

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-522443

(P2004-522443A)

(43) 公表日 平成16年7月29日(2004.7.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 20 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-562772 (P2002-562772)	(71) 出願人	500246625
(86) (22) 出願日	平成14年2月1日 (2002.2.1)		マックス・デルブルック・セントルム フ
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月1日 (2003.8.1)		ュア モレキュラー メディツィン
(86) 国際出願番号	PCT/DE2002/000367		ドイツ連邦共和国, デー- 1 3 1 2 5
(87) 国際公開番号	W02002/063036		ベルリン ロベルト・ロスルーシュトラッセ
(87) 国際公開日	平成14年8月15日 (2002.8.15)		1 0
(31) 優先権主張番号	101 04 952.8	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成13年2月3日 (2001.2.3)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100077517
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR) , JP, US		弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 活性物質のスクリーニングで使用するベクター系

(57) 【要約】

本発明は、細胞における翻訳に影響を与える活性物質のスクリーニングにおいて用いる為のベクター系に関連する。前記ベクター系は、医薬産業、医薬及び分子生物学において用いるの為に適している。前記ベクター系は、検出カセットに対して5'側に実質上位置するが、任意的には、検出カセットの3'側又は内側にも位置する翻訳調節エレメントからなる。前記系は更に、2つ以上のタンパク質レポーター構築体を様々な読み枠でコードする検出カセットを含んで成り、前記レポーター構築体は、細胞から放出される為のシグナル配列及び抗原部位であって、それによって固定化されて特異的に検出されて良い様々な抗原部位を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性物質のスクリーニングをする為のベクター系であって、前記ベクター系は、
－本質的に検出カセットの 5' 側に位置するが、任意に検出カセットの 3' 側又は内側にも位置して良い、翻訳の調節エレメント；

－異なる読み枠にある 2 つ以上のタンパク質レポーター構築体をコードする、検出カセット；

を含んで成り、ここで前記レポーター構築体は、

－細胞から放出される為のシグナル配列、及び

－レポータータンパク質の固定化及び示差的検出を可能にする様々な抗原部位

を含む、

活性物質のスクリーニングをする為のベクター系。

10

【請求項 2】

前記ベクター系が、検出法を改変する為の、誘導された調節エレメントと代替のレポーター遺伝子、例えば GFP 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子が連結されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の、活性物質のスクリーニングをする為のベクター系。

【請求項 3】

図 1 に記載の、活性物質のスクリーニングをする為のベクター系（TCRS）。

【請求項 4】

前記構築体が一過的又は恒常的な方法で細胞中に組み込まれ、その後当該細胞が物質に曝露され、そして当該構築体由来の生成されるレポーター量が測定及び比較されることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の、活性物質をスクリーニングする方法。

20

【請求項 5】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のベクター系を含む、活性物質のスクリーニングにおいて用いる為の細胞株。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞での翻訳に影響を与える活性物質のスクリーニングにおいて用いる為のベクター系に関連する。本発明の応用分野には、医薬産業、医薬及び分子生物学分野が挙げられる。

30

【背景技術】

【0002】

タンパク質を形成する為にメッセンジャー RNA の翻訳を調節することは、重要な生物学的調節過程であり、その調節の解除は多くの疾患の原因になる。細胞中でのタンパク質翻訳の調節の病理を扱う論文が既にいくつか有る。

【0003】

例えば、腸癌では、真核生物の翻訳の開始因子 eIF-4E の発現が増加していることが発見されている（Rosenwald ら、1999; Oncogen 18, 2570）。この開始因子は、真核生物の mRNA の 5' 側に位置する CAP 構造に結合し、翻訳の開始において重要な役割を果たす。これまで証明されたように、eIF-4E の過剰発現が、げっ歯動物の正常な細胞の腫瘍細胞への形質転換をもたらした。そしてそれはヒトの細胞が形質転換する要因を増大することにつながる。一方で、eIF-4E を取り除くことにより ras 発ガン遺伝子による形質転換は抑制され、発ガンにおける翻訳調節の基本的な役割を果たすことが示唆される。このような背景において、翻訳調節の基本的役割をすると考えられる mTOR キナーゼは、発ガン遺伝子 P3K と Akt による形質転換において重要な役割を果たすことが最近分かった（Aoki ら、2001; PNAS 98, 136）。翻訳の調節は、腫瘍形成とは別に、代謝症候群の一因にもなる。例えば、EIF2AK3 の突然変異は、常染色体劣性「Wolcott-Rallison」症候群の原因として同定された（Delepine ら、2000; Gen. 25, 46）。前記 EIF2AK3 遺伝子は、翻訳の eIF2 α 開始因子のリン酸化反応を起こすキナーゼをコードする。代謝、胚

40

50

発生、細胞の分化及び感染防御における翻訳の他の多くの機能が現在周知であり、そして最近刊行された書籍「Translation Control of Gene Expression」(著者、Sonenberg, Hershey and Mathews, Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, N.Y., 2000; ISSN 0270-1847; 39)に総説されている。

【発明の開示】

【0004】

本発明は、細胞中での翻訳過程を迅速に観察することを可能にするベクター系を開発する目的に基づいている。

【0005】

本発明は、メインクレーム、好適な実施態様を示すサブクレームに従って実施される。

10

【0006】

本発明の中心課題は、下記の更なる詳細を特徴とするだろう新規組換えレポータープラスミド構築体(ベクター系)である。それは、多くのモジュールからなる。これらのモジュールは、i) 翻訳の開始又はリボソームの機能に影響を与える調節エレメントとして、ii) 調節過程の検出及び(翻訳に対する転写など)内部平衡を生じさせる為に、iii) 高試料流速により、より簡単に測定(細胞からの翻訳産物の分泌及びミクロスケール上での固定化、抽出、並びに抗原標識を用いることでの検出)する為に用いられる。

1. 構築体には翻訳の調節エレメントが含まれる。これらのエレメントは、本質的に検出カセットの5'側に位置する(下を参照のこと)が、検出カセットの3'側又は内側にも位置して良い。この調節エレメントは、検出カセット内でコードされる様々なタンパク質レポーター構築体の示差的発現を調節する。

20

2. 前記構築体には検出カセットが含まれる。前記検出カセットは同じ又は異なる読み枠にある2つ以上のタンパク質レポーター構築体をコードする。翻訳の開始が示差的であることによりレポーターの量の変動し、これが示差翻訳を反映する。対照的に、翻訳の一般的な修飾をもたらす調節過程により、レポーター発現が均一に変動する。両方の調節形態は、計算に含まれて良くそして数学モデルに組み合わされて良く、従って、コンピューター制御による結果の評価及び方法の自動化が可能になる。

3. 前記レポーター構築体には、細胞から放出される為のシグナル配列が含まれる。従って、レポータータンパク質は細胞溶出物中又は上清中で測定されて良い。このような後者の特性は、有力な活性物質のハイスループット分析において特に有用である。

30

4. 前記レポーター構築体には、レポータータンパク質の固定化及び示差的検出を可能にする様々な抗原部位が含まれる。レポータータンパク質を固定化するのに1つの抗原部位が用いられ、それぞれのレポータータンパク質における異なる別のレポータータンパク質を示差的に検出する為に他の抗原部位が用いられる(実施例1を参照のこと)。

【0007】

このようなモジュラー構造の組換えレポータープラスミド構築体である、翻訳調節レポーター系(TCRS)を用いることで、物質が、翻訳の示差的開始過程並びに翻訳中の様々な過程に影響を及ぼすその活性について調べられる。前記TCRS構築体は、一過性又は恒常的な方法で細胞中に組み込まれる。この後、細胞が物質にさらされ、そして構築体から生じる生成レポーター量が測定及び比較される。得られたデータは翻訳調節の方法を評価する為に用いられる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明の系は、翻訳調節過程に影響を与えそして疾患の薬理学的な修正に用いることができる活性物質の迅速な検出及び至適化の為の基礎を供する助となる。更に、この系は、翻訳調節過程の科学的な分析の為に適している。

【0009】

例を参考にすることにより、本発明は更なる詳細を以下に示されて良い。

【実施例】

【0010】

50

実施例 1

示されているものは、以下の特性を有する本発明の前記構築体の試作品である(図1を参照のこと)。

【0011】

真核生物発現ベクターは、下記の構造を有する。 β グロブリンmRNAに由来する約50塩基対のリーダー配列を含む。これには、3'方向において、翻訳調節エレメントとして「 κ 」開始部位を含むラットC/EBP α 遺伝子上流オープンリーディングフレーム(uORF)が続く。これには、2つのレポーター遺伝子PR及びSRを含む検出カセットが続く。「A」はPR読み枠の開始部位を示す。PRには1次レポータータンパク質(PR)の放出をもたらすシグナル配列(プレプロトリプシン)が含まれる。FLAG配列及び血球凝集素(HA)エピトープが抗原エピトープとして続く。血球凝集素エピトープはレポータータンパク質を固定化するのに用いられる。SRは、開始部位(B)からコードを開始される。SRは、PRに対して3'方向に1ヌクレオチドシフトしている。読み枠がシフトすることで、リボソームが「A」から読み取りを開始する場合にはセンスSR産物が生じない。対照的に、Bからの開始ではPRとは異なる2次レポータータンパク質(SR)がもたらされる。PR同様、SRはN末端にプレプロトリプシンシグナル配列を有する。その隣はジーン10抗原エピトープ及びHAエピトープである。どちらのレポーター構築体も、3'重複部で終結している。A開始部位又はB開始部位から始まるレポータータンパク質の発現は、調節エレメント(uORF、 κ)による影響を受ける。

10

【0012】

20

実施例 2

構築体(図1)を細胞にトランスフェクションし、そしてレポータータンパク質を24時間後と48時間後にそれぞれ測定する。見かけ上、所望の特性(大きさ、分泌、抗原特性)を有するレポータータンパク質が生産される。類似構築体であるが、翻訳調節エレメントを欠く構築体により生産されるレポータータンパク質の量は、TCRSで生産されたものとは異なる。従って、本発明のTCRS構築体は、調節エレメントを介して翻訳に影響を与える物質のハイスループットスクリーニングで用いる為に適している。

【図面の簡単な説明】

【0013】

(原文記載なし)

30

【図 1】

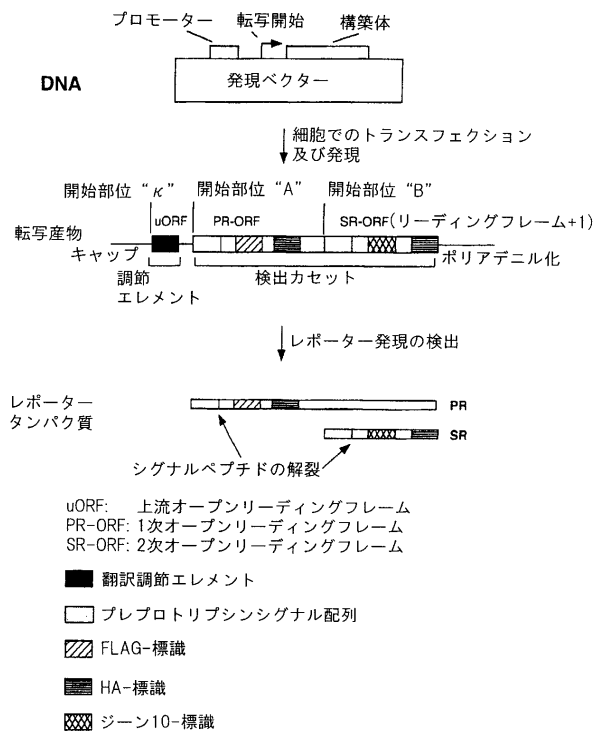


Fig. 1

【国際公開パンフレット】

(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 Patentklassifikation: C12Q 1/68 LEUTZ, Achim [DE/AUS]; Eichengrund 3, 16352 Schön-
walde (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-DELBÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKU-
LARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10,
13125 Berlin (DE).
(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CALKHOVEN, Cor-
nelis, F. [NL/DE]; Maybachufer 26a, 12047 Berlin (DE).

Veröffentlicht:
ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

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 Leserahmen 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

WO 02/063036

PCT/DE02/00367

1

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 (Sekernierung 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 Reporteremengen, 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 Zellysaten 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 differentiellen Reporter-Detektion (siehe Beispiel 1).

WO 02/063036

PCT/DE02/00367

3

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 „A“. Danach folgt die Detektionskassette mit den beiden Reportergen 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

WO 02/063036

PCT/DE02/00367

4

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.

WO 02/063036

PCT/DE02/00367

5

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.

WO 02/063036

1/1

PCT/DE02/00367

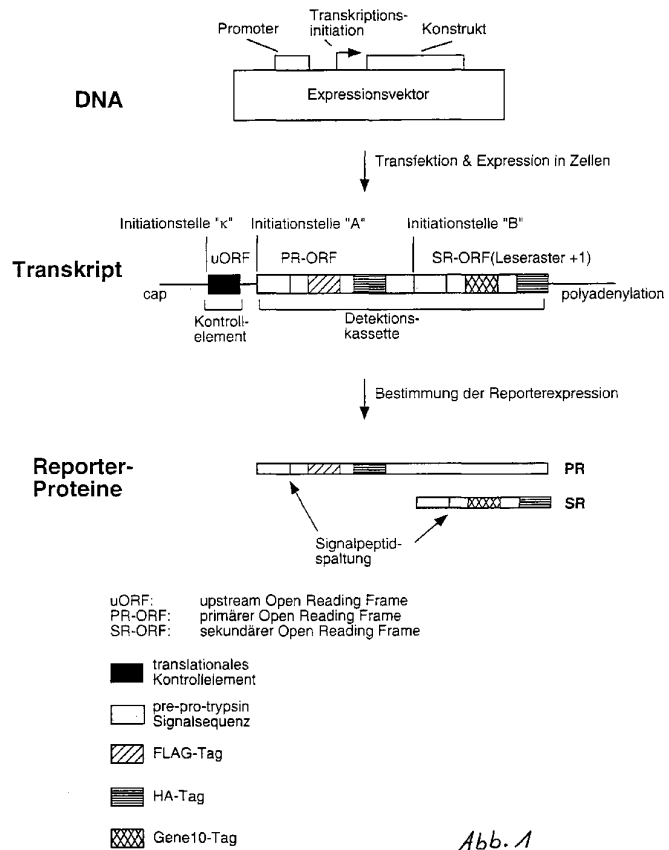


Abb. 1

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(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 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68 LEUTZ, Achim [DE/US]; Eichengrund 3, 16352 Schönwalde (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/00367 (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Februar 2002 (01.02.2002) (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
- (25) Einreichungssprache: 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).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 04 952.8 3. Februar 2001 (03.02.2001) DE Veröffentlicht: mit internationalem Recherchenbericht
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MAX-DELBÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE). (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 17. Oktober 2002
- (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 Anschluß an die Zelle und verschiedene antigene Stellen, mit deren Hilfe Reporterproteine immobilisiert und differentiell detektiert werden können, enthalten.

WO 02/063036 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/DE 02/00367
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
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 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, BIOSIS, MPI Data, PAJ, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 24460 A (TROPIX INC) 10 July 1997 (1997-07-10) the whole document	
A	CALKHOVEN COR F ET AL: "Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression." GENES & DEVELOPMENT, vol. 14, no. 15, 1 August 2000 (2000-08-01), pages 1920-1932, XP002204522 ISSN: 0890-9369 the whole document	
P,A	EP 1 176 196 A (MESSAGE PHARMACEUTICALS INC) 30 January 2002 (2002-01-30) the whole document	
-/--		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of other documents: ** 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 *** 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 **** 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 3 July 2002		Date of mailing of the international search report 31/07/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 810-3040; Tx: 31 651 epo nl; Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bassias, I

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DE 02/00367

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	US 2002/006605 A1 (GU KERONG) 17 January 2002 (2002-01-17) the whole document	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/DE 02/00367

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9724460	A	10-07-1997	AU 732044 B2 12-04-2001
		AU 1350297 A 28-07-1997	
		CA 2241760 A1 10-07-1997	
		EP 0874913 A1 04-11-1998	
		JP 2000513563 T 17-10-2000	
		WO 9724460 A1 10-07-1997	
EP 1176196	A	30-01-2002	EP 1176196 A1 30-01-2002
US 2002006605	A1	17-01-2002	AU 6340201 A 03-12-2001
		WO 0190400 A2 29-11-2001	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/DE 02/00367
A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPD-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beiz. Anspruch Nr.
A	WO 97 24460 A (TROPIX INC) 10. Juli 1997 (1997-07-10) das ganze Dokument	
A	CALKHOVEN COR F ET AL: "Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression." GENES & DEVELOPMENT, Bd. 14, Nr. 15, 1. August 2000 (2000-08-01), Seiten 1920-1932, XP002204522 ISSN: 0890-9369 das ganze Dokument	
P, A	EP 1 176 196 A (MESSAGE PHARMACEUTICALS INC) 30. Januar 2002 (2002-01-30) das ganze Dokument	
	-/--	
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam angesehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *Q* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Demonstration, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem datierten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsfähiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsfähiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nachvollziehbar ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
3. Juli 2002		31/07/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchebehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patenstrasse 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Bassias, I

Formblatt PCT/ISA/210 (statt 2) Juli 1999

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 02/00367

C (Fortsetzung) ALS WESSENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Klassifizierung	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Blatt-Anspruch-Nr.
P, A	US 2002/006605 A1 (GU KERONG) 17. Januar 2002 (2002-01-17) das ganze Dokument -----	

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1999)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
 Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

 Internationaler Aktenzeichen
 PCT/DE 02/00367

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9724460 A	10-07-1997	AU 732044 B2 AU 1350297 A CA 2241760 A1 EP 0874913 A1 JP 2000513563 T WO 9724460 A1	12-04-2001 28-07-1997 10-07-1997 04-11-1998 17-10-2000 10-07-1997
EP 1176196 A	30-01-2002	EP 1176196 A1	30-01-2002
US 2002006605 A1	17-01-2002	AU 6340201 A WO 0190400 A2	03-12-2001 29-11-2001

Formblatt PCT/ISA210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	A

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 カルクホーフェン, コルネリウス エフ.

ドイツ連邦共和国, 1 2 0 4 7 ベルリン, マイバッハウファー 2 6 アー

(72)発明者 ロイツ, アーヒム

ドイツ連邦共和国, 1 6 3 5 2 シェーンバルデ, アイヒェングルント 3

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA08 BA31 BA80 CA01 FA18 GA11 HA11

4B063 QA05 QA20 QQ91 QR02 QR55 QR58 QR74 QS24 QS28 QS36
QX01

4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AC15 BA02 BB40 BD50 CA24 CA27
CA46