

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 528574

(P2003 - 528574A)

(43)公表日 平成15年9月30日(2003.9.30)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 21/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 21/00		25/00 101	4 B 0 6 5
	25/00 101	31/18	4 C 0 8 4
	31/18	35/00	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 34数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 503650(P2001 - 503650)

(86)(22)出願日 平成12年6月9日(2000.6.9)

(85)翻訳文提出日 平成13年12月5日(2001.12.5)

(86)国際出願番号 PCT/US00/15868

(87)国際公開番号 W000/077206

(87)国際公開日 平成12年12月21日(2000.12.21)

(31)優先権主張番号 09/329,685

(32)優先日 平成11年6月10日(1999.6.10)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アボット・ラボラトリーズ  
ABBOTT LABORATORIE  
S

アメリカ合衆国、イリノイ・60064 - 6050、  
アボット・パーク、アボット・パーク・ロ  
ード・100、チャド・0377/エイ・ピー・6・  
デー2

(72)発明者 ウー・ウオン、チンシユン・アール  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・95132、  
サン・ノゼ、ガーベイ・プレイス・1594

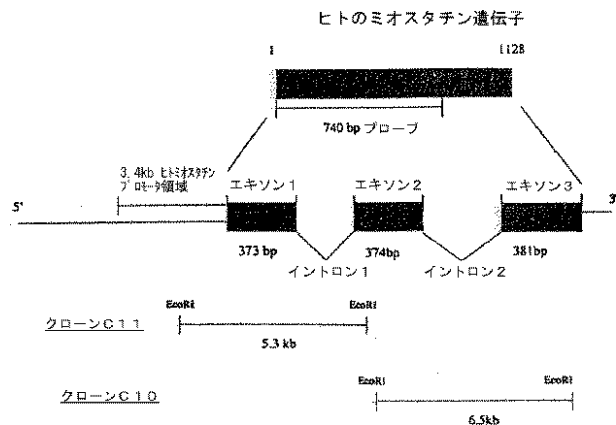
(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外5名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ミオスタチン遺伝子プロモータおよびその活性化阻害

(57)【要約】

本発明は、ミオスタチン遺伝子の発現を誘導するプロモータ、ならびに前記プロモータの阻害に有用な組成物を同定するための方法に関し、そしてミオスタチンの合成、分泌および機能を妨げることに有用な方法および組成物にも関する。特に、ミオスタチンの合成、分泌および機能を妨げる阻害剤は、ヒトおよび哺乳動物における筋肉量の喪失を妨げるために使用することができる。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 図2（配列番号1）によって表される単離された核酸配列。

【請求項2】 請求項1に記載される前記核酸配列と、レポーター分子をコードする核酸配列とを含むベクターであって、前記レポーター分子をコードする前記核酸配列は請求項1に記載される前記核酸配列に機能的に連結しているベクター。

【請求項3】 前記レポーター分子は、ルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）からなる群から選択される、請求項2に記載のベクター。

【請求項4】 前記レポーター分子はルシフェラーゼである、請求項3に記載のベクター。

【請求項5】 請求項3に記載されるベクターを含む宿主細胞。

【請求項6】 ミオスタチンによる免疫感作に応答して産生される精製された抗体。

【請求項7】 請求項6に記載される前記精製抗体を含む組成物。

【請求項8】 ミオスタチンプロモータの活性化を阻害する組成物を同定する方法であって、

a) 図2（配列番号1）によって表される核酸配列と、レポーター分子をコードする核酸配列とを含むベクターを構築する工程であって、前記レポーター分子をコードする前記核酸配列は、図2によって表される前記配列をコードする前記核酸配列に機能的に連結されている工程；

b) ミオスタチンの発現に好適な時間および条件のもとで前記ベクターを宿主細胞に導入する工程；

c) ミオスタチンプロモータの活性化を阻害し得る組成物と、前記レポーター分子に特異的な基質とに前記宿主細胞をさらす工程；および

d) 前記レポーター分子と前記基質との反応によって生じるシグナルを、コントロールの宿主細胞によって産生されるシグナルと比較して測定する工程であって、（c）の前記宿主細胞によるシグナルの方が小さいことにより、前記組成物が前記ミオスタチンプロモータの活性化を阻害することが示される工程

を含む方法。

【請求項9】 ミオスタチンの発現を阻害する組成物を同定する方法であって、

a) ミオスタチンに対して産生されたモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体からなる群から選択される抗体を固相に加える工程；

b) 既知濃度のミオスタチン、または前記試験組成物にさらされたミオスタチン含有細胞サンプルを、前記抗体と前記既知濃度のミオスタチンまたは前記細胞サンプル内のミオスタチンとの間での第1の複合体を形成させるために前記固相に加える工程；

c) ミオスタチンに対して産生されたモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体からなる群から選択される第2の抗体を、前記第1の複合体と前記第2の抗体との間での第2の複合体が形成されるのに十分な時間および条件のもとで前記第1の複合体に加える工程；

d) 前記第2の複合体を、前記第2の複合体の前記抗体に対する抗体に結合させたシグナル生成化合物を含む指示試薬と、第3の複合体が形成されるのに十分な時間および条件のもとで接触させる工程；および

e) 測定可能なシグナルの存在を検出する工程であって、前記シグナルが存在しないことにより、前記組成物がミオスタチンの発現を阻害することが示され、そして前記シグナルが存在することにより、前記組成物がミオスタチンの発現を阻害しないことが示される工程

を含む方法。

【請求項10】 ミオスタチンの発現を阻害する組成物を同定する方法であって、

a) 一定量のミオスタチンを固相にコーティングする工程；

b) 既知濃度のミオスタチン、または前記組成物にさらされたミオスタチン含有細胞サンプルを加える工程；

c) ミオスタチンに対して産生されたモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体からなる群から選択される抗体を、第1の複合体を形成させるのに十分な時間および条件のもと、(a)および(b)における前記ミオスタチンに接触さ

せる工程であって、(a)のミオスタチンは前記モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に対して(b)のミオスタチンと競合する工程；

d)前記第1の複合体を、前記第1の複合体の前記抗体に対する抗体に結合させたシグナル生成化合物を含む指示試薬と、第2の複合体が形成されるのに十分な時間および条件のもとで接触させる工程；および

(e)測定可能なシグナルを検出する工程であって、コントロールと比較してシグナルがより大きいことにより、前記組成物がミオスタチンの発現を阻害することが示される工程

を含む方法。

【請求項11】 ミオスタチンがミオスタチン受容体に結合することを阻害する組成物を組成物の混合物中において同定する方法であって、

a)精製されたミオスタチンを組成物の前記混合物と混合する工程；

b)工程(a)で得られた混合物を、ミオスタチンと複合体化した組成物がフィルターを通過できないようなサイズの細孔を有するフィルターに通す工程；および

c)複合体化した組成物の構造を明らかにし、それによってミオスタチンがミオスタチン受容体に結合することを阻害する組成物を同定する工程

を含む方法。

【請求項12】 ミオスタチンがミオスタチン受容体に結合することを阻害する組成物を同定する方法であって、

a)組換えミオスタチンを放射能標識する工程；

b)前記放射能標識された組換えミオスタチンを、ミオスタチン受容体を含む細胞または膜とともにインキュベーションする工程；

c)工程(b)のインキュベーション混合物を目的とする組成物と接触させる工程；

d)細胞または膜に結合した放射能標識ミオスタチンを非結合ミオスタチンから分離する工程；および

e)コントロールと比較して、結合ミオスタチンにおける放射能の量を測定する工程であって、前記コントロールと比較して結合ミオスタチンにおける放射能

のレベルがより少ないことにより、ミオスタチンが受容体に結合することを阻害する組成物が示される工程を含む方法。

【請求項13】 哺乳動物における筋肉消費を防止する方法であって、筋肉消費が防止されるように、ミオスタチンプロモータの活性化を防止すること、ミオスタチンの合成を妨げること、およびミオスタチンがその標的受容体に結合することを妨げることからなる群から選択される作用を引き起こす有効成分を治療効果的な量で含む組成物を前記哺乳動物に投与することを含む方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****(技術分野)**

本発明は、ミオスタチン遺伝子の発現を調節するプロモータ、ならびにこのプロモータを阻害する方法、およびそのような阻害のために使用される組成物に関する。特に、プロモータの阻害剤は、ミオスタチン遺伝子の発現を妨げ、従って筋肉消耗を妨げる。

**【0002】****(背景情報)**

ミオスタチンまたは増殖/分化因子8 (GDF-8) は、トランスフォーミング増殖因子 - (TGF-) スーパーファミリーに属している (McPheron 他、Nature、387:83~90 (1997))。ヒトのミオスタチン遺伝子がクローニングされており (Nestor 他、Proc. Natl. Acad. Sci. 95:14938~43 (1998))、そしてミオスタチンの免疫反応性がヒト骨格筋において1型線維および2型線維の両方で検出され得ることが報告されている。機能に関して、ミオスタチンは、骨格筋の増殖および発達を負に調節することにおいて役割を果たしていると考えられる (Nestor 他、上記)。

**【0003】**

筋肉発達を負に調節することにおいてミオスタチンが重要な役割を果たし得るという最初の証拠が、ミオスタチンのノックアウトマウスを用いた研究からもたらされた (McPheron 他、Nature、387:83~90 (1997))。ミオスタチンヌルマウスにおいて、この動物は、野生型マウスよりも著しく大きく、そして骨格筋の量が大きく広範囲に増大していることを除いてかなり正常であった。さらに、増大した筋肉量を特徴とする2系統のウシはミオスタチンのコード配列に変異を有することもまた明らかにされた (McPheron 他、Proc. Natl. Acad. Sci. 94、12457~61 (1997))。さらに、免疫反応性ミオスタチンの血清濃度および筋肉内濃度は、健康者と比較して、筋肉消耗を伴うHIV感染者では増大しており、そして脂肪を

含まないマスインデックスと負の相関を有することに留意しなければならない。これらのデータは、ミオスタチンが成人における骨格筋増殖の負の調節因子であり、HIV感染者における筋肉消耗に寄与しているという仮説を支持している（Nestor他、上記）。

【0004】

上記の知見を考慮すれば、特に、例えば、老化、自己免疫不全症候群（AIDS）、多発性硬化症およびガンなどの状態または疾患状態の結果としての筋肉消耗を受けている個体においてミオスタチンの発現を調節する方法が求められている。本発明は、そのような筋肉消耗状態の個体を助けるために用いることができる方法および組成物を提供し、そしてミオスタチンの遺伝子発現の調節に対するさらなる洞察を提供する。

【0005】

本明細書中において参照されているすべての米国特許および刊行物は、これらにより参考としてその全体が組み込まれる。

【0006】

（発明の開示）

本発明は、図2（配列番号1）によって表される単離された核酸配列を包含する。

【0007】

さらに、本発明は、上記の核酸配列と、レポーター分子をコードする核酸配列とを含むベクターを包含する。レポーター分子をコードする核酸配列は、図2によって表される核酸配列に機能的に連結されている。レポーター分子は、例えば、ルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）からなる群から選択され得る。好ましくは、レポーター分子はルシフェラーゼである。本発明はまた、上記のベクターを含む宿主細胞を包含する。

【0008】

さらに、本発明は、ミオスタチンによる免疫感作に応答して産生される精製された抗体、ならびにこの精製された抗体を含む組成物を包含する。

## 【0009】

さらに、本発明はまた、ミオスタチンプロモータの活性化を阻害する組成物を同定する方法を包含する。この方法は下記の工程を含む：a) 図2(配列番号1)によって表される核酸配列と、レポーター分子をコードする核酸配列とを含むベクターを構築する工程であって、レポーター分子をコードする核酸配列は、図2によって表される配列をコードする核酸配列に機能的に連結されている工程；b) ミオスタチンの発現に好適な時間および条件のもとでベクターを宿主細胞に導入する工程；c) ミオスタチンプロモータの活性化を阻害し得る組成物と、レポーター分子に特異的な基質とに宿主細胞をさらす工程；およびd) レポーター分子と基質との反応によって生じるシグナルを、コントロールの宿主細胞によって産生されるシグナルと比較して測定する工程であって、(c)の宿主細胞によるシグナルの方が小さいことにより、組成物がミオスタチンプロモータの活性化を阻害することが示される工程。

## 【0010】

また、本発明は、ミオスタチンの発現を阻害する組成物を同定する方法を包含する。この方法は下記の工程を含む：a) ミオスタチンに対して産生されたモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体からなる群から選択される抗体を固相に加える工程；b) 既知濃度のミオスタチン、または試験組成物にさらされたミオスタチン含有細胞サンプルを、抗体と既知濃度のミオスタチンまたは細胞サンプル内のミオスタチンとの間での第1の複合体を形成させるために固相に加える工程；c) ミオスタチンに対して産生されたモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体からなる群から選択される第2の抗体を、第1の複合体と第2の抗体との間での第2の複合体が形成されるのに十分な時間および条件のもとで第1の複合体に加える工程；d) 第2の複合体を、前記第2の複合体の前記抗体に対する抗体に結合させたシグナル生成化合物を含む指示試薬と、第3の複合体が形成されるのに十分な時間および条件のもとで接触させる工程；e) 測定可能なシグナルの存在を検出する工程であって、シグナルが存在しないことにより、組成物がミオスタチンの発現を阻害することが示され、そしてシグナルが存在することにより、組成物がミオスタチンの発現を阻害しないことが示される工程。

## 【0011】

さらに、本発明はまた、ミオスタチンの発現を阻害する組成物を同定する方法を包含する。この方法は下記の工程を含む：a)一定量のミオスタチンを固相にコーティングする工程；b)既知濃度のミオスタチン、または組成物にさらされたミオスタチン含有細胞サンプルを加える工程；c)ミオスタチンに対して産生されたモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体からなる群から選択される抗体を、第1の複合体を形成させるのに十分な時間および条件のもと、(a)および(b)におけるミオスタチンに接触させる工程であって、(a)のミオスタチンは、抗体に対する競合において、(b)のミオスタチンと競合する工程；d)前記複合体を、第1の複合体の抗体に対する抗体に結合させたシグナル生成化合物を含む指示試薬と、第2の複合体を形成させるのに十分な時間および条件のもとで接触させる工程；および(e)測定可能なシグナルを検出する工程であって、コントロールと比較してシグナルがより大きいことにより、組成物がミオスタチンの発現を阻害することが示される工程。

## 【0012】

さらに、本発明は、ミオスタチンがミオスタチン受容体に結合することを阻害する組成物を組成物の混合物の中から同定する方法を包含する。この方法は下記の工程を含む：a)精製したミオスタチンを組成物の混合物と混合する工程；b)工程(a)の得られた混合物を、ミオスタチンと複合体化した組成物がフィルターを通り抜けられないようなサイズの細孔を有するフィルターに通す工程；およびc)複合体化した組成物の構造を明らかにし、それによってミオスタチンがミオスタチン受容体に結合することを阻害する組成物を同定する工程。

## 【0013】

また、本発明は、ミオスタチンがミオスタチン受容体に結合することを阻害する組成物を同定する方法を包含する。この方法は下記の工程を含む：a)組換えミオスタチンを放射能標識する工程；b)放射能標識された組換えミオスタチンを、ミオスタチン受容体を含む細胞または膜と一緒にインキュベーションする工程；c)工程(b)でインキュベーションした混合物を目的とする組成物と接触させる工程；d)細胞または膜に結合した放射能標識ミオスタチンを非結合ミオ

スタチンから分離する工程；およびe) コントロールと比較して、結合ミオスタチンにおける放射能の量を測定する工程であって、コントロールと比較して結合ミオスタチンにおける放射能のレベルがより低いことにより、ミオスタチンが受容体に結合することを阻害する組成物が示される工程。

#### 【0014】

さらに、本発明は、哺乳動物における筋肉消耗を防止する方法を包含する。この方法は、筋肉消耗が防止されるように、ミオスタチンプロモータの活性化を防ぐこと、ミオスタチンの合成を妨げること、およびミオスタチンがその標的受容体に結合することを妨げることからなる群から選択される作用を引き起こす有効成分を治療効果的な量で含む組成物を前記哺乳動物に投与することを含む。

#### 【0015】

( 図面の簡単な説明 )

図1は、ヒトミオスタチン遺伝子の概念図を表す。ヒトミオスタチン遺伝子は3つのエキソンと2つのイントロンとを含み、これらが、1.1 kbのミオスタチンcDNAにコードされる。ヒトP1由来人工染色体(PAC)ライブラリーを、ヒトミオスタチンのエキソン1およびエキソン2をコードする740 bpのプロープを使用してスクリーニングしたとき、120 kbのインサートを有する1個の陽性クローンが同定された。このクローンをEcoRIで消化した後、2つのヒトゲノムサブクローンが単離された。このサブクローンの一方(クローンC11)は、0.37 kbのエキソン1、1.53 kbのイントロン1、およびヒトミオスタチンプロモータ領域を含有する3.4 kbの配列を含有していた。

#### 【0016】

図2は、ヒトミオスタチンプロモータ領域の核酸配列を表す。転写因子の結合領域と推定される領域がいくつか同定され、下線が引かれている。

#### 【0017】

図3は、ヒトの骨格筋、横紋筋肉腫細胞および前立腺平滑筋細胞から得られたRNAサンプルの、ヒトミオスタチンに特異的なプライマーを使用したRT-PCRによるミオスタチンmRNAの検出を表す。G3PDHにはG3PDHに特異的なプライマーが使用される。増幅されたミオスタチン遺伝子(1.1 kb)

は、ヒトの骨格筋細胞（レーン1）および横紋筋肉腫細胞（レーン2）の両方で認められたが、前立腺平滑筋細胞（レーン3）では認められなかった。増幅されたG3PDH遺伝子（0.9kb）は、骨格筋細胞（レーン4）、横紋筋肉腫細胞（レーン5）および前立腺平滑筋細胞（レーン6）で認められた。

【0018】

図4は、ルシフェラーゼレポーター構築物を表す。3.4kbのヒトミオスタチンプロモータ領域を、ルシフェラーゼをレポーターとするpGL3-エンハンサーベクター（Promega、Madison、WI）のXhoI部位およびHindIII部位にクローニングした。このベクターは、ルシフェラーゼレポーター遺伝子と、転写レベルを増大させるためのSV40エンハンサーエレメントとを含有した。

【0019】

図5は、ヒトの骨格筋細胞および横紋筋肉腫細胞におけるヒトミオスタチンプロモータ領域に対するルシフェラーゼアッセイから得られた結果を表す。

【0020】

（発明の詳細な説明）

上記に記されているように、本発明は、ミオスタチン遺伝子の発現の活性化、または調節に関与するプロモータの同定および単離に関する。ミオスタチンは、骨格筋の増殖および発達を負に調節する。

【0021】

特に、本発明は、ミオスタチンのプロモータ活性を阻害する化合物を同定するために使用され得る方法に関する。ミオスタチンの発現を調節するミオスタチンプロモータ領域または核酸配列は、ルシフェラーゼレポーター遺伝子に連結される。従って、ルシフェラーゼの発現を妨げるミオスタチンプロモータ領域の活性を阻害する化合物が同定できる場合、プロモータ領域の機能発現が妨げられ、それによってミオスタチンの発現を妨げることができる。

【0022】

ミオスタチンプロモータ活性およびルシフェラーゼ産生を阻害する化合物の同定は、薬物スクリーニングアッセイを使用することにより行うことができる。最

初に、ルシフェラーゼレポーター遺伝子に連結されたミオスタチンのプロモータ領域をコードする単離されたDNA配列を含むベクターが作製される。ベクターとしては、例えば、プラスミド、バクテリオファージまたはコスミドがあり得る。その後、ベクターは、ミオスタチンプロモータの活性化に好適な時間および条件のもとで宿主細胞に導入される。宿主細胞は、原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。好ましくは、真核生物細胞（例えば、筋肉系の細胞株）が利用される。例には、ヒト骨格筋細胞、ヒト横紋筋肉腫細胞、ならびにラットのL6細胞およびL8細胞が含まれる。その後、宿主細胞は、ミオスタチンプロモータの活性化およびルシフェラーゼ遺伝子の発現を阻止すると考えられる試験組成物にさらされる。細胞はルシフェラーゼの基質にもさらされる。その後、ルシフェラーゼ-基質の反応から発するシグナルまたは光の量を測定する。問題とする組成物にさらされた宿主細胞によって產生されるシグナルの量が、コントロールの細胞（すなわち、組成物にさらされていない細胞）によって產生されるシグナルの量よりも少ない場合、その組成物は、ミオスタチンプロモータの活性を阻害しており、ミオスタチン遺伝子の発現を阻害することにおいて有用である。処理された細胞によって產生されるシグナルの量がコントロールの細胞によって產生されるシグナルの量に等しい場合、その組成物は、ミオスタチンプロモータの活性を阻害しておらず、ミオスタチン遺伝子の発現を阻害しない。

#### 【0023】

ミオスタチンプロモータの活性を阻害する組成物が同定されると、そのような組成物は、筋肉消耗を含む任意のタイプの状態、例えば、後天的免疫不全症候群（AIDS）、ガン、多発性硬化症および老化を伴う患者に投与することができる。そのような薬学的組成物は、治療有効量の阻害剤および適切な生理学的に受容可能なキャリア（例えば、水、緩衝液または生理食塩水）を含むことができる。薬学的組成物の投薬量、形態（例えば、懸濁物、錠剤、カプセルなど）および投与経路（例えば、経口的、局所的、静脈内、皮下など）は、医師によって容易に決定することができ、例えば、患者の年齢、体重、免疫状態および全体的な健康状態のような様々な要因に依存し得る。

#### 【0024】

さらに、本発明はまた、例えば、適切なキャリア（例えば、水、緩衝液または生理食塩水）とともに投与され得る精製されたミオスタチンタンパク質またはその一部を使用して得られる抗体を含む組成物を包含する。抗体が投与された後、抗体は体内の発現ミオスタチンに結合して、複合体を形成し、それによって、発現したミオスタチンが筋肉の発達を負に調節することを妨げることができる。抗体自体ならびにその一部もまた、そのような抗体またはその一部を含むアッセイと同様に本発明の範囲に包含される。

#### 【0025】

上記の薬学的組成物および抗体は、獣医学的適用のために（例えば、老化または疾患動物における筋肉消耗を防止するために）、あるいは農業的適用のために（例えば、ミオスタチンを有しない動物ははるかに多くの筋肉量を示すので、家畜における食肉生産を増大させるために）用いられ得ることに留意しなければならない。例えば、ミオスタチンプロモータの活性を阻害する治療組成物は、例えば、ウマ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ネコ、イヌおよびブタなどの哺乳動物に投与することができる。

#### 【0026】

本発明はまた、精製されたミオスタチンおよび/またはミオスタチン抗体を使用する方法で、ミオスタチンタンパク質の合成および分泌を阻害する組成物を同定する2つの方法を包含する。サンドイッチ法では、成熟型のミオスタチンに対する哺乳動物のモノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体（ウサギまたはマウス）を、固体表面（例えば、Immulon-4プレート（Dynateck Laboratories INC., Chantilly, VA）にコーティングする。表面は、既知のプロットング剤、例えば、ウシ血清アルブミン（BSA）でプロットングし、洗浄する。サンプル（例えば、試薬の存在下または非存在下で処理されたヒト骨格筋細胞に由来する上清）または既知濃度の精製された成熟型ミオスタチンを表面（例えば、プレート）に加える。ミオスタチンを抗体（1つまたは2つ以上）に結合させた後、表面を洗浄し、その後、ミオスタチンに対する哺乳動物のモノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体（例えば、ヤギ、ウサギまたはマウス）と一緒にインキュベーション

する。第2の抗ミオスタチン抗体の結合が、シグナル生成化合物（例えば、酵素）と結合した抗体を含む指示試薬の使用により検出される。酵素に対する基質もまた、酵素を使用した場合に加える。例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）およびその基質O-フェニレンジアミン塩酸塩（OPD）を用いることができる。特に、酵素-基質の反応は、例えば、マイクロプレートリーダーで読み取ることができる検出可能なシグナルまたは変化（例えば、発色）を生じさせる。利用され得る酵素以外のシグナル生成化合物の例には、例えば、発光性化合物、放射活性元素、視覚的標識および化学発光化合物が含まれる。既知濃度の精製されたミオスタチンは、標準曲線を作製するために使用される。未知サンプル（例えば、試薬の存在下または非存在下で処理されたヒト骨格筋細胞に由来する上清）におけるミオスタチンの濃度は、この標準曲線を使用して決定することができる。上清中のミオスタチン濃度を低下させる試験剤は、ミオスタチンの合成および/または分泌を阻害することに関して有用な可能性がある。

#### 【0027】

競合的方法では、一定量のヒトミオスタチンを固体表面（例えば、Immulon-4プレート）にコーティングする。プレートを、例えば、BSAまたは別の既知のプロットング剤によってプロットングし、そして洗浄する。サンプル（例えば、例えば、試験剤の存在下または非存在下で処理されたヒト骨格筋細胞に由来する上清）または既知濃度の精製された成熟型ミオスタチンを、ミオスタチンに対する哺乳動物のモノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体（例えば、ヤギ、ウサギまたはマウス）とともにプレートに加える。プレートを洗浄し、その後、シグナル生成化合物、例えば、酵素（または上記に記載された成分）と結合した抗体を含む指示試薬と一緒にインキュベーションする。酵素を使用した場合は、酵素に対する基質もまた供給する。酵素は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）であり得る。従って、基質はO-フェニレンジアミン塩酸塩（OPD）であり得る。再度ではあるが、酵素-基質の反応は、例えば、マイクロプレートリーダーで読み取ることができる検出可能なシグナルまたは変化（例えば、発色）を生じさせる。既知濃度の精製されたミオスタチンは、標準曲線を作製するために使用することができる。未知サンプル（例えば、試

験剤の存在下または非存在下で処理されたヒト骨格筋細胞に由来する上清)におけるミオスタチンの濃度は、この標準曲線を使用して決定することができる。上清中のミオスタチン濃度を低下させる試験剤は、ミオスタチンの合成および/または分泌を阻害することに関して潜在的に有用である。既知濃度のミオスタチンまたはサンプル中のミオスタチンは、ミオスタチン抗体に対する結合において、プレートにコーティングされたミオスタチンタンパク質と競合する。より多くのミオスタチンがサンプル中に存在する場合、より少ないシグナルが生じる。試験剤がミオスタチンの合成/分泌を阻止できる場合、その特定のサンプルにおけるミオスタチンの量はコントロールよりも少なくなり、そのサンプルにおけるシグナルはコントロールよりも多くなる。

#### 【0028】

さらに、本発明は、ミオスタチンに結合して、ミオスタチンがその受容体に結合することを妨げ、それによってミオスタチンの機能発現を妨げる組成物を同定するために、ろ過アッセイにおいて精製ミオスタチンを使用するアフィニティー選択法を包含する。簡単に記載すると、精製されたミオスタチンを、いくつかの試験化合物と混合する。この混合物を、特定分子量の分子のみが通過することができるフィルターに通す。ミオスタチンに結合した組成物は、フィルターによって保持される。結合していない化合物は保持されず、結合した組成物から分離され得る。ミオスタチンに結合した組成物の構造は、例えば、質量分析法によって決定される。

#### 【0029】

さらに、本発明はまた、ミオスタチン受容体を含む組織または細胞から調製された細胞または膜に結合する放射能標識されたミオスタチンを使用する受容体結合法を包含する。この方法では、ミオスタチンがその受容体に結合することを阻止し、従って、ミオスタチンの機能発現を阻害する組成物を同定することができる。特に、細菌細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞に由来する精製された組換えミオスタチンタンパク質を放射能標識する( [  $^{125}\text{I}$  ]、[  $^3\text{H}$  ]、[  $^{14}\text{C}$  ] など)。その後、放射能標識されたミオスタチンを、ミオスタチン受容体を含む組織または細胞から調製された細胞または膜と一緒に試験組成物の存在下

または非存在下でインキュベーションする。放射能標識された細胞および膜を、その後、放射能標識されていない細胞および膜から、例えば、ろ過および遠心分離などの分離方法により分離する。細胞または膜に結合しているミオスタチンの量は、放射能を計測することによって決定される。試験組成物の存在下で放射能が減少することにより、その組成物がミオスタチンの結合を阻害していること、従ってミオスタチンの機能を阻害することにおいて有用であることが示される。

#### 【0030】

本発明は、下記の非限定的な実施例の使用によって例示され得る。

#### 【0031】

##### 実施例 I

ヒトミオスタチンプロモータをコードするヌクレオチド配列および有用な転写因子結合領域の同定

1. ヒトミオスタチン cDNA のクローニング。ヒトミオスタチン cDNA を、ヒト骨格筋の 5' - plus cDNA ライブラリー (Clontech、Palo Alto、CA) から、下記の特異的なプライマーを使用して、PCR により増幅した: 5' - ATGCAAAA ACTGCAACTCTGTGTTT - 3' および 5' - TCATGAGCACCCACAGCGGTC - 3'。PCR 産物を真核生物 TA クローニングベクターの pCR3.1 (Invitrogen、Carlsbad、CA) にクローニングした。DNA を配列決定することによってインサートを確認した。

#### 【0032】

2. ヒトミオスタチンプロモータ領域のクローニング。ヒトミオスタチン遺伝子のエキソン 1 およびエキソン 2 を含むヒトミオスタチン cDNA (図 1) の EcoRI および HindIII のフラグメント (740 bp) を、ヒト P1 由来人工染色体 (PAC) ライブラリーをスクリーニングするためのプローブとして Genome Systems Inc. (St. Louis、MO) に送った。120 kb のインサートを有する 1 個の陽性クローンが、同じプローブを使用するゲノムサザンプロットによって同定され、確認された。この 120 kb のインサートを EcoRI 制限酵素で消化して、プラスミド pZero (Invitro

ogen、Carlbad、CA)にサブクローニングした。5 kb~7 kbのインサートを有する2つの陽性サブクローンが同定された(図1)。配列決定の結果は、クローン10がエキソン2とイントロン1およびイントロン2の一部とを含有することを示している。クローン11(5.3 kb)は、エキソン1、イントロン1の一部、および3.4 kbの5'非翻訳領域(すなわち、推定的なミオスタチンプロモータ領域)を含有する。プログラムMatInspector V2.2(Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH、Braunschweig、ドイツ)による検索が行われ、潜在的な転写因子結合領域がいくつか同定された(図2)。MatInspectorは、コンセンサスモチーフに対する配列データの迅速な走査を可能にするソフトウェアである。MatInspectorは、類似性インデックスを計算するためにMatIndによって作製されるコア類似性、マトリクス類似性およびCiベクトルを使用する。潜在的な転写因子結合部位は、コア類似性およびマトリクス類似性の両方が0.95に達するときを選択された。プログラムの詳細は、Quandt他、Nucleic Acids Research、23:4878~4884、1995に説明されている。

### 【0033】

3. ミオスタチンを発現するヒト骨格筋細胞または筋肉系統の他の細胞株の同定。ヒトの骨格筋細胞および横紋筋肉腫細胞に由来する全RNAを、Trizol試薬(Life Technologies、Gaithersburg、MD)を使用して単離し、逆転写用のテンプレートとして使用した。ミオスタチン遺伝子を、ヒトミオスタチンに特異的な下記のプライマーを使用してPCRにより増幅した: 5' - ATGCAAAACTGCAACTCTGTGTTT - 3' および 5' - TCATGAGCACCCACAGCGGTC - 3'。ヒト前立腺平滑筋細胞に由来する全RNAも同様に試験した。内因性のG3PDH遺伝子に対するプライマーを使用して、全RNAの完全性を調べた。PCR産物を1%アガロースゲルで分析した(図3)。1.1 kbのPCR産物(1.1 kbはミオスタチンの正しいサイズである)により、ヒトの骨格筋細胞および横紋筋肉腫細胞の両方がミオスタチンを発現していることが示される。

## 【0034】

## 実施例II

## ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを、哺乳動物遺伝子発現の定量的分析のために設計した。ホタル (*Photinus pyralis*) ルシフェラーゼのコード領域を、ヒトミオスタチン遺伝子の3.4 kbの5'非翻訳領域(5'-UTR)に連結した。この構築物をヒト骨格筋細胞またはヒト横紋筋肉腫細胞に一過性トランスフェクションして、48時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性を分析するために、ルシフェリンおよび $Mg^{2+}$ -ATPを細胞抽出物に加え、光の生成をモニターした。3.4 kbの5'-UTR領域がプロモータ活性を有する場合、ルシフェラーゼ活性は増大する。従って、ルシフェラーゼ活性は、上流のプロモータ領域の機能の指標(レポーター)として使用することができる。

## 【0035】

3.4 kbのヒトミオスタチンの5'非翻訳領域を、pGL3-エンハンサーベクター(Promega, Madison, WI)のXhoI部位およびHindIII部位にクローニングし、ルシフェラーゼレポーター遺伝子に連結した(図4)。この構築物を、Superfect試薬(Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA)を使用してヒト骨格筋細胞またはヒト横紋筋肉腫細胞に一過性トランスフェクションした。 - ガラクトシダーゼ遺伝子またはウミシイタケ(*Renilla*)ルシフェラーゼ遺伝子などの別のレポーター遺伝子を、トランスフェクション効率のためのコントロールとして同時にトランスフェクションした。細胞を48時間後に溶解緩衝液中で溶解し、細胞抽出物を、検出キット[例えば、LucLite(Packard, Meriden, CT)、発光 - ガラクトシダーゼ検出キットII(Clontech, Palo Alto, CA)、または二重ルシフェラーゼレポーターアッセイシステム(Promega, Madison, WI)]を使用してルシフェラーゼ活性および - gal活性について分析した。pGL3-エンハンサー親ベクターをネガティブコントロールとして使用し、SV40プロモータを有するpGL3コント

ロールベクターをルシフェラーゼ活性のポジティブコントロールとして使用した。ルシフェラーゼ活性は、MicroBetaカウンターまたはLuminometer (EG&G Life Sciences -Wallac、Turku、フィンランド)などの発光検出器で計数し、結果はトランスフェクション効率により標準化した。ヒトミオスタチンプロモータ構築物のルシフェラーゼ活性は、その親ベクターと比較して、ヒト骨格筋細胞では約5倍増大していた(図5A)。ヒト横紋筋肉腫細胞では、ルシフェラーゼ活性の増大は約7倍であった(図5B)。予想されるように、ルシフェラーゼ活性は、ミオスタチンを発現していないヒト前立腺平滑筋細胞では増大しなかった(図5A)。

#### 【0036】

上記の結果を考慮すると、3.4 kbのヒトミオスタチンプロモータ領域を含有するルシフェラーゼレポーター構築物は、高処理能スクリーニングのために、SV-40で形質転換されたヒト骨格筋細胞または横紋筋肉腫細胞などの哺乳動物細胞株に安定的または一過性にトランスフェクションすることができる。ルシフェラーゼ活性は、ミオスタチン遺伝子の発現を阻害する化合物を選択するための指標として使用することができる。

#### 【0037】

##### 実施例III

高処理能スクリーニングのための酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

サンドイッチ法ELISAまたは競合的ELISAを、ヒトミオスタチンタンパク質の合成および/または分泌を阻害する化合物を同定するために使用することができる。例えば、サンドイッチELISAでは、成熟型のミオスタチンに対するウサギまたはマウスのモノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体をImmulon-4プレート(Dynatech Laboratories, Inc., Chantilly, VA)にコーティングし、そしてプレートをBSAによってブロッキングし、洗浄する。サンプル(例えば、試験剤の存在下または非存在下で処理されたヒト骨格筋細胞に由来する上清)または既知濃度の精製された成熟型ミオスタチンをプレートに加える。ミオスタチンタンパク質を結合させた後、プレートを再び洗浄し、その後、ミオスタチンに対するウサ

ギまたはマウスのモノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体と一緒にインキュベーションする。第2の抗ミオスタチン抗体の結合が、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と結合した抗体によって、基質としてo-フェニレンジアミン塩酸塩(OPD)を使用して検出される。既知濃度のミオスタチンは、標準曲線を作製するために使用される。

#### 【0038】

競合的ELISAでは、ヒトミオスタチンタンパク質をImmulon-4プレートにコーティングし、そしてプレートをBSAでブロッキングし、洗浄する。サンプル(例えば、試験剤の存在下または非存在下で処理されたヒト骨格筋細胞に由来する上清)または既知濃度の精製された成熟型ミオスタチンまたはミオスタチンペプチドを、ミオスタチンに対するヤギまたはウサギまたはマウスのモノクローナル抗体および/またはポリクローナル抗体とともにプレートに加える。プレートを再び洗浄し、その後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と結合した抗体とともに、基質としてo-フェニレンジアミン塩酸塩(OPD)を使用してインキュベーションする。既知濃度のミオスタチンは、標準曲線を作製するために使用する。

#### 【0039】

ミオスタチンを合成して分泌するヒト骨格筋細胞または筋肉系統の他の細胞株は、ミオスタチンの合成または分泌を阻害すると考えられる化合物を試験するために使用することができる。細胞は、所定の時間、例えば、6時間~48時間試験化合物と一緒にインキュベーションする。その後、細胞培地におけるミオスタチンの量をELISAによって測定する。ミオスタチン量の減少により、試験化合物がミオスタチンの合成および分泌を阻害することにおいて効果的であること、これに対して、ミオスタチン量の増大またはミオスタチンの同じレベルの維持により、試験化合物がミオスタチンの合成および分泌を阻害することにおいて効果的でないことが示される。

#### 【0040】

##### 実施例IV

受容体結合アッセイにおいて使用される放射能標識されたミオスタチンの作製

細菌細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞に由来する精製された組換えミオスタチンタンパク質が放射能標識される（ $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ など）。その後、放射能標識されたミオスタチンは、ミオスタチン受容体を含有する組織または細胞から調製された細胞または膜とともに試験組成物の存在下または非存在下でインキュベーションされる。膜に結合しているミオスタチンの量は、放射能を計測することによって決定される。試験組成物の存在下で放射能が減少することにより、その組成物がミオスタチンの結合を阻害していること、従ってミオスタチンの機能を阻害することにおいて有用であることが示される。

#### 【0041】

##### 実施例V

アフィニティー選択において使用される精製されたミオスタチン

細菌細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞に由来する精製された組換えミオスタチンタンパク質は、試験組成物との結合において使用される。特に、ミオスタチンに結合した試験組成物はフィルターに保持され、そしてその構造が質量分析法によって決定される。ミオスタチンに結合する試験組成物は、ミオスタチンがその受容体に結合することを阻害することにおいて、従ってミオスタチンの機能を阻害することにおいて有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、ヒトミオスタチン遺伝子の概念図を表す。ヒトミオスタチン遺伝子は3つのエキソンと2つのイントロンとを含み、これらにより、1.1 kbのミオスタチンcDNAがコードされる。ヒトP1由来人工染色体(PAC)ライブラリーを、ヒトミオスタチンのエキソン1およびエキソン2をコードする740 bpのプロープを使用してスクリーニングしたとき、120 kbのインサートを有する1個の陽性クローンが同定された。このクローンをEcoRIで消化した後、2つのヒトゲノムサブクローンが単離された。このサブクローンの一方(クローンC11)が、0.37 kbのエキソン1、1.53 kbのイントロン1、およびヒトミオスタチンプロモータ領域を含有する3.4 kbの配列を含有した。

##### 【図2】

図2は、ヒトミオスタチンプロモータ領域の核酸配列を表す。推定的な転写因子結合領域がいくつか同定され、下線が引かれている。

【図3】

図3は、ヒトの骨格筋、横紋筋肉腫細胞および前立腺平滑筋細胞から得られたRNAサンプルの、ヒトミオスタチンに特異的なプライマーを使用したRT-PCRによるミオスタチンmRNAの検出を表す。G3PDHにはG3PDHに特異的なプライマーが使用される。増幅されたミオスタチン遺伝子(1.1kb)が、ヒトの骨格筋細胞(レーン1)および横紋筋肉腫細胞(レーン2)の両方で認められたが、前立腺平滑筋細胞(レーン3)では認められなかった。増幅されたG3PDH遺伝子(0.9kb)が、骨格筋細胞(レーン4)、横紋筋肉腫細胞(レーン5)および前立腺平滑筋細胞(レーン6)で認められた。

【図4】

図4は、ルシフェラーゼレポーター構築物を表す。3.4kbのヒトミオスタチンプロモータ領域を、ルシフェラーゼをレポーターとするpGL3-エンハンサーベクター(Promega、Madison、WI)のXhoI部位およびHindIII部位にクローン化した。このベクターは、ルシフェラーゼレポーター遺伝子と、転写レベルを増大させるためのSV40エンハンサーエレメントとを含有した。

【図5】

図5は、ヒトの骨格筋細胞および横紋筋肉腫細胞におけるヒトミオスタチンプロモータ領域に対するルシフェラーゼアッセイから得られた結果を表す。

【図1】

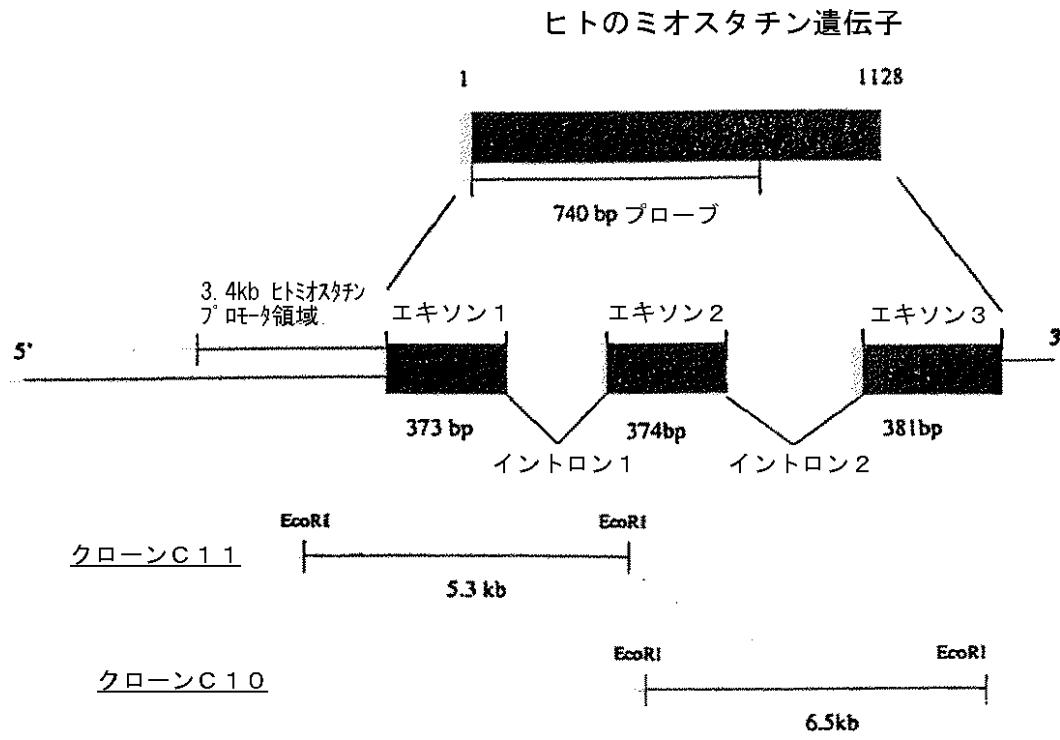


Figure 1



【図3】

ヒトミオスタチンに対するRT-PCR

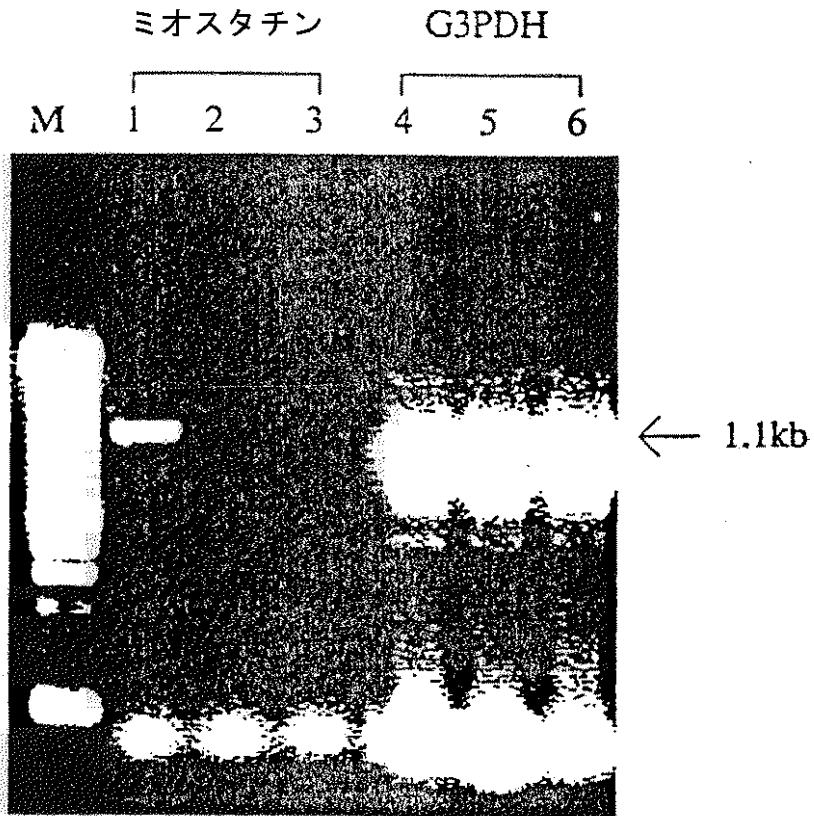


Figure 3

【図4】

ルシフェラーゼレポーター構築物

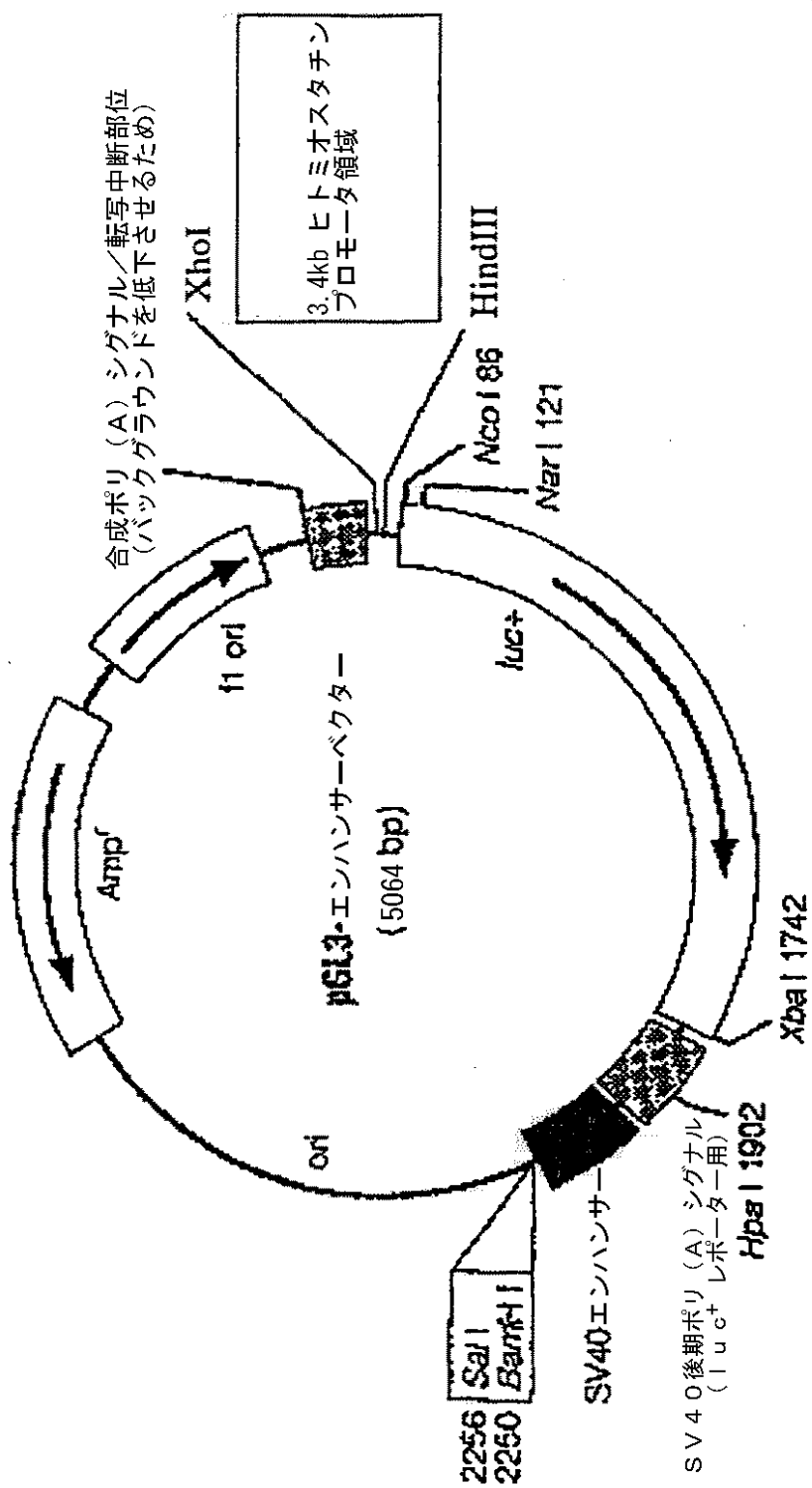
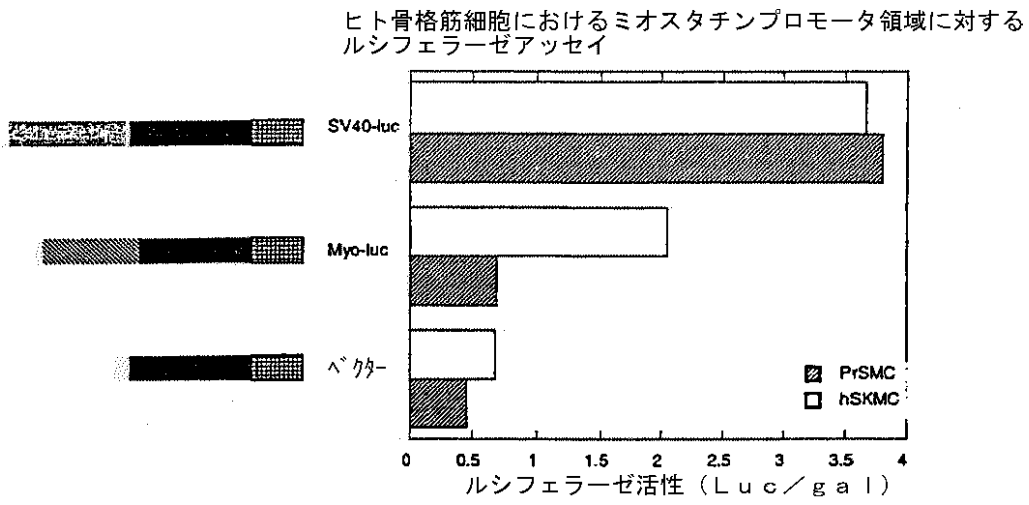
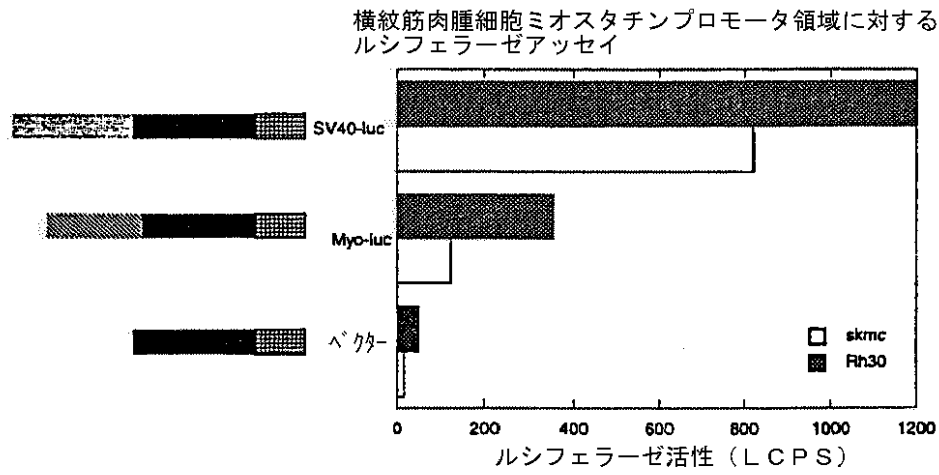


Figure 4

【図5】



(A)



(B)

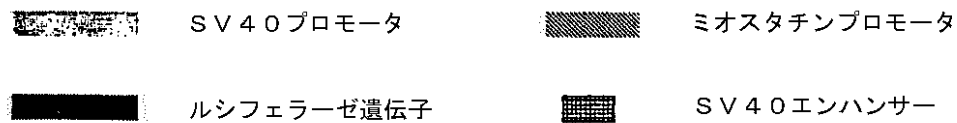


Figure 5

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Int. Application No. PCT/US 00/15868
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	C12N15/12 G01N33/566	C12N5/10 C12Q1/68
	C07K14/475	C07K16/18
		G01N33/50
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7	C12N	C07K G01N C12Q
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 33887 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED) 6 August 1998 (1998-08-06) abstract examples 1-9 claims 1-43	6,7,9-12
A	---	1-5,8
P,X	WO 00 04051 A (METAMORPHIX INC) 27 January 2000 (2000-01-27) the whole document	1-5,8
E	EP 1 072 680 A (PFIZER PROD INC) 31 January 2001 (2001-01-31) the whole document	1-5,8
	---	
	---/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
13 February 2001		28. 02 2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Galli, I

4

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 00/15868

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE EMBL DATABASE 'Online! Accession No. AF093798, 5 October 1998 (1998-10-05) DANEAU I.: "Sus scrofa myostatin (GDF-8) promoter genomic sequence" XP002131251 the whole document</p> <p>---</p>	1-5,8
A	<p>DATABASE EMBL SEQUENCES 'Online! Accession No. AJ133580, 23 March 1999 (1999-03-23) STRATIL A.: "Sus scrofa myostatin gene (GDF8) promoter, exon 1." XP002131250 the whole document</p> <p>---</p>	1-5,8
A	<p>AUSUBEL F.M. ET AL.: "Current Protocols in Molecular Biology" 1988, JOHN WILEY &amp; SONS, UNITED STATES OF AMERICA XP002160132 Unit 11.2 - Enzyme-linked Immunosorbent Assays.</p> <p>---</p>	9,10,12
A	<p>WANG L ET AL: "Determination of heparin-induced IgG antibody by fluorescence-linked immunofiltration assay (FLIFA)" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, vol. 222, no. 1-2, 1999, pages 93-99, XP004152431 ISSN: 0022-1759 abstract</p> <p>-----</p>	11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 00/15868**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 13  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

see additional sheet

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

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 13

Claim 13 relates to the use of a composition comprising an "active ingredient" that influences myostatin promoter activity, myostatin synthesis or myostatin activity, without however offering a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, said claim is ambiguous and vague, and the subject matter is not sufficiently disclosed and supported pursuant to Art. 5 and 6 PCT. No search can be carried out for such purely speculative claims, the wording of which is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-5,8 and partly 13

An isolated nucleic acid represented by seq. ID 1 (human myostatin promoter).

A vector comprising said nucleic acid and a reporter gene.  
A method of identifying a composition which inhibits activation of the myostatin promoter comprising the use of said reporter vector.

2. Claims: 6,7,9,10 and partly 13

A purified antibody produced in response to immunization with myostatin.

A method of identifying a composition which inhibits expression of myostatin comprising the use of an anti-myostatin antibody.

3. Claims: 11,12 and partly 13

A method of identifying a composition (possibly in a mixture of compositions) which prevents myostatin from binding to a myostatin receptor, comprising the use of purified and/or labelled myostatin.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 00/15868

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9833887 A	06-08-1998	US 5994618 A AU 6274298 A	30-11-1999 25-08-1998
WO 0004051 A	27-01-2000	AU 5542799 A	07-02-2000
EP 1072680 A	31-01-2001	NONE	



专利名称(译)	肌肉生长抑制素基因启动子及其激活抑制		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003528574A</a>	公开(公告)日	2003-09-30
申请号	JP2001503650	申请日	2000-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	雅培公司		
申请(专利权)人(译)	雅培制药		
[标]发明人	ウーウオンチンシユンアール ワンチャホン		
发明人	ウー-ウオン,チンシユン・アール ワン,チャホン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K45/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P31/18 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/475 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/536		
CPC分类号	A61P21/00 A61P25/00 C07K14/475		
FI分类号	A61K45/00 A61P21/00 A61P25/00.101 A61P31/18 A61P35/00 A61P43/00.105 C07K16/24 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/536.B G01N33/536.C C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA21 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS03 4B063/QS07 4B063/QS34 4B065/AA90X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA16 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA02 4C084/ZA94 4C084/ZB26 4C084/ZC52 4C084/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/FA74		
优先权	09/329685 1999-06-10 US		
其他公开文献	JP4625602B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及诱导肌生长抑制素基因表达的启动子，以及鉴定可用于抑制所述启动子的组合物的方法，以及可用于干扰肌生长抑制素的合成，分泌和功能的方法和组合物。这也令人担忧。特别地，干扰肌生长抑制素的合成，分泌和功能的抑制剂可用于防止人类和哺乳动物的肌肉质量损失。

ニ  
ミ  
モ  
タ  
タ  
バ  
カ  
フ

