌクレオチド配列；及び
(d) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rのコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる。

【0012】本発明はまた、(a) SEQ ID NO: 3によるポリペプチドをコードする；又は(b) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドをコードする；ヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸に関する。

【0013】本発明のさらなる態様は、(a) SEQ ID NO: 3によるポリペプチドをコードする；又は(b) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドをコードする；ヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸であり、ここで前記核酸は、SEQ ID NO: 1か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによるヌクレオチド配列を有する。

【0014】本発明の好ましい態様は、SEQ ID NO: 1か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンに対し87.4%より多い同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸である。

【0015】本発明のさらに好ましい態様は、SEQ ID NO: 3か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクロー

ンによりコードされるポリペプチドに対し98.2%より多い同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸である。

【0016】本発明のさらにもう1つの好ましい態様は、SEQ ID NO: 3か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸1~46、96~123、186~190又は268~279に対応するネコMC4RのECDをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸である。

【0017】本発明のさらにもう1つの好ましい態様は、SEQ ID NO: 3か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸70~76、146~165、212~244又は302~333に対応するネコMC4RのCDをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸である。

【0018】さらに、本発明は、機能性MC4Rをコードする単離核酸、又はその相補体に関するが、前記核酸

は、
(a) SEQ ID NO: 2のコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(b) SEQ ID NO: 2のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rのコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；及び

(d) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rのコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる。但し、前記機能性MC4Rは、ヒト、ブタ、マウス、ラット又はニワトリのものではない。

【0019】本発明のもう1つの態様は、機能性MC4Rをコードする単離核酸、又はその相補体であって、前記核酸は、

(a) SEQ ID NO: 2のコーディング領域に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(b) SEQ ID NO: 2のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rのコーディング領域に高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；及び

(d) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rのコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに高いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列：からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる。

【0020】本発明のさらなる態様は、(a) SEQ ID NO: 4によるポリペプチドをコードする；又は(b) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドをコードする：ヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸である。

【0021】本発明のさらなる好ましい態様は、(a) SEQ ID NO: 4によるポリペプチドをコードする；又は(b) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドをコードする：ヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸であり、ここで前記核酸は、SEQ ID NO: 2か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによるヌクレオチド配列を有する。

【0022】本発明の好ましい態様は、SEQ ID NO: 2か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンに対し81.3%より多い同一性を有するヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸である。

【0023】本発明のさらなる好ましい態様は、SEQ ID NO: 4か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドに対し98.1%より多い同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸である。

【0024】本発明のさらにもう一つの好ましい態様は、SEQ ID NO: 4か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸1~46、98~124、187~191又は268~279に対応するイヌMC4RのECDをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸である。

【0025】本発明のさらなる好ましい態様は、SEQ ID NO: 4か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸69~77、147~163、216~244又は302~333に対応するイヌMC4RのCDをコードするヌクレオチド配列を含んでなる単離核酸である。

【0026】本発明のもう一つの側面は、本明細書に開示される新規な核酸を含んでなるヌクレオチドベクターに関する。そのような新規核酸には、上記に開示され、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15

1、12、13、14、15及び16に記載される核酸が含まれる。

【0027】さらに本発明は、そのような新規核酸を、前記ヌクレオチド配列によりコードされるポリペプチドの発現を制御するヌクレオチド調節要素と機能的に関連して含んでなる発現ベクターに関する。

【0028】本発明のもう一つの側面は、本明細書に記載の新規核酸を含んでなる遺伝子操作した宿主細胞に関する。本発明のさらにもう一つの側面は、本明細書に記載の新規核酸を含んでなる遺伝子操作した宿主細胞に関するが、ここで前記核酸は、宿主細胞における前記ヌクレオチド配列の発現を制御するヌクレオチド調節要素と機能的に関連している。

【0029】さらに本発明は、本明細書に記載の新規核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチドに関する。本発明の好ましい態様には、

(a) SEQ ID NO: 3；

(b) SEQ ID NO: 4；

(c) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローン；

(d) ATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローン；

(e) SEQ ID NO: 3か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸1~46、96~123、186~190又は268~279に対応するネコMC4RのECD；

(f) SEQ ID NO: 4か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸1~46、98~124、187~191又は268~279に対応するイヌMC4RのECD；

(g) SEQ ID NO: 3か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1762を有するネコMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸70~76、146~165、212~244又は302~333に対応するネコMC4RのCD；又は

(h) SEQ ID NO: 4か又はATCCに預けられてATCC受入れ番号PTA-1761を有するイヌMC4Rクローンによりコードされるポリペプチドのアミノ酸69~77、147~163、216~244又は302~333に対応するイヌMC4RのCD：のアミノ酸配列を含んでなる、実質的に純粋なポリペプチドが含まれる。

【0030】本発明のさらにもう一つの側面は、本明細書に記載の新規核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチドと免疫特異的に結合する抗体に関する。さらに本発明は、(a) 請求項18に記載の発現ベクターで形質転換されて組換えポリペプチドを発現する宿主細胞を培養すること；及び(b) 組換えポリペプチドを細

胞培養物から回収すること：を含んでなる、組換えポリペプチドを製造する方法に関する。

【0031】さらに本発明は、本明細書に記載の新規核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチドと担体を含んでなる組成物に関する。本発明のもう1つの側面は、本明細書に記載の新規核酸を含んでなるポリヌクレオチドをサンプル中に検出する方法に関するが、前記方法は、(a) サンプルを、ポリヌクレオチドに結合して複合体を形成する化合物と、複合体を形成するのに十分な時間接触させること；及び(b) 複合体が検出されたなら、記載のポリヌクレオチドが検出されるように、複合体を検出すること：を含んでなる。

【0032】さらに本発明は、上記のポリペプチドをサンプル中に検出する方法に関するが、前記方法は、(a) ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、本明細書に記載のポリヌクレオチドにそのような条件下でアニールする核酸プライマーと接触させること；及び(b) ポリヌクレオチドが増幅されたなら、本明細書に記載のポリヌクレオチドが検出されるように、アニールされたポリヌクレオチドを増幅させること：を含んでなる。

【0033】好ましい態様では、前記ポリヌクレオチドは機能性MC4RをコードするRNA分子であり、この方法はアニールされたRNA分子をcDNAポリヌクレオチドへ逆転写させることをさらに含む。

【0034】本発明のもう1つの側面は、本明細書に記載の新規核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチドに結合する化合物を同定する方法に関するが、前記方法は、(a) 化合物を、ポリペプチド/化合物の複合体を形成するのに十分な時間上記ポリペプチドと接触させること；及び(b) ポリペプチド/化合物の複合体が検出されたなら、上記ポリペプチドに結合する化合物が同定されるように複合体を検出すること：を含んでなる。

【0035】さらに本発明は、本明細書に記載の新規核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチドに結合する化合物を同定する方法に関するが、前記方法は、(a) 化合物を、ポリペプチド/化合物の複合体を形成するのに十分な時間、複合体がレポーター遺伝子配列の発現を誘導する細胞において、上記ポリペプチドと接触させること；及び(b) ポリペプチド/化合物の複合体が検出されたなら、上記ポリペプチドに結合する化合物が同定されるように、レポーター遺伝子配列の発現を検出することによって複合体を検出すること：を含んでなる。

【0036】さらに本発明は、本明細書に記載の新規核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチドの活性をモジュレートする方法に関するが、前記方法は、上記ポリペプチドを発現する細胞を、当該ポリペプチドの活性をモジュレートする化合物と前記活性をモジュレー

トするのに十分な時間接触させることを含んでなる。

【0037】さらに本発明は、MC4Rの拮抗薬をスクリーニングして同定する方法に関するが、前記方法は、(a) 本明細書に記載の核酸によりコードされる実質的に純粋なポリヌクレオチドを発現する細胞系を、MC4R作動薬の存在下で試験化合物と接触させること；及び(b) 試験化合物がこの細胞系に対するMC4R作動薬の結合及び細胞性効果を阻害するかどうかを決定すること：を含み、ここでは、この細胞系に対するMC4R作動薬の結合及び細胞性効果を両方阻害する化合物として拮抗薬が同定される。

【0038】さらに本発明は、MC4Rの作動薬をスクリーニングして同定する方法に関するが、前記方法は、(a) 本明細書に記載の新規核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチドを発現する細胞系を、MC4R作動薬の存在下及び不在下で試験化合物と接触させること；(b) MC4R作動薬の存在下で、試験化合物がこの細胞系に対するMC4R作動薬の結合を阻害するかどうかを決定すること；及び(c) MC4R作動薬の不在下で、試験化合物がこの細胞系に対するMC4R作動薬の細胞性効果を模倣するかどうかを決定すること：を含み、ここでは、この細胞系に対するMC4R作動薬の結合を阻害するが細胞性効果を模倣する試験化合物として作動薬が同定される。

【0039】好ましい態様では、細胞系は遺伝子操作された細胞系である。さらに本発明は、MC4Rの拮抗薬をスクリーニングして同定する方法に関するが、前記方法は、

(a) 本明細書に記載の新規核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチドをランダムペプチドライブラリーと、ポリペプチドがこのライブラリー内の1つ又はそれ以上のペプチド種を認識して結合するように接触させること；

(b) ポリペプチド/ペプチドの結合物を単離すること；

(c) 工程(b)で単離されたペプチドの配列を決定すること；及び

(d) 試験化合物がMC4R作動薬の結合及び細胞性効果を阻害するかどうかを決定すること：を含み、ここでは、MC4R作動薬の結合及び細胞性効果を両方阻害するペプチドとして拮抗薬が同定される。

【0040】さらに本発明は、MC4Rの作動薬をスクリーニングして同定する方法に関するが、前記方法は、(a) 本明細書に記載の新規核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチドをランダムペプチドライブラリーと、ポリペプチドがこのライブラリー内の1つ又はそれ以上のペプチド種を認識して結合するように接触させること；

(b) ポリペプチド/ペプチドの結合物を単離すること；

(c) 工程 (b) で単離されたペプチドの配列を決定すること；及び

(d) MC4R 作動薬の不在下で、ペプチドが MC4R 作動薬の細胞性効果を模倣するかどうかを決定すること；を含み、ここでは、MC4R ポリペプチドに対する MC4R 作動薬の結合を阻害するが、MC4R 作動薬の細胞性効果を模倣するペプチドとして作動薬が同定される。

【0041】さらに本発明は、本明細書に記載の新規核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチドの活性をモジュレートする方法に関するが、前記方法は、当該ポリペプチドを、当該ポリペプチドの活性をモジュレートする化合物と前記活性をモジュレートするのに十分な時間接触させることを含んでなる。

【0042】さらに本発明は、MC4R の内因性酵素活性を動物においてモジュレートする方法に関するが、前記方法は、前記内因性酵素活性をモジュレートするのに有効な量の MC4R リガンドを動物へ投与することを含んでなる。

【0043】好ましい態様では、動物がウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、イヌ又はネコである。さらに好ましい態様では、前記 MC4R 受容体に対するリガンドが MC4R 作動薬である。

【0044】もう一つの好ましい態様では、前記 MC4R 受容体に対するリガンドが MC4R 拮抗薬である。好ましい態様では、拮抗薬が前記 MC4R のエピトープと免疫特異的に結合するモノクローナル抗体である。

【0045】さらにもう一つの好ましい態様では、前記 MC4R の酵素活性が増加されるか又は減少される。本発明のさらにもう一つの側面はトランスジェニック動物に関するが、ここでは、機能性 MC4R をコードする単離核酸又はその相補体 [前記核酸は、

(a) SEQ ID NO: 1 のコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(b) SEQ ID NO: 1 のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c) ATCC に預けられて ATCC 受入れ番号 PTA-1762 を有するネコ MC4R のコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；及び

(d) ATCC に預けられて ATCC 受入れ番号 PTA-1762 を有するネコ MC4R のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる (但し、前記機能性 MC4R は、ヒト、ブタ、マウス、ラット又はニワトリのものではない)]、又は機能性 MC4R をコードする単離核酸、又はその相補体 [前記核

酸は、

(a) SEQ ID NO: 2 のコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(b) SEQ ID NO: 2 のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；

(c) ATCC に預けられて ATCC 受入れ番号 PTA-1761 を有するイヌ MC4R のコーディング領域に中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；及び

(d) ATCC に預けられて ATCC 受入れ番号 PTA-1761 を有するイヌ MC4R のコーディング領域に相補的であるポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含んでなる (但し、前記機能性 MC4R は、ヒト、ブタ、マウス、ラット又はニワトリのものではない)] を含んでなる核酸が、動物のゲノムに含まれる発現されたトランス遺伝子である。

【0046】さらに本発明は、本明細書に記載の新規核酸によりコードされる実質的に純粋なポリペプチドをコードするゲノム配列の発現が妨げられているか又は抑えられているトランスジェニック動物に関する。

【0047】さらに本発明は、MC4R リガンドの有効量を動物へ投与することを含んでなる、動物の食欲及び/又は代謝率をモジュレートする方法に関する。好ましい態様では、動物が食欲関連又は代謝性の障害を有する。

【0048】さらに好ましい態様では、障害が、食欲、給餌行動又は体重における減少、又は代謝率における増加を引き起こすか、又はそれにより引き起こされるか、又は特徴づけられ、リガンドが MC4R 拮抗薬である。

【0049】さらにもう一つの好ましい態様では、障害が、食欲、給餌行動又は体重における増加、又は代謝率における減少を引き起こすか、又はそれにより引き起こされるか、又は特徴づけられ、リガンドが MC4R 作動薬である。

【0050】もう一つの態様では、動物が産後の雌ブタ又は乳用牛である。もう一つの態様では、動物が伴侶動物である。もう一つの態様では、動物が家畜動物である。

【0051】もう一つの態様では、動物が家禽動物である。もう一つの態様では、動物が搬送又は密集のストレスに病んでいる。もう一つの態様では、動物が泌乳している。

【0052】もう一つの態様では、動物が妊娠している。もう一つの態様では、障害が悪液質、無食欲又は離乳誘導性の食思不振及び成長遅延である。

【0053】もう一つの態様では、障害が代謝性障害で

ある。もう一つの態様では、代謝性障害が糖尿病である。もう一つの態様では、障害が疾患である。

【0054】もう一つの態様では、疾患が癌、腎不全、心臓病、内毒素血症、発熱、肝脂質症、感染症又は炎症である。もう一つの態様では、動物が肥満している。

【0055】もう一つの態様では、MC4Rリガンドが医薬組成物の一部である。さらに本発明は、MC4Rリガンドの有効量を動物へ投与することを含んでなる、動物の繁殖能力を増加させる方法に関する。

【0056】さらに本発明は、MC4Rリガンドの有効量を動物へ投与することを含んでなる、動物の成長能力を増加させる方法に関する。さらに本発明は、MC4Rリガンドの有効量を動物へ投与することを含んでなる、動物の食欲及び/又は代謝率をモジュレートする方法に関するが、ここで当該リガンドは医薬組成物の一部である。

【0057】好ましい態様では、その医薬組成物が経口投与される。さらに本発明は、MC4Rリガンドを含んでなる医薬組成物を含んでなるキットに関する。

【0058】発明の詳細な説明

発明の概論

本発明は、メラノコルチン4受容体(以下、「MC4R」)をコードする新規核酸とその遺伝子産物に関する。特に、本発明は、ネコ及びイヌのMC4Rポリペプチドをコードする核酸とその遺伝子産物を提供する。本発明はまた、本発明の新規MC4Rの活性又は発現をモジュレートする化合物を同定するスクリーニングアッセイに関する。特に、本発明は、MC4Rでトランスフェクトされた細胞系を使用する、MC4R結合性化合物についての *in vitro* アッセイを提供する。MC4Rでトランスフェクトされた細胞系は、さらに、その発現レベルがMC4Rにより調節されるレポーター遺伝子を含む場合がある。さらに本発明は、MC4Rの活性又は発現をモジュレートする医薬組成物に関する。特に、医薬組成物は、MC4Rの作動薬又は拮抗薬であり得る。拮抗薬は、例えば、他のMC4R作動薬又は拮抗薬を競合的に阻害することによって、活性化されたMC4Rのその下流のシグナル経路との相互作用を妨げることによって、又はMC4R遺伝子の転写を阻害することによって、又はMC4RのmRNAのプロセッシング又は翻訳を阻害することによって、作用し得る。作動薬は、MC4Rのシグナル伝達反応又はその発現の天然の生物学的効果を活性化すること及び/又は増強することによって作用し得る。さらにもう一つの側面では、本発明は、伴侶動物、家畜及び家禽における食欲に関連した障害を治療する方法に関し、前記方法は、MC4Rの発現又は活性をモジュレートする医薬組成物を投与することを含んでなる。特に、病んでいるか又はストレス状態にある動物の食欲及び繁殖能力、又は体重の維持又は回復を強化する、又は食欲を減退させるか又は肥満を改善する医薬組

成物が、伴侶動物、家畜又は家禽へ投与され得る。

【0059】本発明は、イヌ及びネコのMC4Rの諸形態をコードする新規なMC4R核酸の発見に一部基づいている。本発明は、(a)イヌMC4Rをコードする核酸(図1、SEQ ID NO:1に示される)；

(b)ネコMC4Rをコードする核酸(図2、SEQ ID NO:2に示される)；(c)それらの突然変異体、先端切除体又はフラグメント；(d)イヌMC4R又はネコMC4Rを含んでなる、その組換えタンパク質、ペプチド、フラグメント又はそれらの誘導体；

(e)本発明のMC4R変異体の組換えタンパク質、ペプチド、フラグメント又はそれらの誘導体；及び(f)イヌ又はネコのMC4Rを含んでなる、組換え融合タンパク質、ペプチド、フラグメント又はそれらの誘導体；

を包含する。本発明により使用され得る変化した核酸には、同一であるか又は機能的に同等な遺伝子産物をコードする核酸を生じる、様々なヌクレオチド残基の欠失物、付加物又は置換物が含まれる。遺伝子産物そのものは、MC4Rポリペプチドの内部にアミノ酸残基の欠失物、付加物又は置換物を含有し得るが、これは機能的に同等なMC4Rを生じる。そのようなアミノ酸の置換物は、関与する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性及び/又は両親媒性における同等性に基いて製造し得る。例えば、陰性に荷電したアミノ酸にはアスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれ；陽性に荷電したアミノ酸にはリジン及びアルギニンが含まれ；同様の親水性を有する電荷のない極性基の付いたアミノ酸には以下が含まれる：ロイシン、イソロイシン、バリン；グリシン、アラニン；アスパラギン、グルタミン；セリン、スレオニン；フェニルアラニン、チロシン。本明細書で使用されるように、機能的に同等なMC4Rとは、MC4Rリガンド又はリガンド類似体に、但し必ずしもその対照となるネーティブMC4Rと同一の結合アフィニティーでなく結合する受容体を意味する。さらに、SEQ ID NO:1又はSEQ ID NO:2の相補体に高いストリンジェント条件の下で選択的にハイブリダイズし、

- MSH (シグマ、セントルイス、MO；BACHEM Bioscience Inc., King of Prussia, PA)、[Nle₄, D-Phe₇]

- MSH (以下、[NDP-MSH]；シグマ、BACHEM, 又はNEN (登録商標)、ボストン、MA)、MTII (BACHEM；メラノコルチン受容体作動薬 (Bednarek et al., 1991 *Biochem. & Biophys. Res. Comm.* 261: 209-13)) 又はSHU9119 (BACHEM；メラノコルチン受容体拮抗薬)に結合し得る任意の核酸が本発明の主題となる。但し、この核酸は、ヒト、ブタ、ラット、マウス又はニワトリのMC4Rをコードしない。

【0060】特に断らなければ、すべての核酸配列は5'から3'へ表記され、すべてのポリペプチド及びタ

ンパク質の配列はN末端からC末端へ表記される。

【0061】本発明の核酸及びポリペプチドの単離及び特徴づけ

ネコ及びイヌ由来の核酸配列(それぞれ、SEQ ID NO: 1、及びSEQ ID NO: 2)とそれによりコードされるネコ(SEQ ID NO: 3)及びイヌ(SEQ ID NO: 4)のMC4Rタンパク質の推定アミノ酸配列を、それぞれ図1、2、3及び4に示す。予測される膜貫通(以下、「TM」)ドメインを、上線及びローマ数字により示し、4種の細胞外ドメインと4種の細胞質ドメインを、それぞれECD1~4、及びCD1~4により示す。図3及び4は、標準的な1文字アミノ酸の配列として示す。配列上のローマ数字は膜貫通領域を示す。ECD=細胞外ドメイン、CD=細胞質ドメインである。

【0062】メラノコルチン受容体の曲がりくねった構造は、TMドメイン間に位置する親水性ドメインが細胞の外側と内側に交替的に配置されてこの受容体のECD(ネコの配列では、アミノ酸残基1~46、96~123、186~190及び268~279、図3;イヌの配列では、アミノ酸残基1~46、98~124、187~191及び268~279、図4)とCD(ネコの配列では、アミノ酸残基70~76、146~165、212~244及び302~333、図3;イヌの配列では、アミノ酸残基69~77、147~163、216~244及び302~333、図4)を形成することを示唆する。

【0063】本明細書に記載される特定の態様では、ネコ及びイヌのcDNAライブラリー(それぞれのライブラリーは、そのSUPERSCRIPT™ cDNAライブラリー構築技術を使用して、Life Technologies(ロックビル、MD)により構築された)のクローンへ、ピオチンタグの付いた特定の非縮重オリゴヌクレオチド(ttgactctgtgactgtagctccttgct)を、ストリンジントにハイブリダイズさせることによって、ネコ及びイヌのMC4R遺伝子を単離した。磁石によりベレット化するStreptavidin磁気ビーズを使用して、ライブラリー中の他のクローンからこの複合体を分離した。捕捉オリゴヌクレオチド部位(前方プライマ- : atgaggcagatgatgacagc; 後方プライマ- : gtgatctgtagctccttgct)に隣接するように設計されたMC4R特異的なプライマー対を使用するPCRによって、MC4Rクローンを同定した。このcDNAライブラリーから6個のネコMC4Rクローンと1個のイヌMC4Rクローンを単離した。これらの中で、1種のネコクローンと1種のイヌクローンを(それぞれ、受入れ番号PTA-1762及びPTA-1761のもとで)ATCCに預けた。これらクローンの同一性を、様々なMC4R遺伝子特異的なプライマー対(前方プライマ- : tgagacatgaagcacac; 後方プライマ- : gtgatctgtagctcc

ttgc)を使用するPCRにより確かめた。MC4R遺伝子の配列決定は、各クローンの両端から1回の標準反応と3回のプライマーウォーキング(primer walking)反応を使用して完了した。MC4R遺伝子フラグメントの配列をその重複領域に基づいて組立てた。各クローン内のオープンリーディングフレームの概念的な翻訳により、それぞれがMC4Rをコードする核酸を含むことが示された。イヌMC4R遺伝子のオープンリーディングフレームはヌクレオチド447~1445を含む(図2)。ネコMC4R遺伝子のオープンリーディングフレームはヌクレオチド451~1449を含む(図1)。

【0064】本発明はまた、MC4R変異体をコードする核酸と、MC4R活性が存在する他の動物から単離したMC4R核酸に関するが、但し、他の動物とはヒト、ブタ、ラット、マウス又はニワトリではない。1つの態様では、MC4R核酸が、限定しないが、雌ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ヘラジカ、シカ、ヤギウ、スイギュウ、雄ウシ、ヒトニザル、サル及びキツネザルを含む哺乳動物に由来する。もう1つの態様では、MC4R核酸が、限定しないが、ガチョウ、ダチョウ、エミュー、七面鳥及びアヒルを含む鳥類に由来する。さらにもう1つの態様では、MC4R核酸が、限定しないが、サケ、コイ及びマスを含む魚類に由来する。好ましくは、本発明の核酸は、LASERGENE-MEGALIGN™ソフトウェアパッケージ(DNA STAR, Inc., マジソン、WI; 類似性比率は、系統関係を考慮せず、配列を直接比較する)を使用すると、ネコMC4R遺伝子配列に対し87.4%より多く同一であり、イヌMC4R遺伝子配列に対し81.3%より多く同一である。他のやり方では、本発明の好ましいポリペプチドは、やはりLASERGENE-MEGALIGN™ソフトウェアパッケージを使用すると、ネコMC4Rタンパク質配列に対し98.2%より多く同一であり、イヌMC4R遺伝子配列に対し98.1%より多く同一である。もう1つの好ましい態様では、本発明のポリペプチドと本発明の核酸によりコードされる遺伝子産物は、生理学的条件の下で、-MSH、NDP-MSH、MTII又はSHU9119に結合して活性化され得る機能性MC4Rである。

【0065】典型的には、本発明の核酸は、ストリンジントな条件の下でネコ又はイヌのMC4R核酸にハイブリダイズすることができる。「ストリンジント」という用語は、当技術分野でストリンジントとして通常理解される条件を意味するために用いられる。好ましい態様では、本発明の核酸は、本明細書に開示されたネコ又はイヌのMC4Rをコードするポリヌクレオチドに、高いストリンジント条件の下でハイブリダイズする。高いストリンジエンシーのような条件を使用する方法は以下の通りである: 6XSSC, 50mM トリス-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA, 0.02%

PVP, 0.02% Ficoll, 0.02% BSA及び変性サケ精子DNA 500 μ g/mlからなる緩衝液において、65で8時間から一晚、DNA含有フィルターのプレハイブリダイゼーションを実行する。変性サケ精子DNA 100 μ g/mlと³²P標識プローブ5~20 \times 10⁶cpmを含有するプレハイブリダイゼーション混合液において、65で48時間、フィルターをハイブリダイズさせる。2XSSC, 0.01% PVP, 0.01% Ficoll及び0.01%

BSAを含有する溶液において、37で1時間、10 フィルターの洗浄を行なう。この後に、0.1XSSCにおいて、50で45分間洗浄した後、オートラジオグラフィを実施する。当技術分野でよく知られている他の高いストリンジェンシーの条件も使用し得る。

【0066】もう一つの態様では、本発明の核酸は、本明細書に開示されたネコ又はイヌのMC4Rをコードするポリヌクレオチドに中位ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする。中位ストリンジェンシーのような条件を使用する方法は以下の通りである：6XSSC, 5Xデンハート溶液, 0.5% SDS及び変性サケ精子DNA 100 μ g/mlを含有する溶液において、55で6時間、DNA含有フィルターを前処理する。同じ溶液においてハイブリダイゼーションを実行し、³²P標識プローブ5~20 \times 10⁶cpmを使用する。ハイブリダイゼーション混合液において、55で18~20時間、フィルターをインキュベートし、次いで、1XSSC及び0.1% SDSを含有する溶液において、60で30分間、2回洗浄する。フィルターを乾燥させ、オートラジオグラフィのために露光させる。当技術分野でよく知られている他の中位ストリンジェンシーの条件も使用し得る。フィルターの洗浄は、2XSSC及び0.1% SDSを含有する溶液において、37で1時間、実行する。

【0067】もう一つの態様では、本発明の核酸には、本明細書に開示されたネコ又はイヌのMC4Rをコードするポリヌクレオチドに低いストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするものが含まれる。低いストリンジェンシーのような条件を使用する方法は以下の通りである(Shilo and Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6789-6792 も参照のこと)：35%ホルムアミド、5XSSC, 50mM トリス-HCl (pH7.5), 5mM EDTA, 0.1% PVP, 0.1% Ficoll, 1% BSA及び変性サケ精子DNA 500 μ g/mlを含む溶液において、40で6時間、DNA含有フィルターを前処理する。同じ溶液においてハイブリダイゼーションを実行するが、以下の変更がある：0.02% PVP, 0.02% Ficoll, 0.2% BSA、サケ精子DNA 100 μ g/ml、10(重量/体積)% 硫酸デキストラン及び³²P標識プローブ5~20 \times 10⁶cpmを使用 50

する。ハイブリダイゼーション混合液において、40で18~20時間、フィルターをインキュベートし、次いで、2XSSC、25mM トリス-HCl (pH7.4)、5mM EDTA及び0.1% SDSを含有する溶液において、55で1.5時間、洗浄する。洗浄溶液を新鮮な溶液に換え、60でさらに1.5時間インキュベートする。フィルターを乾燥させ、オートラジオグラフィのために露光させる。必要ならば、フィルターを65~68でもう一度(3回目)洗浄し、フィルムに再露光させる。当技術分野でよく知られている(例えば、種間ハイブリダイゼーションに利用されているような)他の低いストリンジェンシーの条件も使用し得る。

【0068】本発明の核酸は、低減したストリンジェンシーの条件下で、ネコ又はイヌのMC4Rクローンの放射活性標識フラグメントを使用して、ゲノム又はcDNAライブラリー、例えばバクテリオファージcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離し得る。他のやり方では、ネコ又はイヌのMC4R配列は、PCRプローブとして使用し得る縮重又は完全縮重オリゴヌクレオチドプローブを設計するか又はバクテリオファージcDNAライブラリーをスクリーニングするために使用し得る。もう一つの選択肢では、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づいた戦略を使用して、MC4R変異体又は他の種由来のMC4R遺伝子をコードする核酸をクローン化し得る。ネコ及びイヌのMC4RのcDNA配列間に保存されたモチーフに対応する2つの縮重オリゴヌクレオチドプールが、PCR反応におけるプライマーとして役立つように設計し得る。この反応の鑄型は、MC4Rを発現することが知られている細胞系又は組織から調製されたmRNAの逆転写により得られるcDNAである。この増幅された配列が所望のMC4R配列を表すことを保証するために、PCR産物をサブクローン化して配列を決定する場合がある。このPCRフラグメントは、増幅されたフラグメントを放射活性標識化し、バクテリオファージcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって完全長MC4RのcDNAクローンを単離するために使用し得る。他のやり方では、標識フラグメントは、ゲノムライブラリーをスクリーニングするために使用し得る。使用し得るクローニング戦略の概説については、例えば、Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Press, N. Y.; 及び Ausubel et al., 1991 Current protocols in Molecular Biology, (Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y.) を参照のこと。

【0069】他のやり方では、本発明のMC4R・cDNAの単離は、COS細胞へ移入されたときに高コピー数のプラスミドの発現を可能にするSV40の複製開始配列を含有する、pcDNA1のような哺乳動物の発現

ベクターにおいて cDNA ライブラリーを構築することによっても達成され得る。トランスフェクトされた COS 細胞の表面における MC4R の発現は、放射標識、蛍光標識又は酵素で標識した、MSH 又は MSH 作動薬のような標識化リガンドの使用を含む、数多くの方法で検出され得る。MC4R を発現する細胞は、トランスフェクトされた細胞を FACS (蛍光標示式細胞分取器) ソートにかけることによって濃縮し得る。

【0070】当然ながら、本発明の MC4R をコードするポリヌクレオチドを単離するには、上記に概説した代表的な方法及び手技だけでなく、当技術分野で知られている cDNA 又はゲノム DNA を単離する他の方法も使用し得る。例えば、Sambrook et al., 同上、及び Ausubel et al., 同上を参照のこと。

本発明の核酸の発現

本発明によれば、MC4R ポリペプチド、MC4R ポリペプチドのペプチドフラグメント、MC4R 融合タンパク質又はそれらの機能的同等物をコードする MC4R の核酸が、適切な宿主細胞系における MC4R ポリペプチド又はその機能的同等物の発現を指令する組換え核酸分子を産生するために使用し得る。他のやり方では、MC4R 核酸の 1 つ又はそれ以上の部分にハイブリダイズする核酸も、核酸ハイブリダイゼーションアッセイ、サザン又はノーザンプロット分析などにおいて使用し得る。当然ながら、実質的に同一なもの又は機能的に同等なポリペプチドをコードする関連した核酸も、MC4R ポリペプチドのクローニング及び発現のために本発明の実施において使用し得る。

【0071】本発明の核酸は、限定しないが、遺伝子産物のプロセッシング及び発現を修飾する変化を含む、多種多様な目的について MC4R コーディング配列を変化させるために加工し得る。例えば、新しい制限部位を挿入する、糖鎖結合パターンを変化させること、リン酸化パターンを変化させること、等のために当技術分野でよく知られている技術、例えば部位特異的突然変異誘発を使用して、突然変異を導入し得る。例えば、酵母のようなある種の発現系では、宿主細胞系により遺伝子産物が過剰に糖鎖結合され得る。そのような発現系を使用するときは、MC4R 遺伝子産物の N 連結糖鎖結合部位をすべて消去するように MC4R コーディング配列を変化させることが好ましい場合もある。

【0072】本発明のもう一つの態様では、融合タンパク質をコードするために、MC4R 核酸又は修飾された MC4R 核酸を異種配列へ連結し得る。例えば、ペプチドライブラリーのスクリーニングには、市販の抗体により認識される異種エピトープを含んでなるキメラ MC4R タンパク質を使用することが有利であり得る。融合タンパク質はまた、MC4R ポリペプチドがこの異種ポリペプチドから開裂され得るように、MC4R ポリペプチドと異種ポリペプチドとの間に位置づけられる開裂部位

を含有するように加工し得る。

【0073】本発明の別の態様では、当技術分野でよく知られている化学的な方法を使用して、全体又は部分的に MC4R 核酸を合成し得る (例えば、Caruthers, et al., 1980, Nuc. Acids Res. Symp. Ser. 7: 215-233; Crea and Horn, 1980, Nuc. Acids Res. 9: 2331; Matteucci and Caruthers, 1980, Tetrahedron Letters 21: 7113how and Kempe, 1981, Nuc. Acids Res. 9: 2807-2817 を参照のこと)。他のやり方では、MC4R ポリペプチドは、化学的な方法を使用して、全体又は部分的に製造し得る。例えば、MC4R ポリペプチドは固相技術により合成され、樹脂から開裂され、調製用高速液体クロマトグラフィーにより精製し得る (例えば、Creighton, 1983, Proteins Structures And Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., N. Y. pp. 50-60 を参照のこと)。この合成ペプチドの組成は、アミノ酸分析又は配列決定により確かめ得る (例えば、エドマン分解法; Creighton, 1983, Proteins Structures And Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., N. Y. pp. 34-49 を参照のこと)。

【0074】生物学的に活性な MC4R を発現させるには、MC4R をコードする核酸、又はその (上記に述べたような) 機能的同等物を適切な発現ベクター (即ち、挿入されるコーディング配列の転写及び翻訳に必要な要素を含有するベクター) へ挿入し、MC4R を含むベクターを創出する。この MC4R 含有ベクターを用いて、好適な宿主細胞系 (即ち、MC4R をコードする核酸からの MC4R 遺伝子産物の発現を可能にする細胞系) を形質転換させる。この MC4R 遺伝子産物と形質転換された細胞系は様々な目的に使用し得る。この目的には、限定しないが、MC4R 遺伝子産物に結合する抗体 (即ち、モノクローナル又はポリクローナル抗体) を産生することが含まれる。この抗体は、例えば、MC4R 受容体に対するリガンドの結合を競合阻害し得る (以下参照) か、又は MC4R 受容体を介して作用するリガンド又は薬物をスクリーニングして選択する (以下参照)、等のために使用し得る。

【0075】当技術分野の当業者によく知られている方法を使用して、MC4R 核酸及び適切な転写 / 翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築し得る。この方法には、in vitro 組換え DNA 技術、合成技術及び in vivo 遺伝子組換えが含まれる。例えば、Sambrook et al., 同上; Ausubel et al., 同上、に記載の技術を参照のこと。

【0076】MC4R の核酸を発現させるには、多種多様な宿主 - 発現ベクター系を利用し得る。この系には、限定しないが、MC4R の核酸を含んでなる、組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA 又はコスミド DNA 発現ベクターで形質転換された微生物の株 (例えば、細菌の株); MC4R の核酸を含んでなる組換え

酵母発現ベクターで形質転換された酵母の株（例えば、*S. cerevisiae* 又は *S. pombe* の株）；MC4Rの核酸を含んでなる組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス由来の発現ベクター）に感染させた昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（以下、「CaMV」）又はタバコモザイクウイルス（以下、「TMV」）由来の発現ベクター）に感染させたか、又はMC4Rの核酸を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド由来の発現ベクター）で形質転換させた植物細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、アデノウイルス又はワクシニアウイルス由来の発現ベクター）に感染させた動物細胞系、又は、MC4R核酸の多重コピーを含むように加工された動物細胞の系が含まれ、これらは（例えば、MC4R核酸及びDHF R遺伝子を含んでなる発現ベクターで形質転換されたdhfr CHO細胞系のメトトレキセート選択を使用して）安定的に増幅されるか、又はDM染色体（例えば、マウス細胞系）において不安定に増幅される。

【0077】哺乳動物の宿主細胞系では、数多くのウイルスをベースとする発現系を利用し得る。アデノウイルスが発現ベクターとして使用される場合、MC4R核酸は、アデノウイルスの転写/翻訳制御複合体（例えば、後期プロモーター及び三分割リーダー配列）に連結してキメラ遺伝子を産生し得る。次いで、このキメラ遺伝子は、*in vitro* 又は *in vivo* の組換えによりアデノウイルスゲノムへ挿入し得る。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域E1又はE3）における挿入により、被感染宿主において生存し得て、MC4R核酸を発現し得る組換えウイルスが生じる（例えば、Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3655-3659 を参照のこと）。他のやり方では、ワクシニアの7.5Kプロモーターを使用し得る（例えば、Mackett et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA79: 7415-7419; Mackett et al., 1984, J. Virol. 49: 857-864; Panicali et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4927-4931 を参照のこと）。

【0078】MC4R核酸の効率的な翻訳には、1つ又はそれ以上の特定の開始シグナルも必要とされる場合がある。このシグナルには、ATG開始コドンと隣接配列が含まれる。MC4R核酸が、それ自身の開始コドン及び隣接配列を含め、MC4R遺伝子全体を含む場合、追加の翻訳制御シグナルは必要でないかもしれない。しかしながら、MC4R核酸が、MC4R遺伝子自身の開始コドン及び隣接配列を含まない場合、ATG開始コドンを含む、1つ又はそれ以上の外来翻訳制御シグナルが提供されなければならない。さらに、この開始コドンは、挿入物全体の翻訳を保証するために、MC4Rコーディング配列のリーディングフレームと同期していなければならない。外来の翻訳制御シグナル及び開始コドンは、

それぞれ天然か又は人工のいずれかの起源であり得る。発現の効率は、適切な転写エンハンサー要素、転写ターミネーター等の取込みにより増強し得る（Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153: 516-544 を参照のこと）。

【0079】さらに、MC4R核酸の発現をモジュレートするか、又は所望される特定の形式でMC4Rの遺伝子産物を修飾するか又はプロセシングする宿主細胞を使用し得る。MC4R遺伝子産物のそのような修飾（例えば、糖鎖連結）又はプロセシング（例えば、開裂）は、このタンパク質の機能にとって重要であり得る。様々な宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセシング及び修飾について特徴的かつ特定の機序を有する。MC4R遺伝子産物の正確な修飾及びプロセシングを保証するのに適切な細胞系又は宿主系を選択し得る。この目的のために、一次転写物の適切なプロセシングと、この遺伝子産物の糖鎖連結及びリン酸化をするための細胞装置を保有する真核の宿主細胞系を使用し得る。そのような哺乳動物の宿主細胞系の例には、限定しないが、CHO、VERO、BHK、HeLa、COS、MDCK、293及びWI38細胞系が含まれる。

【0080】組換えタンパク質の長期にわたる高収率産生には、安定な発現が好ましい場合がある。例えば、MC4R核酸を安定的に発現する細胞系を加工し得る。ウイルスの複製起点を含有する発現ベクターを使用するよりは、1つ又はそれ以上の適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位、等）により制御されるMC4R核酸と選択可能マーカーを含んでなる組換えプラスミドで宿主細胞を形質転換し得る。形質転換の後、この細胞系は濃縮培地で1~2日間増殖させ、次いで、選択培地へ移される。組換えプラスミドの選択可能マーカーは、選択に抵抗性をもたらす、形質転換された細胞がこのプラスミドを染色体へ安定的に組込み、増殖してフォーカスを形成し、次いでクローン化され、細胞系へ拡大され得ることを可能にする。この方法は、有利にも、MC4R遺伝子産物を細胞表面上で発現し、MC4Rリガンド介在性のシグナル伝達に反応する細胞系を加工するために使用し得る。そのように加工された細胞系は、MC4Rリガンド及びリガンド類似体をスクリーニングすることに特に有用である。

【0081】MC4R核酸を含有し、生物学的に活性化MC4R遺伝子を発現する宿主細胞は、限定されないが、以下のような少なくとも4種の一般的なアプローチのいずれか1つにより同定し得る：(a) DNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーション；(b) 「マーカー」遺伝子機能の存在又は不在；(c) 宿主細胞におけるMC4R・mRNA転写物の発現により測定されるように転写レベルを評価すること；及び(d) 免疫アッセイ又はその生物学的活性により測定されるよう

な遺伝子産物の検出。

【0082】第一のアプローチでは、発現ベクターに挿入されたMC4R核酸の存在が、MC4Rコーディング配列にそれぞれ相同であるヌクレオチド配列、又はその部分か又は誘導体を含んでなるプローブを使用するDNA-DNA又はDNA-RNAハイブリダイゼーションにより検出され得る。

【0083】第二のアプローチでは、ある種の「マーカー」遺伝子機能（例えば、チミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する抵抗性、メトトレキセートに対する抵抗性、形質転換の表現型、バクテリオファージにおける咬合体の形成、等）の存在又は不在に基づいて、組換え発現ベクター/宿主系が同定及び選択され得る。例えば、MC4R核酸がベクターのマーカー遺伝子配列の内部に挿入されれば、MC4R核酸を含有する組換え体は、マーカー遺伝子機能の不在により同定し得る。他のやり方では、マーカー遺伝子は、MC4R核酸の発現を制御するために使用されるものと同じであるか又は異なるプロモーターの制御下にあるMC4R核酸と並んで配置し得る。誘導又は選択に反応するマーカーの発現は、MC4R核酸の発現を示す。

【0084】第三のアプローチでは、MC4R核酸の転写活性をハイブリダイゼーションアッセイによって評価し得る。例えば、形質転換した細胞系からRNAを単離し、MC4Rの核酸又はその特定部分と同一であるか又は類似したプローブを使用するノーザンブロット分析により分析し得る。他のやり方では、形質転換された細胞の全核酸を抽出し、そのようなプローブに対するハイブリダイゼーションについてアッセイすることが可能である。

【0085】第四のアプローチでは、MC4R遺伝子産物の免疫学的検出、例えば、ウェスタンブロット、放射免疫沈降、酵素吸着免疫アッセイ等の免疫アッセイにより、MC4R核酸の発現を評価し得る。しかしながら、発現系の成功の究極的な試験には、生物学的に活性なMC4R遺伝子産物の検出が含まれる。限定しないが、MC4Rリガンド結合アッセイ；及び加工した細胞系を試験の基質として使用する生物学的アッセイを含む、数多くのアッセイを使用して、受容体の活性を検出することができる。

【0086】当然ながら、宿主細胞と、生物学的に活性なMC4R遺伝子産物の発現を含んでなる、当業者に知られている他のアプローチも、MC4R核酸を同定するために利用し得る。本発明のMC4Rの活性をモジュレートする化合物のスクリーニング以下のパラグラフに記載される本発明のこの側面は、MC4R遺伝子産物の活性のモジュレーションを介して動物の食欲及び/又は代謝率をモジュレートする化合物を同定するためのスクリーニング法（例えば、アッセイ）を包含する。そのような化合物は、例えば、MC4R作動薬又はMC4R拮抗

薬であり得る。MC4R拮抗薬は、MC4R依存性のシグナル伝達を低減させることによって食欲、及び、おそらくは体重における増加を引き起こす。MC4R作動薬は、MC4R依存性のシグナル伝達を増加させることによって、食欲及びおそらくは体重における減少と、代謝率の増加を引き起こす。本発明のこの側面は、本明細書に開示されるアッセイを使用して同定されるMC4Rの作動薬及び拮抗薬も包含するが、それには低分子（例、低分子の有機化合物）、高分子（例、ペプチド）及び抗体、並びに、MC4Rの遺伝子発現を阻害するために使用し得るヌクレオチド配列（例、アンチセンス及びリボザイム分子）、及びMC4R遺伝子の発現を増強させるように設計された遺伝子又は調節配列の置換構築体（例えば、強いプロモーター系の制御下でMC4R遺伝子を配置する発現構築体）が含まれる。上記の化合物は、治療を必要とする動物の食欲及び代謝障害を治療するために使用し得る。

【0087】特に、本発明には、MC4Rと相互作用する、例えば、MC4Rの活性をモジュレートする、及び/又はMC4Rに結合する化合物を同定するために使用し得る、細胞性又は非細胞性のアッセイが含まれる。細胞をベースとするアッセイは、MC4Rのシグナル伝達活性に影響を及ぼす化合物又は組成物を、それらがMC4Rに結合するか又はMC4Rシグナル伝達経路に関係する細胞内因子に作用するかを同定するために使用し得る。この目的のために、MC4Rを内因的に発現する細胞を使用して、化合物をスクリーニングし得る。他のやり方では、MC4Rを発現するように遺伝子操作したHEK293細胞、COS細胞、CHO細胞、線維芽細胞等のような細胞系をスクリーニング目的に使用し得る。この細胞をさらに加工して、活性化されたMC4Rにより伝達されるシグナルに連結され、MC4Rのシグナル伝達活性をモジュレートする化合物の同定に役立つレポーター分子を取込むことができる。好ましくは、メラノコルチンペプチドによる活性化に対応する機能性受容体を発現するように遺伝子操作された宿主細胞系を、化学的、生理学的、生物学的又は表現型の変化、宿主細胞遺伝子又はレポーター遺伝子の誘導、cAMPレベル、アデニルシクラーゼ活性、宿主細胞のGタンパク質活性、細胞外酸性化率、宿主細胞のキナーゼ活性、増殖、分化等の変化により測定されるような、アッセイの終点として使用し得る。

【0088】限定でない例を挙げると、細胞をベースとするアッセイに適した細胞系は、例えば、当技術分野で知られている任意の方法を使用して、HEK293細胞をネコ又はイヌのMC4R核酸でトランスフェクトすることによって製造し得る。例えば、HEK293細胞を含有する50%集密なプレートは、ネコ又はイヌのMC4R核酸を含んでなるベクター構築体で、FuGENE 6™（F.ホフマン・ラ・ロッシュ社、バーゼル、ス

イス) をトランスフェクション担体として使用して(プラスミド DNA 1 μ g につき、FuGENE 6™ 4 μ l)、一過的にトランスフェクトし得る。トランスフェクトされた細胞は、トランスフェクションから 48 時間後に、シグマ解離緩衝液(シグマ、セントルイス、MO) を使用して採取し、遠心分離してから結合緩衝液(50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 0.1% BSA, 及びプロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma P-8340™ (シグマ、セントルイス、MO), pH = 7.5) に再懸濁し得る。血球計を使用して、再懸濁した細胞集団を計数する。細胞容量の滴定を、例えば、同一 3 検体の様々な容量を試験管の中へピペット操作することによって、実施する。緩衝液が又は過剰な非放射活性 NDP - MSH (最終濃度: 2 μ M) のいずれかを加える。過剰な非放射活性 NDP - MSH を使用するの是非特異的な結合を確定するためである。放射標識した NDP - MSH ([¹²⁵I] [Nle₄, D-Phe₇] - MSH; NEN (登録商標)。ボストン、MA) を、最終濃度が 75 pM になるように加える。この反応液を 37 °C で 1 時間インキュベートした後、細胞を 5000 × G で 10 分間遠心分離する。上澄液を吸引し、結合しなかった標識を除去し、 γ -カウンターを使用して膜に結合した(即ち、受容体に結合した)標識の量を決定する。標識 NDP - MSH の特異的な結合が高いレベルを示す 1 つ又はそれ以上のトランスフェクトされた細胞系を、さらなる使用のために選択する。

【0089】そのような細胞系を利用するときには、メラノコルチン受容体を発現する細胞を、試験化合物又は担体対照(例えば、プラセボ)と接触させる。次いで、この細胞をアッセイしてメラノコルチン受容体のシグナル伝達経路の諸成分の発現及び/又は活性を測定するか、又はシグナル伝達経路そのものの活性をアッセイし得る。例えば、曝露した後に、細胞溶解液を cAMP の誘導についてアッセイし得る。担体対照で処理した細胞で見られるレベル以上に cAMP のレベルを増加させる能力が試験化合物にあれば、宿主細胞により発現されるメラノコルチン受容体が介在するシグナル伝達がこの試験化合物により誘導されることを示す(つまり、試験化合物は作動薬である)。MC4R の拮抗薬として作用し得る化合物をスクリーニングするときは、MC4R を活性化するリガンド、例えば、 α -MSH、 β -MSH 又は ACTH を含み、担体対照に比較した試験化合物によるシグナル伝達の阻害について試験することが必要である。

【0090】1 つの特定の態様では、細胞をベースとするアッセイを使用して、候補リガンドが MC4R に結合するかどうかを決定する。そのようなアッセイの例では、MC4R でトランスフェクトされた細胞系(例えば、上記のように創出された)由来の細胞を、放射標識された NDP - MSH と接触させる。同一の MC4R で

トランスフェクトされた細胞系に由来する他の細胞を、放射標識 NDP - MSH 及び候補リガンドと接触させる。各細胞群を 37 °C で 1 時間インキュベートした後、各細胞群を 5000 × G で 10 分間遠心分離する。上澄液を吸引し、結合しなかった標識を除去し、 γ -カウンターを使用して膜に結合した(即ち、受容体に結合した)標識の量を決定する。放射標識 NDP - MSH を MC4R から置換する(膜結合性の放射活性が候補リガンド依存的に減少することにより裏付けられる)候補リガンドを、さらなる使用のために選択する。

【0091】もう 1 つの特定の態様では、細胞をベースとするアッセイを使用して、ある候補リガンドが MC4R の作動薬であるか又は拮抗薬であるかを判定する。1 つのそのようなアッセイでは、MC4R でトランスフェクトした細胞系(例えば、上記のように創出された)が、レポーター構築体でさらにトランスフェクトされる。このレポーター構築体は、2 つの特性を含んでなる遺伝子である。第一に、その発現レベルは MC4R の活性のレベルにより調節されている。例えば、レポーター遺伝子の発現は、cAMP 応答性の要素に依存し得る。この応答要素は、MC4R 依存性のシグナル伝達にตอบสนองしてレポーター遺伝子の転写を増加し得る(この場合、増加したレポーター遺伝子の発現は、増加した MC4R 依存性のシグナル伝達に相関する)か又は、この応答要素は、MC4R 依存性のシグナル伝達にตอบสนองしてレポーター遺伝子の転写を減少し得る(この場合、減少したレポーター遺伝子の発現は、減少した MC4R 依存性のシグナル伝達に相関する)。第二に、レポーター構築体は、レポーター遺伝子を含む。レポーター遺伝子は、アッセイされ得る遺伝子産物をコードする核酸を含む。広範囲のレポーター遺伝子が利用し得る。例えば、レポーター遺伝子は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(以下、「CAT」)、ルシフェラーゼ、GUS、成長ホルモン、又は胎盤アルカリホスファターゼ(以下、「SEAP」)をコードする核酸であり得る。細胞を試験化合物へ曝露した後で、レポーター遺伝子発現のレベルを定量化し、受容体の活性を調節する試験化合物の能力を決定し得る。本発明の実施において特に有用なのは、アルカリホスファターゼをコードするレポーター遺伝子の使用であるが、それはこの酵素が細胞から分泌されるので、組織培養の上澄液をアルカリホスファターゼの分泌につきアッセイし得るからである。さらに、アルカリホスファターゼの活性は、Bronstein et al., 1994, Biotechniques 17: 172-77 に記載されるような、比色、生物発光又は化学発光アッセイにより測定し得る。そのようなアッセイは、単純で、高感度で、容易に自動化し得る医薬品スクリーニングの検出系を提供する。使用し得る他のレポーター遺伝子には、生物発光、比色反応又は蛍光を生じるものが含まれる。例えば、レポーター遺伝子は、細菌のロドプシン(Ng et al., 199

5, *Biochemistry* 34: 879-890 を参照のこと) のような色素 (例えば, Bonhoeffer, 1995, *Arneimittelforschung* 45: 351-356 を参照のこと)、メラニン (Vitkin et al., 1994, *Photochemistry and Photobiology* 59: 455-62 を参照のこと)、アクオリン (Molecular Probes, Eugene, OR)、グリーン蛍光タンパク質 (以下、「GFP」; クローンテック、パロアルト、CA; Chalfie et al., 1994, *Science* 263: 802-805; Cubitt et al., 1995, *TIBS* 20: 448-455)、イエロー蛍光タンパク質 (Daubner et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 8912-8916 を参照のこと)、フラビン、バイオフラビノイド、ヘモグロビン (Chance et al., 1995, *Analytical Biochemistry* 227: 351-362; Shen et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 8108-8112 を参照のこと)、ヘム (Pieulle et al., 1996, *Biochem. Biophys. Acta* 1273: 51-61)、インジゴ色素 (Murdock et al., 1993, *Biotechnology* 11: 381-386)、ペリジニン-クロロフィルタンパク質 (以下、「PCP」) (Ogata et al., 1994, *FEBS Letters* 356: 367-371)、又はピオシアニン (al-Shibib and Kandela, 1993, *Acta Microbiologica Polonica* 42: 275-280) をコードし得る。他のやり方では、レポーター遺伝子は、 β -ラクタマーゼのような吸色性の基質を開裂し得る酵素、発光又は蛍光性のタンパク質、蛍光基質を有する酵素、又は光学的に活性化化学品をコードするか又は基質を光学活性化化合物へ変換し得る他の遺伝子をコードし得る。さらなる選択肢では、レポーター遺伝子は光タンパク質をコードし得る。いずれの場合でも、レポーター遺伝子は、MC4R 依存的なシグナル伝達により活性化される誘導プロモーター (例えば、cAMP 応答性のプロモーター要素) と機能的に連結している。

【0092】本発明の特定の態様では、生物発光性のレポーター遺伝子が利用される。ルシフェラーゼファミリー (例えば, Wood et al., 1989, *Science* 244: 700-702 を参照のこと) を含む、数タイプの生物発光レポーター遺伝子が知られている。ルシフェラーゼファミリーのメンバーは、多種多様な原核及び真核生物において同定されてきた。原核性の発光 (lux) 系、並びに対応する lux 遺伝子に関わるルシフェラーゼ及び他の酵素が、*Vibrio* 及び *Photobacterium* 属の海洋細菌や *photorhalodus* と呼ばれる *Xenorhabdus* 属の陸上細菌から単離されている。ルシフェラーゼ系 (lux) を含有する代表的な真核生物は、北米のホタルである *Photinus pyralis* である。ホタルのルシフェラーゼは詳細に研究されてきて、ATP アッセイに広く使用されている。もう1つの種であるコメツキムシ (*click beetle*)、*Pyrophorus plagiophthalmus* 由来のルシフェラーゼをコードする cDNA がクローン化され、発現された (Wood et al., 同上、を参照のこと)。この甲虫が独特な

は、この種の様々なメンバーが様々な色の生物発光を発することにある。互いに95~99%の類似性を有する4種のクローンが単離された。それらは、546nm (緑)、560nm (黄緑)、578nm (黄) 及び593nm (橙) で光を発する。

【0093】ルシフェラーゼは、ATP、NAD(P)H などのようなエネルギー源、ルシフェリン、デカナル (細菌の酵素) 又はセレンテラジンのような基質、及び酸素を必要とする。基質のルシフェリンが発光するには、それがルシフェラーゼ酵素へ供給されなければならない。従って、ルシフェリンを提供する簡便な方法は、ルシフェラーゼだけでなく、基質のデカナルを合成するための生合成酵素を発現させることである。さらに、上記のタンパク質をLuxオペロンから発現する細菌では、生物発光のために外から必要とされる唯一のものは酸素である。

【0094】例えば、土壌細菌の *Xenorhabdus luminescence* (Frackman et al., 1990, *J. Bact.* 172: 5767-5773) から得られるLuxオペロンは、ヘテロ二量体のルシフェラーゼと3種のアクセサリタンパク質という2つのサブユニットの発現を介して光子を発する能力を形質転換された *E. coli* に与えるので (Frackman et al., 1990, 同上)、レポーター遺伝子として使用し得る。

X. luminescence のLux遺伝子を発現する *E. coli* の最適な生物発光は37で観察される (Szittner and Meighen 1990, *J. Biol. Chem.* 265: 16581-16587; Xi et al., 1991, *J. Bact.* 173: 1399-1405) が、これは真核及び他の原核性発光生物に由来するルシフェラーゼの低温最適性と対照的である (Campbell, 1981 *0 hemiluminescence. Principles and Applications in Biology and Medicine* (Chichester, England: Ellis Horwood Ltd. and VCH Verlagsgesellschaft mbH) を参照のこと)。このように、レポーター遺伝子は特定の応用の本質及び要求条件により選択し得る。従って、例えば、*X. luminescence* 由来のルシフェラーゼは、動物を用いた試験のマーカーとしての使用に好適である。

【0095】ルシフェラーゼベクター構築体は、ほとんどの細菌と多くの真核細胞を含む、多種多様な宿主細胞を形質転換する使用に適用し得る。さらに、ヘルペスウイルスやワクシニアウイルスのようなある種のウイルスは、ルシフェラーゼを発現するように遺伝子操作をすることができる。例えば、Kovacs and Mettenlieter, 1991, *J. Gen. Virol.* 72: 2999-3008 は、ホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子のヘルペスウイルスにおける安定した発現について教示する。Brasier and Ron, 1992, *Meth. in Enzymol.* 216: 386-96 は、ルシフェラーゼ遺伝子構築体の哺乳動物細胞における使用を教示する。培養哺乳動物細胞由来のルシフェラーゼ発現は、CCD造影を使用して、巨視的 (Israel and Honigman, 1991, *Gene* 104: 139-145 を参照のこと) にも、微視的

(Hooper et al., 1990, J. Biol. Chem. 265: 123-130 を参照のこと)にも研究されてきた。

【0096】このスクリーニングアッセイにおいて有用であるためには、機能性MC4Rを発現する宿主細胞系は、MC4Rリガンドに対して有意な応答、好ましくはバックグラウンドより5倍以上高い誘導を示すべきである。宿主細胞系は、好ましくは、メラノコルチンペプチドにより誘導される応答を最大化するための多くの特性を有する：(a)低天然レベルのcAMP、(b)MC4Rと相互作用し得るGタンパク質、(c)高レベルのアデニルシクラーゼ、(d)高レベルのプロテインキナーゼA、(e)低レベルのホスホジエステラーゼ、及び(f)高レベルのcAMP応答要素結合タンパク質が有利であろう。メラノコルチンペプチドに対する応答性を高めるために、より多数の好ましい因子を発現するか又は好ましくない因子をより少なく発現するように宿主細胞を加工し得る。さらに、CREレポーターを誘導する他の経路を消去して、基準レベルを低下させることも可能である。

【0097】特定の態様では、MC4R核酸及びレポーター遺伝子を両方含んでなるトランスフェクトされた細胞系を、候補リガンドと37で1時間接触させる。次いで、レポーター遺伝子の発現を測定し、候補リガンドとの接触を除いて同一に処理した細胞の同等なバッチにおけるレポーター遺伝子の発現と比較する。レポーター遺伝子の発現において5倍又はそれ以上の増加を引き起こしている候補リガンドを、潜在的なMC4R作動薬としてさらなる試験のために選択する。このスクリーニングの別バージョンを使用して、MC4Rの潜在的な拮抗薬を同定し得る。このスクリーニングのバージョンでは、トランスフェクトされた細胞を候補拮抗薬と接触させることの前に、この細胞を既知の作動薬(例えば、NDP-MSH)と接触させる。レポーター遺伝子発現において5倍又はそれ以上の減少を引き起こす候補リガンドを、潜在的なMC4R拮抗薬としてさらなる試験のために選択する。

【0098】メラノコルチン受容体群を区別し、MC4Rを選択的に作動するか又は拮抗する化合物を同定することが所望される場合、上記アッセイは、メラノコルチン受容体群(MC1R~MC5R)の1つを発現するようにそれぞれ遺伝子操作された宿主細胞のパネルを使用して実施されるべきである。この目的のために、宿主細胞は、メラノコルチン受容体1~5について知られるアミノ酸配列のいずれかを発現するように遺伝子操作し得る。1種又はそれ以上の生物からそれぞれの受容体をクローニングして特徴づけることについては、例えば、マウスとヒトのMC1R及びMC2R(Mountjoy, 1992, Science 257: 1248-1251; Chhajlani and Wikberg, 1992, FEBS Lett. 309: 417-420); ラットのMC3R(例えば、Roselli-Reh fuss et al., 1993, Proc. Natl. Ac

ad. Sci. USA 90: 8856-8860; Gantz et al., 1993, J. Biol. Chem. 268: 8246-8250 を参照のこと); ネコ及びイヌのMC4R(本明細書に記載); 及びマウスとヒトのMC5R(Chhajlaniet al., 1993, Biochem. Biophys. Res. Commun. 195: 866-873; Gantz et al., 1994, Biochem. Biophys. Res. Commun. 200: 1214-1220)に記載されているが、これらはいずれもそのまま参照により本明細書に組込まれている。従って、上記配列のそれぞれを利用して、本明細書に記載のスクリーニングアッセイにおける使用のためにメラノコルチン受容体の1つを発現する細胞又は細胞系を加工し得る。MC4R活性を特異的又は選択的に調節する化合物を同定するために、MC4Rの活性化、又は活性化の阻害を、他のメラノコルチン受容体に対する試験化合物の効果と比較する。

【0099】他のやり方では、宿主細胞が1種より多いメラノコルチンペプチド受容体を発現するならば、メラノコルチンペプチドに反応してこれら受容体により産生されるバックグラウンドシグナルは、このシグナルから「差引く」べきである(Gantz et al., 1993, 同上)。これら非MC4Rメラノコルチン受容体により産生されるバックグラウンド反応は、アンチセンス、抗体又は拮抗薬によるMC4R活性の消滅を含む、数多くの方法により決定し得る。この点で、野生型CHO細胞では、バックグラウンドから差引かねばならないメラノコルチンペプチドへの内因性の反応が小さいことに注目すべきである。他のやり方では、他のメラノコルチン受容体から貢献される活性は、MC4R特異的リガンドで宿主細胞を活性化するか、又は他のメラノコルチン受容体に特異的な阻害剤を含むことによって消去し得る。

【0100】もう1つの側面では、本発明は、試験化合物がMC4Rの作動薬か又は拮抗薬であるかを判定するためにMC4Rの調製物を使用する、複数のin vitroアッセイを含む。そのようなMC4R調製物は、当技術分野で容易に知られる方法により得ることができる。例えば、Ausubel et al., 1988, 同上、を参照のこと。好ましい態様では、MC4Rの作動薬又は拮抗薬についてのハイスループットスクリーニングを含む、in vitroアッセイにおいて一群の試験化合物が系列的に使用される。このハイスループットスクリーニングでは、この系列における1つのアッセイにより候補作動薬又は拮抗薬として同定された化合物がこの系列における次のアッセイに使用される。この系列における1つのアッセイで候補作動薬又は拮抗薬として同定されない化合物は、この系列における次のアッセイには使用されない。特に好ましい態様では、このin vitroアッセイの系列は、in vitro結合アッセイ、蛍光造影プレートリーダー(以下、「FLIPR(登録商標)」(Molecular Devices、サニヴェイル、CA)アッセイ、cAMP機能性アッセイ、及び候補作動薬又は拮抗薬がM

C1RからMC5Rのいずれと選択的に結合するかを判定するアッセイを含む。上記アッセイのそれぞれを以下に順に説明する。当然ながら、このアッセイ群は以下の記載と異なる順序で実施してよい。

【0101】最初に、イヌ又はネコのMC4R含有HEK293細胞膜との *in vitro* における特異的な結合について化合物をスクリーニングする。そのような *in vitro* アッセイにより、リガンドのMC4Rへの結合を定量化することが可能になるが、これは細胞全体のアッセイを使用すると(MC4Rの内在化及び再環状化のため)達成し得ない。このアッセイでは、当技術分野で周知の方法を使用して上記のようにトランスフェクトした細胞からイヌ又はネコのMC4Rを含有する膜を調製する。特定の、しかし代表的な態様では、Sigma 解離緩衝液を使用して反応試験管に細胞を採取し、遠心分離して、氷冷したホモジェナイゼーション緩衝液(1mM EDTA, 1mM EGTA, 10mM HEPES 及びプロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma P-8340TM), pH=7.5)に再懸濁させる。この再懸濁した細胞を少なくとも10分間氷上でインキュベートして、次いで、密着ガラス/ガラス式dounceホモジェナイゼーを20ストロークしてホモジェナイズする。この細胞抽出液を4で10分間1000×Gで遠心分離し、核と未溶解細胞をペレット状にする。上澄液の分画を新しい試験管に移し、4で20分間、25000×Gで遠心分離し、原形質膜をペレット状にする。この遠心分離の上澄液分画を捨て、ペレットをホモジェナイゼーション緩衝液に再懸濁し、密着ガラス/ガラス式dounceホモジェナイゼーの20ストロークでホモジェナイズし、このホモジェネートを4で20分間、25000×Gで遠心分離することによって洗浄する。再び上澄液を捨て、1~5mg/mlのタンパク質濃度を生じるのに十分な量のホモジェナイゼーション緩衝液に再懸濁する。長期保存用に500µlのアリコートをして-70で冷凍する。抽出物のタンパク質濃度は当技術分野で知られている方法を使用して決定し得る。例えば、アリコートを5~10倍に希釈して、BCAキット(Pierce, ロックフォード、Ill.)を使用し得る。

【0102】次いで、この膜調製物を実際のMC4R結合アッセイにかけて、イヌ又はネコのMC4Rに結合する試験化合物を同定する。この結合アッセイでは、試験化合物の存在又は不在下において標識リガンドとともに膜をインキュベートする。この受容体に結合し、膜への結合について標識リガンドと競合する化合物は、担体対照サンプルと比較してシグナルを減少させる。

【0103】好ましい態様では、放射標識したNDP-MSH、融解したイヌ又はネコのMC4R/HEK293膜、及び非標識試験化合物をアッセイ緩衝液(50mM HEPES, 5mM MgCl₂, 0.1% BSA

及びプロテアーゼ阻害剤カクテル(Sigma P-8340TM), pH=7.5)に再懸濁させ、NDP-MSHの最終濃度が0.05nMになるように混合し、37で1時間インキュベートする。ポリエチルミン(シグマ-アルドリッチ社、セントルイス、MO)で処理したUNIFILTER(登録商標)GF/C(登録商標)96穴マイクロプレート(パカード・インストルメント社、メリデン、CT)上に膜分画を採取することによってこの結合反応を停止させる。シンチラントを加え、計数装置を利用する。アッセイは96穴プレートフォーマットにおいて実施し得る。非標識の試験化合物を0.01nM~20000nMの濃度範囲で試験し、IC₅₀値を決定する。好ましくは、最初の結合スクリーニングで「ヒット」する(即ち、K_d<10µMでMC4Rに結合する)化合物を、IC₅₀及び/又はK_d値を決定するための7点用量-滴定アッセイにおいて再試験する。この結合アッセイにおいて強力な結合を示す候補化合物を、以下のアッセイで機能活性についてスクリーニングする。

【0104】MC4R作動薬及び拮抗薬についての代替的な *in vitro* 結合アッセイでは、可溶性のMC4Rを組換え的に発現し、無細胞ベースのアッセイにおいて利用して、MC4Rに結合する化合物を同定し得る。以下の記載のように製造したMC4Rの1つ又はそれ以上のECDを含有する組換え的に発現したMC4Rポリペプチド又は融合ペプチドを、無細胞ベースのスクリーニングアッセイに使用し得る。他のやり方では、MC4Rの1つ又はそれ以上のCDに対応するペプチド、又はMC4Rの1つ又はそれ以上のCDを含有する融合タンパク質を無細胞ベースのアッセイ系において使用して、MC4Rの細胞質部分に結合する化合物を同定することができるが、そのような化合物は、MC4Rのシグナル伝達経路をモジュレートするのに有用であり得る。無細胞ベースのアッセイでは、組換え的に発現させたMC4Rを、当業者によく知られている手段により試験管、マイクロタイターウェル又はカラムのような固形の基質に付着させることができる。Ausubel et al., 同上を参照のこと。次いで、MC4Rに結合する能力について試験化合物をアッセイする。

【0105】第二のアッセイとして、上記結合アッセイにおいてMC4Rと強力に結合することが確認された候補化合物についてFLIPR(登録商標)アッセイを実施する。MC4Rタンパク質はGタンパク質共役型受容体(以下、「GPCR」)ファミリーのメンバーであるので、このアッセイは、機能性Gタンパク質に共役するスクリーニングを含むように設計されている。好ましい態様では、特定のGタンパク質の使用により、MC4RをホスホリパーゼC(以下、「PLC」)経路に連結させる。Gタンパク質は、天然に存在する「乱雑な」Gタンパク質、即ち、複数のGPCRタイプをPLC経路へ

連結させ得るGタンパク質 (Offermans et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 15175-15180) であるか、又は、それは選択されたGPCRをPLC経路へ連結させるように設計された、修飾されたキメラGタンパク質であり得る (Conklin et al., 1996, Molecular Pharmacology 50: 885-890)。作動薬又は拮抗薬によるGPCRの活性化又は阻害は、PLCの活性化又は阻害により引き起こされる細胞内カルシウムレベルの変化を測定することによって、上記アプローチのいずれかを使用して測定し得る。

【0106】特定の、しかし代表的な態様では、当技術分野で周知の技術を使用して、cMC4Rを発現するHEK293aの安定な細胞系を培養基 (DMEM, 10% FBS, ペニシリン/ストレプトマイシン100ユニット、GENETICIN (登録商標) (GIBCO BRL, ロックビル, MD) 300 mg/ml) において増殖させ、2つの異なるGタンパク質遺伝子、G15及びG16 (図12及び13参照) を担うベクターでトランスフェクトし、ZEOCIN™ (Invitrogen, Carlsbad, CA) 300 µg/ml を含有する細胞培養液を使用して上記DNAの安定的な取込みについて選択する。他のやり方では、キメラGタンパク質 (例えば、最後の5個のアミノ酸がGs由来のそれで置換されているGである、Gqi5) を含有するベクターを産生し、使用し得る。単一のクローンコロニーを選択し、クローニングシリンドラ (シグマ-アルドリッチ社、セントルイス、MO) を使用して拡張する。以下に示すように、FLIPR (登録商標) アッセイを使用して、取込まれた乱雑Gタンパク質と共役し得る受容体の能力について個々のクローンを試験する。G15及びG16が乱雑Gタンパク質として知られているのは、任意のGタンパク質受容体と機能的に共役し、シグナルを伝達して細胞内カルシウムを増加させる、その能力のためである。FLIPR (登録商標) 装置 (Molecular Devices, サニーヴェイル, CA) は、市販の蛍光色素を使用してそのようなカルシウムシグナル伝達カスケードを定量化することを可能にする。

【0107】HEK293a/cMC4R/G15, G16を集密状態にまで増殖させ、トリプシン-EDTA (GIBCO-BRL, ロックビル, MD) を用いて採取する。ZEOCIN™ 300 µg/ml を含有する新鮮な培養基において細胞を再懸濁する。血球計を使用してこの細胞懸濁液を計数し、ポリ-d-リジンで被覆した黒/透明色の96穴プレート (Becton Dickinson Labware, ベッドフォード, MA) へ、各ウェルにつき約50,000個の細胞を加える。薬48時間の培養後、増殖培地を吸引し、96穴プレートあたり25 µgのカルシウム感受性蛍光色素Fluo-4 (Molecular Probes, ユー

ジーン、OR) 及びプロベネシド2.5 mM (シグマ-アルドリッチ社、セントルイス、MO) を含有する無血清培地で置換する。このプレートを37で1時間インキュベートした後、過剰の色素を除去するために、プロベネシド2.5 mMを含有するHepes Saline溶液で3回洗浄する。次いで、このプレートをFLIPR (登録商標) へそれぞれ加え、蛍光レベルを2分間にわたり連続的にモニターする。(拮抗薬の存在又は不在下で) 候補作動薬、又は(作動薬の存在又は不在下で) 候補拮抗薬を、ベースラインを記録してから20秒後に、96穴のそれぞれへ同時に加える。各化合物につき、実施するならば、6点の用量-滴定アッセイとする。蛍光の増加は、細胞内カルシウムレベルの上昇を示す。EXCEL™ (マイクロソフト、レドマン、WA) へのASCIIファイルとして経時変化を明らかにし、引継いで分析する。細胞内カルシウムレベルを上昇させる作動薬の候補物質、又は細胞内カルシウムレベルを低下させる拮抗薬の候補物質を次の試験のために選択する。

【0108】第三のアッセイとして、上記のFLIPR (登録商標) アッセイにより同定された候補作動薬又は拮抗薬を試験するために、cAMP機能アッセイを実施する。当技術分野で知られている任意のcAMP機能アッセイを使用してよい。このアッセイは、その作動薬リガンドにより活性化されたときにcAMP蓄積を促進する受容体であるMC4Rの特徴に基づいている。候補化合物と接触した安定したイヌ又はネコのMC4R発現HEK293細胞系により産生されるcAMPを直接測定することで、当該化合物がMC4R作動薬であるか又は拮抗薬であるかを判定し得る。

【0109】特定の、しかし代表的な態様では、アデニルシクラーゼ活性化FLASHPLATE™アッセイ (NEN (登録商標) Life Science Products, Inc., ボストン, MA) を使用して、cAMPアッセイを実施する。Sigma解離緩衝液を使用して、MC4Rでトランスフェクトした細胞系を採取し、遠心分離し、刺激緩衝液 (キットで提供される) において再懸濁する。この再懸濁した細胞集団を、血球計を使用して計数する。遠心分離により再び細胞をペレット化し、刺激緩衝液で0.5~5x10⁶細胞/mlへ再懸濁する。同一3検体でウェルへ様々な量を入れることによって細胞量を滴定する。それぞれの試験される細胞濃度につき、候補作動薬又は拮抗薬全体の用量滴定を実施する。NDP-MSH又は-MSHのような既知の作動薬を陽性対照として使用し得る。作動薬の刺激時間も15~45分に変化させる。作動薬の刺激を停止させるために、全ウェルへ、適当な時点で検出ミックスを加える。各プレートにカバーをかけ、室温で20時間インキュベートし、次いでシンチレーション計数用のWallac 1450 MICROBETA™多量

検出器 (PerkinElmer Life Sciences, ゲイサーブルグ、MD) に入れる。cAMP SPA™キット (RPA5511mersham Pharmacia Biotech, Inc., ピスカタウェイ、NJ) のような他のcAMPアッセイキット、又は他のベンダーによる他のキットも使用し得る。

【0110】第四のアッセイでは、MC4Rの候補作動薬又は拮抗薬がMC4R又はMC3Rに選択的に結合するかどうかを決定するために、当技術分野で知られている方法を使用して試験し得る。好ましい態様では、先述のin vitro結合及び機能性スクリーニングにおいて効力を示す候補作動薬又は拮抗薬を、MC3R受容体に対するMC4R受容体への結合の選択性についてアッセイする。MC4Rを発現する1つの細胞系とMC3Rを発現するもう1つの細胞系を、上記のようなHEK293細胞系を使用して創出する。これらトランスフェクトされた細胞系、細胞全体及び膜分画のそれぞれについて、上記のように結合アッセイを実施する。受容体の数やリガンド親和性についてより徹底的に研究し、現今の方法及び文献値に比較するために、膜分画を使用する飽和結合試験を実施する。BCAタンパク質アッセイキットを使用して、特定の膜調製物のタンパク質濃度へ正規化し得るように、各調製物のタンパク質濃度を定量する。各膜分画調製物には、(全タンパク質の量により測定される)一定量の膜分画を使用する(MC4Rを発現する細胞系に由来する膜分画では、この量はタンパク質30µg; MC3Rを発現する細胞系に由来する膜分画では、この量は70µgである)。放射活性で標識した様々な量の候補作動薬又は拮抗薬において滴定することによって、飽和結合等温線(isotherm)を決定する。MC4R又はMC3Rに対する候補作動薬又は拮抗薬の結合についての解離定数(以下、「 K_d 」)と膜タンパク質1mgあたりの最大特異結合部位数(以下、「 B_{max} 」)を、ソフトウェアパッケージのGraphPad Prism(登録商標)(GraphPad Software Inc., サンディエゴ、CA)を使用する飽和結合等温線と非線形回帰分析により決定する。直線状のスキッチャードラインは、それぞれの膜調製物が放射活性リガンドについて単一のアフィニティーを有する受容体の集団を含有することを証明する。

【0111】細胞をベースとするin vitroアッセイも、転写又は翻訳のいずれかのレベルでMC4Rの発現をモジュレートする化合物をスクリーニングするために設計し得る。1つの態様では、レポーター遺伝子(上記参照)をコードする核酸をMC4R遺伝子の調節要素に連結させ、適切なインタクト細胞、細胞抽出物又は溶解物において使用して、MC4R遺伝子の発現をモジュレートする化合物を同定し得る。適切な細胞又は細胞抽出物は、MC4R遺伝子を正常に発現する任意の細胞型から調製され、それにより、この細胞抽出物がin vitro

又はin vivoの転写に必要な転写因子を含有することを保証する。このスクリーニングは、レポーター構築物の発現をモジュレートする化合物を同定するためにも使用し得る。そのようなスクリーニングでは、レポーター遺伝子の発現レベルを試験化合物の存在下で決定し、試験化合物の不在下での発現レベルと比較する。

【0112】MC4Rの翻訳をモジュレートする化合物を同定するには、MC4R転写物を含有する細胞又はin vitroの細胞溶解物をMC4R・mRNAの翻訳のモジュレーションについて試験し得る。MC4R翻訳の阻害剤についてアッセイするために、in vitro翻訳抽出物におけるMC4R・mRNAの翻訳をモジュレートする能力について、試験化合物をアッセイする。

【0113】MC4R発現のレベルを転写又は翻訳のいずれかのレベルで減少させる化合物は、食欲不振や悪液質のような減退した食欲に関連する障害の治療に有用であり得る。対照的に、MC4Rの発現を増加させる化合物は、肥満のような亢進した食欲に関連する障害の治療に有用であり得る。

【0114】上記のアッセイにより、MC4Rの活性に影響を及ぼす化合物を同定することが可能である。例えば、MC4Rの活性に影響を及ぼす化合物には、限定しないが、MC4Rに結合し、天然のリガンドの結合を阻害し、シグナル伝達を活性化する(作動薬)又は活性化を阻害する(拮抗薬)化合物、及び天然のMC4Rリガンドに結合してリガンド活性を中和する化合物が含まれる。(完全長であるか又は先端が切れた形態のMC4Rの発現がモジュレートされ得るように、転写に影響を及ぼすか又はスプライシング反応に干渉する分子、例えばタンパク質又は有機低分子を含め、MC4Rの遺伝子発現に影響を及ぼすことによって)MC4R遺伝子の活性に影響を及ぼす化合物も、本発明のスクリーニングを使用して同定し得る。しかしながら、上記のアッセイがMC4Rのシグナル伝達をモジュレートする化合物(例えば、MC4Rへのシグナル結合によって活性化されるシグナルを伝達することに関与するGタンパク質活性の阻害剤又はエンハンサーのような、下流のシグナル伝達反応に影響を及ぼす化合物)を同定し得ることも銘記すべきである。MC4Rのシグナル伝達反応の下流に影響を及ぼし、体重障害の発達に対するMC4Rの効果をモジュレートするような化合物の同定及び使用も本発明の範囲内にある。ある事例では、Gタンパク質共役型受容体の応答が、リガンドに長い間曝露されると減退するか又は脱感作されることが観察されている。本発明の態様では、種々のアッセイを利用してMC4Rの脱感作を妨げる化合物を同定し得る。そのような化合物はMC4Rの活性を維持するために使用される場合があり、食欲障害を処置する治療法の一部として使用し得る。

【0115】本明細書に記載したようなアッセイを介して同定される化合物は、例えば、MC4R遺伝子産物の

生物学的機能を詳しく検討したり、動物の食欲障害及び代謝障害を改善するのに有用であり得る。細胞性スクリーニングにおいて同定される化合物の効力を試験するアッセイは、食欲障害の動物モデル系において試験し得る。そのような動物モデルは、動物、例えばネコ、イヌ及び家畜動物におけるそのような障害を治療することに有効であり得る薬剤、製剤、治療法及び介入を同定するための試験基質として使用し得る。例えば、動物モデルは、食欲障害の症状を改善する能力を示す可能性がある化合物に、それに曝露される動物における食欲障害症状の改善を誘導するのに十分な濃度と十分な時間、曝露し得る。この曝露に対する動物の応答は、悪液質や肥満のような食欲障害に関連した症状の逆転を評価することによって監視し得る。介入に関して言えば、食欲障害様の症状のどんな側面でも逆転させる処置は、動物、特にネコ、イヌ及び家畜動物における食欲障害の治療的介入の候補とみなすべきである。試験薬剤の用量は、以下に論じるような用量-応答曲線を導くことによって決定し得る。

【0116】動物モデルは、MC4Rの遺伝子産物を過剰に発現する動物であり得る。限定しないが、マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ミニブタ、ヤギ、ウシ、及び非ヒト霊長類（例えばヒヒ、サル及びチンパンジー）を含む、任意の動物種がMC4Rのトランスジェニック動物を産生するために使用し得る。そのサイズが比較的小さいこと、世話が容易なこと、世代時間が短いこと、遺伝子組成が詳しく研究されていること、及び実験室での飼育条件がよく知られていることのために、特に好ましいのはトランスジェニックマウス及びラットである。

【0117】当技術分野で知られている任意の技術を使用して、トランスジェニック動物の創立系を産生するために、MC4Rトランス遺伝子を動物へ導入し得る。そのような技術には、限定しないが、前核マイクロインジェクション (Hoppe and Wagner, 1989, 米国特許第4, 873, 191号を参照のこと) ; レトロウイルスが介在した、生殖細胞系列への遺伝子導入 (Van der Putten et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6148-6152 を参照のこと) ; 胚性幹細胞における遺伝子ターゲティング (Thompson et al., 1981 Cell 56: 313-321) ; 胚のエレクトロポレーション (Lo, 1983, Mol Cell Biol. 3: 1803-1814) ; 及び精子介在性の遺伝子導入 (Lavitrano et al., 1981 Cell 57: 717-723)、等が含まれる。そのような技術の概説としては、Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171-179 を参照のこと。これはそのまま参照により本明細書に組込まれている。

【0118】本発明は、その細胞の全部にMC4Rトランス遺伝子を担うトランスジェニック動物、並びにその細胞の全部ではなく一部にトランス遺伝子を担う動物、

つまり、モザイク動物を提供する。トランス遺伝子は、単一のトランス遺伝子としてか、又はコンカテマーにおいて、例えば、先端-先端又は先端-末端のタンデムリピートで取込まれ得る。トランス遺伝子はまた、例えば、Lasko et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6232-6236 の教示に従うことによって、特定の細胞型へ選択的に取込まれ、活性化され得る。そのような細胞型特異的な活性化に必要な調節配列は、関心対象となる特定の細胞型に依存するものであり、当業者には明らかであろう。MC4Rのトランス遺伝子を内因性MC4R遺伝子の染色体部位へ組込むことが所望される場合は、遺伝子ターゲティングが好ましい。簡潔に言えば、そのような技術が利用されるときは、内因性MC4R遺伝子に同一なヌクレオチド残基を高比率に有する配列及び/又はその遺伝子に隣接する配列を有する核酸を含有するベクターが、染色体配列との相同的組換えを介して内因性MC4R遺伝子を組込み、その機能を妨害することのために設計される。トランス遺伝子はまた、例えば Gu et al., 1994, Science 265: 103-06 の教示に従えば、特定の細胞において選択的に発現され、その細胞型においてのみ内因性MC4R遺伝子を同時に不活性化する。そのような細胞型特異的な組換えに必要な調節配列は、関心対象となる特定の細胞型に依存するものであり、当業者には明らかであろう。

【0119】創始動物が産生されたなら、サザンブロット分析又はPCR技術のような標準技術を使用して動物の組織を分析し、トランス遺伝子の取込みが起こったかどうかを判定する。創始動物の組織におけるトランス遺伝子のmRNA発現レベルも、限定しないが、その動物から入手したサンプルのノーザンブロット分析、in situ ハイブリダイゼーション分析、及びRT-PCRといった技術を使用して評価し得る。MC4R遺伝子を発現する組織のサンプルはまた、MC4Rトランス遺伝子産物に特異的な抗体を使用して、免疫細胞化学的にも評価し得る。

【0120】例えば、MC4Rカスケードにおける下流のシグナル伝達タンパク質を活性化し、それにより欠損MC4Rを回避することによって、活性化されたMC4Rにより伝達されるシグナルを刺激するか又は増強する、上記のアッセイにより同定される化合物は、以下に記載するように、体重減少を達成するために使用し得る。投与の製剤及び様式は化合物の物理化学的性質に依存する。この投与には、血液脳関門の通過を考慮する既知の技術が含まれるべきである。

【0121】本発明のMC4Rの活性をモジュレートする化合物の供給源MC4Rの作動薬又は拮抗薬活性についての上記アッセイを使用して試験され得る化合物には、限定しないが、例えばランダムペプチドライブラリーのメンバーを限定せずを含む、可溶性ペプチドのようなペプチド（例え

ば、Lam et al., 1991, Nature 354: 82-84; Houghten et al., 1991, Nature 354: 84-86 を参照のこと) ; 及び、D - 及びノ又は L - 配置のアミノ酸からなるコンビナトリアルケミストリー由来の分子ライブラリー、ホスホペプチド (限定しないが、ランダム又は部分的に縮重した指定のホスホペプチドライブラリーを含む) (例えば、Songyang et al., 1993, Cell 72: 767-78 を参照のこと)、抗体 (ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、抗イディオタイプ、キメラ又は単鎖の抗体、及び F A b、F (a b ')₂ 及び F A b 発現ライブラリーフ

ラグメント、及びそのエピトープ結合フラグメントを限定せずに含む)、M C 4 R の E C D (又はその部分)、及び天然のリガンドに結合して「中和」する抗体、及び有機又は無機の低分子が含まれる。
【0122】本発明によりスクリーニングされ得る他の化合物には、血液脳関門を通過し、適切な細胞へのエン

トリーを獲得し、M C 4 R 遺伝子又は M C 4 R シグナル伝達経路に関わる他の遺伝子の発現に (例えば、遺伝子発現に関わる調節領域又は転写因子と相互作用することによって) 影響を及ぼすことができる有機の低分子 ; 又は M C 4 R の活性又は、例えば M C 4 R 結合性 G タンパク質のような、M C 4 R シグナル伝達経路に関わる他の細胞内因子の活性に影響を及ぼすような化合物が、限定されずに含まれる。
コンピュータモデリングを使用するリガンドの同定
コンピュータモデリングと検索技術により、M C 4 R の発現又は活性をモジュレートし得るリガンドの同定、又はすでに同定されたリガンドの改良が可能になる。リガンドを同定すると、その活性部位又は領域が同定され

る。活性部位は、典型的には、M C 4 R 結合部位であり得る。活性部位は、例えば、リガンドがペプチドであればアミノ酸配列を、それが核酸であればヌクレオチド配列を試験すること、又は化合物又は組成物の M C 4 R との複合体について試験することを含む、当技術分野で知られている方法を使用して同定し得る。後者の場合、リガンドと M C 4 R がどこで互いに接触するかを見出すことによって活性部位を見つけるために、複合体の化学的試験又は X 線結晶解析試験を使用し得る。
【0123】次に、リガンドの活性部位の 3 次元的幾何学が決定される。このことは、X 線結晶解析を含む、完

全な分子構造を決定し得る既知の方法によりなし得る。一方、ある種の分子間距離を決定するには、固相又は液相の NMR を使用し得る。構造決定の他の実験法も部分的又は完全な幾何学的情報を得るために使用し得る。活性部位のジオメトリーは、リガンドが M C 4 R、又は別の結合パートナーと複合して、測定

の精度を向上させるか又はその正確性を向上させることができる。タンパク質又は核酸のような特定の生体高分子に特有のパラメーター化モデル、分子運動の計算をもとにした分子動態モデル、熱アンサンブルに基づいた統計力学モデル、又は上記を組み合わせモデルを含む、認知されたモデリング法を使用し得る。ほとんどのタイプのモデルで、構成する原子及び基の間の様々な力を表す標準的な分子の力場が必要であり、物理化学において知られている力場から選択され得る。不完全であるか又はあまり正確でない実験構造も、これらモデリング法により計算される完全でより正確な構造に対する束縛事項として役立つ。

【0125】最後に、リガンドの活性部位の構造を決定した後で、様々な化合物とその分子構造についての情報を含むデータベースを検索することによって、候補リガンドを同定し得る。この検索では、リガンドの活性部位構造に同一であるか又は類似した構造を有する化合物が求められる。そのような検索はマニュアルでも可能であるが、好ましくはコンピュータで支援される。この検索で同定される化合物は、潜在的な M C 4 R 作動薬又は拮抗薬である。

【0126】他のやり方では、すでに知られているものを改良した作動薬又は拮抗薬を創出するために、上記の方法を使用し得る。既知の作動薬又は拮抗薬の組成を修飾し、上記の実験及びコンピュータモデリング法を使用して、修飾の構造的影響を決定する。修飾した作動薬又は拮抗薬を M C 4 R に結合させること、又は M C 4 R 依存性のシグナル伝達に対するその効果を、元の作動薬又は拮抗薬のそれと比較する。上記の方法を使用して、既知の作動薬又は拮抗薬の体系的な変更 (例えば、特定の側鎖基の体系的な変更) をすぐに評価して、特異性又は活性が改善された、修飾された作動薬又は拮抗薬を得ることができる。上記工程の 1 つ又はいくつかを連続的に繰り返し、さらに有効な M C 4 R 作動薬又は拮抗薬を同定するか又は創出することが可能になる。

【0127】M C 4 R の活性部位、及び関連する伝達及び転写因子の活性部位の同定に基づいた、M C 4 R の作動薬又は拮抗薬を同定するのに有用なさらなる実験及びコンピュータモデリング法は、当業者に明らかである。

【0128】分子モデリングシステムの例は、CHARMTM及びQUANTATMプログラム (Polygen Corporation, ウォルサム, MA) である。CHARMTMは、エネルギー最少化及び分子動態の関数を実行する。QUANTATMは、分子構造の構築、グラフィックモデリング及び解析を実行する。QUANTATMは、分子相互の挙動に関する相互構築、修飾、視覚化及び解析を考慮する。

【0129】特定のタンパク質と相互作用する薬物のコンピュータモデリングは、Rotivinen, et al., 1981 0

ta Pharmaceutical Fennica 97: 159-166; Ripka, 1988, New Scientist 118: 54-57; McKinaly and Rossman, 1981 Innu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29: 111-122; Perry and Davies, 1989, OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design pp. 189-193 Alan R. Liss, Inc.; Lewis and Dean, 1989, Proc. R. Soc. Lond. 236: 125-140 and 141-162; 及び(核酸成分のモデル受容体については)、Askew, et al., 1989, J. Am. Chem. Soc. 111: 1082-1090 のような、数多くの論文に解説されている。化学品をスクリーニングしてグラフィックに表現する他のコンピュータプログラムが、BioDesign, Inc. (パサデナ、CA)、Allelix, Inc. (ミシソーガ、オンタリオ、カナダ) 及び Hypercube, Inc. (ケンブリッジ、オンタリオ、カナダ) のような企業から提供されている。これらは、特定のタンパク質に特異的な薬物への応用のために主に設計されているが、領域が同定されれば、DNA 又は RNA の領域に特異的な薬物の設計にも適用し得る。

【0130】MC4Rペプチド

本発明のもう1つの側面では、イヌ又はネコのMC4Rタンパク質、ポリペプチド及びペプチドフラグメント、そのMC4Rの突然変異、先端切れ又は欠失した形態及び/又はMC4Rの融合タンパク質が様々な使用のために製造されるが、それには、動物における食欲調節に関わる他の細胞性遺伝子産物を同定する診断アッセイにおける試薬として、動物における食欲障害の治療に使用し得る化合物をスクリーニングするためのアッセイにおける試薬として、及び動物における食欲障害の治療に有用なMC4Rに関する製剤試薬として抗体を産生することが限定せずに含まれる。

【0131】MC4Rの1つ又はそれ以上のドメインに対応するペプチド(例えば、ECD、TM又はCD)、先端切れか欠失しているMC4R(例えば、1つ又はそれ以上のECD、TM及び/又はCDが欠失しているMC4R)、並びに完全長のMC4R、MC4Rペプチド又は先端切れMC4Rが無関係なタンパク質に融合している融合タンパク質も、本発明の範囲内にある。そのような可溶性ペプチド、タンパク質、融合タンパク質、又は循環しているMC4Rの天然リガンドに結合して「中和」する抗体(抗イディオタイプ抗体も含む)が、以下に示すように、食欲増進を実現するために使用し得る。この目的のために、MC4Rの各ECDに対応するペプチド、可溶性のMC4R欠失突然変異体(例えば、TM突然変異体)、又はMC4Rの全ECD(以下に示すように、4種のECDを連結することによって加工される)を、別のポリペプチド(例えば、IgFcポリペプチド)に融合し得る。MC4R又はMC4R・ECDのIgFcポリペプチドへの融合は、調製物の安定性を高めるだけでなく、in vivo におけるMC4R-Ig融合

タンパク質の半減期及び活性を高めるものである。融合タンパク質のIg部分のFc領域は、免疫グロブリンのエフェクター機能を低減させるようにさらに修飾してよい。

【0132】そのようなペプチド、ポリペプチド又は融合タンパク質は、組換えDNA技術により製造し得る。例えば、曲がりくねったMC4RのECDにある4種のドメインの1つ又はそれ以上をコードする核酸は、合成されるか又はクローン化されて、MC4Rの可溶性ECDをコードするようにもに連結し得る。4種のECD(図1及び2のECD1~4)の1つ又はそれ以上をそれぞれがコードする、2つ又はそれ以上の核酸は、直接的にか、又はペプチドスペーサーをコードするリンカーオリゴヌクレオチドを介して連結し得る。このリンカーは、柔軟で、グリシンが多いポリペプチドをコードし得て、それにより、ともに結ばれているECDがMC4Rリガンドに結合し得るコンホメーションをとることを可能にする。他のやり方では、ECD内の各ドメインをコードする核酸を使用して、MC4Rから派生するペプチドを発現し得る。

【0133】上記のポリペプチドを産生するMC4Rの適切な領域をコードする核酸を発現させるために、多種多様な宿主-発現ベクター系を利用し得る。生成するペプチド又はポリペプチドが可溶性の誘導体(例えば、ECDに相当するペプチド; 先端切れ又は内部欠失のMC4R)である場合、このペプチド又はポリペプチドは培養基から回収し得る。ポリペプチド又はタンパク質が分泌されない場合、MC4Rの生成物は、宿主細胞それ自体から回収され得る。

【0134】この宿主-発現ベクター系には、MC4R又は機能的同等物を in situ で、つまり細胞膜内に留まったまま発現するように加工された宿主細胞も含まれる。そのような発現系からのMC4Rの精製又は濃縮は、好適な界面活性剤及び脂質ミセルと当業者によく知られた方法を使用して達成し得る。しかしながら、そのような加工された宿主細胞そのものは、MC4Rの構造及び機能上の特徴を保持することだけでなく、例えば薬物スクリーニングアッセイ(上記参照)において生物学的活性を評価することも重要である状況において使用し得る。

【0135】融合タンパク質は、発現される融合タンパク質に特異的な抗体を利用することによって容易に精製し得る。例えば、そのような1つの系は、ヒト細胞系において発現される非変性融合タンパク質の速やかな精製を可能にする(Janknecht, et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8972-76 を参照のこと)。この系では、6つのヒスチジン残基からなるアミノ酸末端タグに関心対象の遺伝子のオープンリーディングフレームが翻訳可能に融合されるように、その遺伝子がワクシニア組換えプラスミドへサブクローン化される。組換えワク

シニアウイルスで感染した細胞の抽出物をNi²⁺ニトリロ酢酸-アガロースカラムにロードし、ヒスチジン-タグ付きタンパク質をイミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出させる。

【0136】MC4R抗体

さらにもう1つの側面では、ネコ又はイヌMC4Rの1つ又はそれ以上のエピトープ、又はMC4R保存変異体又はMC4Rペプチドフラグメントのエピトープを特異的に認識する抗体も本発明に含まれる。そのような抗体には、限定しないが、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)、ヒト化又はキメラ抗体、短鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fab発現ライブラリーにより産生されるフラグメント、抗イディオタイプ(抗Id)抗体、及び上記のいずれかのエピトープ結合性フラグメントが含まれる。

【0137】本発明の抗体は、例えば、生物学的サンプルにおけるMC4Rの検出において使用し得るので、従って、異常な量のMC4Rについて動物を試験し得る診断又は予後の技術の一部として利用し得る。抗体はまた、例えば上記のような化合物スクリーニング計画とともに、MC4R遺伝子産物の発現及び/又は活性に対する試験化合物の効果を評価するために利用し得る。さらに、抗体は、以下に示すようなトランスジェニック技術とともに、例えば、正常であるか及び/又は加工したMC4R発現細胞を動物被検者へ導入する前に評価するために使用し得る。さらに、抗体は、異常なMC4R活性を阻害するための方法として使用し得る。つまり、上記抗体は、食欲障害の治療法の一部として利用し得る。

【0138】抗体を産生するには、MC4R、MC4Rペプチド(例えば、ECD、TM又はCDのような、受容体の機能性ドメインに対応するもの)、先端切れMC4Rポリペプチド(即ち、1つ又はそれ以上のドメイン、例えばTM又はCDが欠失しているMC4R)、MC4Rの機能的同等物又はMC4Rの突然変異体を用いた注射により、宿主動物を免疫化し得る。宿主動物は、例えば、ヤギ、ウサギ、マウス、ハムスター又はラットである。宿主の種によっては、免疫応答を高めるためにアジュバントを使用してよい。アジュバントは、例えば、フロイント(完全及び不完全)アジュバント、鉱質ゲル(例えば、水酸化アルミニウム)、リソレシチンのような界面活性物質、多価(pluronic)ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性乳剤、アオガイヘモシアニン、ジニトロフェノール、及びカルメット-ゲラン菌(以下、「BCG」)やコリネバクテリウム・パルブムのような潜在的に有用なヒトアジュバントであり得る。

【0139】ポリクローナル抗体は、免疫化した動物の血清に由来する異質な抗体分子の集団である。モノクローナル抗体(以下、「mAb」)は、均質な抗体の集団である。特定の抗原に対するmAbは、継代した培養細胞系による抗体分子の産生を提供する任意の技術により

産生し得る。これらの技術には、限定しないが、Kohler and Milstein, 1975, Nature 256: 495-497; 及び米国特許第4,376,110号のハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72; Cole et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030)、及びEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp77-96を参照のこと)が含まれる。抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDを含む任意の免疫グロブリンクラス、及びそれらの任意のサブクラスであり得る。本発明のmAbを産生するハイブリドーマは、in vitro 又は in vivo で培養し得る。in vivoで高力価のmAbが産生されるので、これが現在は好ましい産生法である。

【0140】さらに、「キメラ抗体」(Morrison et al., 1984, Pro. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604-608; Take da et al., 1985, Nature 314: 452-454を参照のこと)の産生に開発された技術も使用し得る。キメラ抗体は、異なる動物種由来の部分を含んでなる分子であり、マウスmAb由来の変部とヒト免疫グロブリンの定常部を有するようなものである。キメラ抗体は、好適な抗原特異性を有するマウス抗体分子の遺伝子を、好適な生物学的活性を有するヒト抗体分子の遺伝子と再接合させることによって、産生し得る。

【0141】他のやり方では、単鎖抗体(米国特許第4,946,778号; Bird, 1988, Science 242: 423-26; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 85: 5879-83; 及びWard et al., 1989, Nature 334: 544-546を参照のこと)の産生について記載された技術を適用して、MC4R遺伝子産物に対する単鎖抗体を製造し得る。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖及び軽鎖フラグメントをアミノ酸架橋により連結し、単鎖ポリペプチドを生成して形成される。

【0142】特定のエピトープを認識する抗体フラグメントは既知の技術により産生し得る。例えば、この抗体フラグメントは、例えば抗体分子のペプシン消化から生じるF(ab')₂フラグメントの1つ、又はF(ab')₂フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって産生されるFabフラグメントの1つであり得る。他のやり方では、所望の特異性を有するモノクローナルFabフラグメントの迅速かつ容易な同定を可能にするために、Fab発現ライブラリーを構築し得る(Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281を参照のこと)。

【0143】次いで、MC4Rに対する抗体は、当業者に周知の技術(例えば、Greenspan and Bona, 1993, FASEB J. 7: 437-444; 及びNissinoff, 1991, J. Immunol. 147: 2429-2438を参照のこと)を使用して、MC4

Rを「模倣する」抗イディオタイプ抗体を産生するために利用し得る。例えば、MC4RのECDに結合し、メラノコルチンのMC4Rへの結合を競合的に阻害する抗体を使用して、ECDを「模倣し」、従って、メラノコルチンに結合してそれを中和する抗イディオタイプを産生し得る。中和作用のある抗-イディオタイプ(又は抗イディオタイプのFabフラグメント)は、被検動物においてネーティブリガンドを中和して食欲増進を促進する治療法に使用し得る。

【0144】他のやり方では、MC4Rの作動薬として作用するMC4Rへの抗体を産生し得る。この抗体は、MC4Rに結合して、そのシグナル伝達活性を活性化する。この抗体は、被検動物において肥満のような食欲関連障害を治療するのに特に有用である。さらに、MC4Rの拮抗薬として作用する、即ち、MC4R受容体の活性化を阻害する抗体は、被検動物において食欲不振や悪液質のような食欲関連障害を治療するために使用し得る。

【0145】本発明の方法により同定される化合物を使用した食欲関連障害の治療

本発明には、食欲及び/又は代謝率を変化させ、肥満、悪液質、食欲不振、生殖不能、内毒素血症、発熱、腎不全、肝脂質症、離乳誘導性の無食欲及び成長遅延、癌、感染、炎症及び乳汁分泌を限定せずに含む、食欲及び/又は代謝率に関連した障害を治療するための方法及び組成物が含まれる。正常なMC4R機能が欠損すると肥満表現型の発達を生じるので、MC4R活性の増加、又はMC4R経路の活性化(例えば、下流の活性化)は、MC4R遺伝子の発現及び/又はMC4R活性の欠乏レベルを示す肥満動物において、正常な体重状態への進展を促進するだろう。他のやり方では、食欲不振やおそらくは正常以下の体重の表現型が含まれる、例えば悪液質のようなある種の障害の症状は、MC4R遺伝子の発現、及び/又はMC4R遺伝子の活性のレベルを減少させること、及び/又は(例えば、下流のシグナル伝達反応を標的にすることによって)MC4R経路の活性をダウンレギュレートすることによって、改善される可能性がある。種々のアプローチを以下に論じる。

【0146】1つの態様では、MC4R活性をモジュレートする化合物が、それを必要とする被検動物、好ましくは哺乳動物又は鳥類へ投与される。この被検動物は、例えば、上記の疾患又は病態の1つを病んでいる場合がある。化合物はMC4Rの作動薬又は拮抗薬であり得る。MC4Rの作動薬は、被検動物における肥満の治療に、食物摂取を低減する、及び/又は代謝率を高めて体重損失を引き起こすために使用し得る。好ましい態様では、安全で有効な食欲減少を引き起こすMC4R作動薬を含んでなる調製物がそれを必要とする動物へ投与される。特に好ましい態様では、動物はイヌ又はネコであって、体重損失は動物の過剰体重の4~8%/月であり、

及び/又は調製物は経口投与される。MC4R活性の拮抗薬は、食欲不振又は悪液質のような病態を治療するために、食欲増進を引き起こすために使用し得る。好ましい態様では、食欲を急に刺激するMC4R拮抗薬を含んでなる調製物がそれを必要とする動物へ投与される。特に好ましい態様では、動物は、不適切に低い食物摂取と体重減少(例えば、肝脂質症又は悪液質)をもたらず病理に罹患しているイヌ又はネコである。

【0147】化合物がMC4Rに対する絶対的な特異性を示すことは必要ではない。例えば、MC4RとMC1Rの両方を作動する化合物を使用し得るが、この化合物は、脳へのデリバリーが食欲減少と体重減少を達成するように最適化され、皮膚、獣皮又は毛皮に生じる末梢のメラニン産生のような副作用が忍容レベルまで減少されるように、投与され得る。MC4Rに対する特異性を示さない化合物は、他のメラノコルチン受容体をモジュレートすることから生じ得る副作用を制御するために、他の治療法又は薬物とともに投与し得るが、MC3RよりもMC4Rに対する選好性又は選択性を示す化合物が好ましいのは、局所デリバリーを使用しても受容体特異性の不足を補填し得ない脳において、いずれの受容体も発現されているからである。

【0148】化合物の毒性及び治療有効性は、細胞培養物、又はラット及びマウスのような実験動物において、例えばLD₅₀(集団の50%に対する致死量)及びED₅₀(集団の50%における治療有効量)を決定する医薬品の標準的な方法により決定し得る。毒性効果と治療効果の用量比(即ち、LD₅₀/ED₅₀比)が治療インデックスである。大きい治療インデックスを示す化合物が好ましい。有毒な副作用を示す化合物が使用される場合は、感染していない細胞への潜在的な損傷を最小化して副作用を軽減するために、罹患組織の部位を化合物の標的とするデリバリーシステムを設計するよう配慮されるべきである。

【0149】ある化合物についての細胞培養アッセイと実験動物試験から得られるデータは、ネコ、イヌ又は家畜動物のような被検動物における化合物の使用される用量範囲を定式化することに使用し得る。化合物の投与量は、好ましくは、毒性がほとんど又はまったくないED₅₀を含む循環濃度の範囲内にある。投与量は、利用される剤形と利用される投与経路に応じて、この範囲内で変化し得る。化合物の治療有効量は、最初に細胞培養アッセイから評価し得る。用量は、細胞培養において決定されるようなIC₅₀(即ち、症状の最大阻害の半分を達成する試験化合物の濃度)を含む循環血漿濃度の範囲を達成するように、実験動物モデルにおいて定式化し得る。そのような情報を使用して、被検動物において有用な用量をより正確に決定することができる。化合物の血漿レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより測定し得る。

【0150】MC4Rの発現を阻害するために使用されるアンチセンスオリゴヌクレオチド本発明のさらにもう1つの側面では、MC4Rシグナル伝達経路の成分の発現を阻害し、それにより被検動物の食欲をモジュレートするために核酸分子が使用される。1つの態様では、MC4R・mRNA転写物の翻訳を阻害するか又は妨げるアンチセンス核酸又はリボザイム；MC4R遺伝子又はその調節要素の全部又は一部と三重らせんを形成してMC4R遺伝子の転写を阻害する核酸；又はMC4R遺伝子又はその内因性プロモーターを不活性化するか又は「ノックアウト」する標的化した相同的組換えに有用な核酸を使用することによって、被検動物における内因性MC4R遺伝子発現のレベルを減少させる治療法が設計される。この治療法は、MC4R発現の阻害が食欲を増加させるために設計される、悪液質や食欲不振のような被検動物の食欲及び体重の障害を治療するのに利用し得る。MC4R遺伝子は脳内で発現されるので、好ましくは、核酸が血液脳関門を通過することを可能にするデリバリー技術が設計されるべきである（PCT WO 89 / 10134号を参照のこと、これは参照によりそのまま本明細書に組込まれている）。例えば、上記の核酸は、血液脳関門を通過するその能力を高めるように修飾されるか又は適切に製剤化され得る。他のやり方では、本明細書に記載のアンチセンス、リボザイム又は核酸の構築体は、標的細胞を含有する部位へ直接投与し得る。

【0151】アンチセンスアプローチは、mRNAに相補的であるオリゴヌクレオチドの設計に関わる。このオリゴヌクレオチドは、以下により詳しく説明するように、好適なポリマー分子、例えば、DNA、RNA、DNA/RNAハイブリッド、修飾したDNA又はRNA、又は合成のDNA又はRNA類似体（例えば、ペプチド核酸（以下、「PNA」）；WO 92 / 20702号を参照のこと）を含み得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、相補的なmRNA転写物に結合し、翻訳を妨げる。絶対的な相補性は、好ましいが、必須ではない。RNAの一部に「相補的な」配列とは、本明細書に言及されるように、RNAとハイブリダイズし、安定な二本鎖を形成し得るに十分な相補性を有する配列を意味し；二重鎖のアンチセンス核酸の場合は、二本鎖DNAの一本鎖が試験されるか又は三本鎖の形成がアッセイされ得る。ハイブリダイズする能力は、相補性の程度とアンチセンスオリゴヌクレオチドの長さの両方に依存する。一般に、ハイブリダイズするオリゴヌクレオチドが長いほど、それが含有し得るRNAとより多くの塩基ミスマッチが起こるが、それでも安定な二本鎖（場合によっては、三本鎖）が形成される。当業者は、ハイブリダイズした複合体の融点を決定する標準法の使用により、許容し得るミスマッチの度合いを確かめることができる。

【0152】コーディング領域の配列に相補的なアンチ

センスオリゴヌクレオチドも使用し得るが、最も好ましいのは、転写される非翻訳領域に相補的なものである。メッセージの5'末端、例えば、AUG開始コドンまでを含む5'非翻訳領域に相補的であるオリゴヌクレオチドは、翻訳を阻害するのに最も効率的に作用するはずである（図1及び2を参照のこと）。しかしながら、mRNAの3'非翻訳配列に相補的な配列も、mRNAの翻訳を阻害するのに同じくらい有効であることが最近証明された。一般論としては、Wagner, 1994, Nature 372: 333-335を参照のこと。このように、MC4Rの5'-又は3'-非翻訳、非コーディング領域のいずれかに相補的なオリゴヌクレオチドは、内因性mRNAの翻訳を阻害するアンチセンスアプローチにおいて使用し得る。mRNAの5'非翻訳領域に相補的なオリゴヌクレオチドには、好ましくは、AUG開始コドンの相補体が含まれる。mRNAのコーディング領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、低効率の翻訳阻害剤であるが、本発明により使用し得る。MC4R・mRNAの5'-、3'-又はコーディング領域にハイブリダイズするように設計されるかどうかに関わらず、アンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも6個のヌクレオ塩基の長さであり、好ましくは6~約50個の範囲にあるヌクレオ塩基の長さである。ヌクレオ塩基は、オリゴヌクレオチドに含まれるモノマー単位である（例えば、DNA及びRNAオリゴヌクレオチドでは、ヌクレオ塩基はヌクレオチドである）。特定の側面では、オリゴヌクレオチドは少なくとも10個のヌクレオ塩基、少なくとも17個のヌクレオ塩基、少なくとも25個のヌクレオ塩基、又は少なくとも50個のヌクレオ塩基である。

【0153】リボザイム

MC4R・mRNA転写物を触媒的に開裂するように設計されたりボザイム分子も、被検動物におけるMC4R・mRNAの翻訳とMC4Rの発現を妨げるために使用し得る（例えば、1990年10月4日に公開された、PCT国際公開WO 90 / 11364号；Sarver et al., 1990, Science 247: 1222-1225を参照のこと）。部位特異的な認識配列でmRNAを開裂するリボザイムは、MC4R・mRNAを破壊するために使用し得るが、好ましいのはハンマーヘッドリボザイムの使用である。ハンマーヘッドリボザイムは、標的mRNAと相補的な塩基対を形成する隣接領域により指定される位置でmRNAを開裂する。唯一の必要条件は、標的mRNAが5'-UG-3'という2塩基の配列を有することである。ハンマーヘッドリボザイムの構築及び製造については当技術分野でよく知られていて、Haseloff and Gerlach, 1988, Nature 334: 585-591により詳しく記載されている。ネコ及びイヌのmRNA・cDNAのヌクレオチド配列（図1及び2を参照のこと）内にはハンマーヘッドリボザイムの潜在的な開裂部位が数百存在する。好ましくは、リボザイムは、開裂認識部位がMC4R・

【0152】コーディング領域の配列に相補的なアンチ

mRNAの5'末端付近に位置づけられる、つまり開裂効率を高め、非機能的なmRNA転写物の細胞内蓄積を最少化するように加工される。

【0154】本発明のリボザイムには、Tetrahymena Thermophilaにおいて天然に存在し、Thomas Cechと共同研究者により詳しく述べられてきたもの(IVS又はL-19 IVS RNAとして知られる)のような、RNAエンドリボヌクレアーゼ(以下、「Cech型リボザイム」)も含まれる(Zaug et al., 1984, Science 224: 574-578; Zaug and Cech, 1986, Science 231: 470-475; Zaug et al., 1986, Nature 324: 429-433; University Patents Inc.による国際公開特許出願第WO 88/04300号; Been and Cech, 1986, Cell 47: 207-216を参照のこと)。Cech型リボザイムは、標的RNA配列にハイブリダイズした後で標的RNAの開裂が起こる、8塩基対の活性部位配列を有する。本発明には、MC4Rに存在する8塩基対の活性部位を標的とするCech型リボザイムが含まれる。

【0155】アンチセンスアプローチでは、リボザイムは(例えば、安定性、標的化などの向上のために)修飾されたオリゴヌクレオチドから構成され、in vivoでMC4Rを発現する細胞、例えば視床下部ヘデリバリーされるべきである。例えば、リボザイムは、血液脳関門を通過するように修飾し得るか、又は適切に製剤化し得る(PCT WO 89/10134号を参照のこと、これは参照により本明細書にそのまま組込まれている)。好ましいデリバリー方法は、トランスフェクトされた細胞が内因性MC4Rのメッセージを破壊し、翻訳を阻害するのに十分な量のリボザイムを産生するように、強い構造的pol III又はpol IIプロモーターの制御下で、リボザイムをコードするDNA構築体を使用することに関わる。リボザイムは、アンチセンス分子とは異なり、触媒的であるので、効率性にはより低い細胞内濃度で十分である。

【0156】トランスジェニック動物

本発明のもう一つの側面では、野生型の対照物と比較して、変化した食欲調節と体重制御を示すトランスジェニック動物が産生される。特に、そのような動物では、MC4Rの発現がin vivoで、例えば転写又は翻訳のレベルで制御される。好ましくは、トランスジェニック動物は哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ又はブタである。ある種のアプローチを以下に説明する。

【0157】正常なMC4R遺伝子の発現、及び/又はMC4R遺伝子生成物の活性レベルの増加に関しては、イヌ又はネコのMC4R核酸配列を利用して、肥満を含む、食欲及び体重の障害に罹患しにくいトランスジェニック動物を産生することができる。

【0158】他のやり方では、標的化した相同的組換えを利用して、被検動物の適切な組織、例えば脳組織にあ

る欠損した内因性MC4R遺伝子を矯正し得る。標的化した相同的組換えを使用して、ES細胞における欠損を矯正して矯正された形質を有する子孫を産生するために使用し得る。

【0159】もう一つの代替法では、被検動物における内因性のMC4R遺伝子発現を、標的化した相同的組換えを使用して、MC4R又はそのプロモーターを不活性化するか又は「ロックアウト」することによって低減し得る。Smithies et al., 1985, Nature 317: 230-234; Thomas and Capecchi, 1987, Cell 51: 503-512; Thompson et al., 1987, Cell 5: 313-321; これらはいずれもそのまま参照により本明細書に組込まれている。例えば、内因性MC4R遺伝子に相同なDNAが隣接する突然変異体の非機能性MC4R(又は全く無関係なDNA配列)を、選択可能マーカー及び/又は陰性の選択可能マーカーを伴うか又は伴わずに使用して、MC4Rをin vivoで発現する細胞をトランスフェクトすることができる。標的化した相同的組換えを介したDNAの挿入はMC4R遺伝子の不活性化をもたらす。このアプローチは、不活性なMC4Rを有する動物の子孫を産生するために胚性幹細胞(以下、「ES細胞」)への修飾を使用し得る、農業応用に特に適している。例えば、Thomas and Capecchi and Thompson, 1987, 同上を参照のこと。しかしながら、このアプローチは、ネコやイヌのような伴侶動物における使用にも適用し得る。

【0160】他には、被検動物における内因性MC4R遺伝子の発現は、MC4R遺伝子の調節領域(即ち、MC4Rのプロモーター及び/又はエンハンサー)に相補的なデオキシリボヌクレオチド配列を体内標的細胞におけるMC4R遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成させるように標的化することによって、低減し得る。一般論としては、Helene, 1991, Anticancer Drug Des. 6: 569-584; Helene et al., 1992, Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27-36; 及び Maher, 1992, Bioassays 14: 807-815を参照のこと。

【0161】可溶性のMC4R・ECD又は融合タンパク質、例えば融合Ig分子を発現する遺伝子操作された細胞は、in vivoで投与され、そこにおいて可溶性分子の供給物をデリバリーする「バイオリクター」として機能し得る。そのような可溶性のMC4Rポリペプチド及び融合タンパク質は、適切な濃度で発現されると、MC4Rのネーティブリガンドを中和するか又は「吸い取り」、そのようにしてMC4R活性の阻害剤として作用し、被検動物において食欲とおそらくは体重増加を引き起こす。

【0162】医薬製剤と投与方法

本発明に従って使用される、本発明のMC4Rの作動薬及び拮抗薬を含んでなる医薬組成物は、従来のやり方で製剤化し得る。医薬組成物は、(上記のように)MC4Rの活性をモジュレートする化合物と一つ又はそれ以上

の生理学的に許容される担体又は賦形剤を含む。担体又は賦形剤は、使用される投与法に従って選択される。化合物（及びその生理学的に許容される塩又は溶媒和物）は、例えば、吸入又は通気（口又は鼻のいずれかを介する）による投与、又は経口、頬内、腸管外、局所、経皮又は直腸投与のために製剤化し得る。

【0163】経口投与用には、医薬組成物は、例えば、結合剤（例、ゼラチン化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、又はヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例、ラクトース、微結晶性セルロース又はリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例、ステアリン酸マグネシウム、タルク又はシリカ）；崩壊剤（例、ジャガイモデンプン又はグリコール酸ナトリウムデンプン）；又は湿潤剤（例、ラウリル硫酸ナトリウム）のような製剤的に許容される賦形剤とともに従来法により製造される、錠剤又はカプセル剤の形態をとる。錠剤は、当技術分野で周知の方法により被覆し得る。経口投与用の液体調製物は、例えば、溶液、シロップ又は懸濁液の形態をとり得るか、又は、使用前に水又は他の好適な担体と構成させるための乾燥品として提示され得る。液体調製物は、懸濁剤（例、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体又は水素化食用脂肪）；乳化剤（例、レシチン又はアカシア）；非水性担体（例、ヘントウ油、油状エステル、エチルアルコール又は分画された植物油）；又は保存剤（例、p-ヒドロキシ安息香酸メチル又はプロピル、又はソルビン酸）のような製剤的に許容される添加物とともに、従来法により製造し得る。この調製物は、緩衝塩、芳香剤、着色剤及び甘味剤を適宜含有してよい。

【0164】経口投与用の調製物は、有効成分の制御された放出をもたらすように、適切に製剤化し得る。頬内投与用には、組成物は、従来法で製剤化した錠剤又はトローチ剤の形態をとり得る。

【0165】吸入による投与のためには、化合物は、好適な噴霧推進剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、又は他の好適なガスを使用して、加圧バック又はネブライザーからのエアゾールスプレー状の形態で好便にもデリバリーされる。加圧エアゾールの場合、用量単位は、目盛量をデリバリーするためのバルブを提供することによって決定し得る。例えば、吸入器又は吹き入れ器において使用されるゼラチンのカプセル又はカートリッジは、化合物の粉末ミックスとラクトース又はデンプンのような好適な粉末基剤を含有して製剤化し得る。

【0166】本発明の化合物は、注射、例えばボーラス注射又は連続注入による腸管外投与のために製剤化し得る。注射用製剤は、保存剤が加えられた、単位剤形、例えばアンプル又は多用量容器において提示し得る。この製剤は、油性又は水性の担体にある懸濁液、溶液又は乳

液の形態を取り、懸濁剤、安定化剤、及び/又は分散剤のような製剤用の薬剤を含有し得る。他のやり方では、化合物は、使用前に好適な担体、例えば無菌の発熱物質を含まない水と構成させるための粉末形態であり得る。

【0167】化合物はまた、例えばココア脂や他のグリセリドのような従来の坐剤用基剤を含有する坐剤用又は貯留用浣腸剤のような直腸組成物において製剤化し得る。上記の諸製剤だけでなく、本発明の化合物はまた、長時間作用するデポー調製物として製剤化し得る。この調製物は、埋め込み（例えば、皮下又は筋肉内）、筋肉内注射、又は経皮パッチにより投与し得る。従って、例えば、化合物は好適なポリマー又は疎水性材料（例えば、許容し得る油における乳液として）又はイオン交換樹脂と一緒に、又はほとんど溶けない誘導体、例えば難溶性の塩として製剤化し得る。

【0168】この組成物は、所望されるならば、有効成分を含有する1つ又はそれ以上の単位剤形を含有し得るバック又は調合器において提示し得る。このバックは、例えば、プリスターバックのような金属又はプラスチックのホイールを含み得る。バック又は調合器には投与の手引きがつく場合がある。

【0169】本発明のもう1つの側面では、上記に記載の系をキットへ製剤化し得る。このためには、MC4R又はMC4R発現細胞を、多種多様な容器、例えばバイアル、管、マイクロタイタープレート、ボトルなどに封入し得る。他の試薬、例えば、陽性対照サンプル、陰性対照サンプル、メラノコルチンペプチド（限定しないが、-MSH及びACTH誘導体を含む）、緩衝液、細胞培養基などを別の容器に入れ、キットとして提供し得る。

【0170】

【実施例】実施例1

以下の実施例は、本明細書に開示される、ネコ又はイヌのメラノコルチン受タンパク質をコードする核酸の単離について説明する。

【0171】別々の実験で、ネコ及びイヌの視床下部組織を調製した。それからLife Technologies Inc.（ロックビル、MD）によりcDNAライブラリーを調製した。MC4R遺伝子の保存領域から、配列ttgactctgtgatctgtagctccttgctを有するピオチニル化した捕捉オリゴヌクレオチドを設計した。このオリゴヌクレオチドとGENETRAPPER（登録商標）システム（Life Technologies Inc.）を使用して、その対応するcDNAライブラリーからネコ及びイヌのMC4Rクローンを単離した。cDNAライブラリーのクローンへこのオリゴヌクレオチドをストリンジェントにハイブリダイズすることによってポジティブ選択を達成した。磁石によりペレット化されるStreptavidenn磁気ビーズを使用して、ライブラリー中の他のクローンからこの複合体を単

離した。捕捉オリゴヌクレオチド部位の外側に設計されたMC4R特定のプライマー-対(前方プライマー: atgaggcagatgatgacagc; 後方プライマー: gtgatctgtagctccttgc)を使用するPCRによりMC4Rクローンを同定した。このcDNAライブラリーから6個のネコMC4Rクローンと1個のイヌMC4Rクローンを単離した。このクローンのサイズは1.7~2.2キロベースに及んだ。これらクローンの同一性を、様々なMC4R遺伝子特異的プライマー対(前方プライマー: tgagacatgaagcacac; 後方プライマー: gtgatctgtagctccttgc)を使用するPCRにより確かめた。

【0172】ネコ及びイヌのMC4R遺伝子の配列決定は、各クローンの両端から1回の標準反応と3回のプライマーウォーキング(primer walking)反応を使用して完了した。MC4R遺伝子フラグメントの配列をその重複領域に基づいて組立てた。

【0173】イヌ及びネコのMC4R遺伝子のヌクレオチド配列を、それぞれ図1及び2(SEQ ID NO: 1及び2)に示す。各ヌクレオチド配列のオープン・リーディング・フレームの概念的な翻訳により、ネコ及びイヌのMC4Rの予測されるアミノ酸配列を明らかにする。

表I MC4Rヌクレオチド配列の異なる種間の同一性比率

	1 ヒト	2 ブタ	3 ラット	4 ニワトリ	5 イヌ	6 ネコ
ヒト	100	86.7	77.5	65.7	81.2	86.3
ブタ		100	73.8	60.7	81.3	87.4
ラット			100	66.1	72.8	78.5
ニワトリ				100	61.8	66.0
イヌ					100	86.3
ネコ						100

【0176】

表II MC4Rオープンリーディングフレームの異なる種間の同一性比率

	1 ヒト	2 ブタ	3 ラット	4 ニワトリ	5 イヌ	6 ネコ
ヒト	100	92.0	88.4	80.9	89.4	92.8
ブタ		100	88.2	80.0	90.1	92.0
ラット			100	78.6	87.1	88.2
ニワトリ				100	79.7	81.1
イヌ					100	91.5
ネコ						100

【0177】

表III MC4Rアミノ酸配列の異なる種間の同一性比率

	1 ヒト	2 ブタ	3 ラット	4 ニワトリ	5 イヌ	6 ネコ
ヒト	100	95.2	92.8	87.0	94.6	95.8
ブタ		100	94.0	88.0	96.1	98.2
ラット			100	86.7	93.7	95.2
ニワトリ				100	86.7	87.7
イヌ					100	97.6
ネコ						100

実施例2

以下の実施例は、ネコ、イヌ及びヒトのMC4Rの、MSHに結合する能力を判定して比較するために実施した。

*にした。これを、それぞれ図3及び4(SEQ ID NO: 4及び5)に示す。

【0174】ネコ及びイヌのMC4Rのヌクレオチド配列を相互に、及び利用し得る他の種由来のMC4R遺伝子配列と比較した。ネコ及びイヌのMC4Rヌクレオチド配列を、公知の配列データベースを検索するための照会語(queries)として使用した。ヒト、ラットなどのMC4R遺伝子を含む、多くの検索ヒットが得られた。DNA配列、オープンリーディングフレーム(ORF)及びタンパク質配列の照会語間の同一性とヒットについて、LASERGENE-MEGALIGN™ソフトウェアパッケージ(DNASTAR, Inc., マジソン、WI)のJotun Hein法を使用して分析し、分岐性を判定した。Jotun Hein法では、配列の対を検証し、先祖の枝分かれについて最も可能性のある配置を創出することによって系統樹が組立てられる。この方法が最も有用であるのは、並置された配列群が系統的に関連づけられる場合である。以下の表I、II及びIIIは、この照会の結果である。

【0175】

【表1】

【0178】異なるイヌ又はネコのMC4Rクローンをそれぞれ発現する、トランスフェクトされた細胞系を構築した。各細胞系につき特定すると、50%の集密度まで増殖させたHEK293細胞を、1つの種由来のMC

4 R 遺伝子を含んでなるベクター構築体で一過的にトランスフェクトした。プラスミド DNA 1 μ g あたり、トランスフェクション担体の FuGENE 6™ 4 μ l を使用した。

【0179】トランスフェクションから 48 時間後に、シグマ解離緩衝液を使用して細胞を採取し、遠心分離してから結合緩衝液 (50 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 0.1% BSA, 及びプロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma P-8340™, pH = 7.5) に再懸濁した。細胞全体の結合は、この細胞系がメラノコルチン受容体を発現することを手早く確認することとして実施した。血球計を使用して、再懸濁した細胞集団を計数した。同一 3 検体の様々な容量を試験管の中へピペット操作することによって、細胞容量の滴定を実施した。緩衝液か又は過剰な非放射標識 NDP-MSH (最終濃度: 2 μ M) のいずれかを加え、過剰な非放射標識 NDP-MSH を使用して、非特異的な結合を確定した。次いで、放射標識した NDP-MSH を加えて、最終濃度を 75 pM とした。この反応液を 37 °C で 1 時間インキュベートした後、5000 × G で 10 分間遠心分離した。上澄液を吸引し、ペレット化した放射標識 NDP-MSH の量を、 β -カウンターを使用して測定した。結果を図 5 及び 6 に示す。

【0180】細胞全体の結合アッセイでは、(受容体の内在化及び再環状化のために) 細胞あたりの受容体の数を正確に決定するのに使用し得ないので、各細胞系から膜調製物を調製した。Sigma 解離緩衝液を使用してトランスフェクトした細胞を採取し、遠心分離して、氷冷したホモジェナイゼーション緩衝液 (1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM HEPES 及びプロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma P-8340™), pH = 7.5) に再懸濁させた。この細胞懸濁液を少なくとも 10 分間氷上でインキュベートして、次いで、密着ガラス/ガラス式 dounce ホモジェナイザーを 20 ストロークしてホモジェナイズした。このホモジェネートを 4 °C で 10 分間 1000 × G で遠心分離し、核と未溶解細胞をペレット状にした。上澄液を新しい試験管に移し、4 °C で 20 分間 2500 × G で遠心分離し、原形質膜をペレット状にした。この上澄液を捨てた。ペレットをホモジェナイゼーション緩衝液に再懸濁し、原形質膜を洗浄した。再懸濁したペレットを密着ガラス/ガラス式 dounce ホモジェナイザーの 20 ストロークでホモジェナイズし、次いで、4 °C で 20 分間 2500 × G で遠心分離した。上澄液を捨て、1 ~ 5 mg/ml のタンパク質濃度になるようにホモジェナイゼーション緩衝液にペレットを再懸濁した。長期保存用に 500 μ l のアリコートに -70 °C で凍凍した。ホモジェネートを 5 ~ 10 倍に希釈して、Pierce BCA キット (Pierce, ロックフォード, IL) を使用することによって、タンパク質濃度を決定した。

【0181】実施例 3

以下は、cMC4R、hMC3R 及び hMC4R の MSH 及び他の MC4R リガンドに対する相対親和性を決定するために実施した。cMC4R、hMC3R 又は hMC4R を発現する HEK293 細胞系を、10% ウシ胎仔血清、ペニシリン 100 ユニット/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml 及びジエネチシン 300 μ g/ml (いずれも Gibco BRL より入手) を補充した DMEM (ダルベッコ改良イーグル培地; 高グルコース、L-グルタミン、ピルビン酸ナトリウム 110 mg/L 及び塩酸ピリドキシン) (Gibco BRL, ロックビル, MD) において、37 °C、5% CO₂ で増殖させた。各細胞系につき、それがメラノコルチン受容体を発現することを手早く確認する方法として細胞全体の結合アッセイを実施した。Sigma 解離緩衝液を使用して、各細胞系から細胞を採取し、PBS で洗浄した。結合緩衝液に細胞を再懸濁し、血球計を使用して計数した。特異的な結合を定量するために、様々な量の細胞を、最終濃度 5 mM の過剰な非放射標識 NDP-MSH を含むか又は含まない同一 3 検体の試験管へ加えた。各試験管へ、最終濃度 50 pM の ¹²⁵I-NDP-MSH を加え、37 °C で 50 分間結合させた。遠心分離により細胞をペレット化し、上澄液を除去し、細胞に結合した放射活性を β -カウンターで計数した。結果は、細胞数が増加するにつれ、¹²⁵I-NDP-MSH に対する特異的な結合も cMC4R 細胞系で増加したことを示す (図 7)。細胞全体の結合アッセイでは、(受容体の内在化及び再環状化のために) 細胞あたりの受容体分子の数を正確に測定し得ないので、各細胞系から膜調製物を調製した。Sigma 解離緩衝液を使用して細胞を採取し、遠心分離によりペレット化し、再構成させて PBS で洗浄し、遠心分離によりペレット化した。全細胞数のカウントを血球計算により実施し、記録した。この細胞ペレットをホモジェナイゼーション緩衝液 (25 mM HEPES, 1.5 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 100 mM NaCl, 10% スクロース、Sigma プロテアーゼ阻害剤カクテル) に再懸濁させた。Dounce ホモジェナイザー (10 ~ 15 ストローク) を用いて氷上でホモジェナイゼーションを実施した後、音波処理した (高セッティングで 3 × 30 秒のバースト)。700 × G での遠心分離により、大きい細胞の粒子状物質を膜分画から分離した。次いで、この上清分画を 150,000 × G で遠心分離した。この遠心分離の上清分画を除去し、膜ペレットをホモジェナイゼーション緩衝液 20 ml に再懸濁し、-70 °C で 0.5 ml のアリコートに保存した。

【0182】受容体の数やリガンド親和性について研究し、現今の方法を文献値と比較するために、膜調製物に関して飽和結合試験を実施した。各調製物につき BCA™ タンパク質アッセイキットを使用してタンパク質濃度

を定量し、各アッセイに使用する膜の量を正規化した。全ペプチド含量により測定される、各調製物の一定量の膜を各アッセイに使用した (hMC3R/HEK293 及び hMC4R/HEK293 ではタンパク質 1 µg ; cMC4R C1/HEK293 ではタンパク質 2 µg)。様々な量の ¹²⁵I-NDP-MSH をこのアッセイに使用し、各受容体についての飽和結合等温線 (isotherm) を作成した。cMC4R/HEK293、hMC3R/HEK293 及び hMC4R/HEK293 の膜に対する変換等温線を図 8、9 及び 10 に示す ([hMC4R/HEK293 膜のロット 1] ; 図 8 : hMC4R/HEK293 の飽和結合等温線 ; 図 9 : hMC3R/HEK293 の飽和結合等温線 ; 図 10 : cMC4R/HEK293 の飽和結合等温線)。3 種の膜調製物についてのスキッチャード分析は、NDP-MSH の K_d が上記調製物のいずれについても 100 ~ 200 pM の間にあることを示した (図 8、9 及び 10)。さら *

表 IV

膜	ndp-MSH	MTII	Shu9119	JKC363
hMC4R	0.7766	0.8433	0.01163	2.112
cMC4R	0.8558	0.8774	0.009579	1.271
hMC3R	0.3973	4.582	0.1881	22.75

実施例 4

以下の実施例は、-MSH の刺激に応じて cAMP の蓄積を誘発するイヌ MC4R の能力を測定するために実施した。

【0185】他の種では、MC4R が G タンパク質共役型受容体であり、その作動薬リガンドにより刺激されたときに cAMP 蓄積を刺激することが示されている。市販キット (アデニルシクラーゼ活性化 Flashplate Assay, NEN (登録商標) Life Science Products, Inc., ボストン、MA) を使用して、イヌ MC4R でトランスフェクトした細胞における作動薬リガンド刺激後の cAMP の蓄積を測定した。上記のように、MC4R でトランスフェクトした細胞系を調製し、採取した。次いで、採取した細胞を刺激緩衝液 (キットに提供されている) に再懸濁させた。この再懸濁した細胞の数を、血球計を使用して決定した。再懸濁した細胞を遠心分離し、再び刺激緩衝液で 3 種の異なる最終細胞濃度 (96 穴プレート 1 ml につき、0.5 x 10⁶、1.0 x 10⁶ 及び 1.5 x 10⁶ 個の細胞) に再懸濁した。各濃度の細胞を、1 µM の作動薬 -MSH 又は陰性対照のいずれかと接触させた。30 分後に検出ミックス (キットに提供されている) を加えることによってインキュベーションを停止させた。各プレートにカバーをかけ、室温で 20 時間インキュベートした。MC4R の刺激は、Wallac 1450 MICROBETATM シンチレーションカウンターでのシンチレーション計数により定量した。-M 50

*に、GraphPad PRISM (登録商標) (GraphPad Software Inc., サンディエゴ、CA) により算出されるような直線状のスキッチャードラインは、予測されるように、それぞれの細胞系について単一の受容体の集団であることを示す。

【0183】同じ膜調製物を使用して、市販リガンドに対する結合プロファイリングを実施した。単位膜タンパク質あたりの受容体数の膜調製物間での違いを補整するために、膜調製物の量を調整して受容体の発現を正規化した。低分子化合物については DMSO を使用して各化合物を溶かし、結合緩衝液で 0.2% へ希釈した。滴定曲線を図 11 - 14 に示す。GraphPad PRISM (登録商標) により提供される非線形回帰分析を使用して、IC₅₀ 値を算出した。以下の表 IV にデータをまとめる。

【0184】

【表 4】

SH 処理した細胞は、各濃度で、バックグラウンドに対する cAMP レベルの有意な増加を示した (図 15)。この効果は、最も細胞濃度が高いバッチで最も顕著であり、陰性対照細胞の 1.53 ピコモル/ml に対し、-MSH 処理した細胞は、13.82 ピコモル/ml の cAMP 濃度 (ほぼ 10 倍増) を示した。

【0186】実施例 5

以下の実施例は、キメラ又は乱雑 G タンパク質を介した PLC 経路に共役する MC4R を使用して MC4R の作動薬又は拮抗薬を同定するための、機能ベースのハイスループットスクリーニングを使用することの実行可能性を示すために実施した。

【0187】cMC4R を発現する HEK293a の安定な細胞系を培養基 (DMEM, 10% FBS, ペニシリン/ストレプトマイシン 100 ユニット、GENETICIN (登録商標) (GIBCO BRL, ロックビル、MD) 300 mg/ml) において増殖させ、2 つの異なる G タンパク質遺伝子、G15 及び G16 (図 18、19、20 及び 21、22、23 参照) を担うベクターでトランスフェクトし、4 週間にわたり、ZEOCINTM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 300 µg/ml を含有する細胞培養液を使用して、上記 DNA の安定的な取込みについて選択した。他のやり方では、キメラ G タンパク質 (例えば、最後の 5 個のアミノ酸が Gs 由来のそれで置換されている Gq15) を含有するベクターを産生し、使用し得る。単一のクローンコロニーを選択し、クローニングシ

リンダー（シグマ・アルドリッチ社、セントルイス、MO）を使用して拡張した。以下に示すように、FLIPR（登録商標）アッセイを使用して、取込まれた乱雑Gタンパク質と共役し得る受容体の能力について個々のクローンを試験した。G 15及びG 16が乱雑Gタンパク質として知られているのは、任意のGタンパク質受容体と機能的に共役し、シグナルを伝達して細胞内カルシウムを増加させる、その能力のためである。FLIPR（登録商標）装置（Molecular Devices, サニーヴェイル、CA）は、市販の蛍光色素を使用し

てそのようなカルシウムシグナル伝達カスケードを定量化することを可能にする。

【0188】HEK293a/cMC4R/G 15, G 16を集密状態にまで増殖させ、トリプシン-EDTA（GIBCO-BRL, ロックビル、MD）を用いて採取した。ZEOCIN™ 300 µg/mlを含有する新鮮な培養基において細胞を再懸濁した。血球計を使用してこの細胞懸濁液を計数し、ポリ-d-リジンで被覆した黒/透明色の96穴プレート（Becton Dickinson Labware, ベッドフォード、MA）へ、各ウェルにつき約50,000個の細胞を加えた。約48時間の培養後、増殖培地を吸引除去し、96穴プレートあたり25 µgのカルシウム感受性蛍光色素Fluo-4（Molecular Probes, ユージーン、OR）及びプロベネシド（シグマ・アルドリッチ社、セントルイス、MO）2.5 mMを含有する無血清培地で置換した。このプレートを37 °Cで1時間インキュベートした後、プロベネシド2.5 mMを含有するHepes Saline溶液で3回洗浄し、過剰の色素を除去した。次いで、このプレートをそれぞれFLIPR（登録商標）へ加え、2分間にわたり蛍光レベルを連続的にモニターした。3種の有名なMC4R作動薬、NDP-MSH、 α -MSH及びMTIIと1種の有名なMC4R拮抗薬、SHU9119は、Bachem（Bachem Bioscience Inc., King of Prussia, PA）から購入し、上記のアッセイ系で試験した。化合物はすべてHepes緩衝化生理食塩水で希釈した。図16及び17は、作動薬で刺激したカルシウム放出、並びに20 nM NDP-MSH作動薬存在下でのカルシウム放出の拮抗薬阻害についての用量応答曲線を示す。GraphPad Prism（登録商標）ソフトウェア（Graphpad Software, Inc., サンディエゴ、CA）を使用して、作動薬及び拮抗薬それぞれのEC₅₀及びIC₅₀を決定した。NDP-MSHのEC₅₀は13 + / - 6 nMであると算出され、 α -MSHについては55 + / - 15 nMであると算出され、MTIIは10 + / - 6 nMであると算出された。SHU9119のIC₅₀は2 + / - 2 nMであると算出された。

【0189】実施例6

以下の実施例は、食物摂取又は代謝率を減少又は増加させる本発明の化合物を同定するために実験動物を使用することの実行可能性を示すために実施した。

【0190】健全な体重11~15 kgの雄及び雌（1~3年齢）のビーグル（Marshal Farms, North Rose NY）を被検動物として利用した。標準技術を使用して、この動物の側脳室にカニュレを外科的に埋め込んだ。Wilsson Rahmberg et al., 1998, J. Investigative Surgery, 11: 207-214. カニュレの位置及び開存性を蛍光透視法により確認した。イヌは、USDA基準（米国農務省、動物福祉、決議ルール、13.F.R. 1-3部、1995年）を満たしているか又は凌いでいる標準ケージに1匹づつ収容した。

【0191】各被検動物に、3種の溶液の1つを側室内に1回50 µl注射（ICV注射）した：30~100 ナノモルの非特異的メラノコルチン（MC）受容体作動薬 [Nle⁴, D-Phe⁷]- α -MSH（以下、「NDP-MSH」、Bachem Bioscience Inc., King of Prussia, PA）、1~2ナノモルのMC3/4受容体拮抗薬、SHU-9119（Bachem Bioscience Inc., King of Prussia, PA）又は人工脳脊髄液（以下、「aCSF」、Harvard Apparatus、ホリストン、MA）からなる担体。NDP-MSHとSHU-9119は、乾燥粉末として入手し、50 µl注射に対して適切な濃度をなるようにaCSFで再組成した。ICV注射後に、食物摂取又は代謝率に対して生じる効果を判定した。

【0192】この試験は、1群5匹のイヌを含む動物から構成した。試験1では、0日目にNDP-MSH又はaCSFのいずれかをイヌに与えたが、交差試験の設計により、2匹のイヌに最初にNDP-MSHを、3匹のイヌにaCSFを最初に与えた。食物摂取に対して生じる効果を判定した。試験2では、0日目にSHU-9119又はaCSFのいずれかをイヌに与えたが、交差試験の設計により、2匹のイヌに最初にSHU-9119を、3匹のイヌにaCSFを最初に与えた。食物摂取に対して生じる効果を判定した。試験3では、0日目にNDP-MSH又はaCSFのいずれかをイヌに与えたが、交差試験の設計により、3匹のイヌに最初にNDP-MSHを、2匹のイヌにaCSFを最初に与えた。代謝率に対して生じる効果を判定した。試験4では、0日目にSHU-9119又はaCSFのいずれかをイヌに与えたが、交差試験の設計により、3匹のイヌに最初にSHU-9119を、2匹のイヌにaCSFを最初に与えた。代謝率に対して生じる効果を判定した。各試験動物は、試験期間の毎日、特に留意しなければ、自由に水とIAMS MINICHUNKS（登録商標）（The IAMS Company, デイトン、OH）乾燥食料を摂ることが許された。

【0193】食物摂取における減少又は増加は、毎日、摂食前と24時間消費時間の終了時にそれぞれの餌容器の重さを量ることによって測定した。上記重量の差が、24時間の消費期間にイヌが消費した食餌の量を表す。各試験の開始時には、7日間の基準期（-7~-1日と表記）があり、この期間に試験動物の食物摂取基準量を評価した。-7日~-1日に消費された平均量とICV注射後に消費された量との差がICV注射に起因する食物摂取の減少又は増加を表す。

*【0194】代謝率の減少又は増加は、開回路熱量計（OXYMAX DELUXE（登録商標）、Columbus Instruments, コロンバス、OH）を使用する標準間接測熱法により測定した。ICV注射に先立つ約18時間の間、イヌを絶食させた。ICV注射から約2時間後に測熱セッションを開始し、60~90分続けた。

【0195】

【表5】

表V

カニューレを側脳室に挿入した肥満ビーグル犬のICV注射後の間接測熱

発熱量 (キロカロリー/時間)			
	平均	標準偏差	変化率 (%)
aCSF (100μL)	22	5.0	-
NDP-MSH (75ナノモル)	38	15.1	+73*
SHU9119 (2ナノモル)	13	2.8	-37*
VO ₂ (mL/kg/時間)			
	平均	標準偏差	変化率 (%)
aCSF (100μL)	347	54.6	-
NDP-MSH (75ナノモル)	598	152.4	+75*
SHU9119 (2ナノモル)	216	64.4	-38*

* aCSF対照から有意に異なる、p<0.05 (対のt検定)

【0196】

【表6】

表VI

カニューレを側脳室に挿入した肥満ビーグル犬のICV注射後の食餌摂取量

24時間後の食餌摂取量 (g)			
	平均	標準偏差	変化率 (%)
aCSF (100μL)	158	66.5	-
NDP-MSH (100ナノモル)	90	53.9	-47
SHU9119 (2ナノモル)	366	103.0	+132*

* aCSF対照から有意に異なる、p<0.05 (対のt検定)

以上の結果を上記の表V及びVIに示す。

【配列表】

【0197】

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Products Inc.
 <120> NOVEL MELANOCORTIN-4 RECEPTOR SEQUENCES AND SCREENING ASSAYS TO IDENTIFY COMPOUNDS USEFUL IN REGULATING ANIMAL APPETITE AND METABOLIC RATE

<130> PC10743A
 <140> 60/213,909
 <141> 2000-06-26
 <150> 60/213,909
 <151> 2000-06-26
 <160> 6
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1708
 <212> DNA
 <213> Feline MC4R Nucleotide Sequence
 <400> 1
 cataaaatca gcagcagcta ctaacactca aagc

ctaggaaaat tattttgaaa agacctgact gaat
gcctca ggctaaagt aaggtggaag 180
ggaggacaga aaagcaaaga gcagactctt tcaa
ctgaga atgagtattt cagaagccta 240
agattttaca atgaaggtga tcagagccgt tcct
gggaga cagtaaaaac tccatttcca 300
gcctgggagc acgtgacatt tactcacaac aggc
atgcca atttcagcct canaactttc 360
gggcagacaa aggcgtggag aaaaacactg aggc
tacctg acccgagaga tcgaatcaat 420
tccgagggga tctgaatcca ctggtgcagg atga
actcca ctcatcacca tggaatgcac 480
acttctctcc acttctggaa ccgcagcacc tacg
gaccgc acagcaatgc cagtgagtcc 540
cttgaaaag gctactctga tggaggggtg tatg
agcaac ttttgtctc ccctgagggtg 600
tttgtgactc tgggtgtcat cagcttgttg gaga
atattc tgggtattgt ggcaatagcc 660
aagaacaaaa acctgcattc gccatgtac tttt
tcatct gcagcctggc tgtggctgat 720
atgttgggtga gcgtgtcaaa cggatccgaa acca
ttgtca tcaccctatt aaacagtaca 780
gatacggacg cgcagagttt caccgtgaat attg
ataatg tcattgactc ggtgatctgt 840
agctccttgc ttgcatcgat ttgcagcctg ctct
caattg cagtggacag gtactttact 900
atcttttatg ctctccagta ccataacatc atga
cggta ggcgggttgg gatcatcata 960
agttgtatct gggcagcttg cacggtttcg ggcg
ttttgt tcatcatcta ctgagacagc 1020
agtgtgtca tcatctgcct catcaccatg ttct
tcacca tgctggctct catggcctct 1080
ctctatgtcc acatgttctt catggccaga ctgc
acatta agagaattgc tgcctcccg 1140
ggcactggca ccatccgcca aggggccaac atga
aggggt caattaccct gaccatactg 1200
attgggtct tttgtctg ctggccccg ttct
tcctcc acttaatat ctacatctct 1260
tgtccccaga atccttactg tgtgtgcttc atgt
ctcact ttaacctgta tctcactg 1320
atcatgtgta attccatcat cgaccctcta attt
atgcac tccggagcca agaactaagg 1380
aaaaccttca aagagatcat ctgttgctat cctc
taggcg gcctctgtga tttgtctagc 1440
agatactaac tgtgcagata gaaacgtgca taag
agactt cttcattctt acagaaccgg 1500
aacattgtgc tttgatgacc cttttctct ctgt
gtaagg catgggttga gactatctgt 1560
tgtataaatt taagtcatg acttttttt ggaa
tggaaa caatgccag tctctgtaca 1620
tttctaagt ctgtctactt tttggctgta caat
gttaat ccatattata ggtgttaggc 1680
actatgaatg tataaaaaaa aaaaaaaa

acgtccacat gttcctcatg gccagactgc acat
 caagag aatcgccgtc ctcccgggca 1140
 ccggcaccat ccgccaaggg gccaacatga aggg
 tgccat taccttgacc atactcattg 1200
 gggctctcgt cgtctgctgg gctccattct tcct
 ccactt gatattctac atctcttgtc 1260
 cccagaatcc atactgtgtg tgcttcatgt ctca
 cttaa cttgtacctc attctgatca 1320
 tgtgtaactc catcatcgac cctctcattt atgc
 actccg gagccaagag ctgaggaaaa 1380
 ccttcaaaga gatcatctgt tgctatcctc tggg
 tggcct ttgtgacttg tctagcagat 1440
 actagctggg gacagaggaa gtactaaaaa catg
 caccag agacttcttc atcctcacac 1500
 aacatgaact ggtgcttgg acaacagctg ctic
 ttcagt ataaggcagg agttgagaat 1560
 atctgttgca caaattcaac ttatgatgt ttg
 atgtga aaaaaaaaaa gccaggctc 1620
 tgtacattgc taatgtcatg ctacttttgg gctg
 tgcatt gttaatccat ttcgacgctg 1680
 tagacacttt gaatttctag aaaagaaaaa agct
 tccatt aaaagcatat cagtgtttct 1740
 tgttattcac gaggatttgg cactttgctt gctt
 taggaa acatagaaat catagaatca 1800
 ttaactatgt agcctgataa gtaacttctt atat
 tatact atacacatg aaatgtgcag 1860
 atttgaatgt agcatggggg gtggatattg aaca
 atagat acttggatcat taaaacaatc 1920
 aactgaaatt ttaagtaata aaatgtgttc attc
 tccctg ttgcagaaat aaaaaaaaaa 1980

aaaaa

1985

<210> 3

<211> 332

<212> PRT

<213> Feline MC4R protein Seque

nce

<400> 3

Met Asn Ser Thr His His His Gly Met His

Thr Ser Leu His Phe Trp

1

5

10

15

Asn Arg Ser Thr Tyr Gly Pro His Ser Asn

Ala Ser Glu Ser Leu Gly

20

25

30

Lys Gly Tyr Ser Asp Gly Gly Cys Tyr Glu

Gln Leu Phe Val Ser Pro

35

40

45

Glu Val Phe Val Thr Leu Gly Val Ile Ser

Leu Leu Glu Asn Ile Leu

50

55

60

Val Ile Val Ala Ile Ala Lys Asn Lys Asn

Leu His Ser Pro Met Tyr

65

70

75

80

225 230 235 2
 40
 Met Lys Gly Ala Ile Thr Leu Thr Ile Leu
 Ile Gly Val Phe Val Val
 245 250 255

 Cys Trp Ala Pro Phe Phe Leu His Leu Ile
 Phe Tyr Ile Ser Cys Pro
 260 265 270
 Gln Asn Pro Tyr Cys Val Cys Phe Met Ser
 His Phe Asn Leu Tyr Leu
 275 280 285
 Ile Leu Ile Met Cys Asn Ser Ile Ile Asp
 Pro Leu Ile Tyr Ala Leu
 290 295 300
 Arg Ser Gln Glu Leu Arg Lys Thr Phe Lys
 Glu Ile Ile Cys Cys Tyr
 305 310 315 3
 20
 Pro Leu Gly Gly Leu Cys Asp Leu Ser Ser
 Arg Tyr
 325 330

 <210> 4
 <211> 332
 <212> PRT
 <213> Canine MC4R protein Sequence
 nce
 <400> 4
 Met Asn Ser Thr Leu Gln His Gly Met His
 Thr Ser Leu His Phe Trp
 1 5 10 15
 Asn Arg Ser Thr Tyr Gly Gln His Gly Asn
 Ala Thr Glu Ser Leu Gly
 20 25 30
 Lys Gly Tyr Pro Asp Gly Gly Cys Tyr Glu
 Gln Leu Phe Val Ser Pro
 35 40 45
 Glu Val Phe Val Thr Leu Gly Val Ile Ser
 Leu Leu Glu Asn Ile Leu
 50 55 60
 Val Ile Val Ala Ile Ala Lys Asn Lys Asn
 Leu His Ser Pro Met Tyr
 65 70 75 80

 Phe Phe Ile Cys Ser Leu Ala Val Ala Asp
 Met Leu Val Ser Val Ser
 85 90 95
 Asn Gly Ser Glu Thr Ile Val Ile Thr Leu
 Leu Asn Ser Thr Asp Thr
 100 105 110
 Asp Ala Gln Ser Phe Thr Val Asn Ile Asp
 Asn Val Ile Asp Ser Val
 115 120 125

Met Lys Gly Ala Ile Thr Leu Thr Ile Leu
 Ile Gly Val Phe Val Val
 245 250 255
 Cys Trp Ala Pro Phe Phe Leu His Leu Ile
 Phe Tyr Ile Ser Cys Pro
 260 265 270
 Gln Asn Pro Tyr Cys Val Cys Phe Met Ser
 His Phe Asn Leu Tyr Leu
 275 280 285
 Ile Leu Ile Met Cys Asn Ser Ile Ile Asp
 Pro Leu Ile Tyr Ala Leu
 290 295 300
 Arg Ser Gln Glu Leu Arg Lys Thr Phe Lys
 Glu Ile Ile Cys Cys Tyr
 305 310 315 3
 20
 Pro Leu Gly Gly Leu Cys Asp Leu Ser Ser
 Arg Tyr
 325 330

<210> 5

<211> 6148

<212> DNA

<213> pcDNA3.1zeo/murine G-*alp*

ha 15

<400> 5

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtc
 gactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttg
 tgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gctt
 gaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggtagt gcgttttgcg ctgcttcgcg atgt
 acgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttac
 ggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagtccg cgttacataa cttacgtaa atgg
 cccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgccatt gacgcaata atgacgtatg ttcc
 catagt aacccaata gggactttcc 420
 atgacgtca atgggtggac tatttacggt aaac
 tgccca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaa
 tgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctac
 ttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agta
 catcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg attccaagt ctccaccca ttga
 cgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaa
 ctccgc cccattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcag
 agctct ctggctaact agagaacca 840

acacgcaaag cgtccgcagc gtgttcaagg acgt
gcggga ctcggtgctg gcccgtacc 2040
tggacgagat caacctgctg tgacgcagat ctaa
agccga attctgcaga tatccatcac 2100
actggcggcc gctcgagcat gcatctagag ggcc
cgttta aacctgctga tcagcctcga 2160
ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg ttg
cccctc ccccgctgcct tccttgacct 2220
tgaagggtgc cactcccact gtcctttcct aata
aatga ggaaattgca tcgcattgtc 2280
tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg ggg
gggca ggacagcaag gggaggatt 2340
gggaagacaa tagcaggcat gctgggatg cgg
ggctc tatggcttct gaggcgaaa 2400
gaaccagctg gggctctagg ggtatcccc acgc
gccctg tagcggcgca ttaagcgcg 2460
cgggtgtggt ggttacgagc agcgtgaccg ctac
actgc cagcggccta gcgcccgtc 2520
ctttcgttt cttcccttc tttctcgcca cg
cgccg cttccccgt caagctctaa 2580
atcggggcat cccttaggg ttccgattta gtgc
ttacg gcacctcgac ccaaaaaac 2640
ttgattagg tgatggttca cgtagtggc catc
gccctg atagacggt tttcgccctt 2700
tgacgttga gtccacgttc ttaaatagt gact
ctgtt ccaactgga acaactca 2760
accctatctc ggtctattct ttgatttat aagg
gatttt ggggatttcg gcctattggt 2820
taaaaaatga gctgattta caaaaattta acgc
gaatta attctgtgga atgtgtgtca 2880
gttaggtgt ggaaagtccc caggctccc aggc
aggcag aagtatgca agcatgcatc 2940
tcaattagtc agcaaccagg tgtgaaagt cccc
aggctc cccagcaggc agaagtatgc 3000
aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagt
cccgc cctaactccg ccatcccgc 3060
ccctaactcc gccagttcc gccattctc cgcc
ccatgg ctgactaatt tttttatit 3120
atgcagaggc cgaggccgc tctgcctctg agct
attcca gaagtgtga ggaggcttt 3180
ttggaggcct aggcctttgc aaaaagctcc cggg
agcttg tatatcatt ttcgatctg 3240
atcagcacgt gttgacaatt aatcatcggc atag
tatatc ggcatagtat aatagcaaa 3300
ggtgaggac taaacctg ccaagttgac cagt
gccgtt ccggtgtca ccgcgcgga 3360
cgtcgccgga gcggtcagat tctggaccga ccgg
ctcggg ttctcccggg acttctgga 3420
ggacgacttc gccggtgtg tccgggacga cgtg
accctg ttcacagcg cgtccagga 3480
ccaggtggtg ccgacaaca ccctggcctg ggtg
tgggtg cgcggcctgg acgagctgta 3540
cgccgagtgg tcggaggtc gtccacgaa cttc

agaagatcct ttgatcttt ctacggggtc tgac
gctcag tggAACGAAA actCACGTTA 5040
agggattttg gtcATGAGAT tatCAAAAAG gatc
ttcacc tagatccttt taaATTAaaa 5100
atgaagtfff aaatcaatct aaagtatata tgag
taaact tggTCTGACA gttaccaatg 5160
cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgt
ctattt cgttcatcca tagttgcctg 5220
actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggag
ggctta ccatctggcc ccagtgcctg 5280
aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tcca
gattta tcagcaataa accagccagc 5340
cgaaggggcc gagcgcagaa gtggtcctgc aact
ttatcc gcctccatcc agtctattaa 5400
ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc gccA
gttaat agtttgcgca acgtttgtgc 5460
cattgctaca ggcatcgtgg tgcacgctc gtcg
tttggT atggcttcat tcagctccgg 5520
ttccaacga tcaaggcgag ttacatgatc cccc
atgttg tgcaaaaaag cggttagctc 5580
cttcggctct ccgatcgttg tcagaagtaa gttg
gccgca gtgttatcac tcatggttat 5640
ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccA
tccgta agatgctttt ctgtgactgg 5700
tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgt
atgCGG cgaccgagtt gctcttggcc 5760
ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagc
agaact ttaaaagtgc tcatcattgg 5820
aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatc
ttaccg ctgttgagat ccagttcgat 5880
gtaaccact ctgtcaccca actgatcttc agca
tctttt actttcacca gcgtttctgg 5940
gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaa
aaggga ataagggcga cacggaaatg 6000
ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttat
tgaagc atttatcagg gtattgtct 6060
catgagcggA tacatatttg aatgtattta gaaa
aataaa caaatagggg ttccgcgcac 6120
atttccccga aaagtccac ctgacgtc

6148

<210> 6

<211> 6149

<212> DNA

<213> pcDNA3.1zeo/human G-alpha

a 16

<400> 6

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggTc
gactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg ctTg
tgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gctt
gaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgt

cactggcatc aacgagtact gcttctccgt gcag
aaaacc aacctgcgga tcgtggacgt 1560
cgggggccag aagtcagagc gtaagaaatg gatc
cattgt tctgagaacg tgatcgccct 1620
catctacctg gcctcactga gtgaatacga ccag
tcgatgcgaggagcctataccaaggagaaatcgcac
atgcaggagggagactcgccattcttgggact
atcctgggaacactattggctcaagatctcggggc
cctaag caggatgctg aggcagccaa 1860
gaggttcatc ctggacatgt acacaggat gtac
accggg tgcgtggacg gccccgagg 1920
cagcaagaag ggccacgat cccgacgct tttc
agccac tacacatgtg ccacagacac 1980
acagaacatc cgcaaggct tcaaggacgt gcgg
gactcg gtgctcgccc gctacctga 2040
cgagatcaac ctgctgtgac ccagatctaa agcc
gaattc tgagatata catcactg 2100
gcggccgctc gagcatgcat ctgactaga gggc
ccgttt aaaccgctg atcagcctcg 2160
actgtgcctt ctagtcca gccatctgtt gttt
gcccct cccccgtgcc ttccttgacc 2220
ctggaagggtg cactcccac tgcctttcc taat
aaaatg aggaattgc atcgattgt 2280
ctgagtaggt gtcatctat tctgggggt gggg
tggggc aggacagcaa gggggaggat 2340
tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcgg
tgggct ctatggcttc tgaggcggaa 2400
agaaccagct ggggctctag ggggatccc cacg
cgccct gtagcggcgc attaagcgcg 2460
gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gcta
cacttg ccagcgcct agcggccgct 2520
cctttcgctt tcttccctc ctttctcgcc acgt
tcgccg gctttccccg tcaagctcta 2580
aatcggggca tcccttagg gttccgattt agtg
ctttac ggcacctga ccccaaaaa 2640
cttgattagg gtgatggtc acgtagtgg ccat
cgccct gatagacgt tttcgccct 2700
ttgacgttg agtccagtt cttaaatgt ggac
tcttgt tccaaactg aacaacactc 2760
aacctatct cggctattc tttgattta taag
ggattt tggggattc ggcctattg 2820
ttaaaaaatg agctgattta aaaaaattt aacg
cgaatt aattctgtg aatgtgtgc 2880
agttaggggtg tggaaagtcc ccaggctccc cagg
caggca gaagtatga aagcatgat 2940
ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaag tccc
caggct cccagcagg cagaagtatg 3000
caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atag
tccgc ccctaactcc gcccatccg 3060
cccctaactc cgcccagttc cgccattct ccgc
cccatg gctgactaat ttttttatt 3120
tatgcagagg ccgaggccgc ctctgcctct gagg
tattcc agaagtatg aggaggcttt 3180

caagtcagag gtggcgaac ccgacaggac tata
aagata ccaggcgttt ccccctgga 4500
gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgcc
gcttac cggatacctg tccgccttc 4560
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcaat gctc
acgctg taggtatctc agttcgggtg 4620
aggctgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acga
accccc cgttcagccc gaccgctgcg 4680
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca accc
ggtaag acacgactta tcgccactgg 4740
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgag
gtatgt aggcggtgct acagagtct 4800
tgaagtggg gcctaactac ggctacacta gaag
gacagt atttggatc tgcgctctgc 4860
tgaagccagt taccttcgga aaaagagtig gtag
ctcttg atccggcaaa caaaccaccg 4920
ctggtagcgg tggttttttt gtttgaagc agca
gattac ggcagaaaa aaaggatctc 4980
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggg ctga
cgctca gtggaacgaa aactcacgtt 5040
aagggatitt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggat
cttcac ctagatcctt ttaaattaaa 5100
aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atga
gtaaac ttggtctgac agttaccaat 5160
gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctg
tctatt tcgttatcc atagttgct 5220
gactccccgt cgtgtagata actacgatac ggga
gggctt accatctggc cccagtgtcg 5280
caatgatac gcgagacca cgctcaccgg ctcc

73

【図面の簡単な説明】
【図1】ネコムC4 Rの放射線標識 cMC4 Rに対する¹²⁵I-NDP-MSHの特異的な結合を示すグラフとそれに対応するスクッチャードプロットである。
【図2】イヌMC4 Rの放射線標識 cMC4 Rに対する¹²⁵I-NDP-MSHの特異的な結合を示すグラフとそれに対応するスクッチャードプロットである。
【図3】ネコムC4 Rの放射線標識 cMC4 Rに対する¹²⁵I-NDP-MSHの特異的な結合を示すグラフとそれに対応するスクッチャードプロットである。
【図4】イヌMC4 Rの放射線標識 cMC4 Rに対する¹²⁵I-NDP-MSHの特異的な結合を示すグラフとそれに対応するスクッチャードプロットである。
【図5】ヒトMC4 Rの放射線標識 cMC4 Rに対する¹²⁵I-NDP-MSHの特異的な結合を示すグラフとそれに対応するスクッチャードプロットである。
【図6】hMC4 Rの放射線標識 cMC4 Rに対する¹²⁵I-NDP-MSHの特異的な結合を示すグラフとそれに対応するスクッチャードプロットである。
【図7】MC3 R及びMC4 Rを含有する膜由来¹²⁵I-NDP-MSHの特異的な結合を示すグラフとそれに対応するスクッチャードプロットである。
【図8】膜分画のMC3 R及びMC4 Rに対する¹²⁵I-NDP-MSHの特異的な結合を示すグラフとそれに対応するスクッチャードプロットである。
【図9】膜分画のMC3 R及びMC4 Rに対する¹²⁵I-NDP-MSHの特異的な結合を示すグラフとそれに対応するスクッチャードプロットである。
【図10】膜分画のMC3 R及びMC4 Rに対する¹²⁵I-NDP-MSHの特異的な結合を示すグラフとそれに対応するスクッチャードプロットである。
【図11】MC3 R及びMC4 Rを含有する膜由来¹²⁵I-NDP-MSHの様々なリガンドによる競合置換を示す作表及びグラフである。
【図12】MC3 R及びMC4 Rを含有する膜由来¹²⁵I-NDP-MSHの様々なリガンドによる競合置換を示す作表及びグラフである。
【図13】MC3 R及びMC4 Rを含有する膜由来¹²⁵I-NDP-MSHの様々なリガンドによる競合置換を示す作表及びグラフである。
【図14】MC3 R及びMC4 Rを含有する膜由来¹²⁵I-NDP-MSHの様々なリガンドによる競合置換を示す作表及びグラフである。

I - NDP - MSHの様々なリガンドによる競合置換を示す作表及びグラフである。

【図15】cMC4Rクローンの機能バリデーションとしての - MSHによる刺激後に、HEK293細胞にcAMPが蓄積されることを示すグラフである。

【図16】cMC4R及びG 15 - 16でトランスフェクトし、作動薬NDP - MSH、 - MSH又はMTI I、又はNDP - MSH、及び拮抗薬SHU9119で処理した細胞についてのFLIPR（登録商標）アッセイの結果を示すグラフである。

【図17】cMC4R及びG 15 - 16でトランスフェクトし、作動薬NDP - MSH、 - MSH又はMTI I、又はNDP - MSH、及び拮抗薬SHU9119で処理した細胞についてのFLIPR（登録商標）アッセイの結果を示すグラフである。

【図18】G - 15 (SEQ ID NO: 5) をコードする遺伝子のコーディング鎖のヌクレオチド配列で*

*ある。

【図19】G - 15 (SEQ ID NO: 5) をコードする遺伝子のコーディング鎖のヌクレオチド配列である。

【図20】G - 15 (SEQ ID NO: 5) をコードする遺伝子のコーディング鎖のヌクレオチド配列である。

【図21】G - 16 (SEQ ID NO: 6) をコードする遺伝子のコーディング鎖のヌクレオチド配列である。

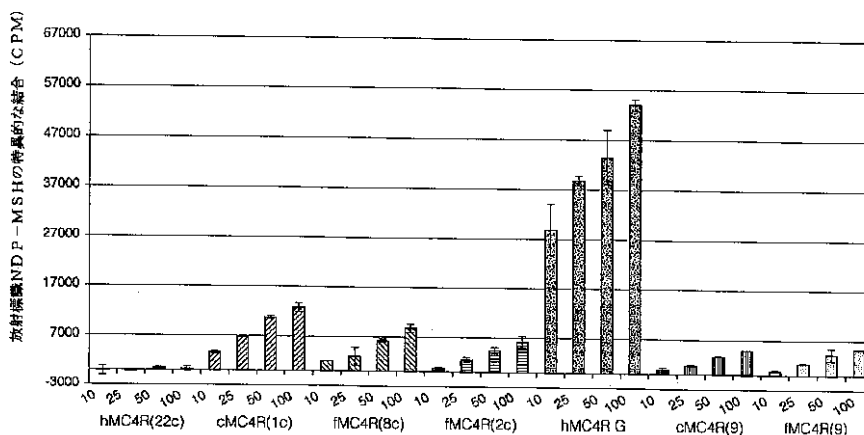
【図22】G - 16 (SEQ ID NO: 6) をコードする遺伝子のコーディング鎖のヌクレオチド配列である。

【図23】G - 16 (SEQ ID NO: 6) をコードする遺伝子のコーディング鎖のヌクレオチド配列である。

【図1】

CATAAAATCAGCAGCAGCTACTAACACTCAAAGCAATGCTTCAGGTTGGGAACTAATACCTCAGAGGCAGC
TGGTGTGAACATGCAAAACCGGATTCAGCTCCAGTGGCACAGCAGCCACTAGGAAAATTATTTTGA AAAAG
ACCTGACTGAATGCCTCAGGCTAAAGTTAAGGTGGAAGGGAGGACAGAAAAGCAAAGAGCAGACTCTTT
CAACTGAGAATGAGTATTTTCAGAAGCCTAAGATTTTACAATGAAGGTGATCAGAGCCGTTCCCTGGGAGACA
GTAAAACTCCATTTCCAGCCTGGGAGCAGCTGACATTTACTCACAACAGGCATGCCAATTCAGCCTCAN
AACTTCGGGGCAGACAAAGGCGTGGAGAAAAACACTGAGGCTACCTGACCCGAGAGATCGAATCAATTC
GAGGGGATCTGAATCCACTGGTGCAGGATGAACCTCCACTATCACCATGGAATGCACACTTCTCTCCACTT
CTGGAACCGCAGCACCTACGGACCGCACAGCAATGCCAGTGAGTCCCTGGAAAAGGCTACTCTGATGGA
GGGTGTTATGAGCAACTTTTGTCTCCCTGAGGTGTTTGTGACTCTGGGTGTCATCAGCTTGTGGAGAAT
ATTCCTGGTATTGTGGCAATAGCCAAGAAACAAAAACCTGCAITCGCCCATGTACTTTTTCATCTGCAGCCTG
GCTGTGGCTGATATGTTGGTGAGCGTGTCAAACGGATCCGAAACCATTTGTCATCACCCATATAAACAGTACA
GATACGGACCGCAGAGTTTACCCTGAAATATGATAATGTCATTGACTCGGTGATCTGTAGCTCCTTGCTT
GCATCGATTTGCAGCCTGCTCTCAATTCAGTGGACAGGTAATTTACTATCTTTTATGCTCTCCAGTACCATA
ACATCATGACGGTCAAGCGGGTGGGATCATATAAGTTGTATCTGGGAGCTTGCAGGTTTCGGCGTIT
TGTTCATCTACTCAGACAGCAGTGTCTCATCTGCTCATCACCATGTTCTTACCATGCTGGCTCT
CATGGCCTCTCTATGTCACATGTTCCATGCGCCAGACTGCACATTAAGAGAATTGCTGTCTCCCGG
CACTGGCACCATCCGCAAGGGGCCAACATGAAGGTGCAATACCTGACCATACTGATTGGGGTCTTTG
TTGCTGTCTGGGCCCGTCTTCTCCACTAATATCTACATCTTTGTCGCCAGAACCTTACTGTGTGTG
CTTCATGTCTCACTTAACCTGTATCTCATACTGATCATGTGTAATCCATCATCGACCCTTAATTTATGCACT
CCGGAGCCAAGAATAAGGAAAACCTTCAAAGATCATCTGTTGCTATCTCTAGGGCGCCTCTGTGATT
TGCTAGCAGATACTAACTGTGCAGATAGAAACCGTGCATAAGAGACTTCTTCAITCTTACAGAACCAGCA
TTGTGCTTTGATGACCTTTCTCTCTGTGTAAGGCATGGGTTGAGACTATCTGTTGTATAAATTAAGTTC
ATGACTTTTTTTTGAATGGAAACAATGCCAGTCTCTGTACATTTCTAATGTCCTTGTACTTTTTGGCTGTA
CAATGTTAATCCATATTATAGGTTGTAGGCCACTATGATGTATAAAAAA AAAAAAAAAA

【図5】



【 図 2 】

CTAAGACCGTGGGGAGGCAGCTGATGCCGAACATGTGCACGCAGATTCACTCCTGGTGGCTCGGGGCAACTC
GGAGAATTACTTGCAACAGACCTCACTGAATGCCCTAGACTAAAGTTAAGGTGGGAGTGAGGACAAAAA
AAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGAAAAAGCAAGAGCAGACTCTTTGAACATAAGAATGAG
CATTTCAGAAATCGAAGATGTTACAGTGAAGGTGATCGGAGCTGTACCTGGAAAGACAGTAAGAGCTCCACTGCC
AGCCTTTTGGAGCACGGGACAGGTACTCAACACCTGGCAGGCCAGCTGGATCCTCAGAACTTTGGGACGCACG
GAGAGGGGGAGAACATCACCGGGCTCCCTGGCTGGAGAGGCCGAATCAGTCCGAGGGGGTCTGCATACACT
TGTTCAGGATGAACCTCCACCTTCAGCACGGAATGCACACTTCTCCTCCACTCTGGAACCGCAGCACCTACGG
ACAGCACGGCAACCGCCACTGATCCCTTGGCAAAAGGCTACCCCGACGGGGGATGCTACGAGCAACTCTTCGTC
TCCCAGGAGGTGTTCCGTGACTCTGGGGGTGATAAGCTTGGCTGGAGAACATTCTGGTGATCGTGGCAATAGCCAA
GAACAAGAATCTGCACTCACCCATGTAATTTTCATCTGTAGCCTGGCTGTGGCCGATATGCTGGTGAGCGTTTC
CAACGGGTCAGAGACCATCGTCATCACCTGTGAACAGTACGGATACGGACCGCAGAGTTTCAGGTTGAATA
TTGATAATGTCATTGACTCGGTGATCTGTAGCTCCTTGTCTCGCCTCGAATTCGAGCCTGCTCTCAITGCAAGTGA
CAGGTACTTTACTATCTTTATGCCCTCCAGTACCATAACATCATGACGGTGAGGGCGGGTGGGATCATCATGAT
TGCATCTGGGCGGCTTGCACGGTGTCAAGGCATCTTGTTCATCATTACTCGGACAGTACTGCTGTATCATCTGCC
TCATCACCATGTTCTTACCATGCTGGCCCTCATGGCTTCTCTTACGTCACATGTTCTCATGCCCAGACTGCA
CATCAAGAGAATCGCGTCTCTCCGGCACCGGCACCATCCGCCAAGGGGCCAACATGAAGGGTGCCATTACCT
TGACCATACTCAITGGGGTCTTCGTCGTCGCTGGGCTCCATCTTCTCCACTTGATATTCTACATCTCTTGTCCC
CAGAATCCATACTGTGTGTCTTCACTTTAACTTGTACCTCAATCTGATCATGTGTAACCTCCATCATCGA
CCCTCTCAATTTGCACTCCGGAGCCAAAGAGCTGAGGAAAACCTTCAAAGAGATCATCTGTGCTATCCTCTGGG
TGGCTTTGTGACTTGTCTAGCAGATACTAGCTGGGGACAGAGGAAGTACTAAAACATGCACCAGAGACTTTC
TCATCTCACACAACATGAACCTGTGCTTGGACAACAGCTCTTCTCAGTATAAGGCAGGAGTTGAGAATATC
TGTGTCACAAATCAACTTTATGATGTTTGTGATGTGAAAAAAAATGCCAGGCTGTACATTGCTAATGTGAT
GCTACTTTTGGGCTGTGCAATGTTAATCCATTCGACGCTGTAGACACTTGAATTTCTAGAAAAAGAAAAAGCT
TCCATTAAGACATATCAGTGTCTTGTGTTTACAGGAGATTGGCACTTGTCTTGTGAAACATAGAAAT
CATAGAATCATAACTATGTAGCCTGATAAGTAACTTCTTATTTATATATATATACATGAAATGTGCAGATTGAA
TATGATGGGGGTGATATGAACAATAGATACTTGGTCATTAACAAATCAACTGAAATTTTAAAGTATAAAA
TGTGTTCAITCTCCCTGTTGCAGAAATAAAAAA

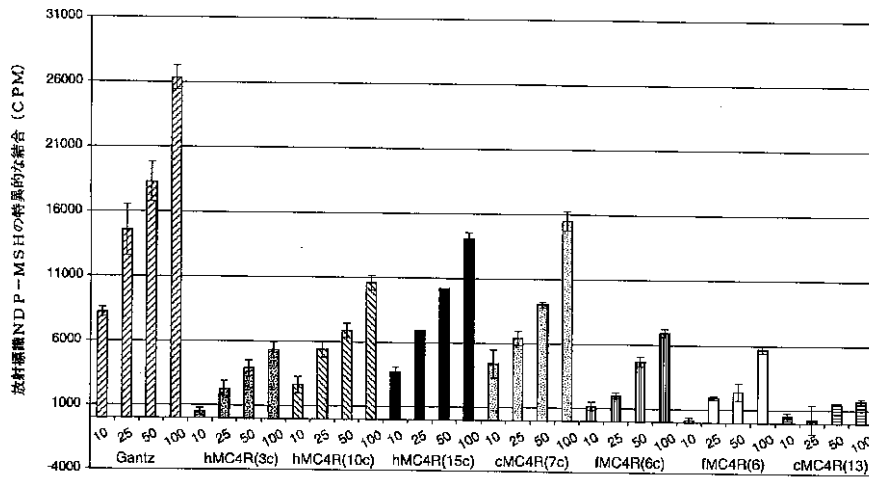
【 図 3 】

ECD1
MNSTHHHGMHTSLHFWRNSTYGPHSNASESLGKGYSDGGCYE
I CD1 II
QLFVSPEVFTLGVISLLENILVIVAIAKNKNLHSPMYFFICSLAV
II ECD2 III
ADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTDAQSFTVNIDNVIDSVICSSLL
III CD2 IV
ASICSLLSIAVDRYFTIFYALQYHNIMTVRRVGHISCIWAAC TVS
IV ECD3 V CD3
GVLFIIYSDSSAVIICLITMFFTMLALMASLYVHMFLMARLHIKRI
CD3 VI
AVLPGTGTIRQGANMKGAITLTILIGVFVVCWAPFFLHLIFYISCP
ECD4 VII CD4
QNPYCVCFMSHFNLYLILIMCNSIIDPLIYALRSQELRKTFFKEIICC
YPLGGLCDLSSRY.

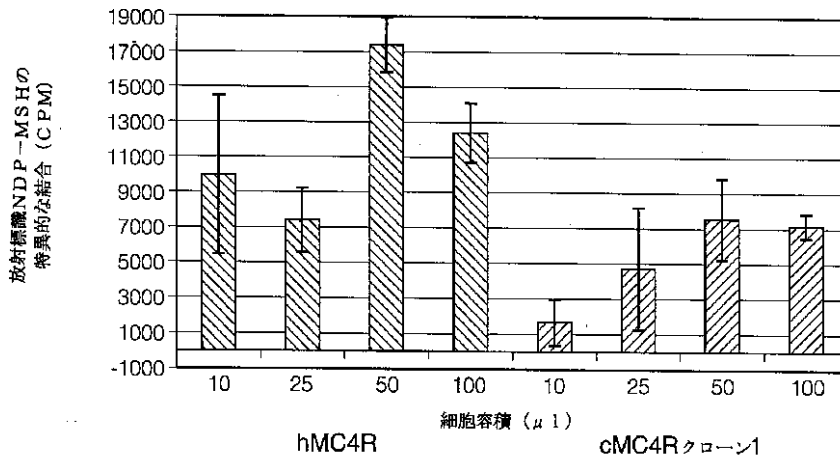
【 図 4 】

ECD1
MNSTLQHGMHTSLHFWRNSTYGQHGHNATESLGKGYPDGGCY
I CD1 II
EQLFVSPEVFTLGVISLLENILVIVAIAKNKNLHSPMYFFICSL
II ECD2 III
AVADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTDAQSFTVNIDNVIDSVICS
III CD2 IV
SLLASICSLLSIAVDRYFTIFYALQYHNIMTVRRVGHISCIWAAC
IV ECD3 V
TVSGILFIIYSDSTAVIICLITMFFTMLALMASLYVHMFLMARLH
CD3 VI
IKRIAVLPGTGTIRQGANMKGAITLTILIGVFVVCWAPFFLHLIF
ECD4 VII CD4
YISCPQNPYCVCFMSHFNLYLILIMCNSIIDPLIYALRSQELRKTFF
KEIICCYPLGGLCDLSSRY.

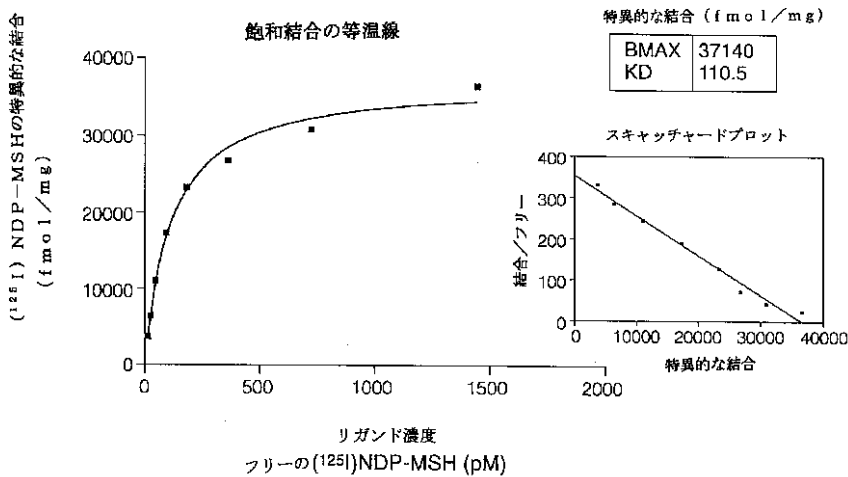
【図6】



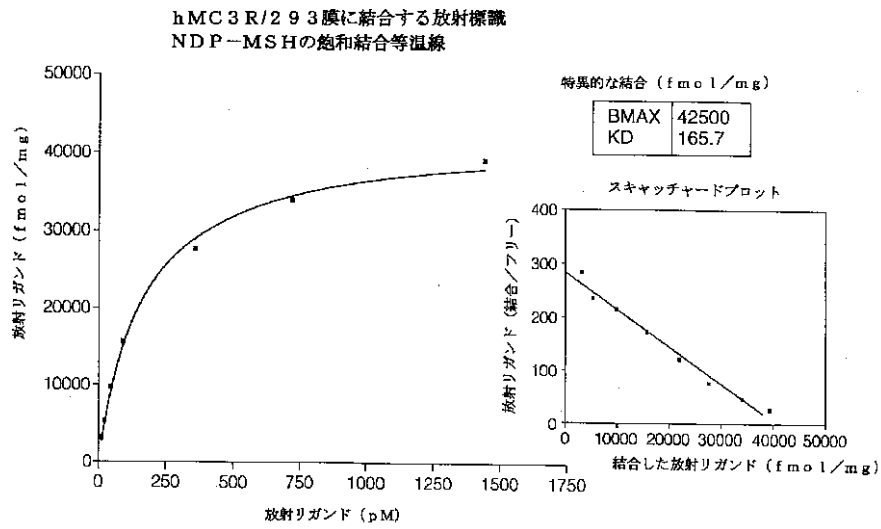
【図7】



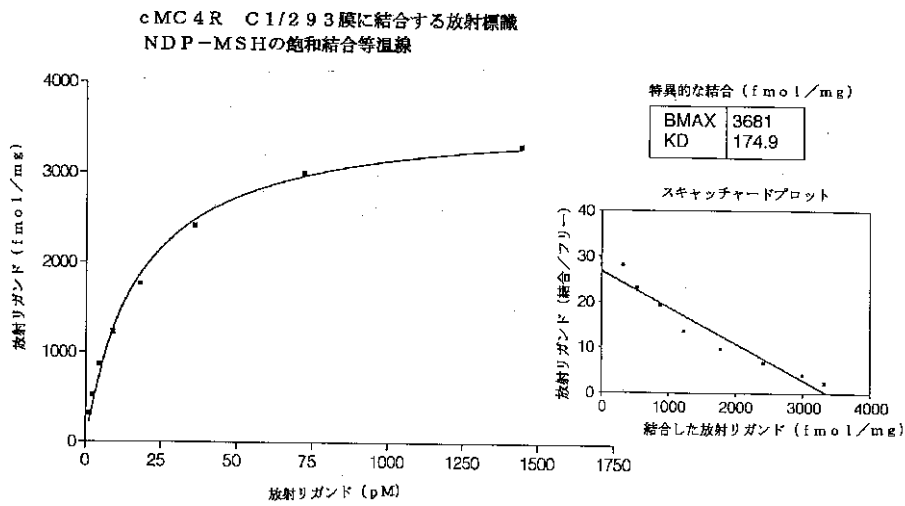
【図8】



【図9】



【図10】

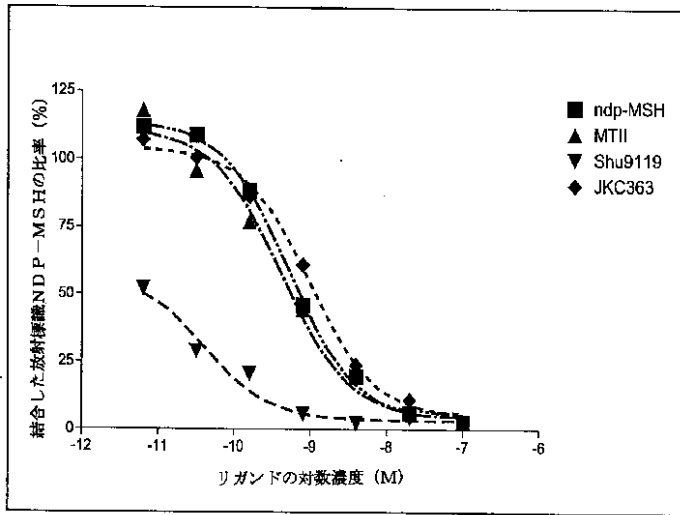


【図11】

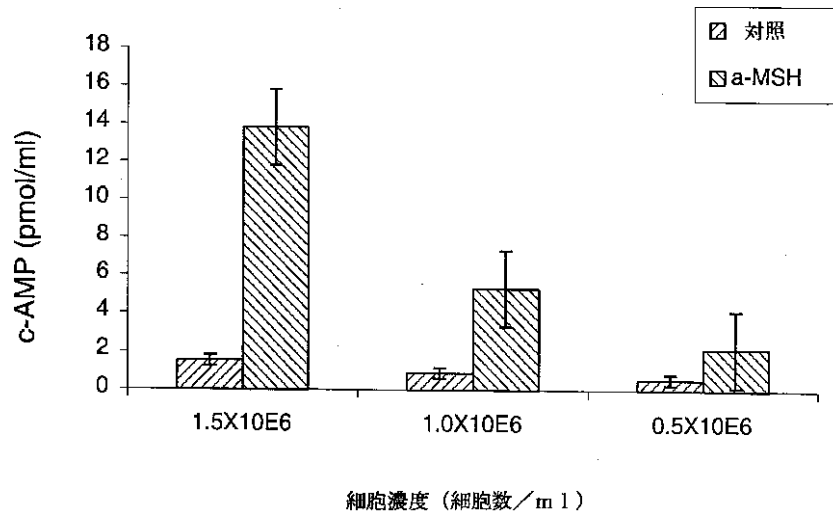
膜	IC50 (M)		Shu9119	JKC363
	ndp-MSH	MTII		
hMC4R	5.13E-10	3.95E-10	7.63E-11	1.31E-09
cMC4R	5.25E-10	4.01E-10	4.07E-11	9.71E-10
hMC3R	3.68E-10	2.48E-09	3.05E-10	1.51E-08

h=ヒト
c=イヌ

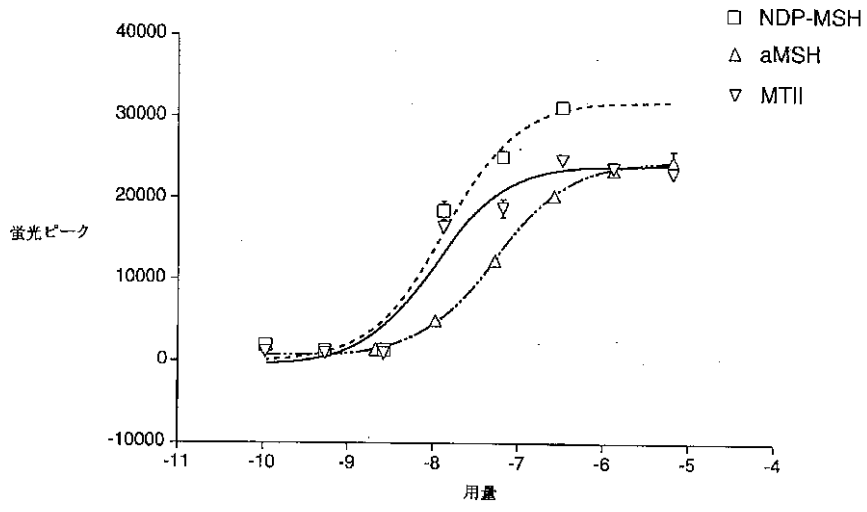
【図14】



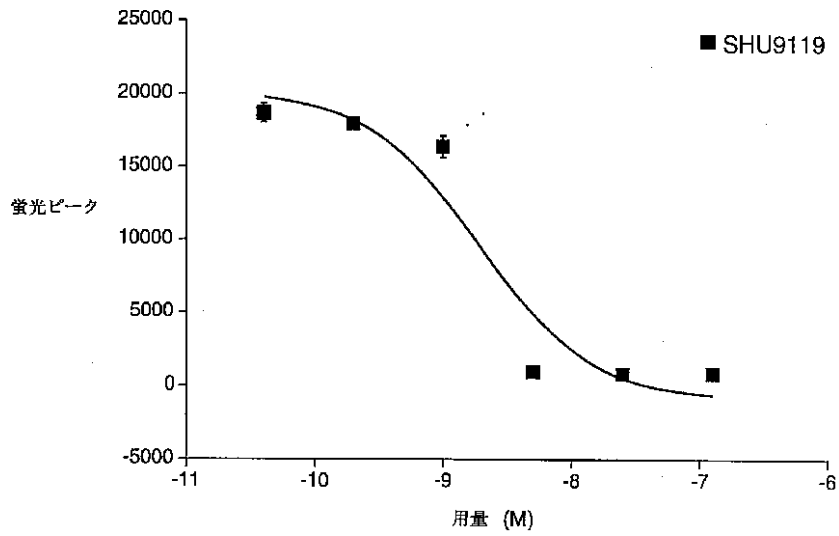
【図15】



【図16】



【図17】



(72)発明者	メアリー・アン・ヒックマン アメリカ合衆国コネチカット州06340, グ ロトン, イースタン・ポイント・ロード, ファイザー・グローバル・リサーチ・アン ド・ディベロプメント	Fターム(参考)	2G045 AA29 AA34 AA35 BB10 BB20 BB41 BB46 BB50 BB51 CB01 CB17 DA13 DA36 FB02 FB07 FB08
(72)発明者	カレン・リン・ハウスクネット アメリカ合衆国コネチカット州06340, グ ロトン, イースタン・ポイント・ロード, ファイザー・グローバル・リサーチ・アン ド・ディベロプメント		4B024 AA01 AA11 BA43 BA63 CA04 CA07 CA09 CA11 DA01 DA02 DA05 DA11 EA01 EA02 EA03 EA04 FA02 GA01 GA11 HA01 HA03 HA12
(72)発明者	アラン・スコット・ロバートソン アメリカ合衆国コネチカット州06340, グ ロトン, イースタン・ポイント・ロード, ファイザー・グローバル・リサーチ・アン ド・ディベロプメント		4B063 QA01 QA18 QA19 QQ01 QQ13 QR08 QR33 QR42 QR55 QR59 QR62 QR74 QR80 QR82 QS05 QS25 QS33 QS34 QS36 QX02 4B064 AG20 CA01 CA19 CC24 DA01 DA13 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA25 CA43 CA46 4C084 AA16 MA52 MA63 MA67 NA12 NA14 ZA07 ZA36 ZA70 ZA75 ZA81 ZB11 ZB26 ZB31 ZC21 ZC33 ZC42 ZC54 ZC61 4C085 AA14 CC23 GG04 GG05 GG08 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA20 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	筛选试验以鉴定新的黑皮质素-4受体序列和用于调节动物食欲和代谢率的化合物		
公开(公告)号	JP2002335974A	公开(公告)日	2002-11-26
申请号	JP2001190828	申请日	2001-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
[标]发明人	メアリーアンヒックマン カレンリンハウスクネット アランスコットロバートソン		
发明人	メアリー・アン・ヒックマン カレン・リン・ハウスクネット アラン・スコット・ロバートソン		
IPC分类号	A01K67/027 A61K39/395 A61K45/00 A61K49/00 A61P1/00 A61P3/00 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P13/12 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/705 C07K14/72 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K49/0008 A61P1/00 A61P3/00 A61P3/10 A61P13/12 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/723		
FI分类号	A01K67/027 A61K39/395.N A61K45/00 A61P3/00 A61P3/00.171 A61P3/04 A61P3/06 A61P3/10 A61P7/00 A61P9/00 A61P13/12 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N5/00.101 C12N5/12		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB41 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB07 2G045/FB08 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA43 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA01 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QQ13 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS05 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG20 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA43 4B065/CA46 4C084/AA16 4C084/MA52 4C084/MA63 4C084/MA67 4C084/NA12 4C084/NA14 4C084/ZA07 4C084/ZA36 4C084/ZA70 4C084/ZA75 4C084/ZA81 4C084/ZB11 4C084/ZB26 4C084/ZB31 4C084/ZC21 4C084/ZC33 4C084/ZC42 4C084/ZC54 4C084/ZC61 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG08 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	60/213909 2000-06-26 US		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

要解决的问题：提供一种用于治疗与食物摄取和能量代谢不足有关的食欲相关的代谢和生殖疾病的方法和治疗组合物。编码犬和猫黑皮质素4受体及其基因产物的新型核酸；筛选试验以鉴定可调节黑皮质素4受体活性或表达的化合物；黑皮质素受体的活性或表达 提供了用于治疗与食物摄取和能量代谢不足有关的食欲相关的代谢和生殖疾病的方法和治疗组合物，包括向动物施用调节化合物。

	1 ヒト	2 ブタ	3 ラット	4 ニワトリ	5 イヌ	6 ネコ
ヒト	100	95.2	92.8	87.0	94.6	95.8
ブタ		100	94.0	88.0	96.1	98.2
ラット			100	86.7	93.7	95.2
ニワトリ				100	86.7	87.7
イヌ					100	97.6
ネコ						100