

(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2005-507493

(P2005-507493A)

(43) 公表日 平成17年3月17日(2005.3.17)

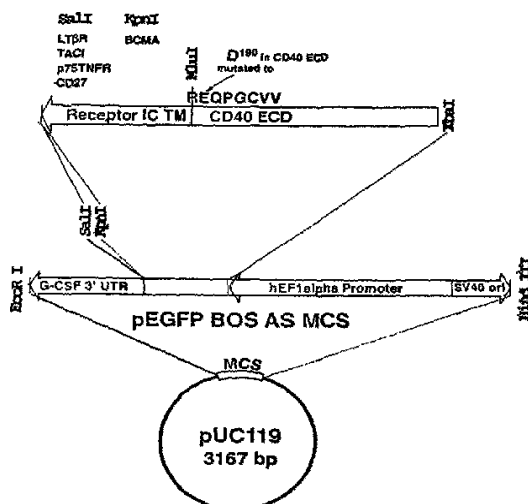
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/48 Z	4 B O 6 3
GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15 Z	
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 86 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-536756 (P2003-536756)	(71) 出願人	397052240
(86) (22) 出願日	平成14年10月14日 (2002.10.14)		アレス トレーディング ソシエテ アノニム
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月13日 (2004.4.13)		スイス国, セアッシュー 1 1 7 0 オーボンヌ, ゴーヌ アンドゥストリエル ドゥルリエッタ
(86) 国際出願番号	PCT/IL2002/000828	(74) 代理人	100065226
(87) 国際公開番号	W02003/034073		弁理士 朝日奈 宗太
(87) 国際公開日	平成15年4月24日 (2003.4.24)	(74) 代理人	100117112
(31) 優先権主張番号	145918		弁理士 秋山 文男
(32) 優先日	平成13年10月14日 (2001.10.14)	(74) 代理人	100129551
(33) 優先権主張国	イスラエル (IL)		弁理士 田村 良介
		(74) 代理人	100131152
			弁理士 八島 耕司
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 インタクトな細胞において受容体の細胞内ドメインへのタンパク質の補充を観察するための方法およびキット

(57) 【要約】

本発明は、インタクトな細胞において受容体の細胞内ドメインへのタンパク質の補充を観察するための免疫学的方法およびキットに関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞において受容体の細胞内ドメインへのタンパク質の結合を観察する方法であって、

a) 細胞でのシグナロソーム形成の誘導、

b) 細胞の溶解、

c) シグナロソーム内に受容体を捕捉できる 1 次抗体で被覆された固相での細胞溶解物のインキュベーション、

d) 細胞溶解物からの固相の分離、および

e) タンパク質を検出できる 2 次抗体を使用する固相に結合したタンパク質の量の検出および測定

を含む方法。

【請求項 2】

シグナロソーム形成が、受容体の過剰発現によって誘導される請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

シグナロソーム形成が、受容体の活性化によって誘導される請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

受容体の活性化が、受容体に対するリガンドで細胞を処置することによって誘導される請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

受容体の活性化が、受容体のクロスリンクによって誘導される請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

クロスリンクが、受容体特異的抗体によって誘導される請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記受容体が、CD40、BCMA、LT_R受容体、TACI、p75TNFR および CD27 から選択される請求項 1、2、3、4、5 または 6 記載の方法。

【請求項 8】

固相に結合した前記タンパク質が、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5 および TRAF6 から選択されるアダプタータンパク質である請求項 1、2、3、4、5、6 または 7 記載の方法。

【請求項 9】

固相に結合した前記タンパク質が、酵素である請求項 1、2、3、4、5、6 または 7 記載の方法。

【請求項 10】

前記酵素が、キナーゼである請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記キナーゼが、NIK である請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

固相に結合した前記タンパク質が、IKK である請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 記載の方法。

【請求項 13】

前記受容体が、その細胞外ドメインでポリペプチドまたはペプチドに融合され、1 次抗体が、そのような融合ポリペプチドまたはペプチドに特異的である請求項 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 または 12 記載の方法。

【請求項 14】

前記融合ペプチドが、特異的タグであり、1 次抗体がそのようなタグに特異的である請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

前記ポリペプチドが、受容体の細胞外ドメインであり、1 次抗体がそのような細胞外ドメインに特異的である請求項 13 記載の方法。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

前記融合ポリペプチドが、CD40の細胞外ドメインである請求項15記載の方法。

【請求項17】

固相に結合した前記タンパク質が、タグに融合され、2次抗体がそのようなタグに特異的である請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15または16記載の方法。

【請求項18】

前記タグが、ヒスチジン、FLAG、VSV-G、プロテイン-Cおよびc-mycタグから選択される請求項17記載の方法。

【請求項19】

細胞において受容体の細胞内ドメインへのアダプタータンパク質および/またはシグナルタンパク質の結合を阻害する分子のスクリーニング方法であって、
細胞への個々の分子の接触、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17または18記載の方法による、受容体の細胞内ドメインへのタンパク質の結合の観察、および受容体へのアダプターおよび/またはシグナルタンパク質の結合を阻害できる分子の選択を含む方法。 10

【請求項20】

スクリーニングされる分子が、合成有機化合物である請求項19記載の方法。

【請求項21】

請求項19および20の方法によって選択される分子。

【請求項22】

細胞においてシグナロソームの組立てを阻害する分子のスクリーニング方法であって、
a) 細胞でのシグナロソーム形成の誘導、
b) 細胞への個々の生成分子の接触、
c) 細胞の溶解、
d) シグナロソーム内に受容体を捕捉できる1次抗体で被覆された固相での細胞溶解物のインキュベーション、
e) 細胞溶解物からの固相の分離、
f) 受容体以外のシグナロソーム構成要素のいずれかを検出できる2次抗体を使用する、形成されたシグナロソームの量の検出および測定、および
g) シグナロソーム形成を阻害できる分子の選択
を含む方法。 20 30

【請求項23】

シグナロソーム形成が、いくつかまたは全てのシグナロソーム構成要素の過剰発現によって誘導される請求項22記載の方法。

【請求項24】

シグナロソーム形成が、受容体の活性化によって誘導される請求項22記載の方法。

【請求項25】

受容体の活性化が、受容体に対するリガンドで細胞を処置することによって誘導される請求項24記載の方法。

【請求項26】

受容体の活性化が、受容体のクロスリンクによって誘導される請求項24記載の方法。 40

【請求項27】

クロスリンクが、受容体特異的抗体によって誘導される請求項26記載の方法。

【請求項28】

シグナロソーム内の受容体が、CD40、BCMA、LTR受容体、TACI、p75TNFRおよびCD27から選択される請求項22、23、24、25、26または27記載の方法。

【請求項29】

測定される受容体とは異なるシグナロソーム構成要素が、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、TRAF6から選択されるアダプタータンパク質であ 50

る請求項 22、23、24、25、26、27 または 28 記載の方法。

【請求項 30】

受容体とは異なるシグナルソームで観察される構成要素が、酵素である請求項 22、23、24、25、26、27、28 または 29 記載の方法。

【請求項 31】

前記酵素が、キナーゼである請求項 30 記載の方法。

【請求項 32】

前記キナーゼが、N I K である請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

測定される受容体とは異なるシグナルソーム構成要素が、I K K である請求項 22、23、24、25、26、27、28、29、30 または 31 記載の方法。 10

【請求項 34】

シグナルソーム内の受容体が、その細胞外ドメインでペプチドまたはポリペプチドに融合され、1次抗体が、そのような融合ペプチドまたはポリペプチドに特異的である請求項 22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32 または 33 記載の方法。

【請求項 35】

前記ポリペプチドが、特異的タグである請求項 34 記載の方法。

【請求項 36】

前記融合ポリペプチドが、受容体の細胞外ドメインである請求項 34 記載の方法。 20

【請求項 37】

前記融合ポリペプチドが、C D 4 0 の細胞外ドメインである請求項 36 記載の方法。

【請求項 38】

測定される受容体とは異なるシグナルソーム構成要素が、タグに融合され、2次抗体が、そのようなタグに特異的である請求項 22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36 または 37 記載の方法。

【請求項 39】

前記タグが、ヒスチジン、F L A G、V S V - G、プロテイン - C および c - m y c タグから選択される請求項 38 記載の方法。

【請求項 40】

スクリーニングされる分子が、合成有機化合物である請求項 22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38 または 39 記載の方法。 30

【請求項 41】

請求項 22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 または 40 記載の方法によって選択される分子。

【請求項 42】

細胞において特異的な膜タンパク質へのアダプターおよび/またはシグナルタンパク質の結合を測定および定量するためのキットであって、

a) 2つの発現プラスミド(一方は、第1のタグまたはポリペプチドに融合された膜タンパク質を過剰発現するための発現プラスミド、他方のプラスミドは、第2のタグに融合されたアダプター/シグナルタンパク質を発現するための発現プラスミド)、 40

b) 膜タンパク質に融合された第1のタグまたはポリペプチドに結合できる1次抗体で被覆された E L I S A マイクロタイタープレート、

c) アダプター/シグナルタンパク質に融合された第2のタグに結合できる2次抗体、

d) トランスフェクション試薬、

e) 溶解緩衝液、

f) トランスフェクション反応におけるベクターの濃度、ならびに E L I S A および定量手段における抗体の濃度を記載するプロトコール

を含むキット。

【請求項 4 3】

前記タグが、ヒスチジン、FLAG、VSV-G、プロテイン-Cおよびc-mycタグから選択される請求項 4 2 記載のキット。

【請求項 4 4】

前記融合ポリペプチドが、CD40 受容体の細胞外ドメインである請求項 4 2 記載のキット。

【請求項 4 5】

細胞において受容体の細胞内ドメインへのアダプタータンパク質および/またはシグナルタンパク質の結合を阻害する分子のスクリーニング方法であって、
個々の分子が接触されたトランスフェクション細胞での、請求項 4 2 または 4 3 記載のキットを使用する、受容体の細胞内ドメインへのタンパク質の結合の観察、および受容体へのアダプターおよび/またはシグナルタンパク質の結合を阻害できる分子の選択を含む方法。

10

【請求項 4 6】

スクリーニングされる分子が、合成有機化合物である請求項 4 5 記載の方法。

【請求項 4 7】

請求項 4 5 または 4 6 記載の方法によって選択される分子。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、インタクトな細胞において受容体の細胞内ドメインへのタンパク質の補充を観察するための免疫学的方法およびキットに関する。

20

【背景技術】**【0002】**

サイトカインは、その標的細胞上の特異的受容体に結合することによってその効果を仲介する。この相互作用は、最終的に細胞内のシグナルカスケードを誘導する受容体の細胞質部分で構造的変化/修飾を生じさせる。これらのシグナルカスケードは、通常、所定のサイトカインに対する生物学的反応に基づく生物学的および遺伝的变化を仲介するキナーゼ、リパーゼ、またはプロテアーゼなどの酵素を含む。

【0003】

TNF 受容体ファミリーなどの多くのサイトカイン受容体について立証されているように、受容体へのリガンドの結合ののちの最初の事象うちの 1 つは、活性化した受容体のシグナルドメインへの種々のアダプタータンパク質の補充である (Wallach et al. 1999 および Inoue et al. 2000 に概説される)。第 2 段階では、これらのアダプタータンパク質は、種々のシグナルカスケードを構成する重要な酵素の特異的結合および活性化を仲介する。その結果得られる、受容体、および 1 つまたは種々のシグナルタンパク質からなるマルチ・タンパク質複合体は、「シグナロソーム」と呼ばれる。シグナロソームの組成は、基本的に、シグナル経路のどの組合せが標的細胞で活性化されるかを決定する。したがって、シグナロソームは、サイトカインに対する最終的な生物学的反応を決定する主要な細胞スイッチボードとみなされ得る。

30

【0004】

サイトカイン受容体のシグナル伝達のこの分子機構を考慮すると、所定の受容体についてのシグナロソーム組成を理解することは非常に重要になっている。結合アダプタータンパク質の同一性、それらが結合する環境、およびそれらの結合熱力学を知ることで、目的の受容体によって開始されるシグナルを推定できる。そのような知識は、生物学的応答に対するシグナルカスケードまたはその組合せにさえも関連させることもできる。

40

【0005】

TNF 受容体 (TNFR) の 1 つである CD40 は、抗原提示細胞 (APC) と T リンパ球とのあいだの相互作用の開始のための主要な切換え点 (switch point) として認識される。細胞増殖、活性化およびアポトーシスなどの基本的機能に影響を及ぼすことによって

50

、この受容体は、T細胞のプライミング(priming)、抗体産生B細胞の選択プロセス、および細胞内病原体を排除するためのマクロファージのエフェクター機構の活性化を調整する(Grewal et al. 1998, Schonbeck et al. 2001で概説される)。多様な免疫エフェクター機構の成熟化および活性化にとってのCD40の重要さは、この受容体またはそのリガンドが機能しなくなったときに最も明白になる。哺乳類では、これにより、高IgM症候群として知られる症状に至る。この重篤な免疫欠乏は、高レベルの血漿IgM、ならびに低レベルのIgA、IgGおよびIgE、胚中心の欠如、ならびに胸腺依存性免疫応答の組み込みに対する能力不全により特徴付けられる(Grewal et al. 1998, Ramesh et al. 1994で概説される)。さらに、インビボ研究により、CD40-CD40L受容体-リガンド対が、B細胞増殖の調節、免疫グロブリンの産生、Igクラスのスイッチング、アポトーシスからのB細胞の救出、胚中心の形成、記憶B細胞の産出および炎症の調節において重要な役割を果たすことを示された(Grewal et al. 1998, Schonbeck et al. 2001, Clark et al. 1996およびFoy et al. 1996で概説される)。免疫応答に関するCD40の優れた役割は、望まない免疫応答が、人工的に抑制され得るといった種々の治療的構想の開発を導いた(Grewal et al. 1998およびLiu et al. 1996で概説される)。CD40-CD40L相互作用の遮断は、自己免疫の症状、移植拒絶、移植片対宿主反応および動脈硬化症の治療に有用であろうことが分かった(Grewal et al. 1998およびSchonbeck et al. 2001)。CD40は、「デスドメイン」を有しないTNF受容体の群に属する。それらは、TNF受容体関連因子(TRAF)との直接的な相互作用を通してそのシグナルを発生する(Arch et al. 1998およびInoue et al. 2000に概説される)。

10

20

【0006】

TRAFは、キナーゼNIK(Malinin et al. 1997)などの別のシグナル分子を補充することにより、AP-1およびNF- κ Bなどの重要な下流エフェクターを活性化するアダプターとして作用する遺伝的に保存されたタンパク質のファミリーである。これらの転写因子は、順に、細胞および免疫の機能の種々の局面に関与する膨大な遺伝子を調節することが明らかにされている(Baeurle et al. 1994, Ghosh et al. 1998およびKarin et al. 1997で概説される)。現在6つのTRAFタンパク質が知られている。最初の2つのTRAF1およびTRAF2は、p75TNF受容体結合タンパク質として単離された(Rothe et al. 1994)。全てのTRAFタンパク質は、共通の構造組織に割り当てられる。TRAFドメインと呼ばれるC末端の相互作用ドメインは、TNFRファミリーの種々の受容体への補充を仲介する(Rothe et al. 1995)。このドメインは、ホモおよびヘテロ-オリゴマー化、ならびにデスドメインタンパク質TRADDなどの他のシグナル分子への結合をも仲介する(Arch et al. 1998およびInoue et al. 2000に概説される)。TRAFドメインは、様々なTRAFファミリーのメンバー間で最も相同性の高い領域でもある。TRAF1以外の全てのTRAFは、NIKまたはJNKなどのシグナル経路での下流構成要素の活性化に必須であるN末端部分に6個までの反復Znフィンガーモチーフおよび1つのリングフィンガーモチーフ(rING Finger motif)を有する(Malinin et al. 1997, Takeuchi et al. 1996, Liu et al. 1996およびSong et al. 1997)。さらに、TRAF3およびTRAF5は、これらの2つのTRAFのあいだでホモ-およびヘテロ化を可能にするコイルドコイル構造を含む(Pullen et al. 1998およびLeo et al. 1999)。最近の結晶化研究により、TRAFは、三量体としてのその受容体と相互作用することが示された(McWhirter et al 1999, Park et al 1999, Ye et al 1999およびNi et al 2000)。補充は、リガンド誘導受容体三量体化によって最も達成されるようであり、その結果、相互作用部位に接近でき、三量体TRAFに対して最適な結合部位を形成する(Baud et al 1999, Pullen et al 1999)。TRAFタンパク質を通してそれらのシグナルを発生する多数の受容体を考慮すると、インビボでのTRAF遺伝子の破壊により劇的な結果となることは驚くべきことではない。マウスでは、TRAF2、TRAF3およびTRAF6の欠失は致命的である(Yeh et al 1997, Nguyen et al 1999, Xu et al 1996, Lomaga et al 1999およびNaito et al 1999)。TRAF5の欠失により、CD27、CD30、CD40およびLTJ3受容体を含め複数の受容体にシグナル欠陥が生じる(

30

40

50

Nakano et al 1999)。T R A F 4 欠失マウスは、気管奇形を伴うが、他の明白な欠陥はなく生まれる (Shiels et al 2000)。T R A F 1 遺伝子標的マウスについての記載はない。

【 0 0 0 7 】

6 2 個のアミノ酸のその比較的短いシグナルドメインにもかかわらず、C D 4 0 は、T R A F 4 以外の全ての T R A F と相互作用することが示された (Pullen et al. 1998, Hu et al. 1994, Rothe et al. 1995, Mosialos et al. 1995, Cheng et al. 1995, Ishida et al. b 1996, Ishida et al. a 1996 および Krajewska et al. 1998)。T R A F 結合受容体間の配列比較に基づいて、2 つのアミノ酸配列モチーフが、最小の T R A F 結合部位が明確にされた：T R A F 1、2 および 3 については P x Q x T (Pullen et al. 1998, Cheng et al. 1996, Gedrich et al. 1996, Devergne et al. 1996, Boucher et al. 1997, Eliopoulos et al. 1997, Sandberg et al. 1997, Brodeur et al. 1997 および Pullen et al. 1999) および T R A F 6 については塩基性 - Q x P x E x - 酸性 (Pullen et al. 1999, Tsukamoto et al. 1999 および Darnay et al. 1999)。T R A F 5 は、T R A F 3 を介して間接的に結合するようと思われる (Pullen et al. 1999, Leo et al. 1999)。最小のコンセンサ配列 P / S / T / A x Q / E E に対する T R A F 2 結合モチーフのさらなる解析は、結晶化研究によって達成された (Ye et al. 1999)。どちらの T R A F 結合モチーフも C D 4 0 に存在し、この受容体への T R A F 補充を仲介することが明らかにされた。C D 4 0 - T R A F 相互作用において大規模な構造的な研究がなされているにもかかわらず、C D 4 0 - T R A F シグナルソームの組立てに関するいくつかの基本的な疑問は、未解決のままである。全長 C D 4 0 細胞質ドメインの配列状況 (sequence context) が、2 つの既知の T R A F 結合モチーフの機能に影響を及ぼすかどうか、そしてそれはどのように及ぼすかは、なお不明である。シグナルソーム中の種々の構成要素が、たとえば、他のシグナルソームタンパク質に別の結合部位を提供することによって、受容体に対する結合に相互に影響を及ぼすかどうかも知られていない。これらの疑問の解決は、T R A F 結合受容体のシグナル伝達機構を理解するために重要であるだけでなく、T R A F 仲介シグナル伝達を特異的に妨げる薬剤の合理的な設計にとっても重要である。

【 0 0 0 8 】

腫瘍壊死因子受容体関連 (T R A F) タンパク質に結合できるそのアイソフォーム、類似体、フラグメントまたは誘導体を含め N I K と称されるタンパク質が知られている (Malinin et al. 1997)。したがって、T R A F タンパク質が、ある T N F / N G F 受容体およびそのほかのものによって開始される転写因子 N F - B の活性化の仲介の調節に関与する場合、T R A F タンパク質に結合することによって、N I K およびそのアイソフォームなどは、たとえば、T R A F タンパク質と直接または間接的な相互作用を介する N F - B の活性化のその調節 / 仲介などのその受容体への種々のリガンド (たとえば、T N F およびその他のもの) 結合により開始される細胞内シグナル伝達プロセスに影響を及ぼす (調節するか、または仲介する) ことができる。

【 0 0 0 9 】

そのシグナルアダプタータンパク質とのサイトカイン受容体の相互作用は、T N F 受容体遺伝子ファミリーについて十分に研究された。ほとんどのアッセイ系は、目的の受容体のシグナルドメインのペプチドフラグメントを使用し、インビトロ条件下で既知のアダプター分子とこのペプチドとの相互作用を試験する (Rothe et al. 1994, Hu et al. 1994, Boldin et al. 1995, Stanger et al. 1995, Chinnaiyan, A. M. et al. 1995, Cheng, G. et al. 1995, Mosialos et al. 1995, Ishida, T. et al., a, 1996, Ishida, T., b, 1996 および Fields, S. 1989)。使用された系は、酵母 - 2 - ハイブリッド - システム (Fields et al. 1989)、たとえば、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ - タグ付受容体フラグメントを用いる免疫沈降法 (Rothe et al. 1994, Boldin et al. 1995, Chinnaiyan et al. 1995 および Mosialos et al. 1995)、またはフィルター上にスポットされたペプチド受容体フラグメントへの標的アダプタータンパク質の結合 (Boucher et al. 1997, Pullen et al. 1998 および Pullen et al. 1999) を含む。これら全ての方法に共通した

問題は、シグナロソームの組立てが、その天然の「膜近傍の」細胞環境では起こらないことである。

【0010】

したがって、シグナロソームの組立てが、従来のインビトロ条件とは対照的にその天然の細胞環境で起こる簡易な定量アッセイが必要とされている。

【0011】

抗原を定量する免疫学的方法は、優れた感受性および特異性を提供し、研究および臨床適用のどちらにおいても標準技術となった。タンパク質定量の全ての現代の免疫化学的方法は、プラスチックなどの固形表面に結合する指標分子（抗原または抗体）の量を、結合していない該指標を洗い流したのちに測定する簡易かつ正確な方法に基づく。

10

【0012】

指標分子が、放射性アイソトープで標識される場合は、そのアッセイは、ラジオイムノアッセイと呼ばれる。その指標分子は、シンチレーション・カウンタで放射性崩壊事象を計数することにより定量される。指標分子が、レポーター基質を切断できる酵素に共有結合される場合は、そのアッセイは、固相酵素免疫検定法（ELISA）と呼ばれ、そしてそれは、比色、化学発光、蛍光、またはホスホメトリック（phosphometric）であり得る。指標分子は、酵素が、中立の基質を、着色または発光産物に変換する初速度を分光光度計で測定することによって定量され得る。

【0013】

ELISAは、4つの表題：直接、間接、サンドイッチおよび競合の下に分類され得る（Crowther, J.R. (1995)、Methods in Molecular Biology 42巻、35-50頁）。直接標識抗原ELISAでは、抗体を固相に吸着し、抗原を標識する。直接標識抗体ELISAでは、固相に結合された抗原は酵素標識された抗体（たとえば、酵素との共役）と直接反応される。間接ELISAでは、抗体は標識されず、酵素に共役した二次抗種特異的抗体が使用される。

20

【0014】

直接サンドイッチELISAでは、一次抗体は固相に結合され、試験抗原が添加され、結合された抗体に捕捉される。酵素に共役した別の二次抗体は、捕らえられた抗原を検出するために使用される。間接サンドイッチELISAでは、二次抗体は標識されず、一次抗体と異なる動物種において産生され、三次抗種特異的標識抗体によって検出される。

30

【0015】

競合ELISAは三次抗体と競合する2つの反応体からなる。以下が競合ELISAの例である。

【0016】

直接標識抗体競合ELISAでは、抗原を固相に吸着し、前滴定された共役抗体を添加するので、該抗原は飽和され、さらなる抗体との結合に利用できる遊離の認識部位はない。標識抗体が、固相に結合された抗原と反応できるほかの抗体（競合抗体）と混合されている場合、抗原と共役抗体との相互作用は混乱する。このような分析は、同一のタンパク質に対するモノクローナル抗体を比較するために使用できる。

【0017】

直接抗原競合ELISAでは、抗原を固相に吸着し、前滴定された共役抗体を添加するので、該抗原は飽和され、さらなる抗体との結合に利用できる遊離の抗原部位はない。この場合、標識抗体がほかの抗原（競合物）と混合されていれば、抗原と共役抗体との相互作用は混乱する。したがって、競合抗原が交差反応的である場合、標識抗体は固相に結合した抗原との反応に利用することができず、色の減少が観察される。このような分析は、抗原を定量するため、または同一抗体に対する2つの抗原の結合の相対的な親和性を比較するために使用される。

40

【0018】

間接抗原/抗体競合ELISAでは、抗体は標識されず、三次抗種特異的標識抗体によって検出される。

50

【0019】

現在のところ、インタクトな細胞において、種々のアダプタータンパク質の、活性化受容体のシグナルドメインへの補充を定量できる、一般的で、感受性で、特異的で、行うのが容易で、有効な方法は存在しない。したがって、本発明に記載される免疫学的方法は、シグナル伝達の領域で長期にわたる問題を解決するものである。

【発明の開示】

【0020】

本発明は、細胞において、CD40、BCMA、LT_R受容体、TACI、p75TNFR、およびCD27などの受容体の細胞内ドメインへの、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5、TRAF6、NIKおよびIKKなどのタンパク質の結合を観察する方法であって、

10

- a) 細胞でのシグナロソーム形成の誘導、
 - b) 細胞の溶解、
 - c) シグナロソーム内に受容体を捕捉できる1次抗体で被覆された固相での細胞溶解物のインキュベーション、
 - d) 細胞溶解物からの固相の分離、および
 - e) タンパク質を検出できる2次抗体を使用する固相に結合したタンパク質の量の検出および測定
- を含む方法に関する。

【0021】

20

より詳細には、本発明の方法によるシグナロソーム形成は、たとえば、受容体の過剰発現により、受容体特異的リガンドでの処置により、またはたとえば特異的抗体による受容体のクロスリンクにより誘導され得る。受容体は、その細胞外ドメインで、ポリペプチド、たとえば、CD40の細胞外ドメイン、またはタグ(たとえば、ヒスチジン、FLAG、VSV-G、プロテイン-Cおよびc-mycタグ)などのペプチドに融合され得るので、1次抗体は、そのような融合ポリペプチドまたはペプチドに特異的である。また、測定された結合タンパク質またはシグナロソーム構成要素は、ポリペプチドタグに融合され得るので、2次抗体は、そのようなタグに特異的である。

【0022】

1つの実施態様において、本発明は、細胞において受容体の細胞内ドメインへのアダプタータンパク質および/もしくはシグナルタンパク質の結合を阻害する、またはシグナロソームの組立てを阻害する分子、たとえば合成有機化合物のスクリーニング方法であって、細胞への個々の分子の接触、受容体の細胞内ドメインへのタンパク質の結合またはシグナロソームの組立ての観察、ついで受容体へのアダプターおよび/もしくはシグナルタンパク質の結合、またはシグナロソームの組立てを阻害できる分子の選択を含む方法に関する。

30

【0023】

本発明は、また、本発明のスクリーニング方法によって選択される分子をも提供する。

【0024】

本発明は、さらに、細胞において特異的な膜タンパク質へのアダプターおよび/またはシグナルタンパク質の結合を測定および定量するためのキットであって、

40

- a) 第1のタグまたはポリペプチドに融合された膜タンパク質を過剰発現するための、および第2のタグに融合されたアダプター/シグナルタンパク質を発現するための発現プラスミド、
- b) 膜タンパク質に融合された第1のタグまたはポリペプチドに結合できる1次抗体で被覆されたELISAマイクロタイタープレート、
- c) アダプター/シグナルタンパク質に融合された第2のタグに結合できる2次抗体、
- d) HEK293細胞、
- e) トランスフェクション試薬、
- f) 溶解緩衝液、

50

g) トランスフェクション反応におけるベクターの濃度、ならびに E L I S A および定量手段における抗体の濃度を記載するプロトコールを含むキットに関する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0025】

本発明は、インタクトな細胞における目的の受容体の細胞内ドメインへのタンパク質の補充を観察できる感受性アッセイに関する。用語インタクトな細胞とは、溶解されていない細胞のことを言い、したがって、補充は、従来のアッセイとは対照的に、その本来の細胞環境で行なわれる。

【0026】

用語、受容体の細胞内ドメインへのタンパク質の補充、および細胞内受容体に対するタンパク質の結合は、相互に交換可能である。

【0027】

用語、シグナロソームへのタンパク質の補充、およびシグナロソームに対するタンパク質の結合も、相互に交換可能である。

【0028】

用語、因子ポリペプチドおよびタンパク質は、相互に交換可能である。

【0029】

T N F 受容体ファミリーなどの多くのサイトカイン受容体について示されるように、受容体に対するリガンド結合ののちの最初の事象の1つは、活性化受容体のシグナルドメインへの種々のアダプタータンパク質の補充である (Wallach et al. 1999およびInoue et al. 2000により概説される)。第2段階では、これらのアダプタータンパク質は、種々のシグナルカスケードを構成する重要な酵素またはシグナルタンパク質への特異的結合および活性化を仲介する。その結果得られる、受容体、および1つまたはそれ以上のアダプター、ならびに1つまたはそれ以上のシグナルタンパク質を含むマルチ・タンパク質複合体は、「シグナロソーム」と呼ばれる。シグナロソームの組成は、基本的に、シグナル経路のどの組合せが、標的細胞中で活性化されるかを決定する。したがって、シグナロソームは、サイトカインに対する最終的な生物学的反応を決定する主要な細胞スイッチボードとみなされ得る。

【0030】

サイトカイン受容体のシグナル伝達のこの分子機構を考慮すると、所定の受容体についてのシグナロソーム組成を理解することは非常に重要になっている。結合アダプタータンパク質の同一性、それらが結合する環境、およびそれらの結合動力学を知ることによって、目的の受容体によって開始されるシグナルを推定できる。そのような知識は、生物学的応答に対するシグナルカスケードまたはその組合せにさえも関連させることもできる。

【0031】

この方法は、シグナロソームへの所定のタンパク質の組込みを特異的に妨げる化合物(分子)をスクリーニングするのに適する。この方法は、種々のシグナルカスケードを構成する重要な酵素、たとえば、キナーゼ、リパーゼまたはプロテアーゼの、シグナロソームへの組込みを特異的に妨げる化合物のスクリーニングに特に適する。そのような化合物は、同じインタクトな受容体の他の有益な機能をそのままにして、望まない効果を示すただ1つのシグナル経路から目的の受容体を分離する薬剤として非常に有用であり得る。

【0032】

補充タンパク質は、種々のシグナルカスケードを構築する重要な酵素、たとえば、N I K、I K K などのアダプタータンパク質またはシグナルタンパク質であり得る。受容体は、タンパク質が補充されるあらゆる受容体であることができ、たとえば、T N F / N G F ファミリーの受容体である。

【0033】

本発明は、全タンパク質に加え、さらに、そのフラグメント、たとえば、全膜貫通タンパク質の代わりに、たとえば、膜貫通および細胞内ドメインを使用し、全アダプター/シグ

10

20

30

40

50

ナルタンパク質の代わりに、シグナロソーム結合ドメインのみを使用することも含む。

【0034】

中でも、このアッセイは、シグナロソームの組成、タンパク質相互作用に関する重要な部位、薬剤ハイスループットスクリーニングなどの分析のために使用され得る。

【0035】

一般に、本発明によるアッセイは、細胞の内側で生じる受容体の細胞内ドメインへのアダプターまたはシグナルタンパク質の会合または補充を観察するために使用することができ、たとえば、このアッセイは、TRAF1、TRAF2、TRAF3、TRAF4、TRAF5およびTRAF6またはそのフラグメントなどのあらゆるTNF/NGF受容体関連タンパク質の補充を観察するために使用できる。補充は、多量の受容体および補充タンパク質を発現する細胞において測定できる。

10

【0036】

シグナロソーム形成は、CD40などの受容体および/もしくはTRAFなどのアダプターおよび/もしくはNIK、IKKなどのシグナルタンパク質、その等価物もしくはそのフラグメントの過剰発現によるか；またはリガンド誘導もしくは受容体クロスリンクによる受容体の活性化のいずれかにより誘導できる。受容体活性化は、特異的抗体と受容体をクロスリンクすることによって達成され得る(Engelmann et al. 1990を参照)。以下の限定されない実施例では、シグナロソーム形成または補充は、CD40、TRAF、NIKおよび等価物の過剰発現により誘導される。

【0037】

受容体および補充可能なタンパク質は、前記タンパク質をコードする発現ベクターを用いたトランスフェクションにより過剰発現できる。受容体および補充タンパク質は、様々のプラスミドにコードされ得るか、または1つのプラスミドに連結され得る。受容体および補充タンパク質の増大した発現は、当技術分野で知られる適切な発現系および耐性マーカーを使用することにより一時的または構成的であり得る。

20

【0038】

受容体および補充タンパク質の内因性の産生を誘導および/または増強するためのベクターの使用による過剰発現も、本発明に意図される。ベクターは、受容体および/または補充タンパク質を発現することが望まれる細胞において機能的な調節配列を含み、たとえば、そのような調節配列は、プロモーターまたはエンハンサーであり得る。そののち、調節配列は、相同組換えにより、ゲノムの正しい遺伝子座に導入されるので、調節配列を遺伝子と操作可能に連結し、必要な発現が誘導または増強される。その技術は、通常、「内因性遺伝子活性化」(EGA)と呼ばれ、たとえば、国際公開第91/09955号パンフレットに記載される。

30

【0039】

プラスミドのトランスフェクションは、たとえば、リン酸カルシウム法によって当技術分野で知られる任意の方法により行なわれることができる(Kingston et al. 1993)。

【0040】

所定の受容体へのタンパク質の補充の測定は、任意の細胞、たとえば、シグナル伝達の結果が評価され得るHEK293、293T細胞およびB細胞での「インタクトな細胞における補充アッセイ」により試験できる。

40

【0041】

アッセイについては、たとえば、 2×10^5 細胞を、3.5cm皿に接種し、37°Cで、約16時間増殖させ、受容体、たとえば、CD40をコードする発現プラスミド、および1つまたはそれ以上の補充可能なタンパク質/ペプチド、たとえば、TRAF、NIKをコードする発現プラスミドでトランスフェクションできる。約27時間のトランスフェクションののち、細胞を、分離し、洗浄し、ついで、たとえば、プロテアーゼインヒビターカクテル(0.16mM Peffabloc、105IUアプロチニン)、1%トリトンX100および0.1%アジ化Naを含有するリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を含む溶解緩衝液を用いて、界面活性剤で抽出する。

50

【0042】

溶解物を、微小遠心装置での遠心分離により不要なものを除去し、好ましくは3倍までの一連の希釈まで希釈し、ついで、各希釈サンプルを、受容体の細胞外ドメイン（たとえば、CD40に関してはのRo1）に特異的なmAbで被覆された固相、好ましくはELISAマイクロタイタープレートのウェル中で約2時間（または一晩）インキュベーションする（Schwabe et al. 1997）。アッセイの感受性を増大させるために、抗受容体抗体を、抗種特異的抗体を通して固相に被覆できる。目的の対照として、野生型受容体をコードするプラスミドの代わりに、シグナルドメイン全体または一部を欠く受容体変異体をコードするプラスミドは、トランスフェクションのために使用できる。インキュベーションのち、好ましくは、洗浄が、結合していないタンパク質を除去するために行われ得る。補充タンパク質を検出するために、前記補充タンパク質に対する特異的抗体、たとえば、目的の抗TRAF、抗NIKを、プレートに加え、室温で約3時間インキュベーションしたのち、洗浄して、結合していない抗体を除去する。この抗体は、酵素結合抗体または酵素に結合した第2の抗種IgG抗体またはプロテインA/Gを使用して検出し、着色、蛍光または化学発光に特異的な基質によって可視化できる。また、抗体またはプロテインA/Gは、放射線で標識し得る。さらに、ビオチンは、リシン残基を通して抗体またはプロテインA/Gに化学的に結合され得る。標識ストレプトアビジンは、ビオチンの存在を検出するために使用され得る。

10

【0043】

補充タンパク質は、インタクトな細胞で行なわれる補充アッセイを使用して定量的に測定できる。その目的のために、アッセイ条件は、補充タンパク質が、受容体タンパク質よりも明らかに過剰であるように調節される。したがって、細胞において受容体濃度よりも過剰な好ましい補充タンパク質の濃度は、等量または約2倍であるべきである。この比は、受容体をコードするプラスミドの量を越えて補充タンパク質をコードするプラスミドの量を増大してトランスフェクションを行うことにより、および/またはそれぞれのタンパク質の転写を制御するより強力なプロモーターを使用することによって達成され得る。

20

【0044】

補充タンパク質の濃度は、各アッセイでの基準として、たとえば、1000U/mlの受容体/補充タンパク質複合体を含む照準細胞抽出物を使用して測定できる。この基純抽出物は、好ましくは、目的の補充タンパク質および目的の受容体をコードするプラスミドで同時トランスフェクションされた細胞からの細胞抽出物の大量のプールからなる。抽出物を、少量に等量に分けて凍結し、さらに使用するまで-80で維持する。これらの抽出物と未知のサンプルのレベルを比較することにより、任意のユニットで受容体を補充したタンパク質複合体の濃度を相対的に測定することができる。以下の式は、サンプル対サンプルの偏差を定量および必須の正規化のために使用できる。

30

【0045】

受容体発現では：

【0046】

【数1】

$$\frac{[\text{受容体-補充タンパク質複合体}](\text{任意のユニット/ml})}{[\text{受容体濃度}](\text{ng/ml})} = \frac{\text{受容体タンパク質あたりの}}{\text{受容体補充タンパク質複合体}} \quad (\text{任意のユニット/ng})$$

40

【0047】

受容体濃度は、モノクローナルおよびポリクローナル抗受容体抗体（どちらも該受容体の細胞外ドメインに特異的である）を使用するELISAで測定できる。精製された可溶性細胞外ドメインを、基準として使用できる。

【0048】

限定されない例では、アッセイは、たとえば、アダプタータンパク質（たとえば、TRA

50

F2)を介してサイトカイン受容体(たとえば、CD40)へのシグナルタンパク質(たとえば、NIK(NF- κ B経路での下流メディエーター、Malinin et al. 1997))の補充を測定するのに適することが示された。CD40へのNIKの補充は、TRAF2依存性であり、IKKが同時に発現されたとき改善した。

【0049】

受容体は、受容体の細胞外部分が、ポリペプチドタグ、たとえば、ヒスチジントグに融合された融合タンパク質として発現できる。この融合タンパク質の使用により、受容体特異的抗体を必要とせずに、固相に受容体を固定するためのタグ特異的抗体、たとえば、抗ヒスチジントグを使用することによって、任意の受容体への補充を観察することができる。タグ融合タンパク質の産生のために設計された発現ベクターは、商業的に入手可能である。これらのベクターは、クローニング部位の上流または下流に特異的タグをコードする。また、PCRにより、たとえば、目的のDNAの増幅のために使用されるプライマーにタグ配列を含ませることによって、タグを、目的の遺伝子に融合し得る。PCR増幅DNA融合産物は、転写および翻訳のための適切な調節シグナルを含む発現ベクターにクローニングされ得る。

【0050】

エピトープタグの例は、ヒスチジントグ(一筋の6個の連続ヒスチジン、Janknecht et al. 1991)、FLAG(8個のアミノ酸エピトープ、ROCHE)、VSV-G(水泡性口内炎ウイルス由来の11個のアミノ酸エピトープ、ROCHE)、プロテイン-C(ヒトプロテイン-Cの重鎖由来の12個のアミノ酸エピトープ、ROCHE)、およびc-myc(ヒトc-myc遺伝子タンパク質由来の10個のアミノ酸エピトープ、ROCHE)である。エピトープタグ付きタンパク質では、その付加される配列は、通常、それ自身機能しない約3~12アミノ酸の短いペプチドである。エピトープタグの重要な性質は、単独のタグ特異的抗体により認識および結合される能力である。エピトープタグは、たとえば、アミノ末端(N末端)に配置できる。

【0051】

広範なエピトープは、タグタンパク質に使用されており、その多くのタグ特異的抗体は、商業的に入手可能である。特定の実験系のための最高のエピトープタグは、タグ付きタンパク質の機能または細胞プロセッシングを妨げないものであり、さらに免疫蛍光顕微鏡法または定量アッセイでのウエスタンブロットで強力な検出シグナルを発生するものである。

【0052】

また、CD40などの所定の受容体の細胞外ドメイン、および様々な受容体の細胞内シグナルドメインを含むハイブリッド構築物を、細胞の内側で行なわれる補充アッセイに使用できる。ハイブリッド受容体を、同じ捕捉抗体、たとえば、CD40特異的抗体を使用して、多様な細胞内受容体への補充を比較のに使用できる。限定するものではない記載の実施例では、BCMA、LTR受容体、TACI、p75TNFRまたはCD27のシグナルドメインへのTRAF補充の測定は、TRAFをコードするプラスミドとともにハイブリッド受容体をコードするプラスミドで293T細胞を同時にトランスフェクションし、TRAF/受容体複合体の測定を同一のELISAサンドイッチを使用して行なった。ここに記載されるアッセイは、まず、所定の郡のシグナル分子、たとえば、TRAFの結合特徴について数種の受容体の直接的な比較を可能にする。これは、所定のTRAF受容体の組合せの生物学的機能を結論づけることができるだろう。得られた結果は、あらゆる受容体へのTRAF補充を観察する補充アッセイの実現可能性を再度証明するものである。

【0053】

EKなどのポリペプチドタグに融合した補充タンパク質を発現し、抗Xpress抗体などの商業的に入手可能なタグ特異的抗体を用いて補充タンパク質を検出することからなる同じアプローチは、補充タンパク質を検出するために採用できる。

【0054】

以下の制限するものではない実施例では、EKに特異的な抗体(抗発現抗体)を使用して

、補充 T R A F 6 を観察されたことにより、C D 4 0 へのタグ付 d T R A F 6 の補充が証明された。

【 0 0 5 5 】

したがって、得られた結果は、このアッセイを使用して、任意の受容体への任意の T R A F の補充が、特異的に観察され得ることを示唆する。

【 0 0 5 6 】

以下の制限するものではない実施例では、細胞内環境における受容体へのタンパク質補充に基づく補充アッセイは、従来の補充アッセイよりいっそう感受性のあることが証明された(図2)。さらに、補充が、受容体自身、またはシグナロソーム中の未だ同定されていない分子のいずれかによって提供される複数の相互作用部位に依存することが示された。たとえば、アッセイは、C D 4 0 に対する T R A F 結合、たとえば、インタクトな C D 4 0 C 末端の必要性を決定する構造的な必要性をより正確に測定することができる。さらに、どのように様々な T R A F が、互いに結合に影響を及ぼすのかを示すことができた。本発明による補充アッセイは、任意の受容体への種々の異なるアダプターおよび/またはシグナルタンパク質の補充を観察するのに定量的な感受性で、かつ適切である。これらの成果を考慮すると、記載されたアッセイ法は、サイトカイン受容体と細胞内のシグナル分子とのあいだの相互作用の理解におおいに貢献するだろう。この知識は、シグナロソームの組立てのレベルで作用する薬剤の合理的な開発に必要不可欠であろう。

10

【 0 0 5 7 】

したがって、本発明による補充アッセイは、受容体の細胞内ドメインへのアダプターおよび/またはシグナルタンパク質の補充を阻害するか、またはシグナロソーム形成を阻害する治療的におおいに価値のある分子をスクリーニングするために使用できる。細胞を、コンビナトリアルケミストリーによって作製された多様な個々の合成有機化合物に接触し、対照細胞に対する処置細胞での補充を、本発明による補充アッセイにより観察し、定量できる。試験される化合物は、コンビナトリアルケミストリーを通したものでなく、他のハイスループット合成法からも得られ得る。自動化技術は、スクリーニングできる、別個の化合物の大きな集合である分子のライブラリーの迅速な合成を可能にする。大量の、そしていっそう多様な化合物ライブラリーを作製することは、ライブラリーに有用な薬剤を発見する見込みを増大させる。ハイスループットスクリーニングについては、ロボットが、数千の化合物によるシグナロソーム形成の補充または破壊の阻害を試験するために使用できる。

20

30

【 0 0 5 8 】

本発明は、以下の構成要素を含む、特異的な受容体へのタンパク質の補充を測定および定量するためのキットであって、

- a) 2つの発現プラスミド(一方は、第1のタグまたはC D 4 0 受容体の細胞外ドメインに融合された膜タンパク質を過剰発現するための発現プラスミド、他方は、第2のタグに融合されたアダプター/シグナルタンパク質を発現するための発現プラスミド)、
- b) 膜タンパク質に融合された第1のタグまたはC D 4 0 の細胞外ドメインに結合できる1次抗体で被覆されたE L I S A マイクロタイタープレート、
- c) アダプター/シグナルタンパク質に融合された第2のタグに結合できる2次抗体、
- d) トランスフェクション試薬、
- e) 溶解緩衝液、
- f) トランスフェクション反応におけるベクターの濃度、ならびにE L I S A および定量手段における抗体の濃度を記載するプロトコールを含むキットにも関する。

40

【 0 0 5 9 】

そのようなキットは、補充もしくは受容体の細胞内ドメインに対する細胞内タンパク質の結合を阻害できる分子、またはシグナロソーム形成を阻害できる分子を選択するために使用できる。たとえば、当技術分野に周知の組換え技術を使用して、受容体をコードする c D N A またはゲノム D N A を、1つのベクターに導入でき、アダプター/シグナルタンパ

50

ク質をコードするcDNAまたはゲノムDNAを、キットによって提供される他のベクターに導入できる。キットで提供されるベクターは、一方は、第1のタグまたはCD40の細胞外ドメインに融合したcDNAまたはゲノムDNAによりコードされる膜タンパク質を含む融合タンパク質を発現でき、他方のプラスミドは、第2のタグに融合したアダプターまたはシグナルドメインを発現できるようなものである。細胞、たとえば、HEK293を、提供されたトランスフェクション試薬を使用して、適切な比率（前記参照）の両ベクターの混合物でトランスフェクションし、トランスフェクション細胞を、個々の分子、たとえば、合成有機分子とインキュベーションする。27時間後、細胞を、界面活性剤で溶解し、溶解物を、遠心分離により不要なものを除去し、一連の3倍希釈により希釈し、第1のタグまたは抗CD40吸着マイクロタイタープレートに指向された抗体とインキュベーションする。結合していないタンパク質を除去する集中的な洗浄ののち、結合タンパク質を、第2のタグに対する抗体、および西洋ワサビペルオキシダーゼが共役した第2の抗種抗-IgG抗体で検出できる。補充タンパク質のレベルは、前記のとおり測定でき、この補充についての各単独分子の効果を、対照サンプルの増殖培地または緩衝液のみでインキュベーションした細胞と比較できる。

【0060】

本発明は、ここで、以下の制限するものでない実施例で例示する。

【実施例1】

【0061】

インタクトな細胞においてCD40へのTRAF補充の観察
 インタクトな細胞において、CD40受容体へのTNF受容体関連因子1（TRAF1）の補充を観察するために、CD40およびTRAF1をコードするプラスミド（実施例7に記載されるとおり作製）を、ヒト胚性腎臓293T細胞（HEK293、すなわちT抗原を過剰発現するATTC-CRL-1573）を同時にトランスフェクションするために使用した（DuBridge et al. 1987）。 2×10^5 細胞を、3.5cm皿に播種し、37で、約16時間で増殖させ、ついでリン酸カルシウム法（Kingston et al. 1993）により、1 μ gのCD40発現プラスミド、およびTRAF1をコードする2 μ gの発現プラスミドでトランスフェクションした。2つの発現プラスミド、TRAF1プラスミドとCD40プラスミドを、産生された全てのCD40分子を飽和するために、それぞれ2:1より大きな比率でトランスフェクションするために使用した。約27時間のトランスフェクションののち、細胞を、分離し、氷冷リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で1回洗浄し、そして180 μ l溶解緩衝液〔プロテアーゼインヒビターカクテル（0.16mM Pefabloc、105IUアプロチニン）、1%トリトンX100および0.1%アジ化Naを含有するリン酸緩衝生理食塩水（PBS）〕を用いて界面活性剤抽出した。高レベルで発現される場合、CD40は、リガンドに独立してシグナル伝達する傾向があるので、溶解の前に、CD40リガンドまたは擬態抗CD40抗体で受容体を活性化する必要はない。この特徴は、TRAF遺伝子ファミリーの種々のメンバーに共通している（Boldin et al. 1995、Siegel et al. 2000およびChan et al. 2000）。

【0062】

溶解物を、微小遠心装置において、4、15000Gで遠心分離により不要なものを除去し、（1%ウシ血清アルブミン含有溶解緩衝液で）一連して3倍に連続希釈し、そののち、各希釈サンプルを、CD40細胞外ドメインに特異的なmAb（Ro1）で被覆したELISAマイクロタイタープレートのウエル中で、室温で約2時間（または一晚）インキュベーションした（Schwabe et al. 1997）。目的の対照として、野生型CD40プラスミドの代わりに、全てのシグナルドメインを欠くCD40変異体をコードするプラスミドを、トランスフェクションおよび一過性発現のために使用した（CD40 1-222、図1B）。インキュベーションののち、徹底的な洗浄を、マイクロタイタープレートで行なって、あらゆる結合していないタンパク質を除去した〔0.05% Tween 20含有PBS（PBS/Tween）での約10回の洗浄工程〕。結合したTRAF1を検出するために、抗TRAF1特異的抗体を、プレートに加え、室温で約3時間インキュベ

ーションし、集中的に洗浄して、結合していない抗体を除去し、HRP共役2次抗体で結合した抗体を検出した。(固相抗体として使用する場合以外の)全ての抗体を、1%BSAをBSA含有PBS/Tweenに希釈した。

【0063】

図1Aに概要的に表された前記アッセイを使用して得られた結果は、インタクトな細胞で生じるCD40受容体へのTRAF1の補充を検出でき(図1Bの黒丸)、かつ非常に低いタンパク質濃度、すなわち、当初の抽出物の243倍希釈で検出できることを示す。非常に低いタンパク質濃度下でさえ、CD40細胞内ドメインへのTRAF1補充が検出されることから、この補充アッセイは非常に感受性であることを示す。このアッセイの高い特異性は、TRAF1の補充が検出不可能であるシグナルドメイン欠損CD40変異体(CD40₁₋₂₂₂)を用いた実験対照群で示された(図1Bの白丸)。

10

【0064】

CD40へのTRAF2、3、5および6の補充は、以下の実施例4および5に、TRAF1の代わりに、それぞれTRAF2、3、5および6のいずれかをコードする様々の発現ベクター(実施例7に記載)を使用して記載される。様々のTRAFの検出のために使用される抗体を、表1に記載する。

【0065】

補充アッセイで試験された別の代替的抗体を、表2に示す。

【0066】

【表1】

20

補充アッセイ	固相抗体 ($\mu\text{g/ml}$)	2次捕捉 抗体 (必要な 場合)	溶解物の 最小の 最初の 希釈率	検出Ab (希釈率)	HRP標識2次Ab (製造業社) (希釈率)
CD40へのTRAF1	抗 CD40 ECD (Ro1 ¹)		1:3	ウサギ抗 TRAF1 (G-20; SC-983) ³ (1:1000)	ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) (DIA) ⁶ 1:30 000
CD40へのTRAF2	抗 CD40 ECD (Ro1 ¹)		1:3	ウサギ抗TRAF2 (H-249; SC-7187) ³ (1:3000)	ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) (DIA) ⁶ 1:30 000
CD40へのTRAF3	抗 CD40 ECD (Ro1 ¹)		1:3	ウサギ抗TRAF3 (BD/Pharm) ⁵ (1:5000)	ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) (DIA) ⁶ (1:30 000)
CD40への Δ TRAF5 (145~557)-His	ロバ抗ウサギ Ig (DIA) ⁶	ウサギ抗 CD40 ⁷ (1:10 000)	希釈なし	抗 Xpress (IV) ⁴ (1:1000)	ヤギ抗マウス Ig (DIA) ⁶ (1:4000)
CD40への Δ TRAF6 (300~524)-His	ロバ抗ウサギ Ig (DIA) ⁶	ウサギ抗 CD40 ⁷ (1:10 000)	希釈なし	抗 Xpress (IV) ⁴ (1:1000)	ヤギ抗マウス Ig (DIA) ⁶ (1:4000)

10

20

¹Ro1: Schwabe, R. F., S. Hess, J. P. Johnson, and H. Engelmann. 1997 参照。抗CD40抗体による可溶性CD40リガンドの生物学的活性の調節。 *Hybridoma* 16:217.

²略記: HRP: 西洋ワサビペルオキシダーゼ; (H+L): (重+軽) 鎖; ECD: 細胞外ドメイン; His: ヒステジンタグ

³SC: Santa Cruz Biotechnology, Inc., 89-2 Bergheimer Straße, 69120 Heidelberg, Tel. 49 (0)6221 4503 0, Toll Free +800 4573 8000, FAX 49 (0)6221 4503 45

⁴IV: Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Phone: 0800-0 83 09 02, FAX: 0800-0 83 34 35

⁵BD/Pharm: Becton Dickinson Biosciences (Pharmingen Products), Tullastraße 8-12, 69126 Heidelberg, Germany, Tel: +(49) 6221.305.0, Fax: +(49) 6221.305.216,

⁶DIA: Dianova, Gesellschaft für biochemische, immunologische und mikrobiologische Diagnostik mbH, Mittelweg 176, D-20148 Hamburg, Tel.: 040/4 50 67-0, Fax: 040/4 50 67-490.

⁷ Schwabe, R. F., H. Engelmann, S. Hess, and H. Fricke. 1999 参照。健康なドナー、慢性腎不全、血液透析および慢性携行式腹膜灌流 (CAPD) 患者の血清中の可溶性 CD 40。 *Clin. Exp. Immunol.* 117:153.

30

40

【 0 0 6 7 】

【 表 2 】

補充アッセイ	固相抗体 (5µg/ml)	2次捕捉 抗体 (必要な 場合)	溶解物の 最小の 最初の 希釈率	検出Ab (希釈率)	HRP標識2次Ab (製造業社) (希釈率)
CD40へのTRAF1	抗 CD40 ECD (Ro1 ¹)		1:3	ウサギ抗 TRAF1 (G-20; SC-983) ³ (1:1000)	ヤギ抗ウサギIgG (H+L) (DIA) ⁶ 1:30 000
CD40へのΔTRAF3 (89~567)	ヤギ抗ウサギ Ig (DIA) ⁶	ウサギ抗 CD40 ⁷ (1:10 000)		抗 Xpress (IV) ⁴ (1:1000)	ヤギ抗マウス Ig (DIA) ⁶ (1:4000)
CD40へのΔTRAF3 (324~657)-His	ヤギ抗ウサギ Ig (DIA) ⁶	ウサギ抗 CD40 ⁷ (1:10 000)	1:3	抗 Xpress (IV) ⁴ (1:1000)	ヤギ抗マウス Ig (DIA) ⁶ 1:4000)
CD40へのTRAF5 (21~557)-His	ロバ抗ウサギ Ig (DIA) ⁶	ウサギ抗 CD40 ⁷ (1:10 000)	希釈なし	抗 Xpress (IV) ⁴ (1:1000)	ヤギ抗マウス Ig (DIA) ⁶ (1:4000)
CD40へのTRAF6	抗 CD40 ECD (Ro1 ¹)		希釈なし	ウサギ抗 TRAF6 (H-274 SC-7221) ³ (1:1000)	ヤギ抗ウサギIgG (H+L) (DIA) 1:30 000
CD40へのTRAF6	抗 CD40 ECD (Ro1 ¹)		希釈なし	ヤギ抗 TRAF6 (C-20; SC-6223) ³ (1:1000)	ウサギ抗ヤギ Ig (DIA) ⁶ (1:4000)

¹Ro1: Schwabe, R. F., S. Hess, J. P. Johnson, and H. Engelmann. 1997 参照。抗CD40抗体による可溶性CD40リガンドの生物学的活性の調節。 *Hybridoma* 16:217.

²略記: HRP: 西洋ワサビペルオキシダーゼ; (H+L): (重+軽) 鎖; ECD: 細胞外ドメイン; His: ヒステジンタグ

³SC: Santa Cruz Biotechnology, Inc., 89-2 Bergheimer Straße, 69120 Heidelberg, Tel. 49 (0)6221 4503 0, Toll Free +800 4573 8000, FAX 49 (0)6221 4503 45

⁴IV: Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Phone: 0800-0 83 09 02, FAX: 0800-0 83 34 35

⁵BD/Pharm: Becton Dickinson Biosciences (Pharmingen Products), Tullastrasse 8-12, 69126 Heidelberg, Germany, Tel: +(49) 6221.305.0, Fax: +(49) 6221.305.216,

⁶DIA: Dianova, Gesellschaft für biochemische, immunologische und mikrobiologische Diagnostik mbH, Mittelweg 176, D-20148 Hamburg, Tel.: 040/4 50 67-0, Fax: 040/4 50 67-490.

⁷ Schwabe, R. F., H. Engelmann, S. Hess, and H. Fricke. 1999 参照。健康なドナー、慢性腎不全、血液透析および慢性携行式腹膜灌流 (CAPD) 患者の血清中の可溶性CD40。 *Clin. Exp. Immunol.* 117:153.

【実施例2】

【0068】

インタクトな細胞および細胞溶解物でのCD40へのTRAF補充の比較

CD40へのTRAF補充を測定するために、多くの研究は、合成ペプチドまたはCD40シグナルドメインの可溶性フラグメントに対するTRAF結合を探索する実験系に依存

10

20

30

40

50

していた (Rothe et al. 1994, Hu et al. 1994, Cheng et al. 1995, Mosialos et al. 1995, Ishida et al. 1996, Ishida et al. b 1996, Boucher et al. 1997, Pullen et al. 1998およびPullen et al. 1999)。これらの方法の潜在的な問題は、シグナロソームの組立てが、「膜近傍の」環境で起こらないことである。そこで、細胞溶解物に対するCD40インタクトな細胞によるTRAF1およびTRAF2の補充を比較した。実験では、CD40とTRAF1またはTRAF2を、293T細胞中で同時に発現、または個別に発現させた(以下の実施例7に記載される構築物)。プラスミド濃度および比率は、実施例1に記載される実験と同一であった。27時間後、細胞を、実施例1でと同様に界面活性剤で溶解させた。目的のCD40またはTRAFのみを発現する293T細胞からの抽出物を、1:1の比で混合し、4で一晚インキュベーションした。目的のCD40とTRAFの両方を発現する抽出物も、同一条件下で維持した。そののち、サンプルを、実施例1に記載されるとおりCD40の細胞外ドメインに対するmAbで被覆したマイクロタイタープレートでインキュベーションした。洗浄工程ののち、CD40結合TRAFを、抗TRAF抗体で検出した(実施例1)。CD40へ補充されたTRAFの定量を、以下の実施例3に記載されるとおり行なった。図2Bに見られるとおり、CD40細胞溶解物に対するTRAF1またはTRAF2結合が、かろうじて検出できたのに対して、インタクトな細胞中でシグナロソームの組立てが起こった、CD40とTRAF1またはTRAF2のあいだの相互作用は、明らかに改善された感受性で測定できた(図2A)。

10

【0069】

この結果により、有効なTRAF補充は細胞内環境を必要とすることが示唆される。

20

【実施例3】

【0070】

CD40へのTRAF補充の定量

CD40へのTRAFの補充は、実施例1に記載されるアッセイを使用して定量的に測定できる。その目的のために、アッセイ条件を、TRAF発現がCD40の発現より明らかに過剰であるような方法に調節した。これは、TRAF発現プラスミドが、CD40発現プラスミドよりも2~3倍過剰に使用した場合である。CD40結合TRAF濃度を、実施例1で記載されるとおり測定した。CD40/TRAF複合体を含む照準抽出物は、各アッセイで基準としての役割を果たした。この基準抽出物は、CD40/TRAF1、CD40/TRAF2、CD40/TRAF3、CD40/TRAF5およびCD40/TRAF6をコードするプラスミドで同時にトランスフェクションされた細胞からの大量ブールの抽出物からなる。抽出物を、CD40/TRAF複合体の存在について試験し、各抽出物中の複合体濃度を、1000U/mlと任意に定義した。抽出物を、少量に等量に分けて凍結し、さらに使用するまで-80で維持した。未知のサンプルをこれらの抽出物と比較することによって、任意のユニットでCD40-TRAF複合体の濃度を相対的に決定することができた。CD40発現でのサンプル-対-サンプル偏差に必須の正規化を、以下の式で計算した：

30

【0071】

【数2】

$$\frac{[\text{受容体-補充タンパク質複合体}](\text{任意のユニット/ml})}{[\text{受容体濃度}](\text{ng/ml})} = \frac{\text{受容体タンパク質あたりの}}{\text{受容体補充タンパク質複合体}} (\text{任意のユニット/ng})$$

40

【0072】

CD40濃度を、ともに受容体の細胞外ドメインに特異的であるモノクローナル抗体(固相)およびポリクローナル抗CD40抗体(検出用)を使用するELISAで測定した。精製された可溶性CD40細胞外ドメインを基準として使用した(Schwabe et al. 1999)。

【実施例4】

50

【 0 0 7 3 】

インタクトな細胞での補充を観察するアッセイによるCD40変異体へのTRAF補充の再評価

配列比較、突然変異分析および結晶化研究は、コンセンサス配列P×QET254およびQ×P×E235x-酸性を示すCD40中の2つのTRAF相互作用部位をマッピングした。CD40中の両方のTRAF結合モチーフは、インピトロでのTRAF1、2、3、5および6の補充を仲介することが示された。アラニンの変異が、対応のTRAF結合を完全に消失させたので、いくつかの結合研究により、TRAF6結合は、235位のグルタミン酸(E235)に基本的に依存し(Pullen et al. 1999, Tsukamoto et al. 1999)、TRAF1、2、3および5は、254位のトレオニン(T254)に依存する(Hu et al. 1994, Cheng et al. 1996, Boucher et al. 1997, Pullen et al. 1999, Hanissian et al. 1997)ことが示された。本明細書に記載されるとおり、CD40へのTRAF補充を測定するために、ほとんどの研究は、合成ペプチドまたはCD40シグナルドメインの可溶性フラグメントに対するTRAF結合を探查する実験系に依存していた。

10

【 0 0 7 4 】

実施例3に記載されるとおりTRAF補充アッセイの定量版は、そのTRAF補充挙動に関して、CD40および種々のCD40変異体を比較するために使用された。TRAF1、2、3、5および6を試験した。強力なTRAF結合部位で欠失または点突然変異を示すCD40変異体を使用した(図3Aは、強力なTRAF結合部位を示す、配列番号:1)。図3Bから分かるように、本明細書に記載されるアッセイにより、試験されたCD40変異体に依存するTRAF補充に特異的差異を検出した。235位のグルタミン酸(E235A)の変異は、TRAF6補充の消失させた。アミノ酸250~254位のTRAF1/2/3/5結合モチーフP×Q×T254の別の欠失は、バックグランドレベルに対して5つ全てのTRAF試験の結合を減少させた(図3Bの1-254EA)。このアッセイにより、CD40のC末端(aa256~aa277)が、CD40により補充された5つ全てのTRAFの結合にとって重要であるも示された(図3Bの1-255)。さらに、2つのTRAFは、互いの補充に影響を及ぼし得ることが示された。たとえば、TRAF2の結合を低下させる変異がCD40に挿入されたときはいつでも、TRAF6の結合は減少した(たとえば、図3BのT254A、QE263AAまたはQE274AA)。E235A変異によるTRAF6補充の障害も、TRAF3およびTRAF5の補充を減少させた(図3B)。CD40変異体1-245EA(図3B)が、TRAF結合について試験されたとき、興味深い部位態様が生じた。1-254EAでのTRAF2のためのコンセンサス結合モチーフP×QE²³¹が存在するにもかかわらず[結晶学により測定されるとおり(Ye et al. 1999)]、このCD40変異体は、TRAF2を結合しなかった。これは、TRAF結合モチーフが配置される配列状況も、所定のTRAFが補充されるかどうかを決定することを示す。

20

30

【 0 0 7 5 】

本明細書に記載されるアッセイは、CD40へのTRAFの補充を検出する従来使用されていた方法より明らかに優れている。本来の膜の環境でのインタクトな受容体の使用により、このアッセイの感受性は、従来記載されていた方法よりも明らかによい(Rothe et al. 1994, Hu et al. 1994, Boldin et al. 1995, Stanger et al. 1995, Chinnaiyan et al. 1995, Cheng et al. 1995, Mosialos et al. 1995, Ishida et al. a 1996, Ishida et al. b. 1996, Boucher et al. 1997, Pullen et al. 1998およびPullen et al. 1999)。したがって、T254A変異体に対するTRAF2の結合(Hu et al. 1994, Boucher et al. 1997, Pullen et al. 1999, Cheng et al. 1996, Hanissian et al. 1997)または結晶化研究で決定されるTRAF結合のためのコンセンサス配列の配列環境の効果(Ye et al. 1999, NcWhirter et al. 1999およびPark et al. 1999)などの、以前に観察できなかったCD40-TRAF相互作用を検出することが可能である。アッセイは、たとえば、インタクトなCD40 C末端の必要性などのCD40に対するTRAF結合を測定する構造的な必要性をより正確な測定することができる。さらに、どのように異なる

40

50

T R A F が、互いに結合に影響を及ぼすかを示すことができた。これらの結果を考慮すると、記載されたアッセイ法は、サイトカイン受容体と細胞内シグナル分子のあいだの相互作用の理解に大いに貢献することが予測されるだろう。この知識は、シグナロソームの組立てのレベルで作用する薬剤の合理的な開発に必須であろう。

【実施例 5】

【0076】

様々の受容体への種々の T R A F の補充

C D 4 0 の細胞外ドメイン、および以下の受容体：B C M A (Madry et al. 1998 および Hatzoglou et al. 2000)、L T R 受容体 (Mosialos et al. 1995, Crowe et al. 1994, Nakano et al. 1996)、T A C I (von Bulow et al. 1997, Xia et al. 2000)、p 7 5 T N F R (Rothe et al. 1994) および C D 2 7 (Graveststein et al. 1998, Akiba et al. 1998) (構築物の詳細は、実施例 7 を参照のこと) の内のいずれかの膜貫通および細胞内ドメインを含むハイブリッド受容体をコードする発現プラスミドで細胞を形質転換させることにより、C D 4 0 および異なる受容体への種々の T R A F の補充を、実施例 1 に記載される補充アッセイによって試験した。実施例 1 に記載される E L I S A サンドイッチ、および実施例 3 に記載される定量を使用して、T R A F をコードするプラスミドとともに前記ハイブリッド受容体のいずれか 1 つをコードするプラスミドで 2 9 3 T 細胞を同時にトランスフェクションし、T R A F / 受容体複合体を測定することにより、B C M A、L T R - 受容体、T A C I、p 7 5 T R A F または C D 2 7 のシグナルドメインに対する T R A F 補充の測定を行なった。ハイブリッド受容体を用いたアッセイは、図 4 A に 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

【0077】

この実施例より分かるように、本明細書に記載されるアッセイは、まず、所定の郡のシグナル分子の結合特徴に関して、いくつかの受容体を直接的に比較できる。これにより、所定の T R A F 受容体の組合せの生物学的機能を結論づけることができるだろう。得られた結果は、あらゆる受容体への T R A F 補充を観察する補充アッセイの実現可能性を再度証明するものである。

【実施例 6】

【0078】

C D 4 0 への N I K の補充

実施例 1 に記載されるアッセイは、アダプタータンパク質 (たとえば、T R A F 2) を介したサイトカイン受容体 (たとえば、C D 4 0) へのシグナルタンパク質 (たとえば、N I K (N F - B 経路での下流メディエーター、Malinin et al. 1997)) の補充を測定するために使用できる。C D 4 0、T R A F 2、N I K (p c D N A 3 . 1 中) および m y c タグ付 I K K をコードする発現プラスミドを、2 9 3 T に (それぞれ、1 : 1 . 7 5 : 1 . 7 5 : 1 . 7 5 の比率で) 同時にトランスフェクションした。空のベクターを、トランスフェクションされた D N A と等量使用した。トランスフェクションを、実施例 1 に記載されるとおり行なった。2 7 時間後、細胞を、実施例 1 に記載されるとおり抽出した。溶解物を、抗 C D 4 0 m A b で被覆した E L I S A プレートでインキュベーションした (R01, Schwabe et al. 1997)。2 時間後、プレートを、P B S / T w e e n で洗浄し、そして商業的に入手可能なウサギ抗 N I K 抗体 (サンタクルーズ、1 : 1 0 0 希釈、S 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

C - 6363) およびHRP標識ヤギ抗ウサギIg抗体(ファルミンゲン)で展開した。NIKについての補充アッセイは、図5Aに概要的に表される。図5BおよびCに示されるとおり、CD40へのNIKの補充は、TRAF2依存性であり、IKKが同時に発現されるとき明らかに改善された。

【0079】

この結果により、アダプタータンパク質に加えて、CD40ドメインの細胞内ドメインへの、NIKなどの他のシグナルソーム構成要素の補充が測定できることが示された。

【実施例7】

【0080】

cDNAクローニング、CD40変異体の作製および発現構築物

ヒトCD40cDNAを、Hessら(1995)により記載されるとおりクローニングした。CD40cDNAを、pEF-BOS(プラスミドサイズ6164bp)に挿入した。

【0081】

ヒトTRAF2cDNAを、Mullinaxら(1996)により記載されるとおりクローニングした。他の全てのヒトTRAFcDNAを、公表された配列情報を用いてRT-PCRによりクローニングした。

【0082】

TRAF1、TRAF2およびTRAF3の発現のために、個々のcDNAを、pcDNA3(TRAF1、TRAF2およびTRAF3をコードするプラスミドのサイズは、それぞれ、6881、7014、7700bpである)に挿入した(図6)。TRAF5およびTRAF6を、pcDNA3.1His(インビトロゲン、Karlsruhe, Germany)で発現させ、得られたdTRAF5およびdTRAF6をコードするプラスミドのサイズは、それぞれ、6776および6199bpであった。pcDNA3.1Hisベクターは、抗Hisタグまたは抗Xpress抗体で検出できるペプチドタグをコードしている(図7)。

【0083】

TRAF5(dTRAF5)およびTRAF6(dTRAF6)の欠失変異体をコードするcDNAフラグメントを、酵素的なDNA制限により作製した。そこで、TRAF5のアミノ酸145~557をコードするNcoI~XhoIフラグメント、およびTRAF6のアミノ酸300~524をコードするXmnI~XhoIフラグメントを使用した(図8)。

【0084】

CD40変異体を、製造業者の指示にしたがってQuickChangeTM Site directed Mutagenesis Kit(Stratagene、オランダ国)を用いて作製した。発現については、全てのCD40構築物を、pEF-BOSのXba-1部位に挿入し(Mizushima et al. 1990)、配列決定により確認した(図8)。

【0085】

CD40受容体ハイブリッドを作製するために、pEF-BOSの変異体であるpEGFP-BOS AS MCSを使用した(図9)。pEF-BOS中の2つのXbaI部位のあいだにアンチセンス方向で、商業的に入手可能なpEGFP-N1プラスミド(Clon tech)から得られるNheI-XbaIフラグメントを挿入することにより、このプラスミドを作製した。フラグメントは、緑色蛍光タンパク質のコーディング配列、指定の制限部位SalIおよびKpnIを含む。PCR指向突然変異誘導を使用して、CD40cDNAの細胞質ドメイン境界に、細胞外に特徴的なMluI部位を作製した。このことから、1190位のアスパラギン酸(D)をグルタミン酸へ指向された変異も生じた。続いて、LTR、TACI、p75TNF受容体、CD27(全てSalI/MluIを介する)、およびBCMA(KpnI/MluIを介する)の膜貫通および細胞質ドメインをコードするcDNAフラグメントを、PCRにより作製し、pEGFP-BOS AS MCSにCD40細胞外ドメイン(ECD)をコードするXbaI/MluIフラグメントとともに、挿入した。指定の受容体ドメインをコードするcDNAフラグメント中に指定

10

20

30

40

50

の制限部位を、PCR指向突然変異誘導により作製し、コードアミノ酸配列を厳密に考慮したところ、対応の野生型受容体と一致した。全ての構築物を、使用前に配列決定により確認した。

【実施例 8】

【0086】

シグナロソーム形成を阻害する非ペプチド小型分子の調製およびスクリーニング
 コンビナトリアルケミストリーにより、小型非ペプチド分子のライブラリーを調製した。
 コンビナトリアルケミストリー技術の設計は、当技術分野に周知であり、たとえば、Herm
 kensら（1996）に記載されている。CD40およびTRAF2を過剰発現する細胞を、個
 々の合成有機化合物に接触させ、実施例1に記載されるとおり補充を試験し、実施例3の
 ように定量した。 10

【0087】

補充またはシグナロソーム形成を阻害できる化合物は、今後試験されるために選択される
 。

【0088】

[参考文献]

- Arch et al. 1998 Genes Dev. 12, 2821-2830.
- Baud et al. 1999 Genes Dev. 13,1297-1308.
- Baeurle et al. 1994 Annu. Rev. Immunol. 12,141-179.
- Boldin MP et al. 1995 J Biol Chem Apr 7; 270 (14): 7795-8 20
- Boucher, L. M et al. 1997 Biochem.
 Biophys. Res. Commun. 233: 592.
- Brodeur et al. 1997 J. Biol. Chem. 272, 19777-19784.
- Cheng, et al. 1995 Science 267: 1494
- Cheng et al. 1996 Genes Dev. 10,963-973.
- Chinnaiyan, et al. 1995. Cell 81: 505.
- Clark et al. 1996 Adv. Immunol. 63, 43-78.
- Darnay et al. 1999 J. Biol. Chem. 274,7724-7731.
- Devergne et al. 1996 Mol. Cell [BIOL. 16, 7098-7108.
- DuBridge et al. 1987 Mol. Cell. Biol. 7: 379. 30
- Eliopoulos et al. 1997 Oncogene 14,2899-2916.
- Engelmann H et al. 1990. J. Biol Chem Jan 25; 265 (3): 1531-6.
- Engelmann H et al. 1990 J. Biol. Chem. 265, p. 14497-504.
- Fields, S. , and O. Song. 1989 Nature 340: 245.
- Foy et al. 1996 Annu. Rev. Immunol. 14,591-617.
- Gedrich et al. 1996 J. Pathol. 152,1549-1561.
- Ghosh et al. 1998 Annu. Rev. Immunol. 16,225-663.
- Grewal et al. 1998 Annu. Re. Immunol. 16,111-135.
- Hanissian et al. 1997 Immunobiology 178, 275-284.
- Hu et al. 1994 J. Biol. Chern. 269.30069. 40
- Inoue et al. 2000 Exp. Cell Res. 254,14-24.
- Ishida, et al. a 1996. Biol. Chern 271: 28745.
- Ishida, et al. b 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. V. SA. 93: 9437.
- Karin et al. 1997 Curr. Opin. Cell. Biol. 9,240-246.
- Krajewska, et al. 1998. Am. J. Pathol. 152: 1549. 1561
- Leo et al. 1999 J. Biol. Chem. 274,22414-22422.
- Liu et al. 1996 Cell 87,565-576.
- Lomaga et al. 1999 Genes Dev. 13, 1015-1024.
- Malinin et al. 1997 Nature 385,540-544.
- Mizushima et al. 1990 Nucleic Acids Res. 18,5322. 50

- Naito et al. 1999 Genes Cells 4,353-362.
 Nakano et al. 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96,9803-9808.
 Mcwhirter et al. 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96,8408-8413.
 Mosialos, G et al.. 1995 Cell 80 : 389.
 Nguyen et al. 1999 Immunity 5,407-415.
 Ni et al. 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97,10395-10399.
 Park et al. 1999 Nature 398,533-538.
 Pullen, S. S et al. 1998. Biochemistry 37: 11836.
 Pullen, S. S. et al. 1999. J. Biol. Chem. 274: 14246.
 Ramesh et al. 1994 Immunol. Re. 138,87-104.
 Rothe et AL.. 1994. Cell 78: 681
 Rothe et al. 1995 Cell 83,1243-1252.
 Sandberg et al. 1997 J. Virol. 71,4649-4656.
 Schonbeck et al. 2001 Cell Mol. Life Sci. 58,4-43.
 Shiels et al. 2000 Am. J. Pathol. 157, 679-688.
 Song et al. 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S ; A. 94,9792-9796.
 Stanger, et al. 1995 Cell 81: 513
 Takeuchi et al. 1996 J. Biol Chem 271,19935-19942.
 Tsukamoto et al. 1999 Proc. Natl. Sci. U. S. A. 96,1234-1239.
 Wallach, D et al. 1999 Annu Rev Immunol. 17,331-67.
 Xu et al. 1996 Immunity 5,407-415.
 Ye et al. 1999 Mol. Cell 4,321-330.
 Yeh et al. 1997 Biochemistry 38,10168-10177.

10

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 9 】

【図 1 A】CD 40 に関するシグナロソームの組立てを測定する本発明によるアッセイの概要図である。CD 40 の細胞外ドメインに対する抗体を、固相に吸着した。そののち、CD 40 および T R A F アダプター（詳細は、実施例 1 を参照）を過剰発現する細胞の抽出物から得られる CD 40 および結合 T R A F アダプターからなるマルチ・タンパク質複合体は、抗 CD 40 吸着固相に捕捉される。結合 T R A F は、T R A F アダプターに対する特異的西洋ワサビペルオキシダーゼ共役（P O X）抗体で検出される。

30

【図 1 B】図 1 A で概要的に表わされ、説明されるアッセイによる CD 40 受容体への T R A F 1 の補充を示す。CD 40 w t（黒丸）または CD 40 1 - 2 2 2（白丸）を、実施例 1 に記載される通り、H E K 2 9 3 T 細胞において T R A F 1 とともに同時発現させた。27 時間後、細胞を、界面活性剤で溶解し、溶解物を、遠心分離で不要なものを除去し、一連の 3 倍希釈により希釈し、ついで抗 CD 40 吸着マイクロタイタープレートでインキュベーションした。CD 40 結合 T R A F 1 を、T R A F 1 に対する商業的に入手可能な抗体、および西洋ワサビペルオキシドに共役した第 2 の抗種抗 I g G 抗体（P O X）を用いて、指示された希釈で検出した。（使用された抗体の詳細は、表 1 を参照）。

【図 2】細胞抽出物に対するインタクトな細胞での CD 40 受容体への T R A F 1 および T R A F 2 の補充の比較を示す。CD 40 w t（黒丸）またはシグナルドメイン欠損変異体 CD 40 1 - 2 2 2（白丸）を、293 T 細胞において、別々に（A）に発現させるか、または T R A F 1 もしくは T R A F 2 とともに同時に発現させた（B）。27 時間後、細胞を、実施例 1 に記載されるとおり界面活性剤で溶解した。CD 40 w t または CD 40 1 - 2 2 2 のみを発現する 293 T 細胞からの抽出物と、T R A F 1 または T R A F 2 を発現する 293 T 細胞からの抽出物を 1 : 1 の比で混合し、ついで 4 で、一晚インキュベーションした。他の抽出物も全て、同一の条件下で維持した。CD 40 結合 T R A F を、実施例 1 に記載されるとおり E L I S A によって細胞抽出物の指示された希釈で測定した。アッセイを、表 1 に列挙される抗体で行なった。T R A F 2 の測定のために、モノクローナルラット抗 T R A F 2（クローン 8 . F 1 ; Dr, E. Kremmer の好意により提

40

50

供、GSF, Institut fuer Molekulare Immunologie; Marchioninstr. 25,81337 Munchen) を、検出抗体 (1:10で希釈されたハイブリドーマ上清) として使用した。

【図3A】TRAF補充について試験したCD40変異体の概要図である。強力なTRAF結合部位を含むCD40野生型配列を、下線を付した2つの主要なTRAF結合部位とともに中央(hsCD40配列番号:1)に示す。結晶化研究(Ye et al. 1999)により決定されるとおり、TRAF2結合のコンセンサス配列と一致する第三の配列モチーフ(SVQE)も下線を付す。矢印で印を付けたアミノ酸は、アラニン(A)に置換された。

【図3B】図3Aに概要的に表されるCD40変異体へのTRAF補充を示す。(同じ実験で測定されたとおり)野生型CD40に対する変異CD40への相対的なTRAF結合を示す。測定は全て、二重に3つの独立した実験で行なった(平均値周辺の平均および偏差を示す)。定量および正規化の詳細は、実施例3を参照のこと。アッセイを、表1に列挙される抗体で行なった。TRAF2の測定については、モノクローナルラット抗TRAF2(クローン8.F1; Dr. E. Kremmerの好意により提供、GSF, Institut fuer Molekulare Immunologie; Marchioninstr. 25,81337 Munchen) を、検出抗体(1:10で希釈されたハイブリドーマ上清)として使用した。

【図4A】TNF受容体ファミリーの様々なメンバーに対するTRAF結合を観察するための本発明のアッセイの概要図である。試験される受容体のCD40細胞外ドメインならびに膜貫通および細胞内ドメインを含む受容体ハイブリッドをコードする発現プラスミドを構築した。TRAFを補充することが知られているCD27、LT受容体、p75TNFR、TACIおよびBCMAのシグナルドメインへのTRAF補充を、実施例1と同様のアッセイを使用して行なった。

【図4B】図4Aに概要的に表され、記載されるアッセイを用いて得られた結果を示す。TRAF補充を、実施例1に記載されるとおり測定した(定量および正規化の詳細は、実施例3を参照のこと)。CD40へのTRAFの補充を、複数の照準CD40として示される他の試験受容体へのTRAF補充と比較するための相対的な基準として使用した。アッセイのバックグラウンドは、完全なシグナルドメインを欠くCD40変異体を用いて測定した(CD40 1-222、図3も参照)。アッセイは、表1に列挙される抗体を用いて行なった。TRAF2の測定については、モノクローナルラット抗TRAF2(クローン8.F1; Dr. E. Kremmerの好意により提供、GSF, Institut fuer Molekulare Immunologie; Marchioninstr. 25,81337 Munchen) を、検出抗体(1:10で希釈されたハイブリドーマ上清)として使用した。

【図5A】アダプタータンパク質を介して仲介されるシグナルタンパク質の補充を観察するための、本発明によるインタクトな細胞における補充アッセイの概要図である。これは、TRAFを介してCD40に補充されるキナーゼNIKで示される。293TへのCD40、TRAF2(T2)およびNIKをコードする3つの発現プラスミドの同時トランスフェクションののち、細胞を溶解し、ついでCD40結合NIKを、実施例7に記載されるとおり測定した。

【図5B】図5Aで概要的に表され、記載されるアッセイを用いて得られた結果を示す。指示された発現プラスミドの組合せは、実施例7に記載されるとおり、293T細胞で過剰発現された。細胞を抽出し、CD40結合NIKを、実施例7に記載されるとおり測定した。アッセイのバックグラウンドは、完全なシグナルドメイン(1-222)を欠くCD40変異体の同時トランスフェクションにより測定した。この図は、NIK補充におけるIKK過剰発現の影響をも示す。

【図5C】CD40へのNIK補充は、TRAF2依存性であることを示す。指示されたプラスミドの組合せは、実施例7に記載されるとおりトランスフェクションされた。CD40結合NIKを、実施例7に記載されるとおりELISAによって測定した。

【図6】TRAF1、TRAF2およびTRAF3(TRAF1、TRAF2およびTRAF3をコードするプラスミドのサイズは、それぞれ、6881、7014、7700bpである)をコードする発現ベクターを示す。

10

20

30

40

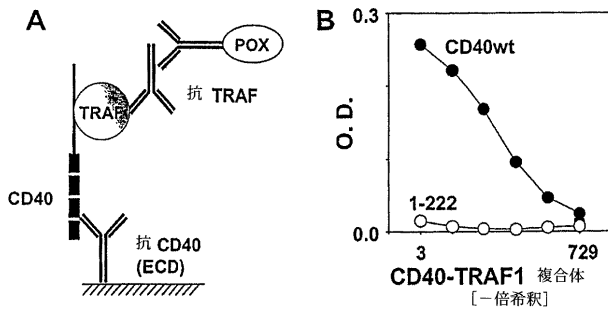
50

【図7】 d T R A F 5 および d T R A F 6 (d T R A F 5 および d T R A F 6 をコードするプラスミドのサイズは、それぞれ、6776および6199bpである)をコードする発現ベクターを示す。この発現ベクターは、抗-His-タグまたは抗Xpress抗体で検出できるペプチドタグをコードする。T R A F 5 (d T R A F 5) および T R A F 6 (d T R A F 6) の欠失変異体をコードするcDNAフラグメントを、酵素的DNA制限により作製した。したがって、T R A F 5 のアミノ酸145~557をコードするNcoI~XhoIフラグメント、およびT R A F 6 のアミノ酸300~524をコードするXmnI~XhoIフラグメントを使用した。

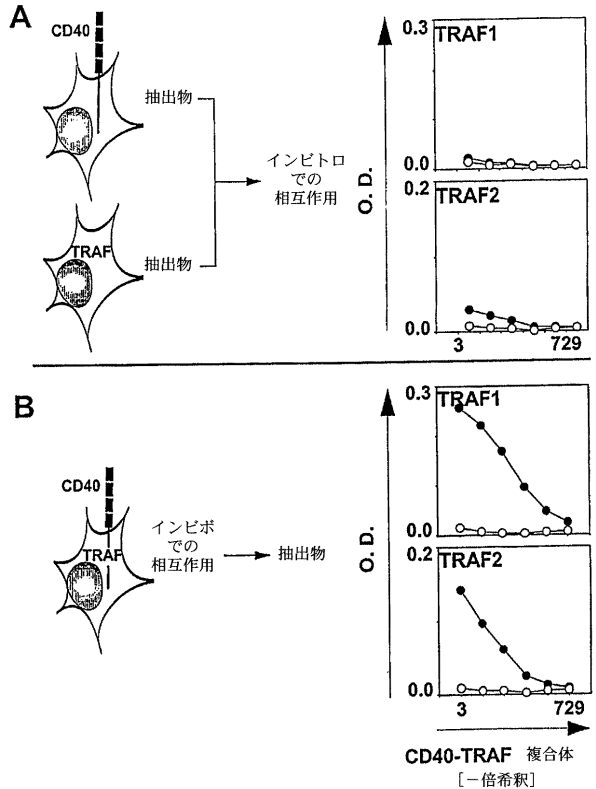
【図8】 製造業者の指示にしたがってQuickChange™ Site directed Mutagenesis Kit (Stratagene、オランダ国)で作製したCD40変異体をコードする発現ベクターを示す。CD40構築物を、pEF-BOSSのXba-1部位に挿入し(Mizushima et al. 1990)、配列決定によって確認した。

【図9】 CD40の細胞外ドメイン、ならびにCD27、LT受容体、p75TNFR、TACIおよびBCMなどの別の受容体の細胞内および膜貫通ドメインを含むハイブリッド受容体をpUC119にコードするDNA構築物を示す。

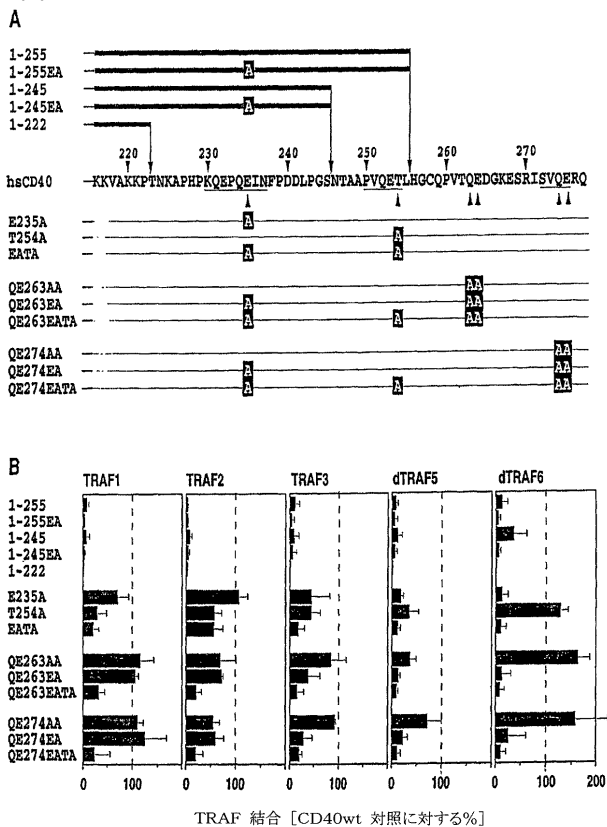
【図1】



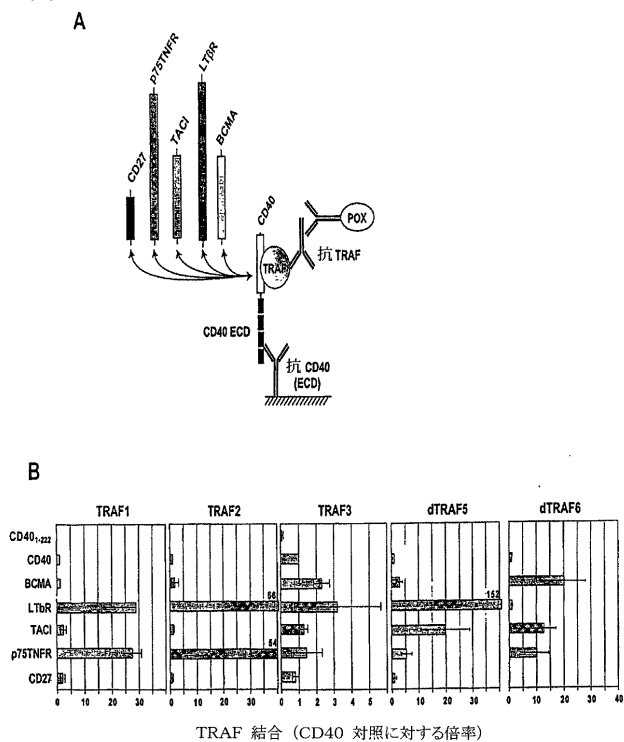
【図2】



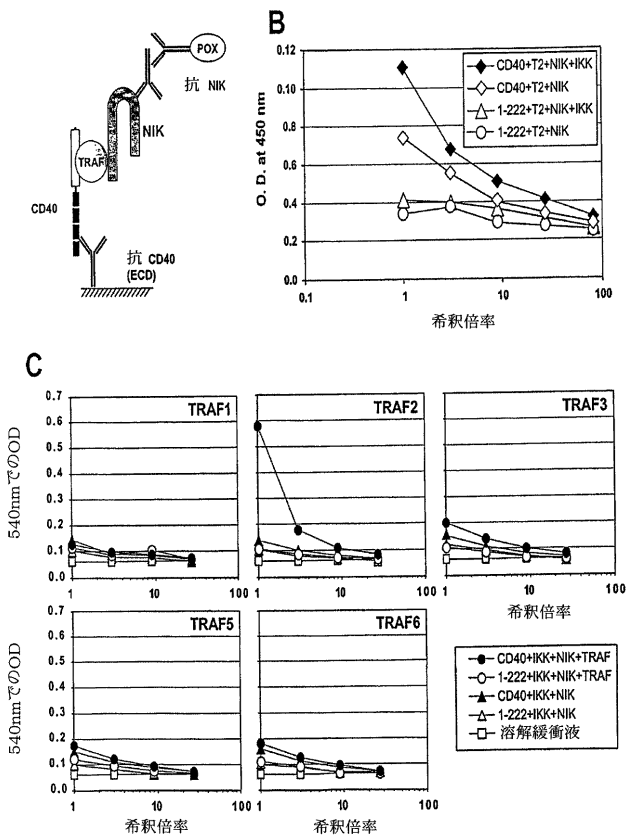
【 図 3 】



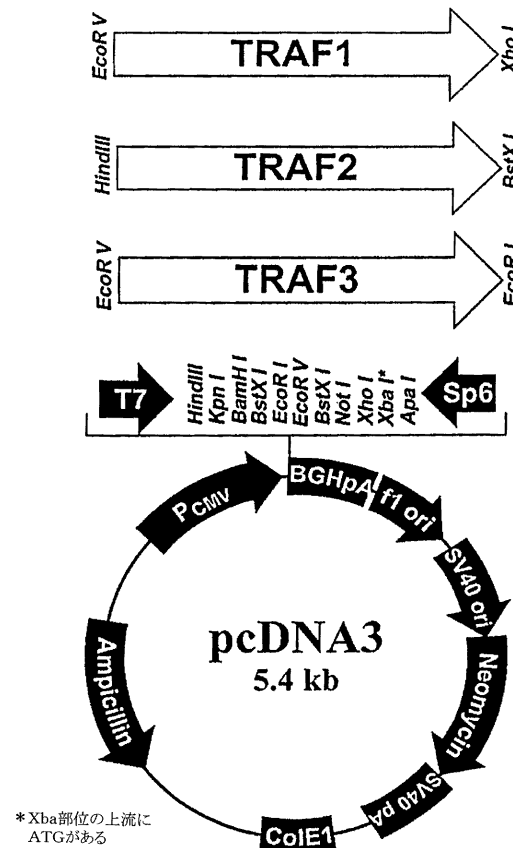
【 図 4 】



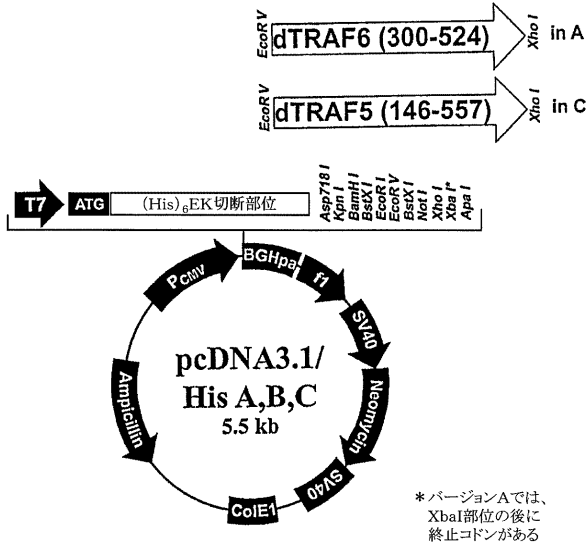
【 図 5 】



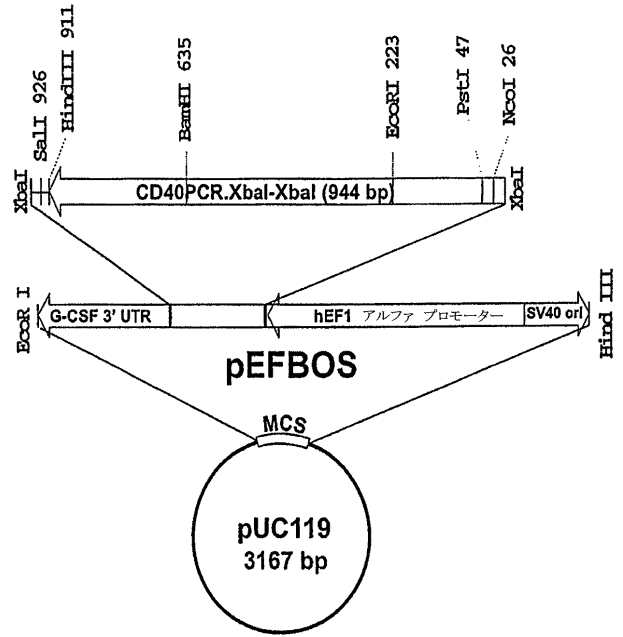
【 図 6 】



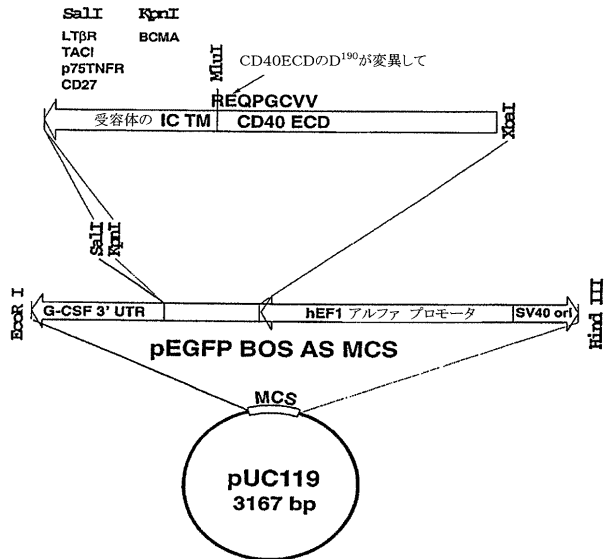
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
24 April 2003 (24.04.2003)

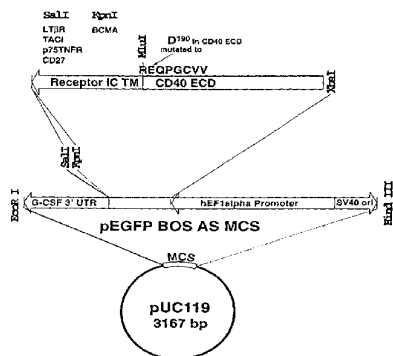
PCT

(10) International Publication Number
WO 03/034073 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68
- (74) Agent: EINAV, Henry; Interpharm Laboratories Ltd., Science-based Industrial Park, Kiryat Weizmann, Ness Ziona, 76110 Ness Ziona (IL).
- (21) International Application Number: PCT/IL02/00828
- (22) International Filing Date: 14 October 2002 (14.10.2002)
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 145918 14 October 2001 (14.10.2001) IL
- (71) Applicant (for all designated States except US): ARES TRADING S.A [CH/CH]; Le Château de Vaumarcus, CH-2028 Vaumarcus (CH).
- (71) Applicant (for OM only): EINAV, Henry [IL/IL]; Herzl St. 43, 43353 Raanana (IL).
- (72) Inventor: and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): ENGELMANN, Hartmut [DE/DE]; Joseph-Latz-Weg 35, 8000 München 70 (DE).
- Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD AND KIT FOR MONITORING RECRUITMENT OF PROTEINS TO THE INTRACELLULAR DOMAIN OF A RECEPTOR IN INTACT CELLS



WO 03/034073 A2

(57) Abstract: The present invention relates to an immunological method and kit for monitoring recruitment of a protein to the intracellular domain of a receptor in intact cells.

WO 03/034073 A2 

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

**METHOD AND KIT FOR MONITORING RECRUITMENT OF
PROTEINS TO THE INTRACELLULAR DOMAIN OF A
RECEPTOR IN INTACT CELLS.**

5

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to an immunological method and kit for monitoring recruitment of a protein to the intracellular domain of a receptor in intact cells.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Cytokines mediate their effects by binding to specific receptors on their target cells. This interaction results in structural changes/modifications in the receptor's cytoplasmic part that eventually trigger intracellular signaling cascades. These signaling cascades usually include enzymes such as kinases, lipases or proteases that mediate the biochemical and genetic changes that are the basis for the biological response to a given cytokine.

As demonstrated for many cytokine receptors –such as the TNF receptor family– one of the first events after ligand binding to a receptor is the recruitment of various adaptor proteins to the signaling domain of the activated receptor (reviewed by Wallach et al. 1999 and Inoue et al. 2000). In a second step, these adaptor proteins mediate specific binding and activation of key enzymes constituting the various signaling cascades. The resulting multi-protein complex consisting of the receptor, and one or various signaling proteins was dubbed "signalosome". The composition of the signalosome essentially determines which combination of signal pathways is activated in the target cell. The signalosome may therefore be regarded as the central molecular switchboard that determines the eventual biological response to a cytokine.

In view of this molecular mechanism of cytokine receptor signal transduction, it becomes very important to understand the signalosome composition for a given receptor. Knowing

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

the identity of the bound adaptor proteins, the circumstances under which they bind as well as their binding kinetics would allow predictions on the signals initiated by the receptor of interest. Such knowledge would make it also possible to relate signal-cascades or even combinations thereof to biological responses.

- 5 CD40, a member of the TNF receptor (TNFR) family, is recognized as the central switch point for the initiation of the interaction between antigen presenting cells (APC) and T-lymphocytes. By influencing basic functions such as cell proliferation, activation and apoptosis this receptor coordinates T-cell priming, the selection process for antibody producing B-cells as well as the activation of the effector mechanisms in macrophages to eliminate intracellular pathogens (reviewed in Grewal et al. 1998, Schonbeck et al. 2001).
- 10 The importance of CD40 for the maturation and activation of diverse immune effector mechanisms becomes most obvious when this receptor or its ligand fail to function. In mammals this results in a condition known as Hyper IgM syndrome. This severe immune deficiency is characterized by high levels of plasma IgM and low levels of IgA, IgG, and
- 15 IgE, the absence of germinal centers and the inability to mount a thymus dependent immune response (reviewed in Grewal et al. 1998, Ramesh et al. 1994). Further *in vivo* studies demonstrated that the CD40-CD40L receptor-ligand pair plays a primary role in the regulation of B-cell proliferation, immunoglobulin production, Ig class switching, rescue of B-cells from apoptosis, germinal center formation, the generation of B-cell memory and the
- 20 regulation of inflammation (reviewed in Grewal et al. 1998, Schonbeck et al. 2001, Clark et al. 1996 and Foy et al. 1996). CD40's eminent role for the immune response led to the development of various therapeutic concepts in which unwanted immune reactions may be artificially suppressed (reviewed in Grewal et al. 1998 and Liu et al. 1996). It was found that the blockade of CD40-CD40L interactions might be useful for the treatment of
- 25 autoimmune conditions, transplant rejection, graft versus host reaction and arteriosclerosis (Grewal et al. 1998 and Schonbeck et al. 2001). CD40 belongs to the group of TNF receptors that do not have a 'death domain'. They generate their signal through direct interaction with TNF receptor associated factors (TRAF) (reviewed in Arch et al. 1998 and Inoue et al. 2000).
- 30 TRAFs are a genetically conserved family of proteins that act as adaptors to recruit further signaling molecules such as the kinase NIK (Malinin et al. 1997), thereby activating important downstream effectors such as AP-1 and NF- κ B. These transcription factors in turn have been shown to regulate numerous genes involved in various aspects of cellular

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

and immune functions (reviewed in Baeurle et al. 1994, Ghosh et al. 1998 and Karin et al. 1997). Six TRAF proteins are known to date. The first two TRAF1 and TRAF2 were isolated as p75TNF receptor binding proteins (Rothe et al. 1994). All TRAF proteins share a common structural organization. A C-terminal interaction domain, dubbed TRAF domain, mediates the recruitment to various receptors of the TNFR family (Rothe et al. 1995). This domain also mediates homo and hetero-oligomerization and binding to other signaling molecules such as the death domain protein TRADD (reviewed in Arch et al. 1998 and Inoue et al. 2000). The TRAF domain is also the region of highest homology between the different TRAF family members. All TRAFs except TRAF1 have up to 6 repetitive Zn-finger motifs and one ring-finger motif in the N-terminal part that are essential for the activation of downstream components in the signaling pathway such as NIK or JNK (Malinin et al. 1997, Takeuchi et al. 1996, Liu et al. 1996 and Song et al. 1997). In addition TRAF3 and TRAF5 contain a coiled coil structure, which allows homo- and heteromerization between these two TRAFs (Pullen et al. 1998 and Leo et al. 1999). Recent crystallization studies have demonstrated that TRAFs interact with their receptors as trimers (McWhirter et al. 1999, Park et al. 1999, Ye et al. 1999 and Ni et al. 2000). The recruitment is most likely achieved by ligand induced receptor trimerization, which results in the approximation of possible interaction sites and thus forming an optimal binding site for the trimeric TRAFs (Baud et al. 1999, Pullen et al. 1999). In view of the multitude of receptors that generate their signals through TRAF proteins it is not surprising that the disruption of TRAF genes *in vivo* has dramatic consequences. In mice TRAF2-, TRAF3- and TRAF6- deficiencies are lethal (Yeh et al. 1997, Nguyen et al. 1999, Xu et al. 1996, Lomaga et al. 1999 and Naito et al. 1999). A TRAF5 deficiency results in signaling defects for multiple receptors including CD27, CD30, CD40 and the LTI3 receptor (Nakano et al. 1999). TRAF4 deficient mice are born with a tracheal malformation but no other obvious defects (Shiels et al. 2000). TRAF1 gene targeted mice have not been described.

Despite its relatively short signaling domain of 62 amino acids, CD40 was shown to interact with all TRAFs except TRAF4 (Pullen et al. 1998, Hu et al. 1994, Rothe et al. 1995, Mosialos et al. 1995, Cheng et al. 1995, Ishida et al. b 1996, Ishida et al. a 1996 and Krajewska et al. 1998). On the basis of sequence comparison between TRAF binding receptors two amino acids sequence motifs were defined as minimal TRAF binding sites: PxQxT for TRAF1, 2 and 3 (Pullen et al. 1998, Cheng et al. 1996, Gedrich et al. 1996, Devergne et al. 1996, Boucher et al. 1997, Eliopoulos et al. 1997 Sandberg et al. 1997,

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

Brodeur et al 1997 and Pullen et al. 1999) and basic-QxPxEx-acidic for TRAF6 (Pullen et al. 1999, Tsukamoto et al. 1999 and Darnay et al. 1999). TRAF5 appears to bind indirectly via TRAF3 (Pullen et al. 1999, Leo et al. 1999). Further refinement of the TRAF2 binding motif to the minimal consensus sequence P/S/T/AxQ/EE was achieved by crystallization
5 studies (Ye et al. 1999). Both TRAF binding motifs are present in CD40 and have been shown to mediate TRAF recruitment to this receptor. Despite extensive structural studies on the CD40-TRAF interactions some basic questions concerning the assembly of the CD40-TRAF signalosome remain unresolved. It is still unclear whether and how the sequence context of the full length CD40 cytoplasmic domain influences the function of the
10 two known TRAF binding motifs. It is also unknown whether the various components in the signalosome mutually affect binding to the receptor, for example by providing additional binding sites for the other signalosome proteins. Resolving these questions will not only be important in order to understand the signaling mechanisms of TRAF binding receptors but also for the rational design of drugs that interfere specifically with TRAF
15 mediated signaling.

A protein designated NIK, including isoforms, analogs, fragments or derivatives thereof which are capable of binding to the tumor necrosis factor receptor-associated (TRAF) proteins is known (Malinin et al. 1997). As the TRAF proteins are involved in the
20 modulation of mediation of the activation of the transcription factor NF- κ B, which is initiated by some of the TNF/NGF receptors, as well as others, NIK and its isoforms etc. by binding to TRAF proteins is therefore capable of affecting (modulating or mediating) the intracellular signaling processes initiated by various ligands (e.g. TNF and others) binding to their receptors such as, for example, their modulation/mediation of NF- κ B activation, via
25 interaction directly or indirectly with TRAF proteins.

The interaction of cytokine receptors with their signal adaptor proteins was well studied for the TNF receptor gene family. Most assay systems use peptide fragments of the signaling domain of the receptor of interest and test the interaction of this peptide with known
30 adaptor molecules under *in-vitro* conditions (Rothe et al. 1994, Hu et al. 1994, Boldin et al. 1995, Stanger et al 1995, Chinaiyan, A.M. et al. 1995, Cheng, G. et al. 1995, Mosialos et al. 1995, Ishida, T et al. a, 1996, Ishida, T. b 1996 and Fields, S. 1989). The systems used

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

comprise the yeast-two-hybrid-system (Fields et al. 1989), immuno-precipitation methods e.g. with Glutathion-S-transferase-tagged receptor fragments (Rothe et al. 1994, Boldin et al. 1995 Chinnaiyan et al. 1995 and Mosialos et al. 1995) or binding of labeled adaptor proteins to peptide receptor fragments spotted on filters (Boucher et al. 1997, Pullen et al. 5 1998 and Pullen et al. 1999). A common problem of all these methods is that the signalosome assembly occurs not in its natural "juxta-membrane" cellular environment.

A need therefore exists for a simple quantitative assay in which the signalosome assembly occurs in its natural cellular environment as opposed to conventional *in vitro* conditions.

10 Immunologic methods for quantifying antigens provide excellent sensitivity and specificity and have become standard techniques for both research and clinical applications. All modern immunochemical methods of protein quantitation are based upon a simple and accurate method for measuring the quantity of an indicator molecule (antigen or antibody) that binds to solid surfaces, such as plastics, and by washing away indicators not bound.

15 When the indicator molecule is labeled with a radioisotope, the assay is called a radioimmunoassay. The indicator molecule is quantified by counting radioactive decay events in a scintillation counter. The assay is called an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), when the indicator molecule is covalently coupled to an enzyme which can cleave a reporter substrate, which may be colorimetric, chemiluminescent, fluorometric, or 20 phosphometric. The indicator molecule may be quantified by determining with a spectrophotometer the initial rate at which the enzyme converts a neutral substrate to a colored or emitting product.

ELISAs may be classified under four headings: direct, indirect, sandwich and competitive (Crowther, J.R. (1995) Methods in Molecular Biology volume 42 pages 35-50). In the 25 direct-labelled antigen ELISA, the antibodies are adsorbed to the solid-phase and the antigen is labelled. In the direct-labelled antibody ELISA, the antigen that is attached to the solid phase is reacted directly with an enzyme labelled antibody (e.g. conjugated with an enzyme). In the indirect ELISA, the antibody is not labelled and a second antispecies specific antibody conjugated to an enzyme is used.

30 In the direct-sandwich ELISA, a first antibody is attached to the solid phase, the tested antigen can be added and captured by the attached antibody. A second different antibody,

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

conjugated to an enzyme is used to detect the captured antigen. In the indirect-sandwich ELISA the second antibody is not labeled, it is generated in different animal species than the first one, and it is detected by a third antispecies specific labeled antibody.

Competitive ELISA consists of two reactants, which are competing for a third one.

5 The following are examples of competitive ELISAs:

In the direct labelled-antibody-competitive ELISA, the antigen is adsorbed to the solid phase and a pre-titrated conjugated antibody is added, so that the antigen is saturated and no free recognition sites are available for further antibody combination. The interaction of antigen and conjugated antibody is perturbed if the labelled antibody is mixed with
10 another antibody (competing antibody) that is able to react with the solid phase-bound antigen. Such an assay can be used to compare monoclonal antibodies directed against the same protein.

In the direct-antigen-competitive ELISA, the antigen is adsorbed to the solid phase and a pre-titrated conjugated antibody is added so that the antigen is saturated and no free antigenic sites are available for further antibody combination. In this case the interaction of
15 antigen and conjugated antibody is perturbed if the labelled antibody is mixed in with another antigen (competitor). Thus, if the competitor antigen is cross-reactive, the labelled antibody is unavailable to react with the antigen attached to the solid phase, and a reduction in the colour is observed. Such assays are used to quantify antigens or to compare the
20 relative affinity of binding of two antigens for the same antibody.

In the indirect-antigen/antibody -competitive ELISA, the antibody is not labelled and it is detected by a third anti species-specific labelled antibody.

Currently no general, sensitive, specific, easy to perform and efficient method exists which
25 allows quantitation of recruitment of various adaptor proteins to the signaling domain of the activated receptor in intact cells. Therefore the immunologic method described in the present invention solves a long-standing problem in the area of signal transduction.

30

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a method for monitoring binding of a protein such as TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6, NIK and IKK to the intracellular domain of a receptor such as CD40, BCMA, LT β R-receptor, TACI, p75TNFR and CD27, in a cell comprising:

- 5 c) inducing signalosome formation in cells,
- d) lysing the cells,
- c) incubating the cell lysate on a solid phase coated with a first antibody capable of capturing the receptor within the signalosome,
- 10 d) separating the solid phase from the cell lysate, and
- e) detecting and measuring the amount of the protein bound to the solid phase using a second antibody capable of detecting the protein.

More specifically, the signalosome formation according to the method of the invention may be induced e.g. by receptor overexpression, by treating with the receptor specific ligand or by receptor cross-linking, e.g. by a specific antibody. The receptor may be fused to a polypeptide e.g. the extracellular domain of CD40, or peptide, such as a tag e.g. histidine, FLAG, VSV-G, Protein-C and c-myc tags, at its extracellular domain and thus, the first antibody is specific for such fused polypeptide or peptide. Also, the binding protein or signalosome component measured, may be fused to a polypeptide tag and thus, the second antibody is specific to such a tag.

In one aspect, the invention relates to methods for screening for a molecule e.g. synthetic organic compound, which inhibit the binding of an adaptor protein and/or signaling protein to an intracellular domain of a receptor or which inhibit signalosome assembly in a cell comprising:

- 25 exposing the cells to individual molecules, monitoring binding of a protein to the intracellular domain of a receptor or signalosome assembly and then selecting a molecule capable of inhibiting the binding of the adaptor and /or signalling protein to the receptor or signalosome assembly. The invention also provides the molecules selected by the screening methods of the invention.

30

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

The invention further provides a kit for measuring and quantitating binding of an adaptor and/or signaling protein to a specific membrane protein in a cell comprising:

- a) expression plasmids for the overexpression of the membrane protein fused to a first tag or to a polypeptide and a for the expression of adaptor/signalling protein fused to a second tag.
- b) ELISA microtiter plates coated with a first antibody capable of binding the first tag or polypeptide fused to the membrane protein,
- c) A second antibody capable of binding the second tag fused to the adaptor/signalling protein.
- d) HEK293 cells
- e) Transfection reagents
- f) Lysis buffer
- e) a protocol describing concentration of vectors in the transfection reaction, and concentration of antibodies in the ELISA and way of quantitation.

15

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1A is a schematic representation of the assay according to the invention for measuring the signalosome assembly for CD40. Antibodies against the extra-cellular domain of CD40 were adsorbed to a solid phase. Then the multi-protein complex consisting of CD40 and bound TRAF adaptor obtained from extracts of cells overexpressing CD40 and TRAF adaptor (for details see example 1) are captured in anti CD40 adsorbed solid phase. Bound TRAF is detected with specific horseradish peroxidase coupled (POX) antibodies against TRAF adaptor.

Figure 1B shows the recruitment of TRAF1 to the CD40 receptor by the assay schematically represented and described in Fig. 1A. CD40wt (closed circles) or CD40 1-222 (open circles) were co-expressed with TRAF1 in HEK 293T cells as described in example 1. After 27 hours, the cells were detergent lysed, the lysates cleared by centrifugation diluted by serial 3 fold dilutions and incubated with anti CD40 adsorbed microtiter plates. CD40 bound TRAF1 was detected at the indicated dilutions with a

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

commercially available antibody against TRAF1 and a secondary antispecies anti-IgG antibody horseradish peroxidase coupled (POX). (For details on antibodies used see Table 1).

5 Figure 2 shows the comparison of recruitment of TRAF1 and TRAF2 to the CD40 receptor in intact cells versus cell extracts. CD40wt (closed circles) or the signal domain deficient mutant CD40 1-222 (open circles) were either expressed separately (A) or co-expressed with TRAF1 or TRAF2 (B) in 293T cells. After 27 hours, the cells were detergent lysed as described in example 1. The extracts from 293T cells expressing only CD40wt, or CD40 1-10 222 were mixed at a 1:1 ratio with extracts from TRAF1 or TRAF2 expressing 293T cells and incubated over night at 4°C. All other extracts were kept under identical conditions. CD40 bound TRAF was measured at the indicated dilutions of the cell extracts by ELISA as described in example 1. The assays were done with antibodies listed in Table 1. For 15 determination of TRAF2 a monoclonal rat anti TRAF2 (clone 8.F1; kindly provided by Dr. E. Kremmer, GSF, Institut fuer Molekulare Immunologie; Marchioninstr. 25,81337 Munchen) was used as detection antibody (hybridoma supernatant diluted 1:10).

Figure 3A is a schematic depiction of CD40 mutants tested for TRAF recruitment. The CD40 wild type sequence comprising the potential TRAF binding sites is shown in the 20 middle (hsCD40 SEQ ID NO:1) with the two major TRAF binding sites underlined. A third sequence motif (SVQE) matching the consensus sequence for TRAF2 binding as determined by crystallization studies (Ye et al. 1999) is also underlined. Amino acids marked with an arrow were exchanged for an alanine (A).

25 Figure 3B shows TRAF recruitment to the CD40 mutants schematically represented in Fig. 3A. Shown is the relative TRAF binding to the mutant CD40 versus the wild type CD40 (as determined in the same experiment). All the determinations were done in three independent experiments in duplicates (shown are the means and variation around the mean value). For details on quantitation and normalization see example 3. The assays were done with the 30 antibodies listed in Table 1. For determination of TRAF2 a monoclonal rat anti TRAF2 (clone 8.F1; kindly provided by Dr. E. Kremmer, GSF, Institut fuer Molekulare

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

Immunologie; Marchioninstr. 25,81337 Munchen) was used as detection antibody (hybridoma supernatant diluted 1:10).

5 Figure 4A is a schematic representation of the assay according to the invention for monitoring TRAF binding to different members of the TNF receptor family. Expression plasmids were constructed that code for receptor hybrids comprising a CD40 extra cellular domain and the transmembrane and intracellular domain of the receptor to be tested. TRAF recruitment to the signaling domains of CD27, the LT β -receptor, the p75TNFR, TACI and BCMA known to recruit TRAF was carried out using the same assay as in example 1.

10

Figure 4B shows the results obtained with the assay schematically represented and described in Figure 4A. TRAF recruitment was determined as described in example 1 (for details on quantitation and normalization see example 3). Recruitment of TRAF to CD40 was used as the relative standard to compare the TRAF recruitment to the other tested
15 receptors expressed as multiples of the reference CD40. The assay background was determined with a CD40 mutant lacking the entire signaling domain (CD40 1-222, see also Fig. 3). The assays were done with the antibodies listed in Table 1. For determination of TRAF2 a monoclonal rat anti TRAF2 (clone 8.F1; kindly provided by Dr. E. Kremmer, GSF, Institut fuer Molekulare Immunologie; Marchioninstr. 25,81337 Munchen) was used
20 as detection antibody (hybridoma supernatant diluted 1:10).

Figure 5A is a schematic representation of the recruitment assay in intact cells according to the invention for monitoring the recruitment of signal proteins mediated via an adaptor protein. This is demonstrated with the kinase NIK that is recruited to CD40 via TRAF.
25 Following co-transfection of three expression plasmids encoding for CD40, TRAF2 (T2) and NIK into 293T the cells are lysed and CD40 bound NIK was determined as described in example 7.

Figure 5B shows the results obtained with the assay schematically represented and described in figure 5A. Combinations of indicated expression plasmids were over-expressed in 293T cells as described in example 7. Cells were extracted and CD40 bound
30

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

NIK was determined as described in example 7. The assay background was determined by co-transfection of a CD40 mutant that lacks the entire signalling domain (1-222). This figure shows also the effect of IKK α overexpression on NIK recruitment.

5 Figure 5C shows that NIK recruitment to CD40 is TRAF2 dependent. The indicated plasmid combinations were transfected as described in example 7. CD40 bound NIK was determined by ELISA as described in example 7).

10 Figure 6 shows the expression vectors encoding TRAF1, TRAF2 and TRAF3 (plasmid sizes are 6881, 7014, 7700 bp. For plasmids encoding TRAF1, TRAF2 and TRAF3 respectively).

15 Figure 7 shows the expression vectors encoding dTRAF5 and dTRAF6 (plasmid sizes are 6776 and 6199 bp for plasmids encoding dTRAF5 and dTRAF6 respectively). This expression vector codes for peptide tags enabling the detection with anti-His-tag or antiXpress antibodies. The cDNA fragments coding for deletion mutants of TRAF5 (dTRAF5) and TRAF6 (dTRAF6) were generated by enzymatic DNA restriction. Thus the NcoI to XhoI fragment coding for amino acids 145 to 557 of TRAF5 and XmnI to XhoI fragments coding for amino acids 300 to 524 of TRAF6 were used.

20

Figure 8 shows expression vectors encoding CD40 mutants generated with the QuickChangeTM Site directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Netherlands) according to the manufacturer's induction. CD40 constructs were inserted in the Xba-1 site of pEF-BOS (Mizushima et al. 1990) and confirmed by sequencing.

25

Figure 9 DNA shows constructs encoding the hybrid receptors comprising the extracellular domain of CD40 and the intracellular and transmembrane domains of another receptor such as CD27, the LT β -receptor, the p75TNFR, TACI and BCM in pUC119.

30

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention relates to a sensitive assay which allows monitoring the recruitment of a protein to the intracellular domain of a receptor of interest in an intact cell. The term intact cell refers to a cell that has not been lysed and therefore recruitment, as opposed to conventional assays, is carried out in its natural cellular environment.

The terms recruitment of a protein to the intracellular domain of a receptor and binding of a protein to the intracellular receptor are interchangeable.

The terms recruitment of a protein to the signalosome or binding of a protein to the signalosome are also interchangeable.

10 The terms factor polypeptide and protein are interchangeable.

As demonstrated for many cytokine receptors –such as the TNF receptor family– one of the first events after ligand binding to a receptor is the recruitment of various adaptor proteins to the signaling domain of the activated receptor (reviewed by Wallach et al. 1999 and Inoue et al. 2000). In a second step, these adaptor proteins mediate specific binding and activation of key enzymes or signaling proteins constituting the various signaling cascades. The resulting multi-protein complex comprising of the receptor and one or more adaptors and one or more signaling proteins was named “signalosome”. The composition of the signalosome essentially determines which combination of signal pathways is activated in the target cell. The signalosome may therefore be regarded as the central molecular switchboard that determines the eventual biological response to a cytokine.

In view of this molecular mechanism of cytokine receptor signal transduction, it becomes very important to understand the signalosome composition for a given receptor. Knowing the identity of the bound adaptor proteins, the circumstances under which they bind as well as their binding kinetics would allow predictions on the signals initiated by the receptor of interest. Such knowledge would make it also possible to relate signal-cascades or even combinations thereof to biological responses.

This method is suitable for screening for compounds (molecules) that interfere specifically with the integration of defined proteins into the signalosomes. This method is especially suitable for screening of compounds that interfere specifically with the integration of key enzymes constituting the various signaling cascades e.g kinases, lipases or proteases, in the

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

signalosome. Such compounds could be very useful as drugs to decouple a receptor of interest from only one signal pathway with unwanted effects, leaving other beneficial functions of the same receptor intact.

5 The recruited protein can be an adaptor protein or signaling protein such as key enzymes constituting the various signaling cascade e.g. NIK, IKK etc. The receptors can be any receptor to which proteins are recruited, for example receptors of the TNF/NGF family.

The present invention also includes, in addition to the full proteins also fragments thereof e.g. instead of the whole membrane protein, employing e.g. the membrane and intracellular domain and instead of the whole adaptor/signaling protein, employing only the
10 signalosome binding domain.

This assay, inter alia, can be used for analysis of signalosome composition, important sites for protein interactions, drug high throughput screening, and the like.

In general, the assay according to the invention can be used to monitor association
15 or recruitment of an adaptor or signalling protein to the intracellular domain of a receptor occurring inside the cells e.g. this assay can be used to monitor recruitment of any TNF/NGF receptor associated proteins, such as TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5 and TRAF6 or fragments thereof. The recruitment can be measured in cells, which express high amounts of the receptor and recruited proteins.

20 Signalosome formation can be induced by either overexpression of receptors, such as CD40 and/or adaptors such as TRAFs and/or signalling proteins such as NIK, IKK etc. equivalent thereof or fragment thereof; or by activation of receptors by ligand triggering or by receptor cross-linkage. Receptor activation may be achieved by cross-linking receptors with specific antibodies (see Engelmann et al. 1990). In the following non-limiting
25 examples, signalosome formation or recruitment is induced by overexpression of CD40, TRAF, NIK and equivalents.

The receptor and recruitable proteins can be over expressed by transfection with expression vectors encoding said proteins. The receptor and the recruited proteins may be
30 encoded in different plasmids or may be linked in one plasmid. The increased expression of

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

the receptor and recruited proteins can be transient or constitutive by using appropriate expression systems and resistance markers known in the art.

Overexpression by the use of a vector for inducing and/or enhancing the endogenous production of the receptor and recruited proteins is also contemplated according to the invention. The vector may comprise regulatory sequences functional in the cells desired to express the receptor and/or the recruited proteins, e.g. such regulatory sequences may be promoters or enhancers. The regulatory sequence may then be introduced into the right locus of the genome by homologous recombination, thus operably linking the regulatory sequence with the gene, the expression of which is required to be induced or enhanced. The technology is usually referred to as "endogenous gene activation" (EGA), and it is described e.g. in WO 91/09955.

Transfection of the plasmid can be carried out by any method known in the art e.g. by the calcium phosphate method (Kingston et al. 1993).

Measurements of recruitment of proteins to a given receptor can be tested by the "recruitment assay in intact cells" in any cell e.g. HEK293, 293T cells and B cells in which the consequences of signalling can be assessed.

For the assay e.g. 2×10^5 cells can be seeded into 3.5 cm dishes grown about 16 hours at 37°C and transfected with expression plasmid encoding the receptor e.g. CD40 and an expression plasmid encoding one or more recruitable proteins/peptides e.g. TRAF, NIK. About twenty-seven hours after transfection, the cells are detached, washed and detergent extracted e.g. with lysis buffer comprising phosphate buffered saline (PBS) containing a protease inhibitor cocktail (0.16 mM Pefabloc, 105 IU Aprotinin), 1% Triton X100 and 0.1% Na Azide.

The lysates are cleared by centrifugation in a micro-centrifuge, diluted preferably to 3 fold serial dilutions and then every diluted sample incubated for about 2 hours (or overnight) in a solid phase, preferably wells of ELISA microtiter plates, coated with a mAb specific to the receptor extra-cellular domain e.g. (Ro1 for CD40) (Schwabe et al. 1997). In order to increase the sensitivity of the assay the anti receptor antibody can be coated to the solid phase through an anti species-specific antibody. For control purposes, instead of the plasmid encoding the wild type receptor, a plasmid encoding a receptor mutant lacking the entire or part of the signalling domain can be used for transfection. Following incubation, washes will be preferably carried out to remove unbound protein. To detect recruited proteins,

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

specific antibodies to said recruited protein, e.g. anti TRAF, anti NIK, of interest are loaded into the plates, incubated for about 3 hours at room temperature and followed by washes to remove unbound antibody. This antibody can be detected by using enzyme-linked antibody or enzyme-linked secondary anti species IgG antibody or protein A/G and
 5 visualized by coloured, florescent or chemiluminescent specific substrates. Alternatively, the antibody or protein A/G may be radioactively labelled. In addition, biotin may be chemically linked to the antibody or protein A/G trough lysine residues. Labelled streptavidine may be used to detect the presence of biotin.

The recruited protein can be quantitatively measured using the recruitment assay carried
 10 out in intact cells. For that purpose, the assay conditions are adjusted in such a way that the recruitable protein is in significant excess over the receptor protein. Therefore a concentration of recruited protein over receptor concentration in the cell should preferably be equal or above 2. This ratio can be achieved by carrying out the transfections with increasing amount of plasmid encoding the recruited protein over the amount of the
 15 plasmid encoding the receptor and or by using more potent promoters controlling the transcription of the respective proteins.

The recruited protein concentration can be measured using a reference cell extract containing e.g. 1000 U/ml of receptor/recruited protein complexes as a standard in each
 20 assay. This standard extract will preferably consist of a large pool of cell extracts from cells that were co-transfected with the plasmids encoding for the recruited protein of interest and the receptor of interest. The extracts are frozen in small aliquots and kept at -80°C until further use. By comparing levels of unknown samples to these extracts, it is possible to determine the relative receptor-recruited protein complex concentrations in arbitrary units. The following formula can be used for quantitation and the necessary normalization for
 25 sample-to-sample variations

in the receptor expression :

$$\frac{\text{[receptor-recruited protein complex] (arb. Units/ml)}}{\text{[receptor concentration] (ng/ml)}} = \frac{\text{receptor recruited protein complex per receptor protein}}{\text{(arb. Units/ng)}}$$

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

The receptor concentrations can be determined with an ELISA employing a monoclonal and a polyclonal anti receptor antibody, both specific for the extracellular domain of said receptor. A purified soluble extra cellular domain can be used as a standard.

5 In a non limiting example, the assay was shown to be suitable for measuring recruitment of signal proteins, e.g. NIK (a downstream mediator in the NF- κ B pathway Malinin et al. 1997) to a cytokine receptor, e.g. CD40 via an adaptor protein e.g. TRAF2. The recruitment of NIK to CD40 was TRAF2 dependent and improved when IKK was co-expressed.

10

The receptor can be expressed as a fusion protein in which the extracellular portion of the receptor is fused to a polypeptide tag e.g. histidine tag. Using this fusion protein allows monitoring the recruitment to any receptor by using tag specific antibodies e.g. anti histidine tag, to immobilize the receptor to the solid phase without the need of receptor
15 specific antibodies. Expression vectors designed for the production of tag fusion proteins are commercially available. These vectors encode a specific tag up-stream or down-stream of the cloning site. Alternatively, the tag may be fused to the gene of interest by PCR, for example by including the tag sequence in the primers used for the amplification of the DNA of interest. The PCR amplified DNA fusion product may be cloned into an
20 expression vector comprising appropriate regulatory signals for transcription and translation.

Examples of epitope tags are histidine tags (a stretch of 6 consecutive histidines, Janknecht et al. 1991), FLAG (8 amino acid epitope ROCHE), VSV-G (11 amino acid epitope from vesicular stomatitis virus ROCHE), Protein-C (12 amino acid epitope from the heavy chain
25 of human Protein C, ROCHE), and c-myc (10 amino acid epitope from the human c-myc gene protein ROCHE). In an epitope tagged protein the added sequence is a short peptide of about 3-12 amino acids, usually with no function of its own. The important property of the epitope tag is its ability to be recognized and bound by a single, tag-specific antibody. Epitope tags can be placed e.g. at the amino-terminus (N-terminus).

30 A wide range of epitopes has been used to tag proteins and many tag specific antibodies are commercially available. The best epitope tag for a particular experimental system is the one that does not interfere with the function or cellular processing of the tagged protein, yet

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

generates a strong detection signal on Western blots, in immunofluorescence microscopy, or quantitative assays.

Alternatively, a hybrid construct comprising the extracellular domain of a given receptor such as CD40 and intracellular signalling domain of different receptors can be used in the recruitment assay carried out inside the cells. Hybrid receptor can be used to compare recruitment to a variety of intracellular receptors using the same capturing antibody e.g. CD40 specific antibodies. In a non limiting example presented the measurement of TRAF recruitment to the signalling domains of BCMA the LT β R-receptor TACI the p75TNFR or the CD27 was carried out by co-transfecting 293T cells with a plasmid encoding hybrid receptors together with a plasmid encoding TRAF and measurement of the TRAF/Receptor complex using the same ELISA sandwich. The assay described here allows for the first time the direct comparison of several receptors with respect to their binding characteristics for a given set of signal molecules e.g. TRAF. This will make it possible to draw conclusions as to the biological functions of a given TRAF receptor combination. The results obtained demonstrate again the feasibility of the recruitment assay for monitoring TRAF recruitment to any receptor.

The same approach can be adopted to detect recruited proteins, consisting of expressing the recruited proteins fused to a polypeptide Tag such as EK and detecting the recruited protein with commercially available Tag specific antibodies such as AntiXpress antibodies.

In a non limiting example below it has been demonstrated the recruitment of tagged dTRAF6 to CD40 by using an antibody specific to EK (antiexpress antibody) to monitor the recruited dTRAF6.

The results obtained suggest therefore that using this assay, recruitment of any TRAF to any receptor can be specifically monitored.

In the non-limiting examples presented below, the recruitment assay based on protein recruitment to a receptor in the intracellular environment, has been demonstrated to be more sensitive than the conventional recruitment assay (Fig. 2). In addition it has been demonstrated that recruitment is dependent on multiple interactions sites either provided by the receptor itself or by as yet unidentified molecules in the signalosome. For example the assay allows a more precise determination of the structural requirements that determine

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

TRAF binding to CD40 e.g. the necessity of the intact CD40 C-terminus. Furthermore it was possible to demonstrate how different TRAFs affect each others binding. The recruitment assay according to the invention is quantitative sensitive and suitable for monitoring recruitment of various different adaptors and/or signaling proteins to any receptor. In view of these findings it is expected that the described assay method will contribute greatly to the understanding of the interaction between a cytokine receptor and intracellular signalling molecules. This knowledge will essential for the rational development of drugs that act on the level of signalosome assembly.

10 The recruitment assay according to the invention can therefore be used to screen for potential therapeutically valuable molecules which inhibit recruitment of adaptor and/or signaling proteins to the intracellular domain of a receptor or which inhibit signalosome formation. Cells can be exposed to a variety of individual synthetic organic compounds created by combinatorial chemistry and recruitment in treated cells versus control cells can be monitored and quantited by the recruitment assay according to the invention. The compounds tested may be obtained not only through combinatorial chemistry, but also from other high throughput synthesis methods. Automated techniques enable the rapid synthesis of libraries of molecules, large collections of discrete compounds, which can be screened. Producing larger and more diverse compound libraries increases the likelihood of discovering a useful drug within the library. For high throughput screening robots can be used to test inhibition of recruitment or disruption of signalosome formation by thousands of compounds.

The invention also provides a kit for the measurement and quantitation of protein recruitment to specific receptors comprising the following components:

- 25 a) two expression plasmids, one for the overexpression of the membrane protein fused to a first tag or to the extracellular domain of the CD40 receptor, and the other plasmid for the expression of an adaptor/signalling protein fused to a second tag.
- b) ELISA microtiter plates coated with a first antibody capable of binding a first tag or to the CD40 extracellular domain fused to the membrane protein,
- 30 c) a second antibody capable of binding to a second tag fused to the adaptor/signalling protein.

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

- d) Transfection reagents
 - e) Lysis buffer
 - e) a protocol describing concentration of vectors in the transfection reaction, and concentration of antibodies in the ELISA and way of quantitation.
- 5 Such a kit can be used for selecting molecules capable of inhibiting recruitment, or inhibiting binding of an intracellular protein to the intracellular domain of a receptor, or molecules capable of inhibiting signalosome formation. For example, the cDNA or genomic DNA encoding the receptor can be introduced in one vector and the cDNA or genomic DNA encoding the adaptor/signalling protein can be introduced in the other
- 10 vector provided by the kit, using recombinant techniques well known in the art. The vectors provided in the kit are such, that one allows expression of fusion proteins comprising the membrane protein encoded by the cDNA or genomic DNAs fused to a first tag or to the extracellular domain of CD40 and the other plasmid allows expression of adaptor or signalling domain fused to a second tag. Cells e.g HEK293 are transfected with
- 15 a mixture of both vectors at appropriated ratio (see above), using the provided transfection reagents and the transfected cells are incubated with individual molecules e.g. synthetic organic molecules. After 27 hours, the cells are detergent lysed, the lysates cleared by centrifugation, diluted by serial 3 fold dilutions and incubated with antibodies directed to the first tag or anti CD40 adsorbed microtiter plates. After extensive washes which remove
- 20 non bound proteins, bound proteins can be detected with the antibody against the second tag and a secondary antispecies anti-IgG antibody horseradish peroxidase coupled. The level of the recruited protein can be measured as described above and the effect of every single molecule on this recruitment can be compared to a control sample of cells incubated in growth medium or buffer alone.
- 25 The invention will now be illustrated by the following non-limiting examples:

30

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

EXAMPLES

Example 1:

Monitoring TRAF1 recruitment to CD40 in intact cells.

In order monitor TNF receptor associated factor 1 (TRAF1) recruitment to the CD40 receptor, in intact cells, CD40 and TRAF1 encoding plasmids (generated as described in example 7) were used to co-transfect the human embryonic kidney 293T cells (HEK293 , ATTC CRL-1573 over expressing the T antigen) (DuBridgde et al 1987). 2×10^5 cells were seeded at into 3.5 cm dishes grown 16 hours at 37°C and transfected with 1 µg CD40 expression plasmid and 2 µg of an expression plasmid encoding TRAF by the calcium phosphate method (Kingston et al. 1993). The two expression plasmids, TRAF1 plasmid and CD40 plasmid were used for transfection at a ratio greater than 2: 1 respectively in order to saturate all the CD40 molecules produced. Twenty-seven hours after transfection, the cells were detached, washed once with ice cold phosphate buffered saline (PBS) and detergent extracted with

180µl lysis buffer [phosphate buffered saline (PBS) containing a protease inhibitor cocktail (0.16 mM Pefabloc, 105 IU Aprotinin), 1% Triton X100 and 0.1% Na Azide]. Since CD40 has a tendency for ligand independent signaling when expressed at high levels it was not necessary to activate the receptor with DC40 ligand or mimetic anti CD40 antibodies before lysis. This feature is shared by various members of the TNFR gene family (Boldin et al. 1995, Siegel et al. 2000 and Chan et al. 2000).

The lysates were cleared by centrifugation at 15000 G at 4 °C in a micro-centrifuge, 3 fold serially diluted (with lysis buffer containing 1% bovine serum albumin) and then every diluted sample incubated for 2 hours at room temperature (or overnight) in wells of ELISA microtiter plates coated with a mAb (Ro1) specific to the CD40 extra-cellular domain (Schwabe et al. 1997). For control purposes, instead of the wild type CD40 plasmid, a plasmid encoding a CD40 mutant lacking the entire signalling domain was used for transfection and transient expression (CD401-222, Figure 1B). Following incubation exhaustive washes were carried out on the microtiter plates to remove any unbound protein [about 10 washing steps with PBS containing 0.05% Tween 20] PBS/Tween]. To detect bound TRAF1, anti TRAF1 specific antibodies were loaded into the plates, incubated for about 3 hours at room temperature, preceded by extensive washes to remove unbound antibody and detecting the bound antibody with an HRP conjugated secondary antibody.

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

All antibodies (except when used as solid phase antibody) were diluted in PBS/Tween containing 1% BSA.

The result obtained using the above described assay, schematically represented in figure 1A demonstrate that recruitment of TRAF1 to the CD40 receptor occurring in intact cells can be detected (filled circles in figure 1B) and at very low protein concentration i.e. up to a 243-fold dilution of the original extract. Detection of TRAF1 recruitment to CD40 intracellular domain even under very low protein concentration indicates that this recruitment assay is highly sensitive. The high specificity of this assay was demonstrated in the experimental control group with a signalling-domain-deficient CD40 mutant (CD401-222) in which recruitment of TRAF1 is undetectable (open circles in figure 1B).

Recruitment of TRAF2, 3, 5 and 6 to CD40 is described in examples 4 and 5 below using different expression vectors (described in example 7) encoding either TRAF2, 3, 5 and 6 respectively instead of TRAF1. The antibodies used for the detection of the different TRAFs are described in Table 1.

Additional alternative antibodies tested in the recruitment assay are given in Table 2.

20

25

30

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

TABLE 1

Recruitment assay for	Solid Phase antibody (at 5µg/ml)	Sec. Capture antibody (when needed)	Min. initial dilution of lysate	Detection Ab (Dilution)	HRP-labeled secondary Ab (Producer) (Dilution)
TRAF1 to CD40	Anti CD40 ECD (Ro1) ¹		1:3	Rabbit anti TRAF1 (G-20; SC-983) ³ (1:1000)	Goat anti Rabbit IgG (H+L) (DIA) ⁶ 1:30 000
TRAF2 to CD40	Anti CD40 ECD (Ro1) ¹		1:3	Rabbit anti TRAF2 (H-249; SC-7187) ³ (1:3000)	Goat anti Rabbit IgG (H+L) (DIA) ⁶ 1:30 000
TRAF3 to CD40	Anti CD40 ECD (Ro1) ¹		1:3	Rabbit anti TRAF3 (BD/Pharm) ⁵ (1:5000)	Goat anti Rabbit IgG (H+L) (DIA) ⁶ (1:30 000)
deltaTRAF5(145-557)-His to CD40	Donkey anti Rabbit Ig (DIA) ⁶	Rabbit anti CD40 ⁷ (1:10 000)	undiluted	AntiXpress (IV) ⁴ (1:1000)	Goat anti Mouse Ig (DIA) ⁶ (1:4000)
deltaTRAF6 (300-524)-His to CD40	Donkey anti Rabbit Ig (DIA) ⁶	Rabbit anti CD40 ⁷ (1:10 000)	undiluted	AntiXpress (IV) ⁴ (1:1000)	Goat anti Mouse Ig (DIA) ⁶ (1:4000)

¹Ro1: see Schwabe, R. F., S. Hess, J. P. Johnson, and H. Engelmann. 1997. Modulation of soluble CD40 ligand bioactivity with anti-CD40 antibodies. *Hybridoma* 16:217.

²Abbreviations: **HRP**: Horse radish Peroxidase; **(H+L)**: (Heavy + Light) chain; **ECD**: extra-cellular Domain; **His**: Histidin-tagged

³SC: Santa Cruz Biotechnology, Inc., 89-2 Bergheimer Straße, 69120 Heidelberg, Tel. 49 (0)6221 4503 0, Toll Free +800 4573 8000, FAX 49 (0)6221 4503 45

10 ⁴IV: Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Phone: 0800-0 83 09 02, FAX: 0800-0 83 34 35

⁵BD/Pharm: Becton Dickinson Biosciences (Pharmingen Products), Tullastrasse 8-12, 69126 Heidelberg, Germany, Tel: +(49) 6221.305.0, Fax: +(49) 6221.305.216,

15 ⁶DIA: Dianova, Gesellschaft für biochemische, immunologische und mikrobiologische Diagnostik mbH, Mittelweg 176, D-20148 Hamburg, Tel.: 040/4 50 67-0, Fax: 040/4 50 67-490.

⁷see Schwabe, R. F., H. Engelmann, S. Hess, and H. Fricke. 1999. Soluble CD40 in the serum of healthy donors, patients with chronic renal failure, haemodialysis and chronic ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) patients. *Clin. Exp. Immunol.* 117:153.

20

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

TABLE 2

Recruitment assay for	Solid Phase antibody (at 5µg/ml)	Sec. Capture antibody (when needed)	Min. initial dilution of lysate	Detection Ab (Dilution)	HRP-labeled secondary Ab (Producer) (Dilution)
TRAF1 to CD40	Anti CD40 ECD (Ro1) ¹		1:3	Rabbit anti TRAF1 (G-20; SC-983) ³ (1:1000)	Goat anti Rabbit IgG (H+L) (DIA) ⁶ 1:30 000
deltaTRAF3 (89-567) to CD40	Goat anti Rabbit Ig (DIA) ⁶	Rabbit anti CD40 ⁷ (1:10 000)		AntiXpress (IV) ⁴ (1:1000)	Goat anti Mouse Ig (DIA) ⁶ (1:4000)
deltaTRAF3(324-567)-His to CD40	Goat anti Rabbit Ig (DIA) ⁶	Rabbit anti CD40 ⁷ (1:10 000)	1:3	AntiXpress (IV) ⁴ (1:1000)	Goat anti Mouse Ig (DIA) ⁶ 1:4000
TRAF5(21-557)-His to CD40	Donkey anti Rabbit Ig (DIA) ⁶	Rabbit anti CD40 ⁷ (1:10 000)	undiluted	AntiXpress (IV) ⁴ (1:1000)	Goat anti Mouse Ig (DIA) ⁶ (1:4000)
TRAF6 to CD40	Anti CD40 ECD (Ro1) ¹		undiluted	Rabbit anti TRAF6 (H-274 SC-7221) ³ (1:1000)	Goat anti Rabbit IgG (H+L) (DIA) 1:30 000
TRAF6 to CD40	Anti CD40 ECD (Ro1) ¹		undiluted	Goat anti TRAF6 (C-20; SC-6223) ³ (1:1000)	Rabbit anti Goat Ig (DIA) ⁶ (1:4000)

¹Ro1: see Schwabe, R. F., S. Hess, J. P. Johnson, and H. Engelmann. 1997. Modulation of soluble CD40 ligand bioactivity with anti-CD40 antibodies. *Hybridoma* 16:217.

- ²Abbreviations: **HRP**: Horse radish Peroxidase; **(H+L)**: (Heavy + Light) chain; **ECD**: extra-cellular Domain; **His**: Histidin-tagged
- 5 ³SC: Santa Cruz Biotechnology, Inc., 89-2 Bergheimer Straße, 69120 Heidelberg, Tel. 49 (0)6221 4503 0, Toll Free +800 4573 8000, FAX 49 (0)6221 4503 45
- ⁴IV: Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, 76131 Karlsruhe, Phone: 0800-0 83 09 02, FAX: 0800-0 83 34 35
- 10 ⁵BD/Pharm: Becton Dickinson Biosciences (Pharmingen Products), Tullastrasse 8-12, 69126 Heidelberg, Germany, Tel: +(49) 6221.305.0, Fax: +(49) 6221.305.216,
- ⁶DIA: Dianova, Gesellschaft für biochemische, immunologische und mikrobiologische Diagnostik mbH, Mittelweg 176, D-20148 Hamburg, Tel.: 040/4 50 67-0, Fax: 040/4 50 67-490.
- 15 ⁷see Schwabe, R. F., H. Engelmann, S. Hess, and H. Fricke. 1999. Soluble CD40 in the serum of healthy donors, patients with chronic renal failure, haemodialysis and chronic ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) patients. *Clin. Exp. Immunol.* 117:153.

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

Example 2:Comparison of TRAF recruitment to CD40 in intact cells and in cell lysate.

To measure TRAF recruitment to CD40 many studies relied on experimental systems that probe TRAF binding to synthetic peptides or soluble fragments of the CD40 signaling domain (Rothe et al. 1994, Hu et al. 1994, Cheng et al. 1995, Mosialos et al. 1995, Ishida et al. a 1996, Ishida et al. b 1996, Boucher et al. 1997, Pullen et al. 1998 and Pullen et al. 1999). A possible problem of these methods is that the signalosome assembly does not occur in the "juxta-membrane" environment. Therefore, recruitment of TRAF1 and TRAF2 by CD40 intact cells versus cell lysate was compared. In the experiment, CD40 and TRAF1 or TRAF2 were co-expressed or expressed separately in 293T cells (constructs described in example 7 below). Plasmid concentrations and ratios were identical to the experiment described in example 1. After 27 hours, the cells were detergent lysed as in example 1. The extracts from 293T cells expressing only CD40 or the TRAF of interest were mixed at a 1:1 ratio and incubated over night at 4 °C. Extracts expressing both CD40 and the TRAF of interest were kept under identical conditions. Then the samples were incubated on microtiter plates coated with a mAb against the extra-cellular domain of CD40 as described in example 1. After a washing step, CD40 bound TRAFs were detected with anti TRAF antibodies (example 1). Quantitation of TRAF recruited to CD40 was carried out as described in the example 3 below. As seen in figure 2B the interaction between CD40 and TRAF1 or TRAF2 could be measured at clearly improved sensitivity when the assembly of the signalosome occurred in an intact cell while TRAF1 or TRAF2 binding to CD40 cell lysate was barely detectable (figure 2A).

The results suggest that effective TRAF recruitment requires the intracellular environment.

25

Example 3:Quantitation of TRAF recruitment to CD40.

The recruitment of TRAF to CD40 can be quantitatively measured using the assay described in example 1. For that purpose, the assay conditions were adjusted in such a way that TRAF expression was in significant excess over the expression of CD40. This was the case when the TRAF expression plasmid was used at a two to three fold excess over the

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

CD40 expression plasmid. The CD40 bound TRAF concentration was measured as described in example 1. A reference extract containing CD40/TRAF complexes served as a standard in each assay. This standard extract consisted of a large pool extract from cells that had been co-transfected with the plasmids encoding CD40/TRAF1, CD40/TRAF2, CD40/TRAF3, CD40/TRAF5 and CD40/TRAF6. The extracts were tested for the presence of CD40/TRAF complexes and the complex concentrations in each extract were arbitrarily defined as 1000 U/ml. The extracts were frozen in small aliquots and kept at -80°C until further use. By comparing unknown samples to these extracts, it was possible to determine the relative CD40-TRAF complex concentrations in arbitrary units. The necessary normalization for sample-to-sample variations in the CD40 expression was calculated with the following formula:

$$\frac{\text{receptor-recruited protein complex}(\text{arb. Units/ml})}{\text{receptor concentration}(\text{ng/ml})} = \frac{\text{receptor recruited protein complex per receptor protein}}{(\text{arb. Units/ng})}$$

CD40 concentrations were determined with an ELISA employing a monoclonal antibody (solid phase) and a polyclonal anti CD40 antibody (for detection) both specific for the extracellular domain of the receptor. A purified soluble CD40 extra cellular domain was used as standard (Schwabe et al 1999).

Example 4:

Re-evaluation of TRAF recruitment to CD40 mutants by the assay monitoring recruitment in intact cells.

Sequence comparison, mutation analysis and crystallization studies mapped the two TRAF interaction sites in CD40 exhibiting the consensus sequences PxQET254 and QxPxE235x-acidic. Both TRAF binding motifs in CD40 were shown to mediate recruitment of TRAF1, 2, 3, 5 and 6 *in vitro*. Several binding studies demonstrated that TRAF6 binding depends essentially on the glutamic acid in position 235 (E235)(Pullen et al. 1999, Tsukamoto et al. 1999) and TRAF1, 2, 3 and 5 depends on the threonine in position 254 (T254) (Hu et al.

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

1994, Cheng et al. 1996, Boucher et al. 1997, Pullen et al. 1999, Hanissian et al. 1997) since their mutation to alanine resulted in complete loss of the corresponding TRAF binding. As mentioned herein, in order to measure TRAF recruitment to CD40 most studies had relied on experimental systems that probe TRAF binding to synthetic peptides or
5 soluble fragments of the CD40 signaling domain.

The quantitative version of the TRAF recruitment assay as described in example 3 was used to compare CD40 and various CD40 mutants with respect to their TRAF recruitment behaviour. TRAF 1, 2, 3, 5 and 6 were examined. CD40 mutants with deletions or point mutations in potential TRAF binding sites were used (figure 3A shows the potential TRAF
10 binding site SEQ ID NO:1). As seen in figure 3B, the assay described here detected specific differences in TRAF recruitment depending on the CD40 mutant tested. Mutation of glutamic acid at position 235 (E235A) resulted in loss of TRAF6 recruitment. Additional deletion of the TRAF1/2/3/5 binding motif PXQXT254 at amino acid position 250 to 254 reduced the binding of all 5 TRAFs test to background levels (1-254EA in fig. 3B). The
15 assay also demonstrates that the C-terminus of CD40 (aa256 to aa277) is critical for the binding of all 5 TRAFs recruited by CD40 (1-255 in fig. 3B). Furthermore it is shown that two TRAFs may influence each others recruitment. For example, the binding of TRAF6 was increased whenever a mutation was inserted in CD40 that lowered the binding of TRAF2 (for example T254A, QE263AA or QE274AA in fig. 3B). Disabling of TRAF6
20 recruitment by the E235A mutation also led to reduced recruitment of TRAF3 and TRAF5 (figure 3B). An interesting side aspect came up when the CD40 mutant 1-245EA (in fig. 3B) was tested for TRAF binding. Despite the presence of the consensus binding motif PXQE²⁵¹ for TRAF2 [as determined by crystallography (Ye et al. 1999)] in 1-254EA, this CD40 mutant did not bind TRAF2. This demonstrates that the sequence context in which
25 the TRAF2 binding motif is situated also determines whether or not a given TRAF will be recruited.

The assay described here is clearly superior to previously used methods that detect the recruitment of TRAFs to CD40. Due to the use of the intact receptor in its natural membrane environment the sensitivity of this assay is clearly better than that of previously
30 described methods (Rothe et al 1994, Hu et al. 1994, Boldin et al 1995, Stanger et al. 1995, Chinmayaan et al. 1995, Cheng et al. 1995 Mosialos et al., 1995, Ishida et al. a 1996, Ishida et al. b 1996, Boucher et al. 1997, Pullen et al. 1998 and Pullen et al. 1999). Thus it is possible to detect CD40-TRAF interactions which could not be monitored before such as the binding of TRAF2 to the T254A mutant (Hu et al. 1994, Boucher et al. 1997, Pullen et
35 al. 1999, Cheng et al. 1996, Hanissian et al. 1997) or the effect of the sequence

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

environment on the consensus sequence for TRAF2 binding as determined in crystallization studies (Ye et al. 1999, McWhirter et al. 1999 and Park et al. 1999). The assay allows a more precise determination of the structural requirements that determine TRAF binding to CD40 as for example the necessity of the intact CD40 C-terminus.

5 Furthermore it was possible to demonstrate how different TRAFs affect each others binding. In view of these findings it is expected that the described assay method will contribute greatly to the understanding of the interaction between a cytokine receptor and intracellular signalling molecules. This knowledge will be essential for the rational development of drugs that act on the level of signalosome assembly.

10

Example 5:Recruitment of various TRAFs to different receptors.

Recruitment of various TRAFs to receptors different to CD40, was tested by the recruitment assay described in example 1 by transforming cells with expression plasmids encoding hybrids receptors comprising the extracellular domain of CD40 and transmembrane and intracellular domain of anyone of the following receptors: BCMA (Madry et al. 1998 and Hatzoglou et al. 2000) the LT β R-receptor (Mosialos et al. 1995, Crowe et al. 1994, Nakano et al. 1996), TACI (von Bulow et al. 1997, Xia et al. 2000) the p75TNFR (Rothe et al. 1994) and the CD27 (Gravestain et al. 1998, Akiba et al. 1998) (for details of constructs see example 7). Measurement of TRAF recruitment to the signalling domains of BCMA the LT β R-receptor TACI the p75TNFR or the CD27 was carried out by co-transfecting 293T cells with a plasmid encoding anyone of the above hybrid receptors together with a plasmid encoding TRAF and measurement of the TRAF/Receptor complex using the ELISA sandwich described in example 1 and the quantitation as described in example 3. The assay with the hybrid receptors is schematically represented in Figure 4A.

15

20

25

30

The results shown in Figure 4B indicate that, using the assay monitoring recruitment in intact cells, any TRAF recruiting receptor of the TNF/NGF family can be examined with the same antibody sandwich assay described in example 1 and the amount of TRAF-receptor/CD40 hybrid complex can be monitored as described in example 3. The results show that recruitment of TRAF1 to LT β R and p75TNFR is 25-folds higher than its recruitment to CD40, and that recruitment of TRAF2 to LT β R and p75TNFR is about 60-folds higher than its recruitment to CD40. Recruitment of TRAF3 to all the receptors tested is similar. TRAF5 is exceptionally highly recruited to LT β R, the recruitment to this

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

receptor being about 152 folds higher than recruitment to the CD40 receptor. TRAF6 is recruited to BCMA, TACI and p75TNFR, about 10 fold higher than its recruitment to the CD40 receptor .

As seen in this example the assay described here allows for the first time the direct comparison of several receptors with respect to their binding characteristics for a given set of signal molecules. This will make it possible to draw conclusions as to the biological functions of a given TRAF receptor combination. The results obtained demonstrate again the feasibility of the recruitment assay for monitoring TRAF recruitment to any receptor.

10 Example 6:

Recruitment of NIK to CD40.

The assay described in example 1 can be used to measure recruitment of signal proteins, e.g. NIK (a downstream mediator in the NF- κ B pathway Malinin et al. 1997) to a cytokine receptor, e.g. CD40 via an adaptor protein e.g. TRAF2. Expression plasmids encoding CD40, TRAF2, NIK (in pcDNA3.1) and myc-tagged IKK α were co-transfected into 293T (at a ratio of 1:1.75:1.75:1.75 respectively). Empty vector was used to equalize the amount of transfected DNA. The transfection was done as described for example 1. Twenty seven hours later the cells were extracted as described in example 1. The lysates were incubated with ELISA plates coated with an anti CD40 mAb (R01, Schwabe et al. 1997). After two hours the plates were washed with PBS/tween and developed with a commercially available rabbit anti NIK antibody (Santa Cruz at 1:100 dilution, SC-6363) and HRP-labeled goat anti rabbit Ig antibody (Pharmingen). The recruitment assay for NIK is schematically represented in Figure 5A. As shown in figures 5B and C, the recruitment of NIK to CD40 was TRAF2 dependent and clearly improved when IKK was co-expressed.

The results indicate that in addition to adaptor proteins, recruitment of other signalosome components such as NIK to the intracellular domain of the CD40 domain can be measured.

30

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

Example 7:cDNA cloning, generation of CD40 mutants and expression constructs.

The human CD40 cDNA was cloned as described by Hess et al. (1995). CD40 cDNA was inserted in pEF-BOS (plasmid size 6164 bp).

- 5 The human TRAF2 cDNA was cloned as described by Mullinax et al. (1996). All other human TRAF cDNAs were cloned by RT-PCR using the published sequence information .

For expression of TRAF1, TRAF2 and TRAF3 the respective cDNAs were inserted in pcDNA3 (plasmid sizes are 6881, 7014 and 7700 bp for plasmids encoding TRAF1, TRAF2 and TRAF3 respectively) (Figure 6). DTRAF5 and dTRAF6 were expressed in
10 pcDNA3.1His (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and the plasmid size obtained were 6776 and 6199 bp for plasmids encoding dTRAF5 and dTRAF6 respectively. PcDNA3.1His vector codes for peptide tags enabling the detection with anti-His-tag or antiXpress antibodies (Figure 7).

The cDNA fragments coding for deletion mutants of TRAF5 (dTRAF5) and TRAF6
15 (dTRAF6) were generated by enzymatic DNA restriction. Thus the NcoI to XhoI fragment coding for amino acids 145 to 557 of TRAF5 and XmnI to XhoI fragments coding for amino acids 300 to 524 of TRAF6 were used (Fig. 8).

CD40 mutants were generated with the QuickChange™ Site directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Netherlands) according to the manufacturer's induction. For expression all the
20 CD40 constructs were inserted in the Xba-1 site of pEF-BOS (Mizushima et al. 1990) and confirmed by sequencing (Figure 8).

To generate the CD40 receptor hybrids the pEF-BOS variant pEGFP-BOS AS MCS was used (Figure 9). This plasmid was generated by inserting the NheI-XbaI fragment obtained
25 from the commercially available pEGFP-N1 plasmid (Clontech) in anti sense direction between the two XbaI sites in pEF-BOS. The fragment contained coding sequence for green fluorescent protein and the indicated restriction sites SalI and KpnI. PCR directed mutagenesis was used to create the unique MluI site at the extracellular to cytoplasmic domain border of the CD40 cDNA. This resulted also in the indicated mutation of aspartic
30 (D) in position 190 to glutamic acid. Subsequently cDNA fragments encoding for the transmembrane and cytoplasmic domains of the LTβR, TACI, the p75TNF receptor, CD27

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

(all via SalI/MluI) and of BCMA (via KpnI/MluI) were generated by PCR and inserted into pEGFP-BOS AS MCS together with the XbaI/MluI fragment encoding the CD40 extracellular domain (ECD). The indicated restriction sites in the cDNA fragments encoding the indicated receptor domains were generated by PCR directed mutagenesis and under the strict consideration that encoded amino acid sequence was identical to the corresponding wild type receptor. All constructs were reconfirmed by sequencing before use.

Example 8:10 Preparation and screen of non peptide small molecules inhibiting signalosome formation

A library of small non peptide molecules are prepared by combinatorial chemistry. The design of combinatorial chemistry technology is well known in the art and is described e.g by Hemkens et al. (1996). Cells overexpressing CD40 and TRAF2 are exposed to individual synthetic organic compounds and recruitment is tested as described in example 1 and quantified as in example 3.

Compounds able to inhibit recruitment or signalosome formation are selected for future testing.

20

25

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

REFERENCES

- Arch et al. 1998 *Genes Dev.* 12, 2821-2830.
- Baud et al. 1999 *Genes Dev.* 13, 1297-1308.
- 5 Baeurle et al. 1994 *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141-179.
- Boldin MP et al. 1995 *J Biol Chem* Apr 7; 270(14): 7795-8
- Boucher, L. M et al. 1997 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233 :592.
- Brodeur et al. 1997 *J. Biol. Chem.* 272, 19777-19784.
- Cheng, et al. 1995 *Science* 267 :1494
- 10 Cheng et al. 1996 *Genes Dev.* 10, 963-973.
- Chinnaiyan, et al. 1995. *Cell* 81 : 505.
- Clark et al. 1996 *Adv. Immunol.* 63, 43-78.
- Darnay et al. 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 7724-7731.
- Devergne et al. 1996 *Mol. Cell Biol.* 16, 7098-7108.
- 15 DuBridg e et al. 1987 *Mol. Cell. Biol.* 7:379.
- Eliopoulos et al. 1997 *Oncogene* 14, 2899-2916.
- Engelmann H et al. 1990. *J. Biol Chem* Jan 25;265(3):1531-6.
- Engelmann H et al. 1990 *J. Biol. Chem.* 265, p. 14497-504.
- Fields, S., and O. Song. 1989 *Nature* 340:245.
- 20 Foy et al. 1996 *Annu. Rev. Immunol.* 14, 591-617.
- Gedrich et al. 1996 *J. Pathol.* 152, 1549-1561.
- Ghosh et al. 1998 *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225-663.
- Grewal et al. 1998 *Annu. Re. Immunol.* 16, 111-135.
- Hanissian et al. 1997 *Immunobiology* 178, 275-284.
- 25 Hu et al. 1994 *J. Biol. Chem.* 269 .30069.
- Inoue et al. 2000 *Exp. Cell Res.* 254, 14-24.

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

- Ishida, et al. a 1996. *Biol. Chem.* 271:28745.
- Ishida, et al. b 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:9437.
- Karin et al. 1997 *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 240-246.
- Krajewska, et al. 1998. *Am. J. Pathol.* 152:1549-1561
- 5 Leo et al. 1999 *J. Biol. Chem.* 274, 22414-22422.
- Liu et al. 1996 *Cell* 87, 565-576.
- Lomaga et al. 1999 *Genes Dev.* 13, 1015-1024.
- Malinin et al. 1997 *Nature* 385, 540-544.
- Mizushima et al. 1990 *Nucleic Acids Res.* 18, 5322.
- 10 Naito et al. 1999 *Genes Cells* 4, 353-362.
- Nakano et al. 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9803-9808.
- McWhirter et al. 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8408-8413.
- Mosialos, G et al.. 1995 *Cell* 80:389.
- Nguyen et al. 1999 *Immunity* 5, 407-415.
- 15 Ni et al. 2000 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 10395-10399.
- Park et al. 1999 *Nature* 398, 533-538.
- Pullen, S. S et al. 1998. *Biochemistry* 37:11836.
- Pullen, S. S. at al. 1999 *J. Biol. Chem.* 274:14246.
- Ramesh et al. 1994 *Immunol. Re.* 138, 87-104.
- 20 Rothe et al. . 1994. *Cell* 78:681.
- Rothe et al. 1995 *Cell* 83, 1243-1252.
- Sandberg et al. 1997 *J. Virol.* 71, 4649-4656.
- Schonbeck et al. 2001 *Cell Mol. Life Sci.* 58, 4-43.
- Shiels et al. 2000 *Am. J. Pathol.* 157, 679-688.
- 25 Song et al. 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9792-9796.
- Stanger, et al. 1995 *Cell* 81:513

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

Takeuchi et al. 1996 *J. Biol Chem* 271, 19935-19942.

Tsukamoto et al. 1999 *Proc. Natl. Sci. U.S.A.* 96, 1234-1239.

Wallach, D et al. 1999 *Annu Rev Immunol.* 17,331-67.

Xu et al. 1996 *Immunity* 5, 407-415.

5 Ye et al. 1999 *Mol. Cell* 4, 321-330.

Yeh et al. 1997 *Biochemistry* 38, 10168-10177.

10

15

20

25

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

CLAIMS:

1. A method for monitoring binding of a protein to the intracellular domain of a receptor in a cell comprising:
 - a) inducing signalosome formation in cells,
 - 5 b) lysing the cells,
 - c) incubating the cell lysate on a solid phase coated with a first antibody capable of capturing the receptor within the signalosome,
 - d) separating the solid phase from the cell lysate, and
 - e) detecting and measuring the amount of the protein bound to the solid phase
- 10 using a second antibody capable of detecting the protein.
2. A method according to claim 1, wherein signalosome formation is induced by receptor overexpression.
3. A method according to claim 1, wherein signalosome formation is induced by
- 15 receptor activation.
4. A method according to claim 3, wherein receptor activation is induced by treating the cell with a ligand to the receptor.
5. A method according to claim 4, wherein receptor activation is induced by receptor cross-linking.
6. A method according to claim 5, wherein cross-linking is induced by a receptor
- 20 specific antibody.
7. A method according to anyone of claims 1 to 6, wherein the receptor is selected from CD40, BCMA, LT β R-receptor, TACI, p75TNFR and CD27.
8. A method according to anyone of claims 1 to 7, wherein the protein bound to the solid phase is an adaptor protein selected from TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4,
- 25 TRAF5 and TRAF6.
9. A method according to anyone of claims 1 to 7, wherein the protein bound to the solid phase is an enzyme.
10. A method according to claim 9, wherein the enzyme is a kinase.
11. A method according to claim 10, wherein the kinase is NIK.

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

12. A method according to anyone of claims 1 to 10, wherein the protein bound to the solid phase is IKK.
13. A method according to anyone of claims 1 to 12, wherein the receptor is fused to a polypeptide or peptide at its extracellular domain and wherein the first antibody is specific for such fused polypeptide or peptide.
- 5 14. A method according to claim 13, wherein the fused peptide is a specific Tag and wherein the first antibody is specific for such a tag.
15. A method according to claim 13, wherein the polypeptide is the extracellular domain of a receptor and wherein the first antibody is specific for such extracellular domain.
- 10 16. A method according to claim 15, wherein the fused polypeptide is the extracellular domain of CD40.
17. A method according to anyone of claims 1 to 16, wherein the protein bound to the solid phase is fused to a tag and wherein the second antibody is specific for such a tag.
- 15 18. A method according to claim 17, wherein the tag is selected from histidine, FLAG, VSV-G, Protein-C and c-myc tags.
19. A method for screening for molecules which inhibit the binding of an adaptor protein and/or signaling protein to an intracellular domain of a receptor in a cell comprising:
- 20 exposing the cells to individual molecules, monitoring binding of a protein to the intracellular domain of a receptor with a method according to anyone of claims 1-18 and selecting a molecule capable of inhibiting the binding of the adaptor and /or signalling protein to the receptor.
- 25 20. A method according to claim 19, wherein the screened molecules are synthetic organic compounds.
21. A molecule selected according to the method of claims 19 and 20.

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

22. A method for screening for molecules, that inhibit signalosome assembly in a cell comprising:
- a) inducing signalosome formation in a cell.
 - b) exposing the cells to individual generated molecules,
 - 5 c) lysing the cell,
 - d) incubating the cell lysate on a solid phase coated with a first antibody capable of capturing the receptor within the signalosome,
 - e) separating the solid phase from the cell lysate,
 - f) detecting and measuring the amount of signalosome formed using a
10 second antibody capable of detecting anyone of the signalosome components except the receptor, and
 - g) selecting a molecule capable of inhibiting signalosome formation.
23. A method according to claim 22, wherein signalosome formation is induced by overexpression of several or all of the signalosome components.
- 15 24. A method according to claim 22, wherein signalosome formation is induced by receptor activation.
25. A method according claim 24, wherein receptor activation is induced by treatment of the cell with the ligand to the receptor.
26. A method according to claim 24, wherein receptor activation is induced by
20 receptor cross-linking.
27. A method according to claim 26, wherein cross-linking is induced by a receptor specific antibody.
28. A method according to anyone of claims 22 to 27, wherein the receptor within the signalosome is selected from CD40, BCMA, LT β R-receptor, TACI, p75TNFR and
25 CD27.
29. A method according to anyone of claims 22 to 28, wherein the signalosome component measured, which is different from the receptor, is an adaptor protein selected from TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5, TRAF6.

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

30. A method according to anyone of claims 22 to 29, wherein the component monitored in the signalosome which is different from the receptor is an enzyme.
31. A method according to claim 30, wherein the enzyme is a kinase.
- 5 32. A method according to claim 31, wherein the kinase is NIK.
33. A method according to of claims 22 to 31, wherein the signalosome component measured, which is different from the receptor, is IKK.
34. A method according to anyone of claims 22 to 33, wherein the receptor within the signalosome is fused to a peptide or polypeptide at its extracellular domain and
10 wherein the first antibody is specific for such fused peptide or polypeptide.
35. A method according to claim 34, wherein the polypeptide is a specific Tag.
36. A method according to claim 34, wherein the fused polypeptide is the extracellular domain of a receptor.
37. A method according to claim 36, wherein the fused polypeptide is the
15 extracellular domain of CD40.
38. A method according to anyone of claims 22 to 37, wherein the signalosome component measured, which is different from the receptor, is fused to a tag and wherein the second antibody is specific to such a tag.
39. A method according to claim 38, wherein the tag is selected from histidine,
20 FLAG, VSV-G, Protein-C and c-myc tags.
40. A method according to anyone of claims 22 to 39, wherein the screened molecule is a synthetic organic compound.
41. A molecule selected according to a method according to anyone of claims 22-40.

25

WO 03/034073

PCT/IL02/00828

42. A kit for measuring and quantitating binding of an adaptor and/or signaling protein to a specific membrane protein in a cell comprising:
- 5 a) two expression plasmids, one for overexpressing the membrane protein fused to a first tag or polypeptide, and the other plasmid for expressing of an adaptor/signalling protein fused to a second tag.
- b) ELISA microtiter plates coated with a first antibody capable of binding the first tag or polypeptide fused to the membrane protein,
- 10 c) a second antibody capable of binding a second tag fused to the adaptor/signalling protein.
- d) Transfection reagents
- e) Lysis buffer
- e) a protocol describing concentration of vectors in the transfection reaction, and concentration of antibodies in the ELISA and way of quantitation.
- 15 43. A kit according to claim 42, wherein the tag is selected from histidine, FLAG, VSV-G, Protein-C and c-myc tags.
44. A kit according to claim 42, wherein the fused polypeptide is the extracellular domain of the CD40 receptor.
45. A method for screening for molecules which inhibit the binding of an adaptor protein and/or signaling protein to an intracellular domain of a receptor in a cell
- 20 comprising:
- monitoring binding of a protein to the intracellular domain of a receptor using a kit according to anyone of claims 42 or 43 in transfected cells exposed to individual molecules and selecting a molecule capable of inhibiting the binding of the adaptor and /or signalling protein to the receptor.
- 25 46. A method according to claim 45, wherein the screened molecule is a synthetic organic compound.
47. A selected molecule according to the method of claims 45 or 46.

Figure 1A

Figure 1B

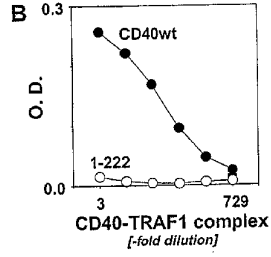
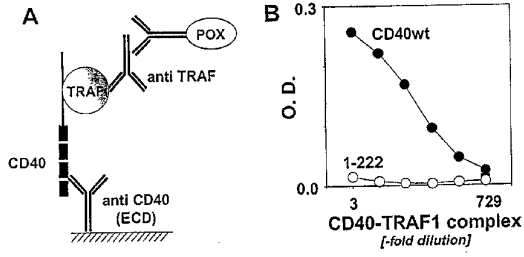


Figure 2A

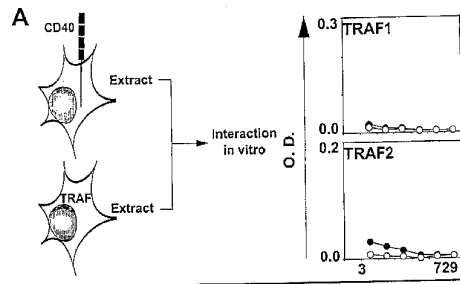
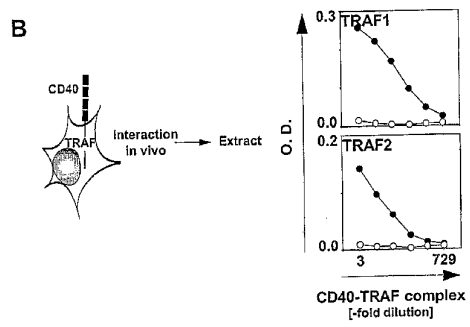


Figure 2B



WO 03/034073

3/9

PCT/IL02/00828

Figure 3A

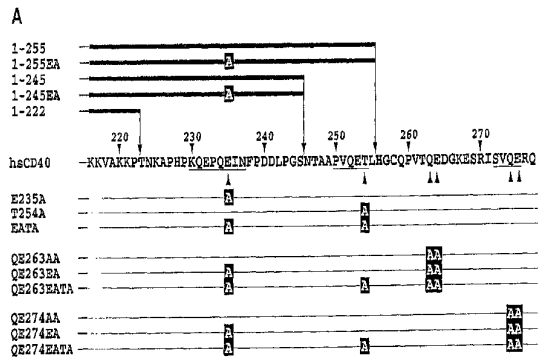


Figure 3B

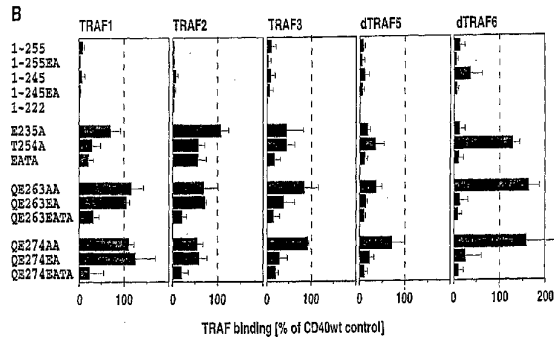


Figure 4A

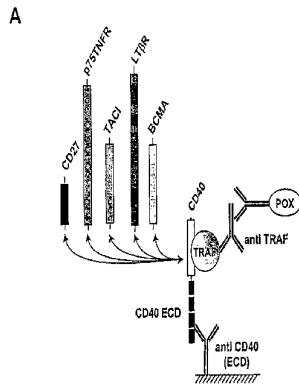
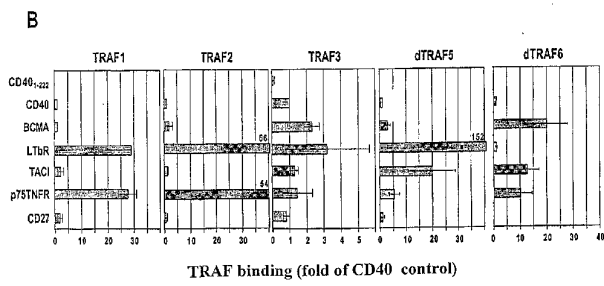


Figure 4B



WO 03/034073

5/9

PCT/IL02/00828

Figure 5

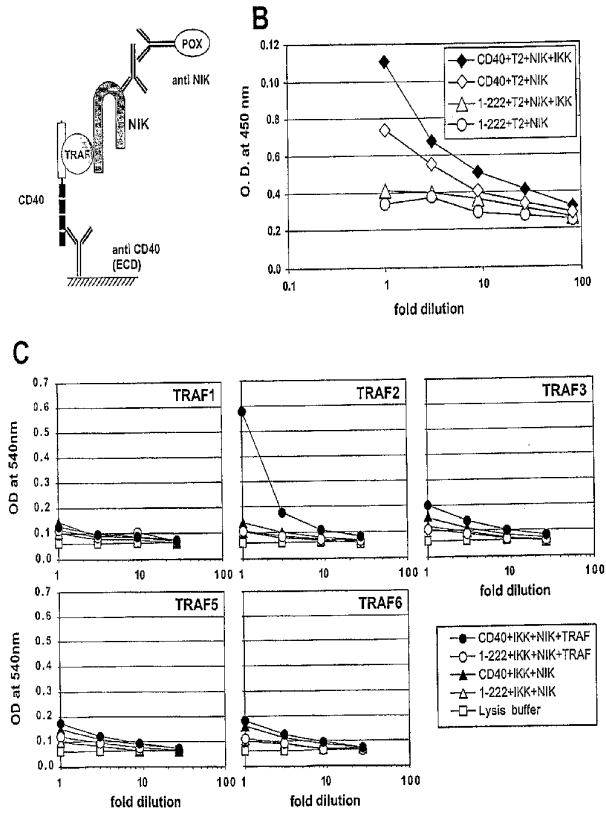
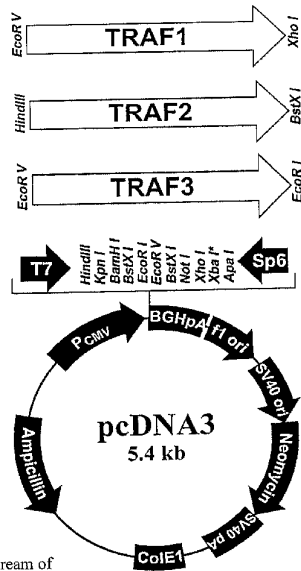


Figure 6



* There is an ATG upstream of the Xba site.

Figure 8

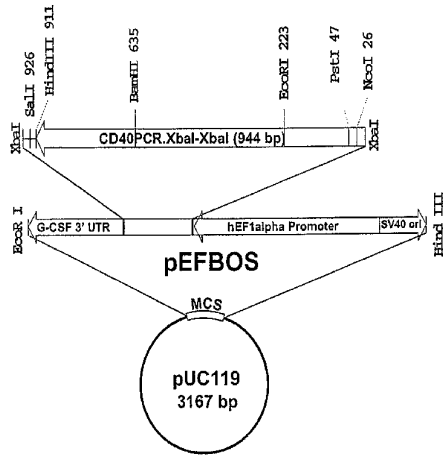
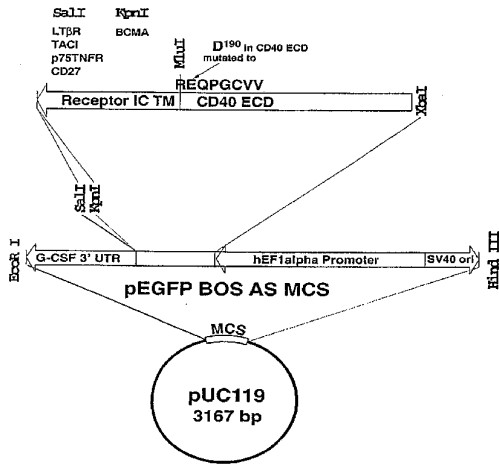


Figure 9



WO 03/034073

PCT/IL02/00828

519.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Ares Trading S.A
Engelmann, Hartmut

<120> METHOD AND KIT FOR MONITORING RECRUITMENT OF PROTEINS TO THE
INTRACELLULAR DOMAINS TO A RECEPTOR IN INTACT CELLS

<130> 519

<150> 145918

<151> 2001-10-14

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 62

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr Asn Lys Ala Pro His Pro Lys Gln
1 5 10 15
Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro Asp Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr
20 25 30
Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln
35 40 45
Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser Val Gln Glu Arg Gln
50 55 60

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization International Bureau



(43) International Publication Date 24 April 2003 (24.04.2003)

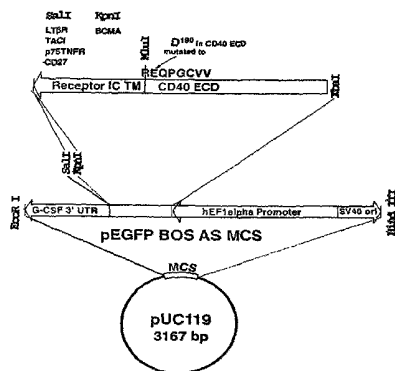
PCT

(10) International Publication Number WO 2003/034073 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68, Hartmut [DE/DE], Joseph-Lutz-Weg 35, 8000 Minchen 70 (DE).
- (21) International Application Number: PCT/IL2002/000828 (74) Agent: EINAV, Henry; Interpharm Laboratories Ltd., Science-based Industrial Park, Kiryat Weitzmann, Ness Ziona, 76110 Ness Ziona (IL).
- (22) International Filing Date: 14 October 2002 (14.10.2002) (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 145918 14 October 2001 (14.10.2001) IL (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): ARES TRADING S.A [CH/CH]; Le Château de Vaumarcus, CH-2028 Vaumarcus (CH).
- (71) Applicant (for OM only): EINAV, Henry [IL/IL]; Herzl St. 43, 43353 Raanana (IL).
- (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): ENGELMANN, — with international search report

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD AND KIT FOR MONITORING RECRUITMENT OF PROTEINS TO THE INTRACELLULAR DOMAIN OF A RECEPTOR IN INTACT CELLS



(57) Abstract: The present invention relates to an immunological method and kit for monitoring recruitment of a protein to the intracellular domain of a receptor in intact cells.

WO 2003/034073 A3

WO 2003/034073 A3



— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(88) Date of publication of the International search report:
17 June 2004

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IL 02/00828
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/68 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 G01N		
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		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIESER ARND ET AL: "LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 18, no. 9, 4 May 1999 (1999-05-04), pages 2511-2521, XP002260161 ISSN: 0261-4189 page 2519 -- -- -/-	1-20, 22-40, 42-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input 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 (see 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		*1* 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 *2* 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 *3* 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 *4* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 4 November 2003	Date of mailing of the international search report 14.05.04	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 940-3040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 940-3016	Authorized officer Cuendet, P	

Form PCT/ISA210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/IL 02/00828
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GIRES OLIVIER ET AL: "Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 18, no. 11, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 3064-3073, XP002260162 ISSN: 0261-4189 page 3071, right-hand column, last paragraph -page 3072, left-hand column, paragraph FIRST	1-18, 42-44
X	ELIOPOULOS ARISTIDES G ET AL: "Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates the JNK pathway through its extreme C terminus via a mechanism involving TRADD and TRAF2" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 73, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 1023-1035, XP002260163 ISSN: 0022-538X page 1024, last paragraph -page 1025, paragraph 1	1-18, 42-44
P, X	SCHULTHEISS UTE ET AL: "TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1" EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 20, no. 20, 15 October 2001 (2001-10-15), pages 5678-5691, XP002260164 ISSN: 0261-4189 page 5683 page 5688 -page 5689	1-20, 22-40, 42-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/IL 02/00828
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. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 21, 41, 47 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. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input checked="" type="checkbox"/>	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.: 1-20, 22-40, 42-46
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. Claims: 1-20,22-40,42-46
recruitment of an adaptor protein.
2. Claims: 1-20,22-40,42-46
monitoring the binding of "signaling molecules".

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 21,41,47

Present claims 21,41,47 relate to a product defined by reference to a desirable characteristic or property, namely "selected according to the method...". These claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has not been carried out for these claims 21,41 and 47.

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.

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 N 15/00 C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 エンゲルマン、ハルトムート

ドイツ連邦共和国、8 5 5 7 9 ノイビベルク、レ-メルフェルト 2

Fターム(参考) 2G045 BB10 BB50 BB51 CB01 FB03
 4B024 AA11 CA04 CA07 DA02 EA02 EA04 HA11
 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ13 QQ27 QR33 QR57 QR59 QR77 QR80
 QS05 QS11 QS36 QX02

专利名称(译)	用于观察蛋白质募集到完整细胞中受体的细胞内结构域的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2005507493A	公开(公告)日	2005-03-17
申请号	JP2003536756	申请日	2002-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	阿雷斯贸易股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	战神贸易兴业ANONYME		
[标]发明人	エンゲルマンハルトムート		
发明人	エンゲルマン、ハルトムート		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6872		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D C12Q1/02 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BB10 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/FB03 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ27 4B063/QR33 4B063/QR57 4B063/QR59 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS05 4B063/QS11 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	秋山文雄 田村良介 屋岛浩二		
优先权	145918 2001-10-14 IL		
其他公开文献	JP4458847B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及免疫学方法和试剂盒，用于观察蛋白质募集到完整细胞中受体的细胞内结构域中。

