

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. August 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/063036 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

LEUTZ, Achim [DE/US]; Eichengrund 3, 16352 Schönwalde (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/00367

(22) Internationales Anmeldedatum:
1. Februar 2002 (01.02.2002)

(74) **Anwalt: BAUMBACH, Fritz**; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) **Bestimmungsstaaten (national)**: JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(30) **Angaben zur Priorität**:
101 04 952.8 3. Februar 2001 (03.02.2001) DE

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)**: **MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN** [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US)**: **CALKHOVEN, Cornelis, F.** [NL/DE]; Maybachufer 26a, 12047 Berlin (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) **Title**: VECTOR SYSTEM USED IN SCREENING ACTIVE SUBSTANCES

(54) **Bezeichnung**: VEKTORSYSTEM ZUM SCREENING VON WIRKSTOFFEN

(57) **Abstract**: The invention relates to a vector system for use in screening active substances that influence translation in the cell. The inventive system is suitable for use in the pharmaceutical industry, in medicine and in molecular biology. The vector system consists of control elements of translation that substantially lie in the 5' position with respect to the detection cassette, but optionally also in the 3' position or within the detection cassette. The system further comprises a detection cassette that encodes two or more protein reporter constructs in different reading frames, said reporter constructs containing signal sequences for the release from the cell and various antigen sites by way of which reporter proteins can be immobilized and specifically detected.

(57) **Zusammenfassung**: Die Erfindung betrifft ein Vektorsystem zum Screening von Wirkstoffen, welche die Translation in der Zelle beeinflussen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie, die Medizin und die Molekularbiologie. Das Vektorsystem besteht aus Kontrollelementen der Translation, die im wesentlichen 5' von der Detektionskassette liegen, ggf. aber auch in 3'-Stellung oder innerhalb der Detektionskassette, einer Detektionskassette, die für zwei oder mehrere Protein-Reporterkonstrukte in unterschiedlichen Leserastern kodiert, wobei die Reporterkonstrukte Signalsequenzen zum Ausschleusen aus der Zelle und verschiedene antigene Stellen, mit deren Hilfe Reporterproteine immobilisiert und differentiell detektiert werden können, enthalten.



WO 02/063036 A2

Vektorsystem zum Screening von Wirkstoffen

Die Erfindung betrifft ein Vektorsystem zum Screening von Wirkstoffen, welche die Translation in der Zelle beeinflussen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die pharmazeutische Industrie, die Medizin und die Molekularbiologie.

Die Kontrolle der Boten RNA Translation in Proteine ist ein wichtiger biologisch-regulatorischer Vorgang, dessen Deregulation Ursache vieler Krankheiten ist. Es gibt bereits einige Arbeiten, die sich mit der Pathologie der Translationsregulation von Proteinen in der Zelle beschäftigen.

Beispielsweise wurde eine erhöhte Expression des eukaryontischen Translations-Initiationsfaktors eIF-4E beim Darmkrebs gefunden. (Rosenwald et al., 1999; Oncogene 18:2507). Dieser Initiationsfaktor bindet die 5' gelegene CAP-Struktur eukaryontischer mRNAs und spielt somit bei der Initiation der Translation eine entscheidende Rolle. Zuvor war bereits gezeigt worden, dass die Überexpression von eIF-4E normale Nagerzellen in Tumorzellen umwandelt und zu einer Verstärkung von Transformationsparametern in menschlichen Zellen führt. Andererseits unterdrückt die Ausschaltung von eIF-4E die Transformation durch das ras Onkogen. Dies weist auf eine grundsätzliche Rolle der Translationsregulation bei der Entstehung von Krebs hin. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich festgestellt, dass die mTOR Kinase, der eine grundlegende Funktion in der Translationsregulation zukommt, auch eine Schlüsselrolle bei der Transformation durch die Oncogene P3K und Akt spielt (Aoki et al., 2001; PNAS, 98:136). Neben der Tumorigenese spielt die Regulation der Translation auch bei metabolischen Syndromen eine Rolle. Beim autosomal rezessiven „Wolcott-Rallison“ Syndrom z. B. wurden als Ursache Mutationen im EIF2AK3 Gen gefunden (Delepine et al., 2000; Nat. Gen. 25:406). Das EIF2AK3 Gen kodiert für eine Kinase, die den Translations-Initiationsfaktor eIF2alpha phosphoryliert. Eine Reihe weiterer Funktionen der translationalen Kontrolle im Metabolismus, bei der Embryonalentwicklung, der Zelldifferenzierung und der Infektabwehr sind inzwischen recht gut bekannt und in dem kürzlich erschienenen Band „Translational Control of Gene Expression“, (ed. by Sonenberg, Hershey and Mathews, Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, N.Y., 2000; ISSN 0270-1847; 39) zusammengefasst.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Vektorsystem aufzubauen, welches eine unmittelbare Beobachtung von Translationsvorgängen in der Zelle erlaubt.

Die Erfindung wird gemäß dem Hauptanspruch realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Kernstück der Erfindung ist ein neues rekombinantes Reporterplasmidkonstrukt (Vektorsystem), welches im folgenden näher charakterisiert wird. Es besteht aus einer Reihe von Modulen. Diese Module dienen i) als Kontrollelemente, welche die Initiation der Translation oder die Funktion von Ribosomen beeinflussen, ii) zur Feststellung von Regulationsvorgängen und zum internen Abgleich (z. B. Transkription vs. Translation), iii) zur vereinfachten Messung mit hohem Probendurchsatz (Sezernierung der Translationsprodukte aus Zellen und Immobilisierung im Microformat, Reinigung und Detektion mit Hilfe von antigenen „Tags“).

1. Das Konstrukt enthält Kontrollelemente der Translation. Diese Elemente liegen im wesentlichen 5' von der Detektionskassette (s. u.), können aber auch 3' oder innerhalb der Detektionskassette liegen. Die Kontrollelemente steuern die differentielle Expression unterschiedlicher Protein-Reporterkonstrukte, die in der Detektionskassette kodiert sind.
2. Das Konstrukt enthält eine Detektionskassette. Diese Detektionskassette kodiert für zwei oder mehrere Protein-Reporterkonstrukte in gleichen oder in unterschiedlichen Leserastern. Differentielle Initiation der Translation führt zur Verschiebung der Reportermengen, die somit differentielle Translation widerspiegeln. Regulationsvorgänge, die zu einer allgemeinen Veränderung der Translation führen, bewirken hingegen eine gleichartige Verschiebung der Reporterexpression. Beide Typen der Regulation können gegeneinander verrechnet und in mathematischen Modellen zusammengefasst werden. Dies ermöglicht eine computergesteuerte Auswertung der Ergebnisse und eine Automatisierung des Verfahrens.
3. Die Reporterkonstrukte enthalten Signalsequenzen zum Ausschleusen aus der Zelle. Somit können Reporterproteine wahlweise in Zelllysaten oder im Überstand bestimmt werden. Die letztere Eigenschaft dient insbesondere zur High Throughput Analyse potentieller Wirkstoffe.
4. Die Reporterkonstrukte enthalten verschiedene antigene Stellen, mit deren Hilfe Reporterproteine immobilisiert und differentiell detektiert werden können. Eine antigene Stelle dient zur Immobilisierung der Reporterproteine, eine weitere, und in den jeweiligen Reporterproteinen verschiedene antigene Stelle dient zur differentellen Reporter-Detektion (siehe Beispiel 1).

Mit Hilfe dieses modular aufgebauten rekombinanten Reporterplasmidkonstrukts Translation Control Reporter System (TCRS) werden Substanzen auf ihre Wirkung hin untersucht, in Vorgänge der differentiellen Initiation der Translation sowie in vielfältige Vorgänge bei der Translation einzugreifen. Das TCRS Konstrukt wird in Zellen transient oder stabil eingebracht. Sodann werden die Zellen mit Substanzen beschickt und die resultierenden, von dem Konstrukt stammenden Reportermengen bestimmt und miteinander verglichen. Aus den ermittelten Daten werden translationelle Kontrollvorgänge eruiert.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Systems wird die Grundlage für das schnelle Auffinden und Optimieren von Wirksubstanzen geschaffen, die translationelle Kontrollvorgänge beeinflussen und zur pharmakologischen Korrektur von Krankheiten dienen können. Darüberhinaus eignet sich das System zur wissenschaftlichen Analyse translationeller Regulationsvorgänge.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Beispiel 1

Ein Prototyp des erfindungsgemäßen Konstrukts mit folgenden Eigenschaften liegt vor (vergleiche Abb. 1):

Der eukaryontische Expressionsvektor ist folgendermassen aufgebaut: ca 50 Basenpaare der Anfangsequenz („Leadersequence“) aus der beta-globin mRNA. Danach folgt 3' der upstream Open Reading Frame (uORF) des Ratten C/EBP alpha Gens als translationelles Kontrollelement mit der Initiationsstelle „K“. Danach folgt die Detektionskassette mit den beiden Reportergenen PR und SR. „A“ bezeichnet die Initiationsstelle des PR Leserasters. PR enthält eine Signalsequenz (pre-pro-Trypsin), die zur Ausschleussung des primären Reporterproteins (PR) führt. Als antigenes Epitop schliesst sich zuerst eine FLAG Sequenz und dann ein Hämagglutinin (HA) Epitop an. Letzteres dient zur Immobilisierung des Reporterproteins. Von der Initiationsstelle (B) wird SR kodiert. SR ist gegenüber PR um ein Nukleotid nach 3' verschoben. Beim Durchlesen der an „A“ gestarteten Ribosomen ergibt sich wegen der Leserasterverschiebung kein sinnvolles SR Produkt. Durch Initiation an B hingegen entsteht ein von PR verschiedenes, sekundäres Reporterprotein (SR). SR besitzt ebenso wie PR eine pre-pro-Trypsin Signalsequenz am N-Terminus. Es schliesst sich ein Gene10 Antigenepitop sowie

ein HA-Epitop an. Beide Reporterkonstrukte werden 3' überlappend terminiert. Reporterproteinexpression von der A oder B Initiationsstelle wird durch das Kontrollelement (uORF, κ) beeinflusst.

Beispiel 2

Das Konstrukt (Abb. 1) wurde in Zellen transfiziert und nach 24 und 48 Stunden wurde das Reporterprotein bestimmt. Es zeigte sich, dass Reporterproteine mit den gewünschten Eigenschaften (Grösse, Sezernierung, antigene Eigenschaften) produziert werden. Ein ähnliches Konstrukt, jedoch ohne das translationelle Kontrollelement, produziert im Vergleich mit TCRS andere Mengen eines Reporterproteins. Somit eignet sich das vorliegende TCRS Konstrukt zum High Throughput Screening von Substanzen, welche die Translation durch das Kontrollelement beeinflussen.

Patentansprüche

1. Vektorsystem zum Screening von Wirkstoffen, bestehend aus

- Kontrollelementen der Translation, die im wesentlichen 5' von der Detektionskassette liegen, ggf. aber auch in 3'-Stellung oder innerhalb der Detektionskassette,
- einer Detektionskassette, die für zwei oder mehrere Protein-Reporterkonstrukte in unterschiedlichen Leserastern kodiert,
- wobei die Reporterkonstrukte
 - Signalsequenzen zum Ausschleusen aus der Zelle und
 - verschiedene antigene Stellen, mit deren Hilfe Reporterproteine immobilisiert und differentiell detektiert werden können, enthalten.

2. Vektorsystem zum Screening von Wirkstoffen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es auf abgeleiteten Kontrollelementen mit alternativen Reportergenen wie z. B. GFP, Luciferase zum modifizierten Nachweis gekoppelt ist.

3. Vektorsystem zum Screening von Wirkstoffen gemäß Abbildung 1 (TCRS)

4. Verfahren zum Screening von Wirkstoffen nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Konstrukt in Zellen transient oder stabil eingebracht wird, sodann die Zellen mit Substanzen beschickt werden und die resultierenden, von dem Konstrukt stammenden Reportermengen bestimmt und miteinander verglichen werden.

5. Zelllinien zum Screening von Wirkstoffen, enthaltend ein Vektorsystem gemäß Anspruch 1-3.

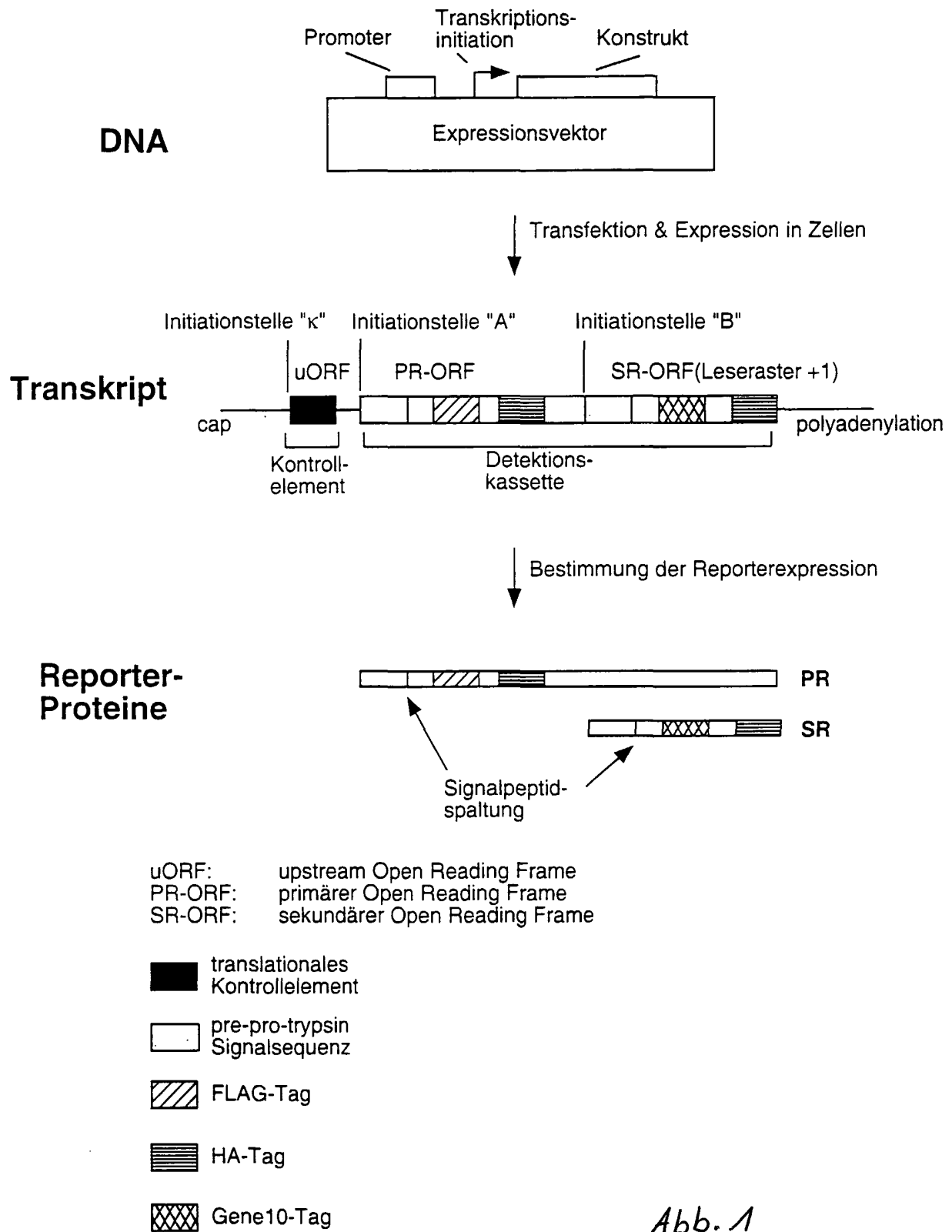


Abb. 1