

(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2010-529127

(P2010-529127A)

(43) 公表日 平成22年8月26日 (2010. 8. 26)

|                                      |                     |             |
|--------------------------------------|---------------------|-------------|
| (51) Int. Cl.                        | F I                 | テーマコード (参考) |
| <b>C 0 7 K 14/47 (2006. 01)</b>      | C O 7 K 14/47 Z N A | 4 B O 6 5   |
| <b>A 6 1 P 43/00 (2006. 01)</b>      | A 6 1 P 43/00 1 1 1 | 4 C O 8 4   |
| <b>A 6 1 P 35/00 (2006. 01)</b>      | A 6 1 P 35/00       | 4 C O 8 5   |
| <b>A 6 1 P 27/02 (2006. 01)</b>      | A 6 1 P 27/02       | 4 H O 4 5   |
| <b>A 6 1 P 9/10 (2006. 01)</b>       | A 6 1 P 9/10        |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 167 頁) 最終頁に続く |                     |             |

|               |                              |          |                     |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2010-511197 (P2010-511197) | (71) 出願人 | 503469393           |
| (86) (22) 出願日 | 平成20年6月5日 (2008. 6. 5)       |          | イエール ユニバーシティ        |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成22年2月1日 (2010. 2. 1)       |          | アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2008/007104            |          | ヘブン トゥ ホイットニー アベニュー |
| (87) 国際公開番号   | W02008/153926                |          | ー                   |
| (87) 国際公開日    | 平成20年12月18日 (2008. 12. 18)   | (74) 代理人 | 100102978           |
| (31) 優先権主張番号  | 60/933, 238                  |          | 弁理士 清水 初志           |
| (32) 優先日      | 平成19年6月5日 (2007. 6. 5)       | (74) 代理人 | 100102118           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 春名 雅夫           |
| (31) 優先権主張番号  | 61/009, 482                  | (74) 代理人 | 100160923           |
| (32) 優先日      | 平成19年12月28日 (2007. 12. 28)   |          | 弁理士 山口 裕孝           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      | (74) 代理人 | 100119507           |
| (31) 優先権主張番号  | 61/070, 506                  |          | 弁理士 刑部 俊            |
| (32) 優先日      | 平成20年3月24日 (2008. 3. 24)     | (74) 代理人 | 100142929           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 井上 隆一           |
|               |                              | 最終頁に続く   |                     |

(54) 【発明の名称】 受容体型チロシンキナーゼの阻害物質およびその使用方法

## (57) 【要約】

本発明は、ヒト受容体型チロシンキナーゼ、例えば、ヒトKit RTKもしくはPDGFR RTKのIg様ドメイン、例えば、D4もしくはD5、またはV型受容体型チロシンキナーゼのD7ドメインに結合する部分を提供し、この部分は受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留め、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性に拮抗する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ヒト受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインに結合する部分 (moiety) であって、該受容体型チロシンキナーゼの該外部ドメインを不活性状態に留め、それによって、該受容体型チロシンキナーゼの活性に拮抗する部分。

## 【請求項2】

ヒト受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合する、請求項1記載の部分。

## 【請求項3】

Ig様ドメインが受容体型チロシンキナーゼに対するリガンドの結合に関与しない、請求項2記載の部分。

## 【請求項4】

Ig様ドメインが受容体型チロシンキナーゼに対するリガンドの結合に関与する、請求項2記載の部分。

## 【請求項5】

受容体型チロシンキナーゼと該受容体型チロシンキナーゼのリガンドの相互作用を妨げない、請求項1記載の部分。

## 【請求項6】

受容体型チロシンキナーゼと該受容体型チロシンキナーゼのリガンドの相互作用を妨げる、請求項1記載の部分。

## 【請求項7】

受容体型チロシンキナーゼの二量体化を妨害しない、請求項1記載の部分。

## 【請求項8】

受容体型チロシンキナーゼの二量体化を妨害する、請求項1記載の部分。

## 【請求項9】

受容体型チロシンキナーゼの各プロトマーに由来する外部ドメインの膜近位領域間の相互作用を妨害する、請求項1記載の部分。

## 【請求項10】

相互作用が同型である、請求項9記載の部分。

## 【請求項11】

相互作用が異型である、請求項9記載の部分。

## 【請求項12】

外部ドメインの膜近位領域が、III型受容体型チロシンキナーゼのD4ドメイン、III型受容体型チロシンキナーゼのD5ドメイン、III型受容体型チロシンキナーゼのD3-D4ヒンジ領域、III型受容体型チロシンキナーゼのD4-D5ヒンジ領域、V型受容体型チロシンキナーゼのD6-D7ヒンジ領域、およびV型受容体型チロシンキナーゼのD7ドメインからなる群より選択される、請求項9記載の部分。

## 【請求項13】

受容体型チロシンキナーゼの各プロトマーに由来する外部ドメインの膜近位領域を、20 Åを超える距離だけ離れさせる、請求項9記載の部分。

## 【請求項14】

受容体型チロシンキナーゼがIII型受容体型チロシンキナーゼである、請求項1記載の部分。

## 【請求項15】

III型受容体型チロシンキナーゼが、Kit、PDGFR  $\alpha$ 、PDGFR  $\beta$ 、CSF1R、およびFlk2からなる群より選択される、請求項14記載の部分。

## 【請求項16】

Ig様ドメインがIII型受容体型チロシンキナーゼのD4ドメインである、請求項2記載の部分。

## 【請求項17】

D4相互作用部位の次のコンセンサス配列：

10

20

30

40

50

**LX<sub>1</sub>RX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>G**

に結合する部分であって、

配列中、Lがロイシンであり、Rがアルギニンであり、Gがグリシンであり;X<sub>1</sub>が、トレオニン、イソロイシン、バリン、プロリン、アスパラギン、またはリジンからなる群より選択され;X<sub>2</sub>が、ロイシン、バリン、アラニン、およびメチオニンからなる群より選択され;X<sub>3</sub>が、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、およびアルギニンからなる群より選択され;X<sub>4</sub>が、グリシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、プロリン、およびメチオニンからなる群より選択され;X<sub>5</sub>が、トレオニン、セリン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、およびアスパラギン酸からなる群より選択され;X<sub>6</sub>が、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびグルタミンからなる群より選択され;かつ、X<sub>7</sub>が、グリシン、セリン、アラニン、リジン、アルギニン、グルタミン、およびトレオニンからなる群より選択される、請求項16記載の部分。 10

**【請求項18】**

Ig様ドメインがIII型受容体型チロシンキナーゼのD5ドメインである、請求項2記載の部分。

**【請求項19】**

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基309~413番に結合する、請求項14記載の部分。

**【請求項20】**

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基410~519番に結合する、請求項14記載の部分。

**【請求項21】**

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Gluに結合する、請求項14記載の部分。

**【請求項22】**

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基<sup>418</sup>Tyrおよび<sup>505</sup>Asnに結合する、請求項14記載の部分。

**【請求項23】**

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体の変異D5ドメインに結合し、該変異D5ドメインが、Thr417、Tyr418、Asp419、Leu421、Arg420、Tyr503、およびAla502からなる群より選択されるアミノ酸残基に点変異を含む、請求項14記載の部分。 30

**【請求項24】**

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される1個または複数個のアミノ酸残基に結合する、請求項14記載の部分。

**【請求項25】**

**K218, S220, Y221, L222, F340, P341, K342, N367, E368, S369, N370, I371, および Y373**

からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する、請求項24記載の部分。 40

**【請求項26】**

**Y350, R353, F355, K358, L379, T380, R381, L382, E386, および T390**

からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する、請求項24記載の部分。

**【請求項27】**

III型受容体型チロシンキナーゼがPDGFR α またはPDGFR β である、請求項14記載の部分。

## 【請求項 28】

III型受容体型チロシンキナーゼがPDGFR $\beta$ であり、ヒトPDGFR $\beta$ のアミノ酸残基<sup>385</sup>Argおよび<sup>390</sup>Gluに結合する、請求項27記載の部分。

## 【請求項 29】

受容体型チロシンキナーゼ上の立体構造エピトープに結合する、請求項1記載の部分。

## 【請求項 30】

III型受容体型チロシンキナーゼ上の立体構造エピトープに結合する、請求項14記載の部分。

## 【請求項 31】

立体構造エピトープが、受容体型チロシンキナーゼのD4ドメインおよび/またはD5ドメイン中の2個以上の残基から構成される、請求項30記載の部分。

10

## 【請求項 32】

立体構造エピトープが、受容体型チロシンキナーゼのD2-D3ヒンジ領域、D3-D4ヒンジ領域、および/またはD4-D5ヒンジ領域中の2個以上の残基から構成される、請求項30記載の部分。

## 【請求項 33】

立体構造エピトープが、

**E33, P34, D72, E76,  
N77, K78, Q79, K158, D159, N250, S251, Q252, T253, K254, L255, N260, W262,  
H264, G265, E344, N352, R353, F355, T356, D357, Y362, S365, E366, N367,  
N370, および G466**

20

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項30記載の部分。

## 【請求項 34】

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、立体構造エピトープが、表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される2個以上の残基から構成される、請求項30記載の部分。

## 【請求項 35】

立体構造エピトープが、Y125、H180、R181、K203、V204、R205、P206、V238、S239、S240、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

30

## 【請求項 36】

立体構造エピトープが、P206、F208、V238、およびS239からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 37】

立体構造エピトープが、K127、A207、F208、およびT295からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 38】

立体構造エピトープが、L222、A339、F340、K342、E368、S369、N370、I371、およびY373からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

40

## 【請求項 39】

立体構造エピトープが、L222、L223、E306、V308、F312、E338、F340、およびI371からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 40】

立体構造エピトープが、R224、V308、K310、G311、F340、P341、およびD398からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 41】

立体構造エピトープが、K218、A219、S220、N367、E368、およびS369からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

50

## 【請求項 4 2】

立体構造エピトープが、K218、A220、E368、およびS369からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 4 3】

立体構造エピトープが、G384、T385、T411、K412、E414、およびK471からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 4 4】

立体構造エピトープが、Y408、F433、G470、K471、およびL472からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 4 5】

立体構造エピトープが、F324、V325、N326、およびN410からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 4 6】

立体構造エピトープが、D327、N410、T411、K412、およびV497からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 4 7】

立体構造エピトープが、G384、G387、V409、およびK471からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 4 8】

立体構造エピトープが、L382、G387、V407、およびV409からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 4 9】

立体構造エピトープが、Y125、G126、H180、R181、K203、V204、R205、P206、F208、V238、S239、S240、S241、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 5 0】

立体構造エピトープが、P206、F208、V238、およびS239からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 5 1】

立体構造エピトープが、K218、S220、Y221、L222、F340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、およびY373からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 5 2】

立体構造エピトープが、G384、G387、G388、Y408、V409、T411、F433、F469、G470、およびK471からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 5 3】

立体構造エピトープが、D327、T411、K412、E414、A431、G432、およびK471からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 5 4】

立体構造エピトープが、Y350、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 5 5】

立体構造エピトープが、Y350、R353、およびF355からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項34記載の部分。

## 【請求項 5 6】

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、立体構造エピトープが、表5に挙げるペプチドより選択される2個以上のアミノ酸残基から構成される、請求項30記載の部分。

## 【請求項 5 7】

10

20

30

40

50

立体構造エピトープが、第1のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸残基および第2のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸から構成され、該第1のペプチドおよび該第2のペプチドが、表5に挙げるペプチドの群より選択される、請求項30記載の部分。

【請求項58】

第1のペプチドがAla219～Leu222であり、第2のペプチドがThr304～Val308である、請求項57記載の部分。

【請求項59】

第1のペプチドがAsp309～Gly311であり、第2のペプチドがArg224～Gly226である、請求項57記載の部分。

10

【請求項60】

第1のペプチドがThr303～Glu306であり、第2のペプチドがAla219～Leu222である、請求項57記載の部分。

【請求項61】

第1のペプチドがAsn367～Asn370であり、第2のペプチドがSer217～Tyr221である、請求項57記載の部分。

【請求項62】

第1のペプチドがAla339～Pro343であり、第2のペプチドがAsn396～Val399である、請求項57記載の部分。

【請求項63】

第1のペプチドがAla339～Pro343であり、第2のペプチドがGlu368～Arg372である、請求項57記載の部分。

20

【請求項64】

第1のペプチドがLys358～Tyr362であり、第2のペプチドがVal374～His378である、請求項57記載の部分。

【請求項65】

第1のペプチドがAsp357～Glu360であり、第2のペプチドがLeu377～Thr380である、請求項57記載の部分。

【請求項66】

第1のペプチドがMet351～Glu360であり、第2のペプチドがHis378～Thr389である、請求項57記載の部分。

30

【請求項67】

第1のペプチドがHis378～Thr389であり、第2のペプチドがVal323～Asp332である、請求項57記載の部分。

【請求項68】

第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがAla493～Thr500である、請求項57記載の部分。

【請求項69】

第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがAla431～Thr437である、請求項57記載の部分。

40

【請求項70】

第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがPhe469～Val473である、請求項57記載の部分。

【請求項71】

第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがVal325～Asn330である、請求項57記載の部分。

【請求項72】

第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがArg381～Gly387である、請求項57記載の部分。

【請求項73】

50

第1のペプチドがGly466～Leu472であり、第2のペプチドがGly384～Gly388である、請求項57記載の部分。

【請求項 7 4】

第1のペプチドがVal325～Glu329であり、第2のペプチドがTyr494～Lys499である、請求項57記載の部分。

【請求項 7 5】

第1のペプチドがThr411～Ile416であり、第2のペプチドがVal497～Ala502である、請求項57記載の部分。

【請求項 7 6】

第1のペプチドがIle415～Leu421であり、第2のペプチドがAla502～Ala507である、請求項57記載の部分。

【請求項 7 7】

第1のペプチドがAla502～Ala507であり、第2のペプチドがLys484～Thr488である、請求項57記載の部分。

【請求項 7 8】

第1のペプチドがAla502～Ala507であり、第2のペプチドがGly445～Cys450である、請求項57記載の部分。

【請求項 7 9】

受容体型チロシンキナーゼがVEGF受容体ファミリーのメンバーである、請求項1記載の部分。

【請求項 8 0】

VEGF受容体ファミリーのメンバーが、VEGFR-1(Flt1)、VEGFR-2(Flk1)、およびVEGFR-3(Flt4)からなる群より選択される、請求項79記載の部分。

【請求項 8 1】

VEGF受容体ファミリーのメンバーのD7ドメインに結合する、請求項79記載の部分。

【請求項 8 2】

VEGF受容体ファミリーのメンバーのD7ドメインの次のコンセンサス配列：

**IX<sub>1</sub>RVX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EDX<sub>4</sub>G (SEQ ID NO: 1)**

に結合する部分であって、

配列中、Iがイソロイシンであり、Rがアルギニンであり、Eがグルタミン酸であり、Dがアスパラギン酸であり、Gがグリシンであり；X<sub>1</sub>が、グルタミン酸、アルギニン、およびグルタミンからなる群より選択され；X<sub>2</sub>が、アルギニンおよびトレオニンからなる群より選択され；X<sub>3</sub>が、グルタミン酸およびリジンからなる群より選択され；かつ、X<sub>4</sub>が、グルタミン酸およびアラニンからなる群より選択される、請求項81記載の部分。

【請求項 8 3】

リガンドによって誘導される受容体型チロシンキナーゼのチロシン自己リン酸化を妨げる、請求項1記載の部分。

【請求項 8 4】

リガンドによって誘導される受容体型チロシンキナーゼの内在化を妨げる、請求項1記載の部分。

【請求項 8 5】

単離された抗体またはその抗原結合部である、請求項1記載の部分。

【請求項 8 6】

抗体またはその抗原結合部が、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、およびキメラ抗体からなる群より選択される、請求項85記載の部分。

【請求項 8 7】

抗体またはその抗原結合部が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、およびIgEの定常領域からなる群より選択される重鎖定常領域を含む、請求項86記載の部分。

10

20

30

40

50

## 【請求項 88】

抗体重鎖定常領域がIgG1である、請求項87記載の部分。

## 【請求項 89】

抗体またはその抗原結合部が、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、単鎖Fv断片、SMIP、アフィボディ、アビマー、ナノボディ、および単一ドメイン抗体からなる群より選択される、請求項85記載の部分。

## 【請求項 90】

抗体またはその抗原結合部が、 $1 \times 10^{-7}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $5 \times 10^{-8}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $1 \times 10^{-8}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $5 \times 10^{-9}$ Mまたはそれ未満からなる群より選択されるKDで受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合する、請求項85記載の部分。

10

## 【請求項 91】

請求項85～請求項90のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合部を産生するハイブリドーマ。

## 【請求項 92】

低分子である、請求項1記載の部分。

## 【請求項 93】

表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する、請求項92記載の部分。

## 【請求項 94】

K218、S220、Y221、L222、F340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、およびY373からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する、請求項92記載の部分。

20

## 【請求項 95】

Y350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する、請求項92記載の部分。

## 【請求項 96】

ペプチド分子である、請求項1記載の部分。

## 【請求項 97】

ペプチド分子が受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに基づいて設計される、請求項96記載の部分。

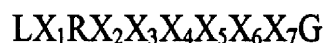
30

## 【請求項 98】

ペプチド分子がヒトKit受容体のD4ドメインに基づいて設計される、請求項97記載の部分。

## 【請求項 99】

ペプチド分子が次の構造：



を含む部分であって、

配列中、Lがロイシンであり、Rがアルギニンであり、Gがグリシンであり；X<sub>1</sub>が、トレオニン、イソロイシン、バリン、プロリン、アスパラギン、またはリジンからなる群より選択され；X<sub>2</sub>が、ロイシン、バリン、アラニン、およびメチオニンからなる群より選択され；X<sub>3</sub>が、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、およびアルギニンからなる群より選択され；X<sub>4</sub>が、グリシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、プロリン、およびメチオニンからなる群より選択され；X<sub>5</sub>が、トレオニン、セリン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、およびアスパラギン酸からなる群より選択され；X<sub>6</sub>が、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびグルタミンからなる群より選択され；かつ、X<sub>7</sub>が、グリシン、セリン、アラニン、リジン、アルギニン、グルタミン、およびトレオニンからなる群より選択される、請求項96記載の部分。

40

## 【請求項 100】

50

ペプチド分子が、ヒトKit受容体のアミノ酸残基309～413番に少なくとも80%同一である構造を含む、請求項98記載の部分。

【請求項101】

ペプチド分子がヒトKit受容体のD5ドメインに基づいて設計される、請求項97記載の部分。

【請求項102】

ペプチド分子が、ヒトKit受容体のアミノ酸残基410～519番に少なくとも80%同一である構造を含む、請求項101記載の部分。

【請求項103】

ペプチド分子が少なくとも1つのD-アミノ酸残基を含む、請求項96記載の部分。

10

【請求項104】

アドネクチンである、請求項1記載の部分。

【請求項105】

ヒトKit受容体のIg様ドメインまたはヒンジ領域上の立体構造エピトープに結合する部分であって、該部分が該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留めてそれにより該ヒトKit受容体の活性に拮抗し、かつ、該立体構造エピトープが表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される2個以上の残基から構成される、部分。

【請求項106】

ヒトKit受容体のアミノ酸残基309～413番および/または410～519番に結合し、それによって、該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗する、部分。

20

【請求項107】

請求項1～請求項90または請求項92～請求項106のいずれか一項記載の部分と薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物。

【請求項108】

請求項1～請求項90または請求項92～請求項106のいずれか一項記載の部分の有効量を対象に投与し、それによって疾患を治療または予防する段階を含む、対象において受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患を治療または予防する方法。

【請求項109】

受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患が、癌、加齢黄斑変性症(AMD)、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、および疼痛に関連した疾患からなる群より選択される、請求項108記載の方法。

30

【請求項110】

癌が、GIST、AML、およびSCLCからなる群より選択される、請求項109記載の方法。

【請求項111】

ヒトIII型受容体型チロシンキナーゼのD2-D3ヒンジ領域、D3-D4ヒンジ領域、および/またはD4-D5ヒンジ領域に結合する部分であって、該受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留め、それによって、該受容体型チロシンキナーゼの活性に拮抗する部分。

【請求項112】

III型受容体型チロシンキナーゼが、Kit、PDGFR $\alpha$ 、PDGFR $\beta$ 、CSF1R、およびFlk2からなる群より選択される、請求項111記載の部分。

40

【請求項113】

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体である、請求項112記載の部分。

【請求項114】

単離された抗体またはその抗原結合部、低分子、ペプチド分子、およびアドネクチンからなる群より選択される、請求項111記載の部分。

【請求項115】

請求項111～請求項114のいずれか一項記載の部分と薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物。

50

## 【請求項 1 1 6】

請求項111～請求項114のいずれか一項記載の部分の有効量を対象に投与し、それによって疾患を治療または予防する段階を含む、対象において受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患を治療または予防する方法。

## 【請求項 1 1 7】

受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患が、癌、加齢黄斑変性症(AMD)、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、および疼痛に関連した疾患からなる群より選択される、請求項116記載の方法。

## 【請求項 1 1 8】

癌が、GIST、AML、およびSCLCからなる群より選択される、請求項116記載の方法。

10

## 【請求項 1 1 9】

受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合し、該受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定するための方法であって、以下の段階を含む方法：

受容体型チロシンキナーゼを候補部分と接触させる段階；

該受容体型チロシンキナーゼを該受容体型チロシンキナーゼのリガンドと同時にまたは逐次的に接触させる段階；および

該部分が、該リガンドによって誘導される二量体受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインの位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼすかどうかを判定することによって、該受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合し、かつ該受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定する段階。

20

## 【請求項 1 2 0】

III型受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定するための方法であって、以下の段階を含む方法：

III型受容体型チロシンキナーゼを候補部分と接触させる段階；

該受容体型チロシンキナーゼを該受容体型チロシンキナーゼのリガンドと同時にまたは逐次的に接触させる段階；ならびに

該部分が、該リガンドによって誘導される二量体受容体型チロシンキナーゼのD4-D4ドメインまたはD5-D5ドメインの位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼすかどうかを判定し、それによって、該III型受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定する段階。

30

## 【請求項 1 2 1】

ヒトKit受容体のIg様ドメインまたはヒンジ領域上の立体構造エピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合部であって、該抗体またはその抗原結合部が、該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留めてそれにより該ヒトKit受容体の活性に拮抗し、かつ、該立体構造エピトープが、表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される2個以上の残基から構成される、単離された抗体またはその抗原結合部。

## 【請求項 1 2 2】

ヒトKit受容体のアミノ酸残基309～413番および/または410～519番に結合し、それによって、該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗する、単離された抗体またはその抗原結合部。

40

## 【請求項 1 2 3】

ヒトKit受容体のK218、S220、Y221、L222、F340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、およびY373 からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合し、それによって、該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗する、単離された抗体またはその抗原結合部。

## 【請求項 1 2 4】

ヒトKit受容体のY350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合し、それによって、該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗す

50

る、単離された抗体またはその抗原結合部。

【請求項 1 2 5】

YHRKVRPVSSHGDFNY (SEQ ID NO: 71), PFVS (SEQ ID NO: 72), KAFT (SEQ ID NO: 73), LAFKESNIY (SEQ ID NO: 74), LLEVFEFI (SEQ ID NO: 75), RVKGFPD (SEQ ID NO: 76), KASNES (SEQ ID NO: 77), KAES (SEQ ID NO: 78), GTTKEK (SEQ ID NO: 79), YFGKL (SEQ ID NO: 80), FVNN (SEQ ID NO: 81), DNTKV (SEQ ID NO: 82), GGVK (SEQ ID NO: 83), LGVV (SEQ ID NO: 84),  
YGHRKVRPFVSSSHGDFNY (SEQ ID NO: 85), PFVS (SEQ ID NO: 72),  
KSYLFPKNESNIY (SEQ ID NO: 86), GGGYVTFFGK (SEQ ID NO: 87), DTKEAGK (SEQ ID NO: 88), YFKLTRLET (SEQ ID NO: 89), YRF, ASYLTLEV (SEQ ID NO: 5), DKGREG (SEQ ID NO: 6), TTLEASYL (SEQ ID NO: 11), NESNSKASY (SEQ ID NO: 15), AFKPNSDV (SEQ ID NO: 18), AFKPESNIR (SEQ ID NO: 20),  
KWEDYVSELH (SEQ ID NO: 28), DKWELHLT (SEQ ID NO: 31),  
MNRTFTDKWEHLTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 33), VNTKPEIAYNDVGKT (SEQ ID NO: 37), VNTKPEIAGFPEPT (SEQ ID NO: 39), VNTKPEI FGKLV (SEQ ID NO: 41), VNTKPEIVNDGEN (SEQ ID NO: 43), VNTKPEIRLKGTEG (SEQ ID NO: 45),  
GPPFGKLGTEGG (SEQ ID NO: 48), VNDGEYNDVGK (SEQ ID NO: 51),  
TKPEILVGK TSA (SEQ ID NO: 63), ILTYDRLAYFNFA (SEQ ID NO: 66),  
AYFNFAKHNGT (SEQ ID NO: 68), および AYFNFAAGTEQRC (SEQ ID NO: 70)

10

20

からなる群より選択される構造を含むペプチド分子。

【請求項 1 2 6】

YHRKVRPVSSHGDFNY (SEQ ID NO: 71), PFVS (SEQ ID NO: 72), KAFT (SEQ ID NO: 73), LAFKESNIY (SEQ ID NO: 74), LLEVFEFI (SEQ ID NO: 75), RVKGFPD (SEQ ID NO: 76), KASNES (SEQ ID NO: 77), KAES (SEQ ID NO: 78), GTTKEK (SEQ ID NO: 79), YFGKL (SEQ ID NO: 80), FVNN (SEQ ID NO: 81), DNTKV (SEQ ID NO: 82), GGVK (SEQ ID NO: 83), LGVV (SEQ ID NO: 84),  
YGHRKVRPFVSSSHGDFNY (SEQ ID NO: 85), PFVS (SEQ ID NO: 72),  
KSYLFPKNESNIY (SEQ ID NO: 86), GGGYVTFFGK (SEQ ID NO: 87), DTKEAGK (SEQ ID NO: 88), YFKLTRLET (SEQ ID NO: 89), YRF, EVVDKGFIN (SEQ ID NO: 2), ASYL (SEQ ID NO: 3), TLEV (SEQ ID NO: 4), ASYLTLEV (SEQ ID NO: 5),

30

40

DKG, REG , DKGREG (SEQ ID NO: 6), VVSVSKASYLL (SEQ ID NO: 7),  
VTTTLEVVD (SEQ ID NO: 8), REGEEFTVTCTI (SEQ ID NO: 9), TTLE (SEQ ID  
NO: 10), TTLEASYL (SEQ ID NO: 11), KSENESENIR (SEQ ID NO: 12), NESN (SEQ  
ID NO: 13), SKASY (SEQ ID NO: 14), NESNSKASY (SEQ ID NO: 15), AFKP (SEQ  
ID NO: 16), NSDV (SEQ ID NO: 17), AFKPNSDV (SEQ ID NO: 18), ESNIR (SEQ  
ID NO: 19), AFKPESNIR (SEQ ID NO: 20), DKWEDYPKSE (SEQ ID NO: 21),  
IRYVSELHL (SEQ ID NO: 22), LTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 23), GENVDLIVEYE  
(SEQ ID NO: 24), MNRTFTDKWE (SEQ ID NO: 25), KWEDY (SEQ ID NO: 26),  
VSELH (SEQ ID NO: 27), KWEDYVSELH (SEQ ID NO: 28), DKWE (SEQ ID NO:  
29), LHLT (SEQ ID NO: 30), DKWELHLT (SEQ ID NO: 31), HLTRLKGTEGGT  
(SEQ ID NO: 32), MNRTFTDKWE (SEQ ID NO: 25), HLTRLKGTEGGT (SEQ ID  
NO: 32), MNRTFTDKWEHLTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 33), VVNDGENVD  
(SEQ ID NO: 34), VNTKPEI (SEQ ID NO: 35), AYNDVGKT (SEQ ID NO: 36),  
VNTKPEIAYNDVGKT (SEQ ID NO: 37), AGFPEPT (SEQ ID NO: 38),  
VNTKPEIAGFPEPT (SEQ ID NO: 39), FGKLV (SEQ ID NO: 40), VNTKPEI FGKLV  
(SEQ ID NO: 41), VNDGEN (SEQ ID NO: 42), VNTKPEIVNDGEN (SEQ ID NO:  
43), RLKGTEG (SEQ ID NO: 44), VNTKPEIRLKGTEG (SEQ ID NO: 45), GPPFGKL  
(SEQ ID NO: 46), GTEGG (SEQ ID NO: 47), GPPFGKLGTEGG (SEQ ID NO: 48),  
VNDGE (SEQ ID NO: 49), YNDVGK (SEQ ID NO: 50), VNDGEYNDVGK (SEQ ID  
NO: 51), TKPEILTYDRL (SEQ ID NO: 52), DRLVNGMLQC (SEQ ID NO: 53),  
GKTSAYFNFAFK (SEQ ID NO: 54), CPGTEQRCSAS (SEQ ID NO: 55),  
CSASVLPVDVQ (SEQ ID NO: 56), DSSAFKHNGT (SEQ ID NO: 57),  
GTVECKAYND (SEQ ID NO: 58), LNSSGPPFGKL (SEQ ID NO: 59),  
FAFKGNNKEQI (SEQ ID NO: 60), TKPEIL (SEQ ID NO: 61), VGKTS (SEQ ID  
NO: 62), TKPEILVGKTS (SEQ ID NO: 63), ILTYDRL (SEQ ID NO: 64), AYFNFA  
(SEQ ID NO: 65), ILTYDRLAYFNFA (SEQ ID NO: 66), KHNGT (SEQ ID NO: 67),  
AYFNFAKHNGT (SEQ ID NO: 68), GTEQRC (SEQ ID NO: 69), および  
AYFNFAGTEQRC (SEQ ID NO: 70)

10

20

30

40

からなる群より選択される構造からなるペプチド分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2008年3月24日に出願された米国特許仮出願第61/070,506号、2007年12月28日に出願された米国特許仮出願第61/009,482号、および2007年6月5日に出願された米国特許仮出願第60/933,238号に関連し、これらに対して優先権を主張する。上述の各出願の内容全体は、この参照により本明細書に組み入れられる。

50

## 【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究または開発に関する記載

本発明は、国立衛生研究所(National Institutes of Health)によって授与された、契約R01-AR 051448、R01-AR 051886、およびP50 AR054086のもとで政府の支援を受けて行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

## 【背景技術】

## 【0003】

発明の背景

幹細胞因子(SCF)は、受容体型チロシンキナーゼKit(SCF受容体としても公知)に結合し活性化することによって様々な細胞応答を媒介するサイトカインである。Kitは、活性化され切断された形態の表面受容体を捕捉するネコレトロウイルス中の癌遺伝子として最初に発見された(Besmer et al. (1986) J Virol 60: 194-203 (非特許文献1))。SCFは、マウスのsteel(SI)遺伝子座にコードされているのに対し、Kitは、マウスの優性白色スポット(W)遺伝子座にコードされている(Copeland et al. (1990) Cell 63: 175-183 (非特許文献2); Huang et al. (1990) Cell 63: 225-233 (非特許文献3); FlanaganおよびLeder (1990) Cell 63: 185-194. (非特許文献4); Tan et al. (1990) Science 247: 209-212 (非特許文献5); Bernstein et al. (1990) Ciba Found Symp 148: 158-166; 考察 166-172 (非特許文献6))。SCFは、非共有結合性ホモ二量体として機能し、選択的RNAスプライシングおよびタンパク質分解プロセッシングによって生成する膜アンカー型SCFおよび可溶型SCFの両方が説明されている(Ashman (1999) Int J Biochem Cell Biol 31:1037-1051 (非特許文献7)に総説がある)。Kitは、PDGF受容体 $\alpha$ およびPDGF受容体 $\beta$ 、CSF-1受容体(M-CSF受容体またはFmsとしても公知)、ならびにFlt3受容体(Flk2としても公知)も含む、受容体型チロシンキナーゼ(RTK)のIII型ファミリーのメンバーである(UllrichおよびSchlessinger (1990) Cell 61: 203-212 (非特許文献8); Blume-Jensen et al. (2001) Nature 411: 355-365 (非特許文献9)に総説がある)。Kitは、単一の膜貫通(TM)ドメインによって細胞質内領域に連結されている、グリコシル化された細胞外リガンド結合ドメイン(外部ドメイン)から構成されている(Schlessinger (2000) Cell 103: 211-225 (非特許文献10)に総説がある)。KitおよびIII型RTKの他のメンバーの外部ドメインはすべて、5個のIg様ドメインを含み、その内の第2および第3の膜遠位ドメインは、リガンド認識において役割を果たすことが示された(UllrichおよびSchlessinger (1990) Cell 61: 203-212 (非特許文献8)に総説がある)。細胞外リガンド結合ドメインが複数のIg様リピートのみで構成される他のRTKには、VEGF受容体ファミリーのメンバー(7個のIg様)、CCK4受容体(7個のIg様)、およびFGF受容体(3個のIg様)が含まれる。Kitの細胞質内領域は、大きなキナーゼ挿入領域を有するタンパク質チロシンキナーゼ(PTK)ドメインを含む。これは、III型RTKの別の特徴である。SCFがKitに結合すると、受容体の二量体化、分子間の自己リン酸化、およびPTK活性化が起こる。Kitの第4のIg様ドメインが、一価または二価いずれかのSCF結合に応答したKit二量体化を担っていることが提唱された(Lev et al. (1992b) J Biol Chem 267: 15970-15977 (非特許文献11); Blechman et al. (1995) Cell 80: 103-113 (非特許文献12))。しかしながら、他の研究により、リガンドによって誘導されるKit二量体化が、SCFの二価結合によって推進されることが実証された(Philo et al. (1996) J Biol Chem 271: 6895-6902 (非特許文献13); Lemmon et al. (1997) J Biol Chem 272: 6311-6317 (非特許文献14))。

## 【0004】

SCF遺伝子座またはKit遺伝子座が変異したマウスの特徴付けにより、SCFおよびKitが、造血細胞、メラニン形成細胞、生殖細胞、および腸ペースメーカー細胞の発達に必要とされることが示された(Ashman (1999) Int J Biochem Cell Biol 31:1037-1051 (非特許文献7)に総説がある)。ヒトにおいて、Kitの機能喪失型変異は、腹側胸部および腹部の色素脱失を特徴とするまだらな形質、一房の白い前髪(fareflock)、聴覚障害、ならびに便秘を引き起こす(Fleischman et al. (1991) Proc Natl Acad Sci U S A 88: 10885-10889 (非特許文献15))。Kitの様々な機能獲得型変異が、様々なタイプのヒト癌において発見

された。様々な癌の中でもとりわけ、消化管間質腫瘍(GIST)、急性骨髄性白血病(AML)、および肥満細胞白血病(MCL)において、活性化Kit変異が発見された。膜近位Ig様ドメイン(D5)(エキソン8および9)、膜近傍(JM)ドメイン(エキソン11)、およびチロシンキナーゼ(PTK)ドメイン(エキソン17)において変異が確認された(Forbes et al. (2006) COSMIC 2005 . BR J. CANCER, 94: 318-22 (非特許文献16) . 体細胞変異データベース(Somatic mutation database): Catalogue of Somatic Mutations in Cancer <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>を参照されたい)。JMドメインおよびPTKドメイン中の機能獲得型変異は、自己抑制的制約を緩和することによって、Kitの構成的活性化をもたらすという十分な証拠はあるが(Mol et al. (2004) J Biol Chem. 279: 31655-31663 (非特許文献17))、外部ドメインのD5における機能獲得型変異の根底にある分子メカニズムは理解されていない。KitおよびPDGFRなどのRTK、ならびにSCF、PDGF $\alpha/\beta$ 、および結合されたKit/SCF複合体の構造をもっと上手く特徴付ける必要がある。このような特徴付けにより、薬物、薬剤、または他の生物製剤を用いて標的とすることができる領域を情報に基づいて同定できるようになる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Besmer et al. (1986) J Virol 60: 194-203

【非特許文献2】Copeland et al. (1990) Cell 63: 175-183

【非特許文献3】Huang et al. (1990) Cell 63: 225-233

【非特許文献4】FlanaganおよびLeder (1990) Cell 63: 185-194

【非特許文献5】Tan et al. (1990) Science 247: 209-212

【非特許文献6】Bernstein et al. (1990) Ciba Found Symp 148: 158-166; 考察 166-172

【非特許文献7】Ashman (1999) Int J Biochem Cell Biol 31:1037-1051

【非特許文献8】UllrichおよびSchlessinger (1990) Cell 61: 203-212

【非特許文献9】Blume-Jensen et al. (2001) Nature 411: 355-365

【非特許文献10】Schlessinger (2000) Cell 103: 211-225

【非特許文献11】Lev et al. (1992b) J Biol Chem 267: 15970-15977

【非特許文献12】Blechman et al. (1995) Cell 80: 103-113

【非特許文献13】Philo et al. (1996) J Biol Chem 271: 6895-6902

【非特許文献14】Lemmon et al. (1997) J Biol Chem 272: 6311-6317

【非特許文献15】Fleischman et al. (1991) Proc Natl Acad Sci U S A 88: 10885-10889

【非特許文献16】Forbes et al. (2006) COSMIC 2005. BR J. CANCER, 94: 318-22

【非特許文献17】Mol et al. (2004) J Biol Chem. 279: 31655-31663

【発明の概要】

【0006】

本発明は、ヒト受容体型チロシンキナーゼ、例えばIII型またはV型の受容体型チロシンキナーゼ、例えばヒトKit(SCF受容体としても公知)またはPDGFR $\alpha/\beta$ の外部ドメイン、例えば、Ig様ドメインまたはIg様ドメイン間のヒンジに結合する部分(moiety)、例えば、抗体またはその抗原結合部、低分子、ペプチド分子、アプタマー、およびアドネクチンを提供する。本発明のこれらの部分は、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留め(lock)、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害する。本発明の1つの態様において、この部分は、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを単量体の状態に留める。本発明の別の態様において、この部分は、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインが二量体化するのを許容するが、2つの単量体のIg様ドメイン(例えば、III型受容体型チロシンキナーゼのD4-D4ドメインもしくはD5-D5ドメイン、またはV型受容体型チロシンキナーゼのD7-D7ドメイン)の位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼし、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害する。言い換え

ると、この部分は、リガンドによって誘導される受容体型チロシンキナーゼ外部ドメインの二量体化を許容し得るが、細胞表面境界面における2つの外部ドメインの位置付けに影響を及ぼすか、または受容体型チロシンキナーゼの立体構造的変化を変更もしくは妨害し、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害し得る(例えば、受容体内在化の阻害および/もしくは受容体のチロシン自己リン酸化の阻害ならびに/または受容体が下流のシグナル伝達経路を活性化する能力の阻害)。本発明は、単量体型ならびにリガンドによって誘導されたホモ二量体型の両方の受容体型チロシンキナーゼKitの外部ドメイン全体の結晶構造の解読に少なくとも部分的に基づく。これらの結晶構造の解読により、本発明の部分が標的とし得るエピトープ、例えば、立体構造エピトープの同定が可能になった。

10

#### 【0007】

また、本発明は、隣接する受容体間のD4同型(およびまたD5同型)相互作用が、受容体二量体化において役割を果たすよりはむしろ、2つの受容体の膜近位領域を、それらの細胞質内ドメイン間の相互作用を可能にしてチロシンキナーゼ活性化をもたらす距離および向きに正確に位置付けるのに必要とされるという発見に少なくとも部分的に基づく。

#### 【0008】

したがって、1つの局面において、本発明は、ヒト受容体型チロシンキナーゼの外部ドメイン、例えば、Ig様ドメインまたはヒンジ領域に結合し、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留め、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性に拮抗する部分を提供する。1つの態様において、Ig様ドメインは、受容体型チロシンキナーゼへのリガンドの結合を担っていてもよく、または担っていなくてもよい。別の態様において、部分は、受容体型チロシンキナーゼと受容体型チロシンキナーゼのリガンドとの相互作用を妨げていてもよく、または妨げなくてもよい。さらに別の態様において、本発明の部分は、受容体型チロシンキナーゼの二量体化を妨害してもよく、または妨害しなくてもよい。さらなる態様において、本発明の部分は、リガンドによって誘導される受容体二量体化を妨害しない場合があるが、受容体型チロシンキナーゼ活性化に必要とされる膜近位領域間の同型相互作用または異型相互作用を妨害すると考えられる。

20

#### 【0009】

いくつかの態様において、本発明の部分は、受容体型チロシンキナーゼの各プロトマーに由来する外部ドメインの膜近位領域間の同型相互作用または異型相互作用を妨害する。例えば、本発明の部分は、受容体型チロシンキナーゼの各プロトマーに由来する外部ドメインの末端(形質膜に最も近い外部ドメインの端)を、約15 Å、約20 Å、約25 Å、約30 Å、約35 Å、または約40 Åを超える距離だけ離すことができる。

30

#### 【0010】

好ましい態様において、受容体型チロシンキナーゼは、III型受容体型チロシンキナーゼ、例えば、Kit、PDGFR α、PDGFR β、CSF1R、Fms、Flt3、またはFlk2である。

#### 【0011】

他の態様において、本発明の部分が結合するIg様ドメインは、III型受容体型チロシンキナーゼのD4ドメインである。1つの特定の態様において、部分は、D4相互作用部位の次のコンセンサス配列:

40

**LX<sub>1</sub>RX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>G**

に結合する部分であり、

配列中、Lはロイシンであり、Rはアルギニンであり、Gはグリシンであり;X<sub>1</sub>は、トレオニン、イソロイシン、バリン、プロリン、アスパラギン、またはリジンからなる群より選択され;X<sub>2</sub>は、ロイシン、バリン、アラニン、およびメチオニンからなる群より選択され;X<sub>3</sub>は、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、およびアルギニンからなる群より選択され;X<sub>4</sub>は、グリシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、プロリン、およびメチオニンからなる群より選択され;X<sub>5</sub>は、トレオニン、セリン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、およびアスパラギン酸からなる群より選択され;X<sub>6</sub>は、グルタミン酸、アスパラギン酸、

50

およびグルタミンからなる群より選択され;かつ、X<sub>7</sub>は、グリシン、セリン、アラニン、リジン、アルギニン、グルタミン、およびトレオニンからなる群より選択される。別の態様において、本発明の部分が結合するIg様ドメインは、III型受容体型チロシンキナーゼのD5ドメイン、例えば、ヒトKitのアミノ酸残基309~413番または410~519番である。特定の態様において、本発明の部分は、D5相互作用部位に由来する、保存されたアミノ酸からなるコンセンサス配列に結合し得る。

【0012】

別の態様において、本発明の部分は、III型受容体型チロシンキナーゼのD4ドメインもしくはD5ドメインの変異体またはV型受容体型チロシンキナーゼD7ドメインの変異体に結合する。特定の態様において、この部分は、ヒトKitの変異D5ドメイン中の点変異に結合し、この変異は、Thr417、Tyr418、Asp419、Leu421、Arg420、Tyr503、およびAla502からなる群より選択される。

【0013】

いくつかの態様において、III型受容体型チロシンキナーゼはヒトKitであり、本発明の部分は、下記の表4に示すアミノ酸残基からなる群より選択される1個または複数個のアミノ酸残基、例えば、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、15個以上、16個以上、17個以上、または18個以上のアミノ酸残基に結合する。例えば、本発明の部分は、1個または複数個の次の残基:

**Y125, G126, H180, R181, K203, V204, R205, P206,**

**P206, F208, K127, A207, V238, S239, S240, S241, H263, G265, D266, F267, N268,**

**Y269, T295, L222, L222, L223, E306, V308, R224, V308, K310, K218, A219, S220,**

**K218, A220, Y221, A339, D327, D398, E338, E368, E386, F312, F324, F340, F355,**

**G311, G384, G387, G388, I371, K342, K358, L382, L379, N326, N367, N370, N410,**

**P341, S369, T385, V325, V407, V409, Y373, Y350, Y408, T380, T390, R381, R353,**

**T411, K412, E414, K471, F433, G470, L472, V497, F469, A431,または G432**

に結合し得る。特定の態様において、本発明の部分は、

**K218, S220, Y221, L222, F340, P341, K342, N367, E368, S369, N370, I371,および Y373**

からなる群より選択される、Kit受容体のアミノ酸残基の内の少なくとも1つ、または

**Y350, R353, F355, K358, L379, T380, R381, L382, E386,および T390**

からなる群より選択される、Kit受容体のアミノ酸残基の内の少なくとも1つに結合する。本発明の部分は、表4において特定するポケットもしくは窪みを形成する残基すべてに結合し得るか、または、それらはポケットもしくは窪みを形成する残基の一部に結合し得る。当業者は、いくつかの態様において、本発明の部分が、上に挙げた残基に対応する他のIII型RTK中の残基、例えば、同様のポケットもしくは窪みを形成する残基または構造アライメントもしくは配列アライメントによって同じ位置になる残基を容易に標的とできることを理解するであろう。

【0014】

別の態様において、本発明の部分は、ヒトKitのアミノ酸残基<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Gluに結合する。さらに別の態様において、本発明の部分は、ヒトKitのアミノ酸残基<sup>418</sup>Tyrおよび/または<sup>505</sup>Asnに結合する。

【0015】

さらなる態様において、本発明の部分は、PDGFR α 受容体またはPDGFR β 受容体に結合する。同様の態様において、本発明の部分は、ヒトPDGFR β のアミノ酸残基<sup>385</sup>Argおよび/もしくは<sup>390</sup>Glu、またはPDGFR α 中の対応する残基に結合する。

## 【0016】

さらに別の態様において、本発明の部分は、III型RTK上の立体構造エピトープに結合する。特定の態様において、立体構造エピトープは、III型RTK、例えば、ヒトKit受容体またはPDGF受容体に由来するD3ドメイン、D4ドメイン、もしくはD5ドメインまたはヒンジ領域に由来する2個以上の残基から構成される。さらなる特定の態様において、本発明の部分は、表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される2個以上の残基、例えば、2個以上、3個以上、4個以上、5個以上、6個以上、7個以上、8個以上、9個以上、10個以上、11個以上、12個以上、13個以上、14個以上、15個以上、16個以上、17個以上、または18個以上のアミノ酸残基から構成される、ヒトKit受容体中の立体構造エピトープに結合し得る。特定の態様において、本発明の部分は、

10

Y125, H180, R181, K203, V204, R205, P206, V238, S239, S240, H263,

G265, D266, F267, N268, および Y269

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープに結合する。同様の態様において、本発明の部分は、次のアミノ酸の群：

P206, F208, V238, および S239; K127, A207,

F208, および T295; L222, A339, F340, K342, E368, S369, N370, I371, および Y373; L222,

L223, E306, V308, F312, E338, F340, および I371; R224, V308, K310, G311, F340, P341,

20

および D398; K218, A219, S220, N367, E368, および S369; K218, A220, E368, および S369;

G384, T385, T411, K412, E414, および K471; Y408, F433, G470, K471, および L472; F324,

V325, N326, および N410; D327, N410, T411, K412, および V497; G384, G387, V409, および

K471; L382, G387, V407, および V409; Y125, G126, H180, R181, K203, V204, R205,

P206, F208, V238, S239, S240, S241, H263, G265, D266, F267, N268, および Y269;

P206, F208, V238, および S239; K218, S220, Y221, L222, F340, P341, K342, N367, E368,

S369, N370, I371, および Y373; G384, G387, G388, Y408, V409, T411, F433, F469,

30

G470, および K471; D327, T411, K412, E414, A431, G432, および K471; Y350, F355, K358,

L379, T380, R381, L382, E386, および T390; Y350, R353, および F355

の内の1つより選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープに結合し得る。先に示したように、本発明の部分は、表4において特定するポケットもしくは窪みを形成するアミノ酸残基すべてに結合し得るか、または、それらはポケットもしくは窪みを形成する残基の一部に結合し得る。

## 【0017】

さらなる態様において、本発明の部分は、表5に挙げるペプチドより選択される2個以上のアミノ酸残基から構成される立体構造エピトープに結合する。特定の態様において、立体構造エピトープは、第1のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸残基、および第2のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸残基から構成され、第1のペプチドおよび第2のペプチドは、表5に挙げるペプチドの群より選択される。したがって、本発明の部分は、第1のペプチドおよび第2のペプチドの群が次のとおりである立体構造エピトープに結合し得る：

40

Ala219-Leu222およびThr304-Val308;  
 Asp309-Gly311およびArg224-Gly226; Thr303 - Glu306およびAla219-Leu222; Asn367-  
 Asn370およびSer217-Tyr221; Ala339-Pro343およびAsn396-Val399; Ala339-Pro343および  
 Glu368-Arg372; Lys358-Tyr362およびVal374-His378; Asp357-Glu360およびLeu377-  
 Thr380; Met351-Glu360およびHis378-Thr389; His378-Thr389およびVal323-Asp332;  
 Val409-Ile415およびAla493-Thr500; Val409-Ile415およびAla431-Thr437; Val409-Ile415  
 およびPhe469-Val473; Val409-Ile415およびVal325-Asn330; Val409-Ile415およびArg381-  
 Gly387; Gly466-Leu472およびGly384-Gly388; Val325-Glu329およびTyr494-Lys499;  
 Thr411-leu416およびVal497-Ala502; Ile415-Leu421およびAla502-Ala507; Ala502-  
 Ala507およびLys484-Thr488; ならびに Ala502-Ala507およびGly445-Cys450

10

。本発明の部分は、前述の第1のペプチドおよび第2のペプチドの群を形成するアミノ酸残基すべてに結合し得るか、または、それらは第1のペプチドおよび第2のペプチドの群を形成する残基の一部に結合し得る。

#### 【0018】

他の態様において、本発明の部分は、VEGF受容体ファミリーのメンバーである受容体型チロシンキナーゼ(V型受容体型チロシンキナーゼ)、例えば、VEGFR-1(Flt1)、VEGFR-2(Flk1)、およびVEGFR-3(Flt4)に結合する。いくつかの態様において、本発明の部分が結合するIg様ドメインは、VEGF受容体ファミリーのメンバーのD7ドメインでよい。特定の態様において、部分は、VEGF受容体ファミリーのメンバーのD7ドメインの次のコンセンサス配列：

20

#### IX<sub>1</sub>RVX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EDX<sub>4</sub>G (SEQ ID NO: 1)

に結合する部分であり、

配列中、Iはイソロイシンであり、Rはアルギニンであり、Eはグルタミン酸であり、Dはアスパラギン酸であり、Gはグリシンであり;X<sub>1</sub>は、グルタミン酸、アルギニン、およびグルタミンからなる群より選択され;X<sub>2</sub>は、アルギニンおよびトレオニンからなる群より選択され;X<sub>3</sub>は、グルタミン酸およびリジンからなる群より選択され;かつ、X<sub>4</sub>は、グルタミン酸およびアラニンからなる群より選択される。

30

#### 【0019】

いくつかの態様において、本発明の部分は、単離された抗体またはその抗原結合部である。抗体またはその抗原結合部は、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、またはキメラ抗体でもよい。いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合部は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、およびIgEの定常領域からなる群より選択される重鎖定常領域を含む。好ましい態様において、抗体重鎖定常領域はIgG1である。さらに、本発明の部分は、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、単鎖Fv断片、SMIP、アフィボディ、アビマー、ナノボディ、および単ドメイン抗体からなる群より選択される抗体またはその抗原結合部でもよい。特定の態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、 $1 \times 10^{-7}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $5 \times 10^{-8}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $1 \times 10^{-8}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $5 \times 10^{-9}$ Mまたはそれ未満のK<sub>D</sub>で受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合する。

40

#### 【0020】

いくつかの態様において、本発明の単離された抗体またはその抗原結合部は、ヒトKitのアミノ酸残基309~413番および/または410~519番に結合し、それによって、ヒトKitの外部ドメインを不活性状態に留め、ヒトKitの活性に拮抗する。

#### 【0021】

50

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗体またはその抗原結合部を産生するハイブリドーマを含む。

【0022】

別の好ましい態様において、本発明の部分は低分子である。

【0023】

いくつかの好ましい態様において、本発明の低分子は、表4に示すアミノ酸残基からなる群より選択される1個または複数個のアミノ酸残基に結合する。例えば、本発明の低分子は、1個または複数個の次の残基：

Y125, G126, H180, R181, K203, V204, R205, P206,

P206, F208, K127, A207, V238, S239, S240, S241, H263, G265, D266, F267, N268,

Y269, T295, L222, L222, L223, E306, V308, R224, V308, K310, K218, A219, S220,

K218, A220, Y221, A339, D327, D398, E338, E368, E386, F312, F324, F340, F355,

G311, G384, G387, G388, I371, K342, K358, L382, L379, N326, N367, N370, N410,

P341, S369, T385, V325, V407, V409, Y373, Y350, Y408, T380, T390, R381, R353,

T411, K412, E414, K471, F433, G470, L472, V497, F469, A431, または G432

に結合し得る。特定の態様において、本発明の低分子は、

K218, S220, Y221, L222, F340, P341, K342, N367, E368, S369, N370, I371, および Y373

からなる群より選択される、Kit受容体のアミノ酸残基の内の少なくとも1つに結合する。関連する態様において、本発明の低分子は、

Y350, R353, F355, K358, L379, T380, R381, L382, E386, および T390

からなる群より選択される、Kit受容体のアミノ酸残基の内の少なくとも1つに結合する。当業者は、いくつかの態様において、本発明の低分子が、上に挙げた残基に対応する他のIII型RTK中の残基、例えば、同様のポケットもしくは窪みを形成する残基または構造アライメントもしくは配列アライメントによって同じ位置になる残基を容易に標的とできることを理解するであろう。

【0024】

さらなる態様において、本発明の部分はペプチド分子である。いくつかの態様において、ペプチド分子は、受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインをベースとして設計される。特定の態様において、本発明のペプチド分子は、KitのD4ドメインをベースとして設計される。本発明のペプチド分子は、保存されたD4相互作用部位、例えば、前述のD4コンセンサス配列

(LX<sub>1</sub>RX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>G)

、またはIII型受容体型チロシンキナーゼのD4ドメインを整列させるか、もしくは比較することによって生じさせた他の部位を含んでよい。その他の態様において、本発明のペプチド分子は、ヒトKitのアミノ酸残基309～413番に少なくとも80%同一である構造、またはヒトKitのアミノ酸残基410～519番に少なくとも80%同一である構造を含む。ペプチド部分はまた、KitのD5ドメインをベースとして設計されてもよく、さらなる好ましい態様において、III型受容体型チロシンキナーゼのD5ドメインを整列させるか、または比較することによって生じさせたコンセンサス配列を含んでよい。代替の態様において、ペプチド分子は、変異D5ドメインの配列またはコンセンサス配列をベースとして設計されてもよい。

【0025】

本発明のペプチド部分は、本明細書において特定するアミノ酸配列(例えば、SEQ ID NO : 1～89、92、93、および105～157)のいずれかを含むか、またはそれらからなるペプチドでよい。

## 【0026】

いくつかの態様において、本発明のペプチド分子は、少なくとも1つのD-アミノ酸残基を含む。

## 【0027】

別の好ましい態様において、本発明の部分はアドネクチンである。

## 【0028】

さらに、いくつかの態様において、本発明の低分子およびペプチド分子は、標的RTKの立体構造エピトープに結合する。他の態様において、本発明の低分子およびペプチド分子は、立体構造エピトープではない、標的RTKのエピトープに結合する。

## 【0029】

別の局面において、本発明は、本発明の部分のいずれかおよび薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。

## 【0030】

その他の局面において、本発明は、対象において受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患を治療または予防する方法を提供する。これらの方法は、本発明の部分(例えば、III型受容体型チロシンキナーゼのD4ドメインもしくはD5ドメイン、またはV型受容体型チロシンキナーゼのD7ドメインに結合する部分)の有効量を対象に投与し、それによって疾患を治療または予防する段階を含む。好ましい態様において、受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患は、癌、例えば、GIST、AML、およびSCLCである。

## 【0031】

別の局面において、本発明は、ヒトIII型受容体型チロシンキナーゼのD3-D4ヒンジ領域および/またはD4-D5ヒンジ領域に結合する部分の有効量を対象に投与し、それによって疾患を治療または予防することによって、対象において受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患を治療または予防する方法を提供する。特定の態様において、受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患は、癌、例えば、GIST、AML、およびSCLCである。

## 【0032】

別の局面において、本発明は、受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合し、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定するための方法を提供する。これらの方法は、受容体型チロシンキナーゼを候補部分と接触させる段階;受容体型チロシンキナーゼを受容体型チロシンキナーゼに対するリガンドと同時または逐次的に接触させる段階;ならびに、その部分が、リガンドによって誘導される二量体受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインの位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼすかどうかを判定し、それによって、受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合し、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定する段階を含む。

## 【0033】

さらなる局面において、本発明は、III型受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定するための方法を提供する。これらの方法は、III型受容体型チロシンキナーゼを候補部分と接触させる段階;受容体型チロシンキナーゼを受容体型チロシンキナーゼに対するリガンドと同時または逐次的に接触させる段階;ならびに、その部分が、リガンドによって誘導される二量体受容体型チロシンキナーゼのD4-D4ドメインまたはD5-D5ドメインの位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼすかどうかを判定し、それによって、III型受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定する段階を含む。

## 【0034】

本発明のその他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0035】

本特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラ

10

20

30

40

50

一図面を含む本特許または特許出願公開のコピーは、請求および必要手数料の支払いがあり次第、特許庁によって提供される。

【図1】図1A～Eは、Kit外部ドメインの結晶構造を示す。図1Aは、Kit外部ドメイン単量体のリボンダイアグラム(左)および表面図(右)を示す。右のパネルは、左のパネルに示す図の縦軸に沿って90度回転させた図を示す。D1を青色、D2を緑色、D3を黄色、D4をオレンジ色、およびD5をピンク色に塗り、N末端およびC末端にラベルを付けている。D1およびD5中のジスルフィド結合は、玉および棒を用いたレンダリングで示し、硫黄原子はオレンジ色に塗っている。アスパラギン結合型の炭水化物は、棒のモデルで示す。図1B～Eは、D1-D2(B)、D2-D3(C)、D3-D4(D)、およびD4-D5(E)の境界面の詳細な図を提供する。色分けは図1Aと同じである。ドメイン間相互作用に参与するアミノ酸にラベルを付け、水素結合を黄色の点線で描く。IgSFの命名法に従って、二次構造要素を名付けている。

10

【図2】図2A～Bは、SCF-Kit外部ドメイン2:2複合体の結晶構造を示す。図2Aは、SCF-Kit 2:2複合体のリボンダイアグラムを示す。D1～D5の色分けは図1と同じであり、SCFは赤紫色に塗っている。KitおよびSCFのN末端およびC末端にラベルを付けている。D1およびD5中のジスルフィド結合は、玉および棒を用いたレンダリングで示し、硫黄原子はオレンジ色に塗っている。アスパラギン結合型の炭水化物は、棒のモデルで表す。矢印は、SCF-Kit 2:2複合体中の大きな窪みをマークする。図2Bは、SCF-Kit外部ドメイン2:2複合体の表面図を示す。この図は、上面図(上)、正面図(中央左)、側面図(中央右)、および底面図(下)を示す。色分けはAと同じである。これらの図から、SCF二量体が、対応する2つのKit外部ドメインのD1、D2、およびD3と対称的に相互作用することが示される。さらに、Kit外部ドメインは、隣接する2つの受容体のD4(オレンジ色)間およびD5(ピンク色)間の側面接触を介して、同種親和性相互作用を生じる。

20

【図3】図3A～Eは、KitによるSCF認識を示す。図3Aは、SCF-Kit境界面の図を示す。SCFおよびKit外部ドメインの埋もれた表面中のアミノ酸を、これらの2つの分子を引き離すことによって可視化する。図は、KitのD1-D2-D3(左)およびSCF(右)の分子表面を示す。酸性アミノ酸を赤色で、塩基性アミノ酸を青色で、極性アミノ酸をオレンジ色で、疎水性アミノ酸を黄色で示す。Kit上のSCF結合部位I、部位II、および部位IIIを丸で囲む。図3Bは、リガンドと受容体の境界面における静電ポテンシャルの相補性を示す。右のパネルは、左のパネルに提示する静電表面の縦軸に沿って180度回転させた図を示す。D1-D2-D3の静電表面ポテンシャルは、緑色に塗られた結合したSCFの漫画図(cartoon diagram)の図形と共に、分子表面に重ね合わせた。右のパネルは、SCFが結合したKitの静電表面ポテンシャルを示し、青色(正)および赤色(負)に色を塗っている。Kitは、青緑色に塗ったリボンダイアグラムの形態で示す。図3C～Eは、SCF-Kit境界面の部位I(C)、部位II(D)、および部位II(E)の拡大図を示す。SCFは緑色に塗り、Kitは青緑色に塗っている。相互作用するアミノ酸にラベルを付け、水素結合を黄色の点線として描き、リボンおよび鎖上の二次構造要素にマークを付けている。

30

【図4】図4A～Cは、Kitに結合した際のSCFの立体構造的変化を示す。図4Aは、Kit結合の際に、2つのSCFプロトマー間の角度が変化することを示す。この図は、遊離SCF(緑色)およびKitに結合したSCF(赤紫色)の漫画図を示す。ヘリックス $\alpha$ Cに関して測定されるように、1つのSCFプロトマー(左)を重ね合わせることで、第2のプロトマー(右)の約5度の角移動が明らかになる。ヘリックスにラベルを付け、円柱として示す。図4Bは、Kitに結合した際のSCFのN末端の立体構造的変化を示す。Kitの部位IIIは、分子表面(灰色)として示し、遊離SCFのN末端は緑色、Kitに結合したSCFのN末端は赤紫色で示す。Cys4'とCys89'の間のジスルフィド結合は黄色の球体として示す。重要なアミノ酸にラベルを付け、棒モデルとして示している。図4Cは、Kitの部位Iに結合した際のSCFの $\alpha$ C- $\beta$ 2ループの立体構造的変化を示す。色分けはBと同じである。

40

【図5】図5A～Bは、SCFが結合した際のKitのD4およびD5の再配置を示す。図5Aは、SCF-Kit複合体中のD4およびD5の再配置を示す。Kit単量体のD3をSCFに結合されたKitのD3(両方とも青色に塗った)と重ね合わせることで、結合型(赤色)のD4は、遊離型のD4(緑色)の位置から22度移動することが示される。これら2つの形態のD4(両方とも青色)を重ね合

50

わせることにより(右のパネル)、SCFに結合された形態(赤色)のD5は、遊離型のD5(緑色)の位置から27度移動することが示される。下の2つのパネルは、単量体型(緑色)およびホモ二量体型(赤色)のD3-D4境界面およびD4-D5境界面のヒンジ領域の拡大図を示す。図5Bは、図2と同じ向きで見た、SCFに占有されたKitのD4およびD5の表面図(上のパネル)を示す。黒い輪郭は、リガンド結合領域へのSCFの結合によって架橋されたKit外部ドメイン単量体のD4およびD5の位置を示す。D4およびD5の再配置により、隣接する2つの外部ドメインのC末端が移動し、互いからの距離が75 Å から15 Å になる。下のパネルは、SCF-Kit複合体の細胞膜から見た図を示す(底面図)。x軸に沿って90度回転していることに留意されたい。D1~D5の色分けは図1と同じである。

【図6】図6A~Dは、D4-D4境界面およびD5-D5境界面の図を示す。図6A(上のパネル)は、D4-D4境界面の図を示す、1.1σレベルで輪郭を描いた2Fo-Fc電子密度マップを示す。Kitプロトマーの主鎖を、それぞれピンク色および黄色の管として表す。隣接する2つの外部ドメインのD4-D4境界面の拡大図(下のパネル)。隣接する2つのD4のArg381とGlu386の間で形成される鎖間水素結合を黄色に塗っている。重要なアミノ酸にラベルを付け、棒モデルとして示す。IgSFの命名法に従って、二次構造要素にラベルを付けている。図6Bは、III型およびV型のRTKファミリーのメンバー全般でのD4-D4二量体化モチーフの保存を示す。マウスホモログ(AAH75716.1)(SEQ ID NO: 95)、ニワトリホモログ(NP\_989692.1)(SEQ ID NO: 96)、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)ホモログ(AAH61947)(SEQ ID NO: 97)、サンショウウオホモログ(AAS91161.1)(SEQ ID NO: 98)、ならびにゼブラフィッシュホモログ(A型(SEQ ID NO: 99)およびB型(SEQ ID NO: 100)(NP\_571128, XP\_691901)の配列と並べた、ヒトKitの残基370~398番(AAC50969.1)(SEQ ID NO: 94)。また、ヒト(P07333)(SEQ ID NO: 101)、マウス(P09581)(SEQ ID NO: 102)、およびトラフグA型(SEQ ID NO: 103)およびB型(SEQ ID NO: 104)(P79750, Q8UVR8)に由来するCSF1Rのアミノ酸配列、ならびにヒト(それぞれ、SEQ ID NO: 105およびSEQ ID NO: 107)(P16234, P09619)およびマウス(それぞれ、SEQ ID NO: 106およびSEQ ID NO: 108)(NP\_035188, P05622)に由来するPDGFRαおよびPDGFRβの配列も示される。V型RTKのヒトVEGFR 1~3型のアミノ酸配列(記載順にそれぞれSEQ ID NO: 109~111)(7番目のIg様ドメイン)(P17948, P35968, およびP35916)もまた、提示される。Kit上の二次構造要素には、配列アライメントの上にラベルを付けている。保存残基であるArg381およびLys383、Leu382およびLeu379、Glu386およびGly388には、それぞれ、青色、黄色、赤色、および緑色の色を塗っている。図6Cは、D5-D5境界面のリボンダイアグラムを示す。隣接する2つのKitプロトマーのA鎖およびG鎖は、D5-D5境界面の形成に関与している。D5-D5境界面は、おそらくはイオンまたは水分子を介した、隣接する2つの受容体のTyr418とAsn505との側面相互作用によって維持されている。図6Dは、KitのD4およびD5の静電ポテンシャル表面を示す。これらの図面は、D4-D4相互作用表面の正面図(右)および縦軸に沿って90度回転させた図(左)を示す。酸性部分(acidic patch)およびD4-D4境界面の位置を丸で囲み、相互作用する残基Arg381およびGlu386にラベルを付けている。

【図7】図7A~Cは、癌および他の疾患に関係があるとされるKit外部ドメイン変異、ならびにKitおよび他のRTKの活性化のメカニズムを示す。図7Aは、左のパネルに示すまだら状の形質に関与する機能喪失型変異を示す。D1(青色)、D2(緑色)、およびD3(黄色)のリボンダイアグラムならびにSCFの表面図(灰色)。変異したアミノ酸は赤色に塗っている。GIST、SCLC、およびAMLに関与する機能獲得型変異を右のパネルに示す。ホモ二量体型のD4およびD5の表面図を灰色に塗っている。GISTにおいて重複しているAla502およびTyr503を青色で示し、Asp419に近い欠失および挿入変異(AMLおよびNCLL)を緑色で示す。活性化Kit変異はD5-D5境界面に限定されていることに留意されたい。図7Bは、Kit活性化が、D4-D4境界面における点変異体によって損なわれることを示す。図に示すように(左上のパネル)、野生型Kit(WT)、D4のR381A点変異、またはD4のE368A点変異を一過性に発現するHEK293細胞を、37℃で6分間、10ng/ml SCFで刺激した。刺激されていない細胞またはSCFで刺激された細胞の溶解物を、抗Kit抗体を用いた免疫沈降(IP)、続いて、SDS-PAGEおよび抗Kit抗体または抗ホスホチロシン(p-Tyr)抗体のいずれかを用いたイムノブロッティング(IB)に

供した。抗p-Tyrイムノブロットによる、Kitのチロシン自己リン酸化の濃度測定定量(右上のパネル)。野生型Kit(WT)またはR381A変異体を安定に発現する3T3細胞を様々な濃度のSCFで処理した。刺激されていない細胞またはSCFで刺激された細胞の溶解物を、抗Kit抗体を用いた免疫沈降、続いて、SDS-PAGEおよび抗Kit抗体または抗p-Tyr抗体を用いたイムノブロッティングに供した(左下のパネル)。天然SCFを用いた、細胞に結合した125I-SCFの置換アッセイ法。野生型を発現する3T3細胞(■)、R381Aを発現する3T3細胞(▼)、R381A/E386Aを発現する3T3細胞(◆)、またはキナーゼ陰性Kitを発現する3T3細胞(▲)を、濃度を段階的に上げた天然SCFの存在下、125I-SCFで処理した。野生型Kitに対するSCFのEC50(c-Kitに結合された<sup>125</sup>I-SCFの50%を置換するリガンド濃度)(1.1nM)は、R381A変異体(1.0nM)、R381A/E386A変異体(0.8nM)、またはキナーゼ陰性Kit変異体(1.4nM)に対するSCFのEC50に類似している。図7Cは、可溶性SCF分子(左のパネル)または隣接した細胞の細胞表面で発現される膜アンカー型SCF(右のパネル)によって推進されるKitおよび他のRTKの活性化のモデルを示す。D1-D2-D3リガンド結合分子にSCFが結合すると、2つの結合されたKit外部ドメイン単量体のC末端が、互いから75 Å以内の距離に近付けられる。D3-D4ヒンジおよびD4-D5ヒンジは柔軟性があるため、隣接する2つの外部ドメインのC末端を互いから15 Å以内の距離に近付ける、D4-D4およびD5-D5の側面相互作用が可能になる。その結果として、Kit細胞質内ドメインの近接性および局所濃度が増大して、キナーゼドメイン中の調節性チロシン残基の自己リン酸化を招き、結果としてPTKが活性化される。(PTK活性化はこのモデルでは描かれていないことに留意されたい)。細胞シグナル伝達分子の補完物(complement)の動員および活性化が、細胞質内ドメイン中の主要なチロシンのリン酸化に続いて進行すると考えられる。このモデルは、遊離のSCF構造、リガンドの付いていないKit、SCF-Kit複合体、およびKit PTK構造に基づいている(PDBエントリー1QZJ、1R01、および1T45)。二次構造予測を用いて、構造が決定されていない領域のモデルを作った(緑色のヘリックスおよび黒色のループ)。SCFは赤紫色、Kit外部ドメインは青色、kit PTKは淡青色に塗っている。

【図8】図8は、Kit外部ドメイン構造に基づいた、III型RTKの構造ベースの配列アライメント、およびIII型ファミリーRTKに対するリガンドの構造ベースの配列アライメントを示す。各行は、個々のIg様ドメインのアライメントを示す。Harpaz et al. (1994) J Mol Biol 238: 528-539によって決定されたようにIgSFフォールドの特徴に基づいて、かつ、Jpred (Cuff et al. (1998) Bioinformatics 14: 892-893)によって算出されたファミリーメンバーの二次構造予測に従って、アミノ酸配列を手動で整列させた。赤色でマークしたアミノ酸は、IgSFフォールドを決定するアミノ酸を表す。β鎖には矢印、α-ヘリックスにはばねのラベルを配列の上に付け、ヒトKitおよびヒトSCFに対して番号を付けている。リガンドが結合すると溶媒の接近容易性が低下するリガンド結合部位の残基にアスタリスクのマークを付けている。部位Iは黒色、部位IIは赤色、部位IIIは緑色に塗っている。同じ色分けを、SCF中の相互作用するアミノ酸残基にラベルを付けるために使用する。D4-D4相互作用を担っているD4 EFループを青緑色の四角で囲んでいる。アライメントのために使用した配列は、ヒトKit(AAC50969)、マウスKit(AAH75716)、ヒトCSFR1(P07333)、ヒトPDGFRα(P16234)、ヒトPDGFRβ(P09619)、およびヒトFlt3(P36888)である。リガンド構造アライメントの場合、SCF (1EXZ)、CSF (1HMC)、Flt3L (1ETE)のPDBエントリーは、Lsqman (KleywegtおよびJones, 1995)を用いて重ね合わせ、一方、SCFマウスの配列(NP\_038626)は、ClustalWを用いてヒトSCFに対して整列させた。図面は、記載順にそれぞれSEQ ID NO: 112~147を開示する。

【図9】図9は、2:2 SCF-Kit複合体の全体的な構造のステレオ図を提供する。2:2 SCF-Kit複合体のリボンモデルをステレオ図で示す。図および色分けは、図2Aと同じである。

【図10】図10A~Bは、SCF-Kit複合体の表面におけるアミノ酸保存を示す。図10Aは、SCF-Kit結晶構造複合体の保存パターンを色分けして示す。青緑色からえび茶色までを、可変アミノ酸から保存アミノ酸までにラベルを付けるのに使用している。図10Bは、2つの分子を互いから引き離すことによってSCFおよびKitを可視化したものを示す。部位I、部位II、および部位III、ならびにD4-D4相互作用領域(D4-D4境界面)を丸で囲んでいる。

【図 1 1】図11A~Bは、SCF-Kit境界面の電子密度を示す。図11Aは、 $2\sigma$ レベルでKitの周りに描いた2Fo-Fc電子密度マップと共に2:2 SCF-Kit複合体の部位IIの部分図を示す。ラベルを付けた側鎖を除いて、Kitの主鎖を黄色の管で描く。図11Bは、SCF-Kit境界面の電子密度を示し、 $1.5\sigma$ レベルでKitの周りに描いた実験的マップと共に遊離Kitの部分図を示す。向きおよび色分けは、図12Aと同じである。

【図 1 2】図12A~Dは、遊離KitおよびSCFに結合されたKitに由来するIg様ドメインの重ね合わされたペアの図を示す。遊離KitおよびSCFに結合されたKitの個々のD1、D2、D3、およびD4を重ね合わせている。Ig様ドメインのペア(A)D1およびD2、(B)D2およびD3、(C)D3およびD4、ならびに(D)D4およびD5の構造を示し、図において、各ペアの重ね合わされたIg様ドメインを青色に塗り、第2の(重ね合わせられていない)Ig様ドメインを、遊離の外部ドメインの場合は緑色で、SCFに結合された外部ドメインの場合は赤色で塗る。これらの図は、SCFが結合した際に、5つの個々のKit Ig様ドメインそれぞれの構造に実質的に変化は起こらないこと、およびD1-D2-D3が、SCF結合に対する態勢が整ったリガンド結合単位として機能することを示す。一方、SCFに結合されたKitでは、D3-D4境界面およびD4-D5境界面では大規模な再配列が起こる。

【図 1 3】図13A~Bは、SCF-Kit複合体構造の静電表面ポテンシャルを示す。図13Aは、SCF-Kit 2:2複合体を具体的に示す。図13Bは、SCF-Kit複合体構造の静電表面ポテンシャル、具体的には、SCFをSCF-Kit 2:2複合体から引き離した後のKitの静電表面ポテンシャルを可視化したものを示す。正および負に帯電した表面をそれぞれ青色および赤色に塗っている。SCF結合領域およびD4-D4境界面を丸で囲んでいる。

【図 1 4】図14は、抗Kit-D5抗体による、SCFによって誘導されるKit活性化の阻害を示す。Kitを発現する3T3細胞を、濃度を段階的に上げた抗Kit D5(Kitの第5のIg様ドメインを対象とする)または対照としての抗SCF(SCFリガンドを対象とする)もしくは抗Kit外部ドメイン(Kit外部ドメイン全体を対象とする)と共にインキュベートした。

【図 1 5】図15は、組換えKit D4を用いた、SCFによって誘導されるKit活性化の阻害を示す。Kitを発現する3T3細胞を、濃度を段階的に上げた組換えKit-D4と共に室温で10分間インキュベートし、続いて10分間、SCFで刺激した。

【図 1 6】図16Aは、PDGFによって誘導されるPDGFR活性化が、D4の点変異によって妨害されることを実証する。野生型PDGFRまたはD4変異体(R385AおよびE390A)を発現するPDGFR-/-MEFを一晩、血清飢餓状態にし、表示した濃度のPDGF BBで5分間刺激した。細胞溶解物を抗PDGFR抗体を用いて免疫沈降し、続いて、SDS-PAGEおよび抗ホスホチロシン抗体4G10を用いたイムノブロッティングを行った。膜から抗体を除去し(stripped off)、抗flagタグ抗体で再プロットして、PDGFRの合計レベルを決定した。図16Bは、PDGFRを介したシグナル伝達が、D4の点変異によって妨害されることを実証する。野生型PDGFRおよびD4変異体(R385AおよびE390A)を発現するPDGFR-/-MEFを一晩、血清飢餓状態にし、表示した濃度のPDGF BBで5分間、 $23^{\circ}\text{C}$ で刺激した。等量的全細胞溶解物(TCL)をSDS-PAGEに供し、それぞれ抗ホスホMAPK、抗MAPK、抗ホスホAkt、および抗Aktを用いたイムノブロッティングによって解析した。この実験から、MAPK応答およびAkt活性化の両方が、D4の点変異によって妨害されることが示される。図16Cは、PDGFR活性化を妨害するD4の点変異が、PDGFによって誘導されるPDGFR二量体化には干渉しないことを実証する。野生型またはE390A変異体が発現するPDGFR-/-MEFを一晩、血清飢餓状態にし、続いて、DMEM/50mM Hepes緩衝液(pH7.4)に溶解した表示した量のPDGFと共に $4^{\circ}\text{C}$ で90分間、インキュベーションした。未結合のリガンドを除去した後、PBSに溶解した0.5mMスベリン酸ジスクシンイミジル(DSS)と共に細胞を30分間インキュベートした。刺激されていない細胞または刺激された細胞の溶解物を、抗PDGFR抗体を用いた免疫沈降、続いてSDS-PAGE解析および抗flag抗体(左のパネル)または抗pTyr抗体(右のパネル)を用いたイムノブロッティングに供した。

【図 1 7】図17は、D3-D4ヒンジ領域の窪みを示す。いくつかの窪みが、外部ドメイン単量体構造のD3-D4境界面に散在している。窪みを画定するのに関与するアミノ酸を表4に要約する(下記)。2つのKit受容体間の同型相互作用が成立すると、D3-D4ヒンジ領域は変化して、次の残基:D3由来のK218、S220、Y221、L222、およびD4由来のF340、P341、K342、N

10

20

30

40

50

367、E368、S369、N370、I371、Y373によって作り出される浅い窪みを形成する。図17は、占有されていない単量体(A)およびSCFが結合した二量体(B)のD3-D4ヒンジ領域のリボンダイアグラムならびにD3-D4ポケットのメッシュ図を示す。

【図18】図18は、D4-D5ヒンジ領域の窪みを示す。小さな窪みが、Kit単量体のD4のABループおよびEFループ、D4-D5を連結するリンカー、ならびにD5のDEループおよびFGループの一部分によって形成されている。窪みを画定する残基を表4に要約する(下記)。窪みの形状および大きさは、Kit外部ドメイン二量体構造において変化している。D4のEFループおよびG鎖、D4-D5リンカー、ならびにD5のB鎖およびDEループによって形成される大きな窪みは、D4のEFループ;D4同型境界面の形成のために決定的に重要な領域の下に位置する。未結合のKit構造および占有されたKit構造の両方の電子密度の質が低いことから明らかであるように、窪みの近くに位置しているD5のDEループの方が、高い柔軟性を有し得ることに留意されたい。図18は、占有されていない単量体(A)およびSCF-二量体(B)のリボンダイアグラムならびにD4-D5ヒンジ領域の周辺の浅い窪みのメッシュ図を示す。

【図19】図19は、D4同型相互作用を媒介する領域の窪みを示す。Kit D4のCDループおよびEFループによって形成される窪んだ表面は、D4同型境界面の真上に位置している。D4由来の残基Y350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390は、外部ドメイン二量体構造中の窪んだ表面に対して、約130Å<sup>2</sup>の表面積を与える。D4同型境界面において重要な役割を果たすGlu386の側鎖は、表面の中心に向かって突き出ている。窪んだ表面の特徴的な特性は、帯電した残基(Glu386およびLys358)によって取り囲まれた小さな疎水性部分である。表面の大きさおよび接近容易性は、D4:D4同型相互作用の際に変化し、CDループの立体構造に変化が起こり、ドメイン先端へと上向きにフォールディングされる。窪んだ表面の形成に関与する残基を表4に要約する(下記)。下記の図のパネルAは、リガンドで占有されたKit D4(図示せず)上に重ねた占有されていないKitのD4ドメイン(金色)のリボンダイアグラムを示し、リガンドで占有された外部ドメイン構造(緑色)と占有されていない外部ドメイン構造(赤色)とではCDループおよびEFループの立体構造が異なっている。D4:D4相互作用のために決定的に重要な残基を棒モデルの形式で示す。パネルBおよびパネルCは、占有されていないKit構造(図19B)およびSCFで占有されたKit構造(図19C)のリボンダイアグラムならびにD4同型境界面の上の浅い窪みのメッシュ図を示す。

【図20】図20は、リガンドが結合するD2領域およびD3領域の窪んだ表面を示す。浅く窪んだ表面は、D2およびD3のリガンド結合表面の一部分に位置している。小さなポケットに関与する残基は、D2由来のY125、G126、H180、R181、K203、V204、R205、P206、およびF208、ならびにD3由来のV238、S239、S240、S241、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269である。ポケットは、親水性残基に取り囲まれた小規模な疎水性部分によって作り出される。占有されていないKit構造とSCFに占有されたKit構造とでは、大きな変化はなく、埋もれた表面積の合計は約500Å<sup>2</sup>である。図AおよびBは、占有されていないKit(A)およびSCFに結合されたKit(B)のリボンダイアグラムならびにD2-D3ポケットのメッシュ図を示す。

【図21】図21は、PDGF受容体の膜近位領域の構造ベースの配列解析およびホモロジーモデリングを示す。図21Aは、PDGFR α、PDGFR β、およびKitのD4のアミノ酸配列(記載順にそれぞれSEQ ID NO: 148~157)のアライメントを示す。IgSFフォールドの重要な残基およびヒトKit構造のD4のIgフォールドのコア残基のアミノ酸にそれぞれ対応して赤色および緑色に塗っている。D4同型相互作用を担っている2つの重要な塩基性残基および酸性残基をそれぞれ青色および赤色の四角で囲む。Ig様ドメイン(B5およびF5)上の保存されたジスルフィド結合形成システイン残基に対応する位置にアスタリスクでマークを付ける。β鎖は、Kit配列の下に矢印によってラベルを付けている。IgSFの命名法に従って、二次構造要素にマークを付ける。図21Bは、PDGFRの細胞外ドメインの膜近位領域のモデルを示す。PDGFR β 外部ドメインの膜近位領域を白色に塗り、透明な分子表面と共にリボンとして示す(D4はオレンジ色に塗り、D5はピンク色に塗った;左のパネル)。隣接する2つのPDGFR β 分子のD4-D4境界面をさらに拡大した図(右のパネル)から、D4間の相互作用が、隣接する2つのEFループから突き出た残基Arg385およびGlu390によって媒介されることが実証される

。重要なアミノ酸にラベルを付け、棒モデルとして示す。

【図 2 2】図22は、PDGFによって誘導されるPDGFR活性化が、D4の変異によって損なわれることを実証する実験の結果を示す。図22Aは、PDGFによって誘導されるPDGFR  $\beta$  のチロシン自己リン酸化が、PDGFR  $\beta$  のE390A変異体、R385A変異体、RE/AA変異体、およびRKE/AAA変異体を発現する細胞において著しく損なわれていることを実証する実験の結果を示す。図22Bは、野生型PDGFR  $\beta$  および変異PDGFR  $\beta$  の置換曲線を示すグラフである。Prism4を用いたカーブフィッティングによって、IC50値を決定した。図22Cは、R385A変異、E390A変異、またはRE/AA変異が、PDGFRの内因性のチロシンキナーゼ活性に影響しないことを実証するイムノプロットの結果を示す。

【図 2 3】図23は、PDGFで刺激された、D4ドメインの変異したPDGFR  $\beta$  が、不活性な二量体の形態で細胞表面で発現されることを実証する免疫沈降実験の結果を示す。抗PDGFR抗体を用いて細胞溶解物を免疫沈降させ、免疫沈殿物(immunopellet)をSDS-PAGEによって解析し、それぞれ、抗flag抗体(左のパネル)および抗ホスホチロシン抗体(右のパネル)を用いてイムノプロットを行った。

【図 2 4】図24は、PDGFによって誘導される細胞応答が、PDGFR  $\beta$  D4変異体における変異によって損なわれることを実証する免疫沈降実験の結果を示す。

【図 2 5】図25は、PDGFによるアクチンリング形成の刺激が、PDGFR D4変異体を発現するMEFにおいて損なわれていることを実証する実験の結果を示す。野生型PDGFRを発現するMEFの約83%が環状アクチンリング形成を示したのに対し、PDGFR D4変異細胞では、50ng/mlのPDGFで2分間刺激した後に同様の環状アクチンリング形成を示したのは5%に過ぎなかった。さらに、野生型PDGFRを発現するMEFでは2~5分間のPDGF刺激後にピークに達する一過性の環状アクチンリング形成は、R385A PDGFR変異体、E390A PDGFR変異体、またはRE/AA PDGFR変異体を発現する細胞では弱く検出された。

【図 2 6】図26は、PDGFR内在化およびユビキチンを介したPDGFR分解が、PDGFRのD4の変異によって損なわれることを実証する実験の結果を示す。図26Aは、野生型PDGFRを発現するMEFに結合された<sup>125</sup>I標識PDGFの内在化の動態が、E390A PDGFR、R385A PDGFR、またはRE/AA PDGFRを発現する細胞に結合された<sup>125</sup>I標識PDGFの内在化の動態よりはるかに速いことを実証するグラフである。図26Bは、R385A PDGFR変異体、E390A PDGFR変異体、またはRE/AA PDGFR変異体の分解の動態が著しく衰えていたことを示す;野生型PDGFRの半分がPDGF刺激から1.5時間以内に分解したのに対し、PDGFR D4変異体の半減期は、約4~6時間に延びた。図26Cは、PDGFによって誘導されるE390A PDGFRユビキチン化の刺激もまた、同様の条件下の野生型PDGFRと比べて著しく減少していたことを示す実験を示す。

【図 2 7】図27は、D4境界面を混乱させると、KITにおける発癌性変異が阻止されることを実証する実験の結果を示す。野生型KITをSCFで刺激すると、KIT活性化が促進され、これは、KITのチロシン自己リン酸化の増大によって明らかになる。この実験は、KITの発癌性D5-リピート変異体が構成的にチロシン自己リン酸化されていることをさらに示す。一方、D5-リピート/E386A変異体は、発癌性のD5-リピート変異によって媒介されるKITの構成的チロシン自己リン酸化を妨げる。

【図 2 8】図28は、KIT-D4の同型相互作用モチーフに対応するペプチドに対する抗体が、完全長のKIT受容体を認識することを実証するイムノプロット実験の結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

発明の詳細な説明

本発明は、ヒト受容体型チロシンキナーゼ、例えばIII型またはV型の受容体型チロシンキナーゼ、例えばヒトKit(SCF受容体としても公知)またはPDGFR  $\alpha$  もしくはPDGFR  $\beta$  の外部ドメイン、例えば、Ig様ドメインまたはIg様ドメイン間のヒンジに結合する部分、例えば、抗体またはその抗原結合部、低分子、ペプチド分子、アプタマー、およびアドネクチンを提供する。本発明のこれらの部分は、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留め、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害する。本発明の1つの態様において、この部分は、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを単量体の状

10

20

30

40

50

態に留める。本発明の別の態様において、この部分は、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインが二量体化するのを許容するが、2つの単量体のIg様ドメイン(例えば、III型受容体型チロシンキナーゼのD4-D4ドメインもしくはD5-D5ドメイン、またはV型受容体型チロシンキナーゼのD7-D7ドメイン)の位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼし、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害する。言い換えると、この部分は、リガンドによって誘導される受容体型チロシンキナーゼ外部ドメインの二量体化を許容し得るが、細胞表面境界面における2つの外部ドメインの位置付けに影響を及ぼすか、または受容体型チロシンキナーゼの立体構造的変化を変更もしくは妨害し、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害し得る(例えば、受容体内在化の阻害および/もしくは受容体のチロシン自己リン酸化の阻害ならびに/または受容体が下流のシグナル伝達経路を活性化する能力の阻害)。本発明は、単量体型ならびにリガンドによって誘導されたホモ二量体型の両方の受容体型チロシンキナーゼKitの外部ドメイン全体の結晶構造の解読に少なくとも部分的に基づく。これらの結晶構造の解読により、本発明の部分が標的とし得るエピトープ、例えば、立体構造エピトープの同定が可能になった。

#### 【0037】

本明細書において使用される場合、「部分」という用語は、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメイン、例えばIg様ドメインに結合し、不活性状態、例えば単量体の状態に受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを留め、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性に拮抗する任意の部分を含むと意図される。部分は、単離された抗体もしくはその抗原結合部;低分子;ペプチド分子(例えば、受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインの構造に基づいて設計されたペプチド分子);アプタマー、またはアドネクチンでよい。いくつかの局面において、部分は、受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインを連結するヒンジ領域(例えば、III型RTKのD3-D4ヒンジ領域またはD4-D5ヒンジ領域)に結合する。

#### 【0038】

いくつかの態様において、部分は、ヒトKit受容体の特異的配列、例えば、ヒトKitの残基309~413番、残基410~519番、<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Glu、または<sup>418</sup>Tyrおよび<sup>505</sup>Asnに結合する。残基309~413番はD4ドメインを含み、残基410~519番はヒトKitのD5ドメインを含み、これらはKit受容体二量体化に不可欠であることが本明細書において示される。残基<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Gluは、D4ドメインの非共有結合的会合、およびしたがって受容体の二量体化のために重要であることが本明細書において示される、KitのD4ドメイン中の残基である。同様に、残基<sup>418</sup>Tyrおよび<sup>505</sup>Asnも、受容体の二量体化のために重要であることが本明細書において示される、KitのD5ドメイン中の残基である。当業者は、前述の残基に特異的に結合する部分が、例えば、2つの単量体Kit分子の二量体化を妨害することによって、受容体の活性に拮抗できることを理解するであろう。

#### 【0039】

その他の態様において、部分は、<sup>417</sup>Thr、<sup>418</sup>Tyr、<sup>419</sup>Asp、<sup>421</sup>Leu、<sup>420</sup>Arg、<sup>503</sup>Tyr、または<sup>502</sup>Alaの内の少なくとも1つである、ヒトKitの変異したアミノ酸残基に結合する。

#### 【0040】

好ましい態様において、本発明の部分は、表4(下記)で説明する小さな窪みまたはポケットを構成する、Kit受容体の1個または複数個の残基に結合する。例えば、本発明の部分は、Kit受容体のD3-D4ヒンジ領域中の1個または複数個の次の残基:D3ドメイン由来のK218、S220、Y221、L222およびD4ドメイン由来のF340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、Y373に結合し得る。本発明の部分はまた、Kit受容体のD4ドメイン中の窪んだ表面を構成する1個または複数個の次の残基:Y350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390にも結合し得る。別の態様において、本発明の部分は、Kit受容体のD2-D3ヒンジ領域中のポケットを形成する1個または複数個の次の残基:D2ドメイン由来のY125、G126、H180、R181、K203、V204、R205、P206、およびF208ならびにD3ドメイン由来のV238、S239、S240、S241、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269に結合する。

## 【0041】

したがって、いくつかの態様において、本発明の部分は、連続的なアミノ酸残基または非連続的なアミノ酸残基に結合し、チロシンキナーゼ活性化を可能にする距離および向きにRTKの膜近位領域を位置付けるために必要な動きを妨害する分子くさびとして機能し得る。また、本発明の部分は、同型もしくは異型のD4もしくはD5の受容体相互作用を妨害するか、またはリガンド-受容体相互作用部位を不安定化する役割を果たし得る。いくつかの好ましい態様において、本発明の部分は、Kit受容体上の1個または複数個の次の残基：

Y125, G126, H180, R181, K203, V204, R205, P206, P206, F208,

K127, A207, V238, S239, S240, S241, H263, G265, D266, F267, N268, Y269, T295,

10

L222, L222, L223, E306, V308, R224, V308, K310, K218, A219, S220, K218, A220,

Y221, A339, D327, D398, E338, E368, E386, F312, F324, F340, F355, G311, G384,

G387, G388, I371, K342, K358, L382, L379, N326, N367, N370, N410, P341, S369,

T385, V325, V407, V409, Y373, Y350, Y408, T380, T390, R381, R353, T411, K412,

E414, K471, F433, G470, L472, V497, F469, A431,またはG432

に結合する。当業者は、いくつかの態様において、本発明の部分が、他のIII型RTK中の対応する残基、例えば、同様のポケットもしくは窪みを形成する残基または構造アライメントもしくは配列アライメントによって同じ位置になる残基を容易に標的とできることを理解するであろう。

20

## 【0042】

特定の態様において、本発明の部分は、III型RTK上の立体構造エピトープまたは不連続エピトープに結合する。立体構造エピトープまたは不連続エピトープは、III型RTK、例えば、ヒトKit受容体またはPDGF受容体に由来するD3ドメイン、D4ドメイン、および/もしくはD5ドメインまたはD4-D5ヒンジ領域もしくはD3-D4ヒンジ領域に由来する2個以上の残基から構成され得る。例えば、立体構造エピトープまたは不連続エピトープは、表4に挙げる2個以上の残基から構成され得る。

## 【0043】

特定の態様において、本発明の部分は、

30

Y125,

H180, R181, K203, V204, R205, P206, V238, S239, S240, H263, G265, D266, F267,

N268, およびY269

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープに結合する。同様の態様において、本発明の部分は、次のアミノ酸の群：

P206, F208, V238, および S239; K127, A207, F208, および  
 T295; L222, A339, F340, K342, E368, S369, N370, I371, および Y373; L222, L223, E306,  
 V308, F312, E338, F340, および I371; R224, V308, K310, G311, F340, P341, および D398;  
 K218, A219, S220, N367, E368, および S369; K218, A220, E368, および S369; G384, T385,  
 T411, K412, E414, および K471; Y408, F433, G470, K471, および L472; F324, V325, N326,  
 および N410; D327, N410, T411, K412, および V497; G384, G387, V409, および K471; L382,  
 G387, V407, および V409; Y125, G126, H180, R181, K203, V204, R205, P206, F208,  
 V238, S239, S240, S241, H263, G265, D266, F267, N268, および Y269; P206, F208,  
 V238, および S239; K218, S220, Y221, L222, F340, P341, K342, N367, E368, S369,  
 N370, I371, および Y373; G384, G387, G388, Y408, V409, T411, F433, F469, G470, および  
 K471; D327, T411, K412, E414, A431, G432, および K471; Y350, F355, K358, L379,  
 T380, R381, L382, E386, および T390; Y350, R353, および F355

10

の内の1つより選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープに結合し  
 得る。先に示したように、本発明の部分は、表4において特定するポケットもしくは窪み  
 を形成するアミノ酸残基すべてに結合し得るか、または、それらはポケットもしくは窪み  
 を形成する残基の一部に結合し得る。特定の態様において、エピトープ、例えば立体構造  
 エピトープに結合する本発明の部分に言及する場合、その部分がエピトープ(例えば、表4  
 において特定するポケットもしくは窪み)を構成する特異的残基のみに結合し、受容体の  
 直線状アミノ酸配列中の他の残基には結合しないという趣旨であることを理解すべきであ  
 る。

20

#### 【0044】

さらなる態様において、本発明の部分は、表5に挙げるペプチドより選択される2個以上  
 のアミノ酸残基から構成される立体構造エピトープに結合する。特定の態様において、立  
 体構造エピトープは、第1のペプチドより選択される1個、または複数個のアミノ酸残基お  
 よび第2のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸残基から構成され、第1の  
 ペプチドおよび第2のペプチドは、表5に挙げるペプチドの群より選択される。したがって  
 、本発明の部分は、表5の第1のペプチドおよび第2のペプチドの群が次のとおりである立  
 体構造エピトープに結合し得る：

30

Ala219-Leu222およびThr304-Val308;  
 Asp309-Gly311およびArg224-Gly226; Thr303 - Glu306およびAla219-Leu222; Asn367-  
 Asn370およびSer217-Tyr221; Ala339-Pro343およびAsn396-Val399; Ala339-Pro343および  
 Glu368-Arg372; Lys358-Tyr362およびVal374-His378; Asp357-Glu360およびLeu377-  
 Thr380; Met351-Glu360およびHis378-Thr389; His378-Thr389およびVal323-Asp332;  
 Val409-Ile415およびAla493-Thr500; Val409-Ile415およびAla431-Thr437; Val409-Ile415  
 およびPhe469-Val473; Val409-Ile415およびVal325-Asn330; Val409-Ile415およびArg381-  
 Gly387; Gly466-Leu472およびGly384-Gly388; Val325-Glu329およびTyr494-Lys499;  
 Thr411-leu416およびVal497-Ala502; Ile415-Leu421およびAla502-Ala507; Ala502-  
 Ala507およびLys484-Thr488; ならびに Ala502-Ala507およびGly445-Cys450

40

。本発明の部分は、前述の第1のペプチドおよび第2のペプチドの群を形成するアミノ酸残

50

基すべてに結合し得るか、または、それらは第1のペプチドおよび第2のペプチドの群を形成する残基の一部に結合し得る。特定の態様において、エピトープ、例えば立体構造エピトープに結合する本発明の部分に言及する場合、その部分がエピトープ(例えば、表5において特定する特異的ペプチド)を構成する特定の残基のみに結合し、受容体の直線状アミノ酸配列中の他の残基には結合しないという趣旨であることを理解すべきである。

【0045】

別の態様において、本発明の部分は、

E33, P34, D72, E76, N77, K78, Q79, K158, D159, N250, S251, Q252,  
T253, K254, L255, N260, W262, H264, G265, E344, N352, R353, F355, T356, D357,  
Y362, S365, E366, N367, N370,およびG466

10

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープまたは不連続エピトープに結合する。

【0046】

別の態様において、本発明の部分は、ヒトPDGFR  $\beta$  のアミノ酸残基<sup>385</sup>Argおよび<sup>390</sup>Glu、またはPDGFR  $\alpha$  中の対応する残基に結合する。ヒトPDGFR  $\beta$  の残基<sup>385</sup>Argおよび<sup>390</sup>Gluは、Kit受容体の残基<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Gluに類似しており、PDGFR  $\beta$  のD4-D4同型相互作用を媒介する。本発明の部分は、チロシンキナーゼ活性化のために不可欠な距離および向きに細胞質内ドメインを位置付けるために不可欠である、III型RTKの膜近位領域間の決定的に重要な同型相互作用(例えば、ヒトPDGFR  $\beta$  の<sup>385</sup>Argと<sup>390</sup>Gluの間で形成される塩橋)を妨害することによって、受容体活性化に対する阻害効果を及ぼし得る。本明細書において考察する実験により、D4-D4同型相互作用がPDGFR  $\beta$  二量体化のために必須ではないこと、およびPDGFR  $\beta$  二量体化は受容体活性化のために必要ではあるが十分ではないことが実証される。したがって、本発明の部分は、活性化を妨害しつつ、PDGFR  $\beta$  の二量体化を許容し得る。構造ベースの配列アラインメントにより、EFループのサイズ、およびD4-D4境界面を含む決定的に重要なアミノ酸が、Kit、PDGFR  $\alpha$ 、PDGFR  $\beta$ 、およびCSF1Rで保存されていることが示された。したがって、いくつかの態様において、本発明の部分は、III型RTKのD4ドメインまたはD5ドメインの保存領域を標的とすることができる。また、本発明の部分が、グリコシル化型RTK上に出現し得る糖残基に結合できることも、当業者は理解するであらう。本発明の部分がアミノ酸残基および糖残基の両方から構成されるエピトープに結合することも、さらに可能である。

20

30

【0047】

「受容体型チロシンキナーゼ」および「RTK」という用語は、本明細書において同義的に使用されて、チロシン残基をリン酸化する膜受容体の周知のファミリーを意味する。多くは、発生または細胞分裂の際に重要な役割を果たす。受容体型チロシンキナーゼは、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内触媒ドメインを有する。細胞外ドメインは、サイトカイン、増殖因子、または他のリガンドに結合し、一般的に、システインに富む領域、フィブロネクチンIII様ドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、EGF様ドメイン、カドヘリン様ドメイン、クリングル様ドメイン、第VIII因子様ドメイン、グリシンに富む領域、ロイシンに富む領域、酸性領域、およびジスコイジン様ドメインを含む、1つまたは複数の同定可能な構造モチーフからなる。細胞内キナーゼドメインの活性化は、受容体の二量体化を誘導する、細胞外ドメインへのリガンド結合によって実現される。こうして活性化された受容体は、触媒ドメインの外のチロシン残基を自己リン酸化して、活性な受容体立体構造の安定化を促進することができる。リン酸化された残基はまた、次いで細胞内でシグナルを伝達するタンパク質に対する結合部位として役立つ。RTKの例には、Kit受容体(幹細胞因子受容体またはSCF受容体としても公知)、線維芽細胞増殖因子(FGF)受容体、肝細胞増殖因子(HGF)受容体、インスリン受容体、インスリン様増殖因子-1(IGF-1)受容体、神経成長因子(NGF)受容体、血管内皮増殖因子(VEGF)受容体、PDGF受容体  $\alpha$ 、PDGF受容体  $\beta$ 、CSF-1受容体(M-CSF受容体またはFmsとしても公知)、およびFlt3受容

40

50

体(Flk2としても公知)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0048】

本発明の好ましい態様において、RTKはIII型RTKである。本発明の別の態様において、RTKはV型RTK、すなわち、VEGF受容体ファミリーのメンバーである。

【0049】

本明細書において使用される場合、「III型ファミリーの受容体型チロシンキナーゼ」または「III型RTK」という用語は、典型的には5個の免疫グロブリン様ドメインまたはIg様ドメインを外部ドメイン中に含む受容体型チロシンキナーゼを含むと意図される。III型RTKの例には、PDGF受容体、M-CSF受容体、FGF受容体、Flt3受容体(Flk2としても公知)、およびKit受容体が含まれるが、それらに限定されるわけではない。本発明の好ましい態様において、III型RTKはKit(当技術分野においてSCF受容体としても公知)である。Kitは、他のIII型RTKと同様に、単一の膜貫通(TM)ドメインによって細胞質内領域に結合される、グリコシル化された細胞外リガンド結合ドメイン(外部ドメイン)から構成されている(Schlessinger (2000) Cell 103: 211-225に総説がある)。III型RTK、例えばKitまたはPDGFRの別の特徴は、大きなキナーゼ挿入領域を有する細胞質内タンパク質チロシンキナーゼ(PTK)ドメインである。Kit受容体には少なくとも2種のスプライシングアイソフォームが存在することが公知であり、短い方は、インフレームのスプライス部位を利用する。Kitの全アイソフォームおよび他の前述のRTKは、本発明に包含される。

【0050】

本明細書において使用される場合、受容体型チロシンキナーゼ(RTK)の「Ig様ドメイン」は、RTKの外部ドメイン中に存在することが当技術分野において周知であるドメインを含むと意図される。III型受容体型チロシンキナーゼ(III型RTK)のファミリー、例えばKitの外部ドメインには、D1、D2、D3、D4、およびD5として公知のこのような5個のドメインがある。III型RTKのD1ドメイン、D2ドメイン、およびD3ドメインは、RTKのリガンド結合を担っている(UllrichおよびSchlessinger (1990) Cell 61: 203-212に総説がある)。したがって、本発明の1つの態様において、「Ig様ドメイン」という用語は、リガンド結合を担っているRTKのドメインを含むと意図されない。本発明の好ましい態様において、Ig様ドメインはIII型RTKのD4ドメインおよび/またはD5ドメインである。VEGF受容体ファミリーの外部ドメインには、D1、D2、D3、D4、D5、D6、およびD7として公知の7個のIg様ドメインがある。本発明の1つの好ましい態様において、Ig様ドメインはVEGF受容体ファミリーのD7ドメインである。

【0051】

本明細書において使用される場合、V型RTKとしても公知の「VEGF受容体ファミリー」という用語は、血管内皮増殖因子に対するRTK受容体を含む。前述したように、これらのRTKは外部ドメインに7個のIg様ドメインを有する。VEGFファミリー受容体の例は、VEGFR-1(Flt-1としても公知)、VEGFR-2(KDRまたはFlk-1としても公知)、およびVEGFR-3(Flt-4としても公知)である。

【0052】

受容体型チロシンキナーゼ(RTK)の「外部ドメイン」という用語は、当技術分野において周知であり、RTKの細胞外部分、すなわち、形質膜の外側にあるRTKの部分を意味する。

【0053】

受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインの「膜近位領域」という用語は、形質膜の近くにあり、好ましくは、RTKへのリガンド結合を直接担っていないRTKの細胞外部分を意味する。膜近位領域の例には、III型受容体型チロシンキナーゼのD4ドメイン、III型受容体型チロシンキナーゼのD5ドメイン、III型受容体型チロシンキナーゼのD3-D4ヒンジ領域、III型受容体型チロシンキナーゼのD4-D5ヒンジ領域、V型受容体型チロシンキナーゼのD7ドメインが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0054】

本明細書において使用される「同型相互作用」という用語は、2つの単量体受容体に由来する2つの同一な膜近位領域間の相互作用を意味する。

## 【0055】

本明細書において使用される「異型相互作用」という用語は、2つの単量体受容体に由来する2つの異なる膜近位領域間の相互作用を意味する。異型相互作用は、2つの異なる型の単量体受容体が二量体化した結果、または同じ単量体受容体の野生型および変異型が二量体化した結果であり得る。例えば、癌患者は、ある種の受容体に関して野生型対立遺伝子および変異対立遺伝子を有する可能性があることは、当技術分野において周知である。

## 【0056】

本明細書において使用される「単量体の状態」という用語は、RTK分子が同じ型または異なる型の第2のRTKポリペプチドと結合していない単一のポリペプチド鎖から構成されている、RTKの状態を意味する。RTKが二量体化すると、自己リン酸化および受容体活性化が起こる。したがって、単量体の状態のRTKは不活性状態にある。また、単量体の状態は、1つのRTKのD4ドメインまたはD5ドメインが、それぞれ第2のRTKのD4ドメインまたはD5ドメインと結合していない状態である。

## 【0057】

「受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める」という語句は、本発明の部分が受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害する能力を意味する。言い換えると、この語句は、本発明の部分が、不活性化された、または阻害された受容体の立体配置を形成する方向に平衡状態を移動させる能力を含む。例えば、本発明の部分は、この部分の不在下での受容体の活性と比べて、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%、受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害し得る。

## 【0058】

本明細書において使用される「不活性状態」という用語は、RTK分子が下流のシグナル伝達を活性化することができないRTKの状態を意味する。不活性状態は、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインが二量体化することは許容されるが、2つの単量体のIg様ドメイン(例えば、III型受容体型チロシンキナーゼのD4-D4ドメインもしくはD5-D5ドメイン、またはV型受容体型チロシンキナーゼのD7-D7ドメイン)の位置付け、向き、立体構造、および/またはそれらの間の距離が変化し、その結果、受容体型チロシンキナーゼの活性が阻害される(例えば、受容体内在化が阻害され、かつ/または受容体のチロシン自己リン酸化が阻害され、かつ/または受容体が下流のシグナル伝達経路を活性化する能力が阻害される)状態であり得る。不活性状態はまた、前述の単量体の状態も含む。不活性状態はまた、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインが受容体リガンドに結合され二量体化しているが、受容体の活性化を可能にさせる立体構造的変化をまだ経ていない状態でもよい。実施例22~25では、RTK活性化のために非常に重要である(例えば、D4またはD5の同型相互作用を媒介することによる)が、受容体二量体化のために必須ではない特異的な保存アミノ酸残基があることを示す実験をさらに考察する。「不活性状態」という用語は、本発明の部分が、この部分の不在下での受容体の活性と比べて、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%、受容体型チロシンキナーゼの活性を低減または阻害し得る状態を含む。本明細書において説明する機能アッセイ法のいずれかを用いて、本発明の部分が受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害する能力を決定することができる。いくつかの態様において、本発明の部分は、例えば、大半またはすべての標的RTKが不活性化される場合、幅広い効果を示し得る。他の態様において、本発明の部分は、例えば、一部の標的RTKが不活性化される場合、より限られた効果を示し得る。このような態様において、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%の受容体は、前記部分の不在下での受容体と比べて、不活性状態に留められている。

## 【0059】

本明細書において使用される場合、「立体構造エピトープ」または「非直線状エピトープ」または「不連続エピトープ」という用語は同義的に使用され、単一のタンパク質鎖中

の連続していないアミノ酸である少なくとも2個のアミノ酸から構成されるエピトープを意味する。例えば、立体構造エピトープは、介在するアミノ酸のストレッチによって隔てられているが、単一のエピトープとして本発明の部分によって認識されるのに十分な近さにある2個以上のアミノ酸からなっておりよい。さらなる例として、単一のタンパク質鎖上で介在するアミノ酸によって隔てられているアミノ酸、または別々のタンパク質鎖上に存在するアミノ酸が、タンパク質の構造または複合体の立体構造的形状の寄与により近付けられて、本発明の部分が結合し得る立体構造エピトープになる場合もある。具体的な不連続エピトープおよびコンフォメーションエピトープ(conformation epitope)を本明細書において説明する(例えば、表4および表5を参照されたい)。

#### 【0060】

一般に、本発明の部分が結合する直線状エピトープは、RTKの二次構造、三次構造、もしくは四次構造に依存してもよく、またはしなくてもよいことを当業者は理解するであろう。例えば、いくつかの態様において、本発明の部分は、天然の三次元タンパク質構造においてそれらがフォールディングされているかどうかに関わらず、アミノ酸の群に結合し得る。他の態様において、本発明の部分は、エピトープを構成する個々のアミノ酸残基を認識しなくてもよく、エピトープを認識し結合するために、特定の立体構造(屈曲、ねじれ、ターン、またはフォールド)を必要とし得る。

#### 【0061】

本発明の様々な局面を以下の小節においてさらに詳細に説明する。

#### 【0062】

#### I. ヒト受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインに結合する抗体

本発明の1つの局面において、ヒト受容体型チロシンキナーゼの外部ドメイン、例えばIg様ドメインまたはヒンジ領域に結合する部分は、抗体またはその抗原結合断片である。

#### 【0063】

本明細書において言及される「抗体」という用語は、全長抗体および任意の抗原結合断片(すなわち「抗原結合部」)またはその単鎖を含む。「抗体」とは、ジスルフィド結合によって相互に連結されている少なくとも2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖を含む糖タンパク質またはその抗原結合部を意味する。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書において $V_H$ と略される)および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、3種のドメイン、すなわち $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 、および $C_{H3}$ からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書において $V_L$ と略される)および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1種のドメイン、すなわち $C_L$ からなる。 $V_H$ 領域および $V_L$ 領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる保存の程度が高い領域と共に散在している、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域にさらに細分することができる。各 $V_H$ および $V_L$ は、3つのCDRおよび4つのFRから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端まで次の順序で配列されている:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えばエフェクター細胞)および古典的な補体系の第1成分(C1q)を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

#### 【0064】

抗体の「抗原結合部」(または単に「抗体部分」)という用語は、本明細書において使用される場合、ある抗原(例えば、KitのD4ドメインまたはD5ドメイン)に特異的に結合する能力を保持している、抗体の1つまたは複数の断片を意味する。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって果たされ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部」という用語に包含される結合断片の例には、(i)Fab断片、すなわち $V_L$ ドメイン、 $V_H$ ドメイン、 $C_L$ ドメイン、および $C_{H1}$ ドメインからなる一価の断片;(ii) $F(ab')_2$ 断片、すなわちヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価の断片;(iii)本質的には、ヒンジ領域の部分を有するFabであるFab'断片(FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY(Paul編、第3版、1993)を参照されたい);(iv) $V_H$ ドメインおよび $C_{H1}$ ドメインからなるFd断片;(v)抗体の単一の腕の $V_L$ ドメインおよび $V_H$ ドメインからなるFv断片;(vi) $V_H$ ドメインからなるdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546);(vii)単離された相補性決定領域(CDR);

ならびに(viii)ナノボディ、すなわち単一の可変ドメインおよび2つの定常ドメインを含む重鎖可変領域が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインであるV<sub>L</sub>およびV<sub>H</sub>は別々の遺伝子によってコードされているが、V<sub>L</sub>領域およびV<sub>H</sub>領域が対になって一価の分子(単鎖Fv(scFv)として公知;例えば、Bird et al. (1988)Science 242:423-426およびHuston et al. (1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい)を形成している単一のタンパク質鎖としてそれらを作製するのを可能にする合成リンカーを用いて、組換え法によってこれらを連結することができる。このような単鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部」という用語に包含されることが意図される。これらの抗体断片は、当業者に公知である従来の技術を用いて得られ、かつこれらの断片は、完全な抗体と同じ様式で、有用性についてスクリーニングされる。

10

**【0065】**

「単離された抗体」とは、本明細書において使用される場合、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を意味すると意図される(例えば、RTKのIg様ドメインに特異的に結合する単離された抗体は、RTKのIg様ドメイン以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。さらに、単離された抗体は、他の細胞材料および/または化学物質を実質的に含まなくてよい。しかしながら、「単離された抗体」は、例えばRTKのIg様ドメインにすべてが特異的に結合するポリクローナル抗体を含んでよい。

**【0066】**

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一の分子組成の抗体分子の調製物を意味する。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。

20

**【0067】**

「ヒト抗体」という用語は、本明細書において使用される場合、フレームワーク領域およびCDR領域の両方がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を含むと意図される。さらに、抗体が定常領域を含む場合は、定常領域もまた、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的な変異によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入される変異)を含んでよい。しかしながら、「ヒト抗体」という用語は、本明細書において使用される場合、マウスのような別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上にグラフトされている抗体を含むとは意図されない。

30

**【0068】**

「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、フレームワーク領域およびCDR領域の両方がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する、単一の結合特異性を示す抗体を意味する。1つの態様において、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合された、ヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られるB細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

**【0069】**

「組換えヒト抗体」という用語は、本明細書において使用される場合、(a)ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックであるか、もしくは染色体導入された動物(例えばマウス)、またはそれから調製されるハイブリドーマ(下記に詳述する)から単離された抗体、(b)ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えばトランスフェクトマ(transfectoma)から単離された抗体、(c)組換えヒト抗体コンビナトリアルライブラリーから単離された抗体、および(d)ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列への接合を含む他の任意の手段によって調製、発現、作製、または単離された抗体など、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離されたすべてのヒト抗体を含む。このような組換えヒト抗体は、フレームワーク領域およびCDR領域がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、特定の態様において、このような組換えヒト抗体は、インビトロの変異誘発(または、ヒトIg配列に関してトランスジェ

40

50

ニックな動物が使用される場合は、インビボの体細胞変異誘発)に供されてよく、したがって、組換え抗体の $V_H$ 領域および $V_L$ 領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列の $V_H$ 配列および $V_L$ 配列に由来し、かつ関係しているが、インビボのヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然には存在し得ない配列である。

【0070】

本明細書において使用される場合、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子にコードされる抗体クラス(例えば、IgMまたはIgG1)を意味する。

【0071】

「ある抗原を認識する抗体」および「ある抗原に特異的な抗体」という語句は、「ある抗原に特異的に結合する抗体」という用語と同義的に本明細書において使用される。

10

【0072】

「ヒト抗体誘導体」という用語は、ヒト抗体の任意の改変型、例えば、その抗体と別の作用物質または抗体との結合体を意味する。

【0073】

「ヒト化抗体」という用語は、マウスのような別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列上にグラフティングされている抗体を意味すると意図される。さらなるフレームワーク領域の改変を、ヒトフレームワーク配列内に起こしてもよい。配列が特定の種に「由来する」場合、可変領域アミノ酸がマウス抗体から受け継がれる場合のように該配列はタンパク質配列であってよいこと、または、可変領域をコードする核酸がマウスDNAから受け継がれる場合のように該配列はDNA配列であってよいことを、当業者は理解するであろう。また、ヒト化抗体は、ヒト抗体および非ヒト(例えば、マウスまたはウサギ)抗体の公知の配列をベースとして設計してもよい。ヒト残基および非ヒト残基の両方を潜在的に組み入れて設計された抗体は、化学的に合成することができる。また、これらの配列をDNAレベルで合成し、インビトロまたはインビボで発現させてヒト化抗体を作製することもできる。

20

【0074】

「キメラ抗体」という用語は、可変領域配列がマウス抗体に由来し、かつ定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体のような、可変領域配列がある種に由来し、かつ定常領域配列が別の種に由来する抗体を意味すると意図される。

【0075】

「抗体ミメティック」または「抗体模倣体」という用語は、抗原に結合する抗体の能力を模倣できるが、天然の抗体構造物に限定されない分子を意味すると意図される。このような抗体ミメティックの例には、非限定的に、Adnectin(アドネクチン)(すなわち、フィブロネクチンをベースとする結合分子)、Affibody(アフィボディ)、DARPin、Anticalin(アンチカリン)、Avimer(アビマー)、およびVersabody(バーサボディ)が含まれ、これらはすべて、従来の抗体結合を模倣する一方で、異なるメカニズムから生じ、かつそれを介して機能する結合構造体を使用する。本発明の態様はまた、抗体またはその抗原結合部を対象とするように、前述の抗体ミメティックにも適用される。

30

【0076】

本明細書において使用される場合、RTKのIg様ドメインに「特異的に結合する」抗体とは、 $1 \times 10^{-7} M$ またはそれ未満、より好ましくは $5 \times 10^{-8} M$ またはそれ未満、より好ましくは $1 \times 10^{-8} M$ またはそれ未満、より好ましくは $5 \times 10^{-9} M$ またはそれ未満の $K_D$ でRTKのIg様ドメインに結合する抗体を意味すると意図される。

40

【0077】

あるタンパク質または細胞に「実質的に結合しない」という用語は、本明細書において使用される場合、そのタンパク質にも細胞にも結合しないか、または高い親和性で結合しないこと、すなわち、 $1 \times 10^{-6} M$ 以上、より好ましくは $1 \times 10^{-5} M$ 以上、より好ましくは $1 \times 10^{-4} M$ 以上、より好ましくは $1 \times 10^{-3} M$ 以上、さらにより好ましくは $1 \times 10^{-2} M$ 以上の $K_D$ でそのタンパク質または細胞に結合することを意味する。

【0078】

50

「 $K_{assoc}$ 」または「 $K_a$ 」という用語は、本明細書において使用される場合、特定の抗体-抗原相互作用の結合速度を意味すると意図されるのに対し、「 $K_{dis}$ 」または「 $K_d$ 」という用語は、本明細書において使用される場合、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を意味すると意図される。「 $K_D$ 」という用語は、本明細書において使用される場合、 $K_a$ に対する $K_d$ の比率(すなわち $K_d/K_a$ )から得られ、モル濃度(M)として表される、解離定数を意味すると意図される。抗体の $K_D$ 値は、当技術分野において十分に確立された方法を用いて決定することができる。抗体の $K_D$ を決定するための好ましい方法は、表面プラズモン共鳴を用いること、好ましくはBiacore(登録商標)システムのようなバイオセンサーシステムを用いることによる。

#### 【0079】

本明細書において使用される場合、「高親和性」という用語は、IgG型抗体に関する場合、RTKのIg様ドメインに対する $K_D$ が $10^{-8}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $10^{-9}$ Mまたはそれ未満、およびさらにより好ましくは $10^{-10}$ Mまたはそれ未満である抗体を意味する。しかしながら、「高親和性」結合は、他の抗体アイソタイプに対しては異なり得る。例えば、IgMアイソタイプに対する「高親和性」結合とは、 $K_D$ が $10^{-7}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $10^{-8}$ Mまたはそれ未満、さらにより好ましくは $10^{-9}$ Mまたはそれ未満である抗体を意味する。

#### 【0080】

抗体

本発明の抗体は、RTK、例えば、受容体型チロシンキナーゼのヒトIII型ファミリーのメンバーのIg様ドメインに特異的に結合する。好ましい態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部がRTK単量体のIg様ドメインに結合すると、外部ドメインが不活性状態、例えば単量体の状態に留められ、したがって、RTKが二量体化して下流のシグナル伝達経路を活性化する能力が弱められる。例えば、抗体は、リガンドによって誘導される、受容体型チロシンキナーゼのチロシン自己リン酸化および/または受容体内在化を妨げ得る。

#### 【0081】

本発明の抗体は、RTKの特異的なIg様ドメイン、例えば、ヒトKitのD4ドメインもしくはD5ドメインまたはVEGF受容体のD7ドメインに結合するように選択または設計される。他の態様において、抗体またはその抗原結合部は、RTK、例えばKit受容体のドメインとの相同性を有するタンパク質に結合するように選択または設計される。例えば、抗体は、Kit受容体のあるドメイン、例えばD4ドメインまたはD5ドメインに少なくとも50%同一、少なくとも60%同一、少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、または少なくとも95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一であるドメインに結合するように選択または設計され得る。このような抗体またはその抗原結合部は、KitのD4ドメインまたはD5ドメインと機能的に類似している、おそらくKitおよび他のRTK中のタンパク質ドメインに結合できると思われる。

#### 【0082】

また、本発明の抗体またはその抗原結合部は、RTK、例えばヒトIII型RTKのIg様ドメインに由来する特定のモチーフまたはコンセンサス配列に結合して、抗体またはその抗原結合部が、RTKのヒトIII型ファミリーのメンバー間、およびIII型RTKと他のRTK、例えばV型RTKの間で共通のエピトープまたはドメインに特異的に結合するのを可能にするように、選択または設計してよい。このような直線状コンセンサス配列は、例えば、様々なRTKのドメイン、例えば、RTKの型全般または種全般に渡るD4ドメインのドメインを整列させる配列アラインメントアルゴリズムを用いて、発見することができる(図6Bを参照されたい)。当業者は、例えば、様々な種(例えば、ヒト、マウス、ラット)に由来するKit D4ドメインのタンパク質配列を整列させて、どのタンパク質残基が、整列された配列の少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも100%で保存されているかを判定することができる。次いで、このようなコンセンサス配列を用いて、コンセンサス配列に特異的に結合し、したがって、Kit RTKの最も保存された残基に結合すると考えられる抗体または他の部分を作製するこ

10

20

30

40

50

とができる。また、同様に、V型RTKのD7ドメインのタンパク質配列を整列させて(図6を参照されたい)、本発明の部分を作製する対象となり得るコンセンサス配列を得ることもできる。当業者は、最も高度に保存された残基が、進化の間に保存され、タンパク質機能のために重要である可能性が最も高い残基であることを当然理解している。あるいは、様々なクラスのRTK全般に渡ってアライメントを行う場合、このようなコンセンサス配列に対して抗体を作製すると、多数のRTK型の類似したIg様ドメインにそれらの抗体が結合することが可能になると思われる。

#### 【0083】

特定の態様において、本発明の部分(例えば、抗体またはその抗原結合部)は、D4相互作用部位の次のコンセンサス配列:

**LX<sub>1</sub>RX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>G**

に結合する部分であり、

配列中、Lはロイシンであり、Rはアルギニンであり、Gはグリシンであり;X<sub>1</sub>は、トレオニン、イソロイシン、バリン、プロリン、アスパラギン、またはリジンからなる群より選択され;X<sub>2</sub>は、ロイシン、バリン、アラニン、およびメチオニンからなる群より選択され;X<sub>3</sub>は、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、およびアルギニンからなる群より選択され;X<sub>4</sub>は、グリシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、プロリン、およびメチオニンからなる群より選択され;X<sub>5</sub>は、トレオニン、セリン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、およびアスパラギン酸からなる群より選択され;X<sub>6</sub>は、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびグルタミンからなる群より選択され;かつ、X<sub>7</sub>は、グリシン、セリン、アラニン、リジン、アルギニン、グルタミン、およびトレオニンからなる群より選択される。

#### 【0084】

別の態様において、本発明の部分(例えば、抗体またはその抗原結合部)は、VEGF受容体ファミリーのメンバーのD7ドメインの次のコンセンサス配列:

**IX<sub>1</sub>RVX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EDX<sub>4</sub>G (SEQ ID NO: 1)**

に結合する部分であり、

配列中、Iはイソロイシンであり、Rはアルギニンであり、Eはグルタミン酸であり、Dはアスパラギン酸であり、Gはグリシンであり;X<sub>1</sub>は、グルタミン酸、アルギニン、およびグルタミンからなる群より選択され;X<sub>2</sub>は、アルギニンおよびトレオニンからなる群より選択され;X<sub>3</sub>は、グルタミン酸およびリジンからなる群より選択され;かつ、X<sub>4</sub>は、グルタミン酸およびアラニンからなる群より選択される。

#### 【0085】

本発明の抗体は、RTKのリガンド結合部位、例えば、Kit受容体のSCF結合部位に結合しない。したがって、本明細書において説明する抗体は、受容体がその標的リガンドに結合する能力に拮抗しない。

#### 【0086】

いくつかの態様において、抗体またはその抗原結合部は、ヒトKit受容体の特異的配列、例えば、ヒトKit受容体の残基309~413番、残基410~519番、<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Glu、または<sup>418</sup>Tyrおよび<sup>505</sup>Asnに結合する。

#### 【0087】

他の態様において、抗体またはその抗原結合部は、タンパク質の三次元構造に相当するタンパク質モチーフまたはコンセンサス配列に結合する。このようなモチーフまたはコンセンサス配列は、連続的な一続きのアミノ酸に相当しないが、RTKの三次元フォールディングの結果として生じる非連続的なアミノ酸配列(すなわち、「構造モチーフ」または「非直線状エピトープ」)に相当する。このようなモチーフの例は、Kit受容体のD4-D4結合境界面またはD5-D5結合境界面である。1つの態様において、本発明の抗体は、例えば、D4-D4境界面またはD5-D5境界面の非直線状エピトープに結合して、RTKの活性化を妨害する。

#### 【0088】

。

10

20

30

40

50

好ましい態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、表4(下記)で説明する小さな窪みまたはポケットを構成する、Kit受容体中の1個または複数個の残基に結合し得る。例えば、本発明の抗体またはその抗原結合部は、Kit受容体のD3-D4ヒンジ領域中の1個または複数個の次の残基:D3ドメイン由来のK218、S220、Y221、L222およびD4ドメイン由来のF340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、Y373に結合し得る。本発明の抗体またはその抗原結合部はまた、Kit受容体のD4ドメイン中の窪んだ表面を構成する1個または複数個の次の残基:Y350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390にも結合し得る。別の態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、Kit受容体のD2-D3ヒンジ領域中のポケットを形成する1個または複数個の次の残基:D2ドメイン由来のY125、G126、H180、R181、K203、V204、R205、P206、およびF208ならびにD3ドメイン由来のV238、S239、S240、S241、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269に結合し得る。

10

**【0089】**

したがって、いくつかの態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、連続的なアミノ酸残基または非連続的なアミノ酸残基に結合し、チロシンキナーゼ活性化を可能にする距離および向きにRTKの膜近位領域辺を位置付けるために必要な動きを妨害する分子くさびとして機能し得る。また、本発明の抗体またはその抗原結合部は、同型のD4もしくはD5の受容体相互作用を妨害するか、またはリガンド-受容体相互作用部位を不安定化する役割を果たし得る。いくつかの好ましい態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、Kit受容体上の1個または複数個の次の残基:

20

**Y125, G126, H180, R181, K203, V204, R205, P206, P206, F208, K127, A207, V238, S239, S240, S241, H263, G265, D266, F267, N268, Y269, T295, L222, L222, L223, E306, V308, R224, V308, K310, K218, A219, S220, K218, A220, Y221, A339, D327, D398, E338, E368, E386, F312, F324, F340, F355, G311, G384, G387, G388, I371, K342, K358, L382, L379, N326, N367, N370, N410, P341, S369, T385, V325, V407, V409, Y373, Y350, Y408, T380, T390, R381, R353, T411, K412, E414, K471, F433, G470, L472, V497, F469, A431,またはG432**

30

に結合し得る。

**【0090】**

当業者は、いくつかの態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部が、他のIII型RTK中の対応する残基、例えば、同様のポケットもしくは窪みを形成する残基または構造アライメントもしくは配列アライメントによって同じ位置になる残基を容易に標的とできることを理解するであろう。

**【0091】**

特定の態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、III型RTK上の立体構造エピトープまたは不連続エピトープに結合する。立体構造エピトープまたは不連続エピトープは、III型RTK、例えば、ヒトKit受容体またはPDGF受容体に由来するD3ドメイン、D4ドメイン、もしくはD5ドメインまたはD4-D5ヒンジ領域もしくはD3-D4ヒンジ領域に由来する2個以上の残基から構成され得る。例えば、立体構造エピトープまたは不連続エピトープは、下記の表4に挙げる2個以上の残基から構成され得る。

40

**【0092】**

特定の態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、

**Y125, H180, R181, K203, V204, R205, P206.**

**V238, S239, S240, H263, G265, D266, F267, N268, および Y269**

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープに結合する。同様の態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、次のアミノ酸の群:

50

P206, F208, V238, および S239; K127, A207, F208, および  
 T295; L222, A339, F340, K342, E368, S369, N370, I371, および Y373; L222, L223, E306,  
 V308, F312, E338, F340, および I371; R224, V308, K310, G311, F340, P341, および D398;  
 K218, A219, S220, N367, E368, および S369; K218, A220, E368, および S369; G384, T385,  
 T411, K412, E414, および K471; Y408, F433, G470, K471, および L472; F324, V325, N326,  
 および N410; D327, N410, T411, K412, および V497; G384, G387, V409, および K471; L382,  
 G387, V407, および V409; Y125, G126, H180, R181, K203, V204, R205, P206, F208,  
 V238, S239, S240, S241, H263, G265, D266, F267, N268, および Y269; P206, F208,  
 V238, および S239; K218, S220, Y221, L222, F340, P341, K342, N367, E368, S369,  
 N370, I371, および Y373; G384, G387, G388, Y408, V409, T411, F433, F469, G470, および  
 K471; D327, T411, K412, E414, A431, G432, および K471; Y350, F355, K358, L379,  
 T380, R381, L382, E386, および T390; Y350, R353, および F355

10

の内の1つより選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープに結合し  
 得る。先に示したように、本発明の抗体は、表4において確認するポケットもしくは窪み  
 を形成するアミノ酸残基すべてに結合し得るか、または、それらはポケットもしくは窪み  
 を形成する残基の一部に結合し得る。特定の態様において、エピトープ、例えば立体構造  
 エピトープに結合する本発明の抗体に言及する場合、その抗体がエピトープ(例えば、表4  
 において特定するポケットもしくは窪み)を構成する特異的残基のみに結合し、受容体の  
 直線状アミノ酸配列中の他の残基には結合しないという趣旨であることを理解すべきであ  
 る。

20

# 【 0 0 9 3 】

さらなる態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、表5に挙げるペプチド  
 より選択される2個以上のアミノ酸残基から構成される立体構造エピトープに結合する。  
 特定の態様において、立体構造エピトープは、第1のペプチドより選択される1個または複  
 数個のアミノ酸残基、および第2のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸残  
 基から構成され、第1のペプチドおよび第2のペプチドは、表5に挙げるペプチドの群より  
 選択される。したがって、本発明の抗体またはその抗原結合部は、第1のペプチドおよび  
 第2のペプチドの群が次のとおりである立体構造エピトープに結合する：

30

Ala219-Leu222およびThr304-Val308; Asp309-Gly311および

Arg224-Gly226; Thr303 - Glu306およびAla219-Leu222; Asn367-Asn370およびSer217-

Tyr221; Ala339-Pro343およびAsn396-Val399; Ala339-Pro343およびGlu368-Arg372;

Lys358-Tyr362およびVal374-His378; Asp357-Glu360およびLeu377-Thr380; Met351-

40

Glu360およびHis378-Thr389; His378-Thr389およびVal323-Asp332; Val409-Ile415および

Ala493-Thr500; Val409-Ile415およびAla431-Thr437; Val409- Ile415およびPhe469-

Val473; Val409-Ile415およびVal325-Asn330; Val409-Ile415およびArg381-Gly387;

Gly466-Leu472およびGly384-Gly388; Val325-Glu329およびTyr494-Lys499; Thr411-

Ile416およびVal497-Ala502; Ile415-Leu421およびAla502-Ala507; Ala502-Ala507および

Lys484-Thr488; ならびに Ala502-Ala507およびGly445-Cys450

## 【0094】

本発明の抗体は、前述の第1のペプチドおよび第2のペプチドの群を形成するアミノ酸残基すべてに結合し得るか、または、それらは第1のペプチドおよび第2のペプチドの群を形成する残基の一部に結合し得る。特定の態様において、エピトープ、例えば立体構造エピトープに結合する本発明の抗体に言及する場合、その抗体がエピトープ(例えば、表5において特定する特異的ペプチド)を構成する特異的残基のみに結合し、受容体の直線状アミノ酸配列中の他の残基には結合しないという趣旨であることを理解すべきである。

## 【0095】

別の態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、

E33, P34, D72, E76, N77, K78, Q79,

10

K158, D159, N250, S251, Q252, T253, K254, L255, N260, W262, H264, G265, E344,

N352, R353, F355, T356, D357, Y362, S365, E366, N367, N370,およびG466

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープまたは不連続エピトープに結合する。

## 【0096】

別の態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、ヒトPDGFR  $\beta$  のアミノ酸残基<sup>385</sup>Argおよび<sup>390</sup>Glu、またはPDGFR  $\alpha$  中の対応する残基に結合する。ヒトPDGFR  $\beta$  の残基<sup>385</sup>Argおよび<sup>390</sup>Gluは、Kit受容体の残基<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Gluに類似しており、PDGFR  $\beta$  のD4-D4同型相互作用を媒介する。本発明の抗体またはその抗原結合部は、チロシンキナーゼ活性化のために不可欠な距離および向きに細胞質内ドメインを位置付けるために不可欠である、III型RTKの膜近位領域間の決定的に重要な同型相互作用(例えば、ヒトPDGFR  $\beta$  の<sup>385</sup>Argと<sup>390</sup>Gluの間で形成される塩橋)を妨害することによって、受容体活性化に対する阻害効果を及ぼし得る。本明細書において考察する実験により、D4-D4同型相互作用がPDGFR  $\beta$  二量体化のために必須ではないこと、およびPDGFR  $\beta$  二量体化は受容体活性化のために必要ではあるが十分ではないことが実証される。したがって、本発明の抗体またはその抗原結合部は、活性化を妨害しつつ、PDGFR  $\beta$  の二量体化を許容し得る。構造ベースの配列アラインメントにより、EFループのサイズ、およびD4-D4境界面を含む決定的に重要なアミノ酸が、Kit、PDGFR  $\alpha$ 、PDGFR  $\beta$ 、およびCSF1Rで保存されていることが示された。したがって、いくつかの態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、III型RTKのD4ドメインまたはD5ドメインの保存領域を標的とすることができる。

20

30

## 【0097】

その他の態様において、本発明の抗体またはその抗原結合部は、変異RTKに特異的に結合するように選択または設計される。好ましい態様において、変異RTKは、腫瘍形成性または発癌性の変異体である。1つの特定の態様において、抗体またはその抗原結合部は、発癌性Kit受容体変異体に結合するように選択または設計される。本発明の抗体が標的とし得るいくつかのKit受容体変異体は、1個または複数個の次のアミノ酸:Thr417、Tyr418、Asp419、Leu421、Arg420、Tyr503、またはAla502に変異を有するKit受容体である。本発明の方法は、Kitの他の変異または他のRTKの変異に応用可能であることを当業者は理解すべきである。変異RTKを標的とする1つの利点は、治療的抗体が、その変異を含む細胞上のRTKのみに結合でき、健常な細胞の大部分または全部が影響を受けずに残ることである。したがって、変異が腫瘍形成性である場合、腫瘍細胞のみが療法の標的とされて、副作用および投与必要量が潜在的に減少すると思われる。

40

## 【0098】

好ましくは、抗体は、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ もしくはそれ未満の $K_D$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ もしくはそれ未満の $K_D$ 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ もしくはそれ未満の $K_D$ 、または $1 \times 10^{-8} \text{M} \sim 1 \times 10^{-10} \text{M}$ の間もしくはそれ未満の $K_D$ でヒトRTKのIg様ドメインに結合する。例えば、ELISA、ウェスタンブロット、およびRIAを含む、RTK、例えばKitのIg様ドメインに対する抗体の結合能力を評価するための標準的アッセイ法は、当技術分野において公知である。抗体の結合動態(例えば、結合親和性)は

50

また、ELISA解析、Scatchard解析、およびBiacore解析など当技術分野において公知の標準的アッセイ法によって評価することができる。

#### 【0099】

操作および改変された抗体

本発明の方法に従って調製した抗体の $V_H$ 配列および/または $V_L$ 配列を、改変抗体を操作するための出発材料として用いてよく、この改変抗体は、出発抗体から変化した特性を有し得る。抗体は、一方または両方の元の可変領域(すなわち、 $V_H$ および/または $V_L$ )内、例えば、1つもしくは複数のCDR領域内および/または1つもしくは複数のフレームワーク領域内の1個または複数個の残基を改変することによって操作することができる。さらにまたはその代わりに、抗体は、例えば、抗体のエフェクター機能を変更するために、定常領域内の残基を改変することによって操作することもできる。

10

#### 【0100】

実施することができる1つのタイプの可変領域操作は、CDRグラフティングである。抗体は、重鎖および軽鎖の6つの相補性決定領域(CDR)中に位置しているアミノ酸残基を主に介して、標的抗原と相互作用する。このため、CDR内のアミノ酸配列の方が、CDRの外側の配列よりも、個々の抗体間で多様である。CDR配列は、大半の抗体-抗原相互作用を担っているため、異なる特性を有する異なる抗体に由来するフレームワーク配列上にグラフティングされた、特異的な天然抗体に由来するCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって、特異的な天然抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現させることが可能である(例えば、Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; Winterの米国特許第5,225,539号ならびにQueenらの米国特許第5,530,101号、同第5,585,089号、同第5,693,762号、および同第6,180,370号を参照されたい)。

20

#### 【0101】

抗体のフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公共のDNAデータベースまたは出版されている参考文献から得ることができる。例えば、ヒトの重鎖および軽鎖の可変領域遺伝子の生殖系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖系列配列データベース(インターネットでmrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseから入手可能)において、ならびに、Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版、U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) 「The Repertoire of Human Germline  $V_H$  Sequences Reveals about Fifty Groups of  $V_H$  Segments with Different Hypervariable Loops」 *J. Mol. Biol.* 227:776-798;およびCox, J. P. L. et al. (1994) 「A Directory of Human Germ-line  $V_H$  Segments Reveals a Strong Bias in their Usage」 *Eur. J. Immunol.* 24:827-836(各文献の内容は、参照により本明細書に明確に組み入れられる)において、確認することができる。別の例として、ヒトの重鎖および軽鎖の可変領域遺伝子の生殖系列DNA配列は、Genbankデータベースにおいて確認することができる。

30

#### 【0102】

抗体タンパク質配列は、当業者に周知である、Gapped BLAST(Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402)と呼ばれる配列類似性検索法の1つを用いて、まとめられたタンパク質配列データベースに対して比較される。BLASTは、抗体配列とデータベース配列間の統計学的に有意なアライメントが、アラインされたワードの高スコアセグメントペア(HSP)を含む可能性が高いという点で、発見的アルゴリズムである。伸長またはトリミングによってスコアを改善させることができないセグメントペアはヒットと呼ばれる。手短に言えば、VBASE(vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php)由来のヌクレオチド配列が翻訳され、かつFR1からFR3フレームワーク領域の間、およびそれらを含む領域が保持される。データベース配列の平均長は98残基である。タンパク質の全長に渡って完全にマッチしている全く同じ(Duplicate)配列は、除外される。オフにされた低複雑度領域フィルター以外は初期設定の標準パラメーターおよびBLOSUM62の置換行列を用いたblastpプログラムを使用するタンパク質のBLAST検索により、配列一致を示している上位5

40

50

ヒットを選択する。ヌクレオチド配列は6つの全フレームにおいて翻訳され、かつデータベース配列のマッチしたセグメント中にストップコドンを持たないフレームは潜在的なヒットとみなされる。これは次に、BLASTプログラムtblastxを用いて確認され、6つの全フレーム中の抗体配列を翻訳し、それらの翻訳物を6つの全フレーム中の動力学的に翻訳されたVBASEヌクレオチド配列と比較する。IMGT (<http://imgt.cines.fr>)から入手可能なもののような他のヒト生殖系列配列データベースを、前述のVBASEと同様に検索することができる。

#### 【0103】

一致とは、配列の全長に渡る、抗体配列とタンパク質データベースとのアミノ酸の完全な適合である。陽性(一致+置換適合)は同一ではなく、BLOSUM62置換行列によって導かれたアミノ酸置換である。抗体配列がデータベース配列の内の2つに同じ一致で適合する場合、陽性の最も強いヒットが、適合している配列ヒットであると決定される。

#### 【0104】

$V_H$ のCDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列、ならびに $V_K$ のCDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列を、フレームワーク配列が由来する生殖系列免疫グロブリン遺伝子中に存在する配列と同一の配列を有するフレームワーク領域上にグラフィングすることができるか、または、CDR配列を、生殖系列配列と比べて1つもしくは複数の変異を含むフレームワーク領域上にグラフィングすることができる。例えば、いくつかの場合において、抗体の抗原結合能力を維持または増強するためにフレームワーク領域内の残基を変異させることが有益であることが見出されている(例えば、Queenらによる米国特許第5,530,101号、同第5,585,089号、同第5,693,762号、および同第6,180,370号を参照されたい)。

#### 【0105】

別のタイプの可変領域改変は、 $V_H$ および/または $V_K$ のCDR1領域、CDR2領域、および/またはCDR3領域内のアミノ酸残基を変異させて、それによって関心対象の抗体の1種または複数種の結合特性(例えば親和性)を改善させるものである。部位特異的変異誘発またはPCR法による変異誘発を実施して、変異を導入することができ、かつ、抗体結合または関心対象の他の機能特性に対する影響を、当技術分野において公知のインビトロまたはインビボのアッセイ法において評価することができる。例えば、本発明の抗体を変異させてライブラリーを作り出すことができ、次いでこれを、RTKのIg様ドメイン、例えばヒトKit RTKのD4ドメインまたはD5ドメインへの結合についてスクリーニングすることができる。好ましくは、(前述のような)保存的改変が導入される。変異は、アミノ酸の置換、付加、または欠失でよいが、好ましくは置換である。さらに、典型的には、CDR領域内の1個、2個、3個、4個、または5個以下の残基が変更される。

#### 【0106】

別のタイプのフレームワーク改変は、フレームワーク領域内、またはさらに1つもしくは複数のCDR領域内の1個または複数個の残基を変異させて、T細胞エпитープを除去し、それにより、抗体の潜在的な免疫原性を低減させることを含む。このアプローチは、「脱免疫化」とも呼ばれ、Carrらによる米国特許出願公開第20030153043号においてさらに詳細に記載されている。

#### 【0107】

フレームワーク領域またはCDR領域内に起こされる改変に加えて、またはその代わりに、典型的には、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/または抗原依存性細胞障害など抗体の1種または複数種の機能特性を変更するために、本発明の抗体を、Fc領域内に改変を含むように操作することができる。さらに、本発明の抗体は、化学的に修飾してもよく(例えば、1つもしくは複数の化学的部分を抗体に結合することができる)、または、やはり抗体の1種もしくは複数種の機能特性を変更するために、そのグリコシル化を変更するように修飾してもよい。これらの各態様は、下記にさらに詳細に説明する。Fc領域中の残基の数は、KabatのEU指数のものである。

#### 【0108】

1つの態様において、CH1のヒンジ領域は、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が変更さ

10

20

30

40

50

れるように、例えば、増加もしくは減少されるように、改変される。このアプローチは、Bodmerらによる米国特許第5,677,425号においてさらに記載されている。CH1のヒンジ領域中のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖の集合を容易にするためか、または抗体の安定性を上昇もしくは低下させるために、変更される。

#### 【0109】

別の態様において、抗体のFcヒンジ領域は、抗体の生物学的半減期を短縮させるために変異させられる。より具体的には、1個または複数個のアミノ酸変異が、CH2-CH3ドメインの境界領域であるFcヒンジ断片中に導入され、その結果、その抗体は、天然のFcヒンジドメインのブドウ球菌(*Staphylococcyll*)プロテインA(SpA)結合に比べて、SpA結合が障害される。このアプローチは、Wardらによる米国特許第6,165,745号においてさらに詳細に記載されている。

10

#### 【0110】

別の態様において、抗体は、生物学的半減期を延長するために改変される。様々なアプローチが可能である。例えば、Wardによる米国特許第6,277,375号に記載されているように、1個または複数個の次の変異を導入することができる:T252L、T254S、T256F。あるいは、生物学的半減期を延長するために、Prestaらによる米国特許第5,869,046号および同第6,121,022号において記載されているように、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループから得られるサルベージ(salvage)受容体結合エピトープを含むように、抗体のCH1領域またはCL領域内を改変することができる。これらの戦略は、RTKのIg様ドメインへの抗体結合が損なわれない限り、効果的である。

20

#### 【0111】

さらに別の態様において、Fc領域は、抗体のエフェクター機能を変更するために、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置換することによって、改変される。例えば、アミノ酸残基234番、235番、236番、237番、297番、318番、320番、および322番より選択される1個または複数個のアミノ酸は、その抗体が、エフェクターリガンドに対する親和性は変更されているが、親抗体の抗原結合能力を保持するように、異なるアミノ酸残基で置換することができる。親和性が変更される対象のエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体、または補体のC1成分でよい。このアプローチは、いずれもWinterらによる米国特許第5,624,821号および同第5,648,260号においてさらに詳細に記載されている。

#### 【0112】

別の実施例において、アミノ酸残基329番、331番、および322番より選択される1個または複数個のアミノ酸は、抗体のC1q結合が変化し、かつ/または補体依存性細胞障害(CDC)が低減もしくは消滅するように、異なるアミノ酸残基で置換することができる。このアプローチは、Idusogieらによる米国特許第6,194,551号においてさらに詳細に記載されている。

30

#### 【0113】

別の実施例において、アミノ酸231位から239位までの範囲内の1個または複数個のアミノ酸残基が変更されて、それにより、抗体が補体に結合する能力が変更される。このアプローチは、BodmerらによるPCT公報W094/29351においてさらに記載されている。

#### 【0114】

さらに別の実施例において、Fc領域は、次の位置の1個または複数個のアミノ酸を改変することによって、抗体が抗体依存性細胞障害(ADCC)を媒介する能力を増大させるように、かつ/またはFc $\gamma$ 受容体に対する抗体の親和性を増大させるように、改変される:

40

238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268,

269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298,

301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334,

335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434,

435, 437, 438または439

50

。このアプローチは、PrestaによるPCT公報WO 00/42072においてさらに記載されている。さらに、Fc $\gamma$ R1、Fc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIII、およびFcRnに対するヒトIgG1上の結合部位は、マッピングされており、かつ結合の改善された変種が説明されている(Shields, R.L.et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照されたい)。256位、290位、298位、333位、334位、および339位の特異的変異は、Fc $\gamma$ RIIIへの結合を改善することが示された。さらに、次の組み合せ変異体は、Fc $\gamma$ RIII結合を改善することが示された:T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A、およびS298A/E333A/K334A。

#### 【0115】

さらに別の態様において、本発明の抗体のC末端は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許仮出願第60/957,271号において説明されているように、システイン残基を導入することによって改変される。このような改変には、完全長の重鎖配列のC末端またはC末端付近の既存のアミノ酸残基を置換すること、ならびにシステインを含む付加物を完全長の重鎖配列のC末端に導入することが含まれるが、それらに限定されるわけではない。好ましい態様において、システインを含む付加物は、アラニン-アラニン-システイン配列(N末端からC末端)を含む。

#### 【0116】

好ましい態様において、このようなC末端システイン改変が存在すると、治療物質またはマーカー分子などのパートナー分子を結合するための位置が提供される。特に、C末端システイン改変によって反応性チオール基が存在することを利用して、下記に詳述するジスルフィドリンカーを用いてパートナー分子を結合することができる。この様式でパートナー分子に抗体を結合させることにより、特異的な結合部位に対する制御の強化が可能になる。さらに、C末端またはC末端付近に結合部位を導入することにより、結合が最適化され得、その結果、抗体の機能特性への干渉が軽減または排除され、結合調製物の簡略な解析および品質管理が可能になる。

#### 【0117】

さらに別の態様において、抗体のグリコシル化が改変される。例えば、アグリコシル化(aglycosylated)抗体を作製することができる(すなわち、この抗体はグリコシル化を欠く)。グリコシル化を変更して、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増大させることができる。このような炭水化物改変は、例えば、抗体配列内の1つまたは複数の部位のグリコシル化を変更することによって、達成することができる。例えば、1つまたは複数の可変領域フレームワークのグリコシル化部位を消失させ、それによってその部位のグリコシル化を無くす、1個または複数個のアミノ酸置換を実施することができる。このようなアグリコシル化(aglycosylation)は、抗原に対する抗体の親和性を増大させ得る。このようなアプローチは、Coらによる米国特許第5,714,350号および同第6,350,861号においてさらに詳細に記載されている。グリコシル化を改変するためのその他のアプローチは、Hanaiらによる米国特許第7,214,775号、Prestaによる米国特許第6,737,056号、Prestaによる米国特許出願公開第20070020260号、DickeyらによるPCT公報WO/2007/084926、ZhuらによるPCT公報WO/2006/089294、およびRavetchらによるPCT公報WO/2007/055916にさらに詳細に説明されており、これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0118】

さらにまたはその代わりに、フコシル残基の量が減少した低フコシル化(hypofucosylated)抗体または分岐GlcNac構造の増加した抗体など、グリコシル化のタイプが変更された抗体を作製することができる。このような変更されたグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を増大させることが実証された。このような炭水化物改変は、例えば、グリコシル化機構が変更された宿主細胞において抗体を発現させることによって、達成することができる。グリコシル化機構が変更された細胞は、当技術分野において説明されており、かつ、本発明の組換え抗体を発現させて、それにより、グリコシル化が変更された抗体を産生させる場となる宿主細胞として使用することができる。例えば、細胞株Ms704、Ms705、およびMs709は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子のFUT8( $\alpha$ (1,6)フコシルトランスフェラーゼ)を欠き、その結果、Ms704、Ms705、およびMs709細胞株において発現される抗体は

、炭水化物上のフコースを欠いている。Ms704、Ms705、およびMs709 FUT8<sup>-/-</sup>細胞株は、2つの置換ベクターを用いて、CHO/DG44細胞中のFUT8遺伝子を標的として破壊することによって、作製された(Yamaneらによる米国特許出願公開第20040110704号およびYamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22を参照されたい)。別の例として、HanaiらによるEP1,176,195では、 $\alpha$ 1,6結合に関連した酵素を減少させるか、または排除することにより、そのような細胞株において発現される抗体が低フコシル化を示すように、フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子を機能的に破壊した細胞株を記載している。Hanaiらはまた、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素活性が低い、またはその酵素活性を有さない細胞株、例えば、ラット骨髄腫細胞株YB2/0(ATCC CRL 1662)も説明している。PrestaによるPCT公報WO 03/035835では、Asn(297)結合型炭水化物にフコースを結合させる能力が低減され、また、その宿主細胞において発現される抗体の低フコシル化をもたらす、変種CHO細胞株のLec13細胞を記載している(Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740も参照されたい)。UmanaらによるPCT公報WO 99/54342では、操作された細胞株において発現される抗体が、抗体のADCC活性の増大をもたらす分岐GlcNac構造の増加を示すように、糖タンパク質を修飾するグリコシルトランスフェラーゼ(例えば、 $\beta$ (1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現させるように操作された細胞株を記載している(Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180も参照されたい)。あるいは、抗体のフコース残基を、フコシダーゼ酵素を用いて切断して除いてもよい。例えば、フコシダーゼの $\alpha$ -L-フコシダーゼは、抗体からフコシル残基を除去する(Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5516-23)。

#### 【0119】

さらにまたはその代わりに、変更が抗体のシアリル化(sialylation)のレベルに関する、グリコシル化のタイプが変更された抗体を作製することもできる。このような変更は、DickeyらによるPCT公報WO/2007/084926およびRavetch et al.によるPCT公報WO/2007/055916に記載されており、両方ともその全体が参照により組み入れられる。例えば、アースロバクター・ウレアファセンス(*Arthrobacter ureafacens*)シアリダーゼのようなシアリダーゼを用いた酵素反応を使用してよい。このような反応の条件は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,831,077号において一般に説明されている。適切な酵素の他の非限定的な例は、ノイラミニダーゼおよびN-グリコシダーゼFであり、それぞれSchloemer et al. J. Virology, 15(4), 882-893 (1975)およびLeibiger et al., Biochem J., 338, 529-538 (1999)において説明されている。脱シアリル化抗体は、アフィニティークロマトグラフィーを用いてさらに精製することができる。あるいは、シアリルトランスフェラーゼ(sialytransferase)酵素の使用のように、シアリル化のレベルを上昇させる方法を使用してよい。このような反応の条件は、一般に、Basset et al., Scandinavian Journal of Immunology, 51(3), 307-311 (2000)に記載されている。

#### 【0120】

本発明によって企図される、本明細書における抗体の別の改変は、ペグ化である。例えば、抗体の生物学的(例えば血清)半減期を延長するために、抗体をペグ化することができる。抗体をペグ化するには、抗体またはその断片を、典型的には、抗体または抗体断片に1つまたは複数のPEG基が結合される条件下で、ポリエチレングリコール(PEG)の反応性のエステルまたはアルデヒド誘導体などのPEGと反応させる。好ましくは、ペグ化は、反応性PEG分子(または類似した反応性の水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施される。本明細書において使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ(C1~C10)アルコキシポリエチレングリコールもしくはアリールオキシポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコールマレイミドなど、他のタンパク質を誘導体化するのに使用された任意の形態のPEGを包含すると意図される。特定の態様において、ペグ化される抗体は、アグリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は当技術分野において公知であり、かつ本発明の抗体に適用することができる。例えば、NishimuraらによるEP 0154316およびIshikawaらによるEP 0401384を参照され

たい。したがって、本明細書において説明するペグ化の方法はまた、後述する本発明のペプチド分子にも適用される。

#### 【0121】

抗体断片および抗体ミメティック

本発明は、従来の抗体に限定されず、抗体断片および抗体ミメティックを用いて実践することができる。

下記に詳述するように、多種多様の抗体断片および抗体ミメティックの技術が現在開発されており、当技術分野において公知である。ドメイン抗体、Nanobody(ナノボディ)、およびUniBody(ユニボディ)などのいくつかのこれらの技術は、従来の抗体構造物の断片を利用するか、または従来の抗体構造物に対する他の改変を利用するのに対し、Adnectin、Afibody、DARPin、Anticalin、Avimer、およびVersabodyなどの代替の技術もあり、これらは、従来の抗体結合を模倣するが、異なるメカニズムによって生成し機能する結合構造物を使用する。これらの代替構造体のいくつかは、GillおよびDamle (2006) 17: 653-658に総説がある。

#### 【0122】

ドメイン抗体(dAb)は、抗体の最も小さな機能的結合単位であり、ヒト抗体の重鎖(VH)または軽鎖(VL)いずれかの可変領域に対応する。ドメイン抗体の分子量は約13kDaである。Domantis社は、完全ヒトVH dAbおよびVL dAbの一連の大規模かつ高度に機能的なライブラリーを開発し(各ライブラリーには100億種を超える異なる配列がある)、これらのライブラリーを用いて、治療標的に特異的なdAbを選択する。多くの従来の抗体とは異なり、ドメイン抗体は、細菌細胞系、酵母細胞系、および哺乳動物細胞系においてよく発現される。ドメイン抗体およびその作製方法に関するさらなる詳細は、米国特許第6,291,158号、同第6,582,915号、同第6,593,081号、同第6,172,197号、同第6,696,245号、米国特許出願公開第2004/0110941号、欧州特許出願公開第1433846号ならびに欧州特許第0368684号および同第0616640号、W005/035572、W004/101790、W004/081026、W004/058821、W004/003019、およびW003/002609を参照することにより得ることができ、これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0123】

Nanobodyは、天然に存在する重鎖抗体の独特な構造特性および機能特性を含む、抗体由来の治療用タンパク質である。これらの重鎖抗体は、単一の可変ドメイン(VHH)および2つの定常ドメイン(CH2およびCH3)を含む。重要なことには、クローン化され単離されたVHHドメインは、元の重鎖抗体の抗原結合能力すべてを有する完全に安定なポリペプチドである。Nanobodyは、ヒト抗体のVHドメインとの間に高い相同性を有し、活性を全く失うことなくさらにヒト化することができる。重要なことには、Nanobodyは免疫原性となる可能性が低く、このことは、Nanobodyリード化合物を用いた霊長類研究で確認されている。

#### 【0124】

Nanobodyは、従来の抗体の利点を低分子薬物の重要な特徴と組み合わせる。従来の抗体と同様に、Nanobodyは、高い標的の特異性、標的に対する高い親和性、および低い固有の毒性を示す。しかしながら、低分子薬物と同様に、酵素を阻害し、受容体のへこみに容易に接近することができる。さらに、Nanobodyは極めて安定であり、注射以外の手段で投与することができ(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるWO 04/041867を参照されたい)、製造が容易である。Nanobodyの他の利点には、サイズが小さいため、珍しいエピトープまたは隠れたエピトープを認識すること、独特な三次元薬物形態が柔軟性であるため、高い親和性および選択性でタンパク質標的の窪みまたは活性部位に結合すること、半減期を調整できること、ならびに薬物開発が容易で速いことが含まれる。

#### 【0125】

Nanobodyは、単一遺伝子にコードされており、ほぼすべての原核性宿主および真核性宿主、例えば大腸菌(E. coli)(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,765,087号を参照されたい)、かび(例えば、アスペルギルス属(Aspergillus)またはトリコデルマ属(Trichoderma))、および酵母(例えば、サッカロミセス属(Saccharomy

ces)、クルイペロマイセス属(Kluyveromyces)、ハンゼヌラ属(Hansenula)、またはピキア属(Pichia))(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,838,254号を参照されたい)において効率的に製造される。製造プロセスは拡張可能であり、何キログラムもの量のNanobodyが製造された。Nanobodyは、従来の抗体と比べて優れた安定性を示すため、貯蔵寿命の長い、すぐ使用できる溶液として調製することができる。

#### 【0126】

Nanoclone(ナノクローン)法(例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるWO 06/079372を参照されたい)は、B細胞の自動高処理量(high-throughout)選択に基づいて所望の標的に対するNanobodyを作製するための独占権下の方法であり、本発明において使用され得る。

#### 【0127】

UniBodyは、別の抗体断片技術であるが、この技術は、IgG4抗体のヒンジ領域の除去に基づいている。ヒンジ領域が欠失すると、従来のIgG4抗体のほぼ半分のサイズであり、IgG4抗体の二価結合領域の代わりに一価結合領域を有する分子が生じる。また、IgG4抗体は不活性であり、したがって、免疫系と相互作用しないことも周知であり、これは、免疫応答が望ましくない疾患の治療に有利な場合があり、この利点はUniBodyに譲り渡される。例えば、UniBodyは、それらが結合された細胞を阻害するかまたは静止させるが、死滅させないように機能し得る。さらに、癌細胞に結合するUniBodyは、それらの増殖を促進しない。さらに、UniBodyは、従来のIgG4抗体のほぼ半分のサイズであるため、大型の固形腫瘍全体へのより優れた分布を示すことができ、潜在的に有利な有効性を伴う。UniBodyは、全長IgG4抗体に類似した速度で身体から除かれ、全長抗体に類似した親和性で抗原に結合することができる。UniBodyに関するさらなる詳細は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる特許出願WO2007/059782を参照することにより得ることができる。

#### 【0128】

Adnectin分子は、フィブロネクチンタンパク質の1つまたは複数のドメインに由来する操作された結合タンパク質である。フィブロネクチンはヒト身体中に天然に存在する。これは、不溶性の糖タンパク質二量体として細胞外基質中に存在し、また、リンカータンパク質としても役立つ。また、ジスルフィド結合した二量体として血漿中に可溶型で存在する。血漿型のフィブロネクチンは、肝臓細胞(肝細胞)によって合成され、ECM型は、軟骨細胞、マクロファージ、内皮細胞、線維芽細胞、および一部の上皮細胞によって産生される(Ward M.およびMarcey, D., [callutheran.edu/Academic\\_Programs/Departments/BioDev/omm/fibro/fibro.htm](http://callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/fibro/fibro.htm)を参照されたい)。先に言及したように、フィブロネクチンは、細胞接着分子として天然に機能し得るか、または、細胞外基質において接触することによって細胞の相互作用を媒介し得る。典型的には、フィブロネクチンは、3つの異なるタンパク質モジュール、すなわちI型モジュール、II型モジュール、およびIII型モジュールからできている。フィブロネクチンの機能構造の総説については、PankovおよびYamada (2002) J Cell Sci. ;115(Pt 20):3861-3、HohenesterおよびEngel (2002) 21:115-128、ならびにLucena et al. (2007) Invest Clin.48:249-262を参照されたい。

#### 【0129】

好ましい態様において、アドネクチン分子は、2つのβシートの間に分布した複数のβ鎖から構成される天然タンパク質を変更することによって、フィブロネクチンIII型ドメインから誘導される。由来する組織によって、フィブロネクチンは、例えば、<sup>1</sup>F<sub>n</sub>3、<sup>2</sup>F<sub>n</sub>3、<sup>3</sup>F<sub>n</sub>3などと表示され得る複数のIII型ドメインを含み得る。<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインはインテグリン結合モチーフを含み、β鎖を連結する3つのループをさらに含む。これらのループは、IgG重鎖の抗原結合ループに対応すると考えられてよく、これらは、下記に考察する方法によって変更して、関心対象の標的、例えば、RTKのIg様ドメイン、例えば、ヒトKit RTKのD4ドメインまたはD5ドメインに特異的に結合するようにすることができる。好ましくは、本発明の目的に有用なフィブロネクチンIII型ドメインは、アクセッションコード1ttgでProtein Data Bank(PDB, [rcsb.org/pdb/home/home.do](http://rcsb.org/pdb/home/home.do))からアクセスできるフィブロネクチンIII型分子の構造をコードする配列に対して少なくとも30%、少なくとも40%、少なく

とも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を示す配列である。また、アドネクチン分子は、単一の単量体<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3構造体ではなく、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3関連分子のポリマーに由来してもよい。

#### 【0130】

天然の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは典型的にはインテグリンに結合するが、アドネクチン分子になるように適合された<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3タンパク質は、関心対象の抗原、例えば、RTKのIg様ドメイン、例えば、ヒトKitのD4ドメインまたはD5ドメインに結合するように変更されている。1つの態様において、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3分子に対する変更は、β鎖に対する少なくとも1つの変異を含む。好ましい態様において、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3分子のβ鎖を連結するループ領域は、ヒト受容体型チロシンキナーゼ、例えば、ヒトKitのようなIII型受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合するように変更される。

10

#### 【0131】

エラープローンPCR、部位特異的変異誘発、DNAシャッフリング、または本明細書において参照した他のタイプの組換え変異誘発を非限定的に含む当技術分野において公知である任意の方法によって、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3に変更を起こしてよい。一例を挙げれば、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3配列をコードするDNAの変種をインビトロで直接合成し、その後、インビトロまたはインビボで転写および翻訳してよい。あるいは、標準的な方法(例えば、米国特許出願公開第20070082365号で実施されているような)を用いて、天然の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3配列をゲノムから単離またはクローン化し、次いで、当技術分野において公知の変異誘発方法を用いて変異させてよい。

#### 【0132】

20

1つの態様において、標的タンパク質、例えば、RTKのIg様ドメイン、例えば、Kit RTKのD4ドメインまたはD5ドメインは、カラム樹脂またはマイクロタイタープレートのウェルなどの固体支持体上に固定してもよい。次いで、潜在的な結合タンパク質のライブラリーと標的を接触させる。ライブラリーは、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3配列の変異誘発/ランダム化によって、または<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ループ領域(β鎖ではない)の変異誘発/ランダム化によって、野生型<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3から誘導した<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3クローンまたはアドネクチン分子を含んでよい。好ましい態様において、ライブラリーは、Szostak et al., 米国特許出願第09/007,005号および同第09/247,190号; Szostak et al., WO989/31700; ならびにRobertsおよびSzostak (1997) 94:12297-12302において説明されている技術によって作製されたRNA-タンパク質融合ライブラリーでよい。また、ライブラリーは、DNA-タンパク質ライブラリー(例えば、Lohse, 米国特許出願第60/110,549号、米国特許出願第09/459,190号、およびWO 00/32823において説明されているような)でもよい。次に、固定された標的(例えば、ヒトKit RTKのD4ドメインまたはD5ドメイン)と共に融合ライブラリーをインキュベートし、固体支持体を洗浄して非特異的結合部分を除去する。次いで、強固に結合した結合物をストリンジェントな条件下で溶出させ、PCRを用いて、遺伝情報を増幅するか、または(追加の変異誘発を併用もしくは併用せずに)このプロセスを繰り返すための新しい結合分子ライブラリーを作り出す。選択/変異誘発プロセスは、標的に対して十分な親和性を有する結合物が得られるまで繰り返してよい。本発明で使用するためのアドネクチン分子は、Adnexus(Briston-Myers Squibb社)によって使用されるPROfusion(商標)技術を用いて操作してよい。PROfusion技術は、上記に参照した技術(例えば、RobertsおよびSzostak (1997) 94:12297-12302)に基づいて作り出された。変化した<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインのライブラリーを作製し、本発明と共に使用され得る適切な結合物を選択する方法は、次の米国特許文書および特許出願文書で完全に説明されており、これらの文書は参照により本明細書に組み入れられる: 米国特許第7,115,396号; 同第6,818,418号; 同第6,537,749号; 同第6,660,473号; 同第7,195,880号; 同第6,416,950号; 同第6,214,553号; 同第6,623,926号; 同第6,312,927号; 同第6,602,685号; 同第6,518,018号; 同第6,207,446号; 同第6,258,558号; 同第6,436,665号; 同第6,281,344号; 同第7,270,950号; 同第6,951,725号; 同第6,846,655号; 同第7,078,197号; 同第6,429,300号; 同第7,125,669号; 同第6,537,749号; 同第6,660,473号; および米国特許出願公開第20070082365号; 同第20050255548号; 同第20050038229号; 同第20030143616号; 同第20020182597号; 同第20020177158号; 同第20040086980号; 同第20040253612号; 同第20030022236号; 同第20030013160号; 同第20030027194

30

40

50

号;同第20030013110号;同第20040259155号;同第20020182687号;同第20060270604号;同第20060246059号;同第20030100004号;同第20030143616号;および同第20020182597号。<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3のようなフィブロネクチンIII型ドメインに多様性を生じさせることとそれに続く選択段階は、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、または酵母表面ディスプレイなど当技術分野において公知の他の方法を用いて遂行することができる。例えば、Lipovsek et al. (2007) Journal of Molecular Biology 368: 1024-1041; Sergeeva et al. (2006) Adv Drug Deliv Rev. 58:1622-1654; Petty et al. (2007) Trends Biotechnol. 25: 7-15; Rothe et al. (2006) Expert Opin Biol Ther. 6:177-187;およびHoogenboom (2005) Nat Biotechnol. 23:1105-1116)。

#### 【0133】

上記に引用した参考文献の方法は、好ましい<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメイン以外のタンパク質に由来する抗体模倣体を誘導するのに使用され得ることを当業者は理解すべきである。上記に参照した方法を用いて抗体模倣体を作製するのに使用できるその他の分子には、非限定的に、ヒトフィブロネクチンモジュール<sup>1</sup>F<sub>n</sub>3~<sup>9</sup>F<sub>n</sub>3および<sup>11</sup>F<sub>n</sub>3~<sup>17</sup>F<sub>n</sub>3、ならびに非ヒト動物および原核生物に由来する関連したF<sub>n</sub>3モジュールが含まれる。さらに、テネイシンおよびアンジュリン(undulin)など<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3に対して配列相同性を有する他のタンパク質に由来するF<sub>n</sub>3モジュールもまた、使用され得る。免疫グロブリン様フォールドを有する(が、V<sub>H</sub>ドメインに無関係な配列を有する)他の例示的なタンパク質には、N-カドヘリン、ICAM-2、タイチン、GCSF受容体、サイトカイン受容体、グリコシダーゼ阻害剤、E-カドヘリン、および抗生作用のある色素タンパク質が含まれる。関連した構造を有するさらなるドメインは、ミエリン膜接着分子P0、CD8、CD4、CD2、クラスI MHC、T細胞抗原受容体、CD1、VCAM-1のC2ドメインおよびIセットドメイン、ミオシン結合タンパク質CのIセット免疫グロブリンフォールド、ミオシン結合タンパク質HのIセット免疫グロブリンフォールド、テロキン、テリキン(telikin)、NCAM、トゥイッチン、ニューログリアンのIセット免疫グロブリンフォールド、成長ホルモン受容体、エリスロポエチン受容体、プロラクチン受容体、GC-SF受容体、インターフェロン-γ受容体、β-ガラクトシダーゼ/グルクロニダーゼ、β-グルクロニダーゼ、およびトランスグルタミナーゼに由来してよい。あるいは、1つまたは複数の免疫グロブリン様フォールドを含む他の任意のタンパク質を利用して、アドネクチン様結合部分を作り出してもよい。このようなタンパク質は、例えば、SCOPプログラム(Murzin et al., J.Mol. Biol. 247:536 (1995); Lo Conte et al., Nucleic Acids Res. 28:257 (2000))を用いて同定することができる。

#### 【0134】

アプタマーは、本発明に包含される別のタイプの抗体ミメティックである。アプタマーは、典型的には、特異的な分子標的に結合する小型ヌクレオチドポリマーである。アプタマーは、単鎖または二本鎖の核酸分子(DNAまたはRNA)でよいが、DNAベースのアプタマーは、最も一般的には二本鎖である。アプタマー核酸の長さは規定されていないが、アプタマー分子の長さは、最も一般的には15~40ヌクレオチドの間である。

#### 【0135】

アプタマーはしばしば、複雑な三次元構造を形成し、この構造が標的分子に対する親和性を決定する。アプタマーは、単純な抗体よりも多くの利点を与えることができ、インビトロではほぼ完全に操作および増幅できることが、その主な理由である。さらに、アプタマーはしばしば、免疫応答をほとんどまたは全く誘導しない。

#### 【0136】

アプタマーは、様々な技術を用いて作製することができるが、もともとは、インビトロでの選択(EllingtonおよびSzostak. (1990) Nature. 346(6287):818-22)ならびにSELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)法(Schneider et al. 1992. J Mol Biol. 228(3):862-9)を用いて開発された。文献の内容は参照により本明細書に組み入れられる。アプタマーを作製するための他の方法および用途は、Klussmann. The Aptamer Handbook: Functional Oligonucleotides and Their Applications. ISBN: 978-3-527-31059-3; Ulrich et al. 2006. Comb Chem High Throughput Screen 9(8):619-32;

Cerchiaおよびde Franciscis. 2007. *Methods Mol Biol.* 361:187-200; IresonおよびKel land. 2006. *Mol Cancer Ther.* 2006 5(12):2957-62; 米国特許第5582981号; 同第5840867号; 同第5756291号; 同第6261783号; 同第6458559号; 同第5792613号; 同第6111095号; ならびに米国特許出願第11/482,671号; 同第11/102,428号; 同第11/291,610号; および同第10/627,543号を含む文献で公開されている。すべて参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0137】

SELEX法は明らかに最も普及しており、3つの基本的な段階で行われる。第1に、特異的な分子標的への結合に関して、候補核酸分子のライブラリーを選択する。第2に、標的に対して十分な親和性を有する核酸を非結合物から分離する。第3に、結合された核酸を増幅し、第2のライブラリーを作り、このプロセスを繰り返す。各繰り返し時に、標的分子に対する親和性が次第に高くなるアプタマーを選択する。SELEX法は、参照により本明細書に組み入れられる次の出版物において、より完全に説明されている: Bugaut et al. 2006. 4(22):4082-8; Stoltenburg et al. 2007 *Biomol Eng.* 2007 24(4):381-403; および Gopinath. 2007. *Anal Bioanal Chem.* 2007. 387(1):171-82。

#### 【0138】

本発明の「アプタマー」はまた、ヌクレオチドの代わりにペプチドから作製されたアプタマー分子も含む。ペプチドアプタマーはヌクレオチドアプタマーと同じ多くの特性を有し(例えば、小さなサイズおよび標的分子に高い親和性で結合する能力)、ヌクレオチドアプタマーを作製するのに使用されるのと同様の原理の選択方法、例えば、参照により本明細書に組み入れられる Baines および Colas. 2006. *Drug Discov Today.* 11(7-8):334-41; ならびに Bickle et al. 2006. *Nat Protoc.* 1(3):1066-91、によって作製することができる。

#### 【0139】

Affibody分子は、ブドウ球菌(staphylococcal)プロテインAのIgG結合ドメインの内の1つに由来する58アミノ酸残基のタンパク質ドメインをベースとする新しいクラスの親和性タンパク質に相当する。この3つのヘリックスバンドルドメインは、コンビナトリアルファージミドライブラリーを構築するための骨格として使用されており、このライブラリーから、ファージディスプレイ技術を用いて、所望の分子を標的とするAffibody変種を選択することができる(Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain, *Nat Biotechnol* 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, *Eur J Biochem* 2002;269:2647-55)。Affibody分子は、低分子量(6kDa)であるに加えて、構造が単純で強固であるため、多種多様の応用、例えば、検出試薬として(Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, et al, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*, *J Immunol Methods* 2002;261:199-211)、および受容体の相互作用を阻害するために(Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, *Protein Eng* 2003;16:691-7)、適している。Affibodyおよびその作製方法に関するさらなる詳細は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,831,012号を参照することにより得ることができる。

#### 【0140】

DARPin(Designed Ankyrin Repeat Protein)は、非抗体ポリペプチドの結合力を活用するために開発された抗体ミメティックDRP(Designed Repeat Protein)技術の一例である。アンキリンリピートタンパク質またはロイシンリッチリピートタンパク質などのリピートタンパク質は、遍在する結合分子であり、抗体とは違って、細胞内および細胞外に存在する。これらの独特なモジュール構成は、繰り返し構造単位(リピート)を特徴とし、これらの構造単位は相互に積み重なって、可変性かつモジュール式の標的結合表面を呈する伸長したリピートドメインを形成する。このモジュール性に基づいて、高度に多様化した結合

特異性を有するポリペプチドのコンビナトリアルライブラリーを作製することができる。この戦略は、可変性の表面残基を提示する自己適合性リピートのコンセンサス設計およびリピートドメインへのそれらのランダムな組立を含む。

#### 【0141】

DARPinは、細菌発現系において高収率で作製することができ、最も安定な公知のタンパク質に属する。ヒト受容体、サイトカイン、キナーゼ、ヒトプロテアーゼ、ウイルス、および膜タンパク質を含む広範囲の標的タンパク質に対して高度に特異的な高親和性DARPinが選択された。1桁ナノモル濃度〜ピコモル濃度の範囲の親和性を有するDARPinを得ることができる。

#### 【0142】

DARPinは、ELISA、サンドイッチELISA、フローサイトメトリー解析(FACS)、免疫組織化学(IHC)、チップ用途、アフィニティー精製、またはウェスタンブロット法を含む広範囲の用途で使用されている。また、DARPinは、例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)に融合された細胞内マーカータンパク質として、細胞内コンパートメント中で高度に活性であることも判明した。DARPinは、pM範囲のIC50でウイルス侵入を阻害するためにさらに使用された。DARPinは、タンパク質間の相互作用を妨げるだけでなく、酵素を阻害するのにも理想的である。プロテアーゼ、キナーゼ、および輸送体が成功裡に阻害されており、アロステリックな阻害様式が最も多い。腫瘍上で非常に迅速かつ特異的に富化され、かつ腫瘍対血液の比率が非常に好都合であるため、DARPinはインビボでの診断または治療的アプローチに好適である。

#### 【0143】

DARPinおよび他のDRP技術に関するその他の情報は、米国特許出願公開第2004/0132028号および国際特許出願公開WO 02/20565において見出すことができ、両方ともその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0144】

Anticalinは、その他の抗体ミメティック技術であるが、この場合、結合特異性は、リポカリン、すなわちヒトの組織および体液で天然かつ豊富に発現される低分子量タンパク質のファミリーに由来する。リポカリンは、化学的に感受性または不溶性の化合物の生理的輸送および貯蔵に関連したインビボの一連の機能を果たすように進化した。リポカリンは、タンパク質の1つの末端で4つのループを支持する高度に保存された $\beta$ -バレルを含む強固な固有の構造を有する。これらのループは、結合ポケットへの入口を形成し、分子のこの部分の立体構造的な違いが、個々のリポカリンの結合特異性の差異の原因である。

#### 【0145】

保存された $\beta$ シートフレームワークによって支持された超可変ループの全体的な構造は免疫グロブリンを思わせるが、サイズの点ではリポカリンは抗体とかなり違い、単一の免疫グロブリンドメインよりもわずかに大きい、アミノ酸160〜180個の単一のポリペプチド鎖から構成されている。

#### 【0146】

リポカリンはクローン化され、それらのループは、Anticalinを作り出すための操作に供される。構造的に多様なAnticalinのライブラリーが作製されており、Anticalinディスプレイにより、結合機能を選択およびスクリーニングし、続いて、原核生物系または真核生物系でさらに解析するために可溶性タンパク質を発現および産生させることが可能になる。研究により、実質的に任意のヒト標的タンパク質に特異的なAnticalinを開発でき、単離でき、ナノモル濃度またはより高い範囲の結合親和性を得ることができることが成功裡に実証された。

#### 【0147】

Anticalinはまた、2重ターゲティングタンパク質、いわゆるDuocalinとして構成することもできる。Duocalinは、標準的な製造プロセスを用いて容易に作製される1つの単量体タンパク質中の2つの別々の治療的標的に結合し、その際、2つの結合ドメインの構造的向きに関わらず、標的特異性および親和性を保持する。

## 【0148】

単一の分子による複数の標的の調節は、複数の原因因子を伴うことが公知の疾患において特に有利である。さらに、Duocalinのような二価性または多価性の結合形態は、疾患の際に細胞表面分子を標的とする際、シグナル伝達経路に対するアゴニスト効果を媒介する際、または細胞表面受容体の結合およびクラスター形成を介して、強化された内在化効果を誘導する際に、かなりの潜在能力を有する。さらに、Duocalin固有の高い安定性は単量体のAnticalinに匹敵しているため、Duocalinの製剤化および送達の潜在的能力は柔軟性に富む。

## 【0149】

Anticalinに関するその他の情報は、米国特許第7,250,297号および国際特許出願公開WO 99/16873において見出すことができ、両方ともその全体が参照により本明細書に組み入れられる。 10

## 【0150】

本発明において有用な別の抗体ミメティック技術はAvimerである。Avimerは、結合特性および阻害特性を有するマルチドメインタンパク質を作製する、インビトロでのエキソシヤッフリングおよびファージディスプレイによって、ヒト細胞外受容体ドメインの大ファミリーから導かれる。複数の独立した結合ドメインを連結すると、結合力が作り出されることが示されており、その結果、従来の単一エピトープ結合タンパク質と比べて親和性および特異性が改善される。他の潜在的な利点には、大腸菌(*Escherichia coli*)における多標的の特異的分子の単純かつ効率的な作製、熱安定性の改善、およびプロテアーゼに対する耐性が含まれる。様々な標的に対する、ナノモル濃度以下の親和性を有するAvimerが得られている。 20

## 【0151】

Avimerに関するその他の情報は、米国特許出願公開第2006/0286603号、同第2006/0234299号、同第2006/0223114号、同第2006/0177831号、同第2006/0008844号、同第2005/0221384号、同第2005/0164301号、同第2005/0089932号、同第2005/0053973号、同第2005/0048512号、同第2004/0175756号において見出すことができ、いずれもその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

## 【0152】

Versabodyは、本発明において使用され得る別の抗体ミメティック技術である。Versabodyは、システインが15%を超える3~5kDaの小型タンパク質であり、典型的なタンパク質が有する疎水性コアと入れ替わるジスルフィド密度の高い骨格を形成する。MHC提示に最も貢献する残基は疎水性であるため、疎水性コアを含む多数の疎水性アミノ酸を小数のジスルフィドで置換した結果、より小型で、親水性が高く(凝集および非特異的結合が少ない)、プロテアーゼおよび熱に対する耐性が高く、T細胞エピトープの密度が低いタンパク質が生じる。これら4種の特性はすべて、免疫原性に影響を及ぼすことが周知であり、一緒になって、免疫原性を大きく低下させると予想されている。 30

## 【0153】

Versabodyの着想は、ヒル、ヘビ、クモ、サソリ、カタツムリ、およびアネモネによって産生され、予想外に低い免疫原性を示すことが公知である天然の注射可能な生物薬剤に由来する。選択された天然のタンパク質ファミリーから始めて、設計およびスクリーニングにより、サイズ、疎水性、タンパク質分解抗原プロセッシング、およびエピトープ密度を、注射可能な天然タンパク質の平均をはるかに下まわるレベルまで最小化する。 40

## 【0154】

Versabodyの構造を考慮すれば、これらの抗体ミメティックは、多価性、多重特異性、多様な半減期メカニズム、組織ターゲティングモジュール、および抗体Fc領域の欠如を含む、多目的に使用できる形態を提供する。さらに、Versabodyは、大腸菌において高収率で製造され、親水性でありサイズが小さいため、Versabodyは可溶性が高く、高濃度に調製することができる。Versabodyは非常に熱に安定であり(煮沸することができる)、長期間に渡る貯蔵寿命を与える。 50

## 【0155】

Versabodyに関するその他の情報は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2007/0191272号において見出すことができる。

## 【0156】

標的結合、エフェクター機能、インビボ半減期、および発現レベルを維持および最適化するように操作されたSMIP(商標)(Small Modular ImmunoPharmaceuticals-Trubion Pharmaceuticals)。SMIPSは、3つの異なるモジュールドメインからなる。第一に、それらは、特異性を与える任意のタンパク質(例えば、細胞表面受容体、単鎖抗体、可溶性タンパク質など)からなり得る結合ドメインを含む。第二に、それらは、結合ドメインとエフェクタードメインの間の柔軟なリンカーとして役立ち、また、SIMP薬物の多量体化の制御を助けるヒンジドメインを含む。最後に、SMIPSは、Fcドメインまたは他の特別に設計されたタンパク質を含む様々な分子に由来してよいエフェクタードメインを含む。設計がモジュール方式であるため、様々な異なる結合ドメイン、ヒンジドメイン、およびエフェクタードメインを有するSMIPの容易な構築が可能となり、迅速かつカスタマイズ可能な薬物設計が実現する。

## 【0157】

それらの設計方法の例を含む、SMIPに関するより多くの情報は、Zhao et al. (2007) Blood 110:2569-77および次の米国特許出願公開第20050238646号;同第20050202534号;同第20050202028号;同第20050202023号;同第20050202012号;同第20050186216号;同第20050180970号;および同第20050175614号において見出すことができる。

## 【0158】

上記に提供した抗体断片技術および抗体ミメティック技術の詳細な説明は、本明細書において使用され得る全技術の包括的なリストであるとは意図されない。例えば、また限定されるわけでもないが、ポリペプチドベースの代替技術、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられるQui et al., Nature Biotechnology, 25(8) 921-929 (2007)で概説されている相補性(complimentary)決定領域の融合、ならびに核酸ベースの技術、例えば、すべて参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,789,157号、同第5,864,026号、同第5,712,375号、同第5,763,566号、同第6,013,443号、同第6,376,474号、同第6,613,526号、同第6,114,120号、同第6,261,774号、および同第6,387,620号に記載されているRNAアプタマー技術を含む様々なその他の技術が、本発明において使用され得る。

## 【0159】

抗体の物理的特性

RTKのIg様ドメインに結合する本発明の抗体は、様々な物理的特性に基づいてさらに特徴付けすることができる。様々なアッセイ法が、これらの物理的特性に基づいて様々なクラスの抗体を検出および/または区別するのに使用され得る。

## 【0160】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、軽鎖可変領域または重鎖可変領域のいずれかに、1つまたは複数のグリコシル化部位を含み得る。可変領域中に1つまたは複数のグリコシル化部位が存在することにより、抗原結合が変わるため、抗体の免疫原性の上昇または抗体のpKの変化が起こり得る(Marshall et al (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702; Gala FAおよびMorrison SL (2004) J Immunol 172:5489-94; Wallick et al (1988) J Exp Med 168:1099-109; Spiro RG (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706)。グリコシル化は、N-X-S/T配列を含むモチーフに存在することが公知である。可変領域のグリコシル化は、Glycoblotsアッセイ法を用いて試験することができる。このアッセイ法では、抗体を切断してFabを生成させ、次いで過ヨウ素酸酸化およびシッフ塩基形成を測定するアッセイ法を用いてグリコシル化に関して試験する。あるいは、可変領域のグリコシル化は、Fab由来の糖類を単糖に切断し、かつ個々の糖類含有量を解析するDionex光クロマトグラフィー(Dionex-LC)を用いて試験することもできる。場合により、可変領域グリコシル化を含まない抗体を有することが好ましい場合がある。これは、可変領域中にグリコシル化モチ

ーフを含まない抗体を選択することによって、または当技術分野において周知の標準的技術を用いてグリコシル化モチーフ内の残基を変異させることによって、実現することができる。

#### 【0161】

各抗体は、特有の等電点(pI)を有すると考えられるが、一般に、抗体は、6~9.5の間のpH範囲に入ると考えられる。IgG1抗体のpIは、典型的には7~9.5のpH範囲内に入り、IgG4抗体のpIは、典型的には6~8のpH範囲内に入る。抗体は、この範囲から外れるpIを有することがある。これらの作用は一般に知られていないが、正常範囲から外れたpIを有する抗体が、インビボ条件下でアンフォールディングおよび不安定さをいくらか示す場合があるという推測がある。等電点は、pH勾配を作り出し、かつ精度を高めるためにレーザー集光を利用し得る、キャピラリー等電点電気泳動アッセイ法を用いて試験することができる(Janini et al (2002) Electrophoresis 23:1605-11; Ma et al. (2001) Chromatographia 53:S75-89; Hunt et al (1998) J Chromatogr A 800:355-67)。場合により、正常範囲に入るpI値を有する抗体を有することが好ましい。これは、正常範囲のpIを有する抗体を選択することによって、または、当技術分野において周知の標準的技術を用いて表面の荷電残基を変異させることによって、実現することができる。

#### 【0162】

各抗体は、熱安定性を示す融解温度を有する(Krishnamurthy RおよびManning MC (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71)。熱安定性が高いほど、インビボでの総合的な抗体安定性がより高いことが示される。抗体の融点は、示差走査熱量測定のような技術を用いて測定することができる(Chen et al (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) Immunol Lett 68:47-52)。T<sub>M1</sub>は、抗体が最初にアンフォールディングする温度を示す。T<sub>M2</sub>は、抗体が完全にアンフォールディングする温度を示す。一般に、本発明の抗体のT<sub>M1</sub>は、60℃より高く、好ましくは65℃より高く、さらにより好ましくは70℃より高いことが好ましい。あるいは、抗体の熱安定性は、円二色性を用いて測定することもできる(Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9)。

#### 【0163】

好ましい態様において、急速に分解しない抗体が望ましい場合がある。抗体の断片化は、当技術分野において十分に理解されているように、キャピラリー電気泳動(CE)およびMALDI-MSを用いて測定することができる(Alexander AJおよびHughes DE (1995) Anal Chem 67:3626-32)。

#### 【0164】

他の好ましい態様において、凝集作用が最小限である抗体が選択される。凝集は、望まれない免疫応答の誘発および/または薬物動態学的特性の変化もしくは好ましくない薬物動態学的特性をもたらし得る。一般に、凝集が25%またはそれ未満、好ましくは20%またはそれ未満、さらにより好ましくは15%またはそれ未満、さらにより好ましくは10%またはそれ未満、およびさらにより好ましくは5%またはそれ未満の抗体が許容される。凝集は、単量体、二量体、三量体、または多量体を同定するためのサイズ排除カラム(SEC)高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、および光散乱を含む、当技術分野において周知のいくつかの技術によって測定することができる。

#### 【0165】

本発明のポリクローナル抗体の作製

本発明のポリクローナル抗体は、当技術分野において周知の様々な技術によって作製することができる。ポリクローナル抗体は様々なB細胞株に由来し、したがって、同じ抗原上の複数のエピトープを認識することができる。ポリクローナル抗体は、典型的には、適切な哺乳動物を関心対象の抗原、例えば、RTKのIg様ドメイン、例えばヒトKitのD4ドメインもしくはD5ドメインまたはヒトVEGFのD7ドメインで免疫化することによって作製される。ポリクローナル抗体の作製のためにしばしば使用される動物は、ニワトリ、ヤギ、モルモット、ハムスター、ウマ、マウス、ラット、ヒツジ、および最も一般にはウサギである。下記の実施例14では、Kitの第4(D4)もしくは第5(D5)のIg様ドメインまたはKitの外部ド

メイン全体でウサギを免疫化することによって、ポリクローナル抗Kit抗体を作製した。ポリクローナル抗体を作製するための標準的な方法は、当技術分野において広く公知であり、本発明の方法と組み合わせることができる(例えば、[research.cm.utexas.edu/bkitto/Kittolabpage/Protocols/Immunology/PAb.html](http://research.cm.utexas.edu/bkitto/Kittolabpage/Protocols/Immunology/PAb.html); 米国特許第4,719,290号、同第6,335,163号、同第5,789,208号、同第2,520,076号、同第2,543,215号、および同第3,597,409号。これらの内容全体が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0166】

本発明のモノクローナル抗体の作製

本発明のモノクローナル抗体(mAb)は、従来のモノクローナル抗体方法、例えばKohlerおよびMilstein (1975) Nature 256:495の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む、様々な技術によって作製することができる。体細胞ハイブリダイゼーション手順が好ましいが、原理的には、モノクローナル抗体を作製するための他の技術、例えばBリンパ球のウイルス形質転換または癌性形質転換を使用することができる。抗体(モノクローナルもしくはポリクローナル)またはその抗原結合部は、RTKのIg様ドメイン、より好ましくはヒトKit RTKのD4ドメインもしくはD5ドメイン上の任意のエピトープに対して、または本明細書において考察するコンセンサス配列に対して、または本明細書において説明する任意の立体構造エピトープ、不連続エピトープ、もしくは直線状エピトープに対して産生され得ることに留意すべきである。

#### 【0167】

当技術分野において公知のいくつかの方法は、関心対象の不連続エピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を特異的に選択するために有用である。例えば、その内容全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2005/0169925号において開示されている技術により、あるタンパク質配列内の2つの異なるペプチドに結合する抗体を選択することが可能になる。このような方法を本発明に従って使用して、本明細書において開示する立体構造エピトープおよび不連続エピトープを特異的に標的とすることができる。立体構造エピトープがタンパク質の二次構造物である場合、そのような構造物は、より小型のペプチド(例えばアミノ酸50個未満)中でしばしば容易に形成する。したがって、小型のペプチドで動物を免疫化すると、いくつかの立体構造エピトープが捕捉され得る。あるいは、立体構造エピトープを含む2つの小型ペプチド(例えば、表5に特定するペプチド)を、柔軟なリンカー(例えば、ポリグリコール、または極性非荷電アミノ酸のストレッチ)によって連結してもよい。このリンカーのおかげで、これらのペプチドは様々な相互作用の向きを探索することが可能になる。この構築物で免疫化し、続いて適切なスクリーニングを行うことにより、立体構造エピトープに対する抗体の同定が可能になり得る。好ましい態様において、特異的な立体構造エピトープまたは直線状エピトープに対するペプチドは、RTKの特定のドメイン(例えば、Kit外部ドメインのドメイン4またはドメイン5)で動物を免疫化し、続いて、関心対象のエピトープに結合する抗体を求めてスクリーニングすることによって作製することができる。1つの態様において、低温電子顕微鏡(Jiang et al. (2008) Nature 451, 1130-1134; Joachim (2006) Oxford University Press ISBN:0195182189)を用いて、本発明の抗体または抗原結合断片が結合するエピトープを同定してよい。別の態様において、RTKまたはそのドメインを、結合された抗体または抗原結合断片と共に結晶化させ、X線結晶構造解析によって解析して、結合されている厳密なエピトープを決定してもよい。さらに、RTK配列の一部をマウスまたは別の種由来の対応する配列で置換することによって、エピトープをマッピングしてもよい。関心対象のエピトープに対する抗体は、ヒト配列領域に選択的に結合し、したがって、標的エピトープを順次マッピングすることが可能である。キメラに基づいてエピトープをマッピングするこの技術は、様々な設定でエピトープを同定するために成功裡に使用されている(内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、HenrikssonおよびPettersson (1997) Journal of Autoimmunity. 10(6):559-568; Netzer et al. (1999) J Biol Chem. 1999 Apr 16;274(16):11267-74; Hsia et al. (1996) Mol. Microbiol. 19, 53-63を参照されたい)。

10

20

30

40

50

## 【0168】

標的RTK(例えばKit RTK)中の関心対象のエピトープはグリコシル化されていないと考えられている。しかしながら、関心対象のRTKがグリコシル化されている場合、抗体またはその抗原結合部(および本発明の他の部分)は、関連するアミノ酸残基および/または糖残基に結合するように、産生させることができる。例えば、Kitタンパク質は、潜在的なN結合型グリコシル化のために少なくとも10個の部位を有することが当技術分野において公知である(Morstyn, Foote, Lieschke (2004) Hematopoietic Growth Factors in Oncology: Basic Science and Clinical Therapeutics. Humana Press. ISBN:1588293025)。KitはO結合型グリコシル化、ならびにシアル酸残基への結合も示し得るとさらに考えられている(Wypych J, et al.(1995) Blood.85(1):66-73)。したがって、抗体またはその抗原結合部(および本発明の他の部分)は、本明細書において特定する任意のエピトープに結合され得る糖残基にも結合するように産生させることができると予想される。この目的のために、関心対象の抗原ペプチドは、適切にそれがグリコシル化され、次いでグリコシル化された抗原ペプチドを用いて動物を免疫化できるように、動物細胞において産生させることができる。グリコシル化ペプチドを作製するのに適した細胞および技術は当技術分野において公知であり、下記にさらに説明する(例えば、GlycoFi, Inc., Lebanon, NHおよびBioWa; Princeton, NJの利用可能な技術を参照されたい)。ペプチドの適切なグリコシル化は、等電点電気泳動(IEF)、酸加水分解(単糖組成を決定するため)、化学的切断または酵素的切断、およびグリカン进行を同定するための質量分析法(MS)など任意の標準的方法を用いて試験することができる。グリカン解析を速めるためにレクチンベースのアレイを使用するProcognia (procognia.com)によって提供される技術もまた、使用され得る。O-グリコシル化は、具体的には、還元的アルカリ切断もしくは「β脱離」、ペプチドマッピング、液体クロマトグラフィー、および質量分析法、またはこれらの技術の任意の組み合わせなどの技術を用いて検出することができる。

## 【0169】

ハイブリドーマを調製するための好ましい動物の系はマウスの系である。マウスにおけるハイブリドーマ作製は、十分に確立された手順である。融合用の免疫脾細胞を単離するための免疫化のプロトコールおよび技術は、当技術分野において公知である。融合相手(例えばマウス骨髄腫細胞)および融合手順もまた、公知である。

## 【0170】

本発明のキメラ抗体またはヒト化抗体は、前述したようにして調製されたマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製することができる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、標準的な分子生物学技術を用いて、関心対象のマウスハイブリドーマから得、かつ、非マウス(例えばヒト)免疫グロブリン配列を含むように操作することができる。例えば、キメラ抗体を作製するために、当技術分野において公知の方法を用いて、マウスの可変領域をヒト定常領域に連結することができる(例えば、Cabillyらによる米国特許第4,816,567号を参照されたい)。ヒト化抗体を作製するために、当技術分野において公知の方法を用いて、マウスのCDR領域をヒトフレームワーク中に挿入することができる(Winterによる米国特許第5,225,539号、ならびにQueenらによる米国特許第5,530,101号;同第5,585,089号;同第5,693,762号;および同第6,180,370号を参照されたい)。あるいは、ヒト配列および非ヒト配列の知識を前提として、DNAレベルまたはタンパク質レベルでヒト化抗体を設計することもできる。このような抗体は直接的に化学合成してよく、または、DNAを合成し、インビトロもしくはインビボで発現させてヒト化抗体を作製してもよい。

## 【0171】

好ましい態様において、本発明の抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。RTKのIg様ドメイン、例えば、KitのD4ドメインまたはD5ドメインに対するこのようなヒトモノクローナル抗体は、マウス系の代わりに、ヒト免疫系の一部分を有するトランスジェニックマウスまたは、染色体導入されたマウスを用いて生成させることができる。これらのトランスジェニックマウスおよび染色体導入されたマウスには、それぞれHuMAbマウスおよびKMマウス(商標)と本明細書において呼ばれるマウスが含まれ、本明細書において、まとめて

「ヒトIgマウス」と呼ばれる。

【0172】

HuMAbマウス(登録商標)(Medarex, Inc.)は、内因性の $\mu$ 鎖および $\kappa$ 鎖の遺伝子座を不活性化する標的化された変異と共に、再配列されていないヒト重鎖( $\mu$ および $\gamma$ )ならびに $\kappa$ 軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含む(例えば、Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859を参照されたい)。したがって、マウスは、マウスIgMまたは $\kappa$ の発現の低減を示し、かつ免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入遺伝子は、クラススイッチおよび体細胞変異を経験して、高親和性のモノクローナルヒトIgG $\kappa$ を生成する(Lonberg, N. et al. (1994)、前記; Lonberg, N.(1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N.およびHuszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13:65-93、ならびにHarding, F.およびLonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546に総説がある)。HuMAbマウスの調製および使用、ならびにそのようなマウスが有するゲノム改変は、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5:647-656; Tuaillon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12:821-830; Tuaillon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6:579-591; およびFishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851においてさらに説明されており、これらの全文献の内容は、その全体が参照により本明細書に具体的に組み入れられる。さらに、すべてLonbergおよびKayによる米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,625,126号、同第5,633,425号、同第5,789,650号、同第5,877,397号、同第5,661,016号、同第5,814,318号、同第5,874,299号、および同第5,770,429号; Suraniらによる米国特許第5,545,807号; すべてLonbergおよびKayによるPCT公報WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884、およびWO 99/45962; ならびにKormanらによるPCT公報WO 01/14424をさらに参照されたい。

【0173】

別の態様において、本発明のヒト抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入染色体を有するマウスのような、導入遺伝子および導入染色体上にヒト免疫グロブリン配列を有するマウスを用いて、産生させることができる。本明細書において「KMマウス(商標)」と呼ばれるこのようなマウスは、IshidaらによるPCT公報WO 02/43478に詳細に記載されている。

【0174】

さらになお、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替のトランスジェニック動物系も当技術分野において利用可能であり、本発明の抗体を産生させるために使用することができる。例えば、Xenomouse(Abgenix, Inc.)と呼ばれる代替のトランスジェニック系を使用することができる。このようなマウスは、例えば、Kucherlapatiらによる米国特許第5,939,598号、同第6,075,181号、同第6,114,598号、同第6,150,584号、および同第6,162,963号に記載されている。

【0175】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替の染色体導入された動物系も当技術分野において利用可能であり、本発明の抗体を産生させるために使用することができる。例えば、「TCマウス」と呼ばれる、ヒト重鎖導入染色体およびヒト軽鎖導入染色体の両方を有するマウスを使用することができる。このようなマウスは、Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727に記載されている。さらに、ヒト重鎖導入染色体およびヒト軽鎖導入染色体を有する雌ウシが当技術分野において説明されており(Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology, 20:889-894)、本発明の抗体を産生させるために使用することができる。

【0176】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーを

スクリーニングするためのファージディスプレイ法を用いて調製することもできる。ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ法は、当技術分野において確立されている。例えば、Ladnerらによる米国特許第5,223,409号、同第5,403,484号、および同第5,571,698号;Dowerらによる米国特許第5,427,908号および同第5,580,717号;McCaffertyらによる米国特許第5,969,108号および同第6,172,197号;ならびにGriffithsらによる米国特許第5,885,793号、同第6,521,404号、同第6,544,731号、同第6,555,313号、同第6,582,915号、および同第6,593,081号を参照されたい。

#### 【0177】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、免疫化した際にヒト抗体応答を生じさせることができるようにヒト免疫細胞を再構成されたSCIDマウスを用いて調製することもできる。このようなマウスは、例えば、Wilsonらによる米国特許第5,476,996号および同第5,698,767号に記載されている。

#### 【0178】

別の態様において、本発明の抗体は、Marks, J.D., et al. ((1991). J. Mol. Biol. 22, 581)、Nissim, A., et al. ((1994). EMBO J. 13, 692)ならびに米国特許第6,794,132号;同第6562341号;同第6057098号;同第5821047号;および同第6512097号において説明されているように、周知のファージディスプレイ技術を用いて産生させてよい。

#### 【0179】

さらなる態様において、本発明の抗体は、例えば、米国特許第6,423,538号;同第6,300,065号;同第6,696,251号;同第6,699,658号において説明されているような酵母細胞表面ディスプレイ技術を用いて発見することができる。

#### 【0180】

本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するために、免疫化マウス由来の脾細胞および/またはリンパ節細胞を単離し、かつ、マウス骨髄腫細胞株のような適切な不死化細胞株に融合させることができる。結果として生じるハイブリドーマを、抗原特異的な抗体の産生についてスクリーニングすることができる。例えば、免疫化マウス由来の脾臓リンパ球の単細胞懸濁液を、50%PEGを用いて、6分の1の数のP3X63-Ag8.653非分泌性マウス骨髄腫細胞(ATCC、CRL 1580)に融合させてよい。あるいは、免疫化マウス由来の脾臓リンパ球の単細胞懸濁液を、Cyto Pulse大チャンバー細胞融合エレクトロポレーター(Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie Maryland)を用いて、電場に基づく電気融合法によって融合させることもできる。約 $2 \times 10^5$ 個の細胞を平底マイクロタイタープレート中に播種し、続いて、20%胎仔クローン血清、18%「653」順化培地、5%オリゲン(Origen)(IGEN)、4mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、5mM HEPES、0.055mM 2-メルカプトエタノール、50ユニット/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシン、50mg/mlゲンタマイシン、および $1 \times \text{HAT}$ (Sigma; HATは融合後24時間目に添加する)を含む選択培地中で2週間インキュベーションする。約2週間後、細胞は、HATをHTに交換した培地中で培養してよい。次いで、個々のウェルを、ELISAにより、ヒトモノクローナルIgM抗体およびIgG抗体についてスクリーニングすることができる。大規模なハイブリドーマ増殖が一度起こったら、通常10~14日後に培地を観察してよい。抗体を分泌するハイブリドーマを再度播種し、再びスクリーニングしてよく、かつ、ヒトIgGについて依然として陽性である場合は、モノクローナル抗体を限界希釈によって少なくとも2回サブクロニングすることができる。次いで、安定なサブクローンをインビトロで培養して、特徴付けのために組織培養培地中で少量の抗体を生成させることができる。

#### 【0181】

ヒトモノクローナル抗体を精製するために、選択したハイブリドーマをモノクローナル抗体精製用の2リットルスピナーフラスコ中で増殖させることができる。上清をろ過および濃縮した後、プロテインAセファロース(Pharmacia, Piscataway, N.J.)を用いたアフィニティークロマトグラフィーにかけることができる。溶出されたIgGは、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによってチェックして純度を保証することができる。緩

10

20

30

40

50

衝液はPBSに交換することができ、かつ濃度は、吸光係数1.43を用いてOD<sub>280</sub>によって決定することができる。モノクローナル抗体は、等分し、かつ-80℃で保存することができる。

#### 【0182】

本発明のモノクローナル抗体を産生するトランスフェクターマの作製

本発明の抗体はまた、例えば、当技術分野において周知の組換えDNA技術および遺伝子トランスフェクション方法の組み合わせ(例えば、Morrison, S.(1985) Science 229:1202)を用いて、宿主細胞トランスフェクターマ(あるタイプのハイブリドーマ)において産生させることもできる。

#### 【0183】

例えば、抗体またはそれらの抗体断片を発現させるために、一部分または完全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAを、標準的な分子生物学技術(例えば、関心対象の抗体を発現するハイブリドーマを用いたPCR増幅またはcDNAクローニング)によって得ることができ、かつそれらのDNAを、それらの遺伝子が転写制御配列および翻訳制御配列に機能的に連結されるように発現ベクター中に挿入することができる。この文脈において、「機能的に連結される」という用語は、抗体遺伝子が、ベクター内の転写制御配列および翻訳制御配列がその抗体遺伝子の転写および翻訳を調節する意図された機能を果たすように、ベクターに連結されることを意味すると意図される。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞に適合するように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別々のベクター中に挿入されてよく、またはより典型的には、両方の遺伝子が同じ発現ベクター中に挿入される。抗体遺伝子は、標準的な方法(例えば、抗体遺伝子断片およびベクター上の相補的な制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合には平滑末端ライゲーション)によって、発現ベクター中に挿入される。説明される抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、V<sub>H</sub>セグメントがベクター内のC<sub>H</sub>セグメントに機能的に連結され、かつV<sub>K</sub>セグメントがベクター内のC<sub>L</sub>セグメントに機能的に連結されるように、所望のアイソタイプの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を既にコードしている発現ベクター中にそれらを挿入することによって、任意の抗体アイソタイプの完全長抗体遺伝子を作製するのに使用することができる。さらにまたはその代わりに、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードし得る。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、ベクター中にクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド(すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド)でよい。

#### 【0184】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞において抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を有する。「調節配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー、および、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御する他の発現制御エレメント(例えばポリアデニル化シグナル)を含むと意図される。このような調節配列は、例えば、Goeddel(Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA(1990))に記載されている。調節配列の選択を含む、発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどのような因子に依存し得ることが、当業者には理解されると考えられる。哺乳動物宿主細胞発現のために好ましい調節配列には、サイトメガロウイルス(CMV)、サルウイルス(Simian Virus)40(SV40)、アデノウイルス(例えばアデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP))、およびポリオマに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーなど、哺乳動物細胞において高レベルのタンパク質発現を指示するウイルスエレメントが含まれる。あるいは、ユビキチンプロモーターまたはβ-グロビンプロモーターなどの非ウイルス調節配列も使用され得る。さらになお、調節エレメントは、SV40初期プロモーターおよびヒトT細胞白血病ウイルス1型の末端反復配列に由来する配列を含むSR $\square$ プロモーター系のように、異なる供給源に由来する配列から構成された(Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-4

10

20

30

40

50

72)。

#### 【0185】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列(例えば、複製起点)および選択マーカー遺伝子など付加的な配列を有し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする(例えば、いずれもAxelらによる米国特許第4,399,216号、同第4,634,665号、および同第5,179,017号を参照されたい)。例えば、典型的には、選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、G418、ヒグロマイシン、またはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を与える。好ましい選択マーカー遺伝子には、(メトトレキサート選択/増幅と共にdhfr-宿主細胞において使用するための)ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)遺伝子および(G418選択のための)neo遺伝子が含まれる。

10

#### 【0186】

軽鎖および重鎖を発現させるために、軽鎖および重鎖をコードする発現ベクターを、標準的技術によって宿主細胞中にトランスフェクトする。用語「トランスフェクション」の様々な形態は、原核宿主細胞または真核宿主細胞中に外因性DNAを導入するために一般に使用される多種多様な技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、およびDEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含すると意図される。原核宿主細胞または真核宿主細胞のいずれかにおいて本発明の抗体を発現させることが理論的に可能であるが、真核細胞、および最も好ましくは哺乳動物宿主細胞における抗体の発現が最も好ましい。これは、そのような真核細胞、および特に哺乳動物細胞の方が、原核細胞よりも、正しくフォールディングされ免疫学的に活性な抗体を構築および分泌する可能性が高いためである。抗体遺伝子の原核生物発現は、高収量の活性抗体を産生させるのに効果的ではないことが報告されている(Boss, M. A.およびWood, C. R.(1985)Immunology Today 6:12-13)。

20

#### 【0187】

本発明の組換え抗体を発現させるために好ましい哺乳動物宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(例えば、R. J. Kaufmanおよび P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621で記載されているように、DHFR選択マーカーと共に使用される、UrlaubおよびChasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されているdhfr-CHO細胞を含む)、NSO骨髓腫細胞、COS細胞、およびSP2細胞が含まれる。特に、NSO骨髓腫細胞と共に使用する場合、別の好ましい発現系は、WO 87/04462、WO 89/01036、およびEP 338,841において開示されているGS遺伝子発現系である。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞に導入される場合、宿主細胞における抗体の発現、またはより好ましくは、宿主細胞を増殖させる培地中への抗体の分泌を可能にさせるのに十分な期間、それらの宿主細胞を培養することによって、抗体が産生される。抗体は、標準的なタンパク質精製方法を用いて培地から回収することができる。

30

#### 【0188】

RTKのIg様ドメインに対する抗体結合の特徴付け

本発明の抗体は、例えば、標準的なELISAによって、外部ドメイン、例えば、RTKのIg様ドメイン(または本明細書において考察するコンセンサス配列のような任意の選択された領域)に対する結合について試験することができる。手短に言えば、マイクロタイタープレートに0.25 µg/mlのPBS中精製Ig様ドメイン(または好ましい受容体ドメイン)でコーティングし、次いでPBS中5%ウシ血清アルブミンでブロッキングする。抗体の希釈物(例えば、免疫化マウス、例えば、ヒトKitのD4ドメインまたはD5ドメインで免疫化したマウスに由来する血漿の希釈物)を各ウェルに添加し、かつ37°Cで1~2時間インキュベートする。これらのプレートをPBS/Tweenで洗浄し、次いで、アルカリ性ホスファターゼに結合させた二次反応物(例えば、ヒト抗体に対しては、ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクロナル反応物)と共に、37°Cで1時間インキュベートする。洗浄後、これらのプレートをpNPP基質(1mg/ml)を用いて発色させ、かつ405~650のODで解析する。好ましくは、最も高い力価を示すマウスが、融合に使用される。

40

50

## 【0189】

前述のELISAアッセイ法はまた、免疫原に対して陽性の反応性を示すハイブリドーマを求めてスクリーニングするために使用することもできる。例えば、RTKのIg様ドメインに高い結合力で結合するハイブリドーマをサブクロニングし、さらに特徴付ける。-140℃で保存される5~10バイアルの細胞バンクを作製し、かつ抗体を精製するために、親細胞の反応性を保持している(EILSAによる)、各ハイブリドーマに由来する1つのクローンを選択することができる。

## 【0190】

抗RTK抗体を精製するには、選択したハイブリドーマを、モノクローナル抗体精製の2リットルスピナーフラスコ中で増殖させることができる。上清をろ過および濃縮した後、10  
プロテインAセファロース(Pharmacia, Piscataway, NJ)を用いたアフィニティークロマトグラフィーにかけることができる。溶出されたIgGは、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによってチェックして純度を保証することができる。緩衝液はPBSに交換することができ、かつ濃度は、吸光係数1.43を用いてOD<sub>280</sub>によって決定することができる。モノクローナル抗体は、等分し、かつ-80℃で保存することができる。

## 【0191】

選択されたモノクローナル抗体が特有のエピトープに結合するか判定するために、市販されている試薬(Pierce, Rockford, IL)を用いて、各抗体をビオチン標識することができる。非標識のモノクローナル抗体およびビオチン標識モノクローナル抗体を用いた競合研究は、前述したようにRTKのIg様ドメイン(例えば、Kit-D4ドメインまたはKit-D5ドメイン)20  
でコーティングした、RTKコーティングELISAプレートを用いて実施することができる。ビオチン標識mAbの結合は、ストレプトアビジン(strep-avidin)-アルカリ性ホスファターゼプローブを用いて検出することができる。

## 【0192】

精製した抗体のアイソタイプを決定するために、特定のアイソタイプの抗体に特異的な試薬を用いて、アイソタイプELISAを実施することができる。例えば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを決定するために、マイクロタイタープレートのウェルを、1μg/mlの抗ヒト免疫グロブリンで、4℃で一晩コーティングすることができる。1%BSAでブロッキングした後、これらのプレートを、周囲温度で1~2時間、1μg/mlまたはそれより低濃度の試験モノクローナル抗体または精製したアイソタイプ対照と反応させる。次いで、30  
これらのウェルを、ヒトIgG1またはヒトIgMに特異的なアルカリ性ホスファターゼ結合プローブのいずれかと反応させることができる。前述したように、プレートを発色させ、かつ解析する。

## 【0193】

抗RTKヒトIgGは、ウェスタンブロット法によって、本明細書において提示するRTKのIg様ドメインまたはコンセンサス配列との反応性に関してさらに試験することができる。手短に言えば、RTKのIg様ドメイン、例えば、Kit RTKのD4ドメインまたはD5ドメインを調製し、かつドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することができる。電気泳動後、分離された抗原をニトロセルロース膜に移し、10%ウシ胎仔血清でブロッキングし、かつ試験すべきモノクローナル抗体でプローブする。ヒトIgG結合は、抗ヒトIgGアルカリ性ホスファターゼを用いて検出し、かつBCIP/NBT基質タブレット(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.)を用いて発色させることができる。40

## 【0194】

エピトープマッピングを使用して、本発明の抗体またはその抗原結合断片の結合部位を決定することができる。立体構造エピトープのマッピングをさらに可能にするいくつかの方法が利用可能である。例えば、Timmerman et al. (Mol Divers. 2004;8(2):61-77)で開示されている方法を使用してよい。Timmermanらは、2つの新規な技術、すなわちDomain ScanおよびMatrix Scanを用いて、不連続エピトープ/立体構造エピトープを成功裡にマッピングすることができた。Ansong et al. (J Thromb Haemost. 2006. 4(4):842-7)で開示されている技術もまた、使用され得る。Ansongらは、親和性に依存する質量分析法を用50

いて、抗体R8B12によって認識される不連続エピトープをマッピングした。さらに、Protein Tomographyのような画像処理技術を使用して、標的RTKに結合する抗体またはペプチドを可視化することもできる。Protein Tomographyは、分子相互作用を洞察するために以前に使用されており、これを用いて、阻害抗体はEGFRのドメインIIIに結合し、それによって、柔軟性がない不活性な立体構造にEGFRを留めることが示された(Lammerts et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008.105 (16):6109-14)。また、部位特異的変異誘発のようなより伝統的な方法も、不連続エピトープをマッピングするために適用され得る。不連続エピトープに関与すると考えられているアミノ酸領域は、選択的に変異させ、本発明の抗体またはその抗原結合断片への結合に関して分析することができる。どちらか一方の領域が変異している場合に抗体が結合できないならば、結合が両方のアミノ酸区域に依存していることが示唆され得る。上記のように、いくつかの直線状エピトープは、本発明の部分に結合するために存在しなければならない特定の三次元構造を特徴とする。このようなエピトープは、RTKが天然状態またはフォールディングされた状態である場合、およびまた、RTKが変性している場合の抗体(または別の部分)の結合を分析することによって、発見することができる。フォールディングされた状態の場合にのみ結合が起こるという観察結果から、エピトープは、特定のフォールディングされた構造を特徴とする直線状エピトープまたはフォールディングされたタンパク質にのみ存在する不連続エピトープのいずれかであることが示唆される。

10

#### 【0195】

本明細書において説明する活性アッセイ法に加えて、Protein Tomographyを使用して、本発明の抗体またはその抗原結合断片が、受容体型チロシンキナーゼに結合し不活性化できるかどうかを判定することができる。結合相互作用を可視化することにより、抗体の結合が、細胞表面境界面における2つの外部ドメインの位置付けに影響を及ぼし得るか、または受容体型チロシンキナーゼの立体構造的変化を変更もしくは妨害し得るかを示すことができる。

20

#### 【0196】

II. ヒト受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインまたはヒンジ領域に結合する低分子

本発明の別の局面において、ヒト受容体型チロシンキナーゼの外部ドメイン、例えばIg様ドメインまたはヒンジ領域に結合する部分は、低分子である。

#### 【0197】

本発明の低分子は、特有の機能的特徴または特性を特徴とする。例えば、これらの低分子は、RTKのIg様ドメイン、例えば、Kit RTKのD4ドメインもしくはD5ドメイン、またはRTKのヒンジ領域、例えば、Kit RTKのD3-D4ヒンジ領域もしくはD4-D5ヒンジ領域に結合する。好ましい態様において、D3-D4ヒンジ領域またはD4-D5ヒンジ領域に低分子阻害物質が結合すると、膜近位のD4ドメインおよびD5ドメインがチロシンキナーゼドメインのトランス自己リン酸化および活性化とそれに続く下流のシグナル伝達経路の動員および活性化を可能にする距離および向き(位置)に存在することを可能にする動作が妨害されと考えられる。いくつかの態様において、低分子結合は、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインが二量体化するのを許容するが、2つの単量体のIg様ドメイン(例えば、III型受容体型チロシンキナーゼのD4-D4ドメインもしくはD5-D5ドメイン、またはV型受容体型チロシンキナーゼのD7-D7ドメイン)の位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼし、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害する。言い換えると、この部分または低分子は、リガンドによって誘導される受容体型チロシンキナーゼ外部ドメインの二量体化を許容し得るが、細胞表面境界面における2つの外部ドメインの位置付けに影響を及ぼし、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害し得る(例えば、受容体内在化の阻害および/もしくは受容体のチロシン自己リン酸化の阻害ならびに/または受容体が下流のシグナル伝達経路を活性化する能力の阻害)。

30

40

#### 【0198】

「低分子化合物」、「低分子薬物」、「低分子」、または「低分子阻害物質」という用語は、本明細書において同義的に使用され、RTKに対する影響およびRTK、例えばKit RTK

50

の二量体化または活性を阻害する能力に関してスクリーニングされた本発明の化合物を意味する。これらの化合物は、PubChemデータベース(pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)、Molecular Libraries Screening Center Network (MLSCN)データベースの化合物、関連するデータベースの化合物、またはそれらの誘導体および/もしくは機能的類似体を含んでよい。

#### 【0199】

本明細書において使用される場合、「類似体」または「機能的類似体」とは、親化合物に構造的に類似しているが、組成がわずかに異なる(例えば、1つまたは複数の原子または官能基が付加、除去、または改変されている)化学化合物または低分子阻害物質を意味する。類似体は、元の化合物とは異なる化学的特性または物理的特性を有しても有さなくてもよく、改善した生物活性および/または化学的活性を有しても有さなくてもよい。例えば、類似体の方が疎水性が高くてもよく、または、類似体は親化合物と比べて変化した活性(親化合物より増大、減少、もしくは同一)を有してもよい。類似体は、元の化合物の天然に存在する変種または天然に存在しない(例えば、組換え)変種でよい。他のタイプの類似体には、異性体(鏡像異性体およびジアステレオマーなど)および化合物の他のタイプのキラル変種、ならびに構造異性体が含まれる。類似体は、直線状化合物の分枝変種または環式変種でもよい。例えば、直線状化合物は、分枝状であるか、またはそうでなければ、ある種の望ましい特性を与えるため(例えば、親水性または生物学的利用能を改善するため)に置換された類似体を有してよい。

#### 【0200】

本明細書において使用される場合、「誘導体」とは、親化合物に構造的に類似しており、親化合物から(実際にまたは理論的に)誘導できる、化学化合物または低分子阻害物質の化学的または生物学的に改変された種類を意味する。「誘導体」は、親化合物が「誘導体」を作製するための出発原料であり得るという点で、「類似体」または「機能的類似体」と異なり、「類似体」または「機能的類似体」を作製するための出発原料としては親化合物を必ずしも使用しなくてもよい。誘導体は、親化合物と異なる化学的特性または物理的特性を有してよく、または有さなくてもよい。例えば、誘導体の方が親水性が高くてもよく、または、誘導体は親化合物と比べて変化した反応性を有してもよい。誘導体化(すなわち、化学的手段または他の手段による改変)は、分子内の1つまたは複数の部分の置換(例えば、官能基中の変化)を伴ってよい。例えば、水素をフッ素もしくは塩素などのハロゲンで置換してよく、または、ヒドロキシル基(-OH)をカルボン酸部分(-COOH)で置換してもよい。「誘導体」という用語はまた、親化合物の結合体およびプロドラッグ(すなわち、生理的条件下で元の化合物に変換され得る、化学的に改変された誘導体)も含む。例えば、プロドラッグは、活性な作用物質の不活性型でよい。生理的条件下で、プロドラッグは化合物の活性型に変換され得る。プロドラッグは、例えば、窒素原子上の1つまたは2つの水素原子をアシル基(アシルプロドラッグ)またはカルバマート基(カルバマートプロドラッグ)で置換することによって、形成することができる。プロドラッグに関するより詳細な情報は、例えば、Fleisher et al., Advanced Drug Delivery Reviews 19 (1996) 115; Design of Prodrugs, H.Bundgaard(編), Elsevier, 1985;およびH. Bundgaard, Drugs of the Future 16 (1991) 443において見出される。「誘導体」という用語はまた、親化合物のあらゆる溶媒和物、例えば、水和物または付加体(例えば、アルコールの付加体)、活性な代謝産物、および塩を説明するのにも使用される。調製され得る塩のタイプは、化合物内の部分の性質に依存する。例えば、カルボン酸基のような酸性基は、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩(例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、ならびに生理的に許容できる四級アンモニウムイオンとの塩、ならびにアンモニアおよび生理的に許容できるトリエチルアミン、エタノールアミン、またはtris-(2-ヒドロキシエチル)アミンなどの有機アミンとの酸付加塩を形成することができる。塩基性基は、例えば、塩酸(「HCl」)、硫酸、もしくはリン酸などの無機酸と、または有機カルボン酸および酢酸、クエン酸、安息香酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、もしくはp-トルエンスルホン酸などのスルホン酸と酸付加塩を形成することができる。塩基性基および酸性基、例えば、塩基性窒素原子に加えてカルボキシル基を同時

に含む化合物は、双性イオンとして存在することができる。塩は、当業者に公知の習慣的な方法によって、例えば、ある化合物を溶媒もしくは希釈液中の無機もしくは有機の酸もしくは塩基と混合することにより、または陽イオン交換もしくは陰イオン交換によって他の塩から得ることができる。

#### 【0201】

低分子の分子量は、1200もしくはそれ未満、1000もしくはそれ未満、900もしくはそれ未満、800もしくはそれ未満、700もしくはそれ未満、600もしくはそれ未満、500もしくはそれ未満、400もしくはそれ未満、300もしくはそれ未満、200もしくはそれ未満、100もしくはそれ未満、50もしくはそれ未満、25もしくはそれ未満、または10もしくはそれ未満であることが公知である。

10

#### 【0202】

本発明の低分子阻害物質は、RTKの外部ドメイン、例えばIg様ドメインまたはヒンジ領域に結合するように選択または設計される。いくつかの態様において、低分子阻害物質は、ヒトKitまたはPDGFRのIg様ドメインまたはヒンジ領域、例えば、ヒトKit受容体のD4ドメインもしくはD5ドメイン、またはD3-D4ヒンジ領域および/もしくはD4-D5ヒンジ領域に結合し、それによって、受容体が二量体化して活性になる、例えば、自己リン酸化して細胞内シグナル伝達経路を活性化する能力に拮抗するように選択または設計される。他の態様において、低分子阻害物質は、Kit受容体のあるドメインに対する相同性を有するドメインに結合するように選択される。例えば、本発明の低分子は、RTKのIg様ドメイン、例えば、KitのD4ドメインもしくはD5ドメイン、またはRTKのヒンジ領域、例えば、Kit受容体もしくはPDGFR受容体のD3-D4ヒンジ領域もしくはD4-D5ヒンジ領域に少なくとも50%同一、少なくとも60%同一、少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、または少なくとも95%もしくは99%同一であるドメインを対象としてよい。このような低分子は、例えば、Kit受容体またはPDGF受容体のD4ドメインもしくはD5ドメイン、またはD3-D4ヒンジ領域および/もしくはD4-D5ヒンジ領域と機能的に類似している、おそらくKitおよび他のRTK中のタンパク質ドメインに結合できると思われる。

20

#### 【0203】

また、本発明の低分子阻害物質は、RTK、例えばヒトIII型RTKのIg様ドメインまたはヒンジ領域に由来する特定のモチーフまたはコンセンサス配列に結合して、低分子阻害物質が、RTKファミリーのメンバー間、例えば、RTKのヒトIII型ファミリーのメンバー間で共通のドメインに特異的に結合するのを可能にすることができる。

30

#### 【0204】

特定の態様において、本発明の低分子は、D4相互作用部位の次のコンセンサス配列：

$LX_1RX_2X_3X_4X_5X_6X_7G$

に結合する低分子であり、

配列中、Lはロイシンであり、Rはアルギニンであり、Gはグリシンであり； $X_1$ は、トレオニン、イソロイシン、バリン、プロリン、アスパラギン、またはリジンからなる群より選択され； $X_2$ は、ロイシン、バリン、アラニン、およびメチオニンからなる群より選択され； $X_3$ は、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、およびアルギニンからなる群より選択され； $X_4$ は、グリシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、プロリン、およびメチオニンからなる群より選択され； $X_5$ は、トレオニン、セリン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、およびアスパラギン酸からなる群より選択され； $X_6$ は、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびグルタミンからなる群より選択され；かつ $X_7$ は、グリシン、セリン、アラニン、リジン、アルギニン、グルタミン、およびトレオニンからなる群より選択される。

40

#### 【0205】

別の態様において、本発明の低分子は、VEGF受容体ファミリーのメンバーのD7ドメインの次のコンセンサス配列：

$IX_1RVX_2X_3EDX_4G$  (SEQ ID NO: 1)

に結合する低分子であり、

50

配列中、Iはイソロイシンであり、Rはアルギニンであり、Eはグルタミン酸であり、Dはアスパラギン酸であり、Gはグリシンであり;X<sub>1</sub>は、グルタミン酸、アルギニン、およびグルタミンからなる群より選択され;X<sub>2</sub>は、アルギニンおよびトレオニンからなる群より選択され;X<sub>3</sub>は、グルタミン酸およびリジンからなる群より選択され;X<sub>4</sub>は、グルタミン酸およびアラニンからなる群より選択される。

#### 【0206】

他の態様において、低分子阻害物質は、タンパク質の三次元構造体に相当するタンパク質モチーフまたはコンセンサス配列に結合する。このようなモチーフまたはコンセンサス配列は、連続的な一続きのアミノ酸に相当しないが、RTKの三次元フォールディングの結果として生じる非直線状アミノ酸配置(すなわち、構造モチーフ)に相当する。このようなモチーフの例は、Kit受容体のD3-D4ヒンジ領域および/またはD4-D5ヒンジ領域に基づいて設計されたモチーフである。このようなモチーフおよびコンセンサス配列は、抗体に関してセクションIで考察した方法に従って設計することができる。

#### 【0207】

重要なことには、本発明の低分子阻害物質は、RTKのリガンド結合部位、例えば、Kit受容体のSCF結合部位に結合しない。言い換えると、低分子阻害物質は、リガンド結合を担っているRTKのIg様ドメインに結合しない。

#### 【0208】

その他の態様において、本発明の低分子阻害物質は、RTKの変異外部ドメイン、例えば、変異Ig様ドメインまたは変異ヒンジ領域に特異的に結合するように選択または設計される。好ましい態様において、変異RTKは、腫瘍形成性変異体または発癌性変異体である。1つの特定の態様において、低分子阻害物質は、発癌性Kit受容体変異体に結合するように選択または設計される。本発明の低分子が標的とし得るKit受容体変異体は、1個または複数個の次のアミノ酸:Thr417、Tyr418、Asp419、Leu421、Arg420、Tyr503、またはAla502に変異を有するKit受容体である。本発明の方法は、Kitの他の変異または他のRTKの変異に応用可能であることを当業者は理解すべきである。変異RTKを標的とする1つの利点は、治療的低分子が、その変異を含む細胞上のRTKのみに結合でき、健常な細胞の大部分または全部が影響を受けずに残ることである。したがって、変異が腫瘍形成性である場合、腫瘍細胞のみが療法の標的とされて、副作用および投与必要量が潜在的に減少すると思われる。

#### 【0209】

いくつかの態様において、低分子は、ヒトKit受容体の特異的な配列、例えば、ヒトKit受容体の残基309~413番、残基410~519番、<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Glu、または<sup>418</sup>Tyrおよび<sup>50</sup>Asnに結合する。

#### 【0210】

好ましい態様において、本発明の低分子は、表4(下記)で説明する小さな窪みまたはポケットを構成する、Kit受容体の1個または複数個の残基に結合し得る。例えば、本発明の低分子は、Kit受容体のD3-D4ヒンジ領域中の1個または複数個の次の残基:D3ドメイン由来のK218、S220、Y221、L222およびD4ドメイン由来のF340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、Y373に結合し得る。本発明の低分子はまた、Kit受容体のD4ドメイン中の窪んだ表面を構成する1個または複数個の次の残基:Y350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390にも結合し得る。別の態様において、本発明の低分子は、Kit受容体のD2-D3ヒンジ領域中のポケットを形成する1個または複数個の次の残基:D2ドメイン由来のY125、G126、H180、R181、K203、V204、R205、P206、およびF208ならびにD3ドメイン由来のV238、S239、S240、S241、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269に結合し得る。

#### 【0211】

したがって、いくつかの態様において、本発明の低分子は、連続的なアミノ酸残基または非連続的なアミノ酸残基に結合し、チロシンキナーゼ活性化を可能にする距離および向きにRTKの膜近位領域辺を位置付けるために必要な動きを妨害する分子くさびとして機能

し得る。また、本発明の低分子は、同型のD4もしくはD5の受容体相互作用を妨害するか、またはリガンド-受容体相互作用部位を不安定化する役割を果たし得る。いくつかの好ましい態様において、本発明の低分子は、Kit受容体上の1個または複数個の次の残基：

Y125, G126, H180, R181, K203, V204, R205,  
P206, P206, F208, K127, A207, V238, S239, S240, S241, H263, G265, D266, F267,  
N268, Y269, T295, L222, L222, L223, E306, V308, R224, V308, K310, K218, A219,  
S220, K218, A220, Y221, A339, D327, D398, E338, E368, E386, F312, F324, F340,  
F355, G311, G384, G387, G388, I371, K342, K358, L382, L379, N326, N367, N370,  
N410, P341, S369, T385, V325, V407, V409, Y373, Y350, Y408, T380, T390, R381,  
R353, T411, K412, E414, K471, F433, G470, L472, V497, F469, A431, または G432

10

に結合し得る。当業者は、いくつかの態様において、本発明の低分子が、他のIII型RTK中の対応する残基、例えば、同様のポケットもしくは窪みを形成する残基または構造アライメントもしくは配列アライメントによって同じ位置になる残基を容易に標的とできることを理解するであろう。

#### 【0212】

特定の態様において、本発明の低分子は、III型RTK上の立体構造エピトープまたは不連続エピトープに結合する。立体構造エピトープまたは不連続エピトープは、III型RTK、例えば、ヒトKit受容体またはPDGF受容体に由来するD3ドメイン、D4ドメイン、もしくはD5ドメインまたはD4-D5ヒンジ領域もしくはD3-D4ヒンジ領域に由来する2個以上の残基から構成され得る。例えば、立体構造エピトープまたは不連続エピトープは、下記の表4に挙げる2個以上の残基から構成され得る。特定の態様において、本発明の低分子は、

20

Y125, H180, R181, K203, V204, R205, P206, V238, S239, S240, H263,  
G265, D266, F267, N268, および Y269

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープに結合する。同様の態様において、本発明の低分子は、次のアミノ酸の群：

30

P206, F208, V238, および S239;  
K127, A207, F208, および T295; L222, A339, F340, K342, E368, S369, N370, I371, および  
Y373; L222, L223, E306, V308, F312, E338, F340, および I371; R224, V308, K310, G311,  
F340, P341, および D398; K218, A219, S220, N367, E368, および S369; K218, A220, E368,  
および S369; G384, T385, T411, K412, E414, および K471; Y408, F433, G470, K471, および  
L472; F324, V325, N326, および N410; D327, N410, T411, K412, および V497; G384, G387,  
V409, および K471; L382, G387, V407, および V409; Y125, G126, H180, R181, K203, V204,  
R205, P206, F208, V238, S239, S240, S241, H263, G265, D266, F267, N268, および  
Y269; P206, F208, V238, および S239; K218, S220, Y221, L222, F340, P341, K342,  
N367, E368, S369, N370, I371, および Y373; G384, G387, G388, Y408, V409, T411,  
F433, F469, G470, および K471; D327, T411, K412, E414, A431, G432, および K471; Y350,  
F355, K358, L379, T380, R381, L382, E386, および T390; Y350, R353, および F355

40

の内の1つより選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープに結合し得る。先に示したように、本発明の低分子は、表4において特定するポケットもしくは窪みを形成するアミノ酸残基すべてに結合し得るか、または、それらはポケットもしくは窪みを形成する残基の一部に結合し得る。特定の態様において、エピトープ、例えば立体構

50

造エピトープに結合する本発明の低分子に言及する場合、その低分子がエピトープ(例えば、表4において特定するポケットもしくは窪み)を構成する特異的残基のみに結合し、受容体の直線状アミノ酸配列中の他の残基には結合しないという趣旨であることを理解すべきである。

### 【0213】

さらなる態様において、本発明の低分子は、表5に挙げるペプチドより選択される2個以上のアミノ酸残基から構成される立体構造エピトープに結合する。特定の態様において、立体構造エピトープは、第1のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸残基、および第2のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸残基から構成され、第1のペプチドおよび第2のペプチドは、表5に挙げるペプチドの群より選択される。したがって、本発明の低分子は、第1のペプチドおよび第2のペプチドの群が次のとおりである立体構造エピトープに結合する：

Ala219-Leu222およびThr304-Val308; Asp309-Gly311およびArg224-Gly226; Thr303 -  
Glu306およびAla219-Leu222; Asn367-Asn370およびSer217-Tyr221; Ala339-Pro343および  
Asn396-Val399; Ala339-Pro343およびGlu368-Arg372; Lys358-Tyr362およびVal374-  
His378; Asp357-Glu360およびLeu377-Thr380; Met351-Glu360およびHis378-Thr389;  
His378-Thr389およびVal323-Asp332; Val409-Ile415およびAla493-Thr500; Val409-Ile415  
およびAla431-Thr437; Val409-Ile415およびPhe469-Val473; Val409-Ile415およびVal325-  
Asn330; Val409-Ile415およびArg381-Gly387; Gly466-Leu472およびGly384-Gly388;  
Val325-Glu329およびTyr494-Lys499; Thr411-Ile416およびVal497-Ala502; Ile415-Leu421  
およびAla502-Ala507; Ala502-Ala507およびLys484-Thr488; ならびにAla502-Ala507および  
Gly445-Cys450

。本発明の低分子は、前述の第1のペプチドおよび第2のペプチドの群を形成するアミノ酸残基すべてに結合し得るか、または、それらは第1のペプチドおよび第2のペプチドの群を形成する残基の一部に結合し得る。特定の態様において、エピトープ、例えば立体構造エピトープに結合する本発明の低分子に言及する場合、その低分子がエピトープ(例えば、表5において特定する特異的ペプチド)を構成する特異的残基のみに結合し、受容体の直線状アミノ酸配列中の他の残基には結合しないという趣旨であることを理解すべきである。

### 【0214】

別の態様において、本発明の低分子は、

E33, P34, D72, E76, N77, K78, Q79, K158, D159, N250,  
S251, Q252, T253, K254, L255, N260, W262, H264, G265, E344, N352, R353, F355,  
T356, D357, Y362, S365, E366, N367, N370, およびG466

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープまたは不連続エピトープに結合する。

### 【0215】

別の態様において、本発明の低分子は、ヒトPDGFR  $\beta$  のアミノ酸残基<sup>385</sup>Argおよび<sup>390</sup>Glu、またはPDGFR  $\alpha$  中の対応する残基に結合する。ヒトPDGFR  $\beta$  の残基<sup>385</sup>Argおよび<sup>390</sup>Gluは、Kit受容体の残基<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Gluに類似しており、PDGFR  $\beta$  のD4-D4同型相互作用を媒介する。本発明の低分子は、チロシンキナーゼ活性化のために不可欠な距離および向きに細胞質内ドメインを位置付けるために不可欠である、III型RTKの膜近位領域間の決定的に重要な同型相互作用(例えば、ヒトPDGFR  $\beta$  の<sup>385</sup>Argと<sup>390</sup>Gluの間で形成される塩橋)を妨害することによって、受容体活性化に対する阻害効果を及ぼし得る。本明細書におい

て考察する実験により、D4-D4同型相互作用がPDGFR  $\beta$  二量体化のために必須ではないこと、およびPDGFR  $\beta$  二量体化は受容体活性化のために必要ではあるが十分ではないことが実証される。したがって、本発明の低分子は、活性化を妨害しつつ、PDGFR  $\beta$  の二量体化を許容し得る。構造ベースの配列アラインメントにより、EFループのサイズ、およびD4-D4境界面を含む決定的に重要なアミノ酸が、Kit、PDGFR  $\alpha$ 、PDGFR  $\beta$ 、およびCSF1Rで保存されていることが示された。したがって、いくつかの態様において、本発明の低分子は、II I型RTKのD4ドメインまたはD5ドメインの保存領域を標的とすることができる。

#### 【0216】

好ましい態様において、本発明の低分子は、KitのIg様ドメインまたはヒンジ領域(例えば、Kit受容体のD3-D4ヒンジ領域および/もしくはD4-D5ヒンジ領域またはD4-D4境界面結合部位および/もしくはD5-D5境界面結合部位)に、高い親和性、例えば、 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ もしくはそれ未満の $K_D$ 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ もしくはそれ未満の $K_D$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ もしくはそれ未満の $K_D$ 、 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ もしくはそれ未満の $K_D$ 、または $1 \times 10^{-8} \text{M} \sim 1 \times 10^{-10} \text{M}$ の間もしくはそれ未満の $K_D$ の親和性で結合する。

#### 【0217】

本発明の低分子阻害物質は、当技術分野において公知のいくつかの方法によって作製または選択することができる。スクリーニング手順を用いて、RTKの所望のIg様ドメインまたはヒンジ領域、例えば、ヒトKit RTKのD4ドメインまたはD5ドメインに結合する低分子をライブラリーから同定することができる。1つの方法であるChemetics(登録商標)(Nuevolution)では、選択を容易にするために、ライブラリー中の各分子に対するDNAタグを使用する。Chemetics(登録商標)システムを用いると、数百万個の化合物を標的結合に関してスクリーニングすることが可能になる。低分子ライブラリーおよびタグに基づいたスクリーニングに関する特許は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第20070026397号;同第20060292603号;同第20060269920号;同第20060246450号;同第20060234231号;同第20060099592号;同第20040049008号;同第20030143561号である。

#### 【0218】

RTKの所望のIg様ドメインまたはヒンジ領域、例えば、ヒトKit RTKのD4ドメインまたはD5ドメインに結合する低分子をライブラリーから同定するために使用され得る他の周知の方法には、ライブラリーのメンバーが同定用の標識でタグ化されている、すなわち、ライブラリー中に存在する各標識が、ライブラリー中に存在する別々の(discreet)化合物構造体と結合しており、その結果、標識を同定すると、タグ化された分子の構造が分かるライブラリーを利用する方法が含まれる。タグ化ライブラリーに取り組む1つのアプローチでは、例えば、PCT公報WO 2005/058479 A2(Direct Select(商標)技術)ならびに米国特許第5,573,905号;同第5,708,153号;同第5,723,598号;同第6,060,596号、公開されたPCT出願WO 93/06121;WO 93/20242;WO 94/13623;WO 00/23458;WO 02/074929;およびWO 02/103008、ならびにBrennerおよびLerner (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5381-5383 (1992); NielsenおよびJanda (Methods: A Companion to Methods in Enzymology 6, 361-371 (1994); ならびにNielsen, BrennerおよびJanda (J. Am. Chem. Soc. 115, 9812-9813 (1993))で説明されているように、オリゴヌクレオチドタグを利用する。これらの各文献の内容全体は、参照により本明細書に完全に組み入れられる。このようなタグは、例えばポリメラーゼ連鎖反応法を用いて増幅して、タグのコピーを多数作製し、配列決定によってタグを同定することができる。次いで、タグの配列から、結合分子の構造が特定され、これを純粋な形態で合成し、活性に関して試験することができる。

#### 【0219】

コンビナトリアルケミカルライブラリーの調製およびスクリーニングは、当業者には周知である。本発明の部分を同定するために使用され得るこのようなコンビナトリアルケミカルライブラリーには、ペプチドライブラリーが含まれるがそれに限定されるわけではない(例えば、米国特許第5,010,175号、Furka, Int. J. Pept. Prot. Res. 37:487-493 (1991)、およびHoughton et al., Nature 354:84-88 (1991)を参照されたい)。化学的に多様なライブラリーを作製するための他の化学的性質(chemistries)は当技術分野において周

知であり、使用することができる。このような化学的性質には、非限定的に、次のものが含まれる：ペプチド(例えば、PCT公報WO 91/19735)、コードされたペプチド(例えば、PCT公報WO 93/20242)、ランダムなバイオオリゴマー(例えば、PCT公報WO 92/00091)、ベンゾジアゼピン(例えば米国特許第5,288,514号)、ヒダントイン、ベンゾジアゼピン、およびジペプチドなどのダイバースマー(diversomer)(Hobbs et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:6909-6913(1993))、ビニローグポリペプチド(Hagihara et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:6568(1992))、グルコース骨格を有する非ペプチド性ペプチドミメティック(Hirschmann et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218(1992))、小さな化合物ライブラリーの類似有機合成(Chen et al., J. Amer. Chem. Soc. 116:2661(1994))、オリゴカルバマート(Cho et al., Science 261 :1303 (1993))、ならびに/またはペプチジルホスホナート(Campbell et al., J. Org. Chem. 59:658 (1994))、核酸ライブラリー(Ausubel, Berger, ならびにRussellおよびSambrookを参照されたい。すべて前記。)、ペプチド核酸ライブラリー(例えば、米国特許第5,539,083号を参照されたい)、炭水化物ライブラリー(例えば、Liang et al., Science, 274: 1520-1522 (1996)および米国特許第5,593,853号を参照されたい)、有機低分子ライブラリー(例えば、ベンゾジアゼピン、Baum C&EN, January 18, 33頁(1993); イソプレノイド、米国特許第5,569,588号; チアゾリジノンおよびメタチアザノン、米国特許第5,549,974号; ピロリジン、米国特許第5,525,735号および同第5,519,134号; モルホリノ化合物、米国特許第5,506,337号; ならびにベンゾジアゼピン、米国特許第5,288,514号などを参照されたい)。前述の各出版物は、参照により本明細書に組み入れられる。公的データベースもまた利用可能であり、低分子スクリーニングのために一般に使用される。例えば、PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)、Zinc (IrwinおよびShoichet (2005) J. Chem. Inf. Model. 45(1):177-82)、およびChemBank (Seiler et al. (2008) Nucleic Acids Res. 36(データベース特集号): D351-D359)がある。

#### 【0220】

コンビナトリアルライブラリーを調製するための装置は市販されている(例えば、357 MPS、390 MPS(Advanced Chem Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass.)、433A(Applied Biosystems, Foster City, Calif.)、9050 Plus(Millipore, Bedford, Mass)を参照されたい)。さらに、多数のコンビナトリアルライブラリー自体が市販されている(例えば、ComGenex, Princeton, N.J., Tripos, Inc., St. Louis, Mo., 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Biosciences, Columbia, Md.などを参照されたい)。さらに、スクリーニング方法論は非常に明確に定義されているため、関心対象の標的に対する特定の化合物を同定するための専門の会社と契約することも一般的である(例えば、BioFocus DPI (biofocus.com)およびQuantum Lead (q-lead.com))。

#### 【0221】

当技術分野において周知であり、本発明の方法に適用され得る、低分子を選択する他の方法は、HuangおよびStuart L. Schreiber (1997) Proc Natl Acad Sci U S A. 94(25): 13396-13401; Hung et al. (2005) Science 310:670-674; Zhang et al. (2007) Proc Natl Acad Sci 104: 4606-4611にある方法、またはGordon (2007) ACS Chem. Biol. 2:9-16に総説がある方法のいずれかであり、これらの文献はすべて、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0222】

実験的なスクリーニング方法の他に、本発明の低分子は、仮想スクリーニング方法を用いて選択することもできる。仮想スクリーニング技術は、統計学的解析およびタンパク質ドッキングシミュレーションを用いて、あるタンパク質またはその中の特異的エピトープにライブラリーのどの低分子が結合するかを予測する。最も一般的には、仮想スクリーニング方法では、あるタンパク質の三次元構造をライブラリー中の低分子の三次元構造と比較する。タンパク質-分子相互作用をモデリングするために様々な戦略が使用されるが、水素結合、静電力、およびファンデルワールス相互作用を含む、原子間の結合エネルギーをシミュレートするアルゴリズムを使用するのが一般的である。典型的には、仮想スクリーニング方法では、百万個を超える化合物からなるライブラリーをスキャンし、強い結合

物である可能性が高い低分子の候補リストを出すことができる。本発明の低分子を同定するために使用され得る技術を詳述した、仮想スクリーニング方法のいくつかの総説が入手可能である(Engel et al. (2008) J. Am. Chem. Soc., 130 (15), 5115-5123;McInnes. (2007). Curr Opin Chem Biol. Oct;11(5):494-502; Reddy et al. (2007) Curr Protein Pept Sci. Aug;8(4):329-51; MueggeおよびOloff. (2006) Drug Discovery Today. 3(4): 405-411; Kitchen et al. (2004) Nature Reviews Drug Discovery 3, 935-949)。低分子スクリーニングのさらなる例は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2005/0124678号において見出すことができる。

#### 【0223】

本発明の低分子は、下記の表に示す骨格構造の内の1つを含んでよい。表中で引用する参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。R<sub>1</sub>基、R<sub>2</sub>基、R<sub>3</sub>基、およびR<sub>4</sub>基は、指定の反応に干渉すべきでもなく、顕著に阻害すべきでもないという点でのみ制限され、水素、アルキル、置換されたアルキル、ヘテロアルキル、置換されたヘテロアルキル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、置換されたシクロアルキル、置換されたヘテロシクロアルキル、アリール、置換されたアリール、アリールアルキル、ヘテロアリールアルキル、置換されたアリールアルキル、置換されたヘテロアリールアルキル、ヘテロアリール、置換されたヘテロアリール、ハロゲン、アルコキシ、アリールオキシ、アミノ、置換されたアミノ、および当技術分野において公知である他のものが含まれ得る。適切な置換基には、アルキル、アルコキシ、チオアルコキシ、ニトロ、ヒドロキシル、スルフヒドリル、アリールオキシ、アリール-S-、ハロゲン、カルボキシ、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アリールアミノ、シアノ、シアナート、ニトリル、イソシアナート、チオシアナート、カルバミル、および置換されたカルバミルが含まれるが、それらに限定されるわけではない。

#### 【0224】

(表6)

10

20

| 骨格 | アミン | アルデヒド<br>／<br>ケトン         | カルボン酸 | その他 | 参考文献                                                             |
|----|-----|---------------------------|-------|-----|------------------------------------------------------------------|
|    |     |                           |       |     | Carranco, I., et al.<br>(2005) J. Comb. Chem.<br>7:33-41         |
|    | アミン | ベンズアルデヒド<br>および<br>フルフラール |       |     | Rosamilla, A.E., et al.<br>(2005) Organic Letters<br>7:1525-1528 |
|    |     |                           |       |     | Syeda Huma, H.Z., et al.<br>(2002) Tet Lett<br>43:6485-6488      |
|    |     |                           |       |     | Tempest, P., et al.<br>(2001) Tet Lett<br>42:4959-4962           |
|    |     |                           |       |     | Paulvanan, K.<br>(1999) Tet Lett<br>40:1851-1854                 |
|    |     |                           |       |     | Tempest, P., et al.<br>(2001) Tet Lett<br>42:4963-4968           |

10

20

30

40

|  |                                     |  |                                                                                                                                                                                                       |
|--|-------------------------------------|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | $R2-NH_2$                           |  | <p>Tempest,<br/>P., et<br/>al.<br/>(2003)<br/>Tet Lett<br/>44:1947-<br/>1950</p>                                                                                                                      |
|  | $R1-CHO$ $R2-COOH$                  |  | <p>Nefzi,<br/>A., et al.<br/>(1999)<br/>Tet Lett<br/>40:4939-<br/>4942</p>                                                                                                                            |
|  |                                     |  | <p>Bose,<br/>A.K., et<br/>al.<br/>(2005)<br/>Tet Lett<br/>46:1901-<br/>1903</p>                                                                                                                       |
|  |                                     |  | <p>Stadler,<br/>A. and<br/>Kappe,<br/>C.O.<br/>(2001) J.<br/>Comb.<br/>Chem.<br/>3:624-<br/>630;<br/>Lengar,<br/>A. and<br/>Kappe,<br/>C.O.<br/>(2004)<br/>Organic<br/>Letters<br/>6:771-<br/>774</p> |
|  | <p>広範囲の<br/>脂肪族<br/>第1級<br/>アミン</p> |  | <p>Ivachtch<br/>enko,<br/>A.V., et<br/>al.<br/>(2003) J.<br/>Comb.<br/>Chem.<br/>5:775-<br/>788</p>                                                                                                   |

10

20

30

40

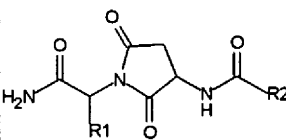
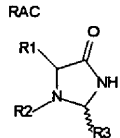
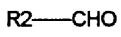
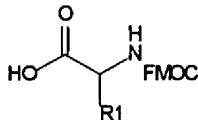
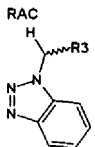
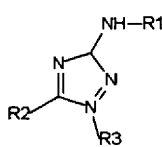
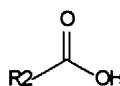
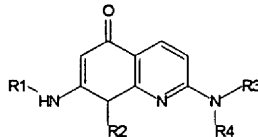
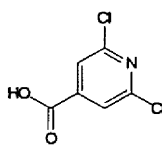
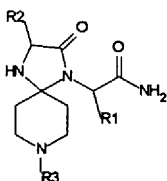
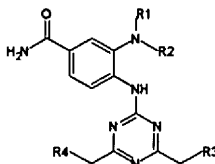
|  |                                       |                 |                                                                                                                                                                             |
|--|---------------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |                                       |                 | <p>Micheli,<br/>F., et al.<br/>(2001) J.<br/>Comb.<br/>Chem.3:<br/>224-228</p>                                                                                              |
|  | <p>R1-HS</p> <p>R1-NH<sub>2</sub></p> |                 | <p>Sternson<br/>, S.M., et<br/>al.<br/>(2001)<br/>Org.<br/>Lett.<br/>3:4239-<br/>4242</p>                                                                                   |
|  |                                       |                 | <p>Cheng,<br/>W.-C., et<br/>al.<br/>(2002) J.<br/>Org. Che<br/>m.<br/>67:5673-<br/>5677;<br/>Park, K.-<br/>H., et al.<br/>(2001) J<br/>Comb<br/>Chem<br/>3:171-<br/>176</p> |
|  |                                       |                 | <p>Brown,<br/>B.J., et<br/>al.<br/>(2000)<br/>Synlett<br/>1:131-<br/>133</p>                                                                                                |
|  | <p>R1-NH<sub>2</sub></p>              |                 | <p>Kilburn,<br/>J.P., et<br/>al.<br/>(2001)<br/>Tet Lett<br/>42:2583-<br/>2586</p>                                                                                          |
|  | <p>アミノ酸</p>                           | <p>アミノ酸エステル</p> | <p>del<br/>Fresno,<br/>M., et al.<br/>(1998)<br/>Tet Lett<br/>39:2639-<br/>2642</p>                                                                                         |

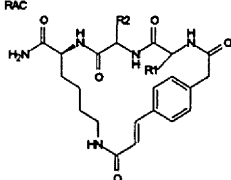
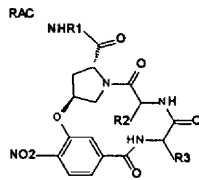
10

20

30

40

|                                                                                     |           |                                                                                    |                                                                                       |                                                                                     |                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|    | アミノ酸      | カルボン酸                                                                              |                                                                                       | Alvarez-Gutierrez, J.M., et al. (2000) Tet Lett 41:609-612                          |                                                      |
|    |           |   |     |  | Rinnová, M., et al. (2002) J. Comb. Chem 4:209-213   |
|    | $R1-NH_2$ |  | $R3-NH-NH_2$                                                                          |                                                                                     | Makara, G.M., et al. (2002) Organic Lett 4:1751-1754 |
|  |           |                                                                                    |  |                                                                                     | Schell, P., et al. (2005) J. Comb. Chem 7:96-98      |
|  |           | アミノ酸                                                                               |                                                                                       |                                                                                     | Feliu, L., et al. (2003) J. Comb. Chem. 5:356-361    |
|  | アミン       | アルデヒド                                                                              |                                                                                       |                                                                                     |                                                      |

|                                                                                   |                                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>アミノ酸</p> <p>Hiroshige, M., et al.<br/>(1995) J. Am. Chem. Soc.<br/>117:11590-11591</p> |
|  | <p>アミノ酸</p> <p>Bose, A.K., et al.<br/>(2005) Tet Lett<br/>46:1901-1903</p>                |

10

## 【0225】

III. ヒト受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合するペプチド分子

本発明の別の局面において、ヒト受容体型チロシンキナーゼの外部ドメイン、例えばIg様ドメインまたはヒンジ領域に結合する部分は、ペプチド分子である。

## 【0226】

20

ペプチド分子は、RTKのIg様ドメインまたはそのようなドメインに由来するコンセンサス配列をベースとして設計してよい。

## 【0227】

特定の態様において、ペプチド分子は、D4相互作用部位の次のコンセンサス配列：

**LX<sub>1</sub>RX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>G**

に結合するペプチド分子であり、

配列中、Lはロイシンであり、Rはアルギニンであり、Gはグリシンであり；X<sub>1</sub>は、トレオニン、イソロイシン、バリン、プロリン、アスパラギン、またはリジンからなる群より選択され；X<sub>2</sub>は、ロイシン、バリン、アラニン、およびメチオニンからなる群より選択され；X<sub>3</sub>は、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、およびアルギニンからなる群より選択され；X<sub>4</sub>は、グリシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、プロリン、およびメチオニンからなる群より選択され；X<sub>5</sub>は、トレオニン、セリン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、およびアスパラギン酸からなる群より選択され；X<sub>6</sub>は、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびグルタミンからなる群より選択され；X<sub>7</sub>は、グリシン、セリン、アラニン、リジン、アルギニン、グルタミン、およびトレオニンからなる群より選択される。

30

## 【0228】

したがって、1つの態様において、本発明のペプチド分子は、前述のコンセンサス配列：

**(LX<sub>1</sub>RX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>G)**

40

に一致する配列を含むか、またはそれからなるペプチド分子であり、

配列中、Lはロイシンであり、Rはアルギニンであり、Gはグリシンであり；X<sub>1</sub>は、トレオニン、イソロイシン、バリン、プロリン、アスパラギン、またはリジンからなる群より選択され；X<sub>2</sub>は、ロイシン、バリン、アラニン、およびメチオニンからなる群より選択され；X<sub>3</sub>は、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、およびアルギニンからなる群より選択され；X<sub>4</sub>は、グリシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、プロリン、およびメチオニンからなる群より選択され；X<sub>5</sub>は、トレオニン、セリン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、およびアスパラギン酸からなる群より選択され；X<sub>6</sub>は、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびグルタミンからなる群より選択され；X<sub>7</sub>は、グリシン、セリン、アラニン、リジン、アルギニン、グルタミン、およびトレオニンからなる群より選択される。

50

## 【0229】

別の態様において、ペプチド分子は、VEGF受容体ファミリーのメンバーのD7ドメインの次のコンセンサス配列:

**IX<sub>1</sub>RVX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EDX<sub>4</sub>G (SEQ ID NO: 1)**

に結合するペプチド分子であり、

配列中、Iはイソロイシンであり、Rはアルギニンであり、Eはグルタミン酸であり、Dはアスパラギン酸であり、Gはグリシンであり;X<sub>1</sub>は、グルタミン酸、アルギニン、およびグルタミンからなる群より選択され;X<sub>2</sub>は、アルギニンおよびトレオニンからなる群より選択され;X<sub>3</sub>は、グルタミン酸およびリジンからなる群より選択され;X<sub>4</sub>は、グルタミン酸およびアラニンからなる群より選択される。

10

## 【0230】

したがって、1つの態様において、本発明のペプチド部分は、コンセンサス配列:

**IX<sub>1</sub>RVX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EDX<sub>4</sub>G (SEQ ID NO: 1)**

に一致する配列を含むか、またはそれからなるペプチド部分であり、

配列中、Iはイソロイシンであり、Rはアルギニンであり、Eはグルタミン酸であり、Dはアスパラギン酸であり、Gはグリシンであり;X<sub>1</sub>は、グルタミン酸、アルギニン、およびグルタミンからなる群より選択され;X<sub>2</sub>は、アルギニンおよびトレオニンからなる群より選択され;X<sub>3</sub>は、グルタミン酸およびリジンからなる群より選択され;X<sub>4</sub>は、グルタミン酸およびアラニンからなる群より選択される。

20

## 【0231】

1つの態様において、本発明のペプチド部分は、タンパク質ドメイン全体、例えば、D4ドメインまたはD5ドメイン、例えば、ヒトKitのD4ドメイン(残基309~413番)またはD5ドメイン(残基410~519番)を含んでよい。さらなる例として、本発明のペプチド部分は、V型RTKのD7ドメイン(またはその断片)、例えばVEGFRのD7ドメインを含んでよい。このようなペプチド分子はRTKに結合し、RTKの活性化を妨害することによってアンタゴニストとして作用する(下記の実施例16を参照されたい)。いくつかの態様において、本発明のペプチド部分は、III型RTKのようなRTKのドメインに対してわずか50%の同一性を有してもよく、例えば、本発明のペプチド部分は、RTKのD4ドメインまたはD5ドメインに少なくとも50%同一、少なくとも60%同一、少なくとも70%同一、少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、または少なくとも95%、96%、97%、もしくは98%同一でよい。特定の態様において、本発明のペプチド部分は、ヒトKit RTKのアミノ酸残基309~413番に少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、または少なくとも95%、96%、97%、もしくは98%同一である。同様の態様において、本発明のペプチド部分は、ヒトKit RTKのアミノ酸残基410~519番に少なくとも80%同一、少なくとも90%同一、または少なくとも95%、96%、97%、もしくは98%同一である。

30

## 【0232】

いくつかの態様において、本発明のペプチド部分は、ヒトKit受容体の特異的配列、例えば、ヒトKit受容体の残基309~413番、残基410~519番、<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Glu、もしくは<sup>418</sup>Tyrおよび<sup>505</sup>Asnに結合するか、またはそれらを含む。

40

## 【0233】

好ましい態様において、本発明のペプチド部分は、表4(下記)で説明する小さな窪みまたはポケットを構成する、Kit受容体の1個または複数個の残基に結合し得る(またはそれを含み得るか、もしくはそれからなり得る)。例えば、本発明のペプチド分子は、Kit受容体のD3-D4ヒンジ領域中の1個または複数個の次の残基:D3ドメイン由来のK218、S220、Y221、L222およびD4ドメイン由来のF340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、Y373に結合し得る(またはそれを含み得るか、もしくはそれからなり得る)。本発明のペプチド分子はまた、Kit受容体のD4ドメイン中の窪んだ表面を構成する1個または複数個の次の残基:Y350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390にも結合し

50

得る(またはそれを含み得るか、もしくはそれからなり得る)。別の態様において、本発明のペプチド分子は、Kit受容体のD2-D3ヒンジ領域中のポケットを形成する1個または複数個の次の残基:D2ドメイン由来のY125、G126、H180、R181、K203、V204、R205、P206、およびF208ならびにD3ドメイン由来のV238、S239、S240、S241、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269に結合し得る(またはそれを含み得るか、もしくはそれからなり得る)。

【0234】

本発明のペプチド部分は、連続的なアミノ酸残基または非連続的なアミノ酸残基に結合し、チロシンキナーゼ活性化を可能にする距離および向きにRTKの膜近位領域辺を位置付けるために必要な動きを妨害する分子くさびとして機能し得る。また、本発明のペプチド分子は、同型のD4もしくはD5の受容体相互作用を妨害するか、またはリガンド-受容体相互作用部位を不安定化する役割を果たし得る。いくつかの好ましい態様において、本発明のペプチド分子は、Kit受容体上の1個または複数個の次の残基:

**Y125, G126, H180, R181, K203, V204, R205, P206, P206,  
F208, K127, A207, V238, S239, S240, S241, H263, G265, D266, F267, N268, Y269,  
T295, L222, L222, L223, E306, V308, R224, V308, K310, K218, A219, S220, K218,  
A220, Y221, A339, D327, D398, E338, E368, E386, F312, F324, F340, F355, G311,  
G384, G387, G388, I371, K342, K358, L382, L379, N326, N367, N370, N410, P341,  
S369, T385, V325, V407, V409, Y373, Y350, Y408, T380, T390, R381, R353, T411,  
K412, E414, K471, F433, G470, L472, V497, F469, A431,またはG432**

に結合し得る(またはそれを含み得るか、もしくはそれからなり得る)。本発明のペプチド部分は、表4において特定するポケットもしくは窪みを形成するアミノ酸残基すべてに結合し得る(またはそれを含み得るか、もしくはそれからなり得る)か、または、それらはポケットもしくは窪みを形成する残基の一部に結合し得る(またはそれを含み得るか、もしくはそれからなり得る)。当業者は、いくつかの態様において、本発明のペプチド分子が、他のIII型RTK中の対応する残基、例えば、同様のポケットもしくは窪みを形成する残基または構造アライメントもしくは配列アライメントによって同じ位置になる残基を容易に標的とできることを理解するであろう。

【0235】

特定の態様において、本発明のペプチド分子は、III型RTK上の立体構造エピトープまたは不連続エピトープに結合する。立体構造エピトープまたは不連続エピトープは、III型RTK、例えば、ヒトKit受容体またはPDGF受容体に由来するD3ドメイン、D4ドメイン、もしくはD5ドメインまたはD4-D5ヒンジ領域もしくはD3-D4ヒンジ領域に由来する2個以上の残基から構成され得る。例えば、立体構造エピトープまたは不連続エピトープは、下記の表4に挙げる2個以上の残基から構成され得る。特定の態様において、本発明のペプチド分子は、

**Y125, H180, R181, K203, V204, R205, P206, V238, S239, S240, H263,  
G265, D266, F267, N268,およびY269**

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープに結合する。同様の態様において、本発明のペプチド分子は、次のアミノ酸の群:

P206, F208, V238, および S239;

K127, A207, F208, および T295; L222, A339, F340, K342, E368, S369, N370, I371, および Y373; L222, L223, E306, V308, F312, E338, F340, および I371; R224, V308, K310, G311, F340, P341, および D398; K218, A219, S220, N367, E368, および S369; K218, A220, E368, および S369; G384, T385, T411, K412, E414, および K471; Y408, F433, G470, K471, および L472; F324, V325, N326, および N410; D327, N410, T411, K412, および V497; G384, G387, V409, および K471; L382, G387, V407, および V409; Y125, G126, H180, R181, K203, V204, R205, P206, F208, V238, S239, S240, S241, H263, G265, D266, F267, N268, および Y269; P206, F208, V238, および S239; K218, S220, Y221, L222, F340, P341, K342, N367, E368, S369, N370, I371, および Y373; G384, G387, G388, Y408, V409, T411, F433, F469, G470, および K471; D327, T411, K412, E414, A431, G432, および K471; Y350, F355, K358, L379, T380, R381, L382, E386, および T390; Y350, R353, および F355

10

の内の1つより選択される2個以上のアミノ酸から構成される立体構造エピトープに結合し得る。

20

#### 【0236】

さらなる態様において、本発明のペプチド分子は、表5に挙げるペプチドより選択される2個以上のアミノ酸残基から構成される立体構造エピトープに結合する。特定の態様において、立体構造エピトープは、第1のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸残基および第2のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸から構成され、第1のペプチドおよび第2のペプチドは、表5に挙げるペプチドの群より選択される。したがって、本発明のペプチド分子は、第1のペプチドおよび第2のペプチドの群が次のとおりである立体構造エピトープに結合する：

Ala219-Leu222 および Thr304-Val308; Asp309-Gly311 および Arg224-Gly226; Thr303 - Glu306 および Ala219-Leu222; Asn367-Asn370 および Ser217-Tyr221; Ala339-Pro343 および Asn396-Val399; Ala339-Pro343 および Glu368-Arg372; Lys358-Tyr362 および Val374-His378; Asp357-Glu360 および Leu377-Thr380; Met351-Glu360 および His378-Thr389; His378-Thr389 および Val323-Asp332; Val409-Ile415 および Ala493-Thr500; Val409-Ile415 および Ala431-Thr437; Val409-Ile415 および Phe469-Val473; Val409-Ile415 および Val325-Asn330; Val409-Ile415 および Arg381-Gly387; Gly466-Leu472 および Gly384-Gly388; Val325-Glu329 および Tyr494-Lys499; Thr411-Ile416 および Val497-Ala502; Ile415-Leu421 および Ala502-Ala507; Ala502-Ala507 および Lys484-Thr488; ならびに Ala502-Ala507 および Gly445-Cys450

30

40

。本発明のペプチド部分は、前述の第1のペプチドおよび第2のペプチドの群を形成するアミノ酸残基すべてに結合し得るか、または、それらは第1のペプチドおよび第2のペプチドの群を形成する残基の一部に結合し得る。

#### 【0237】

別の態様において、本発明のペプチド部分は、

E33,

P34, D72, E76, N77, K78, Q79, K158, D159, N250, S251, Q252, T253, K254, L255,  
N260, W262, H264, G265, E344, N352, R353, F355, T356, D357, Y362, S365, E366,  
N367, N370, および G466

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸に結合し得る(またはそれを含み得るか、もしくはそれからなり得る)。

【0238】

別の態様において、本発明のペプチド分子は、ヒトPDGFR $\beta$ のアミノ酸残基<sup>385</sup>Argおよび<sup>390</sup>Glu、またはPDGFR $\alpha$ 中の対応する残基に結合するか、またはそれらを含む。ヒトPDGFR $\beta$ の残基<sup>385</sup>Argおよび<sup>390</sup>Gluは、Kit受容体の残基<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Gluに類似しており、PDGFR $\beta$ のD4-D4同型相互作用を媒介する。本発明のペプチド分子は、チロシンキナーゼ活性化のために不可欠な距離および向きに細胞質内ドメインを位置付けるために不可欠である、III型RTKの膜近位領域間の決定的に重要な同型相互作用(例えば、ヒトPDGFR $\beta$ の<sup>385</sup>Argと<sup>390</sup>Gluの間で形成される塩橋)を妨害することによって、受容体活性化に対する阻害効果を及ぼし得る。本明細書において考察する実験により、D4-D4同型相互作用がPDGFR $\beta$ 二量体化のために必須ではないこと、およびPDGFR $\beta$ 二量体化は受容体活性化のために必要ではあるが十分ではないことが実証される。したがって、本発明のペプチド分子は、活性化を妨害しつつ、PDGFR $\beta$ の二量体化を許容し得る。構造ベースの配列アラインメントにより、EFループのサイズ、およびD4-D4境界面を含む決定的に重要なアミノ酸が、Kit、PDGFR $\alpha$ 、PDGFR $\beta$ 、およびCSF1Rで保存されていることが示された。したがって、いくつかの態様において、本発明のペプチド分子は、III型RTKのD4ドメインまたはD5ドメインの保存領域を標的とすることができる。

【0239】

本発明のペプチド部分は、本明細書において特定するアミノ酸配列(例えば、SEQ ID NO: 1~89、92、93、および105~157)のいずれかを含むか、またはそれらからなるペプチドでよい。例えば、本発明のペプチド部分は、次のアミノ酸配列のいずれかを含むか、またはそれらからなるペプチドでよい:

EVVDKGFIN

(SEQ ID NO: 2), ASYL (SEQ ID NO: 3), TLEV V (SEQ ID NO: 4), ASYLTLEV V  
(SEQ ID NO: 5), DKG, REG, DKGREG (SEQ ID NO: 6), VVSVSKASYLL (SEQ ID  
NO: 7), VTTTLEVVD (SEQ ID NO: 8), REGEEFTVTCTI (SEQ ID NO: 9), TTLE  
(SEQ ID NO: 10), TTLEASYL (SEQ ID NO: 11), KSENE SNIR (SEQ ID NO: 12),  
NESN (SEQ ID NO: 13), SKASY (SEQ ID NO: 14), NESNSKASY (SEQ ID NO: 15),  
AFPKP (SEQ ID NO: 16), NSDV (SEQ ID NO: 17), AFPKPNSDV (SEQ ID NO: 18),  
ESNIR (SEQ ID NO: 19), AFKPESNIR (SEQ ID NO: 20), DKWEDYPKSE (SEQ ID  
NO: 21), IRYVSELHL (SEQ ID NO: 22), LTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 23),  
GENVDLIVEYE (SEQ ID NO: 24), MNRTFTDKWE (SEQ ID NO: 25), KWEDY  
(SEQ ID NO: 26), VSELH (SEQ ID NO: 27), KWEDYVSELH (SEQ ID NO: 28),  
DKWE (SEQ ID NO: 29), LHLT (SEQ ID NO: 30), DKWELHLT (SEQ ID NO: 31),  
HLTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 32), MNRTFTDKWE (SEQ ID NO: 25),  
HLTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 32), MNRTFTDKWEHLTRLKGTEGGT (SEQ ID

10

20

30

40

50

NO: 33), VVVNDGENVD (SEQ ID NO: 34), VNTKPEI (SEQ ID NO: 35),  
 AYNDVGKT (SEQ ID NO: 36), VNTKPEIAYNDVGKT (SEQ ID NO: 37), AGFPEPT  
 (SEQ ID NO: 38), VNTKPEIAGFPEPT (SEQ ID NO: 39), FGKLV (SEQ ID NO: 40),  
 VNTKPEI FGKLV (SEQ ID NO: 41), VNDGEN (SEQ ID NO: 42),  
 VNTKPEIVNDGEN (SEQ ID NO: 43), RLKGTEG (SEQ ID NO: 44),  
 VNTKPEIRLKGTEG (SEQ ID NO: 45), GPPFGKL (SEQ ID NO: 46), GTEGG (SEQ  
 ID NO: 47), GPPFGKLGTEGG (SEQ ID NO: 48), VNDGE (SEQ ID NO: 49),  
 YNDVGK (SEQ ID NO: 50), VNDGEYNDVGK (SEQ ID NO: 51), TKPEILTYDRL  
 (SEQ ID NO: 52), DRLVNGMLQC (SEQ ID NO: 53), GKTSAYFNFAFK (SEQ ID  
 NO: 54), CPGTEQRCSAS (SEQ ID NO: 55), CSASVLPVDVQ (SEQ ID NO: 56),  
 DSSAFKHNGT (SEQ ID NO: 57), GTVECKAYND (SEQ ID NO: 58),  
 LNSSGPPFGKL (SEQ ID NO: 59), FAFKGNNKEQI (SEQ ID NO: 60), TKPEIL (SEQ  
 ID NO: 61), VGKTS (SEQ ID NO: 62), TKPEILVGKTS (SEQ ID NO: 63),  
 ILTYDRL (SEQ ID NO: 64), AYFNFA (SEQ ID NO: 65), ILTYDRLAYFNFA (SEQ  
 ID NO: 66), KHNGT (SEQ ID NO: 67), AYFNFAKHNGT (SEQ ID NO: 68),  
 GTEQRC (SEQ ID NO: 69), AYFNFAGTEQRC (SEQ ID NO: 70),  
 YHRKVRPVSSHGDFNY (SEQ ID NO: 71), PFVS (SEQ ID NO: 72), KAFT (SEQ ID  
 NO: 73), LAFKESNIY (SEQ ID NO: 74), LLEVFEFI (SEQ ID NO: 75), RVKGFPD  
 (SEQ ID NO: 76), KASNES (SEQ ID NO: 77), KAES (SEQ ID NO: 78), GTTKEK  
 (SEQ ID NO: 79), YFGKL (SEQ ID NO: 80), FVNN (SEQ ID NO: 81), DNTKV (SEQ  
 ID NO: 82), GGVK (SEQ ID NO: 83), LGVV (SEQ ID NO: 84),  
 YGHRKVRPFVSSHGDFNY (SEQ ID NO: 85), PFVS (SEQ ID NO: 72),  
 KSYLFPKNESNIY (SEQ ID NO: 86), GGGYVTFFGK (SEQ ID NO: 87), DTKEAGK  
 (SEQ ID NO: 88), YFKLTRLET (SEQ ID NO: 89),およびYRF

10

20

30

40

50

。  
 【 0 2 4 0 】

本発明のペプチド分子は、その安定性、生物学的利用能、または溶解性を増大させるためにさらに改変することができる。例えば、ペプチド分子内の1個または複数個のL-アミノ酸残基をD-アミノ酸残基で置換してよい。本発明のペプチド分子に適用される「ミメティック」という用語は、D-ペプチド構造体の化学構造を模倣し、かつD-ペプチド構造体の機能特性を保持する分子を含むと意図される。「ミメティック」という用語はさらに、後述するようなペプチドの「類似体」および/または「誘導體」を包含すると意図される。ペプチドの類似体、誘導體、およびミメティックの設計に取り組むアプローチは当技術分野において公知である。例えば、Farmer, P.S., Drug Design (E.J. Ariens編) Academic Press, New York, 1980, 第10巻、119～143頁中; Ball, J.B. およびAlewood, P.F. (1990) J. Mol. Recognition 3:55; Morgan, B.A. およびGainor, J.A. (1989) Ann. Rep. Med. Chem. 24:243; ならびにFreidinger, R.M. (1989) Trends Pharmacol. Sci. 10:270を参照されたい。また、Sawyer, T.K. (1995) 「Peptidomimetic Design and Chemical Approaches to Peptide Metabolism」, Taylor, M.D. およびAmidon, G.L. (編) Peptide-Base

d Drug Design: Controlling Transport and Metabolism, 第17章中; Smith, A.B. 3rd, et al. (1995) J. Am. Chem. Soc. 117:11113-11123; Smith, A.B. 3rd, et al. (1994) J. Am. Chem. Soc. 116:9947-9962; ならびに Hirschman, R., et al. (1993) J. Am. Chem. Soc. 115:12550-12568 も参照されたい。

#### 【0241】

本明細書において使用される場合、本発明のペプチド分子の「誘導体」とは、分子上の1つまたは複数の反応基が置換基で誘導体化されている、ペプチド分子の形態を意味する。ペプチド誘導体の例には、アミノ酸側鎖、ペプチド主鎖、またはアミノ末端もしくはカルボキシ末端が誘導体化されているペプチド(例えば、メチル化アミド結合を有するペプチド化合物)が含まれる。本明細書において使用される場合、本発明のペプチド分子の「類似体」とは、その分子の機能活性に必要な分子化学構造を保持しているが、その分子とは異なる一定の化学構造もまた含むペプチド分子を意味する。天然に存在するペプチドの類似体の例は、1個または複数個の天然に存在しないアミノ酸を含むペプチドである。本明細書において使用される場合、本発明のペプチド分子の「ミメティック」とは、その分子の機能活性に必要な分子化学構造が、その分子の立体構造を模倣する他の化学構造で置き換えられたペプチド分子を意味する。ペプチドミメティックの例には、ペプチド主鎖が1つまたは複数のベンゾジアゼピン分子で置換されているペプチド化合物が含まれる(例えば、James, G.L. et al. (1993) Science 260:1937-1942を参照されたい)。

#### 【0242】

本発明のペプチド分子の類似体は、そのペプチド構造体の1個または複数個のL-アミノ酸またはD-アミノ酸が同種アミノ酸で置換されており、その結果、分子の特性が維持されている分子を含むと意図される。好ましくは、1個または複数個のアミノ酸残基において保存的アミノ酸置換が行われる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似した側鎖を有するアミノ酸残基で置換されたものである。塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 $\beta$ -分岐側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む、類似した側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野において定義されている。本発明のペプチド分子の構造体中で行うことができる同種置換の非限定的な例には、D-チロシン、D-ピリジルアラニン、もしくはD-ホモフェニルアラニンによるD-フェニルアラニンの置換、D-バリンまたは脂肪族側鎖を有する他の天然アミノ酸もしくは非天然アミノ酸によるD-ロイシンの置換、および/またはD-ロイシンまたは脂肪族側鎖を有する他の天然アミノ酸もしくは非天然アミノ酸によるD-バリンの置換が含まれる。

#### 【0243】

ミメティック、および特にペプチドミメティックという用語は、同配体を含むと意図される。本明細書において使用される「同配体」という用語は、第1の構造体の立体構造が第2の構造体に特異的な結合部位に当てはまるため、第2の化学構造体の代わりに使用され得る化学構造体を含むと意図される。この用語は、具体的には、当業者に周知のペプチド主鎖改変(すなわち、アミド結合ミメティック)を含む。このような改変には、アミド窒素、 $\alpha$ -炭素、アミドカルボニルの改変、アミド結合の完全な置換、伸長、欠失、または主鎖架橋が含まれる。

$\psi$ [CH<sub>2</sub>S],  $\psi$ [CH<sub>2</sub>NH],  $\psi$ [CSNH<sub>2</sub>],  $\psi$ [NHCO],  $\psi$ [COCH<sub>2</sub>], および  $\psi$ [(E)または(Z) CH=CH]

を含むいくつかのペプチド主鎖改変が公知である。上記で利用した命名法では、 $\Psi$ はアミド結合がないことを示す。アミド基と入れ替わる構造体が、角括弧内に明記されている。

#### 【0244】

他の考え得る改変には、N-アルキル(もしくはアリール)置換( $\Psi$ [CONR])、またはラクタ

ムおよび他の環状構造体を構築する主鎖架橋が含まれる。本発明のモジュレーター化合物の他の誘導体には、C末端ヒドロキシメチル誘導体、O-改変誘導体(例えば、C末端ヒドロキシメチルベンジルエーテル)、アルキルアミドおよびヒドラジドなどの置換アミドを含むN末端改変誘導体が含まれる。

#### 【0245】

本発明のペプチド分子は、当技術分野において公知の標準的な方法によって作製することができる。ペプチド分子、例えば、ヒトKit RTKのD4 ドメインは、標準的な技術を用いてヒト細胞からクローン化し、組換えベクター中に挿入し、(例えば、酵母細胞にベクターをトランスフェクションすることにより)インビトロの細胞系で発現させることができる。あるいは、ペプチド分子は、Atherton et al. (1989) Oxford, England: IRL Press. ISBN 0199630674; Stewart et al. (1984). 第2版、Rockford: Pierce Chemical Company, 91. ISBN 0935940030; Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154のような公知の合成方法によってデノボで設計および合成することもできる。

#### 【0246】

次いで、本明細書において説明するアッセイ法、例えば、下記の実施例のセクションで説明するアッセイ法のいずれかを用いて、ペプチド分子の機能活性を試験することができる。

#### 【0247】

#### IV. 本発明の部分を同定するためのスクリーニングアッセイ法

本明細書において説明するアッセイ法および当技術分野において周知であるアッセイ法のいずれかを用いて、本発明の部分をRTK阻害活性についてスクリーニングすることができる。例えば、受容体内在化、受容体自己リン酸化、および/またはキナーゼシグナル伝達を測定できるアッセイ法を用いて、標的RTK、例えばKit受容体の活性化を妨害する部分を同定することができる。新しい阻害物質部分のスクリーニングは、当技術分野において公知の標準的方法を用いることによって、例えば、RTKまたは下流の分子のリン酸化状態を判定するホスホELISA(商標)手順(Invitrogenで利用可能)を使用することによって、遂行することができる。受容体、例えば、Kit受容体のリン酸化状態は、例えば、C-Kit [pY 823] ELISA KIT、HU (BioSource(商標); カタログ番号KH00401); c-KIT [TOTAL] ELISA KIT、HU (BioSource(商標); カタログ番号KH00391)などの市販されているキットを用いて判定することができる。本発明の抗体、低分子、および他の部分をこのようなキットを用いてスクリーニングして、それらのRTK阻害活性を判定することができる。例えば、適切なリガンドおよび本発明の部分で処理した後、ホスホELISA(商標)を実施して、リン酸化状態、およびしたがって関心対象のRTKの活性化状態を判定することができる。本発明の部分は、RTK活性化を妨害する部分として同定され得る。下記の実施例15および16では、抗ホスホチロシン抗体を用いたRTK活性化の検出を含むアッセイ法を説明する。下記の実施例20では、ホスホELISA(商標)システムを用いた、受容体活性化を検出するための1つの考え得るアッセイ法を説明する。実施例22~25(それらに関する方法および導入を含む)では、RTKの活性化状態を判定するために本明細書において使用されるその他の方法を説明する。

#### 【0248】

受容体活性化は、エンドサイトーシスおよび受容体内在化を招く場合があるため、いくつかの態様において、受容体内在化を妨害する能力を測定することによって、本発明の部分が標的RTKを阻害する能力を決定することが有用である。下記の実施例25(およびそれに関する方法)では、PDGF受容体変異体の内在化および分解の測定を説明する。受容体内在化アッセイ法は当技術分野において周知であり、例えば、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み入れられる、Fukunaga et al. (2006) Life Sciences. 80(1). 17~23 頁; Bernhagen et al. (2007) Nature Medicine 13, 587-596; natureprotocols.com/2007/04/18/receptor\_internalization\_assay.phpにおいて説明されている。受容体内在化を判定する1つの周知の方法は、リガンドを蛍光タンパク質、例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP)、または他の適切な標識物質でタグ化する方法である。受容体にリガンドが結合した

際、蛍光顕微鏡検査を用いて、受容体内在化を可視化することができる。同様に、本発明の部分に標識物質でタグ化し、蛍光顕微鏡検査を用いて、受容体内在化を可視化することができる。この部分が受容体の活性を阻害できる場合、リガンドの存在下での蛍光内在化は、適切な対照と比べて減少した(例えば、蛍光は、エンドソームでも小胞でもなく、この部分が受容体に結合する細胞の周囲でのみ観察され得る)。

#### 【0249】

前述のものに加えて、他の様々な受容体活性化アッセイ法が当技術分野において公知であり、その内のいずれかを用いて本発明の部分の機能を評価することができる。本発明に従って使用され得るその他の受容体活性化アッセイ法は、米国特許第6,287,784号;同第6,025,145号;同第5,599,681号;同第5,766,863号;同第5,891,650号;同第5,914,237号;同第7,056,685号、および非限定的に次のものを含む多くの科学出版物で説明されている:

Amir-Zaltsman et al. (2000) *Luminescence* 15(6):377-80; Nakayama and Parandoosh (1999) *Journal of Immunological Methods* 225(1-2), 27, 67-74; Pike et al. (1987) *Methods of Enzymology* 146: 353-362; Atienza et al. (2005) *Journal of Biomolecular Screening* 11(6): 634-643; Hunter et al. (1982). *Journal of Biological Chemistry* 257(9): 4843-4848; White and Backer (1991) *Methods in Enzymology* 201: 65-67; Madden et al. (1991) *Anal Biochem* 199: 210-215; Cleaveland et al. (1990) *Analytical Biochemistry* 190: 249-253; Lazaro et al. (1991) *Analytical Biochemistry* 192: 257-261; Hunter and Cooper (1985) *Ann Rev Biochem* 54: 897-930; Ullrich and Schlessinger (1990) *Cell* 61: 203-212; Knutson and Buck (1991) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 285(2): 197-204; King et al. (1993) *Life Sciences* 53: 1465-1472; Wang. (1985) *Molecular and Cellular Biology* 5(12): 3640-3643; Glenney et al. (1988) *Journal of Immunological Methods* 109: 277-285; Kamps (1991) *Methods in Enzymology* 201: 101-110; Kozma et al. (1991) *Methods in Enzymology* 201: 28-43; Holmes et al. (1992) *Science* 256: 1205-10; and Corfas et al. (1993) *PNAS, USA* 90: 1624-1628

。

#### 【0250】

リガンド結合による受容体活性化は、典型的には、後続の細胞内事象を開始し、例えば、細胞内に貯蔵したカルシウムイオンを次に放出するIP<sub>3</sub>のような二次メッセンジャーを増加させる。したがって、受容体活性は、IP<sub>3</sub>、環状ヌクレオチド、細胞内カルシウム、もしくは例えばSTAT、PI3K、Grb2などのリン酸化シグナル伝達分子などの二次メッセンジャーの量、または当技術分野において公知の他の考え得る標的の量を測定することによって決定することができる。米国特許第7,056,685号は、受容体活性を検出するために本発明に従って使用され得るいくつかの方法を説明および参照しており、参照により本明細書に組み入れられる。

#### 【0251】

受容体内在化アッセイ法または受容体活性アッセイ法など前述のアッセイ法の多くは、免疫学的結合アッセイ法を用いた、標的RTKの検出または定量を含み得る(例えば、受容体内在化アッセイ法の間に細胞表面のRTK量を検出するために、放射性標識抗体を使用する場合)。免疫学的結合アッセイ法は、当技術分野において幅広く説明されている(例えば、米国特許第4,366,241号;同第4,376,110号;同第4,517,288号;および同第4,837,168号を参照されたい)。一般のイムノアッセイ法の総説については、Methods in Cell Biology: An

tibodies in Cell Biology, 第37巻 (Asai編 1993); Basic and Clinical Immunology (StitesおよびTerr編、第7版 1991)も参照されたい。

#### 【0252】

受容体内在化研究、受容体活性化研究、または受容体検出アッセイ法で使用され得るようなイムノアッセイ法は、検出抗体とRTKによって形成される複合体に特異的に結合し標識する標識物質をしばしば使用する(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第7,056,685号を参照されたい)。標識物質自体が、受容体を検出するために使用される抗体でもよい(この場合、抗体は、本発明の部分であってもなくてもよい)。あるいは、標識物質は、二次抗体または三次抗体のような第3の作用物質でもよい(例えば、標的RTKに特異的なマウスモノクローナル抗体に結合する抗マウス抗体)。免疫グロブリン定常領域に特異的に結合できる他のタンパク質、例えばプロテインAまたはプロテインGもまた、免疫学的結合アッセイ法において標識物質として使用することができる。これらのタンパク質は、様々な種に由来する免疫グロブリン定常領域との強い非免疫原性反応性を示す(例えば、Kronval et al. (1973), J. Immunol. 111:1401-1406; Akerstrom et al. (1985), J. Immunol. 135:2589-2542を参照されたい)。また、標識物質は、検出可能物質、例えば、ストレプトアビジンのような別の分子が特異的に結合できるビオチンで修飾してもよい。様々な検出可能部分が当業者に周知である。

#### 【0253】

一般に使用されるアッセイ法には、非競合アッセイ法、例えば、サンドイッチアッセイ法、および競合アッセイ法が含まれる。一般に使用されるアッセイ法形式には、試料中のタンパク質の存在を検出および定量するのに使用されるウェスタンブロット(免疫ブロット)が含まれる。このアッセイ法で使用される個々の標識または検出可能な基は、RTKまたはRTKに結合し不活性化するように設計された本発明の部分を検出するのに使用される免疫グロブリンの特異的結合に顕著に干渉しない限り、本発明の決定的に重要な局面ではない。検出可能な基は、検出可能な物理的特性または化学的特性を有する任意の材料でよい。このような検出可能な標識はイムノアッセイ法分野で十分に開発されており、一般に、このような方法で有用な大半の任意の標識を本発明に適用することができる。したがって、標識とは、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電気的手段、光学的手段、または化学的手段によって検出可能な任意の組成物である。本発明で有用な標識には、蛍光色素(例えば、フルオレセインイソチオシアナート、テキサスレッド(Texas red)、およびローダミンなど)、放射性標識物質(例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、または $^{32}\text{P}$ )、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、およびELISAで一般に使用される他の酵素)、ならびに比色標識、例えば、コロイド金ビーズもしくは色ガラスビーズまたはプラスチックビーズ(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、もしくはラテックス)が含まれる。

#### 【0254】

標識は、当技術分野において周知の方法に従って、アッセイ法の所望の構成要素に直接的または間接的に結合されてよい。また、標識は、例えば、酵素または蛍光体との結合により、シグナル生成化合物に直接結合されてもよい。標識としての関心対象の酵素は、主として、加水分解酵素、特にホスファターゼ、エステラーゼ、およびグリコシダーゼ、またはオキシドターゼ(oxidotase)、特にペルオキシダーゼである。蛍光化合物には、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ならびにウンベリフェロンなどが含まれる。化学発光化合物には、ルシフェリン、および2,3-ジヒドロフタラジンジオン、例えば、ルミノールが含まれる。使用され得る様々な標識系またはシグナル生成系の総説については、米国特許第4,391,904号を参照されたい。

#### 【0255】

標識を検出する手段は、当業者に周知である。したがって、例えば、標識が放射性標識である場合、検出手段には、シンチレーションカウンターまたはオートラジオグラフィーにおける写真フィルムが含まれる。標識が蛍光標識である場合、適切な波長の光で蛍光色素を励起し、結果として生じる蛍光を検出することにより、これを検出することができる。

。蛍光は、写真フィルムの使用、および電荷結合素子(CCD)または光電子増倍管などの電子検出器の使用などによって、可視的に検出することができる。同様に、酵素標識は、その酵素に対する適切な基質を提供すること、および結果として生じる反応生成物を検出することによって検出することができる。最後に、単純な比色標識は、標識に関連する色を観察するだけで検出することができる。したがって、様々なディップスティックアッセイ法において、結合された金はしばしばピンク色に見え、様々な結合されたビーズはそのビーズの色に見える。

#### 【0256】

本発明のさらなる局面において、本発明の部分は、標的RTK上のエピトープに結合し、かつ、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインが二量体化するのを引き続き許容し得る。この態様において、この部分の結合は、2つの単量体のIg様ドメイン(例えば、III型受容体型チロシンキナーゼのD4-D4ドメインもしくはD5-D5ドメイン、またはV型受容体型チロシンキナーゼのD7-D7ドメイン)の位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼし、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害し得る。言い換えると、この部分は、リガンドによって誘導される受容体型チロシンキナーゼ外部ドメインの二量体化を許容し得るが、細胞表面境界面における2つの外部ドメインの位置付けに影響を及ぼすか、または受容体型チロシンキナーゼの立体構造的変化を変更もしくは妨害し、それによって、受容体型チロシンキナーゼの活性を阻害し得る(例えば、受容体内在化の阻害および/もしくは受容体のチロシン自己リン酸化の阻害ならびに/または受容体が下流のシグナル伝達経路を活性化する能力の阻害)。

#### 【0257】

したがって、いくつかの態様において、受容体の二量体化を許容するが受容体を不活性にする部分を同定できるアッセイ法を使用することが有用である。このようなアッセイ法を後述する。例えば、実施例18では、架橋を用いて受容体二量体化が検出され、ホスホチロシン特異的抗体を用いて受容体活性化が判定される、PDGF受容体を用いて実施する実験を説明する。さらに、実施例23は、PDGFRの変異体のリガンドによって誘導されるチロシン自己リン酸化の機能障害を有し、この機能障害が、リガンドによって誘導される受容体二量体化を欠くことに起因しないことを示す(実施例22~25の方法および導入も参照されたい)。

#### 【0258】

RTKの立体構造状態はまた、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)解析によって決定することもできる。タンパク質の立体構造および相互作用を決定するための蛍光方法論の包括的な総説は、参照により本明細書に組み入れられるJohnson (2005) Traffic. 2005 Dec;6 (12):1078-92において見出すことができる。FRETアッセイ法において、関心対象のRTKは適切なFRET蛍光体で標識される。RTKを標識した後、標識されたRTKを発現する細胞を、本発明の試験部分およびRTKのリガンド(例えば、Kit RTKの場合はSCF)と共にインキュベートする。FRET解析により、リガンド結合、RTK二量体化、および/または受容体活性化に関連したRTKの立体構造的変化を観察できるようになる。この方法を用いることにより、当業者は、下流の活性化を伴わないRTK二量体化を示すタンパク質の立体構造的変化を直接的に評価できる。FRET解析を実施するために利用可能ないくつかの方法があり、変形法の大部分は、異なる蛍光体を使用すること、または関心対象のタンパク質中にこれらの蛍光体を組み入れるために異なる技術を使用することに起因する。FRET蛍光体およびFRET解析方法は当技術分野において周知であり、FRET技術の簡潔な概要は、Heyduk. (2002) Current Opinion in Biotechnology. 13(4). 292-296およびその中の参考文献から得ることができる。次の出版物はFRET法を詳しく述べており、参照により本明細書に組み入れられる: Kajihara et al. (2006) Nat Methods. 3(11):923-9; Biener-Ramanujan et al. (2006) Growth Horm IGF Res.16(4):247-57; Taniguchi et al. (2007) Biochemistry. 46(18):5349-57; 米国特許第6,689,574号; 同第5,891,646号; およびWIPO公報WO/2002/033102。FRET蛍光体は、これらの蛍光体がRTKの機能にも本発明の部分がRTKに結合する能力にも干渉しないことを条件として、立体構造的変化を検出するためにRTKの任意のドメインまたはヒン

ジ領域(例えば、III型RTKのD4ドメインもしくはD5ドメインまたはV型RTK)のD7ドメイン)に組み入れてよい。

#### 【0259】

FRETに有用な蛍光体は、下記に考察するような生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)に有用なものと同じであることが多い。最も普及しているFRET法は、関心対象のタンパク質中に反応性システイン残基を人工的に作り出すものである。その場合、蛍光体は選択されたシステイン残基と容易に反応することができる。しばしば、関心対象のタンパク質が緑色蛍光タンパク質に融合された融合タンパク質が構築される(Neininger et al. (2001) EMB 0 Reports. 2(8):703-708を参照されたい)。FRETに関するその他の方法および有用な蛍光体は、参照により本明細書に組み入れられるHuebschおよびMooney (2007) Biomaterials. 10 28(15):2424-37; SchmidおよびBirbach (2007) Thromb Haemost. 97(3):378-84; Jares-ErijmanおよびJovin (2006) Curr Opin Chem Biol. 10(5):409-16; Johansson (2006) Methods Mol Biol. 335:17-29; WallrabeおよびPeriasamy (2005) Curr Opin Biotechnol. 16(1):19-27;ならびにClegg RM (1995) Curr Opin Biotechnol. 6(1):103-10に記載されている。

#### 【0260】

他の態様において、どのRTK立体構造が活性化を伴わない二量体化を具体的に示すのかを(受容体に応じて)決定することは不明または困難である場合がある。このような場合、当業者は、受容体二量体化を判定するアッセイ法を、受容体活性化を判定するアッセイ法と組み合わせてよい。例えば、上記の受容体活性化アッセイ法のいずれかと組み合わせて、RTK二量体化を検出するための伝統的な架橋研究(Rodriguez et al. (1990) Molecular Endocrinology, 4(12), 1782-1790に例示されている)を使用してよい。また、FRET系および同様の系を使用して、受容体の活性化または二量体化を直接測定することもできる。例えば、適切なFRET蛍光体をRTKの細胞質内ドメインおよびリン酸化標的タンパク質(すなわち、下流のシグナル伝達分子)中に組み入れることにより、下流のシグナル伝達分子がRTKに動員されているかどうかをFRETによって判定することができる。したがって、1つの態様において、本発明の成功裡の部分は、架橋またはFRETによって測定されるように受容体二量体化を許容するが、FRET解析もしくはBRET解析、または他の受容体活性化アッセイ法(例えば、抗ホスホチロシン抗体を使用する自己リン酸化アッセイ法およびウェスタンブロット)により、蛍光体の欠乏として検出される受容体活性化を妨害する、部分である。 30 したがって、本明細書において説明する技術を用いて、当業者は、部分(例えば、低分子、ペプチド、または抗体)を容易に試験して、それらがRTK活性を阻害するかどうか、およびそれらが受容体二量体化を許容するかどうかを判定することができる。

#### 【0261】

特に、生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)解析を用いて、RTKの活性を阻害する部分を同定することができる。米国特許出願公開第20060199226号、WIPO公報WO/2006/094073、およびTan et al. (2007.Molecular Pharmacology. 72:1440-1446)は、RTKを活性化するリガンドを同定するための方法を具体的に説明しており、したがって、参照により本明細書に組み入れられる。これらの技術は、インビトロおよびインビボでのタンパク質相互作用を決定するために使用されている(Pfleger et al. (2006) Nature Protocols 1 337-34 40 5; Kroeger et al. (2001), J. Biol. Chem., 276(16):12736-43;およびHarikumar, et al. (2004) Mol Pharmacol 65:28-35;すべて参照により本明細書に組み入れられる)

#### 【0262】

BRETは、RTK活性化を妨害する部分を求めてスクリーニングすることにより、試験化合物から本発明の部分を同定するために有用である。

#### 【0263】

参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2006/0199226で考察されているように、BRETに基づいたアッセイ法を用いて、生物発光ドナー分子(DM)を有するタンパク質と蛍光アクセプター部分(AM)を有するタンパク質との相互作用をモニターすることができる。手短に言えば、RTK-DM融合物を発現する細胞は、基質の化学エネルギーを光に変 50

換すると考えられる。RTK-DM融合物の極めて近くにAM(例えば、シグナル伝達タンパク質-AM融合物)がある場合、細胞は、特定の波長で光を発すると考えられる。例えば、BRETに基づいたアッセイ法を用いて、RTK-ルシフェラーゼ融合物とGFP-シグナル伝達タンパク質融合物の相互作用を評価することができる。これは、化学エネルギーの変換によってではなく特定の波長の光によってドナー分子が励起され得るFRET解析とは若干異なる。BRET解析で使用され得る、ルシフェラーゼ活性を有する生物発光タンパク質の例は、米国特許第5,229,285号、同第5,219,737号、同第5,843,746号、同第5,196,524号、同第5,670,356号で見出すことができる。代替のDMには、適切な基質に作用して発光シグナルを生成することができる酵素が含まれる。このような酵素の具体的な例は、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、および $\beta$ -グルコシダーゼである。これらの酵素に対する合成発光基質は当技術分野において周知であり、Tropix Inc. (Bedford, Mass., USA)のような会社から市販されている。また、DMは昆虫から単離するか、または人工的に作り出すこともできる(米国特許第5,670,356号)。

#### 【0264】

基質によって、DMは異なる波長で光を発する。DMに対する基質の非限定的な例には、セレンテラジン、ベンゾチアゾール、ルシフェリン、エノールホルマート(enol formate)、テルペン、およびアルデヒドなどが含まれる。DM部分は、RTKタンパク質のアミノ末端部分またはカルボキシル末端部分のいずれかに融合されてよい。好ましくは、RTK-DM融合物内部にBDMドメインを位置付けることにより、天然タンパク質の活性も本発明の部分の結合も変化しない。RTK-DM融合タンパク質は、天然タンパク質のリガンド結合および下流のシグナル伝達分子と相互作用する能力などの生化学的特性を保持していることを確実にするために、試験することができる。

#### 【0265】

BRET解析のAMは、転移されたエネルギーを蛍光として再び発することができる。AMの例には、緑色蛍光タンパク質(GFP)、またはそのアイソフォームおよび誘導体、例えば、YFP、EGFP、およびEYFPなどが含まれる(R. Y. Tsien, (1998) Ann. Rev. Biochem. 63:509-544)。好ましくは、AM-タンパク質融合物内部にAMドメインを位置付けることにより、天然タンパク質の活性は変化しない。AM-第2のタンパク質融合タンパク質は、RTKとの相互作用のような同族の天然タンパク質の生化学的特性を保持していることを確実にするために、試験することができる。例として、標的RTKによってリン酸化されるか、または標的RTKに結合できる任意の基質へのGFPタンパク質のアミノ末端融合物を使用することができる。

#### 【0266】

### V 本発明の部分を含む薬学的組成物

別の局面において、本発明は、本発明の部分(例えば、本発明のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合部、抗体ミメティック、低分子、またはペプチド分子)の1つまたは組み合わせを含み、薬学的に許容される担体と合わせて調剤された組成物、例えば薬学的組成物を提供する。このような組成物は、本発明の1つまたは組み合わせの(例えば、2つ以上の異なる)抗体、または免疫複合体、低分子、もしくはペプチド分子を含んでよい。例えば、本発明の薬学的組成物は、標的RTK上の異なるエピトープに結合するか、または相補的活性を有する抗体および低分子の組み合わせ、例えば、III型RTKのD4ドメインに結合するモノクローナル抗体と一緒にされた、III型RTKのD3-D4ヒンジ領域に結合する低分子を含んでよい。

#### 【0267】

本発明の薬学的組成物はまた、併用療法において、すなわち他の作用物質と組み合わせて投与することもできる。例えば、併用療法は、少なくとも1種の他の抗癌剤と組み合わせられた、本発明の抗RTK抗体(または低分子もしくはペプチド分子)を含み得る。併用療法において使用され得る治療物質の例は、下記により詳細に説明する。

#### 【0268】

本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される担体」には、生理学的に適合

10

20

30

40

50

性である任意およびすべての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、ならびに等張化剤および吸収遅延剤などが含まれる。好ましくは、担体は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、脊髄投与、または表皮投与(例えば、注射もしくは輸注による)に適している。投与経路に応じて、活性化化合物、すなわち本発明の部分は、酸の作用および化合物を不活性化し得る他の天然の条件から化合物を保護するための材料でコーティングしてよい。

#### 【0269】

本発明の薬学的化合物には、1種または複数種の薬学的に許容される塩が含まれ得る。

「薬学的に許容される塩」とは、親化合物の望ましい生物活性を保持しており、かついかなる望まれない毒物学的作用も与えない塩を意味する(例えば、Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照されたい)。このような塩の例には、酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。酸付加塩には、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、および亜リン酸などの非毒性無機酸に由来するもの、ならびに、脂肪族のモノカルボン酸およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、ならびに脂肪族スルホン酸および芳香族スルホン酸などの非毒性有機酸に由来するものが含まれる。塩基付加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、およびカルシウムなどのアルカリ土類金属に由来するもの、ならびに、N、N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、およびプロカインなどの非毒性有機アミンに由来するものが含まれる。

#### 【0270】

本発明の薬学的組成物はまた、薬学的に許容される抗酸化剤も含んでよい。薬学的に許容される抗酸化剤の例には次のものが含まれる:(1)アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、および亜硫酸ナトリウムなどの水溶性抗酸化剤;(2)パルミチン酸アスコルビル、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、および $\alpha$ -トコフェロールなどの油溶性抗酸化剤;ならびに(3)クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、およびリン酸などの金属キレート剤。

#### 【0271】

本発明の薬学的組成物中で使用され得る適切な水性担体および非水性担体の例には、水、エタノール、(グリセロール、プロピレングリコール、およびポリエチレングリコールなどの)ポリオール、ならびにそれらの適切な混合物、オリーブ油のような植物油、ならびにオレイン酸エチルのような注射剤用の有機エステルが含まれる。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティング材料の使用によって、分散系の場合は必要とされる粒子径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。

#### 【0272】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などの補助剤も含んでよい。微生物の存在の防止は、滅菌手順、ならびに様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、およびフェノールソルビン酸などを含めることの両方によって徹底することができる。糖および塩化ナトリウムなどの等張化剤を組成物中に含めることもまた、望ましい場合がある。さらに、注射用の薬剤形態の持続吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなど吸収を遅延させる作用物質を含めることによって、実現することができる。

#### 【0273】

薬学的に許容される担体には、無菌の注射用溶液または注射用分散液を用時調製するための、無菌の水溶液または水性分散液および無菌粉末が含まれる。薬学的に活性な物質のためのこのような媒体および作用物質の使用は、当技術分野において公知である。任意の従来の媒体または作用物質が活性化化合物と適合しない場合を除いて、本発明の薬学的組成物におけるそれらの使用が企図される。補助的な活性化化合物もまた、組成物中に混合することができる。

#### 【0274】

治療用組成物は、典型的には、製造および貯蔵の条件下で無菌かつ安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬物濃度に適した他の規則構造として調製され得る。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液状ポリエチレングリコールなど)、ならびにそれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒でよい。適切な流動性は、例えば、レシチンのようなコーティング材料の使用によって、分散系の場合は必要とされる粒子径の維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。多くの場合、等張化剤、例えば、糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトールなど、または塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましいと考えられる。注射用組成物の持続吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物中に含めることによって実現することができる。

10

#### 【0275】

無菌注射用溶液は、必要に応じて、前述の成分の1種または組み合わせと共に、適切な溶媒中で必要な量の活性化化合物を混合し、続いて滅菌精密ろ過することによって調製することができる。一般に、分散液は、基本となる分散媒および前述したものの内、必要とされる他の成分を含む無菌ビヒクル中に活性化化合物を混合することによって調製する。無菌注射用溶液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、予め滅菌ろ過したその溶液から、活性成分および任意の付加的な所望の成分の粉末を生じる、真空乾燥およびフリーズドライ法(凍結乾燥)である。

#### 【0276】

20

単一の剤形を作製するために担体材料と組み合わせられ得る活性成分の量は、治療される対象および個々の投与様式に応じて変わると考えられる。単一の剤形を作製するために担体材料と組み合わせられ得る活性成分の量は、一般に、治療的效果をもたらす組成物の量であると考えられる。一般に、100パーセントの内、この量は、薬学的に許容される担体と組み合わせた、約0.01パーセント～約99パーセントの活性成分、好ましくは約0.1パーセント～約70パーセント、最も好ましくは約1パーセント～約30パーセントの活性成分の範囲であると考えられる。

#### 【0277】

投与計画は、最適な所望の応答(例えば治療応答)を提供するように調整される。例えば、単回ボラスを投与してよく、いくつかに分割した用量を時間をかけて投与してよく、または、治療状況の緊急性によって必要とされるように、用量を比例的に減少もしくは増加させてよい。投与を容易にし、かつ投薬量を均一にするために、単位剤形(非経口組成物を調製することが特に有利である。本明細書において使用される単位剤形とは、治療すべき対象に対する単位投薬量として適した物理的に個別の単位を意味する。各単位は、必要とされる薬学的担体と共に、所望の治療的效果をもたらすように計算された所定の量の活性化化合物を含む。本発明の単位剤形の仕様は、(a)活性化化合物の独特の特徴および実現すべき個々の治療的效果、ならびに(b)個体の感受性を治療するためにこのような活性化化合物を調剤する技術に特有の制約によって決定され、かつこれらに直接依存する。

30

#### 【0278】

抗体、低分子、またはペプチド分子の投与の場合、投薬量は、約0.0001mg/kg～100mg/kg(受容者体重)、およびより普通には、0.01mg/kg～5mg/kg(受容者体重)の範囲に渡る。例えば、投薬量は、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重、もしくは10mg/kg体重、または1mg/kg～10mg/kgの範囲内でよい。例示的な治療計画は、1週間に1回、2週間毎に1回、3週間毎に1回、4週間毎に1回、1ヶ月に1回、3ヶ月毎に1回、または3～6ヶ月毎に1回の投与を伴う。本発明の部分の好ましい投与計画は、静脈内投与を介した、1mg/kg体重または3mg/kg体重を含み、抗体は次の投薬スケジュールの内の1つを用いて与えられる:(i)4週間毎に6回投薬、次いで3ヶ月毎;(ii)3週間毎;(iii)3mg/kg体重を1回、次いで3週間毎に1mg/kg体重。

40

#### 【0279】

あるいは、抗体、低分子、またはペプチド分子は、徐放製剤として投与することができ

50

、この場合、必要とされる投与頻度は少なくなる。投薬量および頻度は、投与された物質の患者における半減期に応じて変動する。一般に、ヒト抗体が最も長い半減期を示し、続いて、ヒト化抗体、キメラ抗体、および非ヒト抗体である。投薬量および投与頻度は、治療が予防的であるか、または治療的であるかに応じて変動し得る。予防的適用では、比較的少ない投薬量が、長期間に渡って比較的頻度の低い間隔で投与される。一部の患者は、その後一生、治療を受け続ける。治療的適用では、比較的短い間隔で比較的多い投薬量が、疾患の進行が緩和または終結されるまで、および好ましくは患者が疾患の症状の部分的または全面的な改善を示すまで、必要とされることがある。その後、予防的治療計画を患者に施すことができる。

#### 【0280】

本発明の薬学的組成物中の活性成分および低分子の実際の投薬量レベルは、個々の患者、組成物、および投与様式に対して、患者に有毒とならずに所望の治療応答を実現するのに効果的である活性成分の量を得るために、変更してよい。選択される投薬量レベルは、使用される本発明の個々の組成物、またはそれらのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、使用される個々の化合物の排泄速度、治療期間、使用される個々の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物、および/または材料、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全体的健康状態、および以前の病歴、ならびに医薬分野において周知である同様の因子を含む、様々な薬物動態学的因子に依存すると考えられる。

#### 【0281】

「治療的に有効な投薬量」の本発明の抗RTK部分は、好ましくは、疾患症状の重症度の低減、疾患症状の無い期間の頻度および持続期間の増大、または疾患の苦痛に起因する機能障害もしくは能力障害の予防をもたらす。例えば、腫瘍の治療の場合、「治療的に有効な投薬量」は、好ましくは、未治療の対象と比べて、少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、およびさらにより好ましくは少なくとも約80%、細胞増殖または腫瘍増殖を阻害する。ある化合物が腫瘍増殖を阻害する能力は、ヒト腫瘍における有効性の予測に役立つ動物モデル系において評価することができる。あるいは、ある組成物のこの特性は、その化合物の阻害能力、インビトロでのそのような阻害を当業者に公知のアッセイ法によって検査することによって評価することもできる。治療的有效量の治療的化合物は、腫瘍サイズを縮小し得るか、またはそうでなければ対象の症状を改善し得る。当業者は、対象の大きさ、対象の症状の重症度、および選択される個々の組成物または投与経路のような因子に基づいてそのような量を決定できると思われる。

#### 【0282】

本発明の抗RTK部分を試験して、RTKに拮抗する際にそれが有効であるかどうかを判定することができる。抗RTK部分を試験する1つの方法は、抗RTK部分とRTKの間で相互作用が起こることを確認することである。例えば、当業者は、本発明の抗体、低分子、またはペプチド分子がヒトKit RTKのD4ドメインまたはD5ドメインに結合するかどうか試験することができる。このような結合試験は当技術分野において周知であり、抗RTK部分を標識(例えば放射性標識)する段階、結合が起こり得る条件下で抗RTK部分をRTKと共にインキュベートする段階、次いでゲルまたは蛍光スクリーン上で複合体を単離/可視化する段階を含み得る。同様に、ELISA技術を用いて結合を判定することもできる。

#### 【0283】

本発明の部分がRTKに拮抗するかどうかを判定するための別の方法は、RTKの細胞質内ドメインのリン酸化状態を試験するものである。特定の態様において、有効なアンタゴニストは、RTKの活性化および自己リン酸化を妨害する。RTKのリン酸化は、当技術分野において公知の標準的方法を用いて、例えば、RTKのリン酸化残基に特異的に結合する抗体を用いることによって試験することができる。リン酸化事象を検出するための他の方法には、米国特許第6548266号もしくはGoshe et al. (2006) Brief Funct Genomic Proteomic. 4: 363-76; de Graauw et al. (2006) Electrophoresis. 27:2676-86; Schmidt et al. (200

7) J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 849:154-62に記載されているもの、またはPerkinElmer社による、 $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$ を使用したキナーゼリン酸化アッセイ法のFlashPlates (SMP200)プロトコルを用いたものが含まれる。当業者は、これらの方法および実施例で説明する方法もまた、RTKによってリン酸化され、細胞内のシグナルトランスデューサーであるタンパク質のリン酸化状態を判定するために使用され得ることを理解するであろう。また、このようなタンパク質のリン酸化状態を検出することにより、RTKに本発明の部分が効果的に拮抗しているかどうかを示される。

#### 【0284】

本発明の組成物は、当技術分野において公知である1種または複数種の様々な方法を用いて、1種または複数種の投与経路を介して投与することができる。当業者には理解されるように、投与の経路および/または様式は、所望の結果に応じて異なると考えられる。本発明の結合部分の好ましい投与経路には、静脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、腹腔内投与、皮下投与、脊髄投与、または例えば注射もしくは輸注による他の非経口投与経路が含まれる。本明細書において使用される「非経口投与」という語句は、経腸投与および局所投与以外の通常は注射による投与様式を意味し、非限定的に、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、包内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、気管内、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、硬膜外、および胸骨内の注射および輸注が含まれる。

#### 【0285】

あるいは、本発明の抗RTK結合部分は、局所、表皮、または粘膜の投与経路のような非経口ではない経路を介して、例えば、鼻腔内に、経口的に、腔に、直腸に、舌下に、または局所的に投与することができる。

#### 【0286】

活性化化合物は、埋め込み剤、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤のように、急速な放出から化合物を保護すると考えられる担体と共に調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸など生分解性の生体適合性ポリマーが使用され得る。このような製剤を調製するための多くの方法は、特許権を与えられているか、または、一般に当業者に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson編、Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

#### 【0287】

治療的組成物は、当技術分野において公知の医療器具を用いて投与することができる。例えば、好ましい態様において、本発明の治療的組成物は、米国特許第5,399,163号、同第5,383,851号、同第5,312,335号、同第5,064,413号、同第4,941,880号、同第4,790,824号、または同第4,596,556号に開示されている器具のような、針無しの皮下注射器具を用いて投与することができる。本発明において有用な周知の埋め込み剤およびモジュールの例には、次のものが含まれる：制御された速度で医用薬剤を投与するための埋め込み可能なマイクロインフュージョンポンプを開示している米国特許第4,487,603号；皮膚を介して医薬品を投与するための治療用器具を開示している米国特許第4,486,194号；正確な輸注速度で医用薬剤を送達するための医用薬剤注入ポンプを開示している米国特許第4,447,233号；持続的な薬物送達用の流量可変な埋め込み可能輸注装置を開示している米国特許第4,447,224号；複数のチャンバー区画を有する浸透圧薬物送達系を開示している米国特許第4,439,196号；および浸透圧薬物送達系を開示している米国特許第4,475,196号。これらの特許は、参照により本明細書に組み入れられる。多数の他のこのような埋め込み剤、送達系、および構成単位が、当業者に公知である。

#### 【0288】

### V. 本発明の部分を使用するための方法

別の局面において、本発明は、対象においてRTKに関連した疾患を治療するための方法であって、治療的有效量の本発明の部分を対象に投与する段階を含む方法を提供する。本発明の抗RTK部分、例えば、抗体、低分子、またはペプチド分子は、受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患の診断および治療を含むインビトロおよびインビボでの診断的有用

性および治療的有用性を多数有する。本発明の結合部分は、培養中の細胞にインビトロもしくはエクスピボで、またはヒト対象に例えばインビボで投与して、受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患を治療、予防、および診断することができる。

#### 【0289】

本明細書において使用される場合、「受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患」とは、RTK活性によって媒介されるか、または異常なRTK発現もしくは活性化に関連した疾患または病態である。受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患の例には、例えば、FGF受容体、HGF受容体、インスリン受容体、IGF-1受容体、NGF受容体、VEGF受容体、PDGF受容体- $\alpha$ 、PDGF受容体- $\beta$ 、CSF-1受容体、およびFlt3受容体に関連した疾患または病態、例えば、加齢黄斑変性症(AMD)、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、または疼痛に関連した疾患が含まれる。受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患の具体的な例には、消化管間質腫瘍(GIST)、急性骨髄性白血病(AML)、小細胞肺癌(SCLC)、乳癌、骨転移性乳癌、および腱鞘巨細胞腫が含まれるが、それらに限定されるわけではない。受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患のその他の例には、結腸癌(小腸癌を含む)、肺癌、乳癌、膵臓癌、黒色腫(例えば、転移性悪性黒色腫)、急性骨髄性白血病、腎臓癌、膀胱癌、卵巣癌、および前立腺癌が含まれる。本発明の方法を用いて治療することができる他の癌の例には、腎性癌(例えば、腎細胞癌)、神経膠芽腫、脳腫瘍、慢性または急性の白血病(急性リンパ性白血病(ALL)、成人T細胞白血病(T-ALL)、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病を含む)、リンパ腫(例えば、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、リンパ球性リンパ腫、原発性中枢神経系(CNS)悪性リンパ腫、T細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫(ALCL)、皮膚T細胞リンパ腫、結節性小分割細胞型リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、レナートリンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)、中心芽細胞性(entoblastic)中心細胞性(cb/cc)濾胞性リンパ腫癌、B細胞系列のびまん性大細胞型リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ節症(AILD)-様T細胞リンパ腫およびHIVに関連した体腔リンパ腫)、胎児性癌、鼻咽腔の未分化癌(例えばシュミンケ腫瘍)、キャッスルマン病、カポジ肉腫、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症および他のB細胞リンパ腫、鼻咽頭(nasopharyngeal)癌、骨癌、皮膚癌、頭部または頸部の癌、皮膚または眼内の悪性黒色腫、子宮癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、腔癌、外陰癌、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、小児期の固形腫瘍、膀胱癌、腎臓または尿管の癌、腎う癌、中枢神経系(CNS)の新生物、腫瘍血管新生、脊髄軸(spinal axis)腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、類表皮癌、扁平上皮癌、アスベストによって誘発されるもの、例えば中皮腫を含む環境的に誘発される癌、ならびに前記癌の組み合わせが含まれる。

#### 【0290】

さらに、様々な腫瘍細胞上でのIII型RTKまたはV型RTKの発現を前提として、本発明の結合部分、組成物、および方法は、腫瘍形成性障害、例えば、Kitを発現する腫瘍細胞の存在を特徴とする、例えば、消化管間質腫瘍、肥満細胞症、および急性骨髄性白血病を含む障害を有する対象を治療するために使用することもできる。腫瘍形成性障害を有する他の対象の例には、腎性癌(例えば、腎細胞癌)、神経膠芽腫、脳腫瘍、慢性または急性の白血病(急性リンパ性白血病(ALL)、成人T細胞白血病(T-ALL)、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病を含む)、リンパ腫(例えば、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫、リンパ球性リンパ腫、原発性中枢神経系(CNS)悪性リンパ腫、T細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫(ALCL)、皮膚T細胞リンパ腫、結節性小分割細胞型リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、レナートリンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)、中心芽細胞性(entoblastic)中心細胞性(cb/cc)濾胞性リンパ腫癌、B細胞系列のびまん性大細胞型リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ節症(AILD)-様T細胞リンパ腫およびHIVに関連した体腔リンパ腫)、胎児性癌、鼻咽腔の未分化癌(例えばシュミンケ腫瘍)、キャッスルマン病、カポジ肉腫、多発性骨髄腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症および他のB細胞リンパ腫、鼻咽頭癌、骨癌、皮膚癌、頭

部または頸部の癌、皮膚または眼内の悪性黒色腫、子宮癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、腔癌、外陰癌、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、小児期の固形腫瘍、膀胱癌、腎臓または尿管の癌、腎う癌、中枢神経系(CNS)の新生物、腫瘍血管新生、脊髄軸(spinal axis)腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、類表皮癌、扁平上皮癌、アスベストによって誘発されるもの、例えば中皮腫を含む環境的に誘発される癌、ならびに前記癌の組み合わせを有する対象が含まれる。

#### 【0291】

本明細書において使用される場合、「対象」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含むと意図される。非ヒト動物には、すべての脊椎動物、例えば、哺乳動物および非哺乳動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、雌ウシ、ウマ、ニワトリ、両生類、および爬虫類が含まれる。好ましい対象には、受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患を有するヒト対象が含まれる。

10

#### 【0292】

本発明の部分(例えば、抗体、その抗原結合部、低分子、ペプチド分子、抗体ミメティック、および組成物)は、RTKに関連した疾患の療法および診断においてさらに有用である。例えば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異性分子もしくは二重特異性分子、低分子、またはペプチド分子を用いて、次の1種または複数種の生物活性をインビボまたはインビトロで導き出すことができる:RTK(例えば、KitもしくはPDGFR)を発現する細胞の増殖を阻害するか、かつ/もしくは死滅させること;ヒトエフェクター細胞の存在下で、RTK(例えば、KitもしくはPDGFR)を発現する細胞の食作用もしくはADCCを媒介すること;またはRTK、例えば、RTKのIII型ファミリーのメンバーの外部ドメインを不活性状態および/もしくは単量体の状態に留め、それによって、受容体の活性に拮抗すること。

20

#### 【0293】

本発明の抗RTK部分をインビボおよびインビトロで投与するのに適した経路は当技術分野において周知であり、かつ当業者によって選択され得る。例えば、抗RTK部分は、注射(例えば、静脈内または皮下)によって投与することができる。使用する分子の適切な投薬量は、対象の年齢および体重、ならびに結合部分組成物の濃度および/または配合に依存する。

#### 【0294】

前述したように、本発明の抗RTK部分は、1種または複数種の他の治療物質、例えば、細胞障害性物質、放射毒性物質、または免疫抑制物質と同時に投与してよい。この部分は作用物質に連結させてもよく、または作用物質とは別に投与してよい。後者の場合(個別投与)、結合部分は、作用物質の前、後、もしくは同時に投与してよく、または、他の公知の療法、例えば、抗癌療法、例えば、放射線療法と同時に投与してよい。このような治療物質には、とりわけ、ドキソルビシン(アドリアマイシン)、シスプラスチン硫酸ブレオマイシン、カルムスチン、クロラムブシル、およびシクロホスファミドヒドロキシ尿素などの抗腫瘍剤が含まれ、これらは、それら自体では、患者に毒性または準毒性のレベルでのみ有効である。シスプラスチンは、4週毎に1回、100mg/用量として静脈内投与され、アドリアマイシンは、21日毎に1回、60mg/ml~75mg/mlの用量として静脈内投与される。本発明の抗RTK結合部分と化学療法物質との同時投与により、ヒト腫瘍細胞に細胞障害作用をもたらす異なるメカニズムを介して機能する2種の抗癌物質が提供される。このような同時投与により、薬物耐性の発生、または結合部分との反応性を低下させると考えられる腫瘍細胞の抗原性の変化に起因する問題を解決することができる。

30

40

#### 【0295】

異常な細胞増殖に係する疾患の予防および/または治療において使用するために本発明の抗RTK部分-パートナー分子結合体を投与する場合、循環濃度約0.001  $\mu\text{M}$ ~20  $\mu\text{M}$ または約0.01  $\mu\text{M}$ ~5  $\mu\text{M}$ の投与化合物が使用され得る。

#### 【0296】

本明細書において説明する化合物を経口投与する場合の患者投与量は、典型的には、約

50

1mg/日～約10,000mg/日、より典型的には約10mg/日～約1,000mg/日、および最も典型的には約50mg/日～約500mg/日の範囲である。患者の体重の面から示す場合、典型的な投薬量は、約0.01～約150mg/kg/日、より典型的には約0.1～約15mg/kg/日、および最も典型的には約1～約10mg/kg/日、例えば5mg/kg/日または3mg/kg/日の範囲である。

#### 【0297】

少なくともいくつかの態様において、腫瘍増殖を遅らせるか、または阻害する患者投与量は、 $1\mu\text{mol/kg/日}$ またはそれ未満でよい。例えば、患者投与量は、0.9、0.6、0.5、0.45、0.3、0.2、0.15、もしくは $0.1\mu\text{mol/kg/日}$ またはそれ未満(薬物のモルに関する)でよい。好ましくは、抗RTK部分-薬物結合体は、少なくとも5日間に渡って1日投薬量を投与すると、腫瘍の増殖を遅らせる。

10

#### 【0298】

1つの態様において、本発明の結合体は、化合物(例えば、治療物質、標識、サイトトキシン、放射性毒素、免疫抑制薬など)を抗RTK結合部分に連結することによって、RTK細胞表面受容体を有する細胞にそれらの化合物を導くために使用することができる。例えば、抗RTK部分は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第6,281,354号および同第6,548,530号、米国特許出願公開第20030050331号、同第20030064984号、同第20030073852号、および同第20040087497号において説明されているか、または、WO 03/022806において公開されている、毒素化合物のいずれかに結合させることができる。したがって、本発明は、(例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補助因子など検出可能な標識を用いて)、RTKを発現する細胞をエクスピボまたはインビボで位置決定するための方法も提供する。

20

#### 【0299】

標的特異的なエフェクター細胞、例えば、本発明の組成物(例えば、抗体、その抗原結合部、低分子、またはペプチド分子)に連結されたエフェクター細胞もまた、治療物質として使用することができる。ターゲティング用のエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球、または単球などのヒト白血球でよい。他の細胞には、好酸球、ナチュラルキラー細胞、およびIgG受容体またはIgA受容体を有する他の細胞が含まれる。望ましいならば、エフェクター細胞は、治療しようとする対象から得ることができる。標特的異的なエフェクター細胞は、生理学的に許容される溶液中の細胞懸濁液として投与することができる。投与する細胞の数は、 $10^8$ 個～ $10^9$ 個程度でよいが、治療目的に応じて変動すると考えられる。一般に、この量は、標的細胞、例えば、RTKを発現する腫瘍細胞での局在化を実現し、かつ、例えば食作用による細胞死滅化をもたらすのに十分であると考えられる。投与経路もまた、様々でよい。

30

#### 【0300】

標特的異的なエフェクター細胞を用いた療法は、標的とされた細胞を除去するための他の技術と組み合わせて実施することができる。例えば、本発明の部分および/またはこれらの組成物を備えたエフェクター細胞を使用する抗腫瘍療法は、化学療法と組み合わせて使用することができる。

#### 【0301】

本発明はさらに、試料中のヒトRTK抗原の存在を検出するか、またはヒトRTK抗原(例えば、ヒトKit RTKまたはPDGFRのIg様ドメイン)の量を測定するための方法であって、抗体または他の部分とKitのようなヒトRTKとの複合体の形成を可能にさせる条件下で、試料および対照試料を、RTK結合部分、例えば、ヒトRTKに特異的に結合するヒトモノクローナル抗体または他の結合部分と接触させる段階を含む方法も提供する。次いで、複合体の形成を検出し、その際、試料との複合体形成が対照試料と比べて異なる場合、試料中にRTK、例えば、ヒトKit RTKまたはPDGFR RTKが存在することが暗示される。

40

#### 【0302】

抗RTK結合部分(例えば、抗体、その抗原結合部、低分子、またはペプチド分子)および使用するための取扱い説明書を含むキットもまた、本発明の範囲内である。キットは、免疫抑制反応物、細胞障害性物質、もしくは放射毒性物質など1種もしくは複数種の付加的

50

な反応物、または1種もしくは複数種の付加的な本発明の抗RTK部分(例えば、第1の抗RTK部分とは異なるRTK抗原中のエピトープに結合する、相補的活性を有する抗RTK結合部分)をさらに含んでよい。キットは、典型的には、キットの内容物の所期の用途を示すラベルを含む。ラベルという用語は、キットの表面に、もしくはキットと共に供給されるか、または別の方法でキットに添えられる、任意の書面または記録材料を含む。

### 【0303】

本発明は、さらに限定するものとして解釈されるべきではない以下の実施例によってさらに例示される。図面に加えて、本出願の全体に渡って引用されるすべての図面、ならびにすべての参考文献、特許、および公開された特許出願の内容は、その全体が参照により本明細書に明確に組み入れられる。

### 【0304】

#### 実施例

#### 実施例1~19への導入

幹細胞因子(SCF)は、Kitの外部ドメインに結合し、チロシンキナーゼ活性化を結果として生じることによって、多数の細胞応答を開始する。下記の実施例の内のいくつかにおいて、SCF刺激前および後のKit外部ドメイン全体の結晶構造を説明する。これらの構造から、Kit二量体化は、2つのKit分子を結び付けることが唯一の役割であるSCF結合によって推進されることが示される。受容体二量体化に続いて、2つのKit分子の膜近位Ig様ドメインD4とD5との側面相互作用を可能にする立体構造的変化が起こる。培養細胞を用いた実験から、Kit活性化が、D4-D4相互作用に決定的に重要なアミノ酸の点変異によって損なわれることが示される。さらに、様々な発癌性変異がD5-D5境界面にマッピングされている。Kit構造の重要な特徴、すなわちリガンドによって誘導される受容体二量体化およびD4-D4境界面の決定的に重要な残基は他の受容体で保存されているため、本報告書で明らかにするKit刺激のメカニズムは、他の受容体活性化に応用され得る。このことから、これらの境界面を標的とする薬物または生物製剤を治療薬として使用できることが示唆される。

### 【0305】

本明細書において説明するSCF刺激前および後のKit外部ドメイン全体のX線結晶構造を解明することにより、SCFによって誘導されるKit二量体化および活性化のメカニズムに関する貴重な洞察が得られた。この構造から、D1、D2、およびD3と呼ばれるKitの最初の3つのIg様ドメインがSCF結合を担っていることが示される。SCF結合の主な役割は、2つのKit分子を架橋して、細胞膜上でのKitの局所濃度を上昇させることである。これにより、Kitの膜近位領域の大規模な立体構造変化が促進されて、隣接するKit分子のD4またはD5間の同型相互作用が結果として生じる。隣接する2つのKit分子のD4間の側面相互作用は、各D4プロトマーのEFループに由来する2対の塩橋を介した直接接触によって起こる。膜近位D5ドメインは、隣接するKit分子間の付加的な間接的相互作用を提供して、細胞質チロシンキナーゼの活性化を可能にする距離および向きで外部ドメインの膜近位部分をさらに安定化し、位置付ける。

### 【0306】

下記の実施例の内のいくつかにおいて、単量体型およびSCFによって誘導されたホモ二量体型(SCF-Kit 2:2複合体)両方のKit外部ドメイン全体の結晶構造を説明する。占有されていない単量体型を分解能3.0 Åで、およびSCFによって誘導されたホモ二量体型を分解能3.5 Åで詳細に検査すると、Kitおよび他のRTKの活性化メカニズムに関する新規な洞察が得られる。後述の実験は他のRTKを用いて実施できることを、当業者は理解すべきである。本発明の方法で使用され得るRTK配列の例には、非限定的に、Kit mRNAのGenbank参照配列NM\_000222.2(タンパク質NP\_000213.1;

MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRL  
LCTDPGFVKWTFEILDETENENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVF  
VRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKGCQGKPLPKDLRFIPD  
PKAGIMIKSVKRAYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVSKAS  
YLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQA  
TLTISSARVNDSGVFMCYANNTFGSANVTTTLEVVDKGFNIFPMINTTVFVNDG  
ENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPKSENESENIRYVSELHLTRL  
KGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKPEILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEP  
TIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVEC  
KAYNDVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVIVAGMMCIIVMILTYK  
YLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLSFGKTLGAG  
AFGKVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLSYLGNHM  
NIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICKQEDHAEAAALYKNL  
LHSESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVPTKADKRRSVRIGSYIERDVTPAIMEEDD  
ELALDLEDLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICDFGLAR  
DIKND SNYVVKGNARLPVKWMAPE SIFNCVYTFESDVWSYGIFLWELFSLGSSP  
YPGMPVDSKFYKMIKEGFRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQ  
LIEKQISESTNHIYSNLANCSPNRQKPVVDH SVRINSVGSTASSSQPLL VHDDV

10

20

(SEQ ID NO: 92)

をコードする)、またはKit mRNAの変種2のGenbank参照配列 NM\_001093772.1(タンパク質NP\_001087241.1;

MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSIHPGKSDLIVRVGDEIRL  
LCTDPGFVKWTFEILDETENENKQNEWITEKAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVF  
VRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSKGCQGKPLPKDLRFIPD  
PKAGIMIKSVKRAYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFAKAVPVVSVSKAS  
YLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYERQA  
TLTISSARVNDSGVFMCIYANNTFGSANVTTTLEVVVDKGFNIFPMINTTVFVNDG  
ENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPKSENESENIRYVSELHLTRL  
KGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAFNYYVNTKPEILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEP  
TIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVEC  
KAYNDVGKTSAYFNFAFKEQIHPHTLFTPLLIGFVIVAGMMCIHVMILTYKYLQKP  
MYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLSFGKTLGAGAFGKV  
VEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSELKVLSYLGNNHMNIVNLL  
GACTIGGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICKQEDHAEAAALYKNLLHSKES  
SCSDSTNEYMDMKPGVSYVVPTKADKRRSVRIGSYIERDVTPAIMEDELALDL  
EDLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIKNDS  
NYVVKGNARLPVKWMAPEIFNCVYTFESDVWSYGIFLWELFSLGSSPYPGMP  
VDSKFYKMIKEGFRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQI  
SESTNHIYSNLANCSPNRQKPVVDHNSVRINSVGSTASSSQPLLHDDV (SEQ ID  
NO: 93)

10

20

をコードする)が含まれる。上記のタンパク質は、標準的な1文字のアミノ酸記号で表され  
る。

30

#### 【0307】

実施例1 SCFおよびKitの発現、精製、および結晶化

D1、D2、D3、D4、およびD5と呼ばれる5つのIg様ドメインから構成されるKitの外部ド  
メイン全体を、バキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞において発現させた。精製したKi  
t外部ドメイン単量体、またはSCFによって誘導されたKit外部ドメインホモ二量体(SCF-Ki  
t 2:2複合体)を、結晶成長および最適化のために徹底的なスクリーニングにそれぞれ供し  
、続いてそれらの結晶構造を決定した。

#### 【0308】

タンパク質の発現及び精製

C末端にポリヒスチジンタグを含む可溶性Kit外部ドメイン(アミノ酸1~519)を、バキュ  
ロウイルス発現系を用いて昆虫細胞(Sf9)において発現させた。Niキレート、続いてサイ  
ズ排除クロマトグラフィー(Superdex200, GE Healthcare)によって、Kit外部ドメインを精  
製した。エンドグリコシダーゼF1を用いて部分的に脱グリコシル化した後、陰イオン交換  
クロマトグラフィー(MonoQ, GE Healthcare)によって外部ドメインをさらに精製した。以  
前に説明されているようにして(Langley et al. (1994) Arch Biochem Biophys 311: 55-  
61; Zhang et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97: 7732-7737)、SCF(1~141)を発  
現させ、リフォールディングさせ、精製した。

40

#### 【0309】

細胞株および発現ベクター

10%FCSおよび10%CSをそれぞれ添加したDMEM中でHEK細胞およびNIH3T3細胞を培養した

50

。SCF刺激前に、以前に説明されているようにして(Kouhara et al. (1997) Cell 30: 693-702)、細胞を無血清培地中で一晚飢餓状態にした。製造業者の取扱い説明書に従い、Lipofectamin (Invitrogen)を用いてトランスフェクションを実施した。完全長KitのcDNAを、一過性トランスフェクションのためにRK5発現ベクター中にサブクローニングし、安定な発現のためにpBABE/puroベクター中にサブクローニングした(Kouhara et al. (1997) Cell 30: 693-702)。組換えKit外部ドメインでウサギを免疫化することによって抗Kit抗体を生成させた。イムノブロットイングのためにモノクローナル抗Kit抗体(Santa Cruz)を使用した。抗ホスホチロシン(抗pTyr)抗体は、Upstate Biotechnologyから購入した。

### 【0310】

#### 結晶化およびデータ収集

Kit外部ドメインのみの試料、またはSCFと複合体を形成したKit外部ドメインの試料を、結晶成長および最適化のために徹底的なスクリーニングに供した。適切な寸法、 $0.12 \times 0.1 \times 0.05 \text{ mm}$ 、の脱グリコシル化外部ドメイン結晶を、 $4^\circ$ で沈殿剤としてポリエチレングリコール(PEG)を用いてリン酸緩衝液中で得た( $0.1 \text{ M Na-Pi}$ 緩衝液 $\text{pH } 6.0$ 、 $0.2 \text{ M KCl}$ 、 $12\% \text{ PEG400}$ )。結晶はすべて、 $5 \sim 18\%$ グリセロールを添加した貯蔵溶液に数秒間浸し、急速冷却し、データ収集の間、 $100^\circ \text{ K}$ 、窒素気流中で保存した。結晶は、単位格子寸法は六方格子設定で $a=162.4 \text{ \AA}$ および $c=67.1 \text{ \AA}$ であり、非対称単位当たり1分子を有する菱形空間群 $R3$ に属した。 $277 \text{ K}$ で数秒間 $\sim 10$ 日間、 $0.1 \text{ mM} \sim 50 \text{ mM}$ の濃度範囲の重原子反応物を含む貯蔵溶液に結晶を浸すことによって、Kitの白金誘導体、臭素誘導体、およびヨウ素誘導体を調製した。

### 【0311】

ポリエチレングリコール(PEG)を沈殿剤として用いて( $0.2 \text{ M}$ 硫酸アンモニウム、 $8 \sim 12\% \text{ PEG } 8000$ 、 $5 \sim 8\% \text{ エチレングリコール}$ 、 $\text{pH } 7.0 \sim 8.5$ )、 $4^\circ \text{ C}$ でSCF-Kit複合体の結晶を成長させ、NSLS(Brookhaven National Laboratory)のビームラインX25にてADSD quantum-210 CCD検出器を用いて、分解能 $3.5 \text{ \AA}$ までの回折データを収集した。結晶は、単位格子寸法が $a=269.5 \text{ \AA}$ 、 $b=52.1 \text{ \AA}$ 、 $c=189.8 \text{ \AA}$ 、 $\beta=108.2$ 度であり、非対称単位中のSCF分子およびKit分子の2つのセットからなる単斜空間群 $C2$ に属する。DENZOおよびSCALEPACKならびにHKL2000プログラムパッケージを用いて、データセットすべてを処理しスケーリングした(Otwinowski et al. (1997) Methods Enzymol. 276: 307-326)。収集データの統計値を表1Aに要約する。

### 【0312】

#### 実施例2 構造決定

実験位相は、異常分散を考慮した多重同型置換法(MIRAS)および多波長異常回折法(MAD)を用いて分解能 $3.0 \text{ \AA}$ まで算出した(表1A)。結果として得られる電子密度マップから、 $\beta$ サンドイッチ構造の連続的な電子密度および明瞭な溶媒-タンパク質境界面が示された。単量体Kit外部ドメインの分子モデルを実験の電子密度マップに手動で組み込んだ。結晶 $R$ 因子 $25.4\%$ および自由 $R$ 因子 $29.6\%$ に対するネイティブデータセットを用いて、分解能 $3.0 \text{ \AA}$ まで構造を精密化した(表1B)。SCF-Kit 2:2複合体の構造は、本報告書で説明されている単量体型の構造およびSCFの構造(Zhang et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97: 7732-7737; 記号1EXZでProtein Data Bankから取得可能)を検索モデルとして用いて、分子置換によって解析した。結晶 $R$ 因子 $24.9\%$ および自由 $R$ 因子 $29.5\%$ に対するネイティブデータセットを用いて、分解能 $3.5 \text{ \AA}$ まで構造を精密化した(表1Aおよび1B)。Pymol (pymol.sourceforge.net)ソフトウェアおよびCCP4MGソフトウェア(Potterton et al. (2004) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60: 2288-2294)を用いて分子イメージを作成した。Kit単量体およびSCF-Kit複合体の原子座標および構造因子は、Protein Data Bank (rcsb.org/pdb)に寄託されており、アクセッションコードはそれぞれ2EC8および2E9Wである。

### 【0313】

(表1A) データ収集および位相統計値

|                                            | Kit                  |                                                  |                       |                                                           | SCF-Kit                                                        |                                                            |                       |
|--------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------|
|                                            | 天然                   | K <sub>2</sub> Pt(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> | NaI <sub>2</sub>      | K <sub>2</sub> Pt(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub><br>(ピーク) | K <sub>2</sub> Pt(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub><br>(インフレクション) | K <sub>2</sub> Pt(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub><br>(リモート) | 天然                    |
| データ収集                                      |                      |                                                  |                       |                                                           |                                                                |                                                            |                       |
| X線供給源                                      | NSLS X26C            | NSLS X6A                                         | NSLS X6A              | NSLS 6A                                                   | NSLS 6A                                                        | NSLS 6A                                                    | NSLS X25              |
| 日付                                         | 2006-Apr-3           | 2006-Jun-10                                      | 2006-Jun-12           | 2006-Jun-11                                               | 2006-Jun-11                                                    | 2006-Jun-11                                                | 1999-Jun-29           |
| 波長 (Å)                                     | 1.1000               | 1.0716                                           | 1.6000                | 1.0716                                                    | 1.0722                                                         | 0.9600                                                     | 1.2500                |
| 空間群                                        | R3                   | R3                                               | R3                    | R3                                                        | R3                                                             | R3                                                         | C2                    |
| 単位格子寸法                                     |                      |                                                  |                       |                                                           |                                                                |                                                            |                       |
| a (Å)                                      | 162.25               | 162.09                                           | 161.81                | 162.02                                                    | 162.44                                                         | 162.27                                                     | 269.48                |
| b (Å)                                      | 162.25               | 162.09                                           | 161.81                | 162.02                                                    | 162.44                                                         | 162.27                                                     | 52.07                 |
| c (Å)                                      | 67.59                | 66.94                                            | 67.62                 | 69.02                                                     | 69.13                                                          | 69.09                                                      | 189.79                |
| β (°)                                      |                      |                                                  |                       |                                                           |                                                                |                                                            | 108.24                |
| 分解能 (Å)                                    | 50-3.0<br>(3.11-3.0) | 50-3.1<br>(3.2-3.1)                              | 50-3.0<br>(3.11-3.00) | 50-3.3<br>(3.42-3.3)                                      | 50-3.3<br>(3.42-3.3)                                           | 50-3.3<br>(3.42-3.3)                                       | 50-3.5<br>(3.63-3.50) |
| 総反射数                                       | 156126               | 68961                                            | 120301                | 78599                                                     | 79043                                                          | 79258                                                      | 113481                |
| 独特な反射の数                                    | 13342                | 23535                                            | 26281                 | 19468                                                     | 19550                                                          | 19473                                                      | 31962                 |
| 完全性 (%) <sup>(a)</sup>                     | 99.8 (100)           | 99.2(99.6)                                       | 99.5 (97.1)           | 95.4 (97.2)                                               | 95.4 (97.0)                                                    | 95.0 (96.4)                                                | 98.5 (91.4)           |
| I/σ(I)                                     | 11.7 (7.5)           | 11.3 (3.0)                                       | 21.7 (9.5)            | 13.0 (5.9)                                                | 11.6 (4.8)                                                     | 11.2 (4.7)                                                 | 19.1 (6.6)            |
| R <sub>merge</sub> (%) <sup>(b)</sup>      | 7.6 (17.0)           | 8.6 (32.1)                                       | 8.5 (20.8)            | 11.1 (22.8)                                               | 10.7 (27.0)                                                    | 11.9 (27.5)                                                | 6.1 (17.6)            |
| 位相統計量                                      |                      |                                                  |                       |                                                           |                                                                |                                                            |                       |
| 分解能 (Å)                                    | MIRAS<br>50-3.0      | 50-3.0                                           | 50-3.0                | MAD<br>50-3.3                                             | 50-3.3                                                         | 50-3.3                                                     |                       |
| 部位の数                                       |                      | 3                                                | 6                     | 3                                                         | 3                                                              | 3                                                          |                       |
| R <sub>iso</sub> (%) <sup>(c)</sup>        |                      | 22.0                                             | 11.6                  |                                                           |                                                                |                                                            |                       |
| R <sub>cullis</sub> (同型/異常) <sup>(d)</sup> |                      | 0.85/0.68                                        | 0.80/0.81             | 0.79                                                      | 0.74/0.81                                                      | 0.81/0.98                                                  |                       |
| 位相調整力 (同型/異常) <sup>(e)</sup>               |                      | 0.88/1.48                                        | 1.07/0.65             | 1.10                                                      | 1.32/1.06                                                      | 0.97/0.16                                                  |                       |
| <FOM> <sup>(f)</sup>                       | 0.50                 |                                                  |                       | 0.48                                                      |                                                                |                                                            |                       |

10

括弧内の値は、最も高い分解能シェルの統計値を示す。(a)完全性=(独立した反射の数)/(理論上の反射の総数)。(b) $R_{merge} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$ 、ここで $I_i$ は観察された強度であり、 $\langle I \rangle$ は対称性に関連した反射の複数の観察結果から得られる平均強度である。(c) $R_{iso} = \sum ||F_{ph}| - |F_p|| / \sum |F_p|$ 、(d) $R_{cullis} = \sum |F_h - (F_{ph} - F_p)| / \sum |F_{ph} - F_p|$ 、(e)位相調整力=( $|F_h|/E$ )の二乗平均平方根(r.m.s)、それぞれ、 $F_{ph}$ および $F_p$ は誘導体および天然型の構造因子振幅であり、 $F_h$ は重原子構造振幅である。 $E$ は閉鎖不足の残差(residual lack of closure error)である。(f)<FOM>は、平均性能指数である。

20

【0314】

(表1B)精密化統計値

|                                                                         | Kit        | SCF-Kit    |
|-------------------------------------------------------------------------|------------|------------|
| 分解能 (Å)                                                                 | 27.7 – 3.0 | 39.0 – 3.5 |
| 反射の数(ワーク/試験)                                                            | 12521/650  | 30351/1594 |
| R <sub>cryst</sub> <sup>(a)</sup> /R <sub>free</sub> <sup>(b)</sup> (%) | 25.4/29.6  | 24.9/29.5  |
| 原子の数                                                                    |            |            |
| タンパク質                                                                   | 3498       | 9064       |
| 水                                                                       | 0          | 0          |
| 炭水化物                                                                    | 70         | 84         |
| B因子平均 (Å <sup>2</sup> )                                                 | 31.6       | 75.2       |
| 理想値からの二乗平均平方根偏差(R.m.s.d) <sup>(c)</sup>                                 |            |            |
| 結合長 (Å)                                                                 | 0.015      | 0.013      |
| 結合角 (°)                                                                 | 1.8        | 1.9        |
| ラマチャンドラプロットの質                                                           |            |            |
| 最も好ましい (%)                                                              | 74.4       | 73.5       |
| さらに好ましい (%)                                                             | 24.1       | 24.5       |
| 一般的に許容される (%)                                                           | 1.5        | 2.0        |
| 許容されない (%)                                                              | 0          | 0          |
| PDB コード                                                                 | 2EC8       | 2E9W       |

30

40

(a) $R_{cryst} = \sum |F_{obs} - F_{calc}| / \sum F_{obs}$  ( $F_{obs}$  および  $F_{calc}$  はそれぞれ、観察された構造因子および算出された構造因子である)。(b) $R_{free}$  は、精密化の前に除去された5%の反射から算出される。(c)R.m.s.d. は二乗平均平方根偏差である。

【0315】

実施例3 Kit外部ドメインの構造の解析

外部ドメイン構造の一般的解析

Kit外部ドメインは、およその寸法が $170 \times 60 \times 50 \text{ Å}$ である細長い曲がりくねった形状を

50

示す(図1A)。KitのD1ドメイン、D2ドメイン、D3ドメイン、D4ドメイン、およびD5ドメインは、2つの逆平行βシートからなるβサンドイッチに組み立てられる、ABCC'DEFGと呼ばれる8つのβ鎖から構成された典型的な免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)フォールドを示す(図1A)。D1、D2、D3、およびD5はそれぞれ、B5およびF5(それぞれB鎖およびF鎖の5番目のアミノ酸);2つのβシートを架橋して、Ig様フォールドの疎水性コアの中心を形成する位置に、ジスルフィド結合で連結された保存されたシステイン残基を含む(HarpazおよびChothia (1994) J Mol Biol 238: 528-539)。D2およびD5は2つのジスルフィド結合を含み、D4はシステイン残基を1つも含まないが、それでもなお、D4のIg様フォールドの完全性は、B5およびF5の保存されたシステイン残基がそれぞれバリン残基およびフェニルアラニン残基で置換されても、維持される。

10

### 【0316】

2つのドメインの軸に沿ったD1とD2の間の角度は76度(図1A、B)であり、インターロイキン-1β受容体の第1のIg様ドメインおよび第2のIg様ドメインの向きに似ている(Vigers et al. (1997) Nature, 386: 190-194)。一方、D2とD3の間の角度は150度、D3とD4の間の角度は119度、D4とD5の間の角度は162度である。異なるIg様ドメインのABED βシートおよびA'GFC βシートの向きは、D1-D2の場合は約180度、D2-D3の場合は約180度、D3-D4の場合は約90度、D4-D5の場合は約180度である(図1)。

### 【0317】

Kit外部ドメインの5種のIg様ドメインすべてを、Igフォールドの標準物質として使用されるテロキン(Holden et al. (1992) J. Mol. Biol. 227: 840-851)と重ね合わせると、等価なCα原子に対して1.5~2.9Åの二乗平均平方根(r.m.s.)偏差が明らかになる。D2は、テロキンと重ね合わせた際に二乗平均平方根偏差値が高いことから明らかであるように、5種のKit Ig様ドメインの中で最も異なっている(図8)。Ig様ドメイン中の重要なアミノ酸の構造的保存およびそれらの二次構造トポロジーに基づく(Harpaz et al. (1994) J Mol Biol 238: 528-539; Halaby et al. (1999) Protein Eng 12: 563-571)、D1、D2、D3、およびD4はIサブセットに属し、D5はIgSFのC2サブセットおよびIgCAMサブセットに属している。さらに、IgSFの構造的に保存された20個のフィンガープリント残基の内(Harpaz et al. (1994) J Mol Biol 238: 528-539)、10~14個の残基はKitの5種のIg様ドメインにおいて保存されている(表2)。

20

### 【0318】

(表2) KitドメインのIgSFおよび典型的なIセットIgSFとしてのテロキン(PDBコード:1TLK)の20個の重要なフィンガープリント残基<sup>(1)</sup>

30

| 位置  | D1      | D2       | D3       | D4       | D5     | テロキン   | 特徴                |
|-----|---------|----------|----------|----------|--------|--------|-------------------|
| AB1 | Gly51   | Asp129   | Gly226   | Gly328   | Asn423 | Gly56  | Gly               |
| B1  | Ile54   | Thr132   | Phe229   | Val331   | Gly424 | Ala59  | 脂肪族               |
| B3  | Leu56   | Val134   | Val231   | Leu333   | Leu426 | Phe61  | 非常に疎水性            |
| B5  | Cys58   | Cys136   | Cys233   | Val335   | Cys428 | Cys63  | Cys               |
| B7  | Asp60   | Leu138   | Ile235   | Tyr337   | Ala430 | Val65  | 中性または疎水性          |
| C2  | (Phe63) | Tyr146   | Ser244   | Gln346   | Ile438 | Val73  | 疎水性               |
| C4  | Trp66   | Leu148   | Trp246   | Trp348   | Trp440 | Trp75  | Trp               |
| CD  | -       | (Leu156) | (Leu253) | Phe355   | -      | Val82  | 非常に疎水性            |
| D1  | -       | (Asp159) | (Gln258) | (Lys358) | -      | His87  | 塩基性で塩橋を形成する       |
| D2  | -       | (Leu160) | (Glu257) | (Trp359) | -      | Phe88  | 疎水性               |
| E4  | Trp82   | Ile170   | Leu275   | Leu377   | Ile478 | Leu100 | 疎水性、ほとんどLeu       |
| E6  | Thr84   | Ile172   | Ile277   | Leu379   | Ser480 | Ile102 | 疎水性               |
| EF2 | Ala87   | Val175   | Ala280   | Leu382   | -      | Val105 | 疎水性               |
| EF6 | Asn91   | Tyr179   | Asp284   | Glu386   | -      | Asp109 | Asp               |
| F1  | Gly93   | Leu182   | Gly286   | Gly388   | Gly487 | Ala111 | GlyまたはAlaまたは(Asp) |
| F3  | Tyr95   | Leu184   | Phe288   | Tyr390   | Val489 | Tyr113 | Tyr               |
| F5  | Cys97   | Cys186   | Cys290   | Phe392   | Cys491 | Cys115 | Cys               |
| G6  | Ile107  | Phe204   | Thr303   | Phe405   | Phe504 | Ala128 | 疎水性               |
| G8  | Val109  | Leu202   | Leu305   | Val407   | Phe506 | Leu130 | 疎水性               |
| G10 | Val111  | Val210   | Val307   | Val409   | -      | Val132 | 疎水性               |

40

(1) HarpazおよびChothia, 1994によって明確にされた、20個の重要なフィンガープリント

50

残基の位置および各フィンガープリント残基の典型的な特徴を最初の列および最後の列に示す。

### 【0319】

Kit Ig様ドメインの構造の詳細な解析

Kit D1。D1フォールドは、2つの $\beta$ シートから構成される $\beta$ サンドイッチである。1つ目のシートは3つの鎖、A、B、およびE、によって形成されており、第2のシートは、5つの鎖、A'、G、F、C、およびC'、から構成されている(ABE/A'GFCC')。第1の鎖は、Pro41におけるシス配座によって妨害されて、より短い2つの鎖AおよびA'に分かれ、これらはそれぞれB鎖およびG鎖と対になる。B5のCys58をF5のCys97と連結するジスルフィド結合により、2つの $\beta$ シートが架橋される。かなり長いC'鎖はC鎖と相互に作用し、E鎖に直接連結されているD1の上側にポリペプチド鎖のC末端を誘導する。Ig様ドメイン命名法に基づく、D1はIgSFのI2サブセットに属する(Casasnovas et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95: 4134-4139)。

### 【0320】

Kit D2。D2は、B鎖、E鎖、およびD鎖によって形成される小さな $\beta$ シートならびにA'鎖、G鎖、F鎖、およびC鎖から構成される第2の $\beta$ シート(BED/A'GFC)、ならびにE鎖とF鎖の交差箇所の付加的なヘリックス(残基177~179)からなる。IセットのIgSFの20個の特徴的残基のうち11個がD2上で確認されるが、このIg様ドメインは、標準的なI1セットのIgSFとはいくつかの点で異なる。D2はC4位置にLeu残基を有するのに対し、他のI1セットのIgSFは保存されたTrpを有する。B鎖およびB'鎖と呼ばれる2つの短い $\beta$ 鎖が形成されるため、B鎖中の水素結合のパターンは変化している。付加的なB'鎖がA鎖と並んで、AB'トポロジーを有する短い $\beta$ シートを形成する。G鎖は、アミノ酸197~199への挿入が原因で、2つの短い鎖、すなわちG(下側)およびG'(上側)に分裂し、その結果、A'鎖と $\beta$ シートを形成する。G鎖の残基197~199番における「よじれ」が原因で生じる水素結合パターンの混乱は、Ser197の側鎖とCys186の主鎖アミドの間の水素結合によって埋め合わせされる。特に、Ser197は、様々な種に由来するKitおよび他のIII型RTKにおいてSer残基またはThr残基として保存されている。D2は、Cys151とCys183の間に付加的なジスルフィド結合を含んでCDループをF鎖の末端と架橋して、C鎖およびCDループをさらに安定にする。付加的なジスルフィド架橋は、C鎖とF鎖の間の水素結合網の減少を埋め合わせすることができる。これら2つのCysは、ゼブラフィッシュからヒトまで、Kitで高度に保存されている。

### 【0321】

Kit D3。D3は、I1サブセットのIgSFに属する2セットの $\beta$ シート(ABED/A'GFC)から構成される。これら2つの $\beta$ シートは、B鎖上のCys233とF鎖上のCys290の間のジスルフィド結合によって架橋されている。テロキン(PDBコード:1TLK)とD3の構造の比較により、D3の98個の整列されたC $\alpha$ 残基に対するZスコアが10.4であり二乗平均平方根偏差が2.0 Åであることが示される。

### 【0322】

Kit D4。D4は、B5およびF5におけるシステイン間の特徴的なジスルフィド結合を欠いているが、D4はIgSFのトポロジーを維持している。さらに、IセットIgSFの20個のフィンガープリント残基のうち13個がD4で保存されている。D4の構造的完全性は、ドメインの疎水性コアの一部分を構成する、それぞれB5およびF5に存在する埋もれた脂肪族残基(Val335)と芳香族残基(Phe392)との相互作用によって維持される。DALIを用いた構造比較により、Kit Ig様ドメインの中で、D4がテロキン(Protein Data Bankコード:1TLKで取得可能)に最も類似しており、89個の整列されたC $\alpha$ 残基に対するZスコアが11.9であり二乗平均平方根偏差が1.5 Åであることが示される。Val335およびPhe392のC $\alpha$ -C $\alpha$ 間の距離8.6 Åは、B5およびF5を連結するジスルフィド結合を欠くIgSFドメイン中の同様の位置の間に認められる距離の範囲内である。例えば、同様にジスルフィド結合を欠いているタイチン(Titin)のIg様ドメインM5(Protein Data Bankコード:1TNM)は、二乗平均平方根偏差2 ÅでD4と重なり、B5位置とF5位置の間の距離は8.9 Åである。D4は、4つの鎖をそれぞれ含む2つの $\beta$ シートから構成され、配置はABED/A'GFCである。A'鎖の第1の残基Thr321は、高度に保存

されたPhe405の芳香環とファンデルワールス接触をなす。特に、ドメイン上側の上方ヘフォールディングされたCDループは、3つの主な相互作用によって安定化される。Thr354の側鎖は、Gln347の側鎖およびTrp348の主鎖カルボニルと水素結合を形成する。疎水性コアの端に位置する疎水性残基(Trp348、Tyr350、Trp359、Val377、Leu379、およびTyr390)は、Phe355に疎水性環境を提供する。CDループは注目すべき配列保存は示さないが、このループは、すべてのIII型ファミリーRTKにおいて8個のアミノ酸を含む。

#### 【0323】

Kit D5。D5は、IgSFのC2およびIgCAMサブセットに属し、20個のフィンガープリント残基のうち10個がこのモジュールで保存されている。D5は、ABED/CFGトポロジー、2つのβシートを架橋する、B5のCys428とF5のCys491の間のジスルフィド結合、ならびにC鎖およびCDループを架橋する第2のジスルフィド結合を示す。これら2つのジスルフィド結合は、すべてのKitおよびIII型RTKにおいて保存されている。特に、D5の上半分は、神経細胞接着分子の第3のIgに似ている。

#### 【0324】

アキソニン-1/TAG-1(Protein Data Bankコード1CS6)。程度は落ちるが、テロキン(Protein Data Bankコード1FHG)、FGFR (Protein Data Bankコード1CVS)、およびRTK Musk (Protein Data Bankコード2IEP)において、いくつかの特徴が確認され得る。これらには、B5とF5を連結するジスルフィド結合の近位に2つのAla残基(Ala430およびAla493)があること、ドメイン上部での接近した詰め込みを可能にする小さな側鎖がこの領域中に存在することが含まれる。第2の特徴は、A鎖、B鎖、C鎖、およびG鎖中のPro残基およびGly残基、それぞれPro413、Gly432、Pro436、およびGly498が環状に配置していることである。第3の特徴は、FGループおよびBCループのそれぞれVal497およびPro434の主鎖と水素結合を形成するAsn残基(Asn495)がF9中に存在することである。まとめると、D5の上部のこれらの3つの特徴の結果として、細胞接着タンパク質のIg様ドメインの立体配置に類似した密接に詰め込まれた立体配置が生じる。

#### 【0325】

実施例4 Kit単量体型におけるIg様ドメイン間の相互作用

Kitの5つのIg様ドメインのドメイン間相互作用は、Kit外部ドメイン単量体の全体的なトポロジーの維持を担っている(図1)。D2に対するD1の向きは、これら2つのIg様ドメイン間の多数の相互作用が原因で生じる大規模な埋もれた表面領域によって決定される(図1B)。D1-D2境界面の $1240 \text{ \AA}^2$ の埋もれた表面領域は、 $500 \sim 800 \text{ \AA}^2$ の間の範囲であるKit外部ドメインの他の3つのIg様間境界面を含む、棒状のマルチドメインIgSF構造体の大半のIg様ドメイン間境界面の埋もれた表面領域よりはるかに大きい(Su et al. (1998) Science 281: 991-995)。この境界面は、主に、D1のA'鎖およびG鎖、ループEFおよびループCC'とD2のA鎖のN末端領域、B鎖のC末端、ループBCおよびループDEとの疎水性相互作用および静電的相互作用によって形成される(図1B)。さらに、D1のG鎖、D1およびD2を連結するリンカー領域、ならびにD2のBCループに由来するアミノ酸を含む、D1-D2境界面の多くの残基は、様々な種に由来するKitで保存されている(図1B)。

#### 【0326】

D2-D3境界面の埋もれた表面領域は約 $780 \text{ \AA}^2$ である。D2-D3境界面は、2つの静電的相互作用に取り囲まれた、小さな疎水性部分から構成される。この境界面は、D2のEFループとD3のDEループの相互作用ならびにD2-D3リンカー領域とD3のFGループおよびBCループの相互作用によって形成される(図1C)。D3-D4境界面の埋もれた表面領域は約 $570 \text{ \AA}^2$ である。D3およびD4は、主にD3のA'鎖およびG鎖を介して、D4のBCループおよびDEループと相互作用する(図1D)。D3-D4境界面の長さは、これら2つのIg様ドメインの長軸に沿った角度が $119^\circ$ となるD3に対するD4の角度配置により、約 $20 \text{ \AA}$ である。D4-D5境界面は、主に疎水性相互作用によってもたらされる、 $760 \text{ \AA}^2$ の埋もれた表面領域を形成する(図1E)。この境界面は、D4のA鎖、G鎖、およびF鎖とD5のBCループおよびDEループならびにD4-D5リンカー領域との相互作用によって形成される(図1E)。

#### 【0327】

Kit単量体におけるIg様ドメイン間相互作用に関する詳細なドメイン毎の情報

D1-D2境界面。D1の残基Ile47、Ile70、Leu71、Ala89、Tyr108、およびPhe110とD2のLeu119、Pro137、Leu138、Pro141、Pro166、およびLys167の側鎖との疎水性相互作用により、ドメイン間相互作用が安定化される(図1B)。疎水性部分を取り囲む領域には、D1のArg112とD2のAsp140の相互作用、およびD1のAsp72とD2のArg135の相互作用を含む2つの主な静電的相互作用がある(図1B)。

#### 【0328】

D2-D3境界面。疎水性部分は、Arg177の脂肪族部分ならびにPro206、Phe208、Val238、およびPhe267の側鎖から構成される。静電的相互作用は、D2のGlu128およびAsp129の側鎖とD3のLys209の間の水素結合を含む(図1C)。Arg177の側鎖とGlu128の側鎖の間の塩橋により、D2中のArg177の側鎖およびPro206の側鎖ならびにD3中のPhe267の位置が安定になって、D2中のArg177の側鎖の脂肪族部分に対して疎水性環境が作り出される(図1C)。第2の静電的相互作用は、D2中のArg181の側鎖とD3中のAsp266の側鎖によってもたらされる。

#### 【0329】

D3-D4境界面。D3-D4境界面における疎水性相互作用には、D3のVal308およびLeu222とD4のPhe312、Phe340、およびIle371の間のものが含まれる。D3-D4境界面は、他のIg様ドメイン間境界面よりも小さな埋もれた領域を含む(図1D)。

#### 【0330】

D4-D5境界面。D4-D5境界面の疎水性部分は、D4のA鎖およびG鎖に由来するPhe324およびTyr408ならびにD5のBCループに由来するPhe433をそれぞれ含む。さらに、ファンデルワールス接触が、疎水性部分を取り囲む境界面の安定化に寄与する;D4のPhe324、Gly384、Thr389、Tyr408、Asn410、Thr411、およびMet351は、D5のVal497、Phe433、Gly470、Phe649、およびLys471と相互作用する(図1E)。

#### 【0331】

実施例5 結合されたSCF-Kit複合体の全体的構造の解析

SCF-Kit複合体の構造は2:2の化学量論比を示し、非対称単位中の2セットの1:1複合体が非結晶学的二回転対称によって関連している(図2)。結晶格子中でSCF-Kit 2:2複合体が観察されることは、二量体SCFリガンドによってKit二量体化が推進されることを実証する実験と一致している(Philo et al. (1996) J Biol Chem 271: 6895-6902; Lemmon et al. (1997) J Biol Chem 272: 6311-6317)。Kit外部ドメインおよびSCF分子の2つのセットは、さかさまの文字「A」に似ており、およその寸法は $170 \times 130 \times 70 \text{ \AA}$ である(図2Aおよび図9)。

#### 【0332】

Kitに結合されたSCFの全体的な構造は、以前に説明されている遊離SCFの構造に類似している(Zhang et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97: 7732-7737; Jiang et al. (2000) Embo J 19: 3192-3203)。SCF-Kit 2:2複合体の構造から、個々のSCFプロトマーが個々のKitプロトマーのD1、D2、およびD3に直接結合することが示される(図2B)。その結果として、単一の受容体プロトマーは、SCFプロトマー上の2回軸で関係づけられた(two-fold related)同様の表面と対称性複合体を形成する。また、Kitの二量体化は、Kitの2つの膜近位Ig様ドメイン間の同型相互作用、すなわち、D4-D4相互作用およびD5-D5相互作用によっても媒介される(図2B)。これにより、分子の他の部分に対するD4およびD5の立体配置が劇的に変化し、C末端を互いから $15 \text{ \AA}$ 以内に、それらが膜貫通ドメインに結合する場所の近くへと導く(図2Bおよび図9)。この構造体はまた、複合体の中央に寸法約 $50 \times 50 \times 15 \text{ \AA}$ の大きな窪みが存在することも特徴とする(図2B)。この結晶構造から、SCFの各プロトマーは単一のKit分子にのみ結合すること、および受容体二量体化は付加的な受容体間相互作用を促進するSCF二量体によって推進されることが実証される。

#### 【0333】

実施例6 KitのSCF結合領域の解析

SCFは、SCFの4つのヘリックスバンドルがD1、D2、およびD3の長軸に対して垂直に向き、かつSCFおよびKitのC末端が向かい合わせの方向で面している立体配置で、KitのD1、D2

10

20

30

40

50

、およびD3によって形成される窪んだ表面に結合する(図2、3、および図9)。Kitと各SCFプロトマーの間の境界面に埋もれた、溶媒に接近可能な表面領域は約2060 Å<sup>2</sup>であり、公知のリガンド受容体境界面の範囲内にある埋もれた表面領域である。SCF-Kit境界面を3つの結合部位に分類することが可能である(図3A、B、表2、および表3)。部位IはD1上に位置し、部位IIはD2中およびD2-D3リンカー領域中に位置し、部位IIIはD3中に位置する。部位I、II、およびIIIの埋もれた表面領域はそれぞれ約280 Å<sup>2</sup>、770 Å<sup>2</sup>、および1010 Å<sup>2</sup>である。

#### 【0334】

##### 部位I

SCFのαC-β2ループは、図3Cに示すように、D1のC'鎖に対して垂直に並ぶ。D1のAsp72、Glu73、およびThr74ならびにSCFのLys99'、Ser101'、およびPhe102'は、6~8 ÅのCα距離で接近して位置していることから、これらの残基はD1とSCFの相互作用に参与し得ることが示される。αC-β2ループの側鎖電子密度は十分ではないため、特異的な相互作用を明確にすることはできない。

#### 【0335】

##### 部位II

SCF結合は、大半は、Kit上の帯電した表面の相補的な静電的相互作用に媒介される(図3A、B、D)。塩橋は、Kitの塩基性アミノ酸Arg122、Arg181、Lys203、およびArg205とSCF上のアミノ酸Asp54'、Asp77'、Asp84'、およびGlu88'の間で形成される。Arg122の立体構造は、KitのGlu198とSCFのAsp54'の間の塩橋によって安定化される。図3Dは、D2上の主な相互作用残基の内の3つであるTyr125、Arg181、およびLys203が、同じ平面上に整列し、SCFのαBおよびαCのAsp77'、Asn81'、Asp84'、Ser53'、およびThr57'と水素結合を形成することを示す。D2のSer123およびIle201とSCFのVal50'およびThr57'の間のファンデルワールス接触もまた、リガンド-受容体複合体の形成に寄与する。しかしながら、他の種に由来するKitおよびSCFの部位IIの残基は著しく異なる(図3、図8、および図10)。Arg181およびLys203は哺乳動物において塩基性アミノ酸として不変であるが、マウスおよびラットではTyr125がフェニルアラニンに置換されており、これは水素結合の減少をもたらす可能性が高い。KitのArg205は高度に保存されたアミノ酸であるのに対し、マウスおよびラットでは、Glu88'がそれぞれロイシン残基およびアラニン残基に置換されている。さらに、ヒトのKitのArg122およびSCFのAsp54'は、マウスおよびラットでは、それぞれロイシンまたはバリンに置換されている。これらの置換が、ヒトKitに対するげっ歯動物SCFの親和性が低いことの原因であり得る(Lev et al. (1992b) J Biol Chem 267: 15970-15977)。

#### 【0336】

##### 部位III

SCFのN末端セグメントは、D3のD鎖と相互作用する(図3A、E)。水素結合は、SCFのAsn10'の側鎖とD3上のSer261の主鎖のアミド基およびカルボニル基、ならびにAsp260およびTrp262の側鎖との間で形成される。さらに、SCFのThr9'およびAsn11'は、それぞれKitのSer261およびHis263の側鎖および主鎖アミドに結合する。SCFの変異解析により、Asn10'がアラニン残基またはグルタミン酸残基で置換されると、SCFのKitに対する結合親和性が約10倍低下すること、およびAsn10'(または他の種ではAsp)が生物活性に必要であることが示された(Hsu et al. (1998) Biochemistry 37: 2251-2262)。様々な種に由来するSCFの受容体結合境界面の比較により、Asn10'(またはAsp)が高度に保存された残基であることが示される(図8)。その他の重要な相互作用は、KitのD3上のTyr259、Thr269、Ser240、Val242、Ser241、Ser244とのファンデルワールス接触を介して、SCFのAsn6'およびArg7'によって媒介される

#### 【0337】

(表3) SCF-Kit相互作用および2つのKitプロトマー間の同種親和性相互作用

| SCF-KIT 相互作用 1             |     |                                  | SCF-KIT相互作用 2              |     |                    | KIT D4-D4 相互作用             |     |                |
|----------------------------|-----|----------------------------------|----------------------------|-----|--------------------|----------------------------|-----|----------------|
| 水素結合および塩橋 <sup>(1)</sup>   |     |                                  | 水素結合および塩橋 <sup>(1)</sup>   |     |                    | 水素結合および塩橋 <sup>(1)</sup>   |     |                |
| Kit (molA)                 |     | SCF (molC)                       | Kit (molB)                 |     | SCF (molD)         | Kit (molA)                 |     | KIT (molB)     |
| Arg122                     | Nη1 | Asp54 Oδ1                        | Arg122                     | Nη1 | Asp54 Oδ1          | Arg381                     | O   | Arg381 Nη1     |
| Tyr125                     | OH  | Asp84 Oδ1                        | Tyr125                     | OH  | Asp84 Oδ1          | Arg381                     | Nη1 | Thr380 O       |
| Arg181                     | Nη1 | Asp77 Oδ2                        | Arg181                     | Nη1 | Asp77 Oδ2          | Arg381                     | Nη2 | Glu386 Oε1     |
| Arg181                     | Nη2 | Asn81 Oδ1                        | Arg181                     | Nη2 | Asn81 Oδ1          | Glu386                     | Oε1 | Arg381 Nη2     |
| Lys203                     | Nζ  | Asp84 Oδ1                        | Lys203                     | Nζ  | Ser53 Oγ           |                            |     |                |
| Lys203                     | Nζ  | Ser53 Oγ                         | Ser240                     | Oγ  | Asp85 Oδ2          |                            |     |                |
| Ser240                     | Oγ  | Asp85 Oδ2                        | Ser261                     | O   | Thr9 Oγ1           |                            |     |                |
| Ser261                     | O   | Thr9 Oγ1                         | Ser261                     | O   | Asn10 Oδ1          |                            |     |                |
| Ser261                     | O   | Asn10 Oδ1                        | Trp262                     | Nε1 | Asn10 Oδ1          |                            |     |                |
| ファンデルワールス接触 <sup>(2)</sup> |     |                                  | ファンデルワールス接触 <sup>(2)</sup> |     |                    | ファンデルワールス接触 <sup>(2)</sup> |     |                |
| Asp72                      |     | Phe102                           | Asp72                      |     | Lys99              | Thr380                     |     | Thr380, Arg381 |
|                            |     | Val87, Ser53                     | Thr74                      |     | Lys99              | Arg381                     |     | Leu382, Lys383 |
| Tyr125                     |     |                                  |                            |     |                    |                            |     |                |
| Arg181                     |     | Leu60, Val80                     | Tyr125                     |     | Val87, Ser53       | Leu382                     |     | Arg381         |
| Ile201                     |     | Thr57                            | Arg181                     |     | Leu60, Val80       | Lys383                     |     | Arg381         |
| Lys203                     |     | Thr57                            | Ile201                     |     | Thr57              |                            |     |                |
| Arg205                     |     | Glu88                            | Lys203                     |     | Thr57, Asp84       |                            |     |                |
| Ser240                     |     | Arg7                             | Arg205                     |     | Glu88              |                            |     |                |
| Trp262                     |     | Thr9, Asn10, Asn11               | Ser240                     |     | Arg7               |                            |     |                |
| His263                     |     | Thr9, Asn11, Lys78, Asn81, Asp85 | Trp262                     |     | Thr9, Asn11        |                            |     |                |
| Gly265                     |     | Lys78, Asn81                     | His263                     |     | Thr9, Asn11, Lys78 |                            |     |                |
| Asp266                     |     | Asn81                            | Gly265                     |     | Lys78, Asn81       |                            |     |                |
| Tyr269                     |     | Asn6                             | Tyr269                     |     | Asn6               |                            |     |                |

10

20

30

(1) 水素結合および塩橋ならびに(2) ファンデルワールス接触の距離範囲は、それぞれ2.5～3.6 Å および4.0 Å 以内である。

#### 【0338】

実施例7 Kit/SCF構造の解析および結合に関連した立体構造的変化

Kitのリガンド結合ドメインは、SCF結合に対する態勢が整っている(poised)

Kit単量体型の個々のD1、D2、およびD3の構造を、SCFによって誘導されたホモ二量体型の対応する構造と重ね合わせると、D1、D2、およびD3中の82個、92個、および100個の整列されたCα残基の二乗平均平方根偏差の値がそれぞれ0.5 Å、0.8 Å、および1.1 Åであることが明らかになる。同様に、Kit単量体のD1-D2-D3領域全体の構造をSCF-Kit 2:2複合体の対応する構造と重ね合わせると、D1-D2-D3領域の274個の整列されたCα残基の二乗平均平方根偏差が1.1 Åであることが明らかになる。珍しいことに、KitのSCF結合ポケットの構造において顕著な主鎖の変化はない(図3および図11)。しかしながら、いくつかの軽微な構造変化が、SCF結合の際に、SCFの結合するへこみで検出された。構造変化は、SCF結合後に、D2のG鎖、F鎖、およびC鎖(アミノ酸167～187および143～166)の上半分で認められる(図1A、2A)。これらの鎖は、SCFが結合する境界面と反対側に位置しており、SCFとの任意の直接接触の媒介に関与していない。総合的に、Kit単量体の構造をSCFに占有されたKit二量体の構造と比較すると、KitのD1-D2-D3領域が、SCF結合、続いて二量体SCF分子によって推進される後続のKit二量体化に対する態勢が整っている機能的単位とみなされ得ることが示される。

40

50

## 【0339】

Kitに結合されたSCF分子の立体構造的変化

Kitに結合されたSCFの全体的構造は、遊離SCFの構造に類似しているが、これら2つのプロトマーの間の角度、結合ループの立体構造、および分子の柔軟なN末端の構造には注目すべき差がある(図4)。SCF二量体の公表されている構造(Protein Data Bankのアクセシオンコード1EXZおよび1SCF)の比較により、遊離SCFホモ二量体のこれら2つのプロトマーの間の角度( $\alpha$ Cヘリックス間の角度)は、構造が異なると2度~6度異なり得ることが示され、ある程度の柔軟性がSCF二量体に存在することが示唆される。Kitに結合したSCFプロトマー間の角度と遊離SCFの角度の差の範囲は、3~9度の増加であった。図4は、SCFプロトマー間の角度が5度増加した、Kitに結合したSCF構造体を示す。

10

## 【0340】

図4Bは、遊離SCFのN末端のCys4'からAsn11'までがランダムコイル立体配置を有することを示す(Zhang et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97: 7732-7737)。また、最初の4つのアミノ酸が欠失すると、Kitに対するSCFの結合親和性が約25%低下することも示され、Cys4'とCys89'の間のジスルフィド架橋が、SCFの機能の完全性を維持する上で役割を果たすことが示唆された(Langley et al. (1994) Arch Biochem Biophys 311: 55-61)。図4Bはまた、Kitに結合されたSCFのN末端領域のThr9'およびAsn10'が、立体構造的変化を経て、それらのC $\alpha$ 位置が受容体結合の際に3~5Å移動することも示す(図4B)。N末端のCys4'と $\alpha$ CヘリックスのCys89'の間のジスルフィド架橋は、SCFのN末端で起こる立体構造的変化を媒介する際に重要な役割を果たすと思われる。遊離SCFのCys24'の位置は、C $\alpha$ 位置の二乗平均平方根偏差(r.m.s.d.)が1.2Åであることから示されるように、受容体占有の際に変化しない。最後に、遊離SCFの $\alpha$ C- $\beta$ 2は、障害されているか、またはKitに結合したSCFの $\alpha$ C- $\beta$ 2ループの構造とは異なる構造を有する。図4Cは、SCFの $\alpha$ C- $\beta$ 2ループが、受容体結合の際に大規模な立体構造的変化；SCF-Kit境界面の部位Iの確立に不可欠な変化、を経ることを示す。

20

## 【0341】

SCFに結合されたKitにおけるD4およびD5の向きの大規模な再配列

Kit単量体型の個々のD1、D2、D3、D4、およびD5の構造体を、SCFによって誘導されるホモ二量体型の対応する個々のIg様ドメインと重ね合わせると、SCF結合後のKit Ig様ドメイン構造の軽微な変化が明らかになる。一方、Kit単量体型のD3-D4-D5領域をホモ二量体型の対応する領域と重ね合わせると、D4およびD5の互いに対する向きおよびKitのリガンド結合領域に対する向きの大規模な構造変化が明らかになる(図5Aおよび図12)。単量体Kitの個々のドメインD3、D4、およびD5をそれぞれ、SCFに占有されたKit中の対応物と重ね合わせることができ、D3、D4、およびD5の98個、101個、および85個のCa原子に対する二乗平均平方根偏差の値はそれぞれ0.9Å、0.9Å、および1.9Åである。しかしながら、Kit単量体のD3構造体を、リガンドに占有されたホモ二量体型のD3構造体と重ね合わせると、SCFに結合されたKitにおいてD4およびD5の向きが劇的に移動していることが明らかになる(図5A)。リガンド結合領域に対するD4およびD5の再配向は、D3-D4境界面およびD4-D5境界面をそれぞれ通り抜ける(図5A)、D3をD4に連結するリンカー中の軸に沿った回転、およびD4をD5に連結するリンカー中の軸に沿った回転によって起こる。遊離Kitおよびリガンドに結合されたKitの比較により、リガンドに占有されたKitのD4はD3を基準として22度回転し、リガンドに占有されたKitのD5はD4を基準として27度回転する(図5A)。SCFに占有されたKitにおいてD4およびD5が再配列した結果、隣接する2つのKit分子のD4-D4相互作用およびD5-D5相互作用によって媒介される受容体間相互作用が起こる(図5B)。D5のDEループの立体構造は、SCFに占有された外部ドメインにおいて変化している。受容体二量体化によって推進されるD4およびD5の再配により、D5のDEループに新しい立体配置が課される(図5A)。

30

40

## 【0342】

Kitホモ二量体におけるD4:D4相互作用

隣接する2つのKit分子のD4間の同型相互作用は、SCF-Kit 2:2複合体中のD4-D4境界面に

50

よって媒介される。D4-D4境界面は、各KitプロトマーのD4のABED鎖によって形成された $\beta$ シート2つによってもたらされ、各プロトマーのArg381が互いに向かい合って306A<sup>2</sup>の埋められた表面領域を生じるほぼ平面の配置をなしている。図6Aは、Arg381およびGlu386が、Kit二量体の二回軸(two-fold axis)を横切って塩橋およびファンデルワールス接触を形成することを示す。さらに、各プロトマーのArg381の側鎖は、隣接するKit分子の対応する残基の主鎖カルボニルと水素結合を形成する。

#### 【0343】

構造ベースの配列解析により、D4-D4境界面が、CSF1R、PDGFR $\alpha$ 、およびPDGFR $\beta$ を含む大半のIII型RTKにおいて保存されていることが示された(図6Bおよび図8)。PDGFR $\alpha$ では、Glu386がアスパラギン酸；同様に塩橋相手として機能し得る残基、に置換されている。塩基性残基(Arg381)および酸性残基(Glu386)のペアは、様々な種のIII型RTKにおいて厳密に保存されている。また、D4-D4境界面に存在する配列モチーフは、VEGFR-1(Flt1)、VEGFR-2(Flk1)、およびVEGFR-3(Flt4)を含むV型RTK(VEGFRファミリー)の全メンバーの膜近位の第7のIg様ドメイン(D7)において保存されている。VEGFRにおいて、塩基性残基(Arg)および酸性残基(Asp)はEFループ中に位置する。III型RTKのD4-D4境界面に関与するコア配列モチーフは、VEGFRでは異なるIg様ドメイン(すなわち、III型のD4に対してD7)に位置しているが、KitのD4-D4境界面で認められるものに類似した受容体間相互作用もまた、RTKのVEGFRファミリーの全メンバーにおいて同様のD7-D7境界面(図6A)を介して起こることが可能である(Ruch et al. (2007) Nature.Struct. Mol. Biol. 14: 249-250)。

#### 【0344】

Kitホモ二量体におけるD5-D5相互作用

図2Bおよび図5B、6Cは、SCF-Kit 2:2複合体において、隣接するD5プロトマーが平行で互いの極めて近くにあり、かつ、細胞膜に対して直角である可能性が高い向きで存在することを示す。D5の $\beta$ シートトポロジーは、A鎖がA鎖およびA'鎖に分かれている大半のIセットIgSFとは異なる非定型的な配置に従う。D5のA鎖はB鎖と対になって、ABED/CFGの $\beta$ シートトポロジーを結果として生じる。その結果として、2つの $\beta$ シート(ABED/CFG)の端に位置するA鎖およびG鎖はほぼ平行であり、互いのC $\alpha$ の距離は6.5~11.5 Åである。さらに、1つのプロトマーのA鎖およびG鎖は、隣接するD5のA鎖およびG鎖と二回転対称の関係で向きあう。隣接する2つのKitプロトマーのAsn505の側鎖は互いから約4.2 Å離れているが、これら2つのアスパラギンの間接的相互作用を媒介し得る水または金属イオンは、電子密度の少ないこの領域では検出することができない。付加的なD5-D5相互作用は、隣接する2つのKit分子のTyr418によって媒介される(図6C)。隣接するTyr418側鎖のヒドロキシル基間の相互作用は、水分子によって媒介され得る。また、隣接するD5ドメインの相対的位置が、隣接するプロトマーのTyr418およびAsn505によってもたらされる間接的相互作用によってもたらされることも示唆される。D5のG鎖は、短いリンカーを介して、Kitの膜貫通ドメインに連結される。

#### 【0345】

実施例8 受容体活性化のメカニズム

Kit外部ドメイン単量体およびSCFによって誘導された二量体の構造から、Kitおよび細胞外ドメイン中に5個または7個のIg様ドメインを含む他のRTKのリガンドによって誘導される活性化のメカニズムに関して新規な洞察が得られる。Kit外部ドメイン単量体のD1、D2、およびD3の構造を、SCFによって誘導される外部ドメイン二量体中の対応する領域と比較すると、SCF結合後、SCF結合ポケットならびにD1、D2、およびD3の他の部分のごくわずかの構造変化が示される。それらの独特な生化学的機能に基づいて、本発明者らはKitの外部ドメインを3つの独立した機能単位に分類した。第1の単位は、3つの膜遠位Ig様ドメインD1、D2、およびD3から構成される。D1-D2-D3領域は、特異的なSCF結合単位として機能する別個の(separate)モジュールの役割を果たす。SCF結合単位は、柔軟な継ぎ目(D3-D4境界面)によってD4に連結され、D4は、別の柔軟な継ぎ目(D4-D5境界面)によってD5に連結されている第2の独立した単位であり、D5は第3の独立した単位と定義される。D4およびD5の機能は、隣接する2つのKit外部ドメインの膜近位領域間の相互作用を統合および安定

化するD4-D4およびD5-D5の側面相互作用をそれぞれ媒介することである。

#### 【0346】

この見解によれば、Kitの二量体化は、唯一の機能がSCFを結合することおよび2つのKit分子を統合することである二価のSCF結合によって推進される。SCFによって誘導されるKit二量体化に続いて、D1-D2-D3 SCF結合単位的位置に対するD4およびD5の向きが大きく変化する。本明細書において提示するデータから、D3-D4境界面およびD4-D5境界面の柔軟な継ぎ目のおかげで、受容体二量体化の際に大規模な立体構造的変化をもたらす側面相互作用が可能になることが実証される。Kitの立体構造的変化を誘導する代わりに、二量体化は、柔軟に連結された単量体から強固な二量体に移行する際に特定の立体構造を選択し得る。これは結果的に、Kitの隣接する2つのD4および隣接する2つのD5の複合体形成をもたらして、隣接する2つのKit分子の膜貫通ドメインが互いから15 Å以内となる細胞膜の箇所

10

にD5のC末端を導く。実際、SCFによって誘導されるKitのチロシン自己リン酸化(図7B)および下流のシグナル伝達経路の刺激は、KitのD4内部のArg381またはGlu386いずれかの点変異によって大きく損なわれる。PDGF受容体活性化および下流のシグナル伝達経路の刺激はまた、PDGFRのD4における同様の点変異によっても損なわれる。本明細書において提示するデータから、Kitの膜近位領域間の同型相互作用が主にD4-D4境界面によって媒介されること、およびD5-D5境界面は、細胞表面境界面における2つのKit外部ドメインの正確な位置付けを容易にすることにより、協同的な二次的役割を果たすことが実証される。

#### 【0347】

SCF-Kit複合体は、次の特徴を有する静電場の強い分極を示す:(i)全体的に負に帯電した表面;(ii)SCF(陰性)とリガンドに結合するD1-D2-D3単位(陽性)の相補性;ならびに(iii)D4-D4境界面の真上および周辺の強く負に分極した表面(図6D、3Bおよび図13)。このデータから、KitへのSCFの結合が、少なくとも2つの段階で起こることが実証される;第1に、SCFとD1-D2-D3の間の静電気引力によって、Kit上の対向するリガンド結合領域に沿ってSCFが整列すると考えられる。また、静電気引力は、ステアリング(Steering)効果の寄与により、より速いSCF会合速度をもたらし得る(Mueller et al. (2002) *Biochimica et Biophysica Acta*. 1592: 237-250)。続いて、SCF-Kit複合体形成は、結合されたSCF分子の立体構造的変化によって媒介されるものを含む付加的な相互作用によって安定化される。D4上の強く分極した静電的表面はまた、隣接するKit受容体のD4ドメイン間の反発を誘発することにより、Kitを不活性な単量体立体配置で維持する際に役割を果たし得る(図6D)。

20

30

隣接する受容体のD4に対するD4の結合親和性およびD5に対するD5の結合親和性は低すぎて、細胞表面の局所的受容体濃度がSCFによって推進された受容体二量体化および次元数の効果によって増加する前にKit外部ドメイン二量体化を促進することはできない可能性が高い。このような局所濃度の閾値に一度達すると、隣接するD4間の引力は、隣接する2つのD4単位が互いに結合できるようになる程度まで、静電反発力に打ち勝つ。興味深いことに、D4-D4境界面を維持する主な相互作用、すなわち、隣接するKit分子のArg381とGlu386の間の二重塩橋もまた、静電的相互作用によって媒介される。

#### 【0348】

KitおよびC-カドヘリン(Boggon et al. (2002) *Science* 296: 1308-1313)の外部ドメインはそれぞれ、5個の直列のIg様ドメインから構成され、両方とも同様の細長いトポロジー;Kitは170 ÅでC-カドヘリンは185 Å、を示す。さらに、細菌接着分子インベシンは、著しく類似した細長い構成およびIg様ドメイン間トポロジーを示す(Hamburger et al. (1999) *Science* 286: 291-295)。Kit外部ドメインは、細胞間相互作用を媒介するタンパク質をコードする共通の先祖遺伝子から進化した可能性がある。クラシックカドヘリンは、細胞間相互作用を媒介する同型結合のために膜から最も遠位のIg様ドメインを利用するのに対し、Kitの外部ドメインは、膜アンカー型SCFアイソフォームまたは可溶性SCFアイソフォームに結合して受容体の二量体化および活性化を誘導する細胞シグナル伝達受容体として機能するように進化した(図7C)。

40

#### 【0349】

Kit構造の特徴であるリガンド結合および受容体二量体化は他の受容体で保存されてい

50

るため、Kit活性化に関して本明細書において説明するメカニズムは、多くの受容体の活性化に関する一般的なメカニズムであり得る(図7C)。さらに、本明細書において説明する構造の情報は、癌および活性化受容体によって推進される他の疾患を治療するための新規な治療的介入を設計するために適用され得る。

### 【0350】

#### 実施例9 ヒト疾患におけるKit変異の解析

様々なヒト疾患が、Kit遺伝子の変異によって引き起こされる。ヒトでは、Kit外部ドメインの機能喪失型変異は、まだら状の形質を引き起こす(Fleischman et al. (1996) J Invest Dermatol 107: 703-706; Murakami et al. (2005) J Invest Dermatol. 124: 670-672)。Kit遺伝子座のこれらのエキソン-2点変異およびエキソン-3点変異の結果、Cys136がアルギニン残基によって置換され、Ala178がトレオニン残基によって置換される。どちらの変異も、Kit上のSCF結合部位の決定的に重要な構成要素であるD2において起こる(図7A)。まだら状になるCys136Arg変異は、D2の構造および機能の完全性、およびしたがって、SCFを認識する能力を維持する際に決定的に重要な役割を果たす重要なジスルフィド結合の損失を引き起こす。Ala178は、D2-D3境界面の極めて近くのD2のEFループ中に位置している(図7A)。まだら状になるAla178Thr変異は、D2-D3境界面の完全性を維持するために不可欠な相互作用、ならびにSCFへのD2および/またはD3の結合に必要とされる相互作用を混乱させ得る(図7A)。

### 【0351】

Kit遺伝子座の様々な機能獲得型変異が、GIST、AML、およびSCLCを含む様々な癌で発見された(Forbes et al. (2006) COSMIC 2005. BR J. CANCER, 94: 318-22. Somatic mutation database: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>を参照されたい)。多くの発癌性変異が、JM中およびKitのPTKドメイン中で確認された。共同で活性型Kitの形成をもたらすインフレーム欠失、点変異、インフレーム重複、および挿入を含む様々な発癌性変異もまた、Kit外部ドメインで発見された(図7A)。Asp419の喪失または置換のいずれかを伴う、エキソン-8でのインフレーム欠失および挿入性変異は、AML患者で説明されたのに対し、Ala502-Tyr503配列およびAla502-Phe506配列の重複は、GISTにおいて確認された(図7A)。Asp419は、D5のA鎖およびABループを連結する領域に位置しており、Ala502-Tyr503はKitのD5のG鎖上に位置している。興味深いことに、Kit外部ドメイン中で発見された活性化発癌性変異の実質的にすべてが、D5-D5境界面にマッピングされた(図7A)。発癌性D5変異の作用様式の最も妥当と思われる解釈は、これらの変異が、結合速度を上昇させるか、もしくは解離速度を低下させるか、またはD5-D5相互作用の強化が促進されるように両方のプロセスの速度を変更することによって、隣接するD5ドメイン間の結合親和性および同型相互作用を増強するというものである。

### 【0352】

上記の解析により、D4領域およびD5領域が、治療物質の標的とするのに好適な候補であることが実証される。薬物、薬剤、または生物製剤は、Kit二量体化/活性化を奨励するために、またはより好ましくは、二量体化/活性化を妨害するために、Kitに結合するために使用され得る。

### 【0353】

#### 実施例10 Kit外部ドメインの発現、精製、および部分的脱グリコシル化

C末端に付加的な5つのヒスチジン残基を含むヒトKitのアミノ酸1~519番をコードするDNA構築物(Lemmon et al. (1997) J Biol Chem 272: 6311-6317)をpFastBac1 (Invitrogen, Inc.)に連結した。Bac-to-Bac取扱説明マニュアル(Invitrogen)に記載されている手順に従って、外部ドメインKitタンパク質を発現するバキュロウイルスを調製した。昆虫Sf9細胞を、Wave Bioreactor (Wave Biotech, LLC, System 20/50)を用いて、10%熱失活ウシ胎仔血清を添加したグレース昆虫用培地15リットル中で $2\sim 3 \times 10^6$ 細胞/mlまで増殖させ、次いで、Kit外部ドメイン遺伝子を有する組換えバキュロウイルスに感染させた。外部ドメインKitはヒトKit由来のシグナル配列を含んだが、タンパク質は外に分泌されずに

昆虫細胞中に蓄積された。72時間後、細胞を回収し、氷上で20分間、200mM NaCl、10%グリセロール、1%NDP-40、および2mM PMSFを含む50mMリン酸カリウム緩衝液(pH8)1.4リットル中で溶解した。遠心分離およびろ過後、Ni-NTAビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーとそれに続くSuperdex 200を用いたゲルろ過によって、Kitの外部ドメインを精製した。25mM NaClおよび1%グリセロールを含む25mM Tris緩衝液(pH8.5)に溶解した精製したKit外部ドメインを、4°Cで12時間、Kit溶液に最終比率10:1(w/w)で添加した組換えエンドグリコシラーゼF1で処理した。次いで、エンドヌクレアーゼF1で処理したKit外部ドメインを、予め平衡化した16/10 Mono Q カラムに載せ、400mM NaClおよび1%グリセロールを含むTris緩衝液(pH8.5)のゆるい勾配を用いて溶出させた。脱グリコシル化されたKit外部ドメインの画分を集め、回転濃縮装置を用いて35mg/mlまで濃縮した。部分的に脱グリコシル化されたKit外部ドメインの精製調製物を一定量に分割し、液体窒素中で急速冷凍した。このアプローチを用いて、培養細胞15リットルから、部分的に脱グリコシル化されたKit外部ドメイン約10mgを精製した。以前に説明されているようにして(Zhang et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97: 7732-7737)、SCF(1~141)を発現させ、リフォールディングさせ、精製した。Kit外部ドメイン(アミノ酸1~514)もまた、以前に説明されているようにして(Lemmon et al. (1997) J Biol Chem 272: 6311-6317)、バキュロウイルス系を用いてSf9昆虫細胞において分泌型として発現させ、精製した。

#### 【0354】

実施例11 構造の決定および精密化

Kit外部ドメイン単量体の結晶の多波長異常回折法(MAD)および異常分散を考慮した多重同型置換法(MIRAS)の組み合わせを用いて、実験位相を決定した。CNSプログラム一式(Brunger et al. (1998) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 54: 905-921)およびSHARPプログラム一式(Bricogne et al. (2003) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 59: 2023-2030)を用いて、重原子探索および位相決定を実施した。白金誘導体(K<sub>2</sub>Pt(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>)の場合は大きな部位1つおよび小さな部位2つが検出され、ヨウ素に浸した結晶の場合は大きな部位1つおよび小さな部位5つが検出された。CNSを用いて3種の波長で、白金誘導体に対して分解能3.3 ÅまでMAD位相を算出した。CNSおよびSHARPを用いて、白金誘導体およびヨウ素誘導体に対して分解能3.0 ÅまでMIRAS位相を算出した。溶媒フリッピング(Solvent flipping)密度改変の結果、連続的な電子密度および非常に明瞭な溶媒-タンパク質境界面を有する、解釈可能な品質の電子密度マップが得られた。MIRAS位相決定およびMAD位相決定によって算出した電子密度マップを比較することによって、D2のF鎖、G鎖、およびC鎖の上半分ならびにCDループ、ならびにD5のCDループ、D鎖、DEループおよびEFループならびにF鎖の下半分を含む、電子密度の質が良くない領域を確認した。収集データおよび位相決定統計値を表1Aおよび1Bに要約する。COOT(EmsleyおよびCowtan (2004) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 60: 2126-2132)を用いて、実験の電子密度マップにKitの分子モデルを手動で組み込んだ。自由R因子を算出するために、精密化の間にデータの5%を除外した。CNSを用いて、ネイティブデータに対して分解能3.0 Åまで精密化を実施した。精密化の最終段階で、TLSMDウェブサーバーを用いて作成した3つのTLSグループを用いるCCP4プログラム一式(Painter et al. (2006) J Appl Cryst 39: 109-111)のRefmac5 (Murshudov et al. (1997) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 53: 240-255)によって、トランスレーション/ライブラレーション/スクリュー(translation/libration/screw)(TLS)精密化を実施した。

#### 【0355】

PHASERを用いた分子置換によって(McCoy et al. (2005) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 61: 458-464)、SCF-Kit複合体の構造を解明した。PHASERにより、ネイティブデータセットに対する検索モデルとしてKitのD1D2D3およびD4ならびにSCFをそれぞれ用いて、Kit外部ドメインのD1D2D3D4およびSCFに対する分子置換の明かな解を発見した。Kit(D1D2D3D4)-SCF複合体構造を20 Åから4 Åまでの剛体精密化に供したところ、Rcrystは43.8%となった。CNSを用いて、RcrystおよびRfreeの値がそれぞれ31.6%および34.0%になるまでモデルの再構築および精密化を実施した。D5領域の連続的な電子密度が2σ 2Fo-Fcマッ

ブおよび3 $\sigma$  Fo-Fcマップで見出された。COOTを用いて、D5の鎖を手動でこのマップに引き、続いて、各段階の後に精密化を適用した。最初の精密化の間ずっと、非結晶学的対称(NCS)制約を残基に課した。ネイティブなX線回折データに対して、分解能3.5 Åまでさらに精密化を実施した。ほぼ完全なSCF-Kit複合体分子を構築した後、NCS制約を解除したところ、R値およびRfree値が減少し、電子密度が改善した。精密化の最終段階で、NCS制約を完全に解除した。PROCHECK(Laskowski et al. (1993) J Appl Cryst 26: 283-291)を用いて、これらのモデルの立体化学を解析した。精密化統計の要約を表1Bに示す。

### 【0356】

#### 実施例12 SCFの放射性標識およびリガンド置換アッセイ法

製造業の取扱い説明書に従ってIodo-Gen Iodination Tube(Pierce)を用いて、ヒトSCF(10  $\mu$ g)を1mCiの $^{125}$ I(PerkinElmer)で標識した。置換結合アッセイ法のために、野生型KitまたはKit変異体を発現する3T3細胞を、10% FCSを含むDMEM中で増殖させた。10mM HEPES pH7.4および0.1% BSAを含むDMEM(DMEM-BSA)で細胞を3回洗浄し、次いで、濃度を漸増させた天然SCFの存在下、 $^{125}$ Iで標識したSCF 2ngと共に室温で1時間インキュベートした。次いで、冷DMEM-BSAで細胞を3回洗浄し、室温で1時間、0.5M NaOH 0.5ml中で溶解し、細胞溶解物100  $\mu$ lをOpti-Fluorシンチレーション溶液(Perkin Elmer)10mlに添加して、細胞に結合した放射能をLS6500 Scintillation Counter (Beckman Coulter)を用いて測定した。

10

### 【0357】

#### 実施例13 保存解析

ヒトSCFおよびKitのアミノ酸配列をクエリーとして使用して、PSI-BLAST(Altschul et al. (1990) J Mol Biol 215: 403-410)を用いて、相同配列を求めて非重複性のデータベース(nr)を検索した。SCF配列またはKit配列においてClustalW(Higgins (1994) Methods Mol Biol 25: 307-318)を用いて配列アラインメントを実施し、次いで、Kit Ig様ドメイン中の20種の主要な残基に関するIgSFフォールドの制限(restrain)に基づいて手動で調整した。SCF-Kit複合体結晶構造によって明らかにされたアミノ酸配列のアライメントをConsurf 3.0サーバー(Landau et al. (2005) Nucleic Acids Res 33: W299-302)での処理にまわして、分岐の速度が遅いことが高い配列保存に対応しているアライメントの各位置に関して、最尤法で標準化した進化速度を算出した。Consurfの結果と同様に、持続的保存スコアは、可視化するために9階級(bin)の個別の尺度に分けられる。その際、階級9が最も保存性の高い位置(えび茶色)を含み、階級1が最も可変性が高い位置(青緑色)を含むように分けられる。

20

30

### 【0358】

#### 実施例14 タンパク質発現、精製、および抗体の作製

PCR反応を用いて、ヒトKitの第4のIg様ドメイン(残基309~413番;Kit D4)をコードするDNAを完全長ヒトKitのcDNAから増幅した。Kit D4の合成を指示する細菌発現ベクター(pET-NusAヒスチジンタグ付き)でBL21(DE3)大腸菌コドンプラス細胞を形質転換し、続いて、16°Cで一晩インキュベーションした。金属キレート化アフィニティーカラム(Ni-NTA;QIAGEN)を用いて、BL21溶解物からKit D4-NusA融合タンパク質を精製し、続いて、陰イオン交換クロマトグラフィー(Source Qカラム; GE Healthcare)を用いてさらに精製した。次いで、NusAおよびヒスチジンタグをD4から切断するために、TEVプロテアーゼと共に4°Cで一晩、Kit D4-NusAをインキュベートした。ゲルろ過クロマトグラフィー(Superdex 200カラム; GE Healthcare)を用いて、Kit D4の追加の精製段階を実施した。

40

### 【0359】

ヒトKitの第5のIg様ドメイン(残基410~519番;Kit D5)を大腸菌株BL21(DE3)細胞において発現させ、6.0 M塩酸グアニジンを含む10mM Tris緩衝液、pH 8.0を用いるリフォールディング段階によって、細菌封入体から精製した。リフォールディングされたKit D5を陰イオン交換クロマトグラフィー(Qセファロースカラム; GE Healthcare)を用いてさらに精製し、続いて、ゲルろ過クロマトグラフィー(Superdex 200カラム; GE Healthcare)を用いた精製および陰イオン交換クロマトグラフィー(Source Qカラム; GE Healthcare)を用い

50

た追加の精製段階を実施した。

#### 【0360】

単離されたD4、D5、もしくはKit外部ドメイン全体(アミノ酸1～519番; Kit EC)、またはヒトKitのC末端領域に由来する断片(残基876～976)を含むGST融合タンパク質に対するウサギポリクローナル抗体を、実施例1で挙げた方法のような当技術分野において周知の技術を用いて作製した。例えば、Kit外部ドメインに対するポリクローナル抗体は、精製したKit外部ドメインでウサギを免疫化し、産生された抗体を標準的な方法で採取することによって作製することができる。Kit活性化に対する抗体の影響を試験する実験、例えば実施例15および図14における実験は、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーを用いた精製に供される抗体調製物を用いて実施した。

10

#### 【0361】

実施例15 KitのD5ドメインに対する抗体を用いた、SCFによって誘導されるKit活性化の阻害

ヒトKitを発現する3T3細胞を、単離されたKit組換えD5に対して作製したウサギポリクローナル抗体の濃度を漸増させたものを含む緩衝溶液と共にインキュベートした(図14)。対照として、SCFに対するウサギポリクローナル抗体またはバキュロウイルス発現系を用いて昆虫細胞中で産生させたKit外部ドメイン全体に対するウサギポリクローナル抗体で細胞を処理した。細胞溶解物を、抗Kit抗体を用いた免疫沈降、続いてSDS-PAGEおよび抗Kit抗体または抗pTyr抗体のいずれかを用いたイムノブロッティングに供した(図14)。

20

#### 【0362】

この実験から、抗D5抗体が、SCFによって誘導されるKitのチロシン自己リン酸化を妨げることが示される。

#### 【0363】

実施例16 単離された組換えKit D4ドメインによる、SCFによって誘導されるKit活性化の阻害

Kitを発現する3T3細胞を、大腸菌において発現させ精製した組換えD4の濃度を漸増させたものと共に23℃で10分間インキュベートし、続いてSCFとインキュベートした。刺激されていない細胞または刺激された細胞の溶解物を、抗Kit抗体を用いた免疫沈降、続いてSDS-PAGEおよび抗Kit抗体または抗pTyr抗体のいずれかを用いたイムノブロッティングに供した(図15)。

30

#### 【0364】

この実験から、単離されたD4が存在すると、SCFによって誘導されるKitのチロシン自己リン酸化が干渉されることが示される。

#### 【0365】

実施例17 SCFによって誘導されるKit刺激の実験

ヒトKitを発現する3T3細胞を、10% 仔ウシ血清を含むDMEM中で増殖させた。SCF刺激前に、Yuzawa et al (2007) Cell, 130: 323で説明されているようにして、細胞を無血清培地中で一晚飢餓状態にした。飢餓状態にした細胞を、10mM HEPES(pH 7.4)および0.1% BSAを含む冷DMEMで3回洗浄し、続いて、図14または図15に示すように、濃度を漸増させた抗体またはKit-D4と共に23℃で10分間、インキュベートした。23℃で10分間、100ng/mL SCFで細胞を刺激し、冷PBSで3回洗浄した。刺激されていない細胞またはSCFで刺激された細胞の溶解物を、抗Kit抗体を用いた免疫沈降、続いてSDS-PAGEおよび抗Kit抗体または抗p-Tyr抗体を用いたイムノブロッティングに供した。

40

#### 【0366】

実施例18 PDGFによって誘導されるPDGF受容体βの活性化およびPDGFRβを介したシグナル伝達は、PDGFRβのD4中の決定的に重要なアミノ酸の点変異によって妨害される

野生型PDGFRβまたはD4中の決定的に重要なアミノ酸の点変異体(Kit外部ドメインX線結晶構造におけるD4-D4境界面との配列類似性に基づく)のいずれかを発現するPDGFR<sup>-/-</sup>マウスに由来するマウス胎仔線維芽細胞(MEF)を用いて、R385またはE390の変異により、PDGFによって誘導される受容体活性化(図16A)またはPDGFによって誘導されるMAPキナーゼ応答

50

およびAkt刺激(図16B)が妨害されることを実証した。さらに、共有結合架橋剤を用いた架橋実験によって、本発明者らは、E390A点変異は、PDGFによって誘導される受容体二量体化に干渉しないことを実証する。しかしながら、活性化状態で細胞表面に存在する共有結合的に架橋した二量体である野生型PDGFR  $\beta$ とは違って、E390A変異体の共有結合的に架橋した二量体は不活性である(図16C)。この実験から、D4中の決定的に重要なE390残基の変異によって、PDGFR活性化に不可欠なD4-D4相互作用が妨害されることが示される。しかしながら、PDGFによって誘導されるPDGFR二量体化は、受容体活性化を妨害するD4の点変異の影響を受けないことから、D4-D4が、PDGFRのチロシンキナーゼドメインの活性化が可能になるように外部ドメインの膜近位領域の位置付けを取り持つ際に重要な役割を果たすことが示される。

10

### 【0367】

したがって、本発明の1つの態様は、PDGFRの残基R385もしくは残基E390に結合するか、またはそれを標的とする部分を含む。これらの部分は、受容体二量体化を維持しつつ、受容体を不活性化するために使用され得る。本実施例はまた、1つのRTKの結晶構造、この場合、Kit外部ドメイン結晶構造に基づく情報を他のRTKに容易に転用できることも示す。ここで、Kit D4ドメインに関する知識は、PDGF受容体の活性化に対して重要であるアミノ酸を同定する上で正確であった。PDGFRを使用するさらに詳細な一連の実験は、実施例22~25で説明する。

### 【0368】

実施例19 Kit外部ドメインの分子表面解析

20

本明細書において説明するSCF結合の前および後のKit外部ドメイン全体の結晶構造を決定することにより、SCFによって誘導される受容体二量体化に続いて、隣接する2つのKit分子の膜近位Ig様ドメインD4およびD5の間で同型側面相互作用が起こることが実証された。D4およびD5の同型相互作用により、隣接する2つの受容体の細胞質チロシンキナーゼドメインが、チロシン自己リン酸化およびキナーゼ活性化を可能にする距離および向きに位置付けられる。また、D4同型相互作用のために決定的に重要な単一のアミノ酸残基が変異すると、SCFによって誘導されるKit活性化およびPDGFによって誘導されるPDGF受容体活性化が損なわれることも本明細書において実証される(実施例22~25を参照されたい)。

### 【0369】

本明細書において説明する構造解析により、RTKの外部ドメイン(例えば、D3領域、D4領域、もしくはD5領域)によって形成される窪みの浅い領域中の立体構造エピトープもしくは非連続エピトープに結合するモノクローナル抗体のような阻害部分、またはKitおよび他のIII型RTKの外部ドメインのD3-D4ヒンジ領域およびD4-D5ヒンジ領域に結合する低分子阻害物質を設計する方法についての新しい洞察が得られる。外部ドメイン中の4つの領域が最初に標的とされた:(A)D3-D4ヒンジ領域に結合し、チロシンキナーゼ活性化を可能にする距離および向きに膜近位領域を位置付けるために必要な動きを妨害する分子くさびとして機能する本発明の部分を作り出すことができる(図17を参照されたい);(B)D4-D5ヒンジ領域に結合し、チロシンキナーゼ活性化を可能にする距離および向きに膜近位領域を位置付けるために必要な動きを妨害する分子くさびとして機能する部分を作り出すことができる(図18を参照されたい);(C)D4:D4境界面に結合して、D4受容体同型相互作用を妨害する部分を作り出すことができる(図19を参照されたい);(D)D2-D3ヒンジ領域の窪んだ表面に結合してリガンド受容体相互作用を不安定にする部分を作り出すことができる(図20を参照されたい);ならびに(E)Kit表面の様々な連続エピトープおよび非連続エピトープを形成するペプチド領域に結合する部分を作り出すことができる(表5)。

30

40

### 【0370】

Kit外部ドメインおよびSCF-Kit複合体(PDBコード:2EC8および2E9W)の分子表面をタンパク質の表面トポグラフィのコンピューターによる図解(Computed Atlas of Surface Topography of proteins)(CASTp)サーバーを用いて解析して、位置に関する情報を提供し、かつ、タンパク質の三次元構造上の窪んだ表面領域の描写および測定を可能にした(Dundas et al., (2006) Nucl Acids Res, 34: W116-W118)。確認された窪みは、Pymol (DeLano

50

． (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA)を用いて可視化し、検査した。

### 【0371】

(A)D3-D4ヒンジ領域中の窪み(図17)

いくつかの窪みが、外部ドメイン単量体構造体のD3-D4境界面に散在している。窪みを画定するのに関与しているアミノ酸を表4に要約する。2つのKit受容体間の同型相互作用が成立すると、D3-D4ヒンジ領域は変化して、次の残基:D3由来のK218、S220、Y221、L222、およびD4由来のF340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、Y373によって作り出される浅い窪みを形成する。図17は、占有されていない単量体(図17A)およびSCFに結合された二量体(図17B)のD3-D4ヒンジ領域のリボンダイアグラムならびにD3-D4ポケットのメッシュ図を示す。

10

### 【0372】

(B)D4-D5ヒンジ領域中の窪み(図18)

小さな窪みが、Kit単量体のD4のABループおよびEFループ、D4-D5を連結するリンカー、ならびにD5のDEループおよびFGループの一部によって形成されている。前述の窪みを画定する残基を表4に要約する。窪みの形状および大きさは、Kit外部ドメイン二量体構造体において変化している。D4のEFループおよびG鎖、D4-D5リンカー、ならびにD5のB鎖およびDEループによって形成される大きな窪みは、D4のEFループ;D4同型境界面の形成のために決定的に重要な領域の下に位置する。未結合のKit構造および占有されたKit構造の両方の電子密度の質が低いことから明らかであるように、窪みの近くに位置しているD5のDEループの方が、高い柔軟性を有し得ることに留意されたい。図18は、占有されていない単量体(図18A)およびSCF二量体(図18B)のリボンダイアグラムならびにD4-D5ヒンジ領域の周辺の浅い窪みのメッシュ図を示す。

20

### 【0373】

(C)D4同型相互作用を媒介する領域の窪み

Kit D4のCDループおよびEFループによって形成される窪んだ表面は、D4同型境界面の真上に位置している。D4由来の残基Y350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390は、外部ドメイン二量体構造体中の窪んだ表面に対して、約 $130\text{\AA}^2$ の表面積を与える。D4同型境界面において重要な役割を果たすGlu386の側鎖は、表面の中心に向かって突き出ている。窪んだ表面の特徴的な特性は、帯電した残基(Glu386およびLys358)によって取り囲まれた小さな疎水性部分である。表面の大きさおよび接近容易性は、D4:D4同型相互作用の際に変化し、CDループの立体構造に変化が起こり、ドメイン先端へと上向きにフォールディングされる。窪んだ表面の形成に関与する残基を表4に要約する。図19Aは、リガンドで占有されたKit D4(図示せず)上に重ねた占有されていないKitのD4ドメイン(金色)のリボンダイアグラムを示し、リガンドで占有された外部ドメイン構造体(緑色)と占有されていない外部ドメイン構造体(赤色)とではCDループおよびEFループの立体構造が異なっている。D4:D4相互作用のために決定的に重要な残基を棒モデルの形態で示す。図19Bおよび19Cは、占有されていないKit構造(図19B)およびSCFで占有されたKit構造(図19C)のリボンダイアグラムならびにD4同型境界面の上の浅い窪みのメッシュ図を示す。

30

### 【0374】

(D)リガンドを結合するD2領域およびD3領域の窪んだ表面

浅く窪んだ表面は、D2ドメインおよびD3ドメインのリガンド結合表面の一部に位置している。小さなポケットに関与する残基は、KitのD2ドメイン由来のY125、G126、H180、R181、K203、V204、R205、P206、およびF208、ならびにKitのD3ドメイン由来のV238、S239、S240、S241、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269である。ポケットは、親水性残基に取り囲まれた小規模な疎水性部分によって作り出される。占有されていないKit構造とSCFに占有されたKit構造とでは、大きな変化はなく、埋もれた表面積を合計すると約 $500\text{\AA}^2$ である。図20Aおよび20Bは、占有されていないKit(A)およびSCFに結合されたKit(B)のリボンダイアグラムならびにD2-D3ポケットのメッシュ図を示す。

40

### 【0375】

50

(表4)

## 遊離のKit

| 番号 | 境界面   | ポケット/窪み | 面積<br>(Å <sup>2</sup> ) |    | 残基                                                      |
|----|-------|---------|-------------------------|----|---------------------------------------------------------|
| 84 | D2-D3 | 1       | 226                     | D2 | Y125, H180, R181, K203,<br>V204, R205, P206             |
|    |       |         |                         | D3 | V238, S239, S240, H263, G265,<br>D266, F267, N268, Y269 |
| 30 |       | 2       | 32                      | D2 | P206, F208                                              |
|    |       |         |                         | D3 | V238, S239                                              |
| 22 |       | 3       | 6                       | D2 | K127, A207, F208                                        |
|    |       |         |                         | D3 | T295                                                    |
| 81 | D3-D4 | 1       | 102                     | D3 | L222,                                                   |
|    |       |         |                         | D4 | A339, F340, K342, E368, S369,<br>N370, I371, Y373       |
| 80 |       | 2       | 99                      | D3 | L222, L223, E306, V308                                  |
|    |       |         |                         | D4 | F312, E338, F340, I371                                  |
| 74 |       | 3       | 57                      | D3 | R224, V308, K310                                        |
|    |       |         |                         | D4 | G311, F340, P341, D398                                  |
| 63 |       | 4       | 49                      | D3 | K218, A219, S220                                        |
|    |       |         |                         | D4 | N367, E368, S369                                        |
| 59 |       | 5       | 45                      | D3 | K218, A220                                              |
|    |       |         |                         | D4 | E368, S369                                              |
| 65 | D4-D5 | 1       | 41                      | D4 | G384, T385,                                             |
|    |       |         |                         | D5 | T411, K412, E414, K471                                  |
| 61 |       | 2       | 20                      | D4 | Y408,                                                   |
|    |       |         |                         | D5 | F433, G470, K471, L472                                  |
| 53 |       | 3       | 14                      | D4 | F324, V325, N326, N410                                  |
|    |       |         |                         | D5 |                                                         |
| 24 |       | 4       | 23                      | D4 | D327, N410                                              |
|    |       |         |                         | D5 | T411, K412, V497                                        |
| 18 |       | 5       | 17                      | D4 | G384, G387, V409                                        |
|    |       |         |                         | D5 | K471                                                    |
| 14 |       | 6       | 25                      | D4 | L382, G387, V407, V409                                  |
|    |       |         |                         | D5 |                                                         |

## SCF-Kit複合体 モルA,C (表4の続き)

| 番号 | 境界面   | ポケット/窪み | 面積<br>(Å <sup>2</sup> ) |    | 残基                                                            |
|----|-------|---------|-------------------------|----|---------------------------------------------------------------|
| 60 | D2-D3 | 1       | 280                     | D2 | Y125, G126, H180, R181, K203,<br>V204, R205, P206, F208       |
|    |       |         |                         | D3 | V238, S239, S240, S241, H263, G265,<br>D266, F267, N268, Y269 |
| 47 |       | 2       | 49                      | D2 | P206, F208                                                    |
|    |       |         |                         | D3 | V238, S239                                                    |
| 59 | D3-D4 | 1       | 175                     | D3 | K218, S220, Y221, L222                                        |
|    |       |         |                         | D4 | F340, P341, K342, N367, E368, S369,<br>N370, I371, Y373       |
| 57 | D4-D5 | 1       | 126                     | D4 | G384, G387, G388, Y408, V409                                  |
|    |       |         |                         | D5 | T411, F433, F469, G470, K471                                  |
| 56 |       | 2       | 95                      | D4 | D327,                                                         |
|    |       |         |                         | D5 | T411, K412, E414, A431, G432, K471                            |
| 55 | D4-D4 | 1       | 93                      | D4 | Y350, F355, K358, L379, T380, R381,<br>L382, E386, T390       |
| 7  |       | 2       | 26                      | D4 | Y350, R353, F355                                              |

## 【0376】

(E)

前述したようにして、KITチロシンキナーゼの構造解析を行った。この解析から、本発明の部分の標的となり得る連続エピトープおよび不連続エピトープの両方が明らかになった。表5において、エピトープ1、4、5、6、8、12～16、19、22～23、および31～39は、連続エピトープである。これらのエピトープは、KITタンパク質中の連続したアミノ酸から構成される。表5のエピトープ2、3、7、9～11、17、18、20、21、24～30、および40～43は、KITタンパク質のフォールディングによって近付けられる、KITタンパク質の少なくとも2つのペプチドから構成される不連続な立体構造エピトープである。

## 【0377】

(表5)

| #  | アミノ酸               | 配列                                  | ドメイン          | 鎖/<br>ループ        | アミノ酸               | 配列                       | ドメイン | 鎖/<br>ループ |
|----|--------------------|-------------------------------------|---------------|------------------|--------------------|--------------------------|------|-----------|
| 1  | Glu306 -<br>Ile313 | EVVDKGFIN<br>(SEQ ID NO: 2)         | D3-D4<br>リンカー |                  |                    |                          |      |           |
| 2  | Ala219 -<br>Leu222 | ASYL (SEQ<br>ID NO: 3)              | D3            | A                | Thr304 -<br>Val308 | TLEV (SEQ<br>ID NO: 4)   | D3   | G         |
| 3  | Asp309 -<br>Gly311 | DKG                                 | D3-D4<br>リンカー |                  | Arg224 -<br>Gly226 | REG                      | D3   | ABループ     |
| 4  | Val213 -<br>Leu222 | VVSYSKASY<br>LL (SEQ ID<br>NO: 7)   | D3            | A                |                    |                          |      |           |
| 5  | Val301 -<br>Asp309 | VTTTLEV<br>D (SEQ ID<br>NO: 8)      | D3            | G                |                    |                          |      |           |
| 6  | Arg224 -<br>Ile235 | REGEEFTV<br>TCTI (SEQ<br>ID NO: 9)  | D3            | AB<br>ループ<br>, B |                    |                          |      |           |
| 7  | Thr303 -<br>Glu306 | TTLE (SEQ<br>ID NO: 10)             | D3            | G                | Ala219 -<br>Leu222 | ASYL (SEQ<br>ID NO: 3)   | D3   | A         |
| 8  | Lys364 -<br>Arg372 | KSESNIR<br>(SEQ ID NO:<br>12)       | D4            | D, DE<br>ループ     |                    |                          |      | ループ       |
| 9  | Asn367 -<br>Asn370 | NESN (SEQ<br>ID NO: 13)             | D4            | DE<br>ループ        | Ser217 -<br>Tyr221 | SKASY (SEQ<br>ID NO: 14) | D3   | A         |
| 10 | Ala339 -<br>Pro343 | AFPKP (SEQ<br>ID NO: 16)            | D4            | BC<br>ループ        | Asn396 -<br>Val399 | NSDV (SEQ<br>ID NO: 17)  | D4   | F         |
| 11 | Ala339 -<br>Pro343 | AFPKP (SEQ<br>ID NO: 16)            | D4            | BC<br>ループ        | Glu368 -<br>Arg372 | ESNIR (SEQ<br>ID NO: 19) | D4   | DEループ     |
| 12 | Asp357 -<br>Glu366 | DKWEDY<br>SE (SEQ ID<br>NO: 21)     | D4            | D                |                    |                          |      |           |
| 13 | Ile371 -<br>Leu379 | IRYVSELHL<br>(SEQ ID NO:<br>22)     | D4            | E                |                    |                          |      |           |
| 14 | Leu379 -<br>Thr389 | LTRLKGTE<br>GGT (SEQ<br>ID NO: 23)  | D4            | EF<br>ループ        |                    |                          |      |           |
| 15 | Gly328 -<br>Glu338 | GENVDLIVE<br>YE (SEQ ID<br>NO: 24)  | D4            | B                |                    |                          |      |           |
| 16 | Met351 -<br>Glu360 | MNRTFTDK<br>WE (SEQ ID<br>NO: 25)   | D4            | CD<br>ループ        |                    |                          |      |           |
| 17 | Lys358 -<br>Tyr362 | KWEDY<br>(SEQ ID NO:<br>26)         | D4            | D                | Val374 -<br>His378 | VSELH (SEQ<br>ID NO: 27) | D4   | E         |
| 18 | Asp357 -<br>Glu360 | DKWE (SEQ<br>ID NO: 29)             | D4            | CD<br>loop       | Leu377 -<br>Thr380 | LHLT (SEQ<br>ID NO: 30)  | D4   | E         |
| 19 | His378 -<br>Thr389 | HLTRLKGT<br>EGGT (SEQ<br>ID NO: 32) | D4            | E, EF<br>ループ     |                    |                          |      |           |

10

20

30

40

|    |                    |                                     |                 |              |                    |                                     |    |              |
|----|--------------------|-------------------------------------|-----------------|--------------|--------------------|-------------------------------------|----|--------------|
| 20 | Met351 -<br>Glu360 | MNRTFTDK<br>WE (SEQ ID<br>NO: 25)   | D4              | CD<br>ループ    | His378 -<br>Thr389 | HLTRLKGT<br>EGGT (SEQ<br>ID NO: 32) | D4 | E, EF<br>ループ |
| 21 | His378 -<br>Thr389 | HLTRLKGT<br>EGGT (SEQ<br>ID NO: 32) | D4              | E, EF<br>ループ | Val323 -<br>Asp332 |                                     | D4 | A, AB<br>ループ |
| 22 | Val323 -<br>Asp332 | VFVNDGEN<br>VD (SEQ ID<br>NO: 34)   | D4              | A, AB<br>ループ |                    |                                     |    |              |
| 23 | Val409 -<br>Ile415 | VNTKPEI<br>(SEQ ID NO:<br>35)       | D4 - D5<br>リンカー |              |                    |                                     |    |              |
| 24 | Val409 -<br>Ile415 | VNTKPEI<br>(SEQ ID NO:<br>35)       | D4 - D5<br>リンカー |              | Ala493 -<br>Thr500 | AYNDVGKT<br>(SEQ ID NO:<br>36)      | D5 | FGループ        |
| 25 | Val409 -<br>Ile415 | VNTKPEI<br>(SEQ ID NO:<br>35)       | D4 - D5<br>リンカー |              | Ala431 -<br>Thr437 | AGFPEPT<br>(SEQ ID NO:<br>38)       | D5 | B            |
| 26 | Val409 -<br>Ile415 | VNTKPEI<br>(SEQ ID NO:<br>35)       | D4 - D5<br>リンカー |              | Phe469 -<br>Val473 | FGKLV (SEQ<br>ID NO: 40)            | D5 | DE ループ       |
| 27 | Val409 -<br>Ile415 | VNTKPEI<br>(SEQ ID NO:<br>35)       | D4 - D5<br>リンカー |              | Val325 -<br>Asn330 | VNDGEN<br>(SEQ ID NO:<br>42)        | D4 | A            |
| 28 | Val409 -<br>Ile415 | VNTKPEI<br>(SEQ ID NO:<br>35)       | D4 - D5<br>リンカー |              | Arg381 -<br>Gly387 | RLKGTEG<br>(SEQ ID NO:<br>44)       | D4 | EFループ        |
| 29 | Gly466 -<br>Leu472 | GPPFGKL<br>(SEQ ID NO:<br>46)       | D4              | DE<br>ループ    | Gly384 -<br>Gly388 | GTEGG (SEQ<br>ID NO: 47)            | D4 | EFループ        |
| 30 | Val325 -<br>Glu329 | VNDGE<br>(SEQ ID NO:<br>49)         | D4              | A            | Tyr494 -<br>Lys499 | YNDVGK<br>(SEQ ID NO:<br>50)        | D5 | FGループ        |
| 31 | Thr411 -<br>Leu421 | TKPEILTYD<br>RL (SEQ ID<br>NO: 52)  | D5              | A            |                    |                                     |    |              |
| 32 | Asp419 -<br>Cys428 | DRLVNGML<br>QC (SEQ ID<br>NO: 53)   | D5              | AB<br>ループ    |                    |                                     |    |              |
| 33 | Gly498 -<br>Lys509 | GKTSAYFN<br>FAFK (SEQ<br>ID NO: 54) | D5              | G            |                    |                                     |    |              |
| 34 | Cys443 -<br>Ser453 | CPGTEQRCS<br>AS (SEQ ID<br>NO: 55)  | D5              | C            |                    |                                     |    |              |
| 35 | Cys450 -<br>Gln460 | CSASVLPVD<br>VQ (SEQ ID<br>NO: 56)  | D5              | C            |                    |                                     |    |              |
| 36 | Asp479 -<br>Thr488 | DSSAFKHN<br>GT (SEQ ID<br>NO: 57)   | D5              | EF<br>ループ    |                    |                                     |    |              |
| 37 | Gly487 -<br>Tyr496 | GTVECKAY<br>ND (SEQ ID<br>NO: 58)   | D5              | F            |                    |                                     |    |              |
| 38 | Leu462 -<br>Leu472 | LNSSGPPFG<br>KL (SEQ ID<br>NO: 59)  | D5              | DE<br>ループ    |                    |                                     |    |              |
| 39 | Phe506 -<br>Ile515 | FAFKGNK<br>EQI (SEQ ID<br>NO: 60)   | D5              | C<br>テール     |                    |                                     |    |              |
| 40 | Thr411 -<br>leu416 | TKPEIL<br>(SEQ ID NO:<br>61)        | D5              | A            | Val497 -<br>Ala502 | VGKTS<br>(SEQ ID NO:<br>62)         | D5 | FGループ        |
| 41 | Ile415 -<br>Leu421 | ILTYDRL<br>(SEQ ID NO:<br>64)       | D5              | A            | Ala502 -<br>Ala507 | AYFNFA<br>(SEQ ID NO:<br>65)        | D5 | G            |
| 42 | Ala502 -<br>Ala507 | AYFNFA<br>(SEQ ID NO:<br>65)        | D5              | G            | Lys484 -<br>Thr488 | KHNGT (SEQ<br>ID NO: 67)            | D5 | EFループ        |
| 43 | Ala502 -<br>Ala507 | AYFNFA<br>(SEQ ID NO:<br>65)        | D5              | G            | Gly445 -<br>Cys450 | GTEQRC<br>(SEQ ID NO:<br>69)        | D5 | C            |

10

20

30

40

50

## 【0378】

## 実施例20 RTK活性アッセイ法

関心対象のRTKを含む細胞を、受容体に対する活性化リガンドおよび本発明の部分に曝露させる。関心対象のRTKは、標準的な分子生物学方法(例えば抗体精製)によって単離す

ることができる。精製後、RTKに結合する抗体(本発明の部分ではなく、精製に使用される場合は単に構造的な結合物)を96ウェルのマイクロタイタープレートに予めコーティングする。次いで、RTKおよび調整された標準物質を、RTKタンパク質を捕捉する場である別々のウェルに添加する。次に、リン酸部位に特異的であり得る検出抗体を添加する(例えば、c-Kit pY823または活性化の際にリン酸化されるKitの他の残基;ホスホELISA(商標)系ではウサギ抗体を使用する)。抗体-Kit複合体は、標識、または比色基質を用いて追跡される酵素(例えば、ホスホELISA(商標)系では西洋ワサビペルオキシダーゼが使用される)に結合された二次抗体(例えば、ウサギに由来する一次抗体を検出するための抗ウサギAb)を用いて検出する。次いで、停止液を添加し、(例えば、450nm光源および検出器を用いて)プレートを読み取る。ホスホELISA(商標)の詳細なプロトコールは、Invitrogenから入手可能である(invitrogen.com/content.cfm?pageid=11655; invitrogen.com/downloads/F1027\_BN\_pELISA1006.pdf; invitrogen.com/downloads/F1028\_BN\_pELISA1006.pdf C-KIT [pY823] ELISA KIT, HU (BioSource(商標)) カタログ番号 KH00401; c-KIT [TOTAL] ELISA KIT, HU (BioSource(商標)) カタログ番号KH00391)。

10

### 【0379】

#### 実施例21 受容体内在化アッセイ法

関心対象のRTKを発現する細胞を、適切なリガンドと共に最初にインキュベートして(例えば、Kit発現細胞をSCFとインキュベートする)、受容体内在化を誘導する。細胞を冷PBS中で洗浄することによって、受容体内在化のプロセスを停止する。次いで、リガンドを分離させるのに十分な塩濃度および/またはpHレベルを有する溶液中で細胞を洗浄することによって、残存する表面に結合したリガンドを除去する。次いで、適切な緩衝液に細胞を再懸濁する。この時点で、これらの細胞は、内在化された受容体を含み、したがって、細胞表面に残存する受容体の量は減少している。

20

### 【0380】

細胞を適切なリガンドおよび本発明の試験部分に曝露する、もう一組の類似する実験を実行する。試験部分によって標的RTKの活性化が妨害される場合、受容体内在化が阻害されることが考えられる。上記の実験で説明した(受容体活性化が起こった)細胞と比較すると、これらの細胞の方が、内在化が少なく、細胞表面の受容体の数が多い。また、薬物を可溶化するための一般的媒体である緩衝液またはエタノール溶液のみで細胞を処理する対照群も準備する。

30

### 【0381】

上記の実験における細胞表面受容体の量の決定は、この受容体に特異的なマウス抗体と共に細胞をインキュベートし、続いて、緑色蛍光タンパク質(GFP)のような蛍光体に結合させた抗マウス抗体と共にインキュベーションすることにより、遂行することができる。次いで、蛍光顕微鏡技術を用いて、細胞表面受容体の量を可視化し定量することができる。

### 【0382】

細胞表面受容体を定量または可視化するための代替技術は当技術分野において周知であり、様々な蛍光性技術および放射性技術が含まれる。例えば、1つの方法は、放射性標識した抗受容体抗体と共に細胞をインキュベートする段階を含む。あるいは、受容体の天然リガンドを蛍光性分子または放射性標識に結合させ、細胞と共にインキュベートしてもよい。その他の受容体内在化アッセイ法は当技術分野において周知であり、例えば、それぞれの内容全体が参照により本明細書に組み入れられるJimenez et al. (1999) Biochemical Pharmacology. 57(10):1125-1131; Bernhagen et al. (2007) Nature Medicine. 13(5):587-596;およびConway et al. (2001) J. Cell Physiol. 189(3):341-55に記載されている。

40

### 【0383】

#### 実施例22~25への導入

受容体型チロシンキナーゼ(RTK)活性化の一般に認められているメカニズムは、リガンドによって誘導された受容体二量体化により、触媒コアの活性化ループ中の決定的に重要

50

な調節性チロシン残基のトランス自己リン酸化;チロシンキナーゼ活性化に不可欠な段階、が促進されるというものである。これに続いて、動員および/またはチロシンリン酸化されると、調節された様式で様々な細胞内区画にシグナルを伝達する様々なシグナル伝達タンパク質のSH2(Src homology 2)ドメインまたはPTB(phosphotyrosine binding)ドメインに対する結合部位として役立つ、細胞質内ドメイン中の複数のチロシン残基が自己リン酸化される(Schlessinger, J. (2000) Cell 103, 211-225; Pawson, T.およびNash, P. (2003) Science 300, 445-452;ならびにHunter, T. (2000) Cell 100, 113-127)。

#### 【0384】

RTKはすべて、二量体化によって活性化されるが、異なるRTKファミリーは、リガンドによって誘導される受容体二量体化および活性化のために異なる分子戦略を利用するように進化した(Burgess, A. W., et al. (2003) Mol Cell 12, 541-552; Schlessinger, J., et al. (2000) Molecular Cell 6, 743-750)。PDGF、SCF、CSF、およびFlt3Lを含むIII型RTKのリガンドはすべて、隣接する2つの受容体分子の等価な部位への二価結合によって同族受容体を架橋できる二量体分子である。PDGFプロトマーは、分子の一方の端に特徴的なシステインノットを有する、中央の四本鎖 $\beta$ シートから構成される。2つのPDGFプロトマーは、逆平行に並び、2つの鎖間ジスルフィド架橋によって互いに連結されている(Oefner, C., et al. (1992) EMBO J. 11, 3921-3926.)。一方、SCFプロトマー、CSFプロトマー、またはFlt3Lプロトマーはそれぞれ、短いらせん状フォールドから構成され、非共有結合的相互作用によって互いに連結されている(Jiang, X., et al. (2000) Embo J 19, 3192-3203; Zhang, Z., et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 7732-7737; Pandit, J., et al. (1992) Science 258, 1358-62;およびSavvides, S. N., et al. (2000) Nat Struct Mol Biol 7, 486-491)。多様なフォールドにもかかわらず、2つの増殖因子サブタイプは、実質的に同一の様式で同族RTKに結合し活性化して、活性化されたりリガンド/RTK 2:2複合体の形成をもたらす(Savvides, S. N., et al. (2000) Nat Struct Mol Biol 7, 486-491)。III型RTKはすべて、5個の直列のIg様ドメインを含む細胞外のリガンド結合領域とそれに続く単一の膜貫通ヘリックスおよび細胞質チロシンキナーゼドメインから構成され、この細胞質チロシンキナーゼドメインは、自己リン酸化および異種プロテインキナーゼによるリン酸化に供される調節領域が隣接した大きなキナーゼ挿入領域を有する(Hubbard, S. R. (1999) Prog Biophys Mol Biol 71, 343-358)。

#### 【0385】

PDGF受容体 $\beta$  (PDGFR $\beta$ ) 活性化のメカニズムは、関連する受容体型チロシンキナーゼKitの細胞外領域の結晶構造に基づいて設計される変異受容体の特性を解析することによって調査した。これらの実験に基づき、D4(細胞外領域の第4のIg様ドメイン)のArg385またはGlu390が変異したPDGFR $\beta$ では、PDGFによって誘導される活性化が損なわれて、PDGFによって誘導される様々な細胞応答に障害が生じることを実証した。また、これらの実験から、Arg385とGlu390の間の塩橋によって媒介される可能性が高いD4同型相互作用が、PDGFR $\beta$ およびすべてのIII型RTKの活性化において重要な役割を果たすことも実証される。また、化学架橋剤を用いて、PDGFに刺激された細胞を共有結合的に架橋して、PDGFR $\beta$ のGlu390Ala変異体が、PDGFによって誘導される典型的な受容体二量体化を経験することも実証した。しかしながら、リガンドで刺激された細胞の表面で発現される活性状態の野生型PDGFRとは違って、PDGFによって誘導されるGlu390Ala二量体は不活性である。D4同型相互作用を媒介するのに必要とされる保存されたアミノ酸は、PDGFR $\beta$ 活性化(およびIII型RTKにおける同様の相互作用)にとっては非常に重要であるが、これらの相互作用は、PDGFR $\beta$ 二量体化には必須ではない。さらに、PDGFR $\beta$ 二量体化はチロシンキナーゼ活性化のために必要であるが、十分ではない。

#### 【0386】

KitのD4ドメインと同様に、PDGFR $\alpha$ およびPDGFR $\beta$ のD4ドメインは、Ig様ドメイン中のB5およびF5に位置するシステイン残基を架橋する特徴的なジスルフィド結合を欠く。図21に示すアミノ酸配列アラインメントから、IセットIgSFフォールドの20個のフィンガープリント残基のうち13個がPDGFRのD4ドメインで保存されていること、ならびにフィンガー

プリント残基に対応する鎖の数および長さが、Kit、PDGFR  $\alpha$ 、PDGFR  $\beta$ 、およびCSF1RのD4ドメインで高度に保存されていることが示される。このことから、すべてのIII型RTKを含む様々な受容体分子を阻害するように本発明の阻害物質を設計できることが示唆される。

#### 【0387】

KitのD4ドメインは、配置がABED/A'GFCである4つの鎖をそれぞれ含む2つの $\beta$ シートから構成され、D4の同型接触は、隣接する2つのKit分子から突き出ているD4のEFループによって媒介される。本明細書において開示するKit構造から、EFループ中のArg381およびGlu386が、Kit二量体の二回軸を横切って塩橋およびファンデルワールス接触を形成することが示される。さらに、各プロトマーのArg381の側鎖は、隣接するKit分子の対応する残基の主鎖カルボニルと水素結合を形成する。構造ベースの配列アラインメントにより、EFループのサイズ、およびD4-D4境界面を含む決定的に重要なアミノ酸が、Kit、PDGFR  $\alpha$ 、PDGFR  $\beta$ 、およびCSF1Rで保存されていることが示された。PDGFR  $\alpha$ では、Glu386がアスパラギン酸、同様に塩橋相手として機能し得る残基に置換されている。さらに、塩基性残基と酸性残基(Glu/Asp)のペアは、トラフグ(Takifugu rubripes)からヒト(Homo sapiens)に及ぶ様々な種のPDGFR  $\alpha$ およびPDGFR  $\beta$ で厳密に保存されている(図21)ことから、この領域の機能的な重要性がさらに裏付けられる。したがって、様々なアミノ酸配列を有するRTK、例えばIII型RTK、または本明細書において説明するものに機能が類似した変種ドメインを標的とする本発明の部分もまた、本発明の範囲内である。

#### 【0388】

実施例22~25に関する方法

配列アラインメントおよびホモロジーモデリング

CONSEQサーバー(Berezin, C., et al. (2004) Bioinformatics 20, 1322-1324)を用いて、かつ、IgSFフォールドの特徴(Harpaz, Y.およびChothia, C. (1994) Journal of Molecular Biology 238, 528-539)ならびにヒトKit構造のD4のIgフォールドのコア残基(Yuza wa, S., et al. (2007) Cell 130, 323-334)に照らして、アミノ酸配列アラインメントを実施した。各配列のアクセションコードは、PDGFR  $\alpha$  ヒト(P16234)、マウス(P26618)、ニワトリ(Q9PUF6)、カエル(P26619)、およびフグ(Q8AXC7); PDGFR  $\beta$  ヒト(P09619)、イヌ(Q6QNF3)、マウス(P05622)、フグ(P79749)、およびKitヒト(Q96RW7)である。WHAT IF サーバーを用い(Rodriguez, R., et al. (1998) Bioinformatics 14, 523-528)、D4 Kit構造(PDBコード:2E9W)に基づいて、PDGFR  $\beta$  のD4の相同性モデルを作製した。PyMOL (Delano, W .L.; pymol.org)を用いて図を作成した。

#### 【0389】

反応物および抗体

L-ヒスチジノールおよび抗flag抗体は、Sigmaから購入した。MAPK、ホスホ-MAPK、Akt、ホスホ-Akt、およびホスホリパーゼC $\gamma$ に対する抗体は、Cell Signaling Technologyから購入した。抗ホスホチロシン(4G10)抗体は、Upstate Technologyから入手した。抗ユビキチン抗体(P4D1)は、Santa Cruzeから入手した。PDGFR  $\beta$  に対する抗体は、PDGFR  $\beta$  の細胞質内ドメインに由来する合成ペプチドでウサギを免疫化することによって作製した。PDGF BB cDNAは、Stuart Aaronsonから得た。PDGF BBはInvitrogenから購入し、以前に説明されているようにして細菌において作製した(Hoppe, J., et al. (1990) European Journal of Biochemistry 187, 207-214)。 $^{125}$ I放射性核種はPerkin Elmerから購入した。ボルトンハンター試薬およびIODO-GENで予めコーティングしたヨウ素化チューブはPieceから入手した。FITC-ファロイジンはInvitrogenから購入した。

#### 【0390】

細胞株およびレトロウイルス感染

PDGFR  $\alpha$  およびPDGFR  $\beta$  (PDGFR  $\alpha$  /  $\beta$ ) の両方を欠損したマウス胎仔に由来する線維芽細胞は、Philip SarianoおよびAndrius Kazlauskasによって提供された。PDGFR  $\beta$  cDNAは、Daniel DeMaioによって提供された。PDGFR  $\beta$  cDNAをpLXSHDレトロウイルスベクター中にサブクローニングし、flagタグを受容体のC末端に付加した。D4の変異体はすべて、製造業者の取扱い説明書(Stratagen)に従い、部位特異的変異誘発によって作製した。野生型PDG

FR $\beta$ および変異PDGFR $\beta$ をコードするレトロウイルスを293GPG細胞において作製した(Ory, D. S., et al. (1996) Proc. Nat. Acad. Sci. 93, 11400-11406)。感染後、L-ヒスチジノールを用いて細胞を選択し、選択した細胞のプールを実験で使用した。

### 【0391】

#### 免疫沈降およびイムノブロッティング

刺激されていない細胞またはPDGFで刺激された細胞を、50mM Hepes、150mM NaCl、1mM EDTA、1% Triton X-100、25mMフッ化ナトリウム、1mMオルトバナジン酸、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、5 $\mu$ gのアプロチニンおよびロイペプチンを含む緩衝液(pH7.5)に溶解した。等量の細胞溶解物を指定の抗体で免疫沈降し、免疫沈殿物をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に移した。膜を様々な抗体で免疫プロットした。デンストメーター(Amersham)を用いてフィルムをスキャンし、Imagequantソフトウェア(Molecular dynamics)を用いて定量した。 10

### 【0392】

#### PDGFRのインビトロリン酸化アッセイ法

細胞を16時間血清飢餓状態にし、150mM NaCl、50mM Hepes(pH7.4)、1mM EDTA、25mM NaF、0.1mMオルトバナジン酸ナトリウム、5 $\mu$ g/mlのロイペプチンおよびアプロチニン、1mM PMSF、ならびに1% NP40を含む溶解緩衝液中で可溶化(solubilized)した。溶解物を抗PDGFR $\beta$ 抗体で免疫沈降し、50mM Hepes(pH7.4)、1mM ATP、および10mM MgCl<sub>2</sub>を含む反応緩衝液中で、室温で5分間、免疫沈殿物をインキュベートした。インキュベーション後、SDS-PAGEとそれに続く抗ホスホチロシン抗体を用いたイムノブロッティングによって沈殿物を解析した。膜から抗体を除去し(stripped off)、PDGFR $\beta$ の合計レベルを決定するために抗Flagタグ抗体で再プロットした。 20

### 【0393】

#### 受容体二量体の化学的架橋

コンフルエンスが80%に達するまで150mmプレート中で細胞を増殖させ、16時間血清飢餓状態にした後、50mM Hepes(pH7)を含むDMEMに溶解した指定濃度のPDGFと共に4°Cでインキュベーションした。90分後、細胞をPBS(pH 7.4)で徹底的に洗浄した。プレートを室温に移し、スベリン酸ジスクシンイミジル(DSS)を最終濃度が0.5mMになるまで添加した。10mM Tris緩衝液と共に15分間インキュベーションし、続いてPBSで徹底的に洗浄することによって、30分後に架橋反応を停止した。50mM Hepes、150mM NaCl、1mM EDTA、1% Triton X-100、25mMフッ化ナトリウム、1mMオルトバナジン酸ナトリウム、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、5 $\mu$ g/mlアプロチニン、および5 $\mu$ g/mlロイペプチン(pH7.4)に溶解した細胞溶解物を抗PDGFR抗体で免疫沈降し、SDS-PAGEによって分離した。flagタグに対する抗体または抗ホスホチロシン(4G10)抗体を用いてニトロセルロース膜をイムノプロットして、受容体の合計レベルおよびリン酸化受容体の合計レベルをそれぞれ検出した。 30

### 【0394】

#### PDGFによって誘導されるアクチン細胞骨格再構築

MEFをカバーガラス上でサブコンフルエンスになるまで24時間培養し、続いて一晩、血清飢餓状態にした。2分、5分、10分、もしくは30分間、50ng/ml PDGFで細胞を処理するか、または未処理のままとした。PBSに溶解した4%パラホルムアルデヒド中で細胞を固定し、PBS中0.1% Tritonで透過処理し、1% BSAを含むPBSに溶解したFITC-ファロイジン(Sigma)で30分間染色した。Prolong Antifade封入剤(Invitrogen)と共にカバーガラスを載せ、Nikon蛍光顕微鏡を用いて画像を取得した。各カバーガラス上の細胞約400個を解析し、アクチンリング形成を示している細胞の比率を算出し、直線的に示した。 40

### 【0395】

#### PDGF結合および内在化の実験

製造業者の取扱説明書に従って、ボルトンハンター(Bolton-Hunter)試薬(Pierce)を用いてPDGFを標識した後、Iodo-gen Iodinationチューブ(Pierce)を用いてヨウ素化した。24ウェルプレートに細胞を播種し、10%ウシ胎仔血清を添加したDMEM中で80%コンフルエンスになるまで増殖させた。20mM Hepes(pH7.4)および0.1% BSAを含む冷DMEM中で細 50

胞を2回洗浄した。量を漸増させた天然PDGFの存在下で、5ng/mlの $^{125}\text{I}$ -PDGFと共に三つ組のウェルをインキュベートした。25°Cで1時間、結合を進行させた。次いで、冷PBS中で細胞を洗浄し、0.5M NaOH中に可溶化した。LS6500シンチレーションカウンタ(Beckman Coulter)を用いて、試料の放射含有量を測定し、PRISMソフトウェア(GraphPad)によってデータを解析した。

#### 【0396】

内在化実験のために、24ウェルプレートに細胞を播種し、80%コンフルエンスになるまで増殖させ、一晩飢餓状態にした。DMEM/0.1%BSA/50mM Hepes(pH7.4)に溶解した5ng/ml  $^{125}\text{I}$ -PDGFと共に4°Cで90分間、細胞をインキュベートした。氷冷PBS(pH 7.4)で洗浄して、未結合リガンドを除去した。予め温めたDMEM/0.1% BSA/50mM Hepesを細胞に添加し、指定の時間、37°Cでインキュベートした。PBS(pH3)および0.1%BSAを含む氷冷した酸性緩衝液を用いて、10分間、細胞表面に結合したリガンドを採取した。内在化されたリガンドは、0.5M NaOHで可溶化することによって採取した。10%トリクロロ酢酸(TCA)を用いてインキュベーション媒体を沈殿させ、TCA可溶性画分に関しては上清を計数することによって、分解した $^{125}\text{I}$ -PDGFの量を測定した。液体シンチレーションカウンタを用いて、細胞表面に結合され内在化された放射能および遊離放射能を測定した。表面に結合された細胞内PDGFおよび分解されたPDGFの量を、氷上で90分間インキュベーションした後(t=0分)の細胞に結合された放射能総量に対するパーセントとして表した。各時点の測定を3回実施し、結果を平均値±SEとして表した。

#### 【0397】

実施例22 PDGFによって誘導されるPDGF受容体活性化は、D4ドメインの変異によって損なわれる

図21Aに示すアミノ酸配列アライメントから、PDGFRのEFループ中のArg385およびGlu390が、隣接するKit受容体の間のD4同型相互作用を媒介するのを担っているKitのArg381とGlu386の間で形成される塩橋に類似したD4同型相互作用を媒介し得ることが実証される。同様のメカニズムがPDGFR  $\beta$  によって使用されるかどうかを調査するために、Arg385およびGlu390、それぞれの単独(R385A、E390A)、または組み合わせ(R385E390/AA)をアラニン残基で置換した。また、ループ領域中のその他の保存されたLys387残基も、PDGFによって誘導されるPDGFR  $\beta$  活性化を制御する際の潜在的な役割を検査するために、アラニン残基で置換した(R385K387E390/AAA)。野生型PDGFR  $\beta$  および変異PDGFR  $\beta$  を、PDGFR  $\alpha$  およびPDGFR  $\beta$  両方を欠損したマウス胎仔由来線維芽細胞(MEF)において安定に発現させた(Soriano, P. (1994) Genes Dev. 8, 1888-1896; Soriano, P. (1997) Development 124, 2691-2700; およびAndrews, A., et al. (1999) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40, 2683-2689)。発現レベルを一致させた野生型PDGFR  $\beta$  または変異PDGFR  $\beta$  を発現するMEFを後述の実験で使用した。刺激されていない細胞またはPDGFで刺激された細胞に由来する細胞溶解物を、抗PDGFR抗体を用いた免疫沈降、続いて、抗ホスホチロシン抗体を用いたイムノブロッティングに供した。

#### 【0398】

続いて、膜から抗体を除去し、PDGFR発現を定量するために抗PDGFR抗体で再プロットした。図22Aに示す実験から、PDGFによって誘導されるPDGFR  $\beta$  のチロシン自己リン酸化が、PDGFR  $\beta$  のE390A変異体、R385A変異体、(R385E390/AA)変異体、および(R385K387E390/AAA)変異体を発現する細胞において大きく損なわれていること;チロシン自己リン酸化の規模および動態の両方がそれぞれ減少および減弱していたことが示される。これらの実験から、D4のEFループ中のArg385およびGlu390が、PDGFによって誘導されるPDGFR  $\beta$  刺激において重要な役割を果たすことが実証され、このことから、Kit構造において確認されるものと同様の1組の塩橋が、活性化されたPDGFRおよび他のIII型RTK中に存在することが実証される。リガンド-受容体複合体内部の隣接する受容体のD4ドメイン間の直接的相互作用は、リガンドによって誘導されるIII型RTK活性化のために利用される共通のメカニズムに相当し得る。PDGFによって誘導される受容体自己リン酸化は、R385A変異体、(R385E390/AA)変異体、または(R385K387E390/AAA)変異体を発現する細胞と比較すると、E390Aを発現す

る細胞の方が大きく損なわれていることが、一貫して、かつ再現可能に観察されている。これらの変異体での違いの原因となる正確なメカニズムは明らかではないが、D4境界面の陽性の局所的表面電荷が、静電的反発を引き起こして、リガンド刺激の前に隣接する受容体のD4を離れた状態で維持し得ることが可能である。アラニン残基によるArg385の置換により、塩橋形成が妨害されると考えられるが、また、この変化により、D4-D4境界面の正味の正電荷が減少して、PDGFR活性化の障害が弱まることもある。

#### 【0399】

PDGFRのD4ドメインの変異が、変異PDGFR  $\beta$  の細胞膜発現およびリガンド結合親和性に影響を及ぼし得た可能性を検討するために、野生型PDGFR  $\beta$  または変異PDGFR  $\beta$  を発現する細胞に対する定量的PDGF結合実験を次に実施した。野生型PDGFR  $\beta$ 、R385A PDGFR  $\beta$  変異体、E390A PDGFR  $\beta$  変異体または(R385E390/AA)PDGFR  $\beta$  変異体を発現する細胞を、濃度を漸増させた天然PDGFの存在下、4℃で90分間、 $^{125}\text{I}$ -PDGFを含む緩衝液と共にインキュベートした。シンチレーションカウンターを用いて、細胞に結合した放射能を測定した。Prism4を用いたカーブフィッティングによって、野生型PDGFR  $\beta$  および変異PDGFR  $\beta$  の置換曲線のEC50値を解析した(図22B)。また、PDGFRに対する抗体または抗tag抗体を用いた全細胞溶解物のイムノプロットングによって、トランスフェクトされたMEFにおいて発現される野生型PDGFR  $\beta$  および変異PDGFR  $\beta$  の量も比較した(図22AおよびC)。まとめると、これらの実験から、同様の量の野生型PDGFR  $\beta$  または変異PDGFR  $\beta$  が、トランスフェクトされた細胞の細胞表面で発現されることが実証される。さらに、同様のIC50値(50%の $^{125}\text{I}$ -PDGF結合を置換するPDGF濃度)が、野生型(3.7nM)、R385A変異体(6.0nM)、E390A変異体(2.8nM)、またはRE/AA変異体(3.0nM)を発現する細胞において得られた。また、野生型受容体および変異受容体のインビトロでのチロシンキナーゼ活性を比較することによって、変異PDGFR  $\beta$  の内因性のチロシンキナーゼ活性が不利な影響を受けるかどうかの可能性も検討した。この実験では、血清飢餓状態にした細胞の細胞溶解物を、抗PDGFR抗体を用いた免疫沈降に供し、固定されたPDGFRを、1mM ATPおよび10mM塩化マグネシウムの存在下でインビトロのキナーゼアッセイ法に供した。インキュベーション後、抗ホスホチロシン抗体を用いたイムノプロットングによって試料を解析した。図22Cに示すこの実験から、R385A変異、E390A変異、またはRE/AA変異が、PDGFRの内因性のチロシンキナーゼ活性に影響しないことが実証される。全体的に見て、これらの実験から、PDGFによって誘導されるPDGFR  $\beta$  刺激に影響を及ぼすD4の変異は、細胞表面のPDGFR  $\beta$  発現を変更せず、PDGFR  $\beta$  のリガンド結合親和性に影響せず、かつ、変異PDGFR  $\beta$  の内因性のチロシンキナーゼ活性を変更しないことが実証される。

#### 【0400】

実施例23 PDGF受容体のD4点変異体は、PDGFに刺激された細胞の表面で、不活性二量体の形態で発現される

受容体二量体化は、受容体型チロシンキナーゼ活性化の根底にある決定的に重要なメカニズムとして確立されているため、本発明者らは、PDGF刺激に応答して変異PDGFR  $\beta$  のチロシン自己リン酸化が減少するのは、受容体二量体化を欠くことが原因であるかどうかを調査した。生細胞の細胞表面の野生型EGF受容体および様々なEGF受容体変異体を含む、いくつかの細胞膜受容体のリガンドによって誘導される二量体化をモニターおよび追跡するために、化学架橋剤が以前に使用された(Cochet, C., et al. (1988) J Biol Chem 263, 3290-3295)。この実験では、野生型PDGFR  $\beta$  またはE390A変異体を発現する細胞を一晩血清飢餓状態にし、続いて、4℃で90分間、PDGFとインキュベーションした。数回洗浄して未結合のPDGFを除去し、PBSに溶解した0.5mMスベリン酸ジスクシンイミジル(DSS)と共に細胞を25℃で30分間インキュベートした。刺激されていない細胞またはPDGFで刺激された細胞の細胞溶解物を、抗PDGFR抗体を用いた免疫沈降、続いてSDS-PAGE、およびPDGFR二量体化の状態をモニターするための抗flag抗体またはPDGFR活性化の状態をモニターするための抗ホスホチロシン抗体のいずれかを用いたイムノプロットングに供した(図23)。

#### 【0401】

図23に示す実験から、刺激されていない細胞の溶解物では、PDGFR単量体に対応する見

かけの分子量180kDaでSDSゲル上を移動するバンドが、野生型PDGFR  $\beta$  またはE390A変異体のいずれかを発現する細胞の溶解物において検出されたことが実証される。PDGFで刺激すると、PDGFR二量体に対応する見かけの分子量360kDaでSDSゲル上を移動する付加的なバンドが野生型PDGFR  $\beta$  およびE390A変異体の両方を発現する細胞において検出された。しかしながら、抗ホスホチロシン抗体を用いた試料のイムノブロッティングからは、野生型PDGFRの二量体に対応するバンドはチロシンリン酸化の程度が強いが、E390A変異体の二量体に対応するバンドのチロシンリン酸化の程度は非常に弱く検出されることが示される(図23)。

#### 【0402】

この実験から、E390A変異体のリガンドによって誘導されるチロシン自己リン酸化が障害されるのは、リガンドによって誘導される受容体二量体化の欠乏に起因しないことが示される。また、共有結合的に架橋された野生型PDGFR  $\beta$  は、PDGFに刺激された細胞の細胞表面で活性二量体の形態で提示されるのに対し、E390A変異体は、PDGFに刺激された細胞の表面で不活性二量体の形態で提示されることも、この実験から実証される。前述のデータから、PDGFRにおけるD4同型相互作用が、受容体二量体化に必須ではないこと、およびPDGFによって誘導される受容体二量体化は、チロシンキナーゼ活性化のために必要であるが十分ではないことが実証される。

#### 【0403】

実施例24 PDGF受容体D4変異体を発現する細胞における細胞シグナル伝達刺激の障害

PDGF刺激に応答した細胞シグナル伝達に与えるPDGFR D4変異の影響を検査した。野生型PDGFRまたはPDGFR D4変異体のいずれかを発現する、刺激されていない細胞またはPDGFで刺激された細胞の溶解物を、抗ホスホリパーゼC  $\gamma$  (抗PLC  $\gamma$ ) 抗体を用いた免疫沈降、続いて、SDS-PAGE、および抗PLC  $\gamma$  抗体または抗pTyr抗体のいずれかをを用いたイムノブロッティングに供した。図24Aに示す実験から、PLC  $\gamma$  のチロシンリン酸化が、R385A PDGFR変異体、E390A PDGFR変異体、RE/AA PDGFR変異体、またはRKE/AAA PDGFR変異体を発現する細胞においてひどく損なわれていることが示される。PDGFによって誘導されるその他の細胞応答の刺激の障害が、PDGFR D4変異体を発現する細胞において観察される。図24Bに示す実験から、MAP-キナーゼ応答およびAkt刺激が、野生型PDGFRを発現するMEFにおいてPDGFによって誘導される同様の応答と比べて、R385A PDGFR変異体、E390A PDGFR変異体、R385E390/AA PDGFR変異体、またはR385K387E390/AAA PDGFR変異体を発現する細胞において大きく損なわれていたことが示される。総合的には、約10倍高い濃度のPDGFが、E390A PDGFR変異体、R385E390/AA(すなわち、RE/AA)PDGFR変異体、またはR385K387E390/AAA(すなわち、RKE/AAA)PDGFR変異体を発現する細胞において同様のレベルのMAPキナーゼ応答およびAkt刺激を得るために必要とされた。

#### 【0404】

培養線維芽細胞のPDGF刺激の特徴の内の1つは、PDGFに刺激された細胞の背面でのラッフル膜および環状アクチンリング構造の典型的な形成である。図25に示す実験から、PDGFによるアクチンリング形成の刺激が、PDGFR D4変異体を発現するMEFにおいて損なわれていることが示される。野生型PDGFRを発現するMEFの約83%が環状アクチンリング形成を示したのに対し、PDGFR D4変異細胞では、50ng/mlのPDGFで2分間刺激した後に、同様の環状アクチンリング形成を示したのは5%に過ぎなかった。さらに、野生型PDGFRを発現するMEFでは2~5分間のPDGF刺激後にピークに達する一過性の環状アクチンリング形成は、R385A PDGFR変異体、E390A PDGFR変異体、またはRE/AA PDGFR変異体を発現する細胞では弱く検出された。

#### 【0405】

実施例25 PDGF受容体D4変異体の内在化および分解の減少

PDGF内在化、PDGFR分解、およびPDGFRユビキチン化に対するPDGFR D4変異の影響もまた、検査した。野生型PDGFRまたはPDGFR D4変異体を発現するMEFを、4℃で90分間、5ng/mlの<sup>125</sup>I標識PDGFで処理し、続いて、PBS (pH7.4)で短時間洗浄して、培地中の過剰なりガンドを除去した。予め標識した細胞を37℃まで温めて、最長4時間までの様々な時間間隔

で、リガンド-受容体複合体のエンドサイトーシスを開始させた。細胞表面に結合された<sup>125</sup>I-PDGF、細胞内<sup>125</sup>I-PDGF、および培地中の分解した<sup>125</sup>I-PDGFを採取し、シンチレーションカウンターを用いて定量し、4℃で90分間インキュベーション後(t=0)の細胞に結合した全<sup>125</sup>I-PDGF放射能に対するパーセントとして示した(平均値±SD)。図26Aに示す実験から、野生型PDGFRを発現するMEFに結合された<sup>125</sup>I標識PDGFの内在化の動態が、E390A PDGFR変異体、R385A PDGFR変異体、またはR385E390/AA PDGFR変異体を発現する細胞に結合された<sup>125</sup>I標識PDGFの内在化の動態よりはるかに速いことが示される。30分後、約75～80%の<sup>125</sup>I-PDGFが細胞表面から移動して、野生型受容体を発現する細胞の内部に蓄積したのに対し、変異受容体を発現する細胞では50%未満であった。

#### 【0406】

<sup>125</sup>I-PDGFの低分子量の分解生成物は、30分後に検出可能になった。分解した<sup>125</sup>I-PDGFの放出は、野生型細胞よりもE390A変異細胞の方がはるかに遅かった(図26A)。PDGFの内在化および分解の減少は、PDGFR D4変異体の分解の減少に反映された。分解実験の間に新しいPDGFR分子が生合成されるのを妨害するために、野生型PDGFRまたはR385A PDGFR変異体、E390A PDGFR変異体、もしくはR385E390/AA PDGFR変異体を発現する細胞をシクロヘキシミドと共に30分間、最初にインキュベートした。刺激されていない細胞またはPDGFで刺激された細胞の溶解物を、抗PDGFR抗体を用いた免疫沈降、続いて、SDS-PAGEおよび野生型PDGFRまたはPDGFR D4変異体のC末端に結合されたタグに対する抗体を用いたイムノブロッティングに供した。図26Bに示す実験から、R385A PDGFR変異体、E390A PDGFR変異体、またはR385E390/AA PDGFR変異体の分解の動態が著しく衰えていたことが示される;野生型PDGFRの半分がPDGF刺激から1.5時間以内に分解したのに対し、PDGFR D4変異体の半減期は、約4～6時間に延びた。図26Cに示す実験から、PDGFによって誘導されるE390A PDGFRユビキチン化の刺激もまた、同様の条件下の野生型PDGFRと比べて著しく減少していたことが示される。総合すると、これらの実験から、PDGFR内在化およびユビキチンを介したPDGFR分解が、PDGFRのD4の変異によって損なわれることが実証される。

#### 【0407】

##### 実施例22～25の考察

PDGFR α、PDGFR β、CSF1R、Flt3、およびKitを含むIII型RTKの全メンバーの細胞外ドメインは、5つのIg様ドメインから構成されており、この内の最初の3つは、結合した際に受容体二量体化および活性化を刺激する二量体リガンド分子に対する結合部位として機能する。分子構成としては、III型RTKのリガンド結合特性および受容体二量体化メカニズムは高度に保存されており、SCF刺激前および後のKit外部ドメイン全体の結晶構造によって明らかにされる、SCFによって誘導されるKit活性化のメカニズムは、すべてのIII型RTKの活性化の一般的メカニズムに相当する。さらに、細胞外ドメイン中にIg様ドメインを含むRTKの系統学的解析によって、III型RTKおよびIV型RTK;VEGFR1(Flt1)、VEGFR2(KDR)、およびVEGFR3(Flt4)を含むファミリーの進化上の起源が共通であることが示される。さらに、VEGFおよびPDGFの両方とも、同じシステインノットファミリーに属し、類似したトポロジー、サイズ、および受容体結合戦略を共有するホモ二量体増殖因子である。したがって、細胞外ドメインのX線構造解析によって明らかにされたKit活性化の目立った特徴(本明細書において初めて開示される)はまた、リガンドによって誘導されるV型RTKの活性化にも当てはまり得る。

#### 【0408】

Kitの構造解析から、隣接する2つのD4ドメインのGlu386とArg381の間で形成される一対の塩橋が、SCFによって誘導されるKit活性化に不可欠なD4同型相互作用の媒介を担っていることが示された。III型RTKのアミノ酸配列の比較により、PDGFR α、PDGFR β、およびCSF1RのD4のEFループ領域に同一の配列モチーフが存在することが示され(図21)、同様の塩橋がIII型RTKのD4の間でも形成されるという証拠が与えられる。実際、PDGFR βのD4ドメイン中のArg385またはAsp390をアラニンで置換すると、PDGFによるPDGFR β活性化の刺激が損なわれて、野生型PDGFR βを発現する細胞ではPDGFによって刺激される様々な細胞応答に機能障害が生じた。Kit構造の解析によって明らかにされる、リガンドによって誘導

されるKit活性化のメカニズムは、すべてのIII型RTKの活性化に当てはまる。D4同型相互作用を担っている配列モチーフに同一な配列モチーフは、RTKのVEGFRファミリー(IV型)の3つのメンバーすべての第7の膜近位Ig様ドメイン(D7)のEFループにおいても確認された。Kitおよび他のIII型RTKにおいてD4同型相互作用の媒介を担っている保存配列モチーフが、IV型RTKのD7ドメイン中に位置しているが、VEGFRのD7は、IV型RTKの膜近位領域間の同型相互作用を媒介する際にD4に類似した役割を果たす可能性が高い。実際、VEGFR2の細胞外ドメイン構造の電子顕微鏡解析により、VEGFが結合したVEGFR2二量体のD7間の直接の接触が明らかになった(Ruch, C., et al. (2007) Nat Struct Mol Biol 14, 249-250)。膜近位Ig様ドメイン間の直接接触は、III型RTKおよびIV型RTKの両方が使用する一般的メカニズムに相当する。

10

#### 【0409】

様々な受容体変異体を探求するか、またはKitの個々のIg様ドメイン(Blechman, et al. (1995) Cell 80, 103-113)、PDGF受容体(Miyazawa, K., et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 25495-25502)、および他のIII型RTKに特異的に結合するモノクローナル抗体を使用する研究により、Kitが一価のSCFリガンドによって刺激される場合でさえ(Lev, S., et al. (1992) J Biol Chem 267, 15970-15977)、受容体二量体化を媒介する際にD4が役割を果たすことが提唱された。しかしながら、最初の3つのIg様ドメイン(D1~D3)または5つのIg様ドメインすべて(D1~D5)のいずれかから構成されるKitの精製した細胞外ドメインに対してSCF結合のマイクロカロリーメトリーおよびSCF化学量論を使用する定量的解析から、D4およびD5がKit二量体化のSCF刺激のために必須ではないことが示された。言い換えると、これらの報告から、Kit二量体化は、Kitに結合するSCFの二量体性質によって主に推進されることが示された(Lemmon, M. A., et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 6311-6317.)。

20

#### 【0410】

しかしながら、本明細書において提示する研究から、隣接する受容体間のD4同型(およびまたD5同型)相互作用が、受容体二量体化において役割を果たすよりはむしろ、2つの受容体の膜近位領域を、それらの細胞質内ドメイン間の相互作用を可能にしてチロシンキナーゼ活性化をもたらす距離および向きに正確に位置付けるのに必要とされるということが実証される。したがって、本発明の部分、例えば、モノクローナル抗体は、受容体二量体化に干渉するのではなく、チロシンキナーゼ活性化のために不可欠な距離および向きに細胞質内ドメインを位置付けるために不可欠である、III型RTKの膜近位領域の間の決定的に重要な同型相互作用を妨害することによって、受容体活性化に対する阻害効果を及ぼす。

30

#### 【0411】

本明細書において提示する実験から、PDGFR  $\beta$ 、Kit、および他のIII型RTKの二量体化が、リガンド結合によって完全に推進されること、およびリガンド結合の唯一の役割が、細胞膜での局所濃度を上昇させるために2つの受容体分子を架橋することであることが実証される。D4同型相互作用の媒介を担っている2つの塩橋(埋もれた表面領域が $360 \text{ \AA}^2$ である境界面を伴う)は弱すぎて、リガンドを媒介とする受容体二量体化の支援無しでは受容体相互作用を支援できず、Kitの場合、各SCFプロトマーについて合計 $2060 \text{ \AA}^2$ の埋もれた表面領域との様々な強い相互作用によって媒介される。細胞当たり20,000個の受容体を発現する刺激されていない細胞の細胞膜中の見かけの受容体濃度は、約 $1 \sim 3 \mu\text{M}$ であると推定された(Klein, P., et al. (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101, 929-934; Chandrasekhar, S. (1943) Reviews of Modern Physics 15, 1)。SCFのような二量体リガンドを結合すると、2つの占有された受容体は $75 \text{ \AA}$ の距離で結合される。これらの条件下で、最近傍アプローチへの平均距離を用いて算出した細胞膜中の見かけの受容体濃度は、 $4 \sim 6 \times 10^{-4} \text{ M}$ まで、2桁を超える上昇を示す。この計算から、2つの塩橋に媒介される相互作用のような解離定数が $10^{-4} \sim 10^{-5} \text{ M}$ の範囲の弱い相互作用さえ、隣接する2つの受容体の膜近位領域間の会合および直接接触を媒介し得ることが示される。D4およびD5を受容体分子の他の部分に連結する継ぎ目が柔軟であることに加えて、細胞膜中での局所濃度が高くなることにより、隣接する細胞質内ドメイン間の相互作用、チロシン自己リン酸化、およびチロシン

40

50

キナーゼ活性の刺激を可能にする厳密な向きおよび距離(Kitの場合15 Å)に受容体の膜近位領域を位置付ける、D4同型接触の移動および形成ならびにD5同型接触の移動および形成が可能になる。

#### 【0412】

最後に、刺激されていない細胞またはPDGFで刺激された細胞上の野生型受容体または変異受容体を共有結合的に架橋する化学架橋剤を適用することにより、E390A PDGFR  $\beta$  変異体が、PDGFによって誘導される野生型受容体二量体化に類似したPDGFによって誘導される二量体化を経ることが本明細書において実証された。しかしながら、PDGFで刺激された細胞の細胞表面で活性化二量体の形態で発現される野生型PDGFR  $\beta$  とは対照的に、E390A変異体は、PDGFで刺激された細胞の表面で不活性な二量体の形態で発現される。この実験から、D4-D4同型相互作用がPDGFR  $\beta$  二量体化のために必須ではないこと、およびPDGFR  $\beta$  二量体化は受容体活性化のために必要であるが、十分ではないことが実証される。

10

#### 【0413】

実施例26 D4-D4境界面の混乱により、発癌性KIT活性化が抑えられる

野生型(WT)KIT、D5のAla502およびTyr503が重複している発癌性KIT変異体(D5リピート変異体)、またはD5のAla502およびTyr503(D5リピート)の重複に加えて、D4のGlu386がAla残基で置換された付加的な点変異を伴うKIT変異体(D5リピート/E386A変異体)を安定に発現するマウス3T3細胞を、37°Cで5分間、1ng/ml、5ng/ml、または10ng/mlのSCFで刺激した。

#### 【0414】

刺激されていない細胞またはSCFで刺激された細胞の溶解物を、抗KIT抗体を用いた免疫沈降、続いて、SDS-PAGEおよび抗KIT抗体または抗ホスホチロシン(抗pY)抗体のいずれかを用いたイムノブロッティングに供した。

20

#### 【0415】

図27に示す実験から、野生型KITをSCFで刺激すると、SCF刺激に応答したKITのチロシン自己リン酸化の増大によって明らかにされるKIT活性化の促進がもたらされることが実証される。また、この実験は、KITの発癌性D5リピート変異体が構成的にチロシン自己リン酸化されている(すなわち、SCF刺激の不在下で活性化されている)ことも示す。一方、D4に付加的な点変異(正常な受容体タンパク質の環境でKITのSCF活性化に障害を生じさせることが示された)を有するD5リピート/E386A変異体は、発癌性D5リピート変異によって媒介されるKITの構成的チロシン自己リン酸化を妨げる。

30

#### 【0416】

この実験は、D5の発癌性変異による、およびおそらくはKIT分子の異なる部分の他の発癌性変異によるKIT活性化を媒介する際にD4-D4同型相互作用が重要であることの遺伝的確認を提供する。さらに、この実験は、本発明の部分、例えば、抗体もしくはその抗原結合部、低分子、またはペプチド分子を用いた薬理的介入によるD4-D4境界面の混乱により、D5の発癌性変異、KIT分子の他の部分ならびに発癌性のIII型RTKおよびIV型RTKの発癌性変異の活性が妨げられるという概念に対するさらなる確認を提供する。

#### 【0417】

実施例27 D4同型相互作用の媒介に関与するKITのシグネチャーモチーフに対応する合成ペプチドに対する抗体は、完全なKITタンパク質を認識する

40

この実施例では、以下の3種の異なるKIT抗原に対してウサギポリクローナル抗体を産生させた：

1. ヒトKITの完全長細胞外ドメイン(アミノ酸1~510)。
2. アミノ酸308~411から構成されるKIT Ig様ドメイン4(D4)(KIT D4)。
3. KLHに結合されたKIT D4のシグネチャーモチーフ

(SELHLTRLKGTGGTYT)

を含む、アミノ酸375~391に対応する17量体ペプチド。

#### 【0418】

50

2週間隔で3種の各抗原でウサギを免疫化し、試験血液を解析した。提示する結果は、3回目の免疫化後に採取した血清試料に由来する。

【0419】

野生型ヒトKITを発現する3T3細胞の溶解物を、次の抗体の内の1つを含む血清30  $\mu$ lと共にインキュベートした:1. 完全長KIT細胞外ドメインに対する抗KIT。2. KIT-D4に対する抗D4、および3. KIT D4のアミノ酸375~391に対応するペプチドに対する抗ペプチド。各抗体を含む、野生型KITを発現する3T3細胞の溶解物を、プロテインA Sepharoseと共に4°Cで2時間インキュベートし、次いで、20mM Hepes、150mM NaCl、0.1% Triton X-100、および5% グリセロールを含む洗浄緩衝液で3回洗浄した。SDS-PAGEで免疫沈降物を分離し、ニトロセルロースに移し、図28に記載するように各抗体でイムノブロットした。図28に提示するデータから、KIT二量体を活性化立体配置で位置付けるために不可欠なD4の同型相互作用領域に対する抗ペプチド抗体を含む各抗体が、実験の免疫沈降段階およびイムノブロット段階において完全な天然KITを認識することが示される。

10

【0420】

注目すべきことに、この実験から、抗ペプチド抗体は、KITの完全な細胞外領域またはD4領域に対する抗体と同じくらい効率的に野生型KITを認識することが示される。

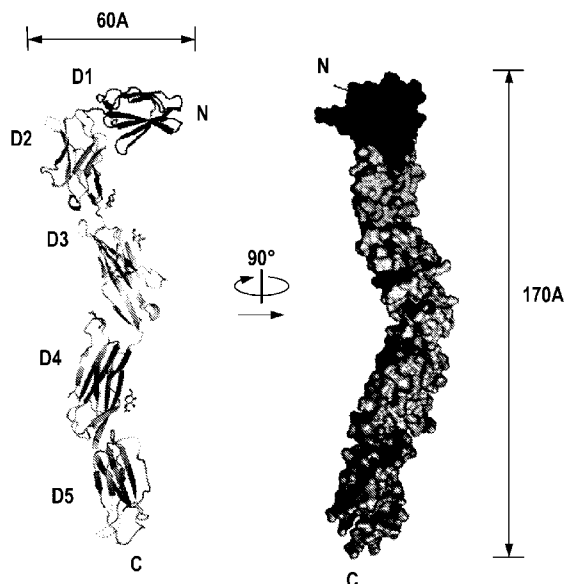
【0421】

等価物

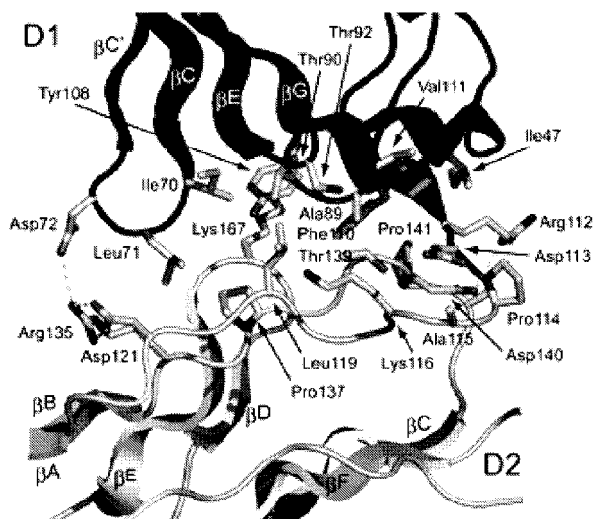
当業者は、日常的な実験法を用いるだけで、本明細書において説明した本発明の個々の態様の多くの等価物を認識するか、または確認することができるであろう。このような等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されると意図される。

20

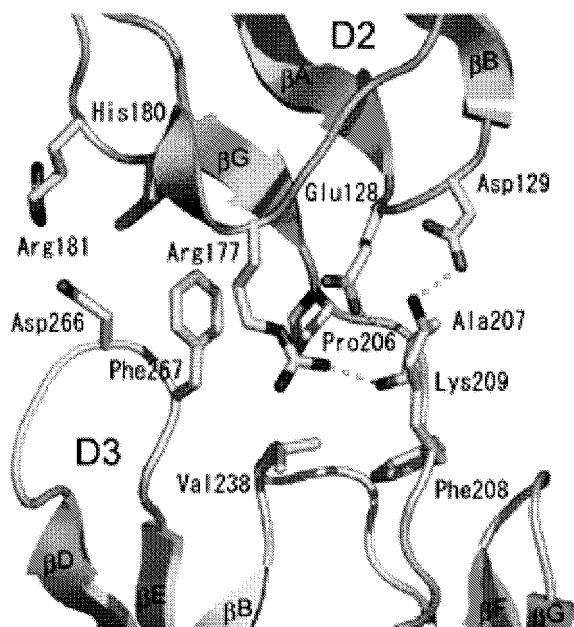
【図1A】



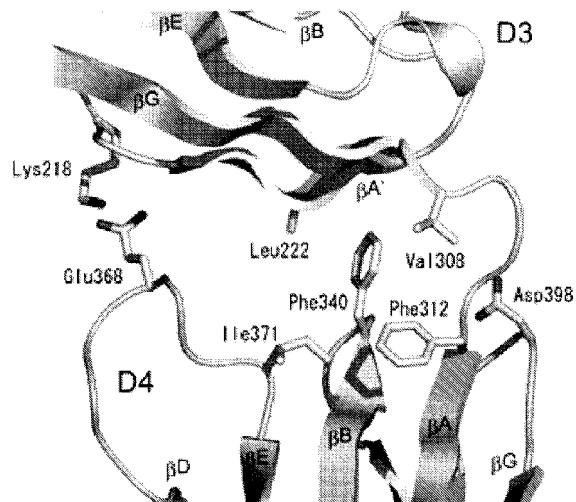
【図1B】



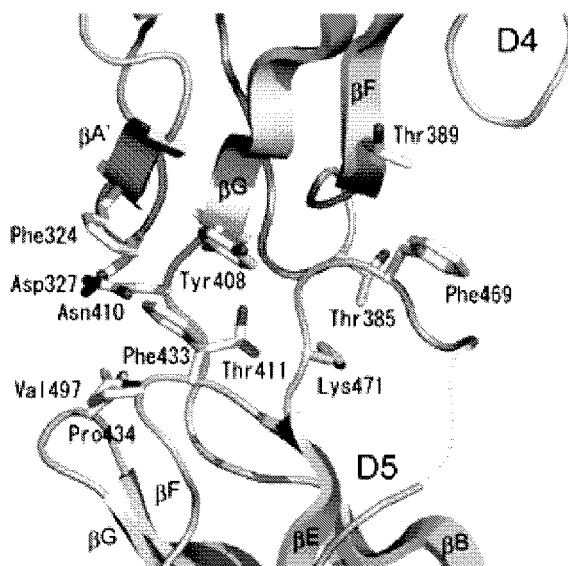
【図 1 C】



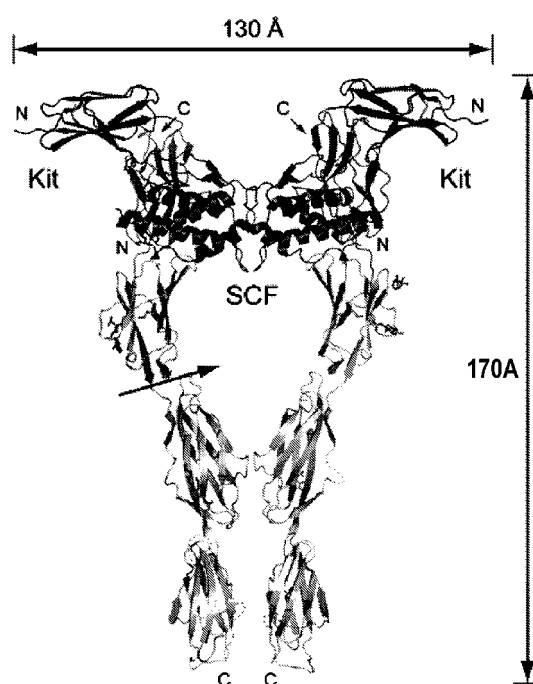
【図 1 D】



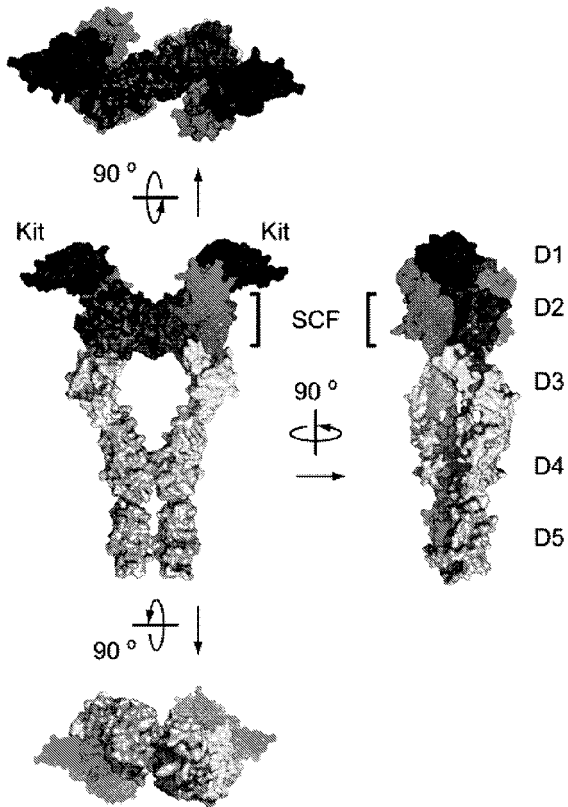
【図 1 E】



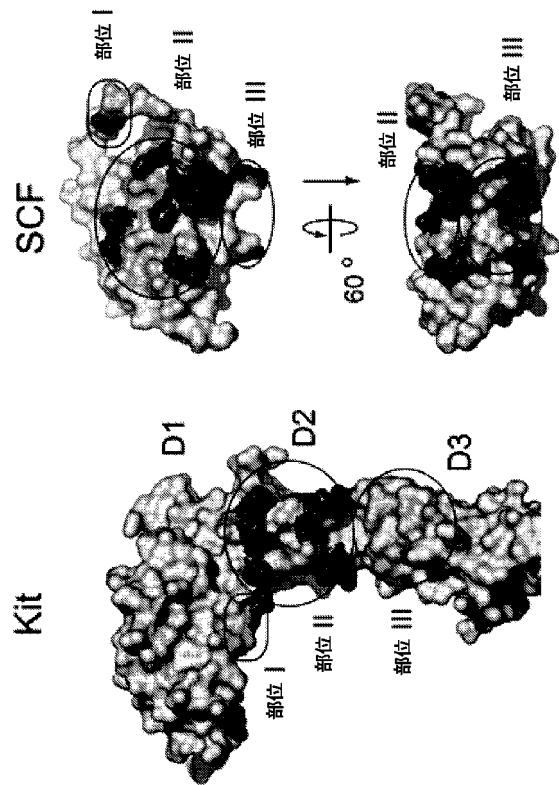
【図 2 A】



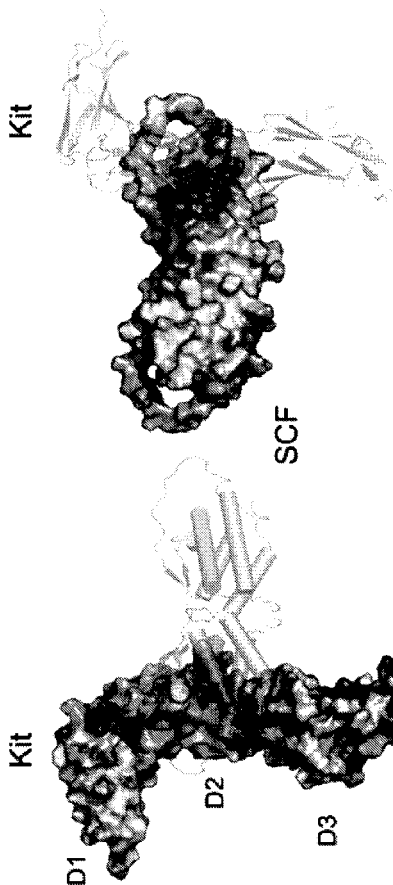
【図 2 B】



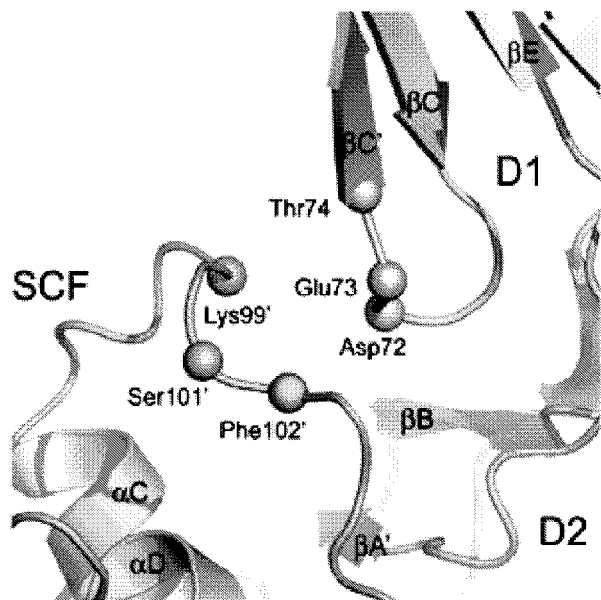
【図 3 A】



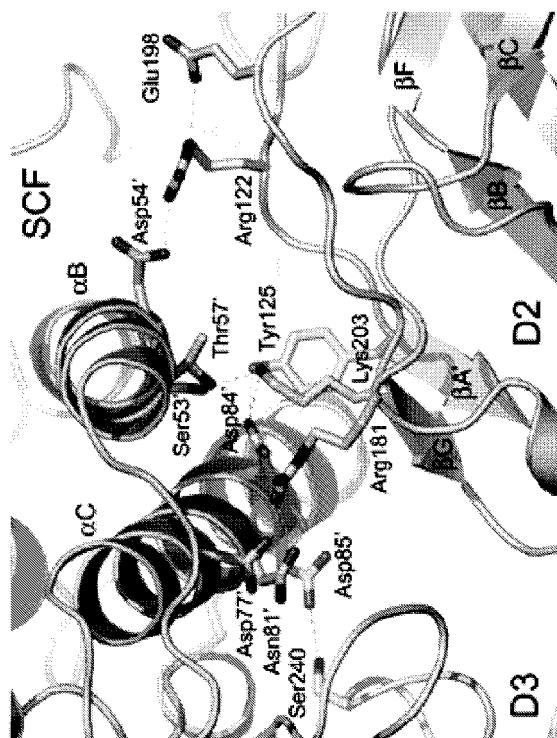
【図 3 B】



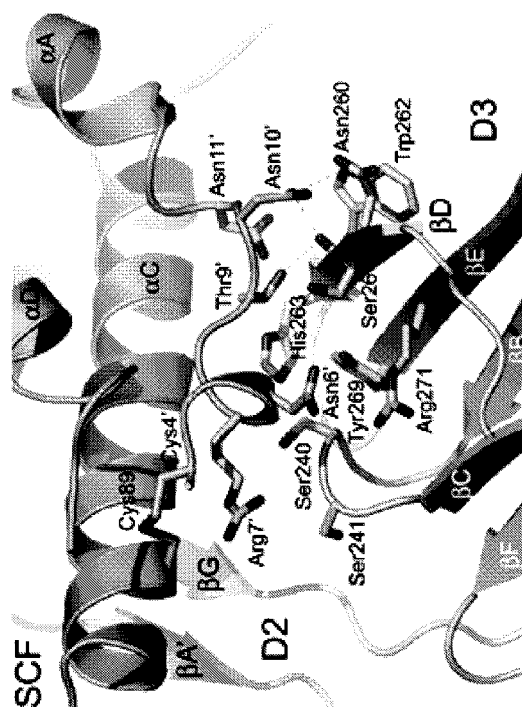
【図 3 C】



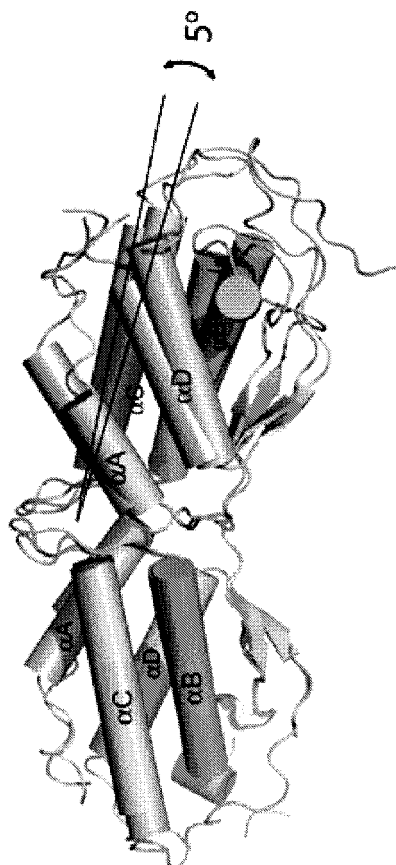
【図 3 D】



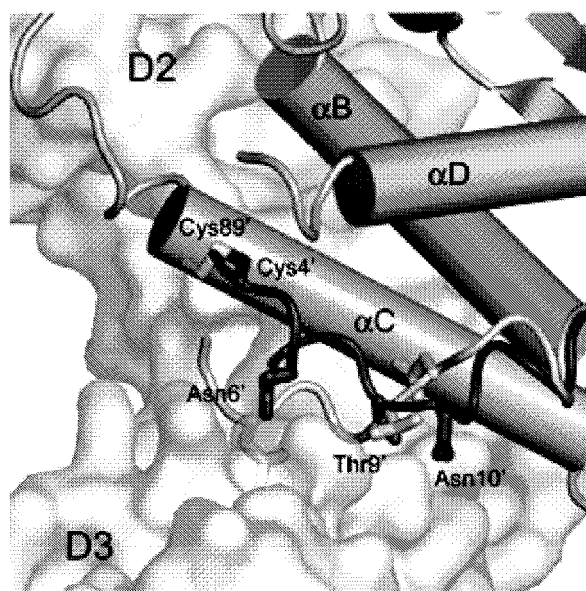
【図 3 E】



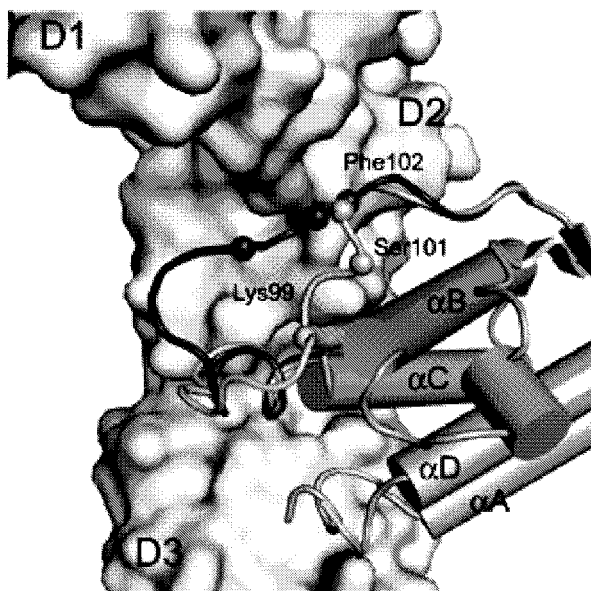
【図 4 A】



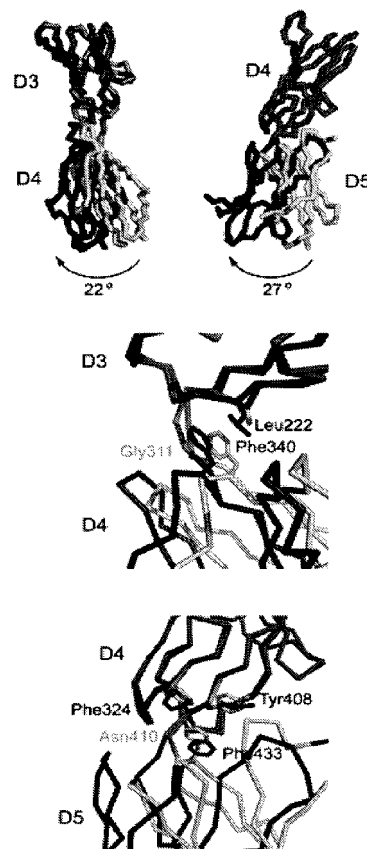
【図 4 B】



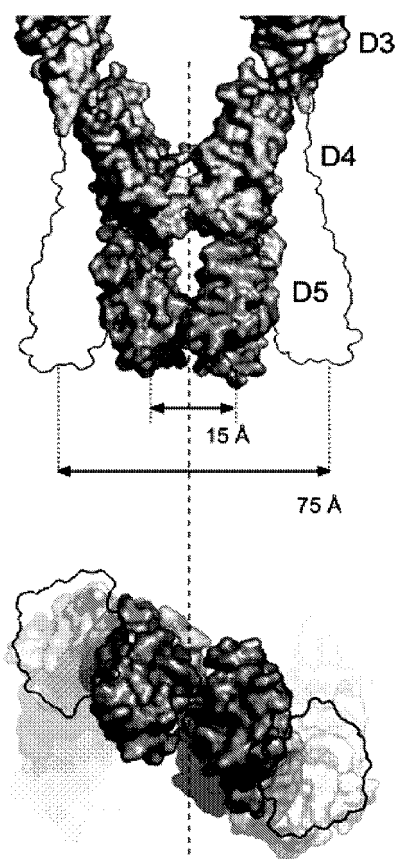
【図 4 C】



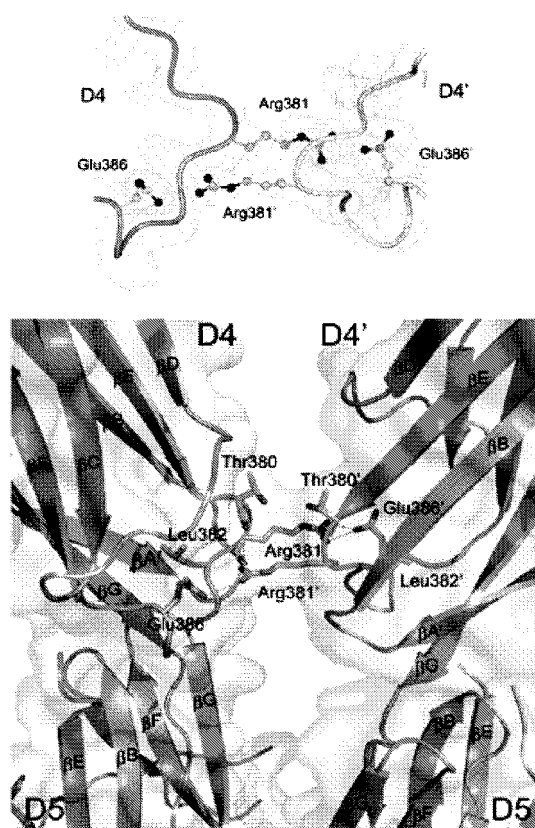
【図 5 A】



【図 5 B】



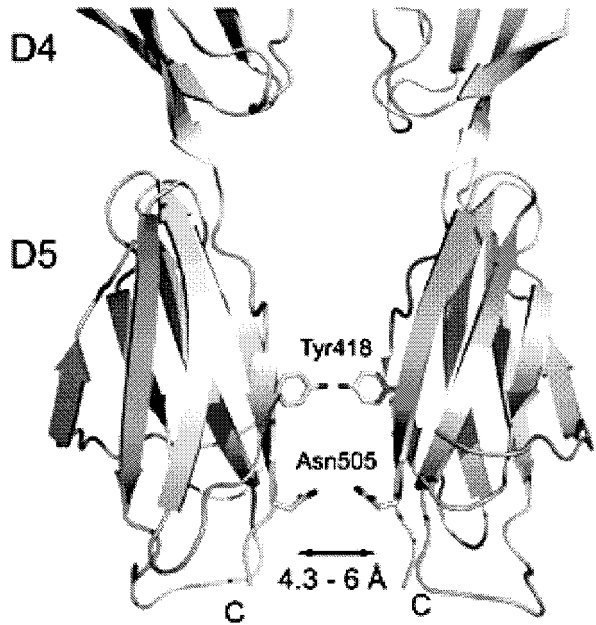
【図 6 A】



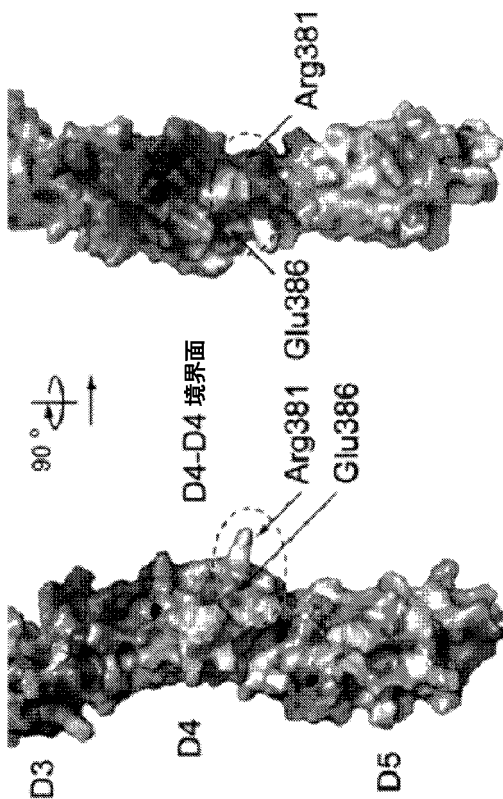
【図 6 B】



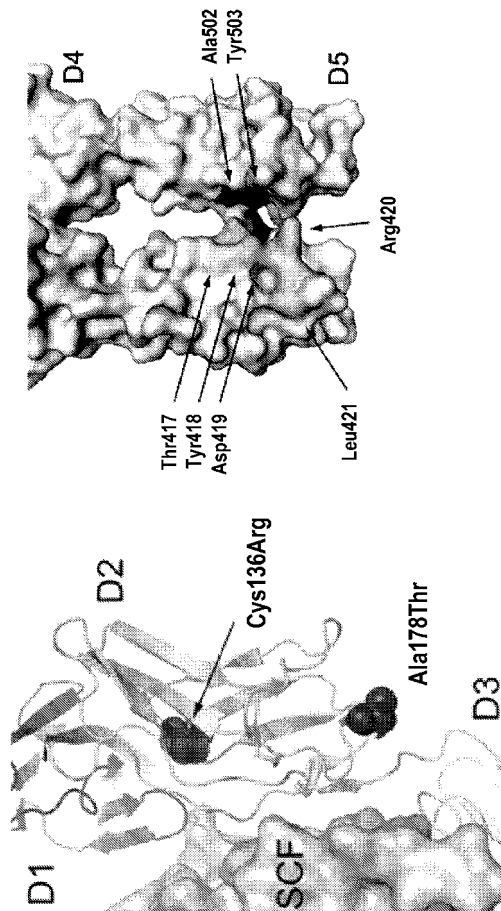
【図 6 C】



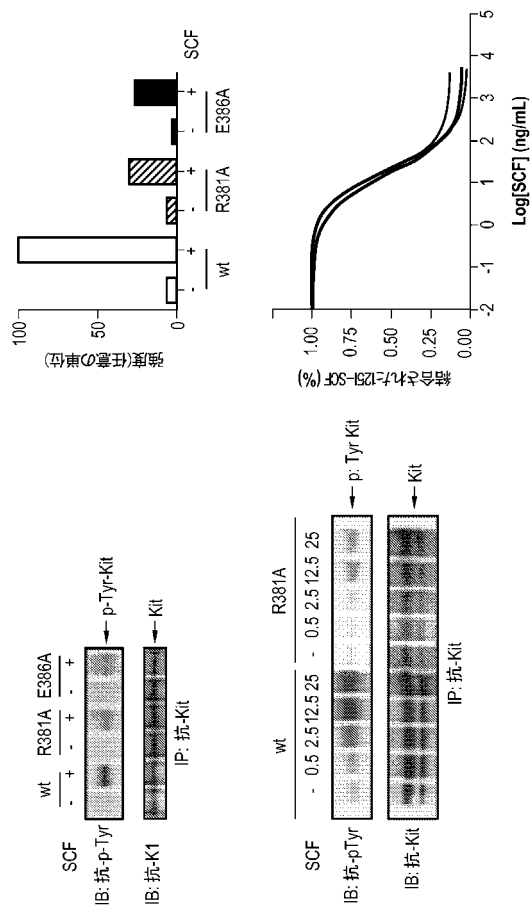
【図 6 D】



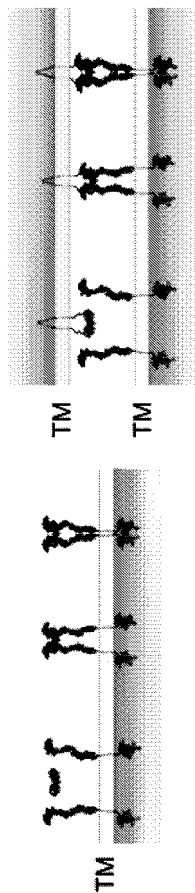
【図 7 A】



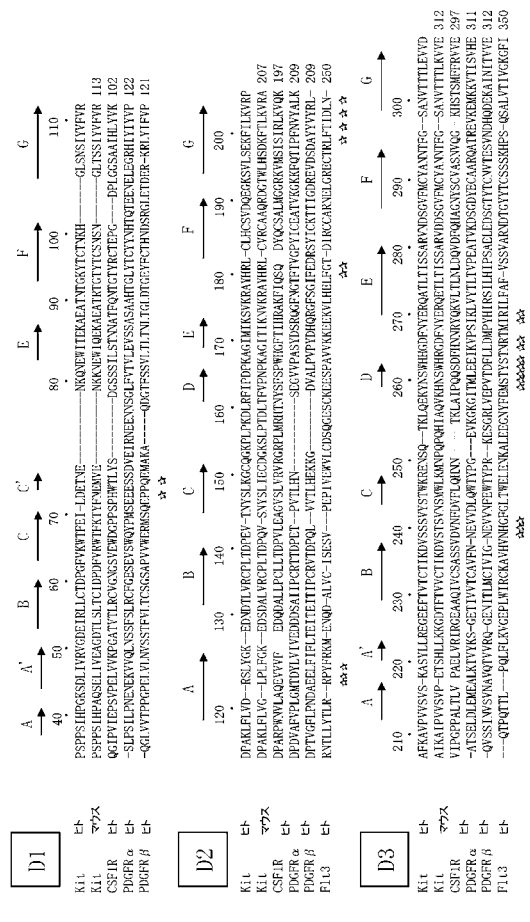
【図 7 B】



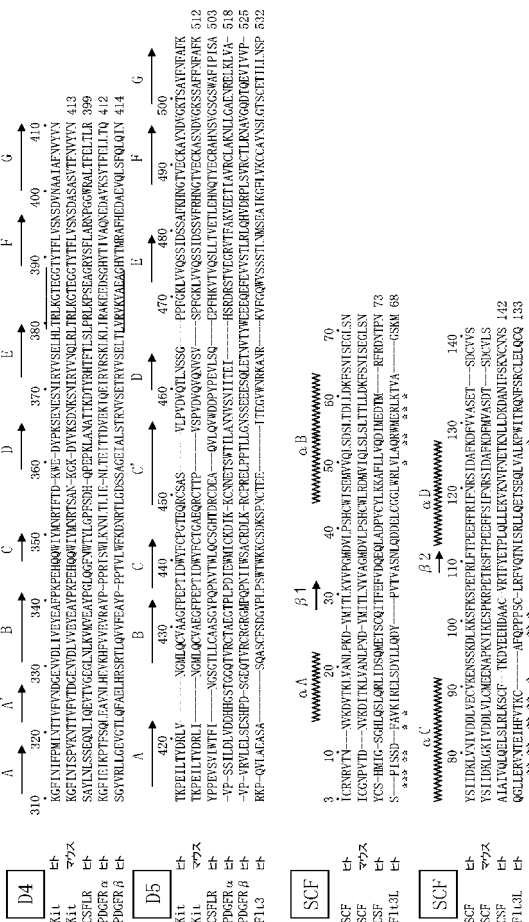
【図 7 C】



【図 8 A】



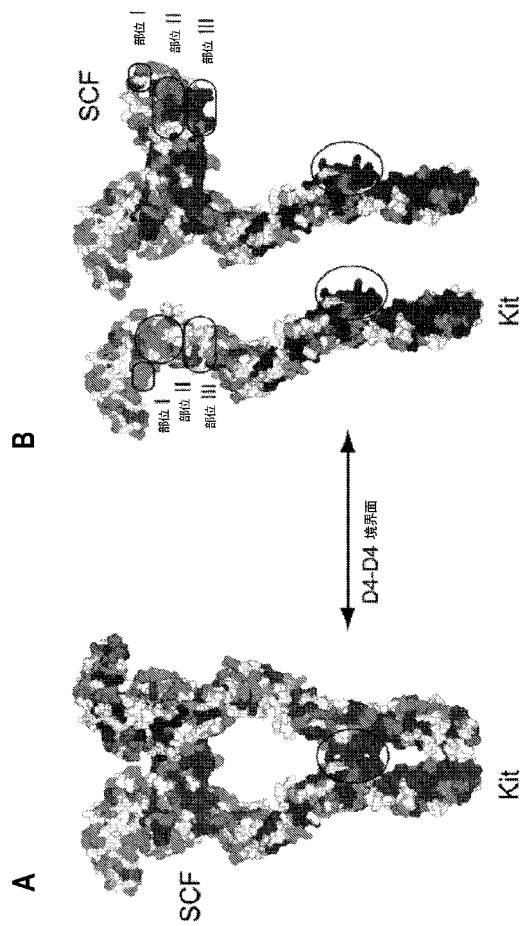
【図 8 B】



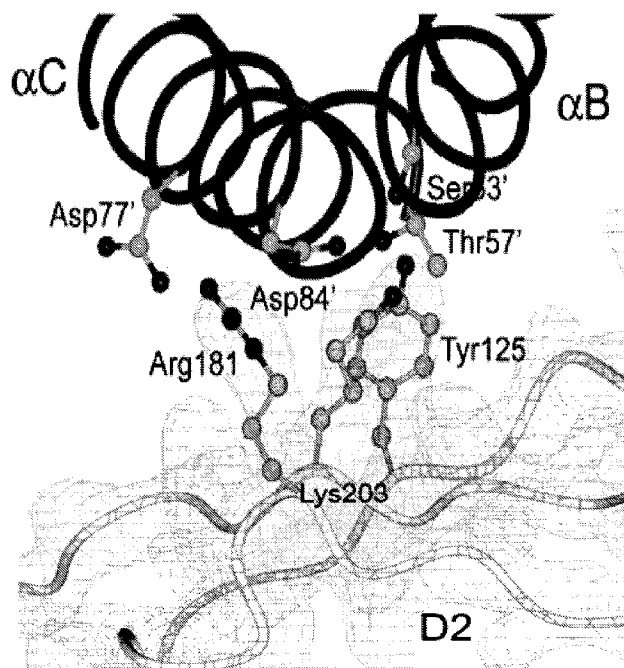
【図 9】



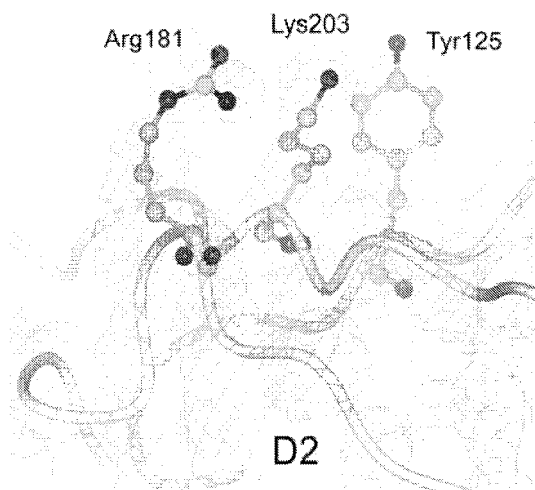
【図 10】



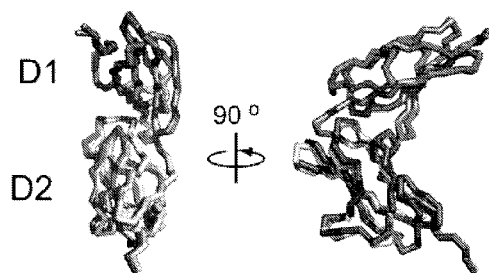
【図 11 A】



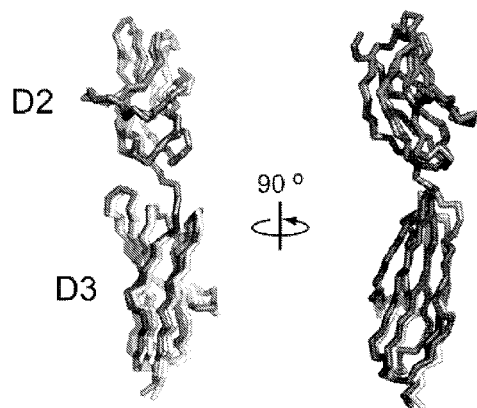
【図 11 B】



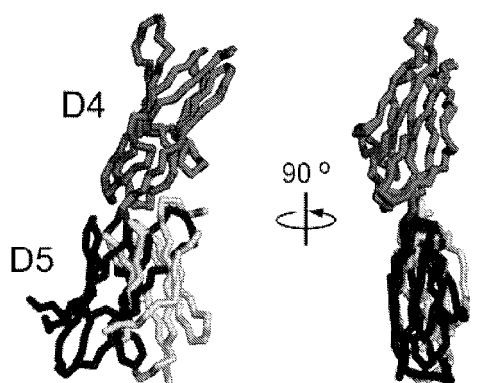
【図 1 2 A】



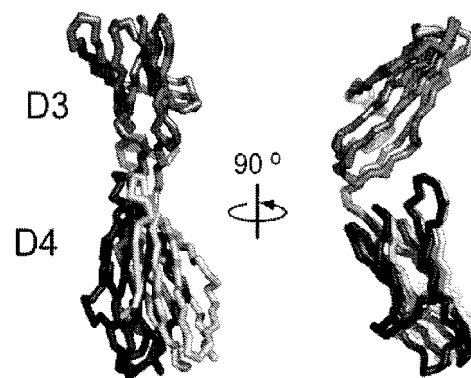
【図 1 2 B】



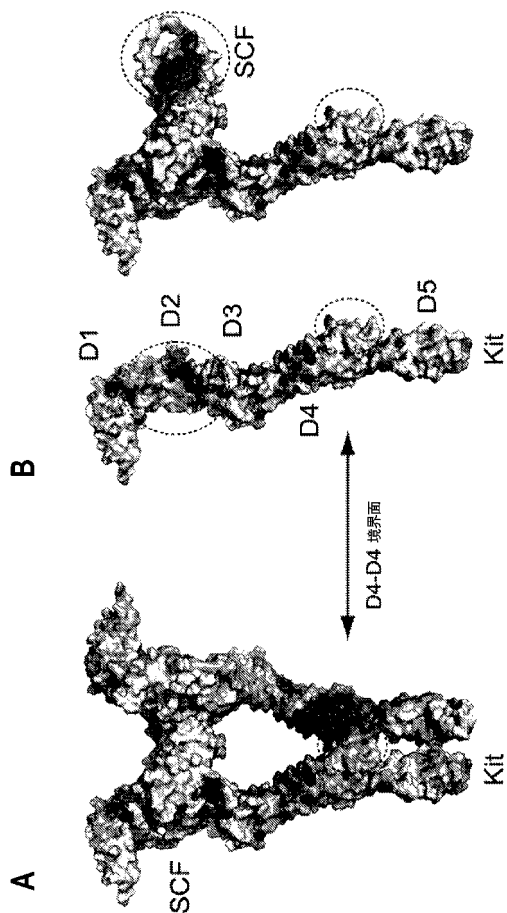
【図 1 2 D】



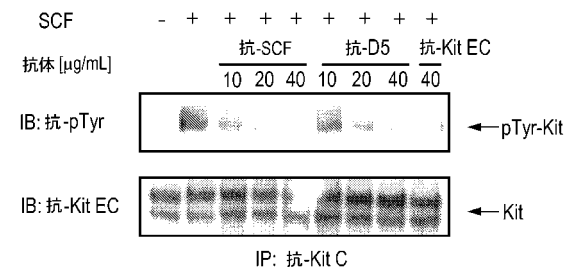
【図 1 2 C】



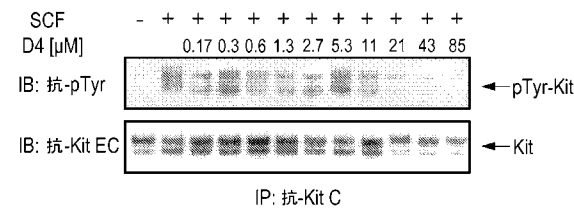
【図 1 3】



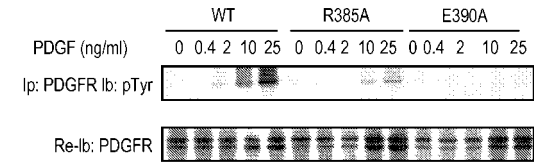
【 図 1 4 】



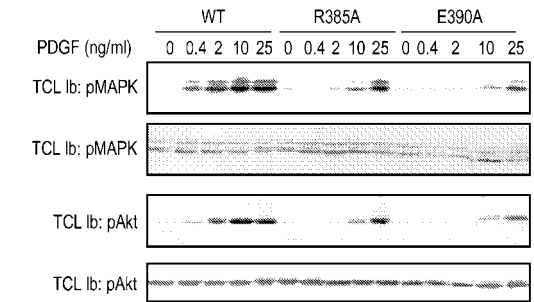
【 図 1 5 】



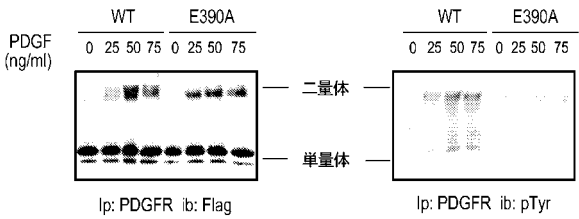
【 図 1 6 】



A

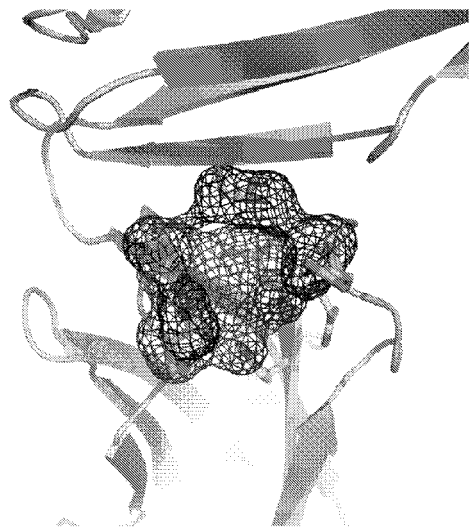


B

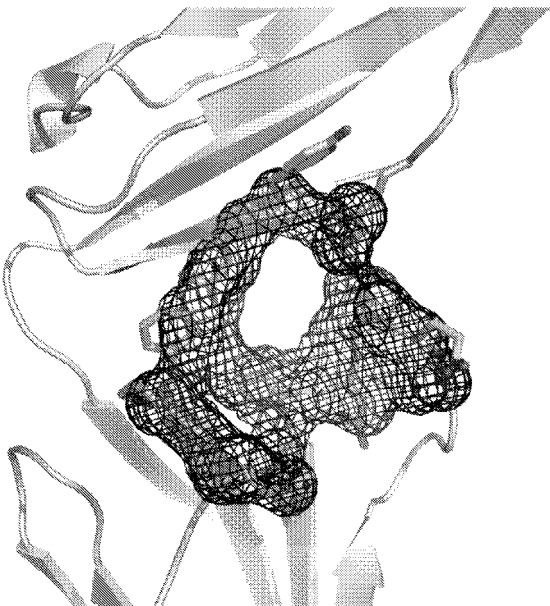


C

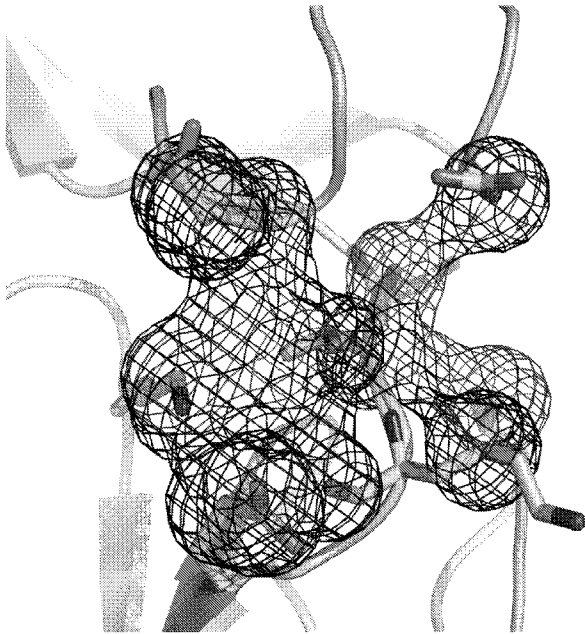
【 図 1 7 A 】



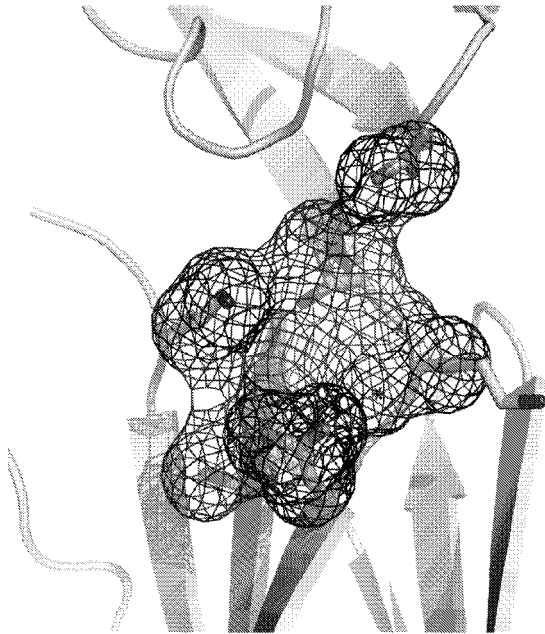
【 図 1 7 B 】



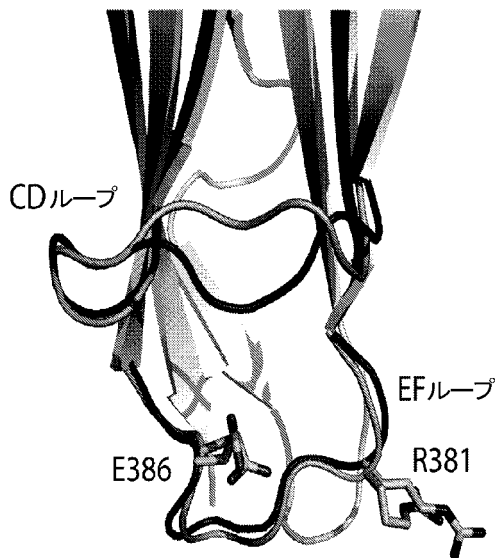
【図 18 A】



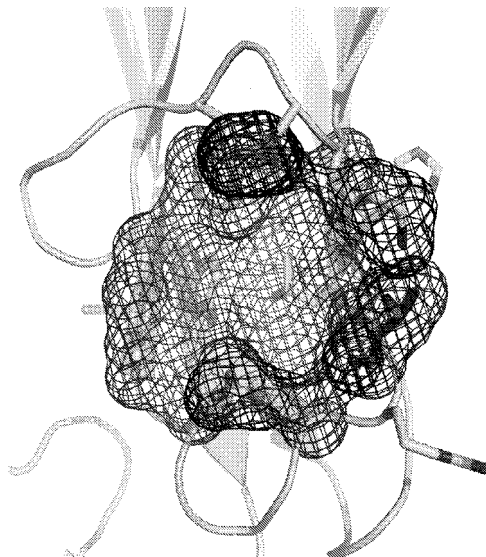
【図 18 B】



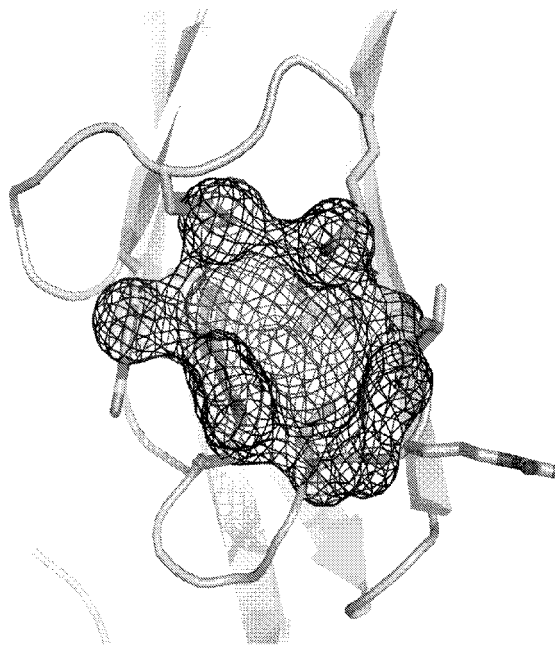
【図 19 A】



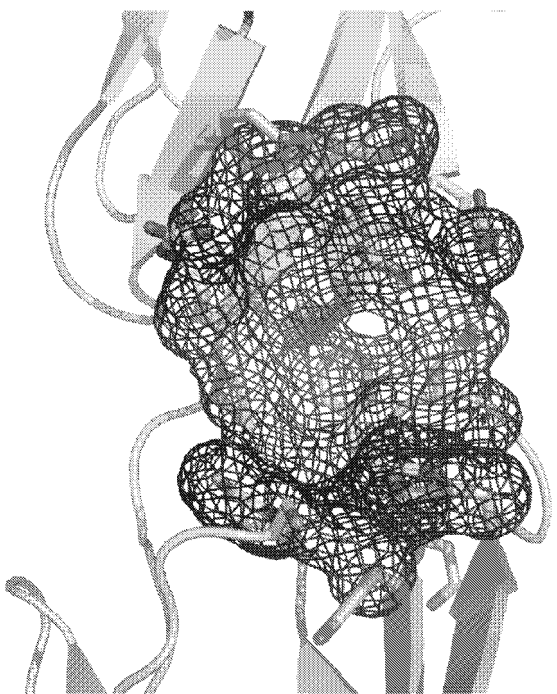
【図 19 B】



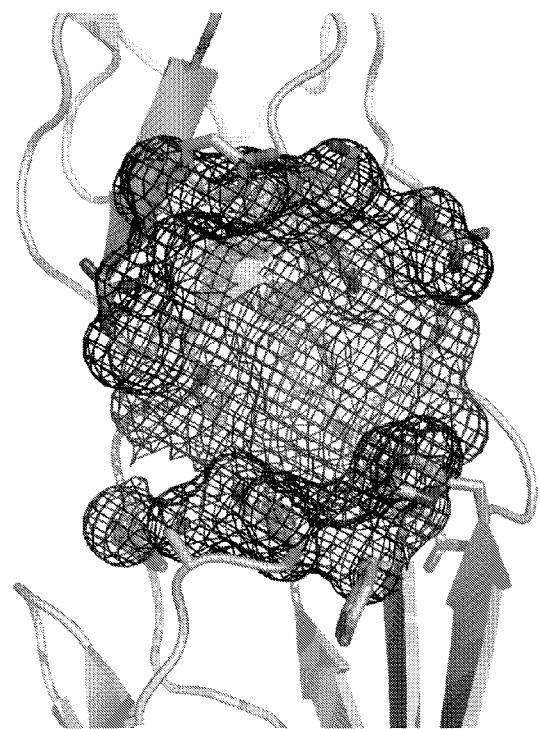
【図 19 C】



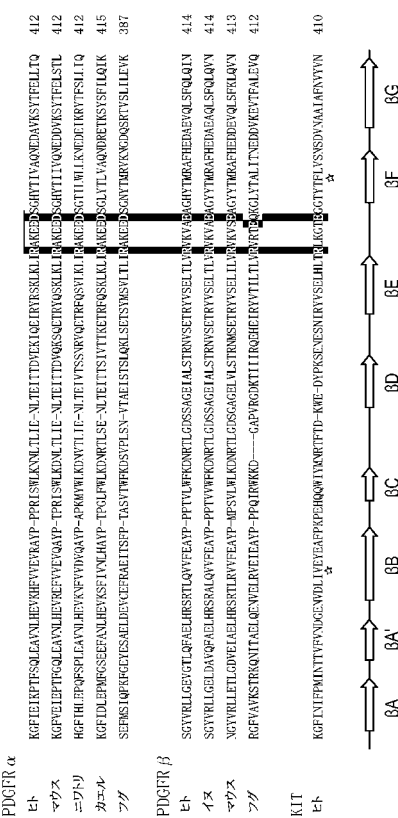
【図 20 A】



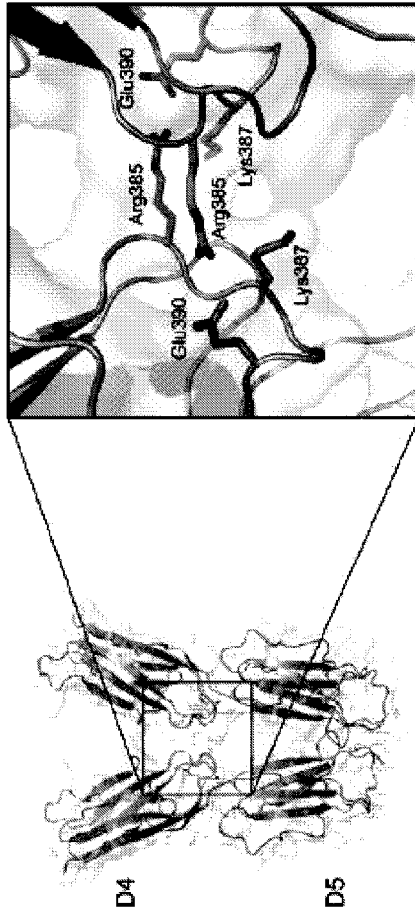
【図 20 B】



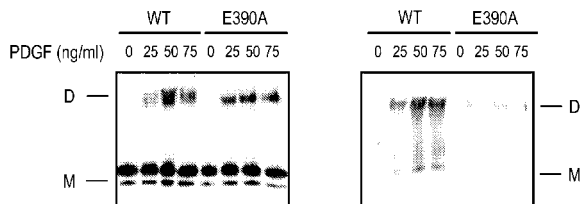
【図 21 A】



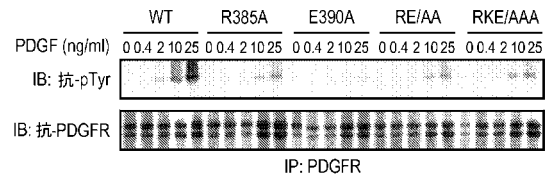
【図 2 1 B】



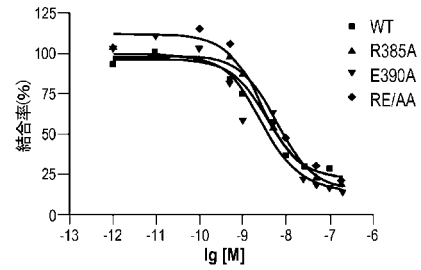
【図 2 3】



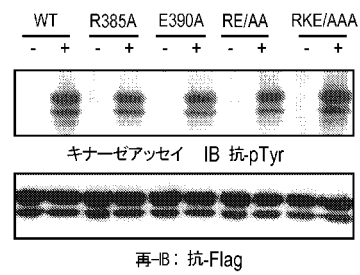
【図 2 2】



A

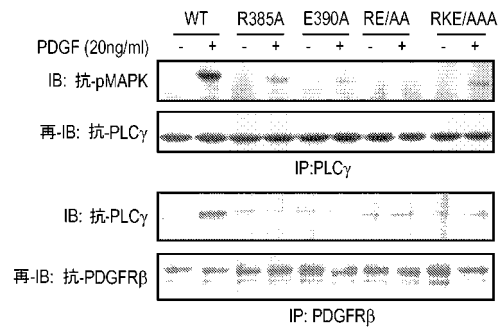


B

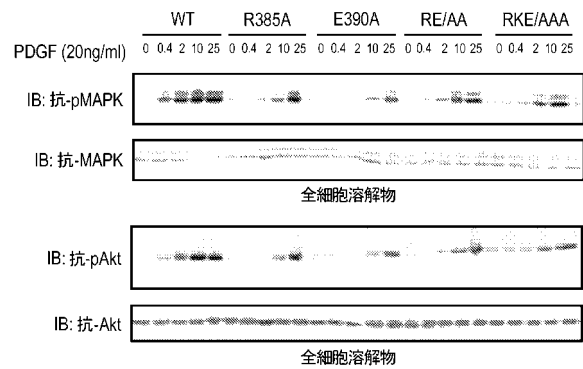


C

【図 2 4】

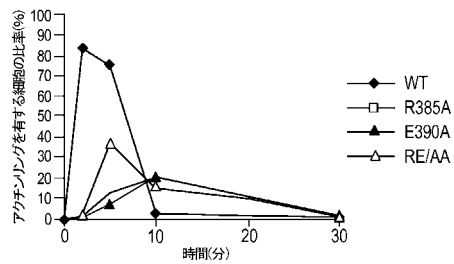
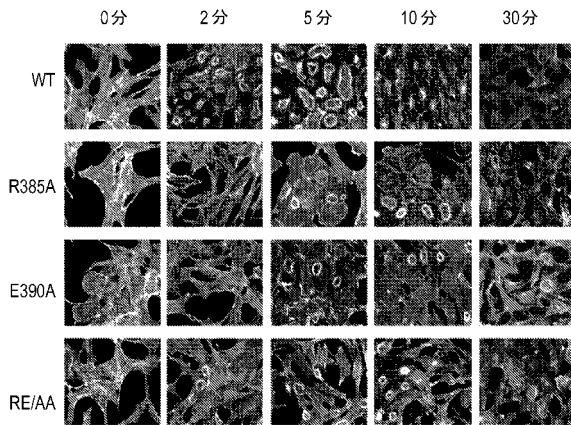


A

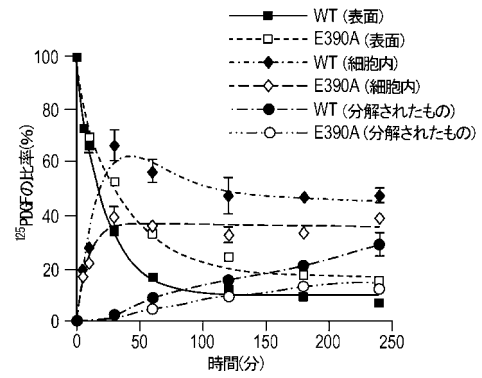


B

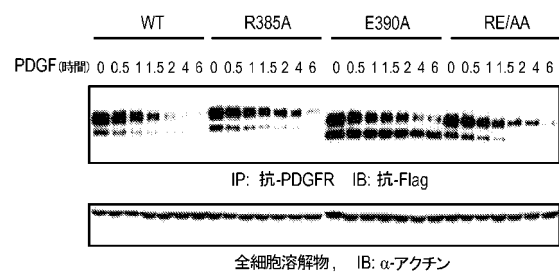
【図 2 5】



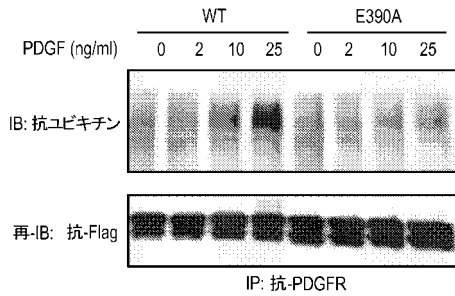
【図 2 6 A】



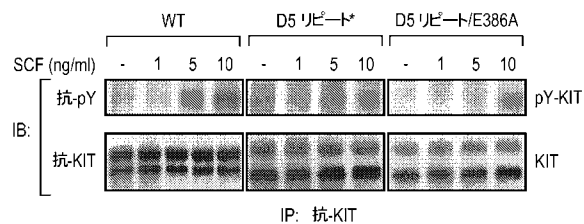
【図 2 6 B】



【図 2 6 C】

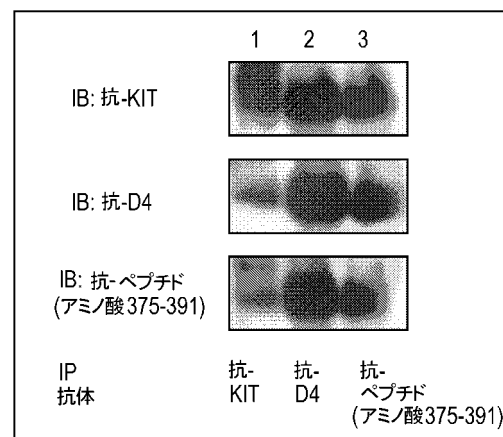


【図 2 7】



\*A502/Y503の発癌性D5リポート

【図 2 8】



## 【配列表】

2010529127000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成22年2月19日(2010.2.19)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ヒト受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインに結合する部分(moiety)であって、該受容体型チロシンキナーゼの該外部ドメインを不活性状態に留め、それによって該受容体型チロシンキナーゼの活性に拮抗する部分。

## 【請求項2】

ヒト受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合する、請求項1記載の部分。

## 【請求項3】

Ig様ドメインが

(a)受容体型チロシンキナーゼに対するリガンドの結合に関与しない；または

(b)受容体型チロシンキナーゼに対するリガンドの結合に関与する、

請求項2記載の部分。

## 【請求項4】

(a)受容体型チロシンキナーゼと該受容体型チロシンキナーゼのリガンドの相互作用を妨げない；

(b)受容体型チロシンキナーゼと該受容体型チロシンキナーゼのリガンドの相互作用を妨げる；

(c)受容体型チロシンキナーゼの二量体化を妨害しない；

(d)受容体型チロシンキナーゼの二量体化を妨害する；または

(e)受容体型チロシンキナーゼの各プロトマーに由来する外部ドメインの膜近位領域間の相互作用を妨害する、  
部分であって；任意で、

(I)該相互作用が

(i)同型である、もしくは

(ii)異型である；または

(II)外部ドメインの該膜近位領域が、III型受容体型チロシンキナーゼのD4ドメイン、III型受容体型チロシンキナーゼのD5ドメイン、III型受容体型チロシンキナーゼのD3-D4ヒンジ領域、III型受容体型チロシンキナーゼのD4-D5ヒンジ領域、V型受容体型チロシンキナーゼのD6-D7ヒンジ領域、およびV型受容体型チロシンキナーゼのD7ドメインからなる群より選択される；または

(III)受容体型チロシンキナーゼの各プロトマーに由来する外部ドメインの膜近位領域を、20 Åを超える距離だけ離れさせる、  
請求項1記載の部分。

## 【請求項5】

受容体型チロシンキナーゼがIII型受容体型チロシンキナーゼであって；任意で、

(a)III型受容体型チロシンキナーゼが、Kit、PDGFR $\alpha$ 、PDGFR $\beta$ 、CSF1R、およびFlk2からなる群より選択される；

(b)III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基309～413番に結合する；

(c)III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基410～519番に結合する；

(d) III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Gluに結合する；

(e) III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基<sup>418</sup>Tyrおよび<sup>505</sup>Asnに結合する；

(f) III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体の変異D5ドメインに結合し、該変異D5ドメインが、Thr417、Tyr418、Asp419、Leu421、Arg420、Tyr503、およびAla502からなる群より選択されるアミノ酸残基に点変異を含む；

(g) III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される1個または複数のアミノ酸残基に結合し；任意で、

(i) 部分が

**K218, S220, Y221, L222, F340, P341, K342, N367, E368, S369, N370, I371, および Y373**

からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する；もしくは

(ii) 部分が

**Y350, R353, F355, K358, L379, T380, R381, L382, E386, および T390**

からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する；または

(h) III型受容体型チロシンキナーゼがPDGFR α またはPDGFR β であり；任意で、該III型受容体型チロシンキナーゼがPDGFR β であり、部分がヒトPDGFR β のアミノ酸残基<sup>385</sup>Argおよび<sup>390</sup>Gluに結合する、

請求項1記載の部分。

【請求項6】

Ig様ドメインが

(a) III型受容体型チロシンキナーゼのD4ドメインであり；任意で、部分がD4相互作用部位の次のコンセンサス配列：

**LX<sub>1</sub>RX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>G**

に結合する部分であって、配列中、Lがロイシンであり、Rがアルギニンであり、Gがグリシンであり；X<sub>1</sub>が、トレオニン、イソロイシン、バリン、プロリン、アスパラギン、またはリジンからなる群より選択され；X<sub>2</sub>が、ロイシン、バリン、アラニン、およびメチオニンからなる群より選択され；X<sub>3</sub>が、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、およびアルギニンからなる群より選択され；X<sub>4</sub>が、グリシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、プロリン、およびメチオニンからなる群より選択され；X<sub>5</sub>が、トレオニン、セリン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、およびアスパラギン酸からなる群より選択され；X<sub>6</sub>が、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびグルタミンからなる群より選択され；かつ、X<sub>7</sub>が、グリシン、セリン、アラニン、リジン、アルギニン、グルタミン、およびトレオニンからなる群より選択される；または

(b) III型受容体型チロシンキナーゼのD5ドメインである、

請求項2記載の部分。

【請求項7】

受容体型チロシンキナーゼ上の立体構造エピトープに結合する、請求項1記載の部分。

【請求項8】

III型受容体型チロシンキナーゼ上の立体構造エピトープに結合し；任意で、

該立体構造エピトープが、受容体型チロシンキナーゼのD4ドメインおよび/またはD5ドメイン中の2個以上の残基から構成される；

該立体構造エピトープが、受容体型チロシンキナーゼのD2-D3ヒンジ領域、D3-D4ヒンジ領域、および/またはD4-D5ヒンジ領域中の2個以上の残基から構成される；

該立体構造エピトープが、

E33, P34, D72, E76,  
N77, K78, Q79, K158, D159, N250, S251, Q252, T253, K254, L255, N260, W262,  
H264, G265, E344, N352, R353, F355, T356, D357, Y362, S365, E366, N367,  
N370, および G466

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；または、

該III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、該立体構造エピトープが、表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される2個以上の残基から構成され；任意で、

(a) 立体構造エピトープが、Y125、H180、R181、K203、V204、R205、P206、V238、S239、S240、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(b) 立体構造エピトープが、P206、F208、V238、およびS239からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(c) 立体構造エピトープが、K127、A207、F208、およびT295からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(d) 立体構造エピトープが、L222、A339、F340、K342、E368、S369、N370、I371、およびY373からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(e) 立体構造エピトープが、L222、L223、E306、V308、F312、E338、F340、およびI371からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(f) 立体構造エピトープが、R224、V308、K310、G311、F340、P341、およびD398からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(g) 立体構造エピトープが、K218、A219、S220、N367、E368、およびS369からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(h) 立体構造エピトープが、K218、A220、E368、およびS369からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(i) 立体構造エピトープが、G384、T385、T411、K412、E414、およびK471からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(j) 立体構造エピトープが、Y408、F433、G470、K471、およびL472からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(k) 立体構造エピトープが、F324、V325、N326、およびN410からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(l) 立体構造エピトープが、D327、N410、T411、K412、およびV497からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(m) 立体構造エピトープが、G384、G387、V409、およびK471からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(n) 立体構造エピトープが、L382、G387、V407、およびV409からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(o) 立体構造エピトープが、Y125、G126、H180、R181、K203、V204、R205、P206、F208、V238、S239、S240、S241、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(p) 立体構造エピトープが、P206、F208、V238、およびS239からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(q) 立体構造エピトープが、K218、S220、Y221、L222、F340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、およびY373からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(r) 立体構造エピトープが、G384、G387、G388、Y408、V409、T411、F433、F469、G470、およびK471からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(s) 立体構造エピトープが、D327、T411、K412、E414、A431、G432、およびK471か

らなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；

(t) 立体構造エピトープが、Y350、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される；または

(u) 立体構造エピトープが、Y350、R353、およびF355からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、

請求項5記載の部分。

【請求項9】

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、立体構造エピトープが、表5に挙げるペプチドより選択される2個以上のアミノ酸残基から構成される、または、

立体構造エピトープが、第1のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸残基および第2のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸から構成され、該第1のペプチドおよび該第2のペプチドが表5に挙げるペプチドの群より選択され；任意で、

(a) 第1のペプチドがAla219～Leu222であり、第2のペプチドがThr304～Val308である

；

(b) 第1のペプチドがAsp309～Gly311であり、第2のペプチドがArg224～Gly226である

；

(c) 第1のペプチドがThr303～Glu306であり、第2のペプチドがAla219～Leu222である

；

(d) 第1のペプチドがAsn367～Asn370であり、第2のペプチドがSer217～Tyr221である

；

(e) 第1のペプチドがAla339～Pro343であり、第2のペプチドがAsn396～Val399である

；

(f) 第1のペプチドがAla339～Pro343であり、第2のペプチドがGlu368～Arg372である

；

(g) 第1のペプチドがLys358～Tyr362であり、第2のペプチドがVal374～His378である

；

(h) 第1のペプチドがAsp357～Glu360であり、第2のペプチドがLeu377～Thr380である

；

(i) 第1のペプチドがMet351～Glu360であり、第2のペプチドがHis378～Thr389である

；

(j) 第1のペプチドがHis378～Thr389であり、第2のペプチドがVal323～Asp332である

；

(k) 第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがAla493～Thr500である

；

(l) 第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがAla431～Thr437である

；

(m) 第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがPhe469～Val473である

；

(n) 第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがVal325～Asn330である

；

(o) 第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがArg381～Gly387である

；

(p) 第1のペプチドがGly466～Leu472であり、第2のペプチドがGly384～Gly388である

；

(q) 第1のペプチドがVal325～Glu329であり、第2のペプチドがTyr494～Lys499である

；

(r) 第1のペプチドがThr411～Ile416であり、第2のペプチドがVal497～Ala502である

；

(s) 第1のペプチドがIle415～Leu421であり、第2のペプチドがAla502～Ala507である

；

(t) 第1のペプチドがAla502～Ala507であり、第2のペプチドがLys484～Thr488である；もしくは

(u) 第1のペプチドがAla502～Ala507であり、第2のペプチドがGly445～Cys450である、  
請求項8記載の部分。

【請求項10】

受容体型チロシンキナーゼがVEGF受容体ファミリーのメンバーであり；任意で、

該VEGF受容体ファミリーのメンバーが、VEGFR-1(Flt1)、VEGFR-2(Flk1)、およびVEGFR-3(Flt4)からなる群より選択される；または

該VEGF受容体ファミリーのメンバーのD7ドメインに結合し；任意で、部分がVEGF受容体ファミリーのメンバーのD7ドメインの次のコンセンサス配列：

**IX<sub>1</sub>RVX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EDX<sub>4</sub>G (SEQ ID NO: 1)**

に結合する部分であって、配列中、Iがイソロイシンであり、Rがアルギニンであり、Eがグルタミン酸であり、Dがアスパラギン酸であり、Gがグリシンであり；X<sub>1</sub>が、グルタミン酸、アルギニン、およびグルタミンからなる群より選択され；X<sub>2</sub>が、アルギニンおよびトレオニンからなる群より選択され；X<sub>3</sub>が、グルタミン酸およびリジンからなる群より選択され；かつ、X<sub>4</sub>が、グルタミン酸およびアラニンからなる群より選択される、  
請求項1記載の部分。

【請求項11】

(a) リガンドによって誘導される受容体型チロシンキナーゼのチロシン自己リン酸化を妨げる；

(b) リガンドによって誘導される受容体型チロシンキナーゼの内在化を妨げる；または

(c) 単離された抗体もしくはその抗原結合部であり；任意で、

(i) 抗体またはその抗原結合部が、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、およびキメラ抗体からなる群より選択され；任意で、抗体またはその抗原結合部が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、およびIgEの定常領域からなる群より選択される重鎖定常領域を含み；任意で、抗体重鎖定常領域がIgG1である；

(ii) 抗体またはその抗原結合部が、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、単鎖Fv断片、SMIP、アフィボディ、アビマー、ナノボディ、および単一ドメイン抗体からなる群より選択される；または

(iii) 抗体またはその抗原結合部が、 $1 \times 10^{-7}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $5 \times 10^{-8}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $1 \times 10^{-8}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $5 \times 10^{-9}$ Mまたはそれ未満からなる群より選択されるKDで受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合する、

請求項1記載の部分。

【請求項12】

請求項11記載の抗体またはその抗原結合部を産生するハイブリドーマ。

【請求項13】

(i) 低分子であり；任意で、

(a) 表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する；

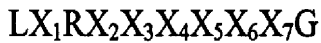
(b) K218、S220、Y221、L222、F340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、およびY373からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する；もしくは

(c) Y350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する；

(ii) ペプチド分子であり；任意で、

(a) ペプチド分子が受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに基づいて設計され；任意で、該ペプチド分子がヒトKit受容体のD4ドメインに基づいて設計される；

(b) ペプチド分子が次の構造：



を含む部分であって、配列中、Lがロイシンであり、Rがアルギニンであり、Gがグリシンであり； $\text{X}_1$ が、トレオニン、イソロイシン、バリン、プロリン、アスパラギン、またはリジンからなる群より選択され； $\text{X}_2$ が、ロイシン、バリン、アラニン、およびメチオニンからなる群より選択され； $\text{X}_3$ が、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、およびアルギニンからなる群より選択され； $\text{X}_4$ が、グリシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、プロリン、およびメチオニンからなる群より選択され； $\text{X}_5$ が、トレオニン、セリン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、およびアスパラギン酸からなる群より選択され； $\text{X}_6$ が、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびグルタミンからなる群より選択され；かつ、 $\text{X}_7$ が、グリシン、セリン、アラニン、リジン、アルギニン、グルタミン、およびトレオニンからなる群より選択される；

(c) ペプチド分子が、ヒトKit受容体のアミノ酸残基309～413番に少なくとも80%同一である構造を含む；

(d) ペプチド分子がヒトKit受容体のD5ドメインに基づいて設計され；任意で、該ペプチド分子が、ヒトKit受容体のアミノ酸残基410～519番に少なくとも80%同一である構造を含む；もしくは

(e) ペプチド分子が少なくとも1つのD-アミノ酸残基を含む、または

(iii) アドネクチンである、

請求項1記載の部分。

#### 【請求項14】

(i) ヒトKit受容体のIg様ドメインまたはヒンジ領域上の立体構造エピトープに結合する部分であって、該部分が該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、それによって該ヒトKit受容体の活性に拮抗し、かつ、該立体構造エピトープが表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される2個以上の残基から構成される；

(ii) ヒトKit受容体のアミノ酸残基309～413番および/または410～519番に結合し、それによって該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗する；または

(iii) ヒトIII型受容体型チロシンキナーゼのD2-D3ヒンジ領域、D3-D4ヒンジ領域、および/またはD4-D5ヒンジ領域に結合する部分であって、該受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留め、それによって該受容体型チロシンキナーゼの活性に拮抗し；任意で、

(a) III型受容体型チロシンキナーゼが、Kit、PDGFR $\alpha$ 、PDGFR $\beta$ 、CSF1R、およびFlk2からなる群より選択され；任意で、III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体である；もしくは

(b) 単離された抗体またはその抗原結合部；低分子；ペプチド分子；およびアドネクチンからなる群より選択される、部分。

#### 【請求項15】

請求項1～請求項14のいずれか一項記載の部分と薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物。

#### 【請求項16】

(a) 受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合し、受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定するための方法であって、以下の段階を含む方法：

受容体型チロシンキナーゼを候補部分と接触させる段階；

該受容体型チロシンキナーゼを該受容体型チロシンキナーゼのリガンドと同時にまたは逐次的に接触させる段階；ならびに

該部分が、該リガンドによって誘導される二量体受容体型チロシンキナーゼのIg様ド

メインの位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼすかどうかを判定し、それによって受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合する部分を同定する段階；または

(b) III型受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定するための方法であって、以下の段階を含む方法：

III型受容体型チロシンキナーゼを候補部分と接触させる段階；

該受容体型チロシンキナーゼを該受容体型チロシンキナーゼのリガンドと同時にまたは逐次的に接触させる段階；および

該部分が、該リガンドによって誘導される二量体受容体型チロシンキナーゼのD4-D4ドメインまたはD5-D5ドメインの位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼすかどうかを判定し、それによってIII型受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定する段階。

【請求項 17】

(a) ヒトKit受容体のIg様ドメインまたはヒンジ領域上の立体構造エピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合部であって、該抗体またはその抗原結合部が、該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、それによって該ヒトKit受容体の活性に拮抗し、かつ、該立体構造エピトープが、表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される2個以上の残基から構成される；

(b) ヒトKit受容体のアミノ酸残基309～413番および/または410～519番に結合し、それによって該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗する；

(c) ヒトKit受容体のK218、S220、Y221、L222、F340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、およびY373からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合し、それによって該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗する；または

(d) ヒトKit受容体のY350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合し、それによって該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗する、

単離された抗体またはその抗原結合部。

【請求項 18】

(a)

YHRKVRPVSSHGDFNY (SEQ ID NO: 71), PFVS (SEQ ID NO: 72), KAFT (SEQ ID NO: 73), LAFKESNIY (SEQ ID NO: 74), LLEVFEFI (SEQ ID NO: 75), RVKGFPD (SEQ ID NO: 76), KASNES (SEQ ID NO: 77), KAES (SEQ ID NO: 78), GTTKEK (SEQ ID NO: 79), YFGKL (SEQ ID NO: 80), FVNN (SEQ ID NO: 81), DNTKV (SEQ ID NO: 82), GGVK (SEQ ID NO: 83), LGVV (SEQ ID NO: 84), YGHRKVRPFVSSSHGDFNY (SEQ ID NO: 85), PFVS (SEQ ID NO: 72), KSYLFPKNESNIY (SEQ ID NO: 86), GGGYVTFFGK (SEQ ID NO: 87), DTKEAGK (SEQ ID NO: 88), YFKLTRLET (SEQ ID NO: 89), YRF, ASYLTLEV (SEQ ID NO: 5), DKGREG (SEQ ID NO: 6), TTLEASYL (SEQ ID NO: 11), NESNSKASY (SEQ ID NO: 15), AFKPNSDV (SEQ ID NO: 18), AFKPESNIR (SEQ ID NO: 20), KWEDYVSELH (SEQ ID NO: 28), DKWELHLT (SEQ ID NO: 31), MNRTFTDKWEHLTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 33), VNTKPEIAYNDVGKT (SEQ ID NO: 37), VNTKPEIAGFPEPT (SEQ ID NO: 39), VNTKPEI FGKLV (SEQ ID NO: 41), VNTKPEIVNDGEN (SEQ ID NO: 43), VNTKPEIRLKGTEG (SEQ ID NO: 45), GPPFGKLGTEGG (SEQ ID NO: 48), VNDGEYNDVGK (SEQ ID NO: 51), TKPEILVGK TSA (SEQ ID NO: 63), ILTYDRLAYFNFA (SEQ ID NO: 66), AYFNFAKHNGT (SEQ ID NO: 68), および AYFNFAAGTEQRC (SEQ ID NO: 70)

；または

(b)

YHRKVRPVSSHGDFNY (SEQ ID NO: 71), PFVS (SEQ ID NO: 72), KAFT (SEQ ID NO: 73), LAFKESNIY (SEQ ID NO: 74), LLEVFEFI (SEQ ID NO: 75), RVKGFPD (SEQ ID NO: 76), KASNES (SEQ ID NO: 77), KAES (SEQ ID NO: 78), GTTKEK (SEQ ID NO: 79), YFGKL (SEQ ID NO: 80), FVNN (SEQ ID NO: 81), DNTKV (SEQ ID NO: 82), GGVK (SEQ ID NO: 83), LGVV (SEQ ID NO: 84), YGHRKVRPFVSSSHGDFNY (SEQ ID NO: 85), PFVS (SEQ ID NO: 72), KSYLFPKNESNIY (SEQ ID NO: 86), GGGYVTFFGK (SEQ ID NO: 87), DTKEAGK (SEQ ID NO: 88), YFKLTRLET (SEQ ID NO: 89), YRF, EVVDKGFIN (SEQ ID NO: 2), ASYL (SEQ ID NO: 3), TLEV (SEQ ID NO: 4), ASYLTLEV (SEQ ID NO: 5),

DKG, REG, DKGREG (SEQ ID NO: 6), VVSVSKASYLL (SEQ ID NO: 7),  
 VTTTLEVVD (SEQ ID NO: 8), REGEEFTVTCTI (SEQ ID NO: 9), TTLE (SEQ ID  
 NO: 10), TTLEASYL (SEQ ID NO: 11), KSENESENIR (SEQ ID NO: 12), NESN (SEQ  
 ID NO: 13), SKASY (SEQ ID NO: 14), NESNSKASY (SEQ ID NO: 15), AFPKP (SEQ  
 ID NO: 16), NSDV (SEQ ID NO: 17), AFPKPNSDV (SEQ ID NO: 18), ESNIR (SEQ  
 ID NO: 19), AFPKPESNIR (SEQ ID NO: 20), DKWEDYPKSE (SEQ ID NO: 21),  
 IRYVSELHL (SEQ ID NO: 22), LTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 23), GENVDLIVEYE  
 (SEQ ID NO: 24), MNRTFTDKWE (SEQ ID NO: 25), KWEDY (SEQ ID NO: 26),  
 VSELH (SEQ ID NO: 27), KWEDYVSELH (SEQ ID NO: 28), DKWE (SEQ ID NO:  
 29), LHLT (SEQ ID NO: 30), DKWELHLT (SEQ ID NO: 31), HLTRLKGTEGGT  
 (SEQ ID NO: 32), MNRTFTDKWE (SEQ ID NO: 25), HLTRLKGTEGGT (SEQ ID  
 NO: 32), MNRTFTDKWEHLTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 33), VVVNDGENVD  
 (SEQ ID NO: 34), VNTKPEI (SEQ ID NO: 35), AYNDVGKT (SEQ ID NO: 36),  
 VNTKPEIAYNDVGKT (SEQ ID NO: 37), AGFPEPT (SEQ ID NO: 38),  
 VNTKPEIAGFPEPT (SEQ ID NO: 39), FGKLV (SEQ ID NO: 40), VNTKPEI FGKLV  
 (SEQ ID NO: 41), VNDGEN (SEQ ID NO: 42), VNTKPEIVNDGEN (SEQ ID NO:  
 43), RLKGTEG (SEQ ID NO: 44), VNTKPEIRLKGTEG (SEQ ID NO: 45), GPPFGKL  
 (SEQ ID NO: 46), GTEGG (SEQ ID NO: 47), GPPFGKLGTEGG (SEQ ID NO: 48),  
 VNDGE (SEQ ID NO: 49), YNDVGK (SEQ ID NO: 50), VNDGEYNDVGK (SEQ ID  
 NO: 51), TKPEILTYDRL (SEQ ID NO: 52), DRLVNGMLQC (SEQ ID NO: 53),  
 GKTSAYFNFAFK (SEQ ID NO: 54), CPGTEQRCSAS (SEQ ID NO: 55),  
 CSASVLPVDVQ (SEQ ID NO: 56), DSSAFKHNGT (SEQ ID NO: 57),  
 GTVECKAYND (SEQ ID NO: 58), LNSSGPPFGKL (SEQ ID NO: 59),  
 FAFKGNNKEQI (SEQ ID NO: 60), TKPEIL (SEQ ID NO: 61), VGKTS (SEQ ID  
 NO: 62), TKPEILVGKTS (SEQ ID NO: 63), ILTYDRL (SEQ ID NO: 64), AYFNFA  
 (SEQ ID NO: 65), ILTYDRLAYFNFA (SEQ ID NO: 66), KHNGT (SEQ ID NO: 67),  
 AYFNFAKHNGT (SEQ ID NO: 68), GTEQRC (SEQ ID NO: 69), および  
 AYFNFAGTEQRC (SEQ ID NO: 70)

からなる群より選択される構造を含む、  
 ペプチド分子。

【請求項 19】

対象において受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患を治療または予防するための薬  
 剤調製における請求項 1 記載の部分の使用。

【請求項 20】

受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患が、癌、加齢黄斑変性症 (AMD)、アテローム  
 性動脈硬化症、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、および疼痛に関連した疾患からなる群よ  
 り選択される、請求項 19 記載の使用。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0034

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0034】

本発明のその他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかになるであろう。

〔請求項1001〕

ヒト受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインに結合する部分(moiety)であって、該受容体型チロシンキナーゼの該外部ドメインを不活性状態に留め、それによって、該受容体型チロシンキナーゼの活性に拮抗する部分。

〔請求項1002〕

ヒト受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合する、請求項1001記載の部分。

〔請求項1003〕

Ig様ドメインが受容体型チロシンキナーゼに対するリガンドの結合に関与しない、請求項1002記載の部分。

〔請求項1004〕

Ig様ドメインが受容体型チロシンキナーゼに対するリガンドの結合に関与する、請求項1002記載の部分。

〔請求項1005〕

受容体型チロシンキナーゼと該受容体型チロシンキナーゼのリガンドの相互作用を妨げない、請求項1001記載の部分。

〔請求項1006〕

受容体型チロシンキナーゼと該受容体型チロシンキナーゼのリガンドの相互作用を妨げる、請求項1001記載の部分。

〔請求項1007〕

受容体型チロシンキナーゼの二量体化を妨害しない、請求項1001記載の部分。

〔請求項1008〕

受容体型チロシンキナーゼの二量体化を妨害する、請求項1001記載の部分。

〔請求項1009〕

受容体型チロシンキナーゼの各プロトマーに由来する外部ドメインの膜近位領域間の相互作用を妨害する、請求項1001記載の部分。

〔請求項1010〕

相互作用が同型である、請求項1009記載の部分。

〔請求項1011〕

相互作用が異型である、請求項1009記載の部分。

〔請求項1012〕

外部ドメインの膜近位領域が、III型受容体型チロシンキナーゼのD4ドメイン、III型受容体型チロシンキナーゼのD5ドメイン、III型受容体型チロシンキナーゼのD3-D4ヒンジ領域、III型受容体型チロシンキナーゼのD4-D5ヒンジ領域、V型受容体型チロシンキナーゼのD6-D7ヒンジ領域、およびV型受容体型チロシンキナーゼのD7ドメインからなる群より選択される、請求項1009記載の部分。

〔請求項1013〕

受容体型チロシンキナーゼの各プロトマーに由来する外部ドメインの膜近位領域を、20 Åを超える距離だけ離れさせる、請求項1009記載の部分。

〔請求項1014〕

受容体型チロシンキナーゼがIII型受容体型チロシンキナーゼである、請求項1001記載の部分。

〔請求項1015〕

III型受容体型チロシンキナーゼが、Kit、PDGFR  $\alpha$ 、PDGFR  $\beta$ 、CSF1R、およびFlk2からなる群より選択される、請求項1014記載の部分。

〔請求項1016〕

Ig様ドメインがIII型受容体型チロシンキナーゼのD4ドメインである、請求項1002記載の部分。

〔請求項1017〕

D4相互作用部位の次のコンセンサス配列：

**LX<sub>1</sub>RX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>G**

に結合する部分であって、

配列中、Lがロイシンであり、Rがアルギニンであり、Gがグリシンであり；X<sub>1</sub>が、トレオニン、イソロイシン、バリン、プロリン、アスパラギン、またはリジンからなる群より選択され；X<sub>2</sub>が、ロイシン、バリン、アラニン、およびメチオニンからなる群より選択され；X<sub>3</sub>が、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、およびアルギニンからなる群より選択され；X<sub>4</sub>が、グリシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、プロリン、およびメチオニンからなる群より選択され；X<sub>5</sub>が、トレオニン、セリン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、およびアスパラギン酸からなる群より選択され；X<sub>6</sub>が、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびグルタミンからなる群より選択され；かつ、X<sub>7</sub>が、グリシン、セリン、アラニン、リジン、アルギニン、グルタミン、およびトレオニンからなる群より選択される、請求項1016記載の部分。

〔請求項1018〕

Ig様ドメインがIII型受容体型チロシンキナーゼのD5ドメインである、請求項1002記載の部分。

〔請求項1019〕

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基309～413番に結合する、請求項1014記載の部分。

〔請求項1020〕

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基410～519番に結合する、請求項1014記載の部分。

〔請求項1021〕

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基<sup>381</sup>Argおよび<sup>386</sup>Gluに結合する、請求項1014記載の部分。

〔請求項1022〕

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体のアミノ酸残基<sup>418</sup>Tyrおよび<sup>505</sup>Asnに結合する、請求項1014記載の部分。

〔請求項1023〕

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が該ヒトKit受容体の変異D5ドメインに結合し、該変異D5ドメインが、Thr417、Tyr418、Asp419、Leu421、Arg420、Tyr503、およびAla502からなる群より選択されるアミノ酸残基に点変異を含む、請求項1014記載の部分。

〔請求項1024〕

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、部分が表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される1個または複数個のアミノ酸残基に結合する、請求項1014記載の部分。

〔請求項1025〕

**K218, S220, Y221, L222, F340, P341, K342, N367, E368, S369, N370, I371, および Y373**

からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する、請求項1024記載の部分。

〔請求項1026〕

**Y350, R353, F355, K358, L379, T380, R381, L382, E386, および T390**

からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する、請求項1024記載の部分。

[請求項1027]

III型受容体型チロシンキナーゼがPDGFR α またはPDGFR β である、請求項1014記載の部分。

[請求項1028]

III型受容体型チロシンキナーゼがPDGFR β であり、ヒトPDGFR β のアミノ酸残基<sup>385</sup>Argおよび<sup>390</sup>Gluに結合する、請求項1027記載の部分。

[請求項1029]

受容体型チロシンキナーゼ上の立体構造エピトープに結合する、請求項1001記載の部分。

[請求項1030]

III型受容体型チロシンキナーゼ上の立体構造エピトープに結合する、請求項1014記載の部分。

[請求項1031]

立体構造エピトープが、受容体型チロシンキナーゼのD4ドメインおよび/またはD5ドメイン中の2個以上の残基から構成される、請求項1030記載の部分。

[請求項1032]

立体構造エピトープが、受容体型チロシンキナーゼのD2-D3ヒンジ領域、D3-D4ヒンジ領域、および/またはD4-D5ヒンジ領域中の2個以上の残基から構成される、請求項1030記載の部分。

[請求項1033]

立体構造エピトープが、

**E33, P34, D72, E76,**

**N77, K78, Q79, K158, D159, N250, S251, Q252, T253, K254, L255, N260, W262,**

**H264, G265, E344, N352, R353, F355, T356, D357, Y362, S365, E366, N367,**

**N370, および G466**

からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1030記載の部分。

[請求項1034]

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、立体構造エピトープが、表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される2個以上の残基から構成される、請求項1030記載の部分。

[請求項1035]

立体構造エピトープが、Y125、H180、R181、K203、V204、R205、P206、V238、S239、S240、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

[請求項1036]

立体構造エピトープが、P206、F208、V238、およびS239からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

[請求項1037]

立体構造エピトープが、K127、A207、F208、およびT295からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

[請求項1038]

立体構造エピトープが、L222、A339、F340、K342、E368、S369、N370、I371、およびY373からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

[請求項1039]

立体構造エピトープが、L222、L223、E306、V308、F312、E338、F340、およびI371からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1040〕

立体構造エピトープが、R224、V308、K310、G311、F340、P341、およびD398からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1041〕

立体構造エピトープが、K218、A219、S220、N367、E368、およびS369からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1042〕

立体構造エピトープが、K218、A220、E368、およびS369からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1043〕

立体構造エピトープが、G384、T385、T411、K412、E414、およびK471からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1044〕

立体構造エピトープが、Y408、F433、G470、K471、およびL472からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1045〕

立体構造エピトープが、F324、V325、N326、およびN410からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1046〕

立体構造エピトープが、D327、N410、T411、K412、およびV497からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1047〕

立体構造エピトープが、G384、G387、V409、およびK471からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1048〕

立体構造エピトープが、L382、G387、V407、およびV409からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1049〕

立体構造エピトープが、Y125、G126、H180、R181、K203、V204、R205、P206、F208、V238、S239、S240、S241、H263、G265、D266、F267、N268、およびY269からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1050〕

立体構造エピトープが、P206、F208、V238、およびS239からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1051〕

立体構造エピトープが、K218、S220、Y221、L222、F340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、およびY373からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1052〕

立体構造エピトープが、G384、G387、G388、Y408、V409、T411、F433、F469、G470、およびK471からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1053〕

立体構造エピトープが、D327、T411、K412、E414、A431、G432、およびK471からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

〔請求項1054〕

立体構造エピトープが、Y350、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

[請求項1055]

立体構造エピトープが、Y350、R353、およびF355からなる群より選択される2個以上のアミノ酸から構成される、請求項1034記載の部分。

[請求項1056]

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体であり、立体構造エピトープが、表5に挙げるペプチドより選択される2個以上のアミノ酸残基から構成される、請求項1030記載の部分。

[請求項1057]

立体構造エピトープが、第1のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸残基および第2のペプチドより選択される1個または複数個のアミノ酸から構成され、該第1のペプチドおよび該第2のペプチドが、表5に挙げるペプチドの群より選択される、請求項1030記載の部分。

[請求項1058]

第1のペプチドがAla219～Leu222であり、第2のペプチドがThr304～Val308である、請求項1057記載の部分。

[請求項1059]

第1のペプチドがAsp309～Gly311であり、第2のペプチドがArg224～Gly226である、請求項1057記載の部分。

[請求項1060]

第1のペプチドがThr303～Glu306であり、第2のペプチドがAla219～Leu222である、請求項1057記載の部分。

[請求項1061]

第1のペプチドがAsn367～Asn370であり、第2のペプチドがSer217～Tyr221である、請求項1057記載の部分。

[請求項1062]

第1のペプチドがAla339～Pro343であり、第2のペプチドがAsn396～Val399である、請求項1057記載の部分。

[請求項1063]

第1のペプチドがAla339～Pro343であり、第2のペプチドがGlu368～Arg372である、請求項1057記載の部分。

[請求項1064]

第1のペプチドがLys358～Tyr362であり、第2のペプチドがVal374～His378である、請求項1057記載の部分。

[請求項1065]

第1のペプチドがAsp357～Glu360であり、第2のペプチドがLeu377～Thr380である、請求項1057記載の部分。

[請求項1066]

第1のペプチドがMet351～Glu360であり、第2のペプチドがHis378～Thr389である、請求項1057記載の部分。

[請求項1067]

第1のペプチドがHis378～Thr389であり、第2のペプチドがVal323～Asp332である、請求項1057記載の部分。

[請求項1068]

第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがAla493～Thr500である、請求項1057記載の部分。

[請求項1069]

第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがAla431～Thr437である、請求項1057記載の部分。

[請求項1070]

第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがPhe469～Val473である、請求

項1057記載の部分。

[請求項1071]

第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがVal325～Asn330である、請求項1057記載の部分。

[請求項1072]

第1のペプチドがVal409～Ile415であり、第2のペプチドがArg381～Gly387である、請求項1057記載の部分。

[請求項1073]

第1のペプチドがGly466～Leu472であり、第2のペプチドがGly384～Gly388である、請求項1057記載の部分。

[請求項1074]

第1のペプチドがVal325～Glu329であり、第2のペプチドがTyr494～Lys499である、請求項1057記載の部分。

[請求項1075]

第1のペプチドがThr411～Ile416であり、第2のペプチドがVal497～Ala502である、請求項1057記載の部分。

[請求項1076]

第1のペプチドがIle415～Leu421であり、第2のペプチドがAla502～Ala507である、請求項1057記載の部分。

[請求項1077]

第1のペプチドがAla502～Ala507であり、第2のペプチドがLys484～Thr488である、請求項1057記載の部分。

[請求項1078]

第1のペプチドがAla502～Ala507であり、第2のペプチドがGly445～Cys450である、請求項1057記載の部分。

[請求項1079]

受容体型チロシンキナーゼがVEGF受容体ファミリーのメンバーである、請求項1001記載の部分。

[請求項1080]

VEGF受容体ファミリーのメンバーが、VEGFR-1(Flt1)、VEGFR-2(Flk1)、およびVEGFR-3(Flt4)からなる群より選択される、請求項1079記載の部分。

[請求項1081]

VEGF受容体ファミリーのメンバーのD7ドメインに結合する、請求項1079記載の部分。

[請求項1082]

VEGF受容体ファミリーのメンバーのD7ドメインの次のコンセンサス配列:

**IX<sub>1</sub>RVX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>EDX<sub>4</sub>G (SEQ ID NO: 1)**

に結合する部分であって、

配列中、Iがイソロイシンであり、Rがアルギニンであり、Eがグルタミン酸であり、Dがアスパラギン酸であり、Gがグリシンであり;X<sub>1</sub>が、グルタミン酸、アルギニン、およびグルタミンからなる群より選択され;X<sub>2</sub>が、アルギニンおよびトレオニンからなる群より選択され;X<sub>3</sub>が、グルタミン酸およびリジンからなる群より選択され;かつ、X<sub>4</sub>が、グルタミン酸およびアラニンからなる群より選択される、

請求項1081記載の部分。

[請求項1083]

リガンドによって誘導される受容体型チロシンキナーゼのチロシン自己リン酸化を妨げる、請求項1001記載の部分。

[請求項1084]

リガンドによって誘導される受容体型チロシンキナーゼの内在化を妨げる、請求項1001記載の部分。

[請求項1085]

単離された抗体またはその抗原結合部である、請求項1001記載の部分。

[請求項1086]

抗体またはその抗原結合部が、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、およびキメラ抗体からなる群より選択される、請求項1085記載の部分。

[請求項1087]

抗体またはその抗原結合部が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA、およびIgEの定常領域からなる群より選択される重鎖定常領域を含む、請求項1086記載の部分。

[請求項1088]

抗体重鎖定常領域がIgG1である、請求項1087記載の部分。

[請求項1089]

抗体またはその抗原結合部が、Fab断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、単鎖Fv断片、SMIP、アフィボディ、アビマー、ナノボディ、および単一ドメイン抗体からなる群より選択される、請求項1085記載の部分。

[請求項1090]

抗体またはその抗原結合部が、 $1 \times 10^{-7}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $5 \times 10^{-8}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $1 \times 10^{-8}$ Mまたはそれ未満、より好ましくは $5 \times 10^{-9}$ Mまたはそれ未満からなる群より選択されるKDで受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合する、請求項1085記載の部分。

[請求項1091]

請求項1085～請求項1090のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合部を産生するハイブリドーマ。

[請求項1092]

低分子である、請求項1001記載の部分。

[請求項1093]

表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する、請求項1092記載の部分。

[請求項1094]

K218、S220、Y221、L222、F340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、およびY373からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する、請求項1092記載の部分。

[請求項1095]

Y350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合する、請求項1092記載の部分。

[請求項1096]

ペプチド分子である、請求項1001記載の部分。

[請求項1097]

ペプチド分子が受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに基づいて設計される、請求項1096記載の部分。

[請求項1098]

ペプチド分子がヒトKit受容体のD4ドメインに基づいて設計される、請求項1097記載の部分。

[請求項1099]

ペプチド分子が次の構造:

**LX<sub>1</sub>RX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>G**

を含む部分であって、

配列中、Lがロイシンであり、Rがアルギニンであり、Gがグリシンであり;X<sub>1</sub>が、トレオニン、イソロイシン、バリン、プロリン、アスパラギン、またはリジンからなる群より選択され;X<sub>2</sub>が、ロイシン、バリン、アラニン、およびメチオニンからなる群より選択され;

X<sub>3</sub>が、リジン、ヒスチジン、アスパラギン、およびアルギニンからなる群より選択され;X<sub>4</sub>が、グリシン、バリン、アラニン、グルタミン酸、プロリン、およびメチオニンからなる群より選択され; X<sub>5</sub>が、トレオニン、セリン、グルタミン酸、アラニン、グルタミン、およびアスパラギン酸からなる群より選択され; X<sub>6</sub>が、グルタミン酸、アスパラギン酸、およびグルタミンからなる群より選択され;かつ、X<sub>7</sub>が、グリシン、セリン、アラニン、リジン、アルギニン、グルタミン、およびトレオニンからなる群より選択される、請求項1096記載の部分。

[請求項1100]

ペプチド分子が、ヒトKit受容体のアミノ酸残基309～413番に少なくとも80%同一である構造を含む、請求項1098記載の部分。

[請求項1101]

ペプチド分子がヒトKit受容体のD5ドメインに基づいて設計される、請求項1097記載の部分。

[請求項1102]

ペプチド分子が、ヒトKit受容体のアミノ酸残基410～519番に少なくとも80%同一である構造を含む、請求項1101記載の部分。

[請求項1103]

ペプチド分子が少なくとも1つのD-アミノ酸残基を含む、請求項1096記載の部分。

[請求項1104]

アドネクチンである、請求項1001記載の部分。

[請求項1105]

ヒトKit受容体のIg様ドメインまたはヒンジ領域上の立体構造エピトープに結合する部分であって、該部分が該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留めてそれにより該ヒトKit受容体の活性に拮抗し、かつ、該立体構造エピトープが表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される2個以上の残基から構成される、部分。

[請求項1106]

ヒトKit受容体のアミノ酸残基309～413番および/または410～519番に結合し、それによって、該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗する、部分。

[請求項1107]

請求項1001～請求項1090または請求項1092～請求項1106のいずれか一項記載の部分と薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物。

[請求項1108]

請求項1001～請求項1090または請求項1092～請求項1106のいずれか一項記載の部分の有効量を対象に投与し、それによって疾患を治療または予防する段階を含む、対象において受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患を治療または予防する方法。

[請求項1109]

受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患が、癌、加齢黄斑変性症(AMD)、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、および疼痛に関連した疾患からなる群より選択される、請求項1108記載の方法。

[請求項1110]

癌が、GIST、AML、およびSCLCからなる群より選択される、請求項1109記載の方法。

[請求項1111]

ヒトIII型受容体型チロシンキナーゼのD2-D3ヒンジ領域、D3-D4ヒンジ領域、および/またはD4-D5ヒンジ領域に結合する部分であって、該受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留め、それによって、該受容体型チロシンキナーゼの活性に拮抗する部分。

[請求項1112]

III型受容体型チロシンキナーゼが、Kit、PDGFR  $\alpha$ 、PDGFR  $\beta$ 、CSF1R、およびFlk2からなる群より選択される、請求項1111記載の部分。

[請求項1113]

III型受容体型チロシンキナーゼがヒトKit受容体である、請求項1112記載の部分。

[請求項1114]

単離された抗体またはその抗原結合部、低分子、ペプチド分子、およびアドネクチンからなる群より選択される、請求項1111記載の部分。

[請求項1115]

請求項1111～請求項1114のいずれか一項記載の部分と薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物。

[請求項1116]

請求項1111～請求項1114のいずれか一項記載の部分の有効量を対象に投与し、それによって疾患を治療または予防する段階を含む、対象において受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患を治療または予防する方法。

[請求項1117]

受容体型チロシンキナーゼに関連した疾患が、癌、加齢黄斑変性症(AMD)、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、および疼痛に関連した疾患からなる群より選択される、請求項1116記載の方法。

[請求項1118]

癌が、GIST、AML、およびSCLCからなる群より選択される、請求項1116記載の方法。

[請求項1119]

受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合し、該受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定するための方法であって、以下の段階を含む方法：

受容体型チロシンキナーゼを候補部分と接触させる段階；

該受容体型チロシンキナーゼを該受容体型チロシンキナーゼのリガンドと同時または逐次的に接触させる段階；および

該部分が、該リガンドによって誘導される二量体受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインの位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼすかどうかを判定することによって、該受容体型チロシンキナーゼのIg様ドメインに結合し、かつ該受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定する段階。

[請求項1120]

III型受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定するための方法であって、以下の段階を含む方法：

III型受容体型チロシンキナーゼを候補部分と接触させる段階；

該受容体型チロシンキナーゼを該受容体型チロシンキナーゼのリガンドと同時または逐次的に接触させる段階；ならびに

該部分が、該リガンドによって誘導される二量体受容体型チロシンキナーゼのD4-D4ドメインまたはD5-D5ドメインの位置付け、向き、および/またはそれらの間の距離に影響を及ぼすかどうかを判定し、それによって、該III型受容体型チロシンキナーゼの外部ドメインを不活性状態に留める部分を同定する段階。

[請求項1121]

ヒトKit受容体のIg様ドメインまたはヒンジ領域上の立体構造エピトープに結合する単離された抗体またはその抗原結合部であって、該抗体またはその抗原結合部が、該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留めてそれにより該ヒトKit受容体の活性に拮抗し、かつ、該立体構造エピトープが、表4に挙げるアミノ酸残基からなる群より選択される2個以上の残基から構成される、単離された抗体またはその抗原結合部。

[請求項1122]

ヒトKit受容体のアミノ酸残基309～413番および/または410～519番に結合し、それによって、該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗する、単離された抗体またはその抗原結合部。

[請求項1123]

ヒトKit受容体のK218、S220、Y221、L222、F340、P341、K342、N367、E368、S369、N370、I371、およびY373 からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合し、それによって、該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗する、単離された抗体またはその抗原結合部。

[請求項1124]

ヒトKit受容体のY350、R353、F355、K358、L379、T380、R381、L382、E386、およびT390からなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸残基に結合し、それによって、該ヒトKit受容体の外部ドメインを不活性状態に留め、かつ、該ヒトKit受容体の活性に拮抗する、単離された抗体またはその抗原結合部。

[請求項1125]

YHRKVRPVSSHGDFNY (SEQ ID NO: 71), PFVS (SEQ ID NO: 72), KAFT (SEQ ID NO: 73), LAFKESNIY (SEQ ID NO: 74), LLEVFEFI (SEQ ID NO: 75), RYKGFDP (SEQ ID NO: 76), KASNES (SEQ ID NO: 77), KAES (SEQ ID NO: 78), GTTKEK (SEQ ID NO: 79), YFGKL (SEQ ID NO: 80), FVNN (SEQ ID NO: 81), DNTKV (SEQ ID NO: 82), GGVK (SEQ ID NO: 83), LGVV (SEQ ID NO: 84), YGHRKVRPFVSSHGDFNY (SEQ ID NO: 85), PFVS (SEQ ID NO: 72), KSYLFPKNESNIY (SEQ ID NO: 86), GGGYVTFFGK (SEQ ID NO: 87), DTKEAGK (SEQ ID NO: 88), YFKLTRLET (SEQ ID NO: 89), YRF, ASYLTLEV (SEQ ID NO: 5), DKGREG (SEQ ID NO: 6), TTLEASYL (SEQ ID NO: 11), NESNSKASY (SEQ ID NO: 15), AFKPNSDV (SEQ ID NO: 18), AFKPESNIR (SEQ ID NO: 20), KWEDYVSELH (SEQ ID NO: 28), DKWELHLT (SEQ ID NO: 31), MNRTFTDKWEHLTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 33), VNTKPEIAYNDVGKT (SEQ ID NO: 37), VNTKPEIAGFPEPT (SEQ ID NO: 39), VNTKPEI FGKLV (SEQ ID NO: 41), VNTKPEIVNDGEN (SEQ ID NO: 43), VNTKPEIRLKGTEG (SEQ ID NO: 45), GPPFGKLGTEGG (SEQ ID NO: 48), VNDGEYNDVGK (SEQ ID NO: 51), TKPEILVGK TSA (SEQ ID NO: 63), ILTYDRLAYFNFA (SEQ ID NO: 66), AYFNFAKHNGT (SEQ ID NO: 68), および AYFNFAAGTEQRC (SEQ ID NO: 70)

からなる群より選択される構造を含むペプチド分子。

[請求項1126]

YHRKVRPVSSHGDFNY (SEQ ID NO: 71), PFVS (SEQ ID NO: 72), KAFT (SEQ ID NO: 73), LAFKESNIY (SEQ ID NO: 74), LLEVFEFI (SEQ ID NO: 75), RVKGFPD (SEQ ID NO: 76), KASNES (SEQ ID NO: 77), KAES (SEQ ID NO: 78), GTTKEK (SEQ ID NO: 79), YFGKL (SEQ ID NO: 80), FVNN (SEQ ID NO: 81), DNTKV (SEQ ID NO: 82), GGVK (SEQ ID NO: 83), LGVV (SEQ ID NO: 84), YGHRKVRPFVSSSHGDFNY (SEQ ID NO: 85), PFVS (SEQ ID NO: 72), KSYLFPKNESNIY (SEQ ID NO: 86), GGGYVTFFGK (SEQ ID NO: 87), DTKEAGK (SEQ ID NO: 88), YFKLTRLET (SEQ ID NO: 89), YRF, EVVDKGFIN (SEQ ID NO: 2), ASYL (SEQ ID NO: 3), TLEV V (SEQ ID NO: 4), ASYLTLEV V (SEQ ID NO: 5),

DKG, REG, DKGREG (SEQ ID NO: 6), VVSVSKASYLL (SEQ ID NO: 7),  
 VTTTLEVVD (SEQ ID NO: 8), REGEEFTVTCTI (SEQ ID NO: 9), TTLE (SEQ ID  
 NO: 10), TTLEASYL (SEQ ID NO: 11), KSENESENIR (SEQ ID NO: 12), NESN (SEQ  
 ID NO: 13), SKASY (SEQ ID NO: 14), NESNSKASY (SEQ ID NO: 15), AFPKP (SEQ  
 ID NO: 16), NSDV (SEQ ID NO: 17), AFPKPNSDV (SEQ ID NO: 18), ESNIR (SEQ  
 ID NO: 19), AFPKPESNIR (SEQ ID NO: 20), DKWEDYPKSE (SEQ ID NO: 21),  
 IRYVSELHL (SEQ ID NO: 22), LTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 23), GENVDLIVEYE  
 (SEQ ID NO: 24), MNRTFTDKWE (SEQ ID NO: 25), KWEDY (SEQ ID NO: 26),  
 VSELH (SEQ ID NO: 27), KWEDYVSELH (SEQ ID NO: 28), DKWE (SEQ ID NO:  
 29), LHLT (SEQ ID NO: 30), DKWELHLT (SEQ ID NO: 31), HLTRLKGTEGGT  
 (SEQ ID NO: 32), MNRTFTDKWE (SEQ ID NO: 25), HLTRLKGTEGGT (SEQ ID  
 NO: 32), MNRTFTDKWEHLTRLKGTEGGT (SEQ ID NO: 33), VVVNDGENVD  
 (SEQ ID NO: 34), VNTKPEI (SEQ ID NO: 35), AYNDVGKT (SEQ ID NO: 36),  
 VNTKPEIAYNDVGKT (SEQ ID NO: 37), AGFPEPT (SEQ ID NO: 38),  
 VNTKPEIAGFPEPT (SEQ ID NO: 39), FGKLV (SEQ ID NO: 40), VNTKPEI FGKLV  
 (SEQ ID NO: 41), VNDGEN (SEQ ID NO: 42), VNTKPEIVNDGEN (SEQ ID NO:  
 43), RLKGTEG (SEQ ID NO: 44), VNTKPEIRLKGTEG (SEQ ID NO: 45), GPPFGKL  
 (SEQ ID NO: 46), GTEGG (SEQ ID NO: 47), GPPFGKLGTEGG (SEQ ID NO: 48),  
 VNDGE (SEQ ID NO: 49), YNDVGK (SEQ ID NO: 50), VNDGEYNDVGK (SEQ ID  
 NO: 51), TKPEILTYDRL (SEQ ID NO: 52), DRLVNGMLQC (SEQ ID NO: 53),  
 GKTSAYFNFAFK (SEQ ID NO: 54), CPGTEQRCSAS (SEQ ID NO: 55),  
 CSASVLPVDVQ (SEQ ID NO: 56), DSSAFKHNGT (SEQ ID NO: 57),  
 GTVECKAYND (SEQ ID NO: 58), LNSSGPPFGKL (SEQ ID NO: 59),  
 FAFKGNNKEQI (SEQ ID NO: 60), TKPEIL (SEQ ID NO: 61), VGKTS (SEQ ID  
 NO: 62), TKPEILVGKTS (SEQ ID NO: 63), ILTYDRL (SEQ ID NO: 64), AYFNFA  
 (SEQ ID NO: 65), ILTYDRLAYFNFA (SEQ ID NO: 66), KHNGT (SEQ ID NO: 67),  
 AYFNFAKHNGT (SEQ ID NO: 68), GTEQRC (SEQ ID NO: 69), および  
 AYFNFAGTEQRC (SEQ ID NO: 70)

からなる群より選択される構造からなるペプチド分子。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 08/07104

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/00; A61K 39/395 (2008.04)

USPC - 424/142.1; 424/143.1

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)

USPC - 424/142.1; 424/143.1

IPC(8) - A61K 39/00; A61K 39/395 (2008.04)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
USPC - 424/146.1; 435/320.1; 435/334; 435/69.1; 530/388.22; 530/388.26; 536/23.53

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWEST (DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=NO; OP=ADJ); freepatentsonline.com; WIPO; Google Patents; Google; conformational epitope, homotypic, heterotypic, receptor tyrosine kinase, domain, antagonize, stem cell factor, residues, VEGFR, D7, D4, inhibitor, antagonize, c-Kit, mast cell, growth factor, type III

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category*       | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No.                                                                         |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| X<br>-----<br>Y | BLECHMAN et al. The Fourth Immunoglobulin Domain of the Stem Cell Factor Receptor Couples Ligand Binding to Signal Transduction. Cell 1995, 80:103-113; pg 103, col 2, para 3, pg 104, col 2, para 1-2, pg 105, col 2, para 1, pg 106, col 2, para 2, pg 107, col 2, para 2, pg 108, Fig 5                                                                          | 1-12, 14-18, 29-31, 83-88, 89, 90<br><br>13, 17, 19, 21, 32-82, 87, 88, 91, 105, 106, 121-124 |
| Y               | LIU et al. Structural basis for stem cell factor: KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. The EMBO Journal. Published online 25 Jan 2007, 26(3):891-901; pg 892, col 1, para 2, col 2, para 1-3, pg 897, Fig 5, pg 900, col 1, para 1                                                                                                  | 13, 32-78                                                                                     |
| Y               | MATTHEWS et al. A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991, 88:9026-9030; pg 9028, col 1, para 2, Fig 2, pg 9030, col 1, para 3                                                                                            | 17, 19, 21, 33-82, 105, 106, 121-124                                                          |
| Y               | TAO et al. Kinase Insert Domain Receptor (KDR) Extracellular Immunoglobulin-like Domains 4-7 Contain Structural Features That Block Receptor Dimerization and Vascular Endothelial Growth Factor-induced Signaling. Journal of Biological Chemistry 2001, 276(24):21918-21923; pg 21916, col 2, para 3, pg 21917, col 1 para 2, pg 21922, col 1, para 2-6, abstract | 81, 82                                                                                        |
| Y               | US 2005/0261175 A1 (ZSEBO et al) 24 Nov 2005 (24.11.2005); para [0158], [0479]-[0482]                                                                                                                                                                                                                                                                               | 87, 88, 91                                                                                    |
| A               | LEV et al. A Recombinant Ectodomain of the Receptor for the Stem Cell Factor (SCF) Retains Ligand-Induced Receptor Dimerization and Antagonizes SCF-stimulated Cellular Responses. Journal of Biological Chemistry 1992, 267(15):10866-10873                                                                                                                        | 1-17, 19, 21, 29-91, 105, 106, 121-124                                                        |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

\* 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 application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"g" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 2008 (21.11.2008)

Date of mailing of the international search report

08 DEC 2008

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450  
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lisa W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300  
PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/07104

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                        |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                          | Relevant to claim No.                  |
| A                                                     | JIANG et al. Structure of the Active core of human stem cell factor and analysis of binding to its receptor Kit. The EMBO Journal 2000, 19(13):3192-3203                                                                                                                                                    | 1-17, 19, 21, 29-91, 105, 106, 121-124 |
| A                                                     | Sequence Alignment [Retrieved from the Internet 26 Nov 2008: < <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> >]: GenBank Accession Number P05532.1 (KIT_MOUSE) 01-MAY-2007 and GenBank Accession Number AAC50968.1 (KIT protein [Homo sapiens]) 06-FEB-1997 | 1-17, 19, 21, 29-91, 105, 106, 121-124 |
| A                                                     | GenBank Accession Number P05532. 01-MAY-2007. [Retrieved from Internet 26 Nov 2008: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?125473:PROT:4572902">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?125473:PROT:4572902</a> >]                                                                | 1-17, 19, 21, 29-91, 105, 106, 121-124 |
| A                                                     | GenBank Accession Number AAC50968. 06-FEB-1997. [Retrieved from Internet 26 Nov 2008: < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&amp;id=1817733">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&amp;id=1817733</a> >]                                                  | 1-17, 19, 21, 29-91, 105, 106, 121-124 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/07104

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☐ Claims Nos.:  
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:
  
3. ☒ Claims Nos.: 107-110  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

Group I, claims 1- 17, 19, 21, 83-91, 106, 121-124, drawn to a moiety that binds to the ectodomain of a human receptor tyrosine kinase, wherein claim 12 is limited to D4 domain; claim 15 is limited to kit.

Group II, claims 1- 15, 18, 20, 22, 23, 83-91, 106, 121, 122, drawn to a moiety that binds to the ectodomain of a human receptor tyrosine kinase, wherein claim 12 is limited to D5 domain; claim 15 is limited to kit.

Group III+, claims 1- 15, 24-26, 83-91, drawn to a moiety that binds to the ectodomain of a human receptor tyrosine kinase, wherein claim 15 is limited to kit. Should additional fee be paid, Applicant is invited to elect a region of the ectodomain of claim 12 to be searched.

\*\*\*\*\* See Supplemental Sheet \*\*\*\*\*

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:  
Group I, claims 1-17, 19, 21, 83-91, 106 and 121-124  
Group VII, claims 1, 29-91, and 105
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/US 08/07104

\*\*\*\*\* Supplemental Sheet \*\*\*\*\*

Continuation of Box III.

Group IV, claims 1- 15, 27, 28, 83-91, drawn to a moiety that binds to the ectodomain of a human receptor tyrosine kinase, wherein claim 12 is limited to D4 domain and claim 15 is limited to PDGFRbeta. Should additional fee be paid, Applicant is invited to elect a region of the ectodomain of claim 12 to be searched.

Group V+, claims 1- 15, 27, 83-91, drawn to a moiety that binds to the ectodomain of a human receptor tyrosine kinase, wherein claim 15 is limited to PDGFRalpha. Should additional fee be paid, Applicant is invited to elect a region of the ectodomain of claim 12 to be searched.

Group VI+, claims 1- 15, 24-26, 83-91, 111- 118, drawn to a moiety that binds to the ectodomain of a human receptor tyrosine kinase. Should additional fee be paid, Applicant is invited to elect a region of the ectodomain and type III receptor tyrosine kinase to be searched.

Group VII+, claims 1, 29-91, 105, drawn to a moiety that binds to a conformational epitope on the receptor tyrosine kinase. Should additional fee be paid, Applicant is invited to elect a conformational epitope to be searched.

Group VIII+, claims 1, 92-95, drawn to a moiety that is a small molecule. Should additional fee be paid, Applicant is invited to elect an amino acid residue(s) to be searched.

Group IX, claims 1, 96-100, 125, 126, drawn to a moiety that is a peptidic molecule moiety, wherein claims 125 and 126 are limited to SEQ ID NO: 71.

Group X+, claims 1, 96-100, 103, 125, 126, drawn to a moiety that is a peptidic molecule moiety homologous to a fragment of D4 domain. Should additional fee be paid, Applicant is invited to elect a SEQ ID NO: of claims 125 and 126 to be searched.

Group XI+, claims 1, 96-99, 101-103, 125, 126, drawn to a moiety that is a peptidic molecule moiety homologous to a fragment of D5 domain. Should additional fee be paid, Applicant is invited to elect a SEQ ID NO: of claims 125 and 126 to be searched.

Group XII, claims 1 and 104, drawn to a moiety that is an adnectin.

Group XIII, claims 119 and 120, drawn to a method for identifying a moiety that binds to an Ig-like domain of a receptor tyrosine kinase and locks the ectodomain of the receptor tyrosine kinase in an inactive state

The inventions listed as Groups I-XIII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups I-XII do not include the inventive concept of identifying a moiety that binds to an Ig-like domain of a receptor tyrosine kinase and locks the ectodomain of the receptor tyrosine kinase in an inactive state, as required by Group XIII.

Although an antibody of Groups I-VII+, a small molecule of Groups VIII+, a peptidic molecule of Groups IX-XI+, and an adnectin of Group XII do share a common property of binding to an Ig-like domain of a receptor tyrosine kinase and locking the ectodomain of the receptor tyrosine kinase in an inactive state, they do not share a significant structural element. Therefore, unity of invention is lacking between said Groups.

Although Groups I-VII+ do share the technical feature of an antibody that binds to the ectodomain of a human receptor tyrosine kinase, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art. Specifically, the article entitled "The Fourth Immunoglobulin Domain of the Stem Cell Factor Receptor Couples Ligand Binding to Signal Transduction" by Blechman et al. (Cell 1995, Vol. 80, 103-113) teaches an antibody against D4 domain that blocks SCF-induced kit activation (abstract). As the above antibody was known at the time, as evidenced by the teaching of Blechman et al., this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Although Groups IX-XI+ do share the technical feature of a peptidic molecule, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art. Specifically, US 2006/0040292 A1 to West et al. teaches the claimed SEQ ID NO: 22 and SEQ ID NO: 23 (amino acids 371-379 and 379-389 of SEQ ID NO: 17, respectively).

Groups I-XIII therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.              | F I            | テーマコード (参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| A 6 1 P 19/02 (2006.01)  | A 6 1 P 19/02  |             |
| A 6 1 P 25/04 (2006.01)  | A 6 1 P 25/04  |             |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | D           |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01)  | A 6 1 K 39/395 | N           |
| A 6 1 K 38/00 (2006.01)  | A 6 1 K 45/00  |             |
| A 6 1 P 35/02 (2006.01)  | A 6 1 K 37/02  |             |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01)   | A 6 1 P 35/02  |             |
|                          | C 1 2 N 5/00   | 1 0 2       |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 シュレシンガー ヨゼフ

アメリカ合衆国 コネチカット州 ウッドブリッジ ロック ヒル ロード 5 0

(72)発明者 ラックス イリト

アメリカ合衆国 コネチカット州 ウッドブリッジ ロック ヒル ロード 5 0

(72)発明者 湯澤 聡

アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー ヘブン ヨーク ストリート 1 2 9 2 エイチ

(72)発明者 オパトウスカイ ヤーデン

アメリカ合衆国 コネチカット州 ニュー ヘブン セントラル アベニュー 4 5 7

(72)発明者 ヤン イアン

アメリカ合衆国 コネチカット州 ハムデン スキップ ストリート 2 アpartment 4 0 3

Fターム(参考) 4B065 AA90X AB04 AC14 AC20 BA08 CA24 CA44

4C084 AA01 AA02 AA17 BA44 NA14 ZA08 ZA33 ZA36 ZA96 ZB26  
ZB27

4C085 AA13 AA14 DD62 DD63 EE01 GG01

4H045 AA10 BA10 CA40 DA76 DA86 EA20 FA72