



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>G01N 33/58, C12Q 1/25, C12N 5/10,</b> <b>C12Q 1/37</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/55873</b>  <b>(43) Date de publication internationale: 10 décembre 1998 (10.12.98)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR98/01136 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 4 juin 1998 (04.06.98)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 97/06977 5 juin 1997 (05.06.97) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> GALZI, Jean-Luc [FR/FR]; 37, rue Saint Aloiise, F-67100 Strasbourg (FR). ALIX, Philippe [FR/FR]; 11, rue de la Gare, F-14650 Carpiquet (FR).  <b>(74) Mandataires:</b> GROSSET-FOURNIER, Chantal etc.; Grosset-Fournier & Demachy S.A.R.L., 103, rue La Fayette, F-75481 Paris Cedex 10 (FR).	<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IÉ, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>  <b>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:</b> 4 mars 1999 (04.03.99)	
<b>(54) Title:</b> USE OF A FLUORESCENT PROTEIN FOR DETECTING INTERACTION BETWEEN A TARGET PROTEIN AND ITS LIGAND		
<b>(54) Titre:</b> UTILISATION D'UNE PROTEINE FLUORESCENTE POUR LA DETECTION D'INTERACTIONS ENTRE UNE PROTEINE CIBLE ET SON LIGAND		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>The invention concerns the use of a fluorescent protein selected in particular among the autofluorescent proteins for detecting the non-covalent interaction between a target protein marked by the fluorescent protein and one of its ligands marked by a marker consisting of: either a molecule capable of absorbing the light emitted by the fluorescent protein, or a fluorescent substance, said detection taking place by fluorescence energy transfer: between the fluorescent protein and said fluorescent substance, the fluorescent substance being such that it is excitable at the fluorescent protein emitting wavelength, or it emits at the fluorescent protein emitting wavelength; between the fluorescent protein and said molecule capable of absorbing the light emitted by the fluorescent protein.</p>		
<b>(57) Abrégé</b>		
<p>L'invention concerne l'utilisation d'une protéine fluorescente choisie notamment parmi les protéines autofluorescentes, pour la détection de l'interaction non covalente entre une protéine cible marquée par la protéine fluorescente et l'un de ses ligands marqué par un marqueur constitué: soit par une molécule susceptible d'absorber la lumière émise par la protéine fluorescente, soit par une substance fluorescente, cette détection ayant lieu par transfert d'énergie de fluorescence: entre la protéine fluorescente et la susdite substance fluorescente, la substance fluorescente étant telle que soit elle est excitable à la longueur d'onde d'émission de la protéine fluorescente, soit elle émet à la longueur d'excitation de la protéine fluorescente, ou entre la protéine fluorescente et la susdite molécule susceptible d'absorber la lumière émise par la protéine fluorescente.</p>		

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

<b>AL</b>	Albanie	<b>ES</b>	Espagne	<b>LS</b>	Lesotho	<b>SI</b>	Slovénie
<b>AM</b>	Arménie	<b>FI</b>	Finlande	<b>LT</b>	Lituanie	<b>SK</b>	Slovaquie
<b>AT</b>	Autriche	<b>FR</b>	France	<b>LU</b>	Luxembourg	<b>SN</b>	Sénégal
<b>AU</b>	Australie	<b>GA</b>	Gabon	<b>LV</b>	Lettonie	<b>SZ</b>	Swaziland
<b>AZ</b>	Azerbaïdjan	<b>GB</b>	Royaume-Uni	<b>MC</b>	Monaco	<b>TD</b>	Tchad
<b>BA</b>	Bosnie-Herzégovine	<b>GE</b>	Géorgie	<b>MD</b>	République de Moldova	<b>TG</b>	Togo
<b>BB</b>	Barbade	<b>GH</b>	Ghana	<b>MG</b>	Madagascar	<b>TJ</b>	Tadjikistan
<b>BE</b>	Belgique	<b>GN</b>	Guinée	<b>MK</b>	Ex-République yougoslave de Macédoine	<b>TM</b>	Turkménistan
<b>BF</b>	Burkina Faso	<b>GR</b>	Grèce	<b>ML</b>	Mali	<b>TR</b>	Turquie
<b>BG</b>	Bulgarie	<b>HU</b>	Hongrie	<b>MN</b>	Mongolie	<b>TT</b>	Trinité-et-Tobago
<b>BJ</b>	Bénin	<b>IE</b>	Irlande	<b>MR</b>	Mauritanie	<b>UA</b>	Ukraine
<b>BR</b>	Brésil	<b>IL</b>	Israël	<b>MW</b>	Malawi	<b>UG</b>	Ouganda
<b>BY</b>	Bélarus	<b>IS</b>	Islande	<b>MX</b>	Mexique	<b>US</b>	Etats-Unis d'Amérique
<b>CA</b>	Canada	<b>IT</b>	Italie	<b>NE</b>	Niger	<b>UZ</b>	Ouzbékistan
<b>CF</b>	République centrafricaine	<b>JP</b>	Japon	<b>NL</b>	Pays-Bas	<b>VN</b>	Viet Nam
<b>CG</b>	Congo	<b>KE</b>	Kenya	<b>NO</b>	Norvège	<b>YU</b>	Yougoslavie
<b>CH</b>	Suisse	<b>KG</b>	Kirghizistan	<b>NZ</b>	Nouvelle-Zélande	<b>ZW</b>	Zimbabwe
<b>CI</b>	Côte d'Ivoire	<b>KP</b>	République populaire démocratique de Corée	<b>PL</b>	Pologne		
<b>CM</b>	Cameroun	<b>KR</b>	République de Corée	<b>PT</b>	Portugal		
<b>CN</b>	Chine	<b>KZ</b>	Kazakstan	<b>RO</b>	Roumanie		
<b>CU</b>	Cuba	<b>LC</b>	Sainte-Lucie	<b>RU</b>	Fédération de Russie		
<b>CZ</b>	République tchèque	<b>LI</b>	Liechtenstein	<b>SD</b>	Soudan		
<b>DE</b>	Allemagne	<b>LK</b>	Sri Lanka	<b>SE</b>	Suède		
<b>DK</b>	Danemark	<b>LR</b>	Libéria	<b>SG</b>	Singapour		
<b>EE</b>	Estonie						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01136

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6 G01N33/58 C12Q1/25 C12N5/10 C12Q1/37

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 6 G01N C12Q C12N

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)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 97 28261 A (UNIV. CALIFORNIA; AURORA BIOSCIENCES CORP) 7 August 1997 see the whole document ---	1-34
P, X	MIYAWAKI A ET AL: "Fluorescent indicators for Ca-2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin." NATURE (LONDON) 388 (6645). 1997. 882-887. ISSN: 0028-0836, XP002058386 see page 886, column 2 ---	1-34
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

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.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 December 1998

Date of mailing of the international search report

08/01/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fletcher, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01136

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>ROMOSER V A ET AL: "Detection in living cells of Ca-2+-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin - binding sequence: A new class of fluorescent indicators."                      JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 272 (20). 1997. 13270-13274. ISSN: 0021-9258, XP002058387                      see the whole document</p>	1-34
Y	<p>PETUSHKOV V N ET AL: "Direct measurement of excitation transfer in the protein complex of bacterial luciferase hydroxyflavin and the associated yellow fluorescence proteins from Vibrio fischeri Y1."                      BIOCHEMISTRY 35 (25). 1996. 8413-8418. ISSN: 0006-2960, XP002058388                      see the whole document</p>	1-34
Y	<p>MITRA R D ET AL: "Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein."                      GENE (AMSTERDAM) 173 (1). 1996. 13-17. ISSN: 0378-1119, XP004042847                      see the whole document</p>	1-34
X	<p>WO 91 01305 A (UNIV WALES MEDICINE) 7 February 1991</p>	1-4, 6, 10, 11, 17, 18, 32
Y	<p>see examples 3,7</p>	5, 7-9, 13-16, 19-21, 29, 33
Y	<p>WO 96 41166 A (UNIV CALIFORNIA ;TSIEN ROGER Y (US); GONZALEZ JESUS E III (US)) 19 December 1996                      see page 33, line 30 - line 35</p>	1-11, 13-21, 29, 32, 33
Y	<p>US 5 342 789 A (CHICK WILLIAM L ET AL) 30 August 1994                      see the whole document</p>	1-11, 13-21, 29, 32, 33
Y	<p>EP 0 552 108 A (UNIV MARYLAND) 21 July 1993                      see the whole document</p>	1-11, 13-21, 29, 32, 33

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. ational Application No

PCT/FR 98/01136

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5 439 797 A (TSIEN ROGER Y ET AL) 8 August 1995  see the whole document -----	1-11, 13-21, 29, 32, 33
A	US 5 625 048 A (TSIEN ROGER Y ET AL) 29 April 1997 see the whole document -----	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01136

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9728261    A	07-08-1997	AU 2250497 A	22-08-1997
		EP 0877805 A	18-11-1998
-----			
WO 9101305    A	07-02-1991	AU 6054590 A	22-02-1991
		CA 2064766 A	23-01-1991
		EP 0484369 A	13-05-1992
		JP 5501862 T	08-04-1993
		US 5683888 A	04-11-1997
-----			
WO 9641166    A	19-12-1996	US 5661035 A	26-08-1997
		AU 6264396 A	30-12-1996
		CA 2223927 A	19-12-1996
		EP 0834074 A	08-04-1998
-----			
US 5342789    A	30-08-1994	EP 0505479 A	30-09-1992
		WO 9109312 A	27-06-1991
-----			
EP 0552108    A	21-07-1993	CA 2087413 A	18-07-1993
		JP 6066802 A	11-03-1994
		US 5631169 A	20-05-1997
-----			
US 5439797    A	08-08-1995	AT 170980 T	15-09-1998
		DE 69130171 D	15-10-1998
		EP 0537270 A	21-04-1993
		WO 9200388 A	09-01-1992
-----			
US 5625048    A	29-04-1997	AU 4155096 A	21-08-1996
		EP 0804457 A	05-11-1997
		JP 10509881 T	29-09-1998
		WO 9623810 A	08-08-1996
		US 5777079 A	07-07-1998
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. demande internationale No

PCT/FR 98/01136

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 G01N33/58 C12Q1/25 C12N5/10 C12Q1/37

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N C12Q C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	WO 97 28261 A (UNIV. CALIFORNIA; AURORA BIOSCIENCES CORP) 7 août 1997 voir le document en entier ---	1-34
P, X	MIYAWAKI A ET AL: "Fluorescent indicators for Ca-2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin." NATURE (LONDON) 388 (6645). 1997. 882-887. ISSN: 0028-0836, XP002058386 voir page 886, colonne 2 ---	1-34
	-/--	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

30 décembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/01/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fletcher, A

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>ROMOSER V A ET AL: "Detection in living cells of Ca-2+-dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin - binding sequence: A new class of fluorescent indicators."                      JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 272 (20). 1997. 13270-13274. ISSN: 0021-9258, XP002058387                      voir le document en entier                      ---</p>	1-34
Y	<p>PETUSHKOV V N ET AL: "Direct measurement of excitation transfer in the protein complex of bacterial luciferase hydroxyflavin and the associated yellow fluorescence proteins from Vibrio fischeri Y1."                      BIOCHEMISTRY 35 (25). 1996. 8413-8418. ISSN: 0006-2960, XP002058388                      voir le document en entier                      ---</p>	1-34
Y	<p>MITRA R D ET AL: "Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein."                      GENE (AMSTERDAM) 173 (1). 1996. 13-17. ISSN: 0378-1119, XP004042847                      voir le document en entier                      ---</p>	1-34
X	<p>WO 91 01305 A (UNIV WALES MEDICINE) 7 février 1991</p>	1-4, 6, 10, 11, 17, 18, 32
Y	<p>voir exemples 3,7</p>	5, 7-9, 13-16, 19-21, 29, 33
Y	<p>WO 96 41166 A (UNIV CALIFORNIA ;TSIEN ROGER Y (US); GONZALEZ JESUS E III (US)) 19 décembre 1996                      voir page 33, ligne 30 - ligne 35                      ---</p>	1-11, 13-21, 29, 32, 33
Y	<p>US 5 342 789 A (CHICK WILLIAM L ET AL) 30 août 1994                      voir le document en entier                      ---</p>	1-11, 13-21, 29, 32, 33
Y	<p>EP 0 552 108 A (UNIV MARYLAND) 21 juillet 1993                      voir le document en entier                      ---</p>	1-11, 13-21, 29, 32, 33
	-/--	

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 5 439 797 A (TSIEN ROGER Y ET AL) 8 août 1995  voir le document en entier -----	1-11, 13-21, 29, 32, 33
A	US 5 625 048 A (TSIEN ROGER Y ET AL) 29 avril 1997 voir le document en entier -----	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

nde Internationale No

PCT/FR 98/01136

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9728261 A	07-08-1997	AU 2250497 A	22-08-1997
		EP 0877805 A	18-11-1998
WO 9101305 A	07-02-1991	AU 6054590 A	22-02-1991
		CA 2064766 A	23-01-1991
		EP 0484369 A	13-05-1992
		JP 5501862 T	08-04-1993
		US 5683888 A	04-11-1997
WO 9641166 A	19-12-1996	US 5661035 A	26-08-1997
		AU 6264396 A	30-12-1996
		CA 2223927 A	19-12-1996
		EP 0834074 A	08-04-1998
US 5342789 A	30-08-1994	EP 0505479 A	30-09-1992
		WO 9109312 A	27-06-1991
EP 0552108 A	21-07-1993	CA 2087413 A	18-07-1993
		JP 6066802 A	11-03-1994
		US 5631169 A	20-05-1997
US 5439797 A	08-08-1995	AT 170980 T	15-09-1998
		DE 69130171 D	15-10-1998
		EP 0537270 A	21-04-1993
		WO 9200388 A	09-01-1992
US 5625048 A	29-04-1997	AU 4155096 A	21-08-1996
		EP 0804457 A	05-11-1997
		JP 10509881 T	29-09-1998
		WO 9623810 A	08-08-1996
		US 5777079 A	07-07-1998