

(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2019-517544

(P2019-517544A)

(43) 公表日 令和1年6月24日(2019.6.24)

| (51) Int.Cl.                   | F I             | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|-----------------|-------------|
| <b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b> | A 6 1 K 39/00 H | 4 C 0 7 6   |
| <b>A 6 1 P 25/00 (2006.01)</b> | A 6 1 P 25/00   | 4 C 0 8 4   |
| <b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b> | A 6 1 P 35/00   | 4 C 0 8 5   |
| <b>A 6 1 P 37/04 (2006.01)</b> | A 6 1 P 37/04   | 4 C 0 8 6   |
| <b>A 6 1 P 7/00 (2006.01)</b>  | A 6 1 P 7/00    | 4 C 0 8 7   |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 108 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-564211 (P2018-564211)  
 (86) (22) 出願日 平成29年6月9日 (2017.6.9)  
 (85) 翻訳文提出日 平成31年2月6日 (2019.2.6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2017/050190  
 (87) 国際公開番号 WO2017/211371  
 (87) 国際公開日 平成29年12月14日 (2017.12.14)  
 (31) 優先権主張番号 PA201670417  
 (32) 優先日 平成28年6月10日 (2016.6.10)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)

(71) 出願人 518289427  
 アイオー バイオテック エービーエス  
 IO Biotech ApS  
 デンマーク国 2200 コペンハーゲン  
 エヌ オーレ マーロース ヴァイ 3  
 Ole Maaloes Vej 3,  
 2200 Copenhagen N,  
 Denmark  
 (74) 代理人 110002572  
 特許業務法人平木国際特許事務所  
 (72) 発明者 アンデルセン, マッズ ハルド  
 デンマーク国 2850 ネールム, ヘン  
 スヴァイ 61

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CALR及びJAK2ワクチン組成物

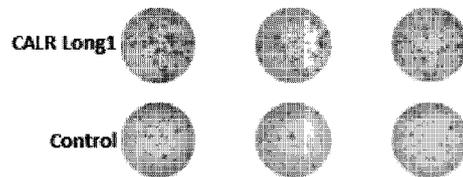
(57) 【要約】

本開示は、骨髄増殖性障害の予防及び治療における、新規のT細胞標的としてのCALR及びJAK2に関する。

【選択図】 図 1 - 1

FIG. 1

A



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

骨髄増殖性障害を治療又は予防する方法において使用するためのワクチン組成物であって、

a)

(i) 配列番号1又は配列番号16を含む、CALRのエクソン9変異体、例えば、配列番号10に示される、CALRのエクソン9変異体、

(ii) 配列番号10に示されるエクソン9変異体CALRの、免疫原として活性のペプチド断片であって、配列番号10のアミノ酸361~411のうち少なくとも一部を含む断片、

(iii) 配列番号16若しくは配列番号1、又はその断片からなる、免疫原として活性のペプチド、

10

(iv) (i)、(ii)、又は(iii)のポリペプチドの機能的相同体であって、配列番号10と少なくとも70%の配列同一性を共有し、且つ/又は最大で3個のアミノ酸、例えば、最大で2個のアミノ酸、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、配列番号16、配列番号1、若しくは配列番号10のアミノ酸の連続配列と同一な配列からなる、免疫原として活性のポリペプチドである機能的相同体、

(v) (i)、(ii)、(iii)、又は(iv)のポリペプチドのうちのいずれかを含むポリペプチド、

(vi) (i)、(ii)、(iii)、(iv)、又は(v)のポリペプチドのうちのいずれかをコードする核酸

20

のうちの1つ以上、

又は

b)

(vii) 配列番号6に示されるJAK2V617F変異体、

(viii) 配列番号6に示されるJAK2V617F変異体の、免疫原として活性のペプチド断片であって、アミノ酸617を少なくとも含む断片、

(ix) (vii)及び(viii)のポリペプチドの機能的相同体であって、配列番号6と少なくとも70%の配列同一性を共有し、且つ/又は最大で3個のアミノ酸、例えば、最大で2個のアミノ酸、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、配列番号6のアミノ酸の連続配列と同一な配列からなる、免疫原として活性のポリペプチドであり、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む機能的相同体、

30

(x) (vii)、(viii)、又は(ix)のポリペプチドのうちのいずれかを含むポリペプチド、

(xi) (vii)、(viii)、(ix)、又は(x)のポリペプチドのうちのいずれかをコードする核酸

のうちの1つ以上

を含み、

アジュバントをさらに含む

組成物。

## 【請求項2】

任意選択で、アジュバントをさらに含む、医薬として使用するための請求項1に記載のワクチン組成物。

40

## 【請求項3】

前記免疫原として活性のペプチド断片が、配列番号10の8~50個のアミノ酸の範囲、例えば、8~40個のアミノ酸の範囲、例えば、8~29個のアミノ酸の範囲の連続配列、又は最大で3個のアミノ酸が置換されているその機能的相同体を含むか、又はそれからなる、請求項1又は2に記載のワクチン組成物。

## 【請求項4】

前記免疫原として活性のペプチド断片が、配列番号16若しくは配列番号1の8~50個のアミノ酸の範囲、例えば、8~40個のアミノ酸の範囲、例えば、8~29個のアミノ酸の範囲の連続配列、又は最大で3個のアミノ酸が置換されているその機能的相同体を含むか、又は

50

それからなる、請求項1～3のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項5】

前記免疫原として活性のペプチド断片が、

- a) 配列番号2若しくは配列番号3の8～29個のアミノ酸の範囲の連続配列、又は
- b) 配列番号15の15～20個のアミノ酸の範囲の連続配列、又は
- c) 配列番号1の25～36個のアミノ酸の範囲の連続配列、又は
- d) 配列番号17の39～44個のアミノ酸の範囲の連続配列、又は
- e) 最大で2個のアミノ酸が置換されているその機能的相同体

を含むか又はそれからなる、請求項1～4のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項6】

前記免疫原として活性のペプチド断片が、

a) 配列番号2若しくは配列番号3若しくは配列番号15の8～11個のアミノ酸の範囲の連続配列、例えば、配列番号2若しくは配列番号3若しくは配列番号15の9～10個のアミノ酸の連続配列、又は

b) 配列番号2若しくは配列番号3若しくは配列番号1若しくは配列番号17の11～29個のアミノ酸の範囲、例えば、15～29個のアミノ酸の範囲、例えば、20～29個のアミノ酸の範囲の連続配列、例えば、配列番号2若しくは配列番号3の25～29個のアミノ酸の連続配列、又は

c) 配列番号17の29～44個のアミノ酸の範囲、例えば、36～44個のアミノ酸の範囲、例えば、29～36個のアミノ酸の範囲の連続配列、例えば、配列番号17の40～44個のアミノ酸の連続配列、又は

d) a)、b)、又はc)の機能的相同体であって、最大で2個のアミノ酸が置換されている機能的相同体

を含むか又はそれからなる、請求項1～5のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項7】

配列番号16又は配列番号1を含むエクソン9変異体CALRの発現によって特徴付けられる臨床状態にある個体に投与されると、配列番号16若しくは配列番号1を含むエクソン9変異体CALRを発現するがん細胞、及び/又は配列番号16若しくは配列番号1を含むエクソン9変異体CALRを発現する抗原提示細胞に対する免疫応答を誘発することが可能である、請求項1～6のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項8】

個体における細胞性免疫応答を誘発することが可能である、請求項1～7のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項9】

前記細胞性免疫応答が、エクソン9変異体CALRに対して特異的である、請求項8に記載のワクチン組成物。

【請求項10】

エクソン9変異体CALRを特異的に認識する細胞傷害性T細胞の形成を誘発することが可能である、請求項1～9のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項11】

エクソン9変異体CALRを特異的に認識する細胞を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項12】

前記免疫原として活性のペプチド断片が、配列番号6の8～50個のアミノ酸の範囲、例えば、8～40個のアミノ酸の範囲、例えば、8～29個のアミノ酸の範囲の連続配列、又は最大で3個のアミノ酸が置換されているその機能的相同体からなる、請求項1～11のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項13】

前記免疫原として活性のペプチド断片が、配列番号7の8～9個のアミノ酸の範囲の連続配列、又は最大で2個のアミノ酸が置換されているその機能的相同体からなる、請求項1～

10

20

30

40

50

12のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項14】

前記免疫原として活性のペプチド断片が、

- a) 配列番号7の8～9個のアミノ酸の範囲の連続配列、
- b) 最大で2個のアミノ酸が置換されているa)の機能的相同体

を含むか又はそれからなる、請求項1～13のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項15】

配列番号6のJAK2V617Fの発現によって特徴付けられる臨床状態にある個体に投与されると、細胞、例えば、配列番号6のJAK2V617F、又はこれと少なくとも70%の配列同一性を共有する機能的相同体を発現する、がん細胞及び/又は抗原提示細胞に対する免疫応答を誘発することが可能である、請求項1～14のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

10

【請求項16】

個体における細胞性免疫応答を誘発することが可能である、請求項1～15のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項17】

前記細胞性免疫応答が、JAK2V617Fに対して特異的である、請求項16に記載のワクチン組成物。

【請求項18】

JAK2V617Fを特異的に認識する細胞傷害性T細胞の形成を誘発することが可能である、請求項1～17のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

20

【請求項19】

JAK2V617Fを特異的に認識する細胞を含む、請求項1～18のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項20】

前記医薬が、骨髄増殖性障害を治療又は予防するためのものである、請求項1～19のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項21】

骨髄増殖性障害が、本態性血小板血症、原発性骨髄線維症、真性赤血球増加症、又は急性骨髄性白血病若しくは慢性骨髄性白血病である、請求項1～20のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

30

【請求項22】

以下の特徴：

a) ELISPOTアッセイにより決定して、ある臨床状態にある個体の、PBL集団内のINF- 産生細胞を、PBL 10<sup>4</sup>個当たり少なくとも1個の頻度で誘発することが可能であること、及び/又は

b) 腫瘍組織試料中の、エピトープペプチドと反応性であるCTL(細胞傷害性T細胞)の、in situにおける検出が可能であること、又は

c) エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fを特異的に認識することが可能であるT細胞の増殖を、in vitroにおいて誘導することが可能であること

のうちの少なくとも1つを有し、MHCクラスI拘束性ペプチドを含む、請求項1～21のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

40

【請求項23】

MHCクラスI分子によって拘束されるペプチド断片を含む、請求項1～22のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項24】

MHCクラスII分子によって拘束されるペプチド断片を含む、請求項1～23のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項25】

臨床状態にある個体のPBL集団内のINF- 産生細胞を、PBL 10<sup>4</sup>個当たり少なくとも5個の頻度で誘発することが可能であるペプチド断片を含む、請求項1～24のいずれか一項に

50

記載のワクチン組成物。

【請求項26】

配列番号16又は配列番号1を含むエクソン9変異体CALRが発現される臨床状態にある個体のPBL集団内のINF-産生細胞を誘発することが可能であるペプチド断片を含む、請求項1~25のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項27】

配列番号6のJAK2V617F、又は配列番号6に対して少なくとも70%の同一性を有するその機能的相同体が発現される臨床状態にある個体の、PBL集団内のINF-産生細胞を誘発することが可能であるペプチド断片を含む、請求項1~26のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

10

【請求項28】

骨髄増殖性障害ががんである、請求項1~27のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項29】

ペプチド断片が、最大で50個のアミノ酸残基、好ましくは、最大で30個のアミノ酸残基、より好ましくは、最大で20個のアミノ酸残基、例えば、最大で9個のアミノ酸残基からなる、請求項1~28のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項30】

ペプチド断片が、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、配列番号17、及び前述のうちのいずれかの機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる群から選択される、請求項1~29のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

20

【請求項31】

ペプチド断片が、配列番号7及びその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸、例えば、最大で2個のアミノ酸、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されている、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる群から選択される、請求項1~30のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項32】

ペプチド断片が配列番号7である、請求項1~31のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項33】

前記ポリペプチドが、配列番号7のアミノ酸の連続配列、好ましくは、配列番号7を含む、最大で100個のアミノ酸、好ましくは、最大で60個のアミノ酸、より好ましくは、最大で20個のアミノ酸、例えば、最大で9個のアミノ酸のポリペプチドである、請求項1~32のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

30

【請求項34】

前記ポリペプチドが、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、又は配列番号17のアミノ酸のうち少なくとも8アミノ酸の連続配列を含む、最大で100個のアミノ酸、好ましくは、最大で60個のアミノ酸、より好ましくは、最大で20個のアミノ酸、例えば、最大で9個のアミノ酸のポリペプチドである、請求項1~33のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

40

【請求項35】

前記ポリペプチドが、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、又は配列番号17を含む、最大で100個のアミノ酸、例えば、最大で90個のアミノ酸、例えば、最大で80個のアミノ酸、例えば、最大で60個のアミノ酸、例えば、最大で40個のアミノ酸、例えば、最大で30個のアミノ酸、例えば、最大で29個のアミノ酸のポリペプチドである、請求項1~34のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項36】

ワクチンが、ワクチン接種された個体における、細胞、例えば、配列番号16若しくは配列番号1を含むエクソン9変異体CALRを発現するがん細胞、及び/又は配列番号16若しくは配列番号1を含むエクソン9変異体CALRの抗原を提示する抗原提示細胞に対する細胞傷害効

50

果を有するT細胞の産生を誘発する、請求項1～35のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項37】

ワクチンが、ワクチン接種された個体における、配列番号7を含む変異体JAK2を発現するがん細胞、及び/又は配列番号6の変異体JAK2の抗原を提示する抗原提示細胞に対する細胞傷害効果を有するT細胞の産生を誘発する、請求項1～36のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項38】

対象における臨床応答を誘発することが可能であり、臨床応答が、安定、部分奏効、又は完全寛解により特徴付けられる、請求項1～37のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

10

【請求項39】

CALRでもエクソン9変異体CALRでもないタンパク質又はペプチド断片から選択される免疫原として活性のタンパク質又はペプチド断片をさらに含む、請求項1～38のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項40】

JAK2でもJAK2V617Fでもないタンパク質又はペプチド断片から選択される免疫原として活性のタンパク質又はペプチド断片をさらに含む、請求項1～39のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項41】

アジュバントが、細菌DNAベースのアジュバント、油/界面活性剤ベースのアジュバント、ウイルスdsRNAベースのアジュバント、及びイミダゾキニリンからなる群から選択される、請求項1～40のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

20

【請求項42】

アジュバントがMontanide ISAアジュバントである、請求項1～41のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項43】

アジュバントがMontanide ISA 51又はMontanide ISA 720である、請求項42に記載のワクチン組成物。

【請求項44】

アジュバントがMontanide ISA 51である、請求項43に記載のワクチン組成物。

30

【請求項45】

アジュバントがGM-CSFである、請求項1～41のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項46】

免疫原として活性のペプチド断片、又は前記免疫原として活性のペプチド断片をコードする核酸を含む抗原提示細胞を含む、請求項1～45のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項47】

抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項45に記載のワクチン組成物。

【請求項48】

核酸が、請求項1～47のいずれか一項に記載のペプチドをコードする、請求項2又は請求項3に記載のワクチン組成物。

40

【請求項49】

核酸がベクター内に含まれる、請求項1～48のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

【請求項50】

ベクターが、ウイルスベクター及び細菌ベクターからなる群から選択される、請求項48に記載のワクチン組成物。

【請求項51】

ベクターが、T細胞刺激性ポリペプチドをコードする核酸をさらに含む、請求項48又は49に記載のワクチン組成物。

50

## 【請求項 5 2】

配列番号16若しくは配列番号1を含むエクソン9変異体CALR及び/又は配列番号6の変異体JAK2V617Fが発現される骨髄増殖性障害を治療するためのものである、請求項1～51のいずれか一項に記載のワクチン組成物。

## 【請求項 5 3】

請求項1～51のいずれか一項に記載のワクチン組成物、及び第2の有効成分を含むキット。

## 【請求項 5 4】

第2の有効成分が免疫刺激組成物である、請求項53に記載のキット。

## 【請求項 5 5】

免疫刺激組成物がIFN- を含む、請求項54に記載のキット。

10

## 【請求項 5 6】

さらなる免疫刺激組成物が、1種以上のインターロイキンを含む、請求項54又は55に記載のキット。

## 【請求項 5 7】

インターロイキンが、IL-2及び/又はIL-21から選択される、請求項53～56のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 5 8】

第2の有効成分が抗がん剤である、請求項53～56のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 5 9】

抗がん剤が化学療法剤である、請求項58に記載のキット。

20

## 【請求項 6 0】

化学療法剤が、アクチミド、アザシチジン、アザチオプリン、プレオマイシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキシソルビシン、エピルビシン、エトポシド、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イリノテカン、レナリドミド、ロイコボリン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、レプリミド、テモゾロミド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、及びビノレルピンから

30

## 【請求項 6 1】

第2の有効成分が抗生物質である、請求項53～60のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 6 2】

抗生物質が、アモキシリン、ペニシリン、アシクロビル、及び/又はピダラビンから選択される、請求項61に記載のワクチン組成物を含むキット。

## 【請求項 6 3】

提供される組成物が、同時に、又は逐次的に投与される、請求項53から62のいずれか一項に記載のキット。

## 【請求項 6 4】

請求項1～52のいずれか一項に記載のペプチド断片、及びクラスIのHLA分子若しくはクラスIIのHLA分子、又はこのような分子の断片の複合体。

40

## 【請求項 6 5】

単量体である、請求項64に記載の複合体。

## 【請求項 6 6】

多量体である、請求項64に記載の複合体。

## 【請求項 6 7】

ある臨床状態にある個体において、エクソン9変異体CALRに対して反応性のT細胞、又はJAK2V617Fに対して反応性のT細胞の存在を検出する方法であって、腫瘍組織又は血液試料を、請求項64から66のいずれか一項に記載の複合体と接触させるステップ、及び複合体の

50

、組織又は血液細胞との結合を検出するステップ、を含む方法。

【請求項 6 8】

請求項1～52、103～104、又は107～108のいずれか一項に記載のペプチド断片に特異的に結合することが可能である分子。

【請求項 6 9】

抗体又はその断片である、請求項68に記載の分子。

【請求項 7 0】

T細胞受容体である、請求項68又は69に記載の分子。

【請求項 7 1】

請求項68～70のいずれか一項に記載の分子の結合を遮断することが可能である分子。

10

【請求項 7 2】

エクソン9変異体CALRの発現及び/又はJAK2V617Fの発現によって特徴付けられる臨床状態を治療又は予防する方法であって、前記臨床状態にある個体に、有効量の、請求項1～52のいずれか一項に記載のワクチン組成物、請求項68～71のいずれか一項に記載の分子、請求項97～102のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項103～104若しくは107～108のいずれか一項に記載のペプチドを投与するステップを含む方法。

【請求項 7 3】

治療又は予防される臨床状態が、エクソン9変異体CALR及び/又はJAK2V617Fが発現されるがん疾患である、請求項72に記載の方法。

【請求項 7 4】

さらなるがん治療と組み合わせられる、請求項72又は73に記載の方法。

20

【請求項 7 5】

さらなる治療が、化学療法、放射線治療、免疫刺激物質による治療、遺伝子治療、抗体による治療、及び樹状細胞を使用する治療からなる群から選択される、請求項74に記載の方法。

【請求項 7 6】

治療又は予防される臨床状態が、抗原提示細胞内のエクソン9変異体CALRの発現及び/又はJAK2V617Fの発現を引き起こす障害である、請求項72～75のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記障害に対するさらなる治療と組み合わせられる、請求項76に記載の方法。

30

【請求項 7 8】

さらなる治療が、化学療法、免疫刺激物質による治療、遺伝子治療、抗体による治療、及び樹状細胞を使用する治療からなる群から選択される、請求項77に記載の方法。

【請求項 7 9】

エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片を、個体当たり50 µg～500 µgの範囲、例えば、80 µg～300 µgの範囲、例えば、100 µg～250 µgの範囲の用量で投与され、個体が、好ましくはヒトである、請求項72～78のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 0】

臨床状態を治療又は予防するための医薬の製造における、請求項1～72のいずれか一項に記載のワクチン組成物、請求項74～63のいずれか一項に記載のキット、請求項68～70のいずれか一項に記載の分子、又は請求項89～96のいずれか一項に記載のペプチド断片の使用。

40

【請求項 8 1】

治療又は予防される疾患が、エクソン9変異体CALR及び/又はJAK2V617Fが発現されるがん疾患である、請求項80に記載の使用。

【請求項 8 2】

さらなるがん治療と組み合わせられる、請求項80又は81に記載の使用。

【請求項 8 3】

50

さらなる治療が、化学療法、放射線治療、免疫刺激物質による治療、遺伝子治療、抗体による治療、及び樹状細胞を使用する治療からなる群から選択される、請求項82に記載の使用。

【請求項 8 4】

治療又は予防される臨床状態が、抗原提示細胞内のエクソン9変異体CALRの発現及び/又はJAK2V617Fの発現を引き起こす障害である、請求項83に記載の使用。

【請求項 8 5】

前記感染に対するさらなる治療と組み合わせられる、請求項84に記載の使用。

【請求項 8 6】

さらなる治療が、化学療法、免疫刺激物質による治療、遺伝子治療、抗体による治療、及び樹状細胞を使用する治療からなる群から選択される、請求項85に記載の使用。

10

【請求項 8 7】

免疫化をモニタリングする方法であって、

a) 個体に由来する血液試料を用意するステップ、

b) (i) 配列番号16又は配列番号1を含むCALRのエクソン9変異体、例えば、配列番号10に示される、CALRのエクソン9変異体、又は

(ii) 配列番号10に示されるエクソン9変異体CALRの、免疫原として活性のペプチド断片であって、配列番号10のアミノ酸361~411のうち少なくとも一部を含む断片、又は

(iii) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号15、若しくは配列番号17、又はその断片からなる、免疫原として活性のペプチド、又は

20

(iv) 配列番号6に示されるJAK2V617F変異体、又は

(v) 配列番号6に示されるJAK2V617F変異体の、免疫原として活性のペプチド断片であって、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む断片、又は

(vi) 前述のうちのいずれかの機能的相同体

を用意するステップ、

c) 前記血液試料が、タンパク質又はペプチドに特異的に結合する、抗体、又はT細胞受容体を含むT細胞を含むかどうかを決定するステップを含み、

これにより、前記タンパク質又はペプチドに対する免疫応答が、前記個体において惹起されたかどうかを決定する

30

方法。

【請求項 8 8】

ペプチド断片が、請求項1~52のいずれか一項に記載のペプチド断片である、請求項87に記載の方法。

【請求項 8 9】

変異体CALRの発現と関連する臨床状態、例えば、骨髄増殖性障害の治療又は予防において使用するための、配列番号16若しくは配列番号1の連続配列のうち少なくとも一部を含む、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体、又は前記ペプチド断片をコードする核酸。

40

【請求項 9 0】

請求項1~52のいずれか一項に記載のペプチド断片である、請求項89に記載のペプチド断片。

【請求項 9 1】

がんの治療又は予防において使用するための、請求項89又は90に記載のペプチド断片。

【請求項 9 2】

エクソン9変異体CALRの発現と関連する臨床状態、例えば、骨髄増殖性障害の治療又は予防において使用するための、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、若しくは配列番号17を含むか又はそれからなる、請求項89~91のいずれか一項に記載のペプチド断片、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されていることを除

50

き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体、又は前記CALRのペプチド断片をコードする核酸。

【請求項 9 3】

変異体JAK2V617Fの発現と関連する臨床状態、例えば、骨髄増殖性障害の治療又は予防において使用するための、配列番号7の連続配列のうちの少なくとも一部を含む、免疫原として活性のJAK2V617Fのペプチド断片、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体、又は前記JAK2V617Fのペプチド断片をコードする核酸。

【請求項 9 4】

請求項1～52のいずれか一項に記載のペプチド断片である、請求項93に記載のペプチド断片。 10

【請求項 9 5】

がんの治療又は予防において使用するための、請求項93又は94に記載のペプチド断片。

【請求項 9 6】

JAK2V617Fの発現と関連する臨床状態、例えば、骨髄増殖性障害の治療又は予防において使用するための、配列番号7を含むか若しくはそれからなる、請求項93～95のいずれか一項に記載のペプチド断片、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体、又は前記JAK2のペプチド断片をコードする核酸。

【請求項 9 7】 20

エクソン9変異体CALRを特異的に認識する細胞を含む組成物であって、好ましくは、エクソン9変異体CALRが、最大で3個のアミノ酸が置換された配列番号16の連続配列を含む、組成物。

【請求項 9 8】

細胞が、細胞傷害性T細胞である、請求項97に記載の組成物。

【請求項 9 9】

細胞が、前記請求項のいずれかに記載のペプチド若しくはペプチド断片、又は請求項103～104に記載のペプチド若しくはペプチド断片を、T細胞を含む細胞集団と接触させることにより得られる、請求項97又は98に記載の組成物。

【請求項 1 0 0】 30

JAK2V617Fを特異的に認識する細胞を含む組成物であって、好ましくは、JAK2V617Fが、最大で3個のアミノ酸が置換された配列番号6の連続配列を含む、組成物。

【請求項 1 0 1】

細胞が、細胞傷害性T細胞である、請求項100に記載の組成物。

【請求項 1 0 2】

細胞が、請求項107又は108に記載のペプチド又はペプチド断片を、T細胞を含む細胞集団と接触させることにより得られる、請求項100又は101に記載の組成物。

【請求項 1 0 3】

CALRの配列(配列番号9)、又は配列番号1の配列を含むCALRのエクソン9変異体の配列のうちの50までの連続アミノ酸を含むか、又はそれからなるペプチドであって、前記変異体が、任意選択で、配列番号10の配列を有し、前記連続アミノ酸が、配列番号1、2、3、15、16、又は17のうちのいずれか1つの配列を含み、より好ましくは、前記連続アミノ酸が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、又は配列番号17を含み、任意選択で、最大で1～10個の間の連続アミノ酸が、置換、例えば、保存的置換により置き換えられている、ペプチド。 40

【請求項 1 0 4】

免疫原として活性である、請求項103に記載のペプチド。

【請求項 1 0 5】

請求項103又は104に記載のペプチド、並びに任意選択で保存剤及び/又はアジュバントを含む医薬組成物。 50

## 【請求項106】

それを必要とする個体を治療する方法であって、請求項103又は104に記載のペプチドを前記個体に投与するステップを含む方法。

## 【請求項107】

JAK2の配列(配列番号5)、又は配列番号6の配列を含むJAK2V617Fの配列のうちの50個までの連続アミノ酸を含むか、又はそれからなるペプチドであって、前記連続アミノ酸が、配列番号7の配列を含み、任意選択で、最大で1~10個の間の連続アミノ酸が、置換、例えば、保存的置換により置き換えられている、ペプチド。

## 【請求項108】

免疫原として活性である、請求項107に記載のペプチド。

10

## 【請求項109】

請求項107又は108に記載のペプチド、並びに任意選択で保存剤及び/又はアジュバントを含む医薬組成物。

## 【請求項110】

それを必要とする個体を治療する方法であって、請求項107又は108に記載のペプチドを前記個体に投与するステップを含む方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、障害、例えば、骨髄増殖性障害、特に、骨髄増殖性新生物(MPN)の予防及び治療の分野に関する。特に、変異したJAK2遺伝子及びCALR遺伝子に由来するペプチド断片であって、これらの血液がんに対する免疫応答を誘発することが可能なペプチド断片が提供される。具体的に述べると、本発明は、JAK2及びCALRの変異に由来するペプチド、並びにCALR特異的T細胞又はJAK2特異的T細胞の、MPNの治療のための使用に関する。したがって、本発明は、任意選択で、他の免疫療法と組み合わせて使用され得るワクチンに関する。本発明はまた、JAK2の変異及びCALRの変異に特異的なT細胞の養子移入に使用することもでき、MPNの治療としてのワクチン接種により、*in vivo*において、JAK2及びCALRの変異ペプチドに対する免疫を誘導するのに使用することもできる。本明細書で提示されるワクチン戦略を、がん化学療法と組み合わせて使用し得ることは、本発明の一態様である。さらなる態様は、骨髄増殖性障害、例えば、本態性血小板血症、原発性骨髄線維症、又は真性赤血球増加症の予防及び治療に関する。

20

30

## 【0002】

また、CALR変異体及びJAK2変異体に由来する、免疫原として活性のペプチド断片の、増殖性障害の治療、診断、及び予後診断のための使用も提供される。

## 【背景技術】

## 【0003】

MPN患者のうちの50%を超える患者は、JAK2V617F変異を保有する。加えて、カルレティキュリン(CALR)遺伝子のエクソン9内の変異も、JAK2が野生型である、本態性血小板血症(ET)又は原発性骨髄線維症(PMF)の患者のうちの約60%において見出される。

## 【0004】

40

CALRエクソン9変異は、CALRタンパク質のC末端を変化させる、1bpのフレームシフト変異を結果としてもたらす(Klampflら、2013、Nangaliaら、2013)。現在までに、50を超える変異が記載されており、それらは全て、C末端において、36アミノ酸長のコンセンサス配列を共有する。2つの最も顕著なCALRエクソン9変異が、全ての患者のうちの80%において見出される。この新規のC末端は、潜在的な腫瘍関連抗原である。免疫系は腫瘍関連抗原をターゲティングするとされているため、このような抗原は、免疫系が、腫瘍のコントロールを得るのに重要であると考えられる(Schumacherら、2015)。

## 【0005】

CALRエクソン9変異及びJAK2V617F変異は、もっぱら、骨髄悪性腫瘍内に見出される。したがって、これらは、がん特異的抗原である。結果として、エクソン9CALR変異体及びJAK

50

2V617Fは、がん免疫療法の魅力的な標的である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

骨髄増殖性障害、例えば、MPNを治療及び予防する方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、特許請求の範囲に記載の通りである。

【0008】

増殖性障害、例えば、骨髄増殖性障害を治療及び予防する、このような方法を提供するという課題は、CALR及びJAK2を、新規のT細胞標的として提供する本発明により解決される。本発明者らは、驚くべきことに、下記で規定される、変異体のCALR及びJAK2に由来するペプチドが、免疫原性であり、変異体CALR及び/又は変異体JAK2を発現する細胞に対する免疫応答を誘発し得ることを見出した。したがって、このようなペプチドは、骨髄増殖性障害、例えば、MPNを治療及び予防する方法において有用である。本明細書で開示されるペプチドは、T細胞応答を誘発することが可能であり、骨髄増殖性障害を治療及び予防する方法において有用なT細胞ワクチンを製造するのに使用することができる。

10

【0009】

したがって、本発明は、変異体CALR又は変異体JAK2を発現する細胞を直接ターゲティングする免疫応答を誘導し、これにより、これらの細胞を殺滅することにより、MPNを治療する材料及び方法を提供する。

20

【0010】

これは、T細胞が、変異体CALR又は変異体JAK2を発現する細胞を認識することを可能とすることによりなされる。興味深いことに、本発明は、変異体JAK2又は変異体CALRを発現する細胞に対する細胞傷害性免疫応答を健常対象において惹起することができ、変異体CALRに対するT細胞応答が健常ドナーにおいて同定されることを開示する。これは、骨髄増殖性障害、例えば、MPNを治療及び/又は予防する、新規の機構をもたらす。

【0011】

本明細書において、本発明者らは、T細胞が変異体JAK2を提示する抗原提示細胞(APC)を殺滅することが可能であり、T細胞が、CALR変異体ペプチドに曝露されると大幅に活性化されることを開示する。

30

【0012】

したがって、本発明は、変異したJAK2及び/又はCALRを発現する細胞をターゲティングするように免疫系を刺激することにより、MPN細胞内の変異体CALR及び/又は変異体JAK2の発現を利用する。

【0013】

驚くべきことに、変異体JAK2及び/又は変異体CALRに対する免疫応答を生じさせ得るワクチン組成物を提供することが、本発明の一態様である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

40

【図1-1】(A)患者P37からのCALR Long1に対する応答に関する三連のELISPOTの例を示す。(B)CALR Long1による刺激を受けた細胞と対照ウェルの間のスポットの平均量の差を示す棒グラフである。(C)患者C39からのCALR Long2に対する応答に関する三連のELISPOTの例を示す。(D)CALR Long2による刺激を受けた細胞と対照ウェルの間のスポットの平均量の差を示す棒グラフである。\*は、 $p < 0.05$ を示す。

【図1-2】図1-1のつづきである。

【図1-3】図1-2のつづきである。

【図1-4】図1-3のつづきである。

【図2-1】(A)CALR Long1ペプチドで1週間パルス刺激した患者C42由来のPBMCに関する細胞内サイトカイン染色による、ペプチドに対する強力なCD8<sup>+</sup> T細胞応答及びより穏やか

50

なCD4 T細胞応答を示す図である。(B)CALR Long1ペプチドでパルス刺激した自己樹状細胞で3回刺激した患者C42由来のPBMCから生じたT細胞に関する細胞内サイトカイン染色を示す。この実験は、CALR Long1ペプチドに対するCD4 T細胞の反応性の増加及びCD8 T細胞の若干低い反応性を実証する。

【図2-2】図2-1のつづきである。

【図3】TNF- ELISPOTにおけるCALR Long1及びCALR Long2に対する応答を示す。(A)CALR Long2に対する応答に関する三連のウェルの例を示す。(B)CALR Long1による刺激を受けた細胞と対照細胞の間のスポットの差を示すグラフである。(C)CALR Long2による刺激を受けた細胞と対照細胞の間のスポットの差を示すグラフである。\*は、 $p < 0.05$ を示す。

【図4-1】INF- ELISPOTによって解析した健常ドナーの変異したCALR配列由来の九量体ペプチドに対する応答を示す。CALR Long1ペプチドとCALR Long2ペプチドの両方における九量体ペプチドは、健常ドナーにおいて強力な自発的免疫応答を誘発する。\*は、 $p < 0.05$ を示す。

10

【図4-2】図4-1のつづきである。

【図4-3】図4-2のつづきである。

【図4-4】図4-3のつづきである。

【図4-5】図4-4のつづきである。

【図5】CALR Long1ペプチドによる刺激を受けたPBMCに関する細胞内サイトカイン染色を示す。2人の健常ドナーは、CALR Long1ペプチドによる刺激の際にCD4 T細胞の応答を呈する。

20

【図6】T細胞応答がJAK2変異体ポリペプチドの発現を必要とすることを示す。

【図7】変異体CALR C末端のエピトープに対するCALR Long1-バルク培養物におけるCD4<sup>+</sup> T細胞の特異性を示す。CALR Long1により刺激を受けた細胞(上段左)、CALR Long3による刺激(中段左)、CALR Long2による刺激(下段左)、CALR Long4による刺激(上段右)、CALR Long5による刺激(中段右)及びスクランブルペプチド(scrambled peptide)。

【図8】CALR Long1ペプチド(RRMMRTKMRMRMRTRRRKMRRKMSPARP)に対して特異的なCD4<sup>+</sup> T細胞培養物の確立を示す。A. 上段は、樹状細胞による3回の刺激後のバルク培養物の特異性を示す。中段は、バルク培養物のIFN- 濃縮後の特異性を示す。下段は、CD4<sup>+</sup> CALR Long1特異的T細胞の特異性を示す。B. CD4<sup>+</sup> CALR Long1特異的T細胞の表現型解析。

【図9】CD4<sup>+</sup> CALR Long1特異的T細胞が、自己CALRmut細胞を認識することを示す。A. 特異的T細胞を、エフェクター:標的比1:1の自己CALRmut CD14<sup>+</sup>単球で刺激した。B. 特異的T細胞は、エフェクター:標的比3:1の自己CALRmut CD14<sup>+</sup>単球で刺激した。C. エフェクター:標的比1:1における自己EBV形質転換B細胞による特異的T細胞の刺激。D. CD14<sup>+</sup>濃縮の純度解析。

30

【図10-1】自己CALRmut標的細胞の認識が、IFN- による標的細胞の刺激によって増強され、標的細胞にCALR siRNAをトランスフェクトすると低下することを示す。A. CALR Long1-特異的T細胞を、自己CD14<sup>+</sup>単球又は自己EBV形質転換B細胞(BCL)で刺激した。抗原提示を増強するために、標的細胞を、アッセイする前に、IFN- 300U/mlの培養物で24時間刺激した。エフェクター:標的比は、全ての実験で1:1であった。B. 自己骨髓細胞に、陰性対照のRNAをトランスフェクトするか、又はCALR siRNAをトランスフェクトし、次いで、エフェクター細胞としてのCD4<sup>+</sup> CALR Long1特異的T細胞を用いる細胞内サイトカイン染色において、標的細胞として使用した。C. トランスフェクション対照として、Bの標的細胞と同じ電気穿孔パラメーターを使用して、自己骨髓細胞にFITCコンジュゲートsiRNA(左)をトランスフェクトした。陰性対照(右)をトランスフェクトした細胞を使用してゲートを設定した。

40

【図10-2】図10-1のつづきである。

【図11】CALR Long1特異的応答は、拘束エレメントとしてHLA-DRでHLAクラスIIに拘束性である。A. CD4<sup>+</sup> CALR Long1特異的T細胞を、エフェクター:標的比1:1で自己CD14<sup>+</sup>単球により刺激した。単球は、未処理のままか(A、上段)又はHLAクラスII-遮断モノクローナル抗体(TU39)で30分間処理した(A、下段)。B. CD4<sup>+</sup> CALR Long1特異的T細胞を、CALR Long1ペ

50

プチドで刺激し、次いで、未処理のまま(B、上段)、HLA-DQ特異的抗体で15分間(B、中段)又はHLA-DR特異的抗体で15分間処理した(B、下段)。

【図12】CALRLong1特異的T細胞が、骨髄及び血液由来の自己CD34<sup>+</sup>細胞を認識することを示す。A. CALRLong1特異的T細胞を、エフェクター:標的比3:1で新たに吸引した骨髄から単離した自己CD34<sup>+</sup>単球(上段)、又はスクランブル陰性対照ペプチドで刺激した。標的細胞の量が制限されているため、実験は二連で実施した。B. 骨髄吸引由来のCD34<sup>+</sup>濃縮細胞の純度解析。C. 凍結保存したPBMC(上段)及びスクランブル陰性対照(下段)から単離した自己CD34<sup>+</sup>細胞によるCALRLong1特異的T細胞の刺激。両方の実験を、エフェクター:標的比5:1で実行した。単離したCD34<sup>+</sup>細胞は、アッセイする前に5%のヒト血清を含むX-VIVOで48時間静止させた。標的細胞の欠如により、実験は1つのウェルで実行した。D. 凍結保存したPBMC由来のCD34<sup>+</sup>濃縮細胞の純度解析。

10

【図13-1】CD4<sup>+</sup> CALRLong1特異的T細胞が、CALRLong1ペプチドでパルス刺激した自己細胞に対して細胞傷害性であることを示す。A. CALRLong1特異的T細胞を、CALRLong1ペプチド(上段)又はスクランブルペプチド(下段)でパルス刺激した自己EBV形質転換B細胞(BCL)で刺激した。B. CALRLong1特異的T細胞をCALRLong1でパルス刺激されたBCL又はスクランブルペプチドでパルス刺激されたBCLのいずれかと共にインキュベートした場合の標準Cr<sup>51</sup>細胞傷害性アッセイからの死滅曲線。C. CD4<sup>+</sup> CALRLong1特異的T細胞を、CALRLong1(上段)又はスクランブルペプチド(下段)でパルス刺激されたBCLで刺激し、次いで、PEコンジュゲートCD107a抗体で染色した。D. CALRLong1バルク培養物由来の細胞を、CALRLong1(上段)又はスクランブルペプチド(下段)で刺激し、次いで、PEコンジュゲートCD107a抗体で

20

【図13-2】図13-1のつづきである。

【図14-1】健常ドナーのペプチドCALRLong1に対する自発的免疫応答を示す(実施例3)。21名の解析した患者のうち、17名(81%)がペプチドに対する有意な応答を呈した。

【図14-2】図14-1のつづきである。

【図15-1】健常ドナーのペプチドCALRLong2に対する自発的免疫応答を示す(実施例3)。23名の解析した患者のうち、18名(78%)がペプチドに対する有意な応答を呈した。

【図15-2】図15-1のつづきである。

【図16-1】健常ドナーのペプチドCALRLong4に対する自発的免疫応答を示す(実施例3)。9名の解析した患者のうち、9名(100%)がペプチドに対する有意な応答を呈した。

30

【図16-2】図16-1のつづきである。

【図17-1】健常ドナーのペプチドCALRLong5に対する自発的免疫応答を示す(実施例3)。7名の解析した患者のうち、7名(100%)がペプチドに対する有意な応答を呈した。

【図17-2】図17-1のつづきである。

【図18-1】TNF- ELISPOTによって解析したペプチドCALRLong1及びCALRLong2に対する健常ドナーの自発的免疫応答を示す。A. 10名の健常対照者をCALRLong1に対するTNF- 応答について解析したところ、3名が有意な応答を有した。これら3名のレスポンドーの全員が、同様に、CALRLong1に対するIFN- 応答を保有した。10名の健常対照者をCALRLong2に対するTNF- 応答について解析した。5名が有意な応答を保有し、これら5名の個体の全員が、同様に、CALRLong2に対するIFN- 応答を有した。B. 10名の健常対照者をCALRLong2に対するTNF- 応答について解析した。5名が有意な応答を保有し、これら5名の個体の全員が、同様に、CALRLong2に対するIFN- 応答を有した。

40

【図18-2】図18-1のつづきである。

【図19】10名の健常対照者を変異体CALR C末端の九量体ペプチドに対するin vitro IFN- ELISPOTを使用して、自発的免疫応答についてスクリーニングした。ペプチドB1は、変異体C末端の第1の九量体ペプチドであり、B2は、第2のものであり、以下同様である。本発明者らは、変異体CALR C末端の全ての部分の九量体エピトープに対する免疫応答を特定したが、大部分は、最も免疫原性である九量体エピトープとしてのペプチドB11に関する配列の最初の半分で特定された。

【図20-1】細胞内サイトカイン染色を使用して、CALR変異体九量体ライブラリーの上

50

述のELISPOT解析で特定したIFN- $\gamma$ 分泌細胞の表現型を決定した。CALR変異体ペプチドによる刺激に際してサイトカインを分泌した細胞は、CD4<sup>+</sup> T細胞であったか(A)又は大部分がCD4<sup>+</sup> T細胞(B)であった。しかし、ドナーBC342における1つのCD8<sup>+</sup> T細胞応答がペプチドB11による刺激の際に特定された。ドナーBC348は、ペプチドC2による刺激の際に非常に強力なCD4<sup>+</sup>応答を呈した(B)。全体で、5名のドナーを解析し、本発明者らは、ドナーのうちの4名において少なくとも1つのペプチドに対する応答を特定した。

【図20-2】図20-1のつづきである。

【図21-1】JAK201特異的T細胞の特異性を示す。(a)HIV対照と比較して、JAK201ペプチドによる刺激の際のJAK201特異的T細胞からのIFN- $\gamma$  (左)及びTNF- $\alpha$  (右)の放出を実証するELISPOTアッセイ。(b)JAK201wtペプチドと比較して、JAK201ペプチドによる刺激の際のJAK201特異的T細胞からのIFN- $\gamma$  (左)及びTNF- $\alpha$  (右)の放出を実証するELISPOTアッセイ。Moodieらによって記載されたディストリビューションフリーリサンプリング方法(distribution-free resampling method)を三連の統計解析のために使用した。P < 0.05を統計的に有意とみなした。(c)JAK201及びJAK201wtペプチドの濃度の滴定による標準Cr<sup>51</sup>細胞傷害性アッセイ。(d)エフェクター細胞として使用されるJAK201特異的T細胞、及び標的細胞として使用される、HLA-A2若しくはHLA-A3がトランスフェクトされ、JAK201ペプチドでパルス刺激されたK562細胞、又はHLA-A2がトランスフェクトされ、いずれのペプチドも含まないK562細胞のいずれかによる標準Cr<sup>51</sup>細胞傷害性アッセイ。

【図21-2】図21-1のつづきである。

【図21-3】図21-2のつづきである。

【図22-1】JAK201特異的T細胞の細胞溶解能を示す。(a)JAK2V617F変異がん細胞UKE-1及びJAK2wt、HLA-A2がトランスフェクトされたK562細胞、IFN- $\gamma$  で2日間前処理されたUKE-1細胞、並びにIFN- $\gamma$  で2日間前処理されたHLA-A2がトランスフェクトされたK562細胞に対するJAK201特異的T細胞の反応性を調査するIFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイ。実験は、三連又は二連で実施した。Moodieらによって記載されたディストリビューションフリーリサンプリング方法を三連の統計解析のために使用した。P < 0.05を統計的に有意とみなした。(b)エフェクター細胞として使用されるJAK201特異的T細胞、及び標的細胞として使用される、IFN- $\gamma$  による2日間の前処理をしたか前処理をしないJAK2V617F変異を保有するHLA-A2陽性急性骨髄性白血病がん細胞株UKE-1による標準Cr<sup>51</sup>細胞傷害性アッセイ。UKE-1細胞は、JAK2V617F変異についてホモ接合性である。更に、T2細胞を、対照の標的細胞として使用した。(c)エフェクター細胞として使用されるJAK201特異的T細胞、及び標的細胞として使用されるJAK2V617F siRNAがトランスフェクトされたか又はモックトランスフェクトされたUKE-1細胞による標準Cr<sup>51</sup>細胞傷害性アッセイ。(d)HLA-A2陽性JAK2wt急性骨髄性白血病がん細胞株THP-1に対するJAK201特異的T細胞の反応性を調査するELISPOTアッセイ。細胞には、JAK2V617FをコードするmRNA又は対照としてNGFRをコードするmRNAのいずれかがトランスフェクトされた。T細胞は、対照と比較して、JAK2V617F変異THP-1細胞による刺激の際に、IFN- $\gamma$  (左)、TNF- $\alpha$  (中央)及びグランザイムB(右)をより多く分泌する。Moodieらによって記載されたディストリビューションフリーリサンプリング方法を三連の統計解析のために使用した。P < 0.05を統計的に有意とみなした。

【図22-2】図22-1のつづきである。

【図22-3】図22-2のつづきである。

【図22-4】図22-3のつづきである。

【図22-5】図22-4のつづきである。

【発明を実施するための形態】

【0015】

[定義]

アジュバント: 投与された免疫原として活性のペプチド/抗原/核酸構築物との混合剤が、前記ペプチド/抗原に対する免疫応答を増加させるか又はそうでない場合は改変する任意の物質。

【0016】

抗原:クローン的に分布した免疫受容体(T細胞又はB細胞受容体)に結合することができる任意の物質。通常、ペプチド、ポリペプチド、又は多量体ポリペプチドである。抗原は、好ましくは、免疫応答を誘発することが可能である。

【0017】

APC:抗原提示細胞。APCは、その表面上にMHCと複合体化した抗原を呈する細胞である。T細胞は、そのT細胞受容体(TCR)を使用してこの複合体を認識することができる。APCは以下の2つのカテゴリーに分類される:プロフェッショナル(以下の3つの型が存在する:樹状細胞、マクロファージ及びB細胞)又は非プロフェッショナル(ナイーブT細胞との相互作用に必要な主要組織適合性複合体タンパク質を構成的に発現せず、これらは、IFN- などのある特定のサイトカインによって非プロフェッショナルAPCの刺激の際のみに発現される)。

10

【0018】

追加免疫:追加抗原の注射又は投与によって追加免疫するとは、免疫剤の前の投与によって誘発された免疫応答を維持するために最初の投与後のある時点で投与されたさらなる用量の免疫剤、例えば、ワクチンを投与することである。

【0019】

担体:免疫応答の誘導を補助するために抗原をカップリングさせる実体又は化合物。

【0020】

CALR:CALR遺伝子は、ヒトのカルレティキュリンをコードする。カルレティキュリンは、カルレグリン、CRP55、CaBP3、カルセケストリン様タンパク質、及び小胞体タンパク60(ERp60)としても知られている。用語「エクソン9変異体CALR」は、本開示全体を通して、CALRのエクソン9に少なくとも1つの非サイレント変異を含む変異体カルレグリンを指す。例えば、エクソン9変異体CALRは、配列番号16のアミノ酸配列を含んでもよい。エクソン9変異体の例は、L367fs\*46(配列番号10に示される全長)、E370fs\*43、E370fs\*48、L367f\*48、L367fs\*44、K368fs\*51、L367fs\*52、R366fs\*53、E371fs\*49、K368fs\*43、E370fs\*37、D373fs\*47、K374fs\*53、E371fs\*49、K385fs\*47、K385fs\*47、R376fs\*55、K385fs\*47、E381fs\*48である(Nangaliaら、2013、上記変異の配列は、Nangaliaらの図3、パネルA、2400頁に列挙されている)。典型的には、前記エクソン9変異体CALRは、野生型カルレティキュリンタンパク質と共有されるN末端配列を含むことになる。したがって、エクソン9変異体CALRは、配列番号1の配列に加えて、配列番号10のアミノ酸1~360を含んでもよい。したがって、エクソン9変異体CALRは、配列番号10に示されるポリペプチドであってもよい。言い換えれば、エクソン9変異体CALRは、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

20

30

【0021】

CALR<sub>xx-yy</sub>:本明細書で使用する場合、この命名法は、言及される全長配列、すなわち、配列番号9のアミノ酸xx~yyからなるCALRのポリペプチド断片を指す。

【0022】

エクソン9変異体CALR<sub>xx-yy</sub>:本明細書で使用する場合、この命名法は、配列番号10の配列のアミノ酸xx~yyからなるCALRのポリペプチド断片を指す。

【0023】

キメラタンパク質:2つ以上の完全若しくは部分的な遺伝子又は一連の(非)ランダム核酸の同時スプライシングによって作製されたヌクレオチド配列によってコードされる遺伝子操作されたタンパク質。

40

【0024】

臨床状態:医学的配慮を必要とする状態、本明細書では、特に、CALR又はJAK2、特に、CALR又はJAK2の変異体形態の発現に関連する状態。そのような状態の例として、骨髄増殖性障害などの増殖性障害、例えば、がんが挙げられる。

【0025】

CTL:細胞傷害性Tリンパ球。T細胞受容体と共にCD8を発現し、したがって、クラスI分子によって提示される抗原に応答することができるT細胞の亜群。

50

## 【0026】

送達ビヒクル:ヌクレオチド配列若しくはポリペプチド又はその両方を少なくとも一方の媒体から別の媒体に輸送することができる実体。

## 【0027】

DC:樹状細胞。(DC)は免疫細胞であり、哺乳動物免疫系の一部を形成する。その主な機能は、抗原物質をプロセッシングし、免疫系の他の細胞に対してその表面上に抗原物質を提示することであり、したがって、抗原提示細胞(APC)として機能する。

## 【0028】

断片:断片は、核酸又はポリペプチドの非全長部分を示すために使用する。したがって、断片自体がそれぞれ核酸又はポリペプチドでもある。

10

## 【0029】

機能的相同体:機能的相同体は、基準ポリペプチドと少なくともいくらかの配列同一性を示し、元の機能性の少なくとも一態様を保持している任意のポリペプチドであり得る。本明細書では、CALR若しくはJAK2又はその免疫原として活性のペプチド断片の機能的相同体は、CALR若しくはJAK2又はその断片と少なくともいくらかの配列同一性を共有するポリペプチドであり、CALR又はJAK2発現細胞に対する免疫応答を誘導する能力を有する。エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F変異体又はその免疫原として活性のペプチド断片の機能的相同体は、配列番号10のエクソン9変異体CALR若しくは配列番号6のJAK2V617F又はその断片と少なくともいくらかの配列同一性を共有するポリペプチドであり、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617F発現細胞に対する免疫応答を誘導する能力を有する。典型的には、JAK2V617Fの機能的相同体は、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む。エクソン9変異体CALRの機能的相同体は、典型的には、配列番号16の少なくとも一部を含む。

20

## 【0030】

免疫原として活性のペプチド:少なくとも1つの個体への投与後に前記個体において、免疫応答、好ましくは、T細胞応答を誘発することが可能なペプチド。ペプチドは、*in vitro*を含む任意の適切な方法を使用して免疫原として活性であると特定され得る。例えば、ペプチドは、以下の特徴:

(i)ELISPOTアッセイにより決定して、少なくとも1人のがん患者のPBL集団内のINF- 産生細胞を、PBL 10<sup>4</sup>個当たり少なくとも1個の頻度で誘発することが可能であること、及び/又は

30

(ii)腫瘍組織試料中で、エピトープペプチドと反応性であるCTLの*in situ*における検出が可能であること、及び/又は

(iii)特異的T細胞の増殖を*in vitro*において誘導することが可能であること  
のうちの少なくとも1つを有する場合、免疫原として活性であると特定され得る。あるペプチドが免疫原として活性であるか否かを決定するために適切な方法は、以下の「実施例」のセクションでも提供されている。

## 【0031】

個体:一般に、鳥類、哺乳動物、魚類、両生類、又は爬虫類の任意の種又は亜種、好ましくは、哺乳動物、最も好ましくは、ヒト。

## 【0032】

感染:本明細書では、用語「感染」は、病因物質による宿主生物への侵襲を含む任意の種類臨床状態に関する。特に、感染は、病原体による個体への侵襲を含む臨床状態を指す。

40

## 【0033】

単離:本明細書で開示された核酸、ポリペプチド、及び抗体に関連して使用される、「単離」は、これらをその天然の、典型的には細胞の環境の成分から同定及び分離及び/又は回収することを指す。本発明の核酸、ポリペプチド、及び抗体は単離するのが好ましく、本発明のワクチン及び他の組成物は、単離した核酸、ポリペプチド、又は単離した抗体を含むのが好ましい。

## 【0034】

50

JAK2: JAK2遺伝子は、ヤヌスキナーゼファミリーのメンバーである非受容体チロシンキナーゼ、ヤヌスキナーゼ2をコードし、II型サイトカイン受容体ファミリー(例えば、インターフェロン受容体)、GM-CSF受容体ファミリー(IL-3R、IL-5R及びGM-CSF-R)、gp130受容体ファミリー(例えば、IL-6R)、及び単鎖受容体(例えば、Epo-R、Tpo-R、GH-R、PRL-R)のメンバーによるシグナル伝達に参与してきた。JAK2シグナル伝達は、プロラクチン受容体から下流で活性化される。JAK2に対する他の名称は、JTK10及びTHCYT3である。

【0035】

JAK2<sub>xx-yy</sub>: 本明細書で使用する場合、この命名法は、配列番号5のアミノ酸xx~yyからなるJAK2のポリペプチド断片を指す。

【0036】

JAK2V617F<sub>xx-yy</sub>: 本明細書で使用する場合、この命名法は、配列番号6のアミノ酸xx~yからなるJAK2のポリペプチド断片を指す。

【0037】

骨髄増殖性腫瘍(MPN): MPNは、造血幹細胞から生じ、骨髄不全(骨髄線維症)及び最終的には急性骨髄性白血病をもたらす進行性骨髄線維症を伴う血液細胞の過剰産生(本態性血小板血症、真性多血症、骨髄線維症)によって特徴付けられる後天的血液がんである。この用語は、フィラデルフィア陰性骨髄増殖性腫瘍を含む。本態性血小板血症、真性多血症及び原発性骨髄線維症は、骨髄異形成症候群又は急性骨髄性白血病に進展する場合がある。早期がんステージ(ET/PV)から進行がんステージ(脾腫の巨大化を伴う骨髄線維症)への生物学的連続性におけるこの進展は、ゲノム不安定性の増加、さらなる変異を伴うサブクローン形成、最終的には従来の療法への耐性によって定義される。

【0038】

MHC: 主要組織適合性複合体であって、2つの主なMHCサブクラスであるクラスI及びクラスIIが存在する。

【0039】

核酸: 遺伝情報を伝達するヌクレオチドの鎖又は配列。本発明に関して、核酸は、一般的に、デオキシリボ核酸(DNA)である。

【0040】

核酸構築物: 遺伝子操作された核酸。典型的には、いくつかのエLEMENT、例えば、遺伝子又は遺伝子の断片、cDNA、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、ポリAテール、リンカー、ポリリンカー、機能的リンカー、多重クロニング部位(MCS)、マーカー、終止コドン、他の調節ELEMENT、内部リボゾーム侵入部位(IRES)などを含む。

【0041】

機能的リンカー: 核酸又はポリペプチドの生物学的プロセッシングを確保する様式で核酸構築物又は(キメラ)ポリペプチドの2つの部分を一緒に結合するヌクレオチド又はアミノ酸残基の配列。

【0042】

PBL: 末梢血球は、循環血液内で見出されるが、リンパ系、脾臓、肝臓、又は骨髄内で隔絶されない、赤血球、白血球、及び血小板からなる血液の細胞構成成分である。

【0043】

PBMC: 末梢血単核球(PBMC)は、円形の核を有する血球、例えば、リンパ球又は単球である。これらの血球は、感染と戦い、侵入者に適応するための免疫系における重要な構成成分である。リンパ球集団は、T細胞(CD4及びCD8陽性、約75%)、B細胞及びNK細胞(合わせて約25%)からなる。

【0044】

ポリペプチド: 配列を定義し、アミド結合によって連結された複数の共有結合により連結したアミノ酸残基。この用語を、オリゴペプチド及びペプチドと同様に使用する。用語ポリペプチドはまた、当技術分野で公知の化学反応又は酵素触媒反応によって導入された翻訳後修飾を包含する。この用語は、ポリペプチドのパリアント又は断片をいうことができる。

10

20

30

40

50

## 【0045】

薬学的担体: 賦形剤、又は安定剤とも称され、用いられる投薬量及び濃度で曝露された細胞又は個体に無害である。薬学的担体は、水性pH緩衝液であることが多い。薬学的担体の例として、緩衝液、例えば、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸;アスコルビン酸を含む抗酸化剤;低分子量(約10残基未満)のポリペプチド;タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリン;親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン;アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン若しくはリジン;単糖、二糖、及び他の炭水化物(グルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む);キレート剤、例えば、EDTA;糖アルコール、例えば、マンニトール若しくはソルビトール;塩形成対イオン、例えば、ナトリウム;並びに/又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN(商標)、ポリエチレングリコール(PEG)、及びPLURONICS(商標)が挙げられる。

10

## 【0046】

複数: 少なくとも2つ。

## 【0047】

増殖性障害: 本明細書では、任意の前腫瘍又は腫瘍疾患、良性又は悪性のものであり、「腫瘍」は、細胞の異常な増殖を指す。増殖性障害の非限定例は、がんである。

## 【0048】

プロモーター: RNAポリメラーゼが結合して1つ以上の近隣の構造遺伝子によるメッセンジャーRNAの転写が開始されるDNA鎖中の結合部位。

## 【0049】

界面活性剤: 溶解される液体の表面張力を低減することが可能な界面活性剤。界面活性剤は、親水性である極性基及び疎水性である非極性基を含有し、脂肪鎖から構成されることの多い化合物である。

20

## 【0050】

Treg: 調節性T細胞/Tリンパ球

## 【0051】

治療: 用語「治療」は、本明細書で使用する場合、治療的治療及び/又は軽減治療及び/又は疾患の症状を低減する治療及び/又は疾患の進行を遅らせる治療を指す場合がある。

## 【0052】

ワクチン: 個体において、特に、哺乳動物において、好ましくは、ヒトにおいて、免疫応答を誘導することが可能な物質又は組成物。本明細書では、免疫原性組成物ともいう。本発明によるワクチンは、多くの場合、少なくとも1種のアジュバント及び免疫原として活性のペプチドを含む組成物であり得る。作用因子に対する免疫応答は、生物の記憶を誘導する、体液性、抗体及び/又は細胞の応答であり、結果として、前記作用因子は、一次応答よりもむしろ二次応答によって対処され、それによって宿主生物に及ぼす影響が低減される。前記作用因子は、病原体であってもよい。本発明の文脈で、作用因子は、好ましくは、増殖性障害に関連する細胞、例えば、がん細胞である。本発明のワクチンを、臨床状態に遭遇する危険性を低減するための予防として、及び/又は臨床状態の治療のための治療薬として与えることができる。組成物は、抗原、1つ以上の抗原をコードする核酸構築物、担体、アジュバント及び薬学的担体のうちの1つ以上を含むことができる。

30

40

## 【0053】

バリエーション: 所与の基準核酸又はポリペプチドの「バリエーション」は、前記基準核酸又はポリペプチドとある程度の配列相同性/同一性を示すが、前記基準核酸又はポリペプチドと同一でない核酸又はポリペプチドを指す。

## 【0054】

[発明の詳細な説明]

本開示は、骨髄増殖性障害を治療又は予防する方法において使用するためのワクチン組成物に関する。

## 【0055】

別の態様では、本開示は、

50

a)

(i) 配列番号1又は配列番号16を含む、CALRのエクソン9変異体、例えば、配列番号10に示されるCALRのエクソン9変異体、

(ii) 配列番号10に示されるエクソン9変異体CALRの、免疫原として活性のペプチド断片であって、配列番号10のアミノ酸361～411のうちの少なくとも一部を含む断片、

(iii) 配列番号16若しくは配列番号1、又はその断片からなる、免疫原として活性のペプチド、

(iv) (i)、(ii)、若しくは(iii)のポリペプチドの機能的相同体であって、配列番号10と少なくとも70%の配列同一性を共有し、且つ/又は最大で3個のアミノ酸、例えば、最大で2個のアミノ酸、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、配列番号16、配列番号1、若しくは配列番号10のアミノ酸の連続配列と同一な配列からなる、免疫原として活性のポリペプチドである機能的相同体、

(v) (i)、(ii)、(iii)、又は(iv)のポリペプチドのうちのいずれかを含むポリペプチド、

(vi) (i)、(ii)、(iii)、(iv)、又は(v)のポリペプチドのうちのいずれかをコードする核酸

のうちの1つ以上、

又は

a)

(vii) 配列番号6に示されるJAK2V617F変異体、

(viii) 配列番号6に示されるJAK2V617F変異体の、免疫原として活性のペプチド断片であって、アミノ酸617を少なくとも含む断片、

(ix) (vii)及び(viii)のポリペプチドの機能的相同体であって、配列番号6と少なくとも70%の配列同一性を共有し、且つ/又は最大で3個のアミノ酸、例えば、最大で2個のアミノ酸、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、配列番号6のアミノ酸の連続配列と同一な配列からなる、免疫原として活性のポリペプチドであり、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む機能的相同体、

(x) (vii)、(viii)、又は(ix)のポリペプチドのうちのいずれかを含むポリペプチド、

(xi) (vii)、(viii)、(ix)、又は(x)のポリペプチドのうちのいずれかをコードする核酸

のうちの1つ以上

を含み、

任意選択で、アジュバントをさらに含む  
ワクチン組成物に関する。

【0056】

本開示はまた、医薬として使用するための、本明細書に記載されるワクチン組成物にも関する。

【0057】

本開示はまた、本明細書に記載されるワクチン組成物、及び第2の有効成分を含むキットにも関する。

【0058】

さらに別の態様では、本開示は、本明細書で規定されるペプチド断片、及びクラスIのHLA分子若しくはクラスIIのHLA分子、又はこのような分子の断片の複合体に関する。

【0059】

さらに別の態様では、本開示は、臨床状態にある個体において、CALRに対して反応性のT細胞、又はJAK2に対して反応性のT細胞の存在を検出する方法であって、腫瘍組織又は血液試料を、本開示の複合体と接触させるステップ、及び複合体の、組織又は血液細胞との結合を検出するステップを含む方法に関する。

【0060】

さらに別の態様では、本明細書で規定されるペプチド断片に特異的に結合することが可

10

20

30

40

50

能である分子が開示される。

【0061】

さらに別の態様では、本明細書で規定されるペプチド断片に特異的に結合することが可能である分子の結合を遮断することが可能である分子が開示される。

【0062】

さらに別の態様では、エクソン9変異体CALRの発現及び/又はJAK2V617Fの発現によって特徴付けられる臨床状態を治療又は予防する方法であって、前記臨床状態にある個体に、有効量の、本明細書で記載される組成物、分子、又はペプチドを投与するステップを含む方法が開示される。

【0063】

さらに別の態様では、本開示は、臨床状態を治療又は予防するための医薬の製造における、本明細書で記載されるワクチン組成物、キット、分子、又はペプチドの使用に関する。

【0064】

さらに別の態様では、本開示は、免疫化をモニタリングする方法であって、

a) 個体に由来する血液試料を用意するステップ、

b) (i) 配列番号16又は配列番号1を含む、CALRのエクソン9変異体、例えば、配列番号10に示される、CALRのエクソン9変異体、

(ii) 配列番号10に示されるエクソン9変異体CALRの、免疫原として活性のペプチド断片であって、配列番号10のアミノ酸361～411のうち少なくとも一部を含む断片、

(iii) 配列番号1若しくはその断片からなる、免疫原として活性のペプチド、

(iv) 配列番号6に示されるJAK2V617F変異体、

(v) 配列番号6に示されるJAK2V617F変異体の、免疫原として活性のペプチド断片であって、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む断片、又は

(vi) 前述のうちのいずれかの機能的相同体

を用意するステップ、及び

c) 前記血液試料が、タンパク質又はペプチドに特異的に結合する、抗体又はT細胞受容体を含むT細胞を含むのかどうかを決定するステップ

を含み、

これにより、前記タンパク質又はペプチドに対する免疫応答が、前記個体において惹起されたのかどうかを決定する

方法に関する。

【0065】

さらに別の態様では、本開示は、変異体CALR又は変異体JAK2の発現と関連する臨床状態、例えば、骨髄増殖性障害の治療又は予防において使用するための、配列番号16若しくは配列番号1の連続配列のうち少なくとも一部を含む、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片、又はその機能的相同体、配列番号7の連続配列のうち少なくとも一部を含む、免疫原として活性の変異体JAK2のペプチド断片、又はその機能的相同体、又は前記エクソン9変異体CALRのペプチド断片又は変異体JAK2のペプチド断片をコードする核酸、に関する。このような実施形態では、前記機能的相同体は、最大で3個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである。

【0066】

また、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fを特異的に認識する細胞を含む組成物であって、好ましくは、エクソン9変異体CALRが、最大で3個のアミノ酸が置換され、配列番号16の連続配列を含むか、又はJAK2V617Fが、最大で3個のアミノ酸が置換された、配列番号6の連続配列を含む組成物も開示される。

【0067】

さらに別の態様では、CALRの配列(配列番号9)、又は配列番号1の配列を含むCALRのエクソン9変異体の配列のうち、50個までの連続アミノ酸を含むか、又はそれからなるペプチドであって、前記変異体が、任意選択で、配列番号10の配列を有し、前記連続アミノ酸

10

20

30

40

50

が、配列番号1、2、3、15、16、又は17のうちのいずれか1つの配列を含み、より好ましくは、前記連続アミノ酸が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、又は配列番号17を含み、任意選択で、最大で1~10個の間の連続アミノ酸が、置換、例えば、保存的置換により置き換えられているペプチドが提供される。

【0068】

さらに別の態様では、エクソン9変異体CALRを特異的に認識する細胞を含む組成物であって、好ましくは、エクソン9変異体CALRが、最大で3個のアミノ酸が置換された、配列番号16の連続配列を含む組成物が提供される。

【0069】

さらに別の態様では、JAK2V617Fを特異的に認識する細胞を含む組成物であって、好ましくは、JAK2V617Fが、最大で3個のアミノ酸が置換された、配列番号6の連続配列を含む組成物が提供される。

10

【0070】

さらに別の態様では、CALRの配列(配列番号9)、又は配列番号1の配列を含むCALRのエクソン9変異体の配列のうちの、50個までの連続アミノ酸を含むか、又はそれからなるペプチドであって、前記変異体が、任意選択で、配列番号10の配列を有し、前記連続アミノ酸が、配列番号1、2、3、15、16、又は17のうちのいずれか1つの配列を含み、より好ましくは、前記連続アミノ酸が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、又は配列番号17を含み、任意選択で、最大で1~10個の間の連続アミノ酸が、置換、例えば、保存的置換により置き換えられているペプチドが提供される。

20

【0071】

さらに別の態様では、JAK2の配列(配列番号5)、又は配列番号6の配列を含むJAK2V617Fの配列のうちの、50個までの連続アミノ酸を含むか、又はそれからなるペプチドであって、前記連続アミノ酸が、配列番号7の配列を含み、任意選択で、最大で1~10個の間の連続アミノ酸が、置換、例えば、保存的置換により置き換えられているペプチドが提供される。

【0072】

さらに別の態様では、本明細書で開示されるペプチド、並びに、任意選択で、保存剤及び/又はアジュバントを含む医薬組成物が提供される。

【0073】

さらに別の態様では、それを必要とする個体を治療する方法であって、本明細書で開示されるペプチドを投与するステップを含む方法が提供される。

30

【0074】

#### ワクチン組成物

本開示は、増殖性障害、及び、特に、骨髄増殖性障害を治療又は予防する方法において使用するためのワクチン組成物に関する。

【0075】

a)

(i) 配列番号1を含む、CALRのエクソン9変異体、例えば、配列番号10に示されるCALRのエクソン9変異体、

40

(ii) 配列番号10に示される、エクソン9変異体CALRの、免疫原として活性のペプチド断片であって、配列番号16又は配列番号1のアミノ酸の連続配列のうちの少なくとも一部を含む断片、

(iii) 配列番号1又はその断片からなる、免疫原として活性のペプチド、

(iv) (i)、(ii)、若しくは(iii)のポリペプチドの機能的相同体であって、配列番号10と少なくとも70%の配列同一性を共有し、且つ/又は最大で3個のアミノ酸、例えば、最大で2個のアミノ酸、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、配列番号16、配列番号1、若しくは配列番号10のアミノ酸の連続配列と同一な配列からなる、免疫原として活性のポリペプチドである機能的相同体、

(v) (i)、(ii)、(iii)、又は(iv)のポリペプチドのうちのいずれかを含むポリペプチ

50

ド、

(vi)(i)、(ii)、(iii)、(iv)、又は(v)のポリペプチドのうちのいずれかをコードする核酸

のうちの1つ以上、

又は

b)

(vii)配列番号6に示されるJAK2V617F変異体、

(viii)配列番号6に示されるJAK2V617F変異体の、免疫原として活性のペプチド断片であって、アミノ酸617を少なくとも含む断片、

(ix)(i)及び(ii)のポリペプチドの機能的相同体であって、配列番号6と少なくとも70%の配列同一性を共有し、且つ/又は最大で3個のアミノ酸、例えば、最大で2個のアミノ酸、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、配列番号6のアミノ酸の連続配列と同一な配列からなる、免疫原として活性のポリペプチドである機能的相同体、

(x)(vii)、(viii)、又は(ix)のポリペプチドのうちのいずれかを含むポリペプチド、

(xi)(vii)、(viii)、(ix)、又は(x)のポリペプチドのうちのいずれかをコードする核酸

核酸

のうちの1つ以上

を含むワクチン組成物を提供することは、本発明の一態様である。

【0076】

上述に加えて、前記ワクチン組成物はまた、例えば、本明細書下記の「アジュバント」というセクションに記載されるアジュバントのうちのいずれかであり得るアジュバントも含むことが好ましい。

【0077】

本発明のワクチン組成物中で使用され得る機能的相同体については、本明細書下記の、「カルレティキュリン(CALR)」、「ヤヌスキナーゼ2(JAK2)」、「免疫原として活性のエクソン9変異体CALR及びJAK2V671Fのペプチド断片」、「機能的相同体」、及び「エクソン9変異体CALR及びJAK2V671F、又はその断片を含むポリペプチド」というセクションに記載する。

【0078】

カルレティキュリン(CALR)

カルレティキュリンとは、ヒトにおいて、CALR遺伝子によりコードされるタンパク質(配列番号9)である。本開示に従うCALRは、任意の有用なCALRであり得る。一般に、CALRは、本開示のワクチン組成物により治療することが意図される、同じ種のものであることが好ましい。本開示の好ましい実施形態では、ワクチン組成物は、ヒトへの投与が意図されるので、CALRは、ヒトCALRであり得る。ヒト野生型CALRのアミノ酸配列を、本明細書で配列番号9として提示する。CALRのエクソン9変異体L367fs\*46の全アミノ酸配列を、本明細書で配列番号10として提示する。

【0079】

したがって、CALRは、配列番号9のCALR、又は配列番号9のCALRに対して少なくとも70%の配列同一性を共有する、その機能的相同体であって、好ましくは、配列番号9のヒトCALRと少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも89%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも91%の配列同一性、例えば、少なくとも92%の配列同一性、例えば、少なくとも93%の配列同一性、例えば、少なくとも94%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、99%の配列同一性を有する機能的相同体であり得る。

【0080】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号10のエクソン9変異体CALR、又は配列番号10のエクソン9変異体CALRに対して少なくとも70%の配列同一性を共有する、その機能的相同

体、例えば、好ましくは、配列番号10のヒトエクソン9変異体CALRと少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも89%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも91%の配列同一性、例えば、少なくとも92%の配列同一性、例えば、少なくとも93%の配列同一性、例えば、少なくとも94%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、99%の配列同一性を有する機能的相同体を含むか、又はこれを認識する、ワクチン組成物、方法、細胞、ペプチド、又はペプチド断片に関する。

【0081】

CALRの機能的相同体であるエクソン9変異体CALR、及び配列同一性を決定する方法については、本明細書下記の「機能的相同体」という節で、より詳細に記載する。

【0082】

好ましくは、エクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号16に示されるエクソン9変異体の配列の連続アミノ酸配列の少なくとも一部を含む。一部の実施形態では、エクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、又は配列番号17を含むか、又はそれからなる。

【0083】

一部の実施形態では、配列番号10のエクソン9変異体CALRの機能的相同体は、アミノ酸のうちの一つ以上が、別のアミノ酸に変異しているか、又は欠失している変異体である。エクソン9変異体CALRのペプチド断片の機能的相同体はまた、アミノ酸のうちの一つ以上が、別のアミノ酸に変異しているか、又は欠失している、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、又は配列番号17の断片でもあり得る。本発明の文脈では、エクソン9変異体CALRの「機能的相同体」は、エクソン9変異体CALRを発現する細胞に対する免疫応答を誘導する能力を保持しながら、野生型CALRの触媒活性を欠く場合がある。

【0084】

ヤヌスキナーゼ2(JAK2)

ヤヌスキナーゼは、ヒトでは、JAK2遺伝子によりコードされるタンパク質(配列番号5)である。本開示に従うJAK2は、任意の有用なJAK2であり得る。一般に、JAK2は、本開示のワクチン組成物により治療することが意図される、同じ種のものであることが好ましい。本開示の好ましい実施形態では、ワクチン組成物は、ヒトへの投与が意図されるので、JAK2は、ヒトJAK2であり得る。ヒト野生型JAK2のアミノ酸配列を、本明細書において配列番号5として提示する。JAK2V617F変異体の全アミノ酸配列を、本明細書において配列番号6として提示する。

【0085】

したがって、JAK2は、配列番号5のJAK2、又は配列番号5のJAK2に対して少なくとも70%の配列同一性を共有する、その機能的相同体であって良く、したがって、好ましくは、配列番号5のヒトJAK2と少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも89%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも91%の配列同一性、例えば、少なくとも92%の配列同一性、例えば、少なくとも93%の配列同一性、例えば、少なくとも94%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、99%の配列同一性を有する機能的相同体であり得る。

【0086】

一部の実施形態では、本発明は、配列番号6のJAK2V617F変異体、又は配列番号6のJAK2V617Fに対して少なくとも70%の配列同一性を共有する、その機能的相同体であって、好ましくは、配列番号6のヒトエクソン9変異体JAK2と少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも89%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも91%の配列

10

20

30

40

50

同一性、例えば、少なくとも92%の配列同一性、例えば、少なくとも93%の配列同一性、例えば、少なくとも94%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、99%の配列同一性を有する機能的相同体を含むか、又は認識する、ワクチン組成物、方法、細胞、ペプチド、又はペプチド断片に関する。

【0087】

JAK2の機能的相同体であるJAK2V617F、及び配列同一性を決定する方法については、本明細書下記の「機能的相同体」という節で、より詳細に記載する。

【0088】

好ましくは、JAK2V617Fの断片は、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む。JAK2V617Fの断片はまた、配列番号7に示されるJAK2V617F配列の連続アミノ酸配列の一部を含むことが好ましい場合もある。一部の実施形態では、JAK2V617Fの断片は、配列番号7である。

10

【0089】

一部の実施形態では、配列番号6のJAK2V617F変異体は、アミノ酸のうちの一つ以上が別のアミノ酸に変異しているか、又は欠失している変異体である。変異体JAK2V617Fはまた、アミノ酸のうちの一つ以上が別のアミノ酸に変異しているか、又は欠失している変異体JAK2V617Fの断片、例えば、配列番号6の断片でもあり得る。本発明の文脈では、JAK2V617Fの「機能的相同体」は、JAK2V617Fを発現する細胞に対する免疫応答を誘導する能力を保持しながら、野生型であるJAK2の触媒活性を欠く場合がある。

20

【0090】

エクソン9変異体CALR及びJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片

野生型ヒトCALR、すなわち、このタンパク質の、天然の、全長の、非変異形は、配列番号9内で同定され、野生型ヒトJAK2、すなわち、このタンパク質の、天然の、全長の、非変異形は、配列番号5内で同定される。本発明は、CALR、CALRの免疫的に活性のペプチド断片、最大で3個のアミノ酸、例えば、最大で2個のアミノ酸、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されたCALRのペプチド断片、及び/又は配列番号9に対して少なくとも70%の配列同一性を含む、CALRの機能的相同体、を含むワクチン組成物を対象とする。

【0091】

好ましくは、本発明は、エクソン9変異体CALR、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片、エクソン9変異体CALRペプチド断片のほか、最大で3個のアミノ酸、例えば、最大で2個のアミノ酸、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換された、その機能的相同体、及び/又は配列番号10に対して少なくとも70%の配列同一性を含む、エクソン9変異体CALRの機能的相同体、を含むワクチン組成物を対象とする。好ましくは、エクソン9変異体CALRのペプチド断片、又はその機能的相同体は、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、又は配列番号17の連続アミノ酸配列を含む。配列番号16は、2つの最も顕著なエクソン9変異体CALRである、1型及び2型において見出される、コンセンサスアミノ酸配列を示す。言い換えれば、配列番号16は、配列番号10のCALR<sub>376-411</sub>に対応する。

30

【0092】

本発明はまた、JAK2、JAK2の免疫的に活性のペプチド断片、JAK2のペプチド断片のほか、最大で3個のアミノ酸、例えば、最大で2個のアミノ酸、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換された、その機能的相同体、及び/又は配列番号5に対して少なくとも70%の配列同一性を含む、JAK2の機能的相同体、を含むワクチン組成物も対象とする。本発明はまた、JAK2V617F、JAK2V617Fの免疫的に活性のペプチド断片、JAK2V617Fのペプチド断片のほか、最大で3個のアミノ酸、例えば、最大で2個のアミノ酸、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換された、その機能的相同体、及び/又は配列番号6に対して少なくとも70%の配列同一性を含む、JAK2V617Fの機能的相同体、を含むワクチン組成物も対象とする。好ましくは、JAK2のペプチド断片、又はその機能的相同体は、配列番号7の連続アミノ酸配列を含む。配列番号7は、配列番号6のJAK2<sub>610-618</sub>に対応するアミノ酸配列を示す。好ましくは、JAK2のペプチド断片、又はその機能的相同体は、配列番号6のJAK2V617Fの、アミノ酸61

40

50

7を少なくとも含む。

【0093】

本明細書では、ポリペプチド断片という用語は、配列番号16、配列番号1、配列番号10、又は配列番号6の少なくとも一部に直接由来するか、又はこれと同一となるように合成されたアミノ酸残基の、任意の非全長(配列番号9、配列番号10、配列番号5、又は配列番号6と比較して)連続配列を規定するのに使用される。ペプチド断片は、例えば、配列番号10の8~50個のアミノ酸の範囲、例えば、8~40個のアミノ酸の範囲、例えば、8~29個のアミノ酸の範囲の連続配列、例えば、配列番号10の8~27個のアミノ酸、例えば、配列番号10の8~25個のアミノ酸であり得る。例えば、ペプチド断片は、配列番号16、配列番号1、配列番号2、若しくは配列番号3、又は配列番号10の20~44個のアミノ酸を含み得るか、又はそれからなり得る。例えば、ペプチド断片は、配列番号15、配列番号1、又は配列番号17を含み得るか、又はそれからなり得る。ペプチド断片は、例えば、配列番号1の8~50個のアミノ酸、例えば、8~34個のアミノ酸の範囲、例えば、8~33個のアミノ酸の範囲、例えば、8~29個のアミノ酸の連続配列であり得る。ペプチド断片は、例えば、配列番号10の8~50個のアミノ酸の範囲、例えば、8~44個のアミノ酸の範囲、例えば、8~40個のアミノ酸の範囲、例えば、8~29個のアミノ酸の範囲の連続配列、例えば、配列番号10の、8~27個のアミノ酸、例えば、配列番号10の8~25個のアミノ酸であり得る。例えば、ペプチド断片は、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、又は配列番号17を含み得るか、又はそれからなり得る。ペプチド断片は、例えば、エクソン9変異体CALRである、L367fs\*46(配列番号10に示される全長)、E370fs\*43、E370fs\*48、L367fs\*48、L367fs\*44、K368fs\*51、L367fs\*52、R366fs\*53、E371fs\*49、K368fs\*43、E370fs\*37、D373fs\*47、K374fs\*53、E371fs\*49、K385fs\*47、K385fs\*47、R376fs\*55、K385fs\*47、E381fs\*48(Nangaliaら、2013:上記の変異の配列は、Nangaliaらの、2400頁、図3、パネルAに列挙されている)のうちのいずれかの、8~50個のアミノ酸、例えば、8~44個のアミノ酸の範囲、例えば、8~34個のアミノ酸の範囲、例えば、8~33個のアミノ酸、例えば、8~29個のアミノ酸の連続配列であり得る。

10

20

【0094】

ペプチド断片は、例えば、配列番号6の8~50個のアミノ酸の範囲、例えば、8~40個のアミノ酸の範囲、例えば、8~29個のアミノ酸の範囲の連続配列、例えば、配列番号6の8~27個のアミノ酸、例えば、配列番号6の8~25個のアミノ酸であり得、例えば、ペプチド断片は、配列番号7を含み得るか、又はこれからなる。

30

【0095】

野生型CALRの機能的相同体は、配列が、野生型CALR、例えば、配列番号9のヒト野生型CALRと異なるが、変異体CALRを発現する細胞、例えば、増殖性新生物細胞及びDCに対する免疫応答を誘導することがやはり可能である、全長CALR又はCALRの断片として規定することができる。一部の実施形態では、これらの細胞内で発現するCALRは、例えば、配列番号10に示される、CALRのエクソン9変異体である。

【0096】

エクソン9 CALR変異体の機能的相同体は、配列が、配列番号10のエクソン9 CALR変異体と異なるが、変異体CALRを発現する細胞、例えば、増殖性新生物細胞及びDCに対する免疫応答を誘導することがやはり可能である、全長のエクソン9 CALR変異体又はその断片として規定することができる。一部の実施形態では、これらの細胞内で発現するエクソン9変異体CALRは、配列番号10に示される、CALRのエクソン9変異体である。一実施形態では、変異体CALRを発現する細胞、例えば、増殖性新生物細胞及びDCに対する免疫応答を誘導することが可能である、エクソン9 CALR変異体の断片は、配列番号16に示される断片を含むか、又はこれからなる。別の実施形態では、断片は、配列番号2に示される断片を含むか、又はこれからなる。別の実施形態では、断片は、配列番号3に示される断片を含むか、又はこれからなる。別の実施形態では、断片は、配列番号15に示される断片を含むか、又はこれからなる。別の実施形態では、断片は、配列番号1に示される断片を含むか、又はこれからなる。別の実施形態では、断片は、配列番号17に示される断片を含むか、又はこ

40

50

れからなる。

【0097】

野生型JAK2の機能的相同体は、配列が、野生型JAK2、例えば、配列番号5のヒト野生型JAK2と異なるが、配列番号6のJAK2V617Fを発現する細胞、例えば、増殖性新生物細胞及びDCに対する免疫応答を誘導することがやはり可能である、全長野生型JAK2又は野生型JAK2の断片として規定することができる。

【0098】

JAK2V617F変異体の機能的相同体は、配列が、配列番号6に示されるJAK2V617Fと異なるが、配列番号6のJAK2V617Fを発現する細胞、例えば、増殖性新生物細胞及びDCに対する免疫応答を誘導することがやはり可能である、全長JAK2V617F又はJAK2V617Fの断片として規定することができる。好ましくは、機能的相同体は、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む。

10

【0099】

機能的相同体は、野生型のCALR又はJAK2の、変異形又は代替的スプライス変異体であり得る。別の態様では、CALR又はJAK2の機能的相同体は、本明細書の下記に記載される通りに規定される。機能的相同体は、*ex vivo*において、1つ以上の変異並びに/若しくは1つ以上の配列の欠失及び/若しくは付加を導入した、全長CALR又は断片化CALRの組換え変化形、エクソン9 CALR変異体、JAK2又はJAK2V617F変異体であり得るが、これらに限定されない。

【0100】

したがって、一実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号10内で同定される、エクソン9変異体CALRの、最大で90個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で80個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で70個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で60個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で50個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で45個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で40個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で35個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で30個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で24個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で22個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で20個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で15個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で10個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で9個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で8個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。置換は、保存的置換であり得る。

20

30

【0101】

前記免疫原として活性のペプチドエクソン9変異体CALR断片はまた、配列番号10内で同定される、エクソン9変異体CALRの、最大で80個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で70個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で60個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で50個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で45個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で40個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で35個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で30個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で24個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で22個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で20個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号10内で同定される、エクソン9変異体CALRの、24~32個の連続アミノ酸残基、例えば、26~29個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、この場合、1個以上のアミノ酸が、別のアミノ酸に変異しているか、又は欠失している。

40

【0102】

本発明の、好ましい一実施形態では、免疫原として活性のペプチド断片は、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、若しくは配列番号17の、20~29個のアミノ酸の範囲の連続アミノ酸、好ましくは、29個の連続アミノ酸、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列

50

のポリペプチドである機能的相同体からなる。

【0103】

したがって、別の具体的実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号16に由来する、最大で34個のアミノ酸残基、例えば、最大で33個のアミノ酸残基、例えば、最大で32個のアミノ酸残基、例えば、最大で31個のアミノ酸残基、例えば、最大で30個のアミノ酸残基、例えば、最大で29個のアミノ酸残基、例えば、最大で28個のアミノ酸残基、例えば、最大で27個のアミノ酸残基、例えば、最大で26個のアミノ酸残基、例えば、最大で25個のアミノ酸残基、例えば、最大で24個のアミノ酸残基、例えば、最大で23個のアミノ酸残基、例えば、最大で22個のアミノ酸残基、例えば、最大で21個のアミノ酸残基、例えば、最大で20個のアミノ酸残基、例えば、最大で19個のアミノ酸残基、例えば、最大で18個のアミノ酸残基、例えば、最大で17個のアミノ酸残基、例えば、最大で16個のアミノ酸残基、例えば、最大で15個のアミノ酸残基、例えば、最大で14個のアミノ酸残基、例えば、最大で13個のアミノ酸残基、例えば、最大で12個のアミノ酸残基、例えば、最大で11個のアミノ酸残基、例えば、8~10個のアミノ酸残基、例えば、9~10個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

10

【0104】

別の具体的な実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号2に由来する、最大で29個のアミノ酸残基、例えば、最大で28個のアミノ酸残基、例えば、最大で27個のアミノ酸残基、例えば、最大で26個のアミノ酸残基、例えば、最大で25個のアミノ酸残基、例えば、最大で24個のアミノ酸残基、例えば、最大で23個のアミノ酸残基、例えば、最大で22個のアミノ酸残基、例えば、最大で21個のアミノ酸残基、例えば、最大で20個のアミノ酸残基、例えば、最大で19個のアミノ酸残基、例えば、最大で18個のアミノ酸残基、例えば、最大で17個のアミノ酸残基、例えば、最大で16個のアミノ酸残基、例えば、最大で15個のアミノ酸残基、例えば、最大で14個のアミノ酸残基、例えば、最大で13個のアミノ酸残基、例えば、最大で12個のアミノ酸残基、例えば、最大で11個のアミノ酸残基、例えば、8~10個のアミノ酸残基、例えば、9~10個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

20

30

【0105】

別の具体的な実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号3に由来する、最大で29個のアミノ酸残基、例えば、最大で28個のアミノ酸残基、例えば、最大で27個のアミノ酸残基、例えば、最大で26個のアミノ酸残基、例えば、最大で25個のアミノ酸残基、例えば、最大で24個のアミノ酸残基、例えば、最大で23個のアミノ酸残基、例えば、最大で22個のアミノ酸残基、例えば、最大で21個のアミノ酸残基、例えば、最大で20個のアミノ酸残基、例えば、最大で19個のアミノ酸残基、例えば、最大で18個のアミノ酸残基、例えば、最大で17個のアミノ酸残基、例えば、最大で16個のアミノ酸残基、例えば、最大で15個のアミノ酸残基、例えば、最大で14個のアミノ酸残基、例えば、最大で13個のアミノ酸残基、例えば、最大で12個のアミノ酸残基、例えば、最大で11個のアミノ酸残基、例えば、8~10個のアミノ酸残基、例えば、9~10個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

40

【0106】

別の具体的な実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号15に由来する、最大で20個のアミノ酸残基、例えば、最大で19個のアミノ酸残基、例えば、最大で18個のアミノ酸残基、例えば、最大で17個のアミノ酸残

50

基、例えば、最大で16個のアミノ酸残基、例えば、最大で15個のアミノ酸残基、例えば、最大で14個のアミノ酸残基、例えば、最大で13個のアミノ酸残基、例えば、最大で12個のアミノ酸残基、例えば、最大で11個のアミノ酸残基、例えば、8~10個のアミノ酸残基、例えば、9~10個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

【0107】

別の具体的な実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号1に由来する、最大で36個のアミノ酸残基、例えば、最大で35個のアミノ酸残基、例えば、最大で34個のアミノ酸残基、例えば、最大で33個のアミノ酸残基、例えば、最大で32個のアミノ酸残基、例えば、最大で31個のアミノ酸残基、例えば、最大で30個のアミノ酸残基、例えば、最大で29個のアミノ酸残基、例えば、最大で28個のアミノ酸残基、例えば、最大で27個のアミノ酸残基、例えば、最大で26個のアミノ酸残基、例えば、最大で25個のアミノ酸残基、例えば、最大で24個のアミノ酸残基、例えば、最大で23個のアミノ酸残基、例えば、最大で22個のアミノ酸残基、例えば、最大で21個のアミノ酸残基、例えば、最大で20個のアミノ酸残基、例えば、最大で19個のアミノ酸残基、例えば、最大で18個のアミノ酸残基、例えば、最大で17個のアミノ酸残基、例えば、最大で16個のアミノ酸残基、例えば、最大で15個のアミノ酸残基、例えば、最大で14個のアミノ酸残基、例えば、最大で13個のアミノ酸残基、例えば、最大で12個のアミノ酸残基、例えば、最大で11個のアミノ酸残基、例えば、8~10個のアミノ酸残基、例えば、9~10個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

【0108】

別の具体的な実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号17に由来する、最大で44個のアミノ酸残基、例えば、最大で43個のアミノ酸残基、例えば、最大で42個のアミノ酸残基、例えば、最大で41個のアミノ酸残基、例えば、40個のアミノ酸残基、例えば、最大で39個のアミノ酸残基、例えば、最大で38個のアミノ酸残基、例えば、最大で37個のアミノ酸残基、例えば、最大で36個のアミノ酸残基、例えば、最大で35個のアミノ酸残基、例えば、最大で34個のアミノ酸残基、例えば、最大で33個のアミノ酸残基、例えば、最大で32個のアミノ酸残基、例えば、最大で31個のアミノ酸残基、例えば、最大で30個のアミノ酸残基、例えば、最大で29個のアミノ酸残基、例えば、最大で28個のアミノ酸残基、例えば、最大で27個のアミノ酸残基、例えば、最大で26個のアミノ酸残基、例えば、最大で25個のアミノ酸残基、例えば、最大で24個のアミノ酸残基、例えば、最大で23個のアミノ酸残基、例えば、最大で22個のアミノ酸残基、例えば、最大で21個のアミノ酸残基、例えば、最大で20個のアミノ酸残基、例えば、最大で19個のアミノ酸残基、例えば、最大で18個のアミノ酸残基、例えば、最大で17個のアミノ酸残基、例えば、最大で16個のアミノ酸残基、例えば、最大で15個のアミノ酸残基、例えば、最大で14個のアミノ酸残基、例えば、最大で13個のアミノ酸残基、例えば、最大で12個のアミノ酸残基、例えば、最大で11個のアミノ酸残基、例えば、8~10個のアミノ酸残基、例えば、9~10個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

【0109】

本発明の好ましい一実施形態では、免疫原として活性のCALRペプチドは、エクソン9変異体CALRに由来する、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号1を含む、エクソン9変異体CALR、又は配列番号16内、配列番号2内、若しくは配列番号3内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で28個の連続アミノ酸残基、例えば、27

10

20

30

40

50

個の連続アミノ酸残基、例えば、26個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。別の実施形態では、免疫原として活性のCALRペプチドは、エクソン9変異体CALRに由来する、最大で44個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号1を含む、エクソン9変異体CALR、又は配列番号15内、配列番号1内、若しくは配列番号17内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で36個の連続アミノ酸残基、例えば、20個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

10

**【0110】**

別の実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号16に由来する、少なくとも8個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも9個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも10個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも11個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも12個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも13個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも14個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも15個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも16個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも17個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも18個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも19個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも20個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも21個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも22個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも23個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも24個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも25個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも26個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも27個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも28個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも29個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも30個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも31個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも32個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも33個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも34個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも35個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも36個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも37個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも38個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも39個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも40個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも41個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも42個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも43個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも44個のアミノ酸残基、例えば、25~35個のアミノ酸残基、例えば、20~36個のアミノ酸残基、例えば、29~44個のアミノ酸残基、例えば、26~32個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

20

30

**【0111】**

別の実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号2に由来する、少なくとも8個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも9個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも10個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも11個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも12個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも13個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも14個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも15個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも16個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも17個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも18個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも19個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも20個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも21個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも22個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも23個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも24個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも25個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも26個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも27個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも28個のアミノ酸残基、例えば、29個のアミノ酸残基、例えば、25~29個のアミノ酸残基、例えば、26~29個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ

40

50

酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

【0112】

別の具体的な実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号3に由来する、少なくとも8個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも9個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも10個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも11個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも12個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも13個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも14個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも15個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも16個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも17個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも18個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも19個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも20個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも21個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも22個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも23個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも24個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも25個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも26個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも27個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも28個のアミノ酸残基、例えば、29個のアミノ酸残基、例えば、25~29個のアミノ酸残基、例えば、26~29個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

10

20

【0113】

別の具体的な実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号15に由来する、少なくとも8個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも9個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも10個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも11個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも12個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも13個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも14個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも15個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも16個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも17個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも18個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも19個のアミノ酸残基、例えば、20個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

30

【0114】

別の具体的な実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号1に由来する、少なくとも8個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも9個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも10個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも11個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも12個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも13個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも14個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも15個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも16個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも17個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも18個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも19個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも20個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも21個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも22個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも23個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも24個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも25個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも26個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも27個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも28個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも29個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも30個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも31個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも32個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも33個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも34個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも35個のアミノ酸残基、例えば、36個のアミノ酸残基、例えば、20~36個のアミノ酸残基、例えば、29~36個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸

40

50

が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

【0115】

別の具体的な実施形態では、本発明の、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRのペプチド断片は、配列番号17に由来する、少なくとも8個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも9個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも10個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも11個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも12個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも13個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも14個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも15個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも16個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも17個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも18個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも19個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも20個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも21個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも22個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも23個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも24個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも25個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも26個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも27個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも28個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも29個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも30個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも31個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも32個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも33個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも34個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも35個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも36個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも37個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも38個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも39個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも40個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも41個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも42個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも43個のアミノ酸残基、例えば、44個のアミノ酸残基、例えば、20~44個のアミノ酸残基、例えば、29~44個のアミノ酸残基、例えば、36~44個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

10

20

【0116】

本発明の好ましい一実施形態では、免疫原として活性のCALRペプチドは、エクソン9変異体CALRに由来する、又は配列番号16内、配列番号2内、配列番号3内、配列番号15内、配列番号1内、若しくは配列番号17内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも25個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号1を含む、エクソン9変異体CALRに由来する、少なくとも26個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも27個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも28個の連続アミノ酸残基、例えば、29個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

30

【0117】

特に、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号16に由来する8~34個の範囲、例えば、8~30個の範囲、例えば、8~29個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号16のエクソン9変異体CALR断片に由来する、28個の連続アミノ酸残基からなる場合もある。一部の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号16内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で28個の連続アミノ酸残基、例えば、27個の連続アミノ酸残基、例えば、26個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。他の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも28個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号16内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも29個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも

40

50

30個の連続アミノ酸残基、例えば、31個の連続アミノ酸残基、例えば、32個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。特に、免疫原として活性のペプチドは、配列番号16の、エクソン9変異体CALR断片に由来する、29個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号16の、エクソン9変異体CALR断片に由来する、28個の連続アミノ酸残基からなる場合もある。

【0118】

別の実施形態では、免疫原として活性のCALRペプチドは、配列番号2の、エクソン9変異体CALR断片に由来する8~29個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号2の、エクソン9変異体CALR断片に由来する25~29個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もある。一部の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号2内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で28個の連続アミノ酸残基、例えば、27個の連続アミノ酸残基、例えば、26個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。他の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも25個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号2内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも26個の連続アミノ酸残基、例えば、27個の連続アミノ酸残基、例えば、28個の連続アミノ酸残基、例えば、29個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。特に、免疫原として活性のペプチドは、配列番号2のCALR断片に由来する、29個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号2のCALR断片に由来する、28個の連続アミノ酸残基からなる場合もある。

【0119】

別の実施形態では、免疫原として活性のCALRペプチドは、配列番号3の、エクソン9変異体CALR断片に由来する8~29個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号3の、エクソン9変異体CALR断片に由来する25~29個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もある。一部の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号3内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で28個の連続アミノ酸残基、例えば、27個の連続アミノ酸残基、例えば、26個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。他の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも25個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号3内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも26個の連続アミノ酸残基、例えば、27個の連続アミノ酸残基、例えば、28個の連続アミノ酸残基、例えば、29個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。特に、免疫原として活性のペプチドは、配列番号3のCALR断片に由来する、29個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号3のCALR断片に由来する、28個の連続アミノ酸残基からなる場合もある。

【0120】

別の実施形態では、免疫原として活性のCALRペプチドは、配列番号15の、エクソン9変異体CALR断片に由来する8~20個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号15の、エクソン9変異体CALR断片に由来する15~20個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もある。一部の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で20個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号15内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で19個の連続アミノ酸残基、例えば、18個の連続アミノ酸残基、例えば、17個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。他の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも16個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号15内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも17個の連続アミノ酸残基、例えば、18個の連続アミノ酸残基、例えば、19個の連続アミノ酸残基、例えば、20個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。特に、免疫原として活性のペプチドは、配列番号15のCALR断片に由来する、20個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号15のCALR断片に由来する、15個の連続アミノ酸残基からなる場合もある。

10

20

**【0121】**

別の実施形態では、免疫原として活性のCALRペプチドは、配列番号1の、エクソン9変異体CALR断片に由来する30~36個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号1の、エクソン9変異体CALR断片に由来する15~20個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もある。一部の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で36個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号1内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で35個の連続アミノ酸残基、例えば、34個の連続アミノ酸残基、例えば、33個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。他の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも30個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号1内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも33個の連続アミノ酸残基、例えば、34個の連続アミノ酸残基、例えば、35個の連続アミノ酸残基、例えば、36個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。特に、免疫原として活性のペプチドは、配列番号1のCALR断片に由来する、36個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号1のCALR断片に由来する、30個の連続アミノ酸残基からなる場合もある。

30

40

**【0122】**

別の実施形態では、免疫原として活性であるCALRペプチドは、配列番号17の、エクソン9変異体CALR断片に由来する37~44個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号17の、エクソン9変異体CALR断片に由来する30~35個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もある。一部の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で44個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号17内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、最大で43個の連続アミノ酸残基、例えば、42個の連続アミノ酸残基、例えば、41個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、

50

例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。他の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも37個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号17内で同定される、エクソン9変異体CALRの断片に由来する、少なくとも38個の連続アミノ酸残基、例えば、39個の連続アミノ酸残基、例えば、40個の連続アミノ酸残基、例えば、41個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。特に、免疫原として活性のペプチドは、配列番号17のCALR断片に由来する、44個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号17のCALR断片に由来する、36個の連続アミノ酸残基からなる場合もある。

10

**【0123】**

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号16のCALRペプチド断片に由来する、最大で15個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号16内で同定される、エクソン9変異体CALRペプチド断片に由来する、最大で12個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で11個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で10個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で9個の連続アミノ酸残基、例えば、8個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

20

**【0124】**

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号16のCALRペプチド断片に由来する、少なくとも25個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号16内で同定される、エクソン9変異体CALRペプチド断片に由来する、少なくとも26個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも27個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも28個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも29個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも30個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

30

**【0125】**

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号2に由来する、最大で15個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号2の、最大で12個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で11個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で10個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で9個の連続アミノ酸残基、例えば、8個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

40

**【0126】**

別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号2のCALRペプチド断片に由来する、少なくとも25個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号2内で同定される、エクソン9変異体CALRペプチド断片に由来する、少なくとも26個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも27個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも28個の連続アミノ酸残基、例えば、29個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

**【0127】**

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配

50

列番号3に由来する、最大で15個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号3に由来する、最大で12個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で11個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で10個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で9個の連続アミノ酸残基、例えば、8個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

【0128】

別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号3のCALRペプチド断片に由来する、少なくとも25個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号3内で同定される、エクソン9変異体CALRペプチド断片に由来する、少なくとも26個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも27個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも28個の連続アミノ酸残基、例えば、29個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

10

【0129】

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号15のCALRペプチド断片に由来する、最大で15個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号15内で同定される、エクソン9変異体CALRペプチド断片に由来する、最大で12個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で11個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で10個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で9個の連続アミノ酸残基、例えば、8個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

20

【0130】

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号15のCALRペプチド断片に由来する、少なくとも15個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号15内で同定される、エクソン9変異体CALRペプチド断片に由来する、少なくとも16個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも17個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも18個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも19個の連続アミノ酸残基、例えば、20個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

30

【0131】

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号1のCALRペプチド断片に由来する、最大で30個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号1内で同定される、エクソン9変異体CALRペプチド断片に由来する、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で30個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で31個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で32個の連続アミノ酸残基、例えば、33個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

40

【0132】

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号1のCALRペプチド断片に由来する、少なくとも32個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号1内で同定される、エクソン9変異体CALRペプチド断片に由来する、少なくとも33個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも34個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも35個の連続アミノ酸残基、例えば、36個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポ

50

リペプチドである機能的相同体を含む。

【0133】

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号17のCALRペプチド断片に由来する、最大で35個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号17内で同定される、エクソン9変異体CALRペプチド断片に由来する、最大で36個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で37個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で38個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で39個の連続アミノ酸残基、例えば、40個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

10

【0134】

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号17のCALRペプチド断片に由来する、少なくとも39個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号17内で同定される、エクソン9変異体CALRのペプチド断片に由来する、少なくとも40個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも41個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも42個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも43個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも44個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

20

【0135】

本発明の一部の実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、若しくは配列番号17、又はその機能的相同体のペプチドからなる群から選択することができる。特定の実施形態では、ペプチドは、配列番号16に示されるもの、又はその機能的相同体である。別の実施形態では、ペプチドは、配列番号2に示されるもの、又はその機能的相同体である。別の実施形態では、ペプチドは、配列番号3に示されるもの、又はその機能的相同体である。別の実施形態では、ペプチドは、配列番号15に示されるもの、又はその機能的相同体である。別の実施形態では、ペプチドは、配列番号1に示されるもの、又はその機能的相同体である。別の実施形態では、ペプチドは、配列番号17に示されるもの、又はその機能的相同体である。機能的相同体は、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、又は配列番号17のペプチドと少なくとも70%の配列同一性、例えば、これと少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドであり得る。好ましくは、配列と、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、又は配列番号17との、配列同一性のパーセンテージは、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1、又は配列番号17の全長にわたる配列同一性を測定することにより決定される。

30

40

【0136】

したがって、好ましい実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号16のCALRペプチド断片、又はその機能的相同体であって、これと少なくとも70%の配列同一性、例えば、これと少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドである機能的相同体であり得る。

【0137】

別の好ましい実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、配列番号2のCALRペプチ

50

ド断片、又はその機能的相同体であって、これと少なくとも70%の配列同一性、例えば、これと少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドである機能的相同体であり得る。

【0138】

別の好ましい実施形態では、免疫原として活性のCALRペプチドは、配列番号3のCALRペプチド断片、又はその機能的相同体であって、これと少なくとも70%の配列同一性、例えば、これと少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドである機能的相同体であり得る。

10

【0139】

したがって、好ましい実施形態では、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドは、配列番号15のCALRペプチド断片、又はその機能的相同体であって、これと少なくとも70%の配列同一性、例えば、これと少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドである機能的相同体であり得る。

20

【0140】

別の好ましい実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、配列番号1のCALRペプチド断片、又はその機能的相同体であって、これと少なくとも70%の配列同一性、例えば、これと少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドである機能的相同体であり得る。

30

【0141】

別の好ましい実施形態では、免疫原として活性のCALRペプチドは、配列番号17のCALRペプチド断片、又はその機能的相同体であって、これと少なくとも70%の配列同一性、例えば、これと少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドである機能的相同体であり得る。

【0142】

本発明の好ましい実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、

40

- a) 配列番号16(CALR<sub>378-411</sub>)、
- b) 配列番号2(CALR<sub>367-396</sub>)、
- c) 配列番号3(CALR<sub>383-411</sub>)、及び

d) a) ~ c) のうちのいずれかの、ポリペプチドの機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体

からなる群から選択される。

【0143】

本発明の好ましい実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、

50

- a) 配列番号16(CALR<sub>378-411</sub>)、
- b) 配列番号2(CALR<sub>367-396</sub>)、
- c) 配列番号3(CALR<sub>383-411</sub>)、
- d) 配列番号15(CALR<sub>373-393</sub>)、
- e) 配列番号1(CALR<sub>376-411</sub>)、
- f) 配列番号17(CALR<sub>367-411</sub>)、及び

g)a)～f)のうちのいずれかの、ポリペプチドの機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体

からなる群から選択される。

【0144】

一部の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、50個以下、例えば、40個以下、例えば、30個以下、例えば、25個以下、例えば、20個以下のアミノ酸からなり、

- a) 配列番号16(CALR<sub>378-411</sub>)、
- b) 配列番号2(CALR<sub>367-396</sub>)、
- c) 配列番号3(CALR<sub>383-411</sub>)、
- d) 配列番号15(CALR<sub>373-393</sub>)、
- e) 配列番号1(CALR<sub>376-411</sub>)、
- f) 配列番号17(CALR<sub>367-411</sub>)、及び

g)a)～f)のうちのいずれかの、ポリペプチドの機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体

からなる群から選択される配列を含む。

【0145】

前記ペプチドの50、40、30、25、又は20個までのアミノ酸は、好ましくは、(a)～(g)のうちのいずれか1つから選択される配列がその中に含まれる、CaLRタンパク質の連続アミノ酸の配列からなり得る。

【0146】

理論に束縛されずに述べると、場合によって、N末端、C末端、又は両末端における、さらなる末端残基、例えば、親水性のアミノ酸残基の組み込みにより、ペプチドの安定性を増大させることができる。

【0147】

本発明の、他のCALRペプチドは、配列番号10のエクソン9変異体CALRの、8～90個の間、好ましくは、8～80個の間、より好ましくは、8～70個の間、さらにより好ましくは、8～60個の間、なおより好ましくは、8～40個の間、例えば、18～25個の間の連続アミノ酸、又は配列番号10に対して少なくとも70%、好ましくは、少なくとも80%、より好ましくは、少なくとも90%、なおより好ましくは、少なくとも95%、さらにより好ましくは、少なくとも98%、例えば、少なくとも99%の配列同一性を有する、その機能的相同体を含む(又は、より好ましくは、これからなる)。

【0148】

具体的な実施形態では、本発明の、免疫原として活性のJAK2V617Fのペプチド断片は、配列番号6内で同定されるJAK2V617Fの、最大で90個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で80個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で70個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で60個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で50個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で45個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で40個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で35個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で30個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で24個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で22個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で20個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で15個の連続アミノ酸残基、

10

20

30

40

50

例えば、最大で10個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で9個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で8個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。置換は、保存的置換であり得る。

【0149】

前記免疫原として活性のJAK2V617Fのペプチド断片はまた、配列番号6内で同定されるCALRの、最大で80個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で70個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で60個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で50個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で45個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で40個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で35個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で30個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で24個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で22個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で20個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号6内で同定されるJAK2V617Fの、15~25個の連続アミノ酸残基、例えば、8~10個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、この場合、1個以上のアミノ酸が、別のアミノ酸に変異しているか、又は欠失している。

10

【0150】

前記免疫原として活性のJAK2V617Fのペプチド断片はまた、配列番号6内で同定されるJAK2の、少なくとも5個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも6個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも7個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも8個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも9個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも10個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも15個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも20個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも25個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも30個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも35個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも40個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号6内で同定される、JAK2V617Fの、8~15個の連続アミノ酸残基、例えば、9~10個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、この場合、1個以上のアミノ酸が置換されているか、別のアミノ酸に変異しているか、又は欠失している。

20

【0151】

本発明の、好ましい一実施形態では、免疫原として活性のペプチド断片は、配列番号7内で同定されるJAK2V617Fの、8~9個のアミノ酸の範囲の連続アミノ酸、好ましくは、9個の連続アミノ酸、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる。

30

【0152】

したがって、別の実施形態では、本発明の、免疫原として活性のJAK2V617Fのペプチド断片は、配列番号6のJAK2V617Fに由来する、連続であり得る最大で35個のアミノ酸残基、例えば、最大で34個のアミノ酸残基、例えば、最大で33個のアミノ酸残基、例えば、最大で32個のアミノ酸残基、例えば、最大で31個のアミノ酸残基、例えば、最大で30個のアミノ酸残基、例えば、最大で29個のアミノ酸残基、例えば、最大で28個のアミノ酸残基、例えば、最大で27個のアミノ酸残基、例えば、最大で26個のアミノ酸残基、例えば、最大で25個のアミノ酸残基、例えば、最大で24個のアミノ酸残基、例えば、最大で23個のアミノ酸残基、例えば、最大で22個のアミノ酸残基、例えば、最大で21個のアミノ酸残基、例えば、最大で20個のアミノ酸残基、例えば、最大で19個のアミノ酸残基、例えば、最大で18個のアミノ酸残基、例えば、最大で17個のアミノ酸残基、例えば、最大で16個のアミノ酸残基、例えば、最大で15個のアミノ酸残基、例えば、最大で14個のアミノ酸残基、例えば、最大で13個のアミノ酸残基、例えば、最大で12個のアミノ酸残基、例えば、最大で11個のアミノ酸残基、例えば、8~10個のアミノ酸残基、例えば、9~10個のアミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体、からなる。

40

50

## 【0153】

別の実施形態では、本発明の、免疫原として活性のJAK2V617Fのペプチド断片は、配列番号6のJAK2V617Fに由来する、連続であり得る最大で35個のアミノ酸残基、例えば、最大で34個のアミノ酸残基、例えば、最大で33個のアミノ酸残基、例えば、最大で32個のアミノ酸残基、例えば、最大で31個のアミノ酸残基、例えば、最大で30個のアミノ酸残基、例えば、最大で29個のアミノ酸残基、例えば、最大で28個のアミノ酸残基、例えば、最大で27個のアミノ酸残基、例えば、最大で26個のアミノ酸残基、例えば、最大で25個のアミノ酸残基、例えば、最大で24個のアミノ酸残基、例えば、最大で23個のアミノ酸残基、例えば、最大で22個のアミノ酸残基、例えば、最大で21個のアミノ酸残基、例えば、最大で20個のアミノ酸残基、例えば、最大で19個のアミノ酸残基、例えば、最大で18個のアミノ酸残基、例えば、最大で17個のアミノ酸残基、例えば、最大で16個のアミノ酸残基、例えば、最大で15個のアミノ酸残基、例えば、最大で14個のアミノ酸残基、例えば、最大で13個のアミノ酸残基、例えば、最大で12個のアミノ酸残基、例えば、最大で11個のアミノ酸残基、例えば、8~10個のアミノ酸残基、例えば、9~10個のアミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体、からなる。

10

## 【0154】

別の実施形態では、本発明の、免疫原として活性のJAK2V617Fのペプチド断片は、配列番号6に由来する、少なくとも8個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも9個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも10個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも11個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも12個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも13個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも14個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも15個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも16個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも17個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも18個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも19個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも20個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも21個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも22個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも23個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも24個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも25個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも26個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも27個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも28個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも29個のアミノ酸残基、例えば、25~35個のアミノ酸残基、例えば、26~32個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体、からなる。

20

30

## 【0155】

本発明の好ましい一実施形態では、免疫原として活性のJAK2V617Fペプチドは、JAK2V617Fに由来する、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号7を含む、配列番号6に由来する最大で28個の連続アミノ酸残基、例えば、27個の連続アミノ酸残基、例えば、26個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

40

## 【0156】

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のJAK2V617Fペプチドは、配列番号7のJAK2V617Fペプチド断片に由来する、少なくとも5個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号7内で同定される、JAK2V617Fペプチド断片に由来する、少なくとも6個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも7個の連続アミノ酸残基、例えば、少なくとも8個の連続アミノ酸残基、例えば、9個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。

50

## 【 0 1 5 7 】

特に、免疫原として活性のJAK2V617Fペプチドは、配列番号6のJAK2V617Fに由来する8～29個の範囲の連続アミノ酸残基からなり得る。一部の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、JAK2V617Fに由来する最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号6のJAK2V617Fの、最大で28個の連続アミノ酸残基、例えば、27個の連続アミノ酸残基、例えば、26個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含むか、又はそれからなる。特に、免疫原として活性のペプチドは、配列番号6のJAK2V617F変異体に由来する、29個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号6のJAK2V617Fに由来する28個の連続アミノ酸残基からなる場合もある。

10

## 【 0 1 5 8 】

別の実施形態では、免疫原として活性のJAK2V617Fペプチドは、配列番号6のJAK2V617F変異体に由来する8～29個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号6のJAK2V617F変異体に由来する25～29個の範囲の連続アミノ酸残基からなる場合もある。一部の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、JAK2V617F変異体に由来する、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号6内で同定される、JAK2V617F変異体の断片に由来する、最大で28個の連続アミノ酸残基、例えば、27個の連続アミノ酸残基、例えば、26個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。特に、免疫原として活性のペプチドは、配列番号6のJAK2V617F変異体に由来する、29個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号6のJAK2V617F変異体に由来する、28個の連続アミノ酸残基からなる場合もある。

20

## 【 0 1 5 9 】

特に、免疫原として活性のJAK2V617Fペプチドは、配列番号6のJAK2V617F変異体に由来する、9個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号6のJAK2V617Fに由来する、30個までの連続アミノ酸残基からなる場合もある。一部の実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、JAK2V617Fに由来する、最大で30個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号6内で同定される、JAK2V617Fの、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、28個の連続アミノ酸残基、例えば、27個の連続アミノ酸残基、例えば、26個の連続アミノ酸残基、例えば、25個の連続アミノ酸残基、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体を含む。特に、免疫原として活性のペプチドは、配列番号7のJAK2V617F断片に由来する、9個の連続アミノ酸残基からなる場合もあり、免疫原として活性のペプチドは、配列番号7のJAK2V617F断片に由来する、8個の連続アミノ酸残基からなる場合もある。

30

40

## 【 0 1 6 0 】

本発明の別の実施形態では、免疫原として活性のJAK2V617Fペプチドは、配列番号7のJAK2V617Fのペプチド断片に由来する、最大で9個の連続アミノ酸残基、例えば、配列番号7内で同定される、JAK2V617Fのペプチド断片、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体から由来する、最大で8個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で7個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で6個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で5個の連続アミノ酸残基を含む。

## 【 0 1 6 1 】

50

別の実施形態では、本発明の、免疫原として活性のJAK2V617Fのペプチド断片は、配列番号7、又はその機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体由来する、少なくとも5個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも6個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも7個のアミノ酸残基、例えば、少なくとも8個のアミノ酸残基、例えば、9個の連続アミノ酸残基からなる。

【0162】

本発明の一部の実施形態では、免疫原として活性のJAK2V617Fペプチドは、配列番号7又はその機能的相同体を含み得るか、又はそれからなり得る。特定の実施形態では、ペプチドは、配列番号7に示されるもの、又はその機能的相同体である。機能的相同体は、配列番号7のペプチドと少なくとも70%の配列同一性、例えば、これと少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドであり得る。好ましくは、配列と、配列番号7との、配列同一性の百分率は、配列番号7の全長にわたる配列同一性を測定することにより決定する。

10

【0163】

したがって、好ましい実施形態では、免疫原として活性のJAK2V617Fペプチドは、配列番号7のJAK2V617Fのペプチド断片、又はその機能的相同体であって、これと少なくとも70%の配列同一性、例えば、これと少なくとも75%の配列同一性、例えば、少なくとも80%の配列同一性、例えば、少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、例えば、少なくとも96%の配列同一性、例えば、少なくとも97%の配列同一性、例えば、少なくとも98%の配列同一性、例えば、少なくとも99%の配列同一性を有するポリペプチドである機能的相同体であり得る。

20

【0164】

本発明の、好ましい実施形態では、免疫原として活性のペプチドは、

a) 本明細書で規定される、配列番号7(JAK2<sub>610-618</sub>)又は配列番号7を含むペプチド、及び

30

b) a)のポリペプチドの機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き、同一な配列のポリペプチドである機能的相同体からなる群から選択される。

【0165】

ペプチドは、(a)又は(b)のうちのいずれか1つから選択される配列がその中に含まれる、JAK2タンパク質の、50、40、30、25、又は20個までの連続アミノ酸からなり得る。

【0166】

理論に束縛されずに述べると、場合によって、N末端、C末端、又は両末端における、さらなる末端残基、例えば、親水性のアミノ酸残基の組込みにより、ペプチドの安定性を増大させることができる。

40

【0167】

本発明の、他のJAK2V617Fペプチドは、配列番号6のJAK2V617F変異体の、8~90個の間、好ましくは、8~80個の間、より好ましくは、8~70個の間、さらにより好ましくは、8~60個の間、なおより好ましくは、8~40個の間、例えば、18~25個の間の連続アミノ酸、又は配列番号6に対して少なくとも70%、好ましくは、少なくとも80%、より好ましくは、少なくとも90%、なおより好ましくは、少なくとも95%、さらにより好ましくは、少なくとも98%、例えば、少なくとも99%の配列同一性を有する、その機能的相同体を含む(又は、より好ましくは、これからなる)。

【0168】

50

## 【表 1】

表 1: 例示的なエクソン 9 変異体 CALR 及び JAK2V617F ペプチド

| 配列番号 | 名称                      | 親配列内のアミノ酸番号 | 配列  |
|------|-------------------------|-------------|---|
| 1    | CALR <sub>378-411</sub> | 378-411     | RRMRTRRKMRMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE            |
| 2    | CALR <sub>367-396</sub> | 367 - 396   | RRMMRTKMRMRRMRTRRKMRMRRKMSPARP                |
| 3    | CALR <sub>383-411</sub> | 383 - 411   | TRRKMRMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA               |
| 7    | JAK2 <sub>610-618</sub> | 610 - 618   | VLNYGVCFC                                     |
| 14   | CALR <sub>361-411</sub> | 361-411     | RRMMRTKMRMRRMRTRRKMRMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE  |
| 15   | CALR <sub>373-393</sub> | 373-393     | KMRMRRMRTRRKMRMRRKMSPARP                      |
| 16   | CALR <sub>375-411</sub> | 375-411     | RMRRMRTRRKMRMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA         |
| 17   | CALR <sub>367-411</sub> | 367-411     | RRMMRTKMRMRRMRTRRKMRMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA |

10

20

## 【 0 1 6 9 】

## 機能的相同体

エクソン9CALR及びJAK2V617F、又はその免疫原として活性の断片の機能的相同体は、免疫原として活性であり、それぞれエクソン9CALR及びJAK2V617F、特に、配列番号10のエクソン9変異体CALR又は配列番号6のJAK2V617Fと少なくともいくつかの程度の配列同一性を共有するポリペプチドである。エクソン9CALR及びJAK2V617F、又はその免疫原として活性の断片の機能的相同体は、免疫原として活性であり、それぞれエクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの断片と少なくともいくつかの程度の配列同一性を共有するポリペプチドでもあり得る。特に、エクソン9変異体CALRの機能的相同体は、配列番号16に示される断片と少なくともいくつかの程度の配列同一性を共有し得る。JAK2V617Fの機能的相同体は、配列番号7に示される断片と少なくともいくつかの程度の配列同一性を共有し得る。エクソン9変異体CALR、又はその免疫原として活性の断片の機能的相同体は、免疫原として活性であり、エクソン9変異体CALRの断片、特に、配列番号2に示される断片と少なくともいくつかの程度の配列同一性を共有するポリペプチドでもあり得る。エクソン9変異体CALR、又はその免疫原として活性の断片の機能的相同体は、免疫原として活性であり、エクソン9変異体CALRの断片、特に、配列番号3に示される断片と少なくともいくつかの程度の配列同一性を共有するポリペプチドでもあり得る。

30

40

## 【 0 1 7 0 】

50個のアミノ酸より短い、例えば、25個のアミノ酸より短いポリペプチドなどの、より短いポリペプチドでは、機能的相同体は、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き同一配列の免疫原として活性のポリペプチドであり得る。

## 【 0 1 7 1 】

あるいは、機能的相同体は、配列番号16のエクソン9変異体CALR断片と少なくとも70%の配列同一性を共有する、免疫原として活性のエクソン9変異体CALRポリペプチドであってもよく、したがって、機能的相同体は、好ましくは、配列番号16のヒトエクソン9変異体CALRと少なくとも75%の配列同一性、例えば少なくとも80%の配列同一性、例えば少なくとも

50



列同一性、例えば少なくとも89%の配列同一性、例えば少なくとも90%の配列同一性、例えば少なくとも91%の配列同一性、例えば少なくとも92%の配列同一性、例えば少なくとも93%の配列同一性、例えば少なくとも94%の配列同一性、例えば少なくとも95%の配列同一性、例えば少なくとも96%の配列同一性、例えば少なくとも97%の配列同一性、例えば少なくとも98%の配列同一性、例えば99%の配列同一性を有する。

【0177】

あるいは、機能的相同体は、配列番号7のJAK2V617F断片と少なくとも70%の配列同一性を共有する、免疫原として活性のポリペプチドであってもよく、したがって、機能的相同体は、好ましくは、配列番号7のヒトJAK2V617Fと少なくとも75%の配列同一性、例えば少なくとも80%の配列同一性、例えば少なくとも85%の配列同一性、例えば少なくとも89%の配列同一性、例えば少なくとも90%の配列同一性、例えば少なくとも91%の配列同一性、例えば少なくとも92%の配列同一性、例えば少なくとも93%の配列同一性、例えば少なくとも94%の配列同一性、例えば少なくとも95%の配列同一性、例えば少なくとも96%の配列同一性、例えば少なくとも97%の配列同一性、例えば少なくとも98%の配列同一性、例えば99%の配列同一性を有する。

10

【0178】

好ましくは、JAK2V617F断片は、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む。

【0179】

いくつかの周知のアルゴリズムを使用し、いくつかの異なるギャップペナルティを適用して配列同一性を計算することができる。配列同一性は、基準配列の全長、例えば、配列番号16の全長に対して計算される。これらに限定されないが、FASTA、BLAST、又はLALIGNなどの任意の配列アラインメントツールを使用して、相同体を検索し、配列同一性を計算してもよい。さらに、これらに限定されないが、PAM、BLOSSUM又はPSSMなどの任意の一般的に公知の置換マトリックスを、適宜、検索アルゴリズムと共に適用してもよい。例えば、PSSM(位置特異的スコアリングマトリックス)をPSI-BLASTプログラムを介して適用してもよい。さらに、ギャップオープニング及びエクステンションについて様々なペナルティを使用して配列アラインメントを実施してもよい。例えば、範囲5~12のギャップオープニングペナルティ、及び範囲1~2のギャップエクステンションペナルティでBLASTアルゴリズムを使用してもよい。

20

【0180】

機能的相同体は、ユビキチン化、標識化(例えば、放射性核種、種々の酵素などによる)、ペグ化(ポリエチレングリコールによる誘導体化)などの、又は通常ヒトタンパク質で生じないオルニチンなどのアミノ酸の挿入(又は化学合成による置換)による化学修飾をさらに含んでもよいが、機能的等価物が化学修飾を含有しないことが好ましい。

30

【0181】

配列番号10のエクソン9変異体CALRの配列と比較して、又は配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1若しくは配列番号17のエクソン9変異体CALR断片と比較して、又は配列番号6のJAK2V617Fの配列と比較して、又は配列番号7のJAK2V617F断片と比較して、アミノ酸残基の配列に対してなされた任意の変化は、好ましくは、保存的置換である。1個のアミノ酸が、1つ以上の化学的及び/又は物理的特徴を共有する別のアミノ酸で置換される「保存的」アミノ酸置換をなし、及び評価する方法は、当業者に公知であろう。保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能性に影響を及ぼす可能性は低い。アミノ酸は、共有の特徴に従って群分けされてもよい。保存的アミノ酸置換は、所定の群のアミノ酸のうちの1個のアミノ酸の同一群の別のアミノ酸への置換であり、ここで、所定の群のアミノ酸は、類似するか又は実質的に類似する特徴を呈する。

40

【0182】

したがって、本発明の実施形態では、ワクチン組成物は、8~35個のアミノ酸の範囲、好ましくは、25~31個、又は27~30個のアミノ酸の範囲の、配列番号10のエクソン9変異体CALR断片の連続配列からなるポリペプチドを含み、最大で3個のアミノ酸が置換されており、置換は、好ましくは、保存的である。

50

## 【0183】

したがって、本発明の実施形態では、ワクチン組成物は、8~34個のアミノ酸の範囲、好ましくは、25~31個、又は27~30個のアミノ酸の範囲の、配列番号16のエクソン9変異体CALR断片の連続配列からなるポリペプチドを含み、最大で3個のアミノ酸が置換されており、置換は、好ましくは、保存的である。

## 【0184】

本発明の別の実施形態では、ワクチン組成物は、8~29個のアミノ酸の範囲、好ましくは、20~29個、又は27~29個のアミノ酸の範囲の、配列番号2のエクソン9変異体CALR断片の連続配列からなるポリペプチドを含み、最大で3個のアミノ酸が置換されており、置換は、好ましくは、保存的である。

10

## 【0185】

本発明の別の実施形態では、ワクチン組成物は、8~29個のアミノ酸の範囲、好ましくは、20~29個、又は27~29個のアミノ酸の範囲の、配列番号3のエクソン9変異体CALR断片の連続配列からなるポリペプチドを含み、最大で3個のアミノ酸が置換されており、置換は、好ましくは、保存的である。

## 【0186】

本発明の別の実施形態では、ワクチン組成物は、8~20個のアミノ酸の範囲、好ましくは、15~20個、又は17~20個のアミノ酸の範囲の、配列番号15のエクソン9変異体CALR断片の連続配列からなるポリペプチドを含み、最大で3個のアミノ酸が置換されており、置換は、好ましくは、保存的である。

20

## 【0187】

本発明の別の実施形態では、ワクチン組成物は、8~36個のアミノ酸の範囲、好ましくは、39~36個、又は33~36個のアミノ酸の範囲の、配列番号1のエクソン9変異体CALR断片の連続配列からなるポリペプチドを含み、最大で3個のアミノ酸が置換されており、置換は、好ましくは、保存的である。

## 【0188】

本発明の別の実施形態では、ワクチン組成物は、8~44個のアミノ酸の範囲、好ましくは、36~44個、又は40~44個のアミノ酸の範囲の、配列番号17のエクソン9変異体CALR断片の連続配列からなるポリペプチドを含み、最大で3個のアミノ酸が置換されており、置換は、好ましくは、保存的である。

30

## 【0189】

本発明の別の実施形態では、ワクチン組成物は、8~15個のアミノ酸の範囲、好ましくは、8~13個、又は9~10個のアミノ酸の範囲の、配列番号6のJAK2V617Fの連続配列からなるポリペプチドを含み、最大で3個のアミノ酸が置換されており、置換は、好ましくは、保存的である。

## 【0190】

本発明の別の実施形態では、ワクチン組成物は、8~9個のアミノ酸の範囲、好ましくは、9個のアミノ酸の、配列番号7のJAK2V617F断片の連続配列からなるポリペプチドを含み、最大で3個のアミノ酸が置換されており、置換は、好ましくは、保存的である。

## 【0191】

好ましくは、JAK2V617Fポリペプチドは、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む。

40

## 【0192】

エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又はその断片を含むポリペプチド

また、本発明のワクチン組成物が、エクソン9変異体CALR、JAK2V617F又はその断片を含むポリペプチドを含んでもよいことも、本発明のうちに含まれる。したがって、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの、免疫原として活性のペプチド断片は、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617F断片を含むポリペプチド、例えば、本明細書のこのセクションに記載されているポリペプチドのうちのいずれかであってもよい。

## 【0193】

特に、そのようなポリペプチドは、エクソン9変異体CALRの全長、例えば、本明細書の

50

「カルレティキュリン(CALR)」のセクションで上述したエクソン9変異体CALRのいずれかを含んでもよい。ポリペプチドは、JAK2V617Fの全長、例えば、本明細書の「ヤヌスキナーゼ2(JAK2)」のセクションで上述したJAK2V617Fのいずれかを含んでもよい。

【0194】

例えば、ポリペプチドは、配列番号10のエクソン9変異体CALR、又はそれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%の配列同一性を共有するその機能的相同体を含んでもよい。特に、そのようなポリペプチドは、配列番号10のCALRに加えて、最大で90個、例えば最大で50個、例えば最大で29個、例えば最大で25個、例えば最大で10個のアミノ酸を含んでもよい。例えば、ポリペプチドは、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1又は配列番号17のエクソン9変異体断片CALR、又はそれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%の配列同一性を共有するその機能的相同体を含んでもよい。特に、そのようなポリペプチドは、配列番号10のCALRに加えて、最大で90個、例えば最大で50個、例えば最大で25個、例えば最大で10個のアミノ酸を含んでもよい。

10

【0195】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号6のJAK2V617F変異体、又はそれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、例えば少なくとも90%、例えば少なくとも95%の配列同一性を共有するその機能的相同体を含んでもよい。特に、そのようなポリペプチドは、配列番号6のJAK2V617Fに加えて、最大で90個、例えば最大で50個、例えば最大で29個、例えば最大で25個、例えば最大で10個のアミノ酸を含んでもよい。例えば、ポリペプチドは、配列番号6のJAK2V617F、又はそれと少なくとも70%、例えば少なくとも80%、少なくとも90%、例えば少なくとも95%の配列同一性を共有するその機能的相同体を含んでもよい。特に、そのようなポリペプチドは、配列番号6のJAK2V617Fに加えて、最大で90個、例えば最大で50個、例えば最大で25個、例えば最大で10個のアミノ酸を含んでもよい。

20

【0196】

好ましくは、ワクチン組成物に含まれるJAK2V617Fポリペプチドは、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む。

【0197】

また、ワクチン組成物が、エクソン9変異体CALRの断片、例えば、本明細書の「エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの、免疫原として活性のペプチド断片」のセクションで上述した断片のいずれか、又はJAK2V617Fの断片、例えば、本明細書の「エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの、免疫原として活性のペプチド断片」のセクションで上述した断片のいずれかを含むポリペプチドを含んでもよいことも、本発明のうちに含まれる。

30

【0198】

したがって、前記ポリペプチドは、配列番号16のアミノ酸の連続配列を含む、最大で400個のアミノ酸、例えば最大で300個のアミノ酸、例えば最大で200個のアミノ酸、例えば最大で100個のアミノ酸、例えば最大で50個のアミノ酸のエクソン9変異体CALRポリペプチドであってもよく、配列番号1のアミノ酸の前記連続配列は、配列番号16又はその機能的相同体の、最大で50個のアミノ酸残基、例えば最大で45個のアミノ酸残基、例えば最大で40個のアミノ酸残基、例えば最大で35個のアミノ酸残基、例えば最大で30個のアミノ酸残基、例えば最大で25個のアミノ酸残基、例えば18~25個の範囲、5~10個の範囲などの連続アミノ酸からなる。したがって、前記ポリペプチドは、以下のエクソン9CALR変異体:L367fs<sup>\*</sup>46(配列番号10に示される全長)、E370fs<sup>\*</sup>43、E370fs<sup>\*</sup>48、L367fs<sup>\*</sup>48、L367fs<sup>\*</sup>44、K368fs<sup>\*</sup>51、L367fs<sup>\*</sup>52、R366fs<sup>\*</sup>53、E371fs<sup>\*</sup>49、K368fs<sup>\*</sup>43、E370fs<sup>\*</sup>37、D373fs<sup>\*</sup>47、K374fs<sup>\*</sup>53、E371fs<sup>\*</sup>49、K385fs<sup>\*</sup>47、K385fs<sup>\*</sup>47、R376fs<sup>\*</sup>55、K385fs<sup>\*</sup>47、E381fs<sup>\*</sup>48(Nangaliaら、2013、上記変異体の配列は、Nangaliaらの図3、パネルA、2400頁に列挙されている)のうちのいずれかである。

40

【0199】

特に、前記エクソン9CALRポリペプチドは、

a) 配列番号16(CALR<sub>378-411</sub>)、

50

b) 配列番号2(CALR<sub>367-396</sub>)、

c) 配列番号3(CALR<sub>383-411</sub>)、及び

d) a) から c) のいずれかに記載のポリペプチドの機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き同一配列のポリペプチドである機能的相同体

からなる群から選択される免疫原として活性のペプチドを含む、最大で100個のアミノ酸残基、例えば、最大で90個のアミノ酸残基、例えば、最大で80個のアミノ酸残基、例えば、最大で70個のアミノ酸残基、例えば、最大で60個のアミノ酸残基、例えば、最大で50個のアミノ酸残基、例えば、最大で45個のアミノ酸残基、例えば、最大で40個のアミノ酸残基、例えば、最大で35個のアミノ酸残基、例えば、最大で30個のアミノ酸残基のポリペプチドであり得る。

10

【0200】

特に、前記エクソン9CALRポリペプチドは、

a) 配列番号16(CALR<sub>378-411</sub>)、

b) 配列番号2(CALR<sub>367-396</sub>)、

c) 配列番号3(CALR<sub>383-411</sub>)、

d) 配列番号15(CALR<sub>373-393</sub>)、

e) 配列番号1(CALR<sub>376-411</sub>)、

f) 配列番号17(CALR<sub>367-411</sub>)、及び

20

g) a) から f) のいずれかに記載のポリペプチドの機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き同一配列のポリペプチドである機能的相同体

からなる群から選択される免疫原として活性のペプチドを含む、最大で100個のアミノ酸残基、例えば、最大で90個のアミノ酸残基、例えば、最大で80個のアミノ酸残基、例えば、最大で70個のアミノ酸残基、例えば、最大で60個のアミノ酸残基、例えば、最大で50個のアミノ酸残基、例えば、最大で45個のアミノ酸残基、例えば、最大で40個のアミノ酸残基、例えば、最大で35個のアミノ酸残基、例えば、最大で30個のアミノ酸残基のポリペプチドであり得る。

30

【0201】

前記エクソン9変異体CALRポリペプチドは、配列番号16のアミノ酸の連続配列を含む、最大で100個のアミノ酸、例えば、最大で50個のアミノ酸、例えば、最大で30個のアミノ酸、例えば、最大で20個のアミノ酸、例えば、最大で15個のアミノ酸のポリペプチドであり得、配列番号16のアミノ酸の前記連続配列は、配列番号16のCALR由来の8~10個の範囲の、例えば、9又は10個の連続アミノ酸又はその機能的相同体からなる。したがって、前記ポリペプチドは、

a) 配列番号16(CALR<sub>378-411</sub>)、

b) 配列番号2(CALR<sub>367-396</sub>)、

c) 配列番号3(CALR<sub>383-411</sub>)、

d) 配列番号15(CALR<sub>373-393</sub>)、

e) 配列番号1(CALR<sub>376-411</sub>)、

f) 配列番号17(CALR<sub>367-411</sub>)、及び

40

g) a) から f) のいずれかに記載のポリペプチドの機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き同一配列のポリペプチドである機能的相同体

からなる群から選択される免疫原として活性のペプチドを含む、最大で100個のアミノ酸、例えば、最大で50個のアミノ酸、例えば、最大で30個のアミノ酸、例えば、最大で29個のアミノ酸のポリペプチドであり得る。

50

## 【0202】

他の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号6のアミノ酸の連続配列を含む、最大で400個のアミノ酸、例えば、最大で300個のアミノ酸、例えば、最大で200個のアミノ酸、例えば、最大で100個のアミノ酸、例えば、最大で50個のアミノ酸のJAK2V617Fポリペプチドであり得、配列番号6のアミノ酸の前記連続配列は、配列番号6のJAK2V617F又はその機能的相同体由来の最大で50個のアミノ酸残基、例えば、最大で45個のアミノ酸残基、例えば、最大で40個のアミノ酸残基、例えば、最大で35個のアミノ酸残基、例えば、最大で30個のアミノ酸残基、例えば、最大で25個のアミノ酸残基、例えば、18~25個の範囲の、例えば、8~10個の範囲の連続アミノ酸からなる。

## 【0203】

特に、前記JAK2V617Fポリペプチドは、配列番号6内で特定されるJAK2V617Fの最大で100個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で90個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で80個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で70個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で60個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で50個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で45個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で40個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で35個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で30個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で29個の連続アミノ酸残基、例えば、最大で25個の連続アミノ酸残基、例えば、18~25個の連続アミノ酸残基、例えば、20個の連続アミノ酸のポリペプチド又はその機能的相同体であって、

a) 配列番号7(JAK2<sub>610-618</sub>)、及び

b) a) から c) のいずれかに記載のポリペプチドの機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き同一配列のポリペプチドである機能的相同体

からなる群から選択される免疫原として活性のペプチドを含むポリペプチドであり得る。

## 【0204】

前記JAK2V617Fポリペプチドはまた、配列番号6のアミノ酸の連続配列を含む、最大で100個のアミノ酸、例えば、最大で50個のアミノ酸、例えば、最大で30個のアミノ酸、例えば、最大で20個のアミノ酸、例えば、最大で15個のアミノ酸、例えば、最大で10個のアミノ酸のポリペプチドでもあり得、配列番号6のアミノ酸の前記連続配列は、配列番号6のJAK2V617F又はその機能的相同体由来の8~10個の範囲の、例えば、9又は10個の連続アミノ酸からなる。したがって、前記ポリペプチドは、

a) 配列番号7(JAK2<sub>610-618</sub>)、及び

b) a) から c) のいずれかに記載のポリペプチドの機能的相同体であって、最大で3個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で2個のアミノ酸が置換されている、例えば、最大で1個のアミノ酸が置換されていることを除き同一配列のポリペプチドである機能的相同体

からなる群から選択される免疫原として活性のペプチドを含む、最大で100個のアミノ酸、例えば、最大で50個のアミノ酸、例えば、最大で30個のアミノ酸、例えば、最大で29個のアミノ酸、例えば、26個のアミノ酸、例えば、最大で20個のアミノ酸、例えば、最大で15個のアミノ酸のポリペプチドであり得る。

## 【0205】

好ましくは、JAK2V617Fポリペプチドは、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む。

## 【0206】

MHC

エクソン9変異体CALRの又はJAK2V617F変異体の免疫原として活性のペプチド断片は、MHCクラスI拘束性ペプチド断片又はMHCクラスII拘束性ペプチド断片、例えば、このセクションに記載されるMHCクラスI拘束性ペプチド断片又はMHCクラスII拘束性ペプチド断片のいずれかであってもよいことは、本発明のうちに含まれる。

## 【0207】

MHCクラスI分子及びMHCクラスII分子の2つのMHC分子型が存在する。MHCクラスI分子は

10

20

30

40

50

、適応免疫応答の主なエフェクター細胞であるCD8 T細胞によって認識される。MHCクラスII分子は、主に、抗原提示細胞(APC)の表面上に発現し、その最も重要なものは樹状細胞であるようである。APCは、ナイーブT細胞、及び免疫系における他の細胞を刺激する。これらは、CD8 T細胞及びCD4 T細胞の両方を刺激する。

【0208】

一実施形態では、本発明は、免疫原として活性のCALRペプチド(任意選択で、本明細書に記載されているより大きなペプチド及び/又はワクチン組成物中に含まれる)であって、配列番号10のCALR由来の25~35個の連続アミノ酸からなるMHCクラスI拘束性ペプチド断片、例えば、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1若しくは配列番号17のペプチド断片又はその機能的相同体であり、配列番号10又は配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1若しくは配列番号17のうちの最大で2個のアミノ酸が置換されている免疫原として活性のエクソン9変異体CALRペプチドを提供する。別の実施形態では、本発明は、免疫原として活性のJAK2V617Fペプチド(任意選択で、本明細書に記載されているより大きなペプチド及び/又はワクチン組成物中に含まれる)であって、配列番号6のJAK2V617F由来の5~15個の連続アミノ酸からなるMHCクラスI拘束性ペプチド断片、例えば、配列番号7のペプチド断片又はその機能的相同体の8~9個のペプチドであり、配列番号6又は配列番号7のうちの最大で2個のアミノ酸が置換されている免疫原として活性のJAK2V617Fペプチドを提供する。そのようなMHCクラスI拘束性ペプチド断片は、いくつかの特徴のうちの少なくとも1つを有することによって特徴付けられ、このいくつかの特徴のうちの1つは、本明細書中に記載されているアセンブリ結合アッセイによって決定したところ、最大で50 $\mu$ MであるクラスI HLA分子の最大半量の回収が可能なペプチドの量( $C_{50}$ 値)によって測定される親和性で拘束されるクラスI HLA分子に結合する能力である。このアセンブリアッセイは、ペプチド輸送体欠損細胞株T2へのペプチドの負荷後のHLA分子の安定化に基づく。次に、正確に折り畳まれた安定なHLA重鎖を、構造依存抗体を使用して免疫沈降させ、ペプチド結合を定量する。この実施形態のペプチドは、最大で100個、好ましくは最大で50個、より好ましくは最大で25個、さらにより好ましくは最大で20個、なおさらにより好ましくは最大で15個、例えば、最大で10個、例えば、25~35個又は8~12個の範囲の、配列番号10のエクソン9CALR変異体の、又は配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1若しくは配列番号17の断片の、又はその機能的相同体の連続アミノ酸含み(又はより好ましくは、からなり)、配列番号10、配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号15、配列番号1又は配列番号17のうちの最大で2個のアミノ酸が置換されている。ペプチドは、一部の実施形態では、最大で100個、好ましくは最大で50個、より好ましくは最大で25個、さらにより好ましくは最大で20個、なおさらにより好ましくは最大で15個、例えば、最大で10個、例えば、8~15個又は15~25個の範囲の、配列番号6のJAK2V617Fの又はその機能的相同体の連続アミノ酸を含み(又はより好ましくは、からなり)、配列番号6のうちの最大で2個のアミノ酸が置換されている。好ましくは、JAK2V617Fペプチドは、配列番号6のアミノ酸617を少なくとも含む。

【0209】

アセンブリ結合アッセイは、上記親和性で所与のHLA対立遺伝子分子に結合する能力についての候補ペプチドの簡便なスクリーニング手段を提供する。好ましい実施形態では、本発明のペプチド断片は、最大で30 $\mu$ Mである $C_{50}$ 値、例えば、最大で20 $\mu$ Mである $C_{50}$ 値(最大で10 $\mu$ M、最大で5 $\mu$ M及び最大で2 $\mu$ Mの $C_{50}$ 値を含む)を有するものである。

【0210】

別の好ましい実施形態では、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの新規のMHCクラスII拘束性ペプチド断片が提供される。一部の実施形態では、MHCクラスII拘束性ペプチド断片は、配列番号10のエクソン9変異体CALR、例えば、配列番号16、配列番号2若しくは配列番号3のペプチド又はその機能的相同体のものであり、配列番号10のうちの最大で2個のアミノ酸が置換されており(これも本明細書では「ペプチド」という)、本明細書の以下に記載されているいくつかの特徴のうちの少なくとも1つを有することによって特徴付けられる。この実施形態のペプチドは、4から93個の間、好ましくは8から90個の間、より好まし

くは10から75個の間、さらにより好ましくは12から60個の間、なおより好ましくは20から40個の間、例えば、25から35個の間の、配列番号10のエクソン9変異体CALR又はその機能的相同体の連続アミノ酸を含み(又はより好ましくはそれからなり)、配列番号10のうちの最大で2個の、好ましくは最大で1個のアミノ酸が置換されている。好ましい実施形態では、ペプチドは、25から35個の間、好ましくは26から33個の間、より好ましくは27から32個の間、さらにより好ましくは28から31個の間、なおより好ましくは28から30個の間、例えば、29個の、配列番号10のエクソン9変異体CALRの連続アミノ酸を含む(又はより好ましくはそれからなる)。別の好ましい実施形態では、ペプチドは、25から35個の間、好ましくは26から33個の間、より好ましくは27から32個の間、さらにより好ましくは28から31個の間、なおより好ましくは28から30個の間、例えば、29個の、配列番号16のCALRペプチド断片の連続アミノ酸を含む(又はより好ましくはそれからなる)。さらに別の好ましい実施形態では、ペプチドは、25から29個の間、好ましくは26から29個の間、より好ましくは27から29個の間、例えば、28又は29個の、配列番号2のエクソン9変異体CALRペプチド断片の連続アミノ酸を含む(又はより好ましくはそれからなる)。さらに別の好ましい実施形態では、ペプチドは、25から29個の間、好ましくは26から29個の間、より好ましくは27から29個の間、例えば、28又は29個の、配列番号3のエクソン9変異体CALRペプチド断片の連続アミノ酸を含む(又はより好ましくはそれからなる)。さらに別の好ましい実施形態では、ペプチドは、15から20個の間、好ましくは16から20個の間、より好ましくは17から20個の間、例えば、18又は19個の、配列番号15のエクソン9変異体CALRペプチド断片の連続アミノ酸を含む(又はより好ましくはそれからなる)。さらに別の好ましい実施形態では、ペプチドは、32から36個の間、好ましくは33から36個の間、より好ましくは34から36個の間、例えば、35又は36個の、配列番号1のエクソン9変異体CALRペプチド断片の連続アミノ酸を含む(又はより好ましくはそれからなる)。さらに別の好ましい実施形態では、ペプチドは、40から44個の間、好ましくは41から44個の間、より好ましくは40から41個の間、例えば、40、41、42、43又は44個の、配列番号17のエクソン9変異体CALRペプチド断片の連続アミノ酸を含む(又はより好ましくはそれからなる)。

#### 【0211】

他の実施形態では、MHCクラスII拘束性ペプチド断片は、配列番号6のJAK2V617F、例えば、配列番号7のペプチド又はその機能的相同体のものであり、配列番号6のうちの最大で2個のアミノ酸が置換されており(これも本明細書では「ペプチド」という)、本明細書の以下に記載されているいくつかの特徴のうちの少なくとも1つを有することによって特徴付けられる。この実施形態のペプチドは、4から93個の間、例えば、5から90個の間、例えば、6から75個の間、例えば、7から60個の間、例えば、8から40個の間、例えば、9から30個の間、例えば、10から20個の間の、配列番号6のJAK2又はその機能的相同体の連続アミノ酸を含み(又はより好ましくは、からなり)、配列番号6のうちの最大で2個の、好ましくは最大で1個のアミノ酸が置換されている。好ましい実施形態では、ペプチドは、8から15個の間、好ましくは8から14個の間、より好ましくは8から13個の間、さらにより好ましくは8から12個の間、なおより好ましくは8から11個の間、例えば、9個の、配列番号6のJAK2V617Fのアミノ酸を含む(又はより好ましくは、からなる)。別の好ましい実施形態では、ペプチドは、8から9個の間、例えば、9個の、配列番号7のJAK2V617Fペプチド断片のアミノ酸を含む(又はより好ましくは、からなる)。

#### 【0212】

したがって、配列番号10のエクソン9変異体CALRの、25～35個のアミノ酸の新規のMHCクラスI拘束性ペプチドエクソン9変異体CALR断片、又は25～35個のアミノ酸の新規のMHCクラスII拘束性ペプチド断片であって、配列番号10のうちの最大で2個のアミノ酸が置換されており、本明細書に記載されている以下のいくつかの特徴(そのうちの1つは、拘束されるクラスI又はクラスII HLA分子に結合する能力である)のうちの少なくとも1つを有することによって特徴付けられるペプチド断片又はその機能的相同体が提供される。また、配列番号6のJAK2V617Fの、8～15個のアミノ酸の新規のMHCクラスI拘束性ペプチドJAK2V617F断片又は8～15個のアミノ酸の新規のMHCクラスII拘束性ペプチド断片であって、配列番

10

20

30

40

50

号6のうちの最大で2個のアミノ酸が置換されており、本明細書に記載されている以下のいくつかの特徴（そのうちの1つは、拘束されるクラスI又はクラスII HLA分子に結合する能力である）のうちの少なくとも1つを有することによって特徴付けられるペプチド断片又はその機能的相同体が提供される。

【0213】

特定の実施形態では、以下の特徴：

(i) ELISPOTアッセイにより決定して、少なくとも1人のがん患者のPBL集団内のINF- $\gamma$ 産生細胞を、PBL  $10^4$ 個当たり少なくとも1個の頻度で誘発することが可能であること、及び/又は

(ii) 腫瘍組織中で、エピトープペプチドと反応性であるCTLの、in situにおける検出が可能であること、

(iii) エクソン9変異体CALR特異的T細胞の増殖を、in vitroにおいて誘導することが可能であること及び/又はJAK2V617F特異的T細胞の増殖を、in vitroにおいて誘導することが可能であること

のうちの少なくとも1つを有する、MHCクラスI拘束性ペプチド又はMHCクラスII拘束性ペプチドであるペプチド断片を提供する。

【0214】

本発明によるより好ましいペプチドは、ELISPOTアッセイ、例えば、以下の本明細書の実施例1に記載されているELISPOTアッセイにより決定して、特異的T細胞応答を惹起することが可能であるペプチドである。いくつかのペプチドは、MHCクラスI又はクラスIIと高親和性で結合しないが、ELISPOTにより決定して、T細胞応答を依然として生じ得る。MHCクラスI又はクラスIIと高親和性で結合することが可能である他のペプチドはまた、ELISPOTにより決定して、T細胞応答を生じる。両方の種類のペプチドが、本発明によるより好ましいペプチドである。

【0215】

したがって、本発明によるより好ましいペプチドは、ELISPOTアッセイにより測定した場合に、特異的T細胞応答を惹起することが可能であるペプチドであって、 $10^6$ 個の細胞当たり、より好ましくは $10^5$ 個の細胞当たり、なおより好ましくは $10^4$ 個の細胞当たり、50個を超えるペプチド特異的スポットが測定されるペプチドである。

【0216】

本発明による最も好ましいペプチドは、変異体CALR、特に、エクソン9変異体CALRの発現により、又は変異体JAK2、特に、変異体JAK2V617Fの発現によって特徴付けられる臨床状態にある個体における細胞性免疫応答を誘発することが可能なペプチドであり、臨床状態は、好ましくは、骨髄増殖性状態などの増殖性状態、例えば、本態性血小板血症、原発性骨髄線維症、真性赤血球増加症、又は急性若しくは慢性骨髄性白血病、好ましくは、急性若しくは慢性骨髄性白血病などの悪性骨髄増殖性障害である。

【0217】

上記のように、HLA系は、ヒト主要組織適合(MHC)系を表す。一般的に、MHC系は、以下の様々な特徴：移植抗原、胸腺依存性免疫応答、一定の補体因子及び一定の疾患の素因を制御する。より具体的には、MHCは、MHCのより一般的な特徴を決定する3つの異なる型の分子、すなわち、クラスI、II及びIII分子をコードする。これらの分子のうち、クラスI分子は、ほとんどの有核細胞及び血小板の表面上に存在する、いわゆるHLA-A分子、HLA-B分子及びHLA-C分子である。

【0218】

本発明のペプチドは、特定のMHCクラスI HLA分子に結合する(によって拘束される)能力によって特徴付けられる。したがって、一実施形態では、ペプチドは、HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A9、HLA-A10、HLA-A11、HLA-Aw19、HLA-A23(9)、HLA-A24(9)、HLA-A25(10)、HLA-A26(10)、HLA-A28、HLA-A29(w19)、HLA-A30(w19)、HLA-A31(w19)、HLA-A32(w19)、HLA-Aw33(w19)、HLA-Aw34(10)、HLA-Aw36、HLA-Aw43、HLA-Aw66(10)、HLA-Aw68(28)、HLA-A69(28)を含むMHCクラスI HLA-A分子によって拘束されるペプチドである。最初の数字

10

20

30

40

50

表示のみを使用するより簡便な表示も文献全体を通して使用され、例えば、それぞれ、HLA-A-Aw19及びHLA-A24(49)の代わりにHLA-A19又はHLA-A24が使用される。特定の実施形態では、本発明のペプチドは、HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A11、及びHLA-A24からなる群から選択されるMHCクラスI HLA種によって拘束される。特定の実施形態では、本発明のペプチドは、MHCクラスI HLA種であるHLA-A2又はHLA-A3によって拘束される。

【0219】

さらに有用な実施形態では、本発明のペプチドは、HLA-B5、HLA-B7、HLA-B8、HLA-B12、HLA-B13、HLA-B14、HLA-B15、HLA-B16、HLA-B17、HLA-B18、HLA-B21、HLA-Bw22、HLA-B27、HLA-B35、HLA-B37、HLA-B38、HLA-B39、HLA-B40、HLA-Bw41、HLA-Bw42、HLA-B44、HLA-B45、HLA-Bw46及びHLA-Bw47のうちのいずれかを含むMHCクラスI HLA-B分子によって拘束されるペプチドである。本発明の特定の実施形態では、本発明のペプチドが結合することが可能なMHCクラスI HLA-B種は、HLA-B7、HLA-B35、HLA-B44、HLA-B8、HLA-B15、HLA-B27及びHLA-B51から選択される。

10

【0220】

さらに有用な実施形態では、本発明のペプチドは、HLA-Cw1、HLA-Cw2、HLA-Cw3、HLA-Cw4、HLA-Cw5、HLA-Cw6、HLA-Cw7及びHLA-Cw1のいずれかを含むがこれらに限定されない、MHCクラスI HLA-C分子によって拘束されるペプチドである。

【0221】

さらに有用な実施形態では、本発明のペプチドは、HLA-DPA-1、HLA-DPB-1、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRA、HLA-DRB及びこれらの群内の全ての対立遺伝子及びHLA-DM、HLA-DOのいずれかを含むがこれらに限定されない、MHCクラスII HLA分子によって拘束されるペプチドである。

20

【0222】

特定のHLA分子に結合する能力を潜在的に有するペプチドの選択は、所与の特定のHLA分子に結合する既知の配列のアラインメントによってなされ、それによって、ペプチド中の特定の位置でのいくつかの関連アミノ酸の優性が明らかとなる。そのような優性のアミノ酸残基は、本明細書で、「アンカー残基」又は「アンカー残基モチーフ」ともいう。アクセス可能なデータベース中で見出すことができる既知の配列データに基づいたこのような比較的簡便な手順に従うことにより、ペプチドは、特定のHLA分子に結合する可能性が高いエクソン9CALR又はJAK2V617Fに由来し得る。様々なHLA分子についてのそのような分析の代表例を、以下の表に示す。

30

【0223】

【表 2】  
表 2

| HLA 対立<br>遺伝子    | 位置 1 | 位置 2                        | 位置 3          | 位置 5 | 位置 6  | 位置 7 | C 末端       |    |
|------------------|------|-----------------------------|---------------|------|-------|------|------------|----|
| HLA-A1           |      | T,S                         | D,E           |      |       | L    | Y          |    |
| HLA-A2           |      | L, M                        |               |      | V     |      | L,V        |    |
| HLA-A3           |      | L,V,M                       | F,Y           |      |       |      | K, Y, F    |    |
| HLA-A11          |      | V,I,F,Y                     | M,L,F,Y,<br>I |      |       |      | K, R       | 10 |
| HLA-A23          |      | I,Y                         |               |      |       |      | W,I        |    |
| HLA-A24          |      | Y                           |               | I,V  | F     |      | I,L,F      |    |
| HLA-A25          |      | M,A,T                       | I             |      |       |      | W          |    |
| HLA-A26          | E,D  | V,T,I,L,F                   |               |      | I,L,V |      | Y,F        |    |
| HLA-A28          | E,D  | V,A,L                       |               |      |       |      | A,R        |    |
| HLA-A29          |      | E                           |               |      |       |      | Y,L        |    |
| HLA-A30          |      | Y,L,F,V                     |               |      |       |      | Y          | 20 |
| HLA-A31          |      |                             | L,M,F,Y       |      |       |      | R          |    |
| HLA-A32          |      | I,L                         |               |      |       |      | W          |    |
| HLA-A33          |      | Y,I,L,V                     |               |      |       |      | R          |    |
| HLA-A34          |      | V,L                         |               |      |       |      | R          |    |
| HLA-A66          | E,D  | T,V                         |               |      |       |      | R,K        |    |
| HLA-A68          | E,D  | T,V                         |               |      |       |      | R,K        |    |
| HLA-A69          |      | V,T,A                       |               |      |       |      | V,L        |    |
| HLA-A74          |      | T                           |               |      |       |      | V,L        | 30 |
| HLA-B5           |      | A,P                         | F,Y           |      |       |      | I,L        |    |
| HLA-B7           | *    | P                           |               |      |       |      | L,F        |    |
| HLA-B8           |      |                             | K             | K,R  |       |      | L          |    |
| HLA-B14          |      | R,K                         |               |      |       |      | L,V        |    |
| HLA-B15<br>(B62) |      | Q,L,K,P,<br>H,V,I,M,<br>S,T |               |      |       |      | F,Y,W      |    |
| HLA-B17          |      |                             |               |      |       |      | L,V        | 40 |
| HLA-B27          |      | R                           |               |      |       |      | Y, K,F,L   |    |
| HLA-B35          |      | P                           |               |      |       |      | I, L, M, Y |    |
| HLA-B37          |      | D,E                         |               |      |       |      | I,L,M      |    |
| HLA-B38          |      | H                           | D,E           |      |       |      | F,L        |    |
| HLA-B39          |      | R,H                         |               |      |       |      | L,F        |    |
| HLA-B40          |      | E                           | F,I,V         |      |       |      | L,V,A,W,   |    |

|          |         |     |  |  |         |    |
|----------|---------|-----|--|--|---------|----|
| (B60,61) |         |     |  |  | M,T,R   |    |
| HLA-B42  | L,P     |     |  |  | Y,L     |    |
| HLA-B44  | E       |     |  |  | F,Y,W   |    |
| HLA-B46  | M,I,L,V |     |  |  | Y,F     |    |
| HLA-B48  | Q,K     |     |  |  | L       |    |
| HLA-B51  | A,P,G   |     |  |  | F,Y,I,V |    |
| HLA-B52  | Q       | F,Y |  |  | I,V     | 10 |
| HLA-B53  | P       |     |  |  | W,F,L   |    |
| HLA-B54  | P       |     |  |  |         |    |
| HLA-B55  | P       |     |  |  | A,V     |    |
| HLA-B56  | P       |     |  |  | A,V     |    |
| HLA-B57  | A,T,S   |     |  |  | F,W,Y   |    |
| HLA-B58  | A,T,S   |     |  |  | F,W,Y   |    |
| HLA-B67  | P       |     |  |  | L       |    |
| HLA-B73  | R       |     |  |  | P       | 20 |
| HLA-Cw1  | A,L     |     |  |  | L       |    |
| HLA-Cw2  | A,L     |     |  |  | F,Y     |    |
| HLA-Cw3  | A,L     |     |  |  | L,M     |    |
| HLA-Cw4  | Y,P,F   |     |  |  | L,M,F,Y |    |
| HLA-Cw6  |         |     |  |  | L,I,V,Y |    |
| HLA-Cw6  | Y       |     |  |  | L,Y,F   |    |
| HLA-Cw8  | Y       |     |  |  | L,I,    |    |
| HLA-Cw16 | A,L     |     |  |  | L,V     | 30 |

\*一実施形態では、この位置に特異的なアンカー残基は存在しないが、好ましい実施形態では、アンカー残基はR又はAである。

【0224】

したがって、一例として、HLA-A3に結合する能力を潜在的に有するノナペプチドは、以下の配列：Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-K、Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Y;Xaa-L-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-F又はXaa-V-Y-Xaa-Xaa-Xaa-Xaa-K(Xaaは任意のアミノ酸残基を示す)のうちの1つを有するであろう。類似の様式で、任意の他のHLA分子に結合する能力を潜在的に有する配列をデザインすることができる。当業者は所与のHLA分子についてのさらなる「アンカー残基モチーフ」を同定することができることが認識されるであろう。

【0225】

本発明のペプチドは、由来するエクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fのネイティブ配列である配列を有してもよく、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fは、本明細書に記載されている任意のエクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fであってもよい。しかし、任意の所与のHLA分子に対してより高い親和性を有するペプチドは、例えば、上記手順に基づいた少なくとも1個のアミノ酸残基の置換、欠失、又は付加による配列の修飾によってそのようなネイティブ配列から誘導してもよく、それにより所与のHLA分子に関するアンカー残基モチ

40

50

ーフが同定される。

【0226】

したがって、有用な実施形態では、本発明のポリペプチドには、その配列が、表2に列挙した各特異的HLA対立遺伝子について、表中に示す任意のアミノ酸残基を含むペプチドが含まれる。

【0227】

したがって、本発明のペプチドは、ペプチドが、好ましくは上記表中に示す所与のHLA-A特異的ペプチドの1個以上の、好ましくは全てのアンカー残基を含む様式で、1~10個の範囲、好ましくは1~5個の範囲、より好ましくは1~3個の範囲、なおより好ましくは1~2個の範囲、さらにより好ましくは1個のアミノ酸が別のアミノ酸と交換された、エクソン9変異体CALR由来の連続配列を含む任意の上述のペプチドであり得る。本発明のペプチドは、ペプチドが、好ましくは上記表中に示す所与のHLA-A特異的ペプチドの1個以上の、好ましくは全てのアンカー残基を含む様式で、1~10個の範囲、好ましくは1~5個の範囲、より好ましくは1~3個の範囲、なおより好ましくは1~2個の範囲、さらにより好ましくは1個のアミノ酸が別のアミノ酸と交換された、JAK2V617F由来の連続配列を含む任意の上述のペプチドでもあり得る。

【0228】

本発明の好ましいペプチドが拘束される好ましいHLA種の例として、HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A11、及びHLA-A24からなる群から選択されるMHCクラスI HLA種が挙げられ、より好ましくはペプチドはHLA-A3又はHLA-A2によって拘束される。あるいは、好ましいHLA種として、HLA-B7、HLA-B35、HLA-B44、HLA-B8、HLA-B15、HLA-B27及びHLA-B51からなる群から選択されるMHCクラスI HLA-B種が挙げられる。

【0229】

本発明のポリペプチドを同定するためのアプローチは、以下のステップ:特定のHLA分子、例えば、所与の集団内に高い割合で存在するものを選択するステップ、上記のアラインメント分析を行ってエクソン9変異体CALRタンパク質中の又はJAK2V617Fタンパク質中の「アンカー残基モチーフ」を同定するステップ、1つ以上の同定したアンカー残基を含む適切なサイズのペプチドを単離又は構築するステップ、及び実施例1に記載のELISPOTアッセイにより決定して、がん患者のPBL集団内で $10^4$ 個のPBL当たり少なくとも1個の頻度でINF-産生細胞を誘発するペプチドの能力について、得られたペプチドを試験するステップ、を含む。例えば、がん患者のPBMC集団においてINF-産生細胞を誘発するペプチドの能力は、 $10^4$ 個のPBMC当たり少なくとも1個の頻度を有する。

【0230】

本発明の一態様では、8~10個のアミノ酸残基より長いCALR由来ペプチド、特に、エクソン9変異体CALR由来ペプチド、及びJAK2由来ペプチド、特に、JAK2V617F由来ペプチドを提供する。8~10個のアミノ酸より長いポリペプチドは、HLA分子への結合のためにプロテアソームによってより短い長さにプロセッシングされる。したがって、8~10個のアミノ酸残基長を超えるポリペプチドを投与する場合、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの「長い」ポリペプチド/タンパク質/タンパク質断片/バリエーションは、*in vivo*で、プロテアソームによりサイトゾル中で一連のより小さなペプチドにプロセッシングされ得る。プロテアソームによって種々の異なるより短いペプチドにプロセッシングされ得るより長いポリペプチドを使用することの利点は、1つのペプチドを用いて、特定のHLAクラスによって拘束される8~10個のアミノ酸のペプチドよりも多数のHLAクラスを標的とすることができることである。

【0231】

a)驚くべきことに、本発明のいくつかのペプチドは、置換を不必要とするのに十分に高い親和性でMHC分子に結合し、ここでペプチドが提示される場合に抗原として使用できる状態にある。好ましくは、本発明のワクチン組成物は、エクソン9変異体CALRタンパク質(配列番号10)、JAK2V617F変異体タンパク質(配列番号6)、そのポリペプチド断片(配列番号16、配列番号2、配列番号3、配列番号7、配列番号15、配列番号1、配列番号17)、同様に

バリエーション、全長及び部分的な長さのエクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの機能的相同体、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの連続ペプチド、並びにその機能的相同体のうちの1つ以上を含む。より好ましくは、ワクチン組成物は、表1に列挙した任意の配列を含む。非常に好ましくは、ワクチン組成物は、ペプチドである配列番号16(CALR<sub>378-411</sub>)、配列番号2(CALR<sub>367-396</sub>)、配列番号3(CALR<sub>383-411</sub>)、配列番号14(CALR<sub>378-411</sub>)、配列番号15(CALR<sub>373-393</sub>)、配列番号1(CALR<sub>376-411</sub>)、配列番号17(CALR<sub>367-411</sub>)又は配列番号7(JAK2<sub>610-618</sub>)を含む。

#### 【0232】

本発明のペプチドの重要な特徴は、がん及び/又は感染を患う個体のAPC又は腫瘍/新生物細胞(標的細胞)上で、PBL集団内の特定のペプチドを特異的に認識するINF- $\gamma$ 産生応答T細胞、すなわち、細胞傷害性T細胞(CTL)を認識又は誘発する能力である。この活性は、個体由来のPBL、PBMC、APC又は腫瘍細胞をELISPOTアッセイに供することによって容易に決定される。アッセイの前に、細胞を試験すべきペプチドと接触させることによってアッセイすべき細胞を刺激することが有利であり得る。好ましくは、ペプチドは、本明細書で使用するELISPOTアッセイにより決定して、 $10^4$ 個のPBL当たり少なくとも1個の頻度で、例えば、 $10^4$ 個のPBMC当たり少なくとも1個の頻度で、INF- $\gamma$ 産生T細胞を誘発又は認識することが可能である。より好ましくは、頻度は、 $10^4$ 個のPBL当たり少なくとも5個、最も好ましくは $10^4$ 個のPBL当たり少なくとも10個、例えば、 $10^4$ 個のPBL当たり少なくとも50又は100個である。例えば、頻度は、 $10^4$ 個のPBMC当たり少なくとも5個、最も好ましくは $10^4$ 個のPBMC当たり少なくとも10個、例えば、 $10^4$ 個のPBMC当たり少なくとも50又は100個である。

#### 【0233】

ELISPOTアッセイは、エクソン9変異体CALRペプチド又はJAK2V617Fペプチドに対して特異的なT細胞応答をモニタリングするための強力なツールの代表である。本明細書における所見の主要な意味は、本発明のペプチドが発現され、変異体CALR又はJAK2V617Fを発現するがん細胞及び/又はエクソン9 APC上のHLA分子と複合体を形成することである。これにより、これらのがん細胞がCTLによる破壊に感受性を示すようになり、がん及び骨髄増殖性障害と戦うためのCALR免疫化の有用性が強調される。メラノーマ患者由来のPBLにおけるHLA拘束性CALR由来ペプチドエピトープに対する自発的CTL応答の存在は、CALRの免疫原として活性のペプチドの免疫療法の可能性を示す。

#### 【0234】

本発明の一実施形態では、本発明のペプチドは、変異体CALR、例えば、配列番号10のエクソン9変異体CALR若しくは配列番号10に対する少なくとも70%の同一性を有するその機能的相同体が発現される臨床状態、又は変異体JAK2V617F、例えば、配列番号6のJAK2V617Fが発現される臨床状態にある個体のPBL集団内のINF- $\gamma$ 産生細胞を誘発することが可能である。臨床状態は、好ましくは増殖性障害、例えば、骨髄増殖性障害、好ましくは悪性骨髄増殖性障害である。

#### 【0235】

##### 個体

本発明のワクチン組成物で治療すべき個体は、臨床状態にある個体である。個体は、好ましくは哺乳動物種個体であり、最も好ましくはヒト個体である。個体は、任意の年齢、若年又は高齢の個体であり得、男性又は女性のいずれでもよい。個体が患う臨床状態は、骨髄増殖性障害などの新生物疾患又はがんであり得る。

#### 【0236】

本発明の実施形態は、がんの治療、リスクの低減、安定化又は予防のためのワクチンを提供する。別の実施形態では、本発明は、感染、例えば、微生物感染又はウイルス感染から生じる疾患の治療、リスクの低減、安定化又は予防のためのワクチンを提供する。

#### 【0237】

##### 骨髄増殖性障害

本発明のワクチン組成物を使用して、臨床状態を予防、リスクを低減又は治療すること

ができる。好ましくは、臨床状態は、エクソン9変異体CALR及び/又は変異体JAK2V617Fの発現に関連するか又はそれによって特徴付けられる。エクソン9変異体CALRは、配列番号10で特定されるエクソン9変異体CALRであってもよく、又はそれらの野生型形態において、配列番号10と少なくとも70%の同一性を共有する(しかし、機能的であることを必要としない)相同体であってもよい。エクソン9変異体は、Nangaliaらの図3、パネルA、2400頁に列挙された変異体のいずれかであってもよい。例えば、エクソン9変異体CALRは、L367fs\*46(配列番号10に示される全長)、E370fs\*43、E370fs\*48、L367fs\*48、L367fs\*44、K368fs\*51、L367fs\*52、R366fs\*53、E371fs\*49、K368fs\*43、E370fs\*37、D373fs\*47、K374fs\*53、E371fs\*49、K385fs\*47、K385fs\*47、R376fs\*55、K385fs\*47又はE381fs\*48であってもよい。JAK2V617Fは、配列番号6で特定されるJAK2V617F変異体であってもよく、又はそれらの野生型形態において、配列番号6と少なくとも70%の同一性を共有する(しかし、機能的であることを必要としない)相同体であってもよい。本明細書により、臨床状態にある個体のエクソン9変異体CALR又は変異体JAK2V617Fの発現レベル(発現は、例えば、hnRNA、mRNA、前駆体タンパク質、十分にプロセシングされたタンパク質の発現である)は、臨床状態を患っていない個体と同じであるか又はそれよりも高いことが理解される。

10

20

30

40

50

#### 【0238】

本発明の一実施形態では、臨床状態は、増殖性障害、例えば、骨髄増殖性障害、例えば、前腫瘍性又は腫瘍性障害である。本発明の好ましい実施形態では、臨床状態は、がんである。がん(悪性新生物)は、細胞群が制御されない増殖(正常限度を超える増殖及び分裂)、侵襲(隣接組織への侵入及び破壊)、及び時折転移(リンパ又は血液を介した体内の他の位置への拡大)の性質を示す疾患の分類である。これら3つのがんの悪性度は、自己制限され、侵襲や転移のない良性腫瘍と区別される。ほとんどのがんは腫瘍を形成するが、白血病のように、形成しないものもある。

#### 【0239】

治療又は予防することができる骨髄増殖性腫瘍の非限定的群として、本態性血小板血症、真性赤血球増加症、原発性骨髄線維症、及び急性骨髄性白血病又は慢性骨髄性白血病が挙げられる。

#### 【0240】

好ましい実施形態では、本発明によるワクチン組成物は、対象における臨床応答を誘発することが可能であり、臨床応答は安定した疾患によって特徴付けることができるか、好ましい実施形態では、臨床応答は部分的応答によって特徴付けることができるか、好ましくは、臨床応答はがんなどの障害の完全寛解によって特徴付けることができる。

#### 【0241】

本発明の一態様では、ワクチン組成物は、個体における臨床応答を誘発することが可能である。一実施形態では、臨床応答は安定した疾患(さらに悪化も進行もしない)によって特徴付けることができるか、好ましい実施形態では、臨床応答は部分的応答によって特徴付けることができるか、好ましくは、臨床応答はがんなどの障害の完全寛解によって特徴付けることができる。臨床応答を、本明細書で以下に記載されているように決定することができる。

#### 【0242】

本発明の別の態様では、ワクチン組成物は、対象における臨床応答を誘発することが可能であり、臨床応答は、最も巨大な標的病変の最大直径の合計の減少によって特徴付けられる。この減少は、本明細書で以下に記載されているように決定することができる。

#### 【0243】

European Leukemia NetによるMPNである本態性血小板血症の応答基準:

臨床血液学的応答:

- 完全応答:

1. 末梢血中の血小板濃度 $<400 \times 10^9/L$

2. 疾患関連症状なし

3. コンピュータ断層撮影又は超音波検査によって評価した場合、肝臓及び脾臓のサイズ

が正常

4.末梢血中の白血球濃度 $<10 \times 10^9/L$

- 部分的応答:完全応答に対する基準に合致しないが、末梢血中の血小板濃度が $<600 \times 10^9/L$ であるか、又は血小板数がベースライン値の $>50\%$ まで低減している。
- 応答なし:完全応答又は部分的応答のいずれの基準にも合致しない。

【0244】

分子応答:

- 完全応答:測定不能な特異的分子異常。
- 部分的応答:( $>10\%$ の変異対立遺伝子負荷を有する患者について)。ベースラインで $<50\%$ の変異対立遺伝子負荷を有する患者に対する変異対立遺伝子負荷の $>50\%$ の低減。ベースラインで $>50\%$ の変異対立遺伝子負荷を有する患者に対する変異対立遺伝子負荷の $>25\%$ の低減。
- 応答なし:完全応答又は部分的応答のいずれの基準にも合致しない。

10

【0245】

組織学的応答:巨核球過形成なしとして定義される骨髄の寛解。

【0246】

European Leukemia NetによるMPNである真性赤血球増加症の応答基準:

臨床血液学的応答:

- 完全応答:
  - 1.放血なしでヘマトクリットが $<45\%$
  - 2.末梢血中の血小板濃度 $<400 \times 10^9/L$
  - 3.疾患関連症状なし
  - 4.コンピュータ断層撮影又は超音波検査によって評価した場合、肝臓及び脾臓のサイズが正常
  - 5.末梢血中の白血球濃度 $<10 \times 10^9/L$
- 部分的応答:完全応答に対する基準を満たさない患者:
  - 1.放血なしでヘマトクリットが $<45\%$ 、又は
  - 2.上記の3つ以上の基準で応答。
- 応答なし:完全応答又は部分的応答のいずれに対する応答にも合致しない。

20

【0247】

分子応答:

- 完全応答:測定不能な分子異常(例えば、JAK2V617F変異対立遺伝子負荷)。
- 部分的応答:( $>10\%$ の変異対立遺伝子負荷を有する患者について)。ベースラインで $<50\%$ の変異対立遺伝子負荷を有する患者に対する変異対立遺伝子負荷の $>50\%$ の低減。ベースラインで $>50\%$ の変異対立遺伝子負荷を有する患者に対する変異対立遺伝子負荷の $>25\%$ の低減。
- 応答なし:完全応答又は部分的応答のいずれの基準にも合致しない。

30

【0248】

骨髄線維症に対する応答は、Blood、2013年においてTefferiらによって述べられた基準に従って評価される(Tefferiら Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European LeukemiaNet (ELN) consensus report. Blood. 2013年、122; (8): 1395 ~ 1398頁)。

40

【0249】

エクソン9変異体CALR及び/又はJAK2V617Fの発現に関連する障害を患う個体に投与した場合に、本発明のワクチン組成物は、エクソン9変異体CALR、例えば、配列番号10の変異体CALR若しくは配列番号10に対して少なくとも70%の同一性を有するその機能的相同体の発現に関連するか、又は配列番号6の変異体JAK2V617F若しくは配列番号6に対して少なくとも70%の同一性を有するその機能的相同体の発現に関連する障害に対して免疫応答を誘発することが可能であることが企図される。本発明のワクチン組成物は、ワクチン接種し

50

た個体において、腫瘍性細胞、エクソン9変異体CALR及び/若しくは変異体JAK2V617Fを発現するAPCに対して細胞傷害効果を有するエフェクターT細胞の産生を誘発し、並びに/又は対象における腫瘍間質中の抗原特異的T細胞の浸潤を誘導することが可能である。

【0250】

PBL集団内で免疫応答を誘発する能力に加えて、本発明のペプチドは、in situで、すなわち、固形腫瘍組織中で、細胞溶解性免疫応答を誘発することが可能であることも企図される。これは、例えば、HLA-ペプチド複合体(例えば、多量体化され、検出可能なレベルで提供される)を提供すること、及び本発明のエピトープペプチドと反応性である腫瘍組織CTL中で検出するための免疫組織化学染色のためにそのような複合体を使用することによって実証することができる。したがって、本発明のペプチドのさらに重要な特徴は、腫瘍組織中で、エピトープペプチドに反応性であるCTLの、in situにおける検出が可能であることである。

10

【0251】

本発明のペプチドが、HLA分子に結合し、細胞表面上にHLAとペプチドとの複合体を提示し、次いで、複合体が細胞溶解性T細胞のエピトープ又は標的として作用するその能力に加えて、他の免疫応答型、例えば、複合体に対して抗体を産生するB細胞応答及び/又は遅延型過敏症(DTH)反応を誘発することができることも企図される。後者の免疫応答型は、本発明のペプチドの注射部位における発赤及び明確な硬化(palpable induration)と定義される。

20

【0252】

本発明の目的は、骨髄増殖性障害、特に、悪性骨髄増殖性障害の予防、リスクの低減又は治療のために、配列番号10のCALRのエクソン9変異体若しくは配列番号6の変異体JAK2V617F、又は配列番号10に対して少なくとも70%の同一性を有するエクソン9変異体CALRの機能的相同体、又は配列番号6に対して少なくとも70%の同一性を有するJAK2V617Fの機能的相同体、又は前記エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又は前記のその機能的相同体の連続配列を含む免疫原として活性のペプチド断片、又は前記エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又は前記ペプチド断片をコードする核酸、及びアジュバント、を含むワクチン組成物を提供することである。

【0253】

#### がん組合せ治療

一部の場合、本発明の治療方法をさらなるがん治療、例えば、化学療法、放射線治療、免疫刺激物質による治療、遺伝子治療、抗体による治療及び樹状細胞を使用する治療と組み合わせることが適切であろう。

30

【0254】

本発明によって開示されるCALR又はJAK2ベースの免疫療法と細胞傷害性化学療法及び又は別の抗がん免疫療法との組合せは、がんを治療するための有効なアプローチである。これらの療法を、本明細書では、「第2の有効成分」ともいう。

【0255】

本発明のワクチン組成物との共投与(連続的又は同時)に関して関連する抗腫瘍剤又は化学療法剤の例として、以下が挙げられるがこれらに限定されない:オールトランスレチノイン酸、アクチミド、アナグレリド、アザシチジン、ブスルファン、アザチオプリン、ブレオマイシン、カルボプラチン、カペシタビン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキシルビシン、エピルビシン、エトポシド、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イリノテカン、レナリドマイド、ロイコボリン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペグ化インターフェロン-アルファ、ペメトレキサド、レプリミド、ルキソリチニブ、テモゾロミド、テニポシド、チオグアニン、バルルビシン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン及びポリノスタット及びピノレルピン。一実施形態では、本発明の薬剤の組合せで使用するための化学療法剤自体が、異なる

40

50

化学療法剤の組合せであり得る。適切な組合せとしては、FOLFOX及びIFLが挙げられる。FOLFOXは、5-フルオロウラシル(5-FU)、ロイコボリン、及びオキサリプラチンを含む組合せである。IFL治療には、イリノテカン、5-FU、及びロイコボリンが含まれる。

【0256】

別の第2の有効成分は、腫瘍の治療で個別、同時又は併用使用するためのキナーゼ阻害剤であり得る。これに関して、チロシンキナーゼ阻害剤であるルキソリチニブは選択肢であってもよい。適切なキナーゼ阻害剤には、抗腫瘍活性を保有することが示されている阻害剤、例えば、ゲフィチニブ(Iressa)及びエルロチニブ(Tarceva)が含まれ、これらをペプチドと組み合わせて使用することができる。腎細胞癌の治療に有効であることが示されている受容体チロシンキナーゼ阻害剤、例えば、リンゴ酸スニチニブ及びソラフェニブもまた、第2の有効成分として使用されるのに適切である。

10

【0257】

第2の有効成分のさらなる例は、免疫刺激物質、例えば、サイトカイン及び抗体である。サイトカインなどは、GM-CSF、I型IFN、インターロイキン21、インターロイキン2、インターロイキン12及びインターロイキン15からなる群から選択することができるがこれらに制限されない。抗体は、好ましくは、免疫刺激抗体、例えば、抗CD40、抗PD-1抗体又は抗CTLA-4抗体である。免疫刺激物質はまた、免疫阻害細胞(例えば、調節性T細胞)又は因子を枯渇させることが可能な物質であり得、前記物質は、例えば、E3ユビキチンリガーゼであり得る。E3ユビキチンリガーゼ(HECT、RING及びU-ボックスタンパク質)は、免疫細胞機能の重要な分子調節物質として出現し、それぞれ、タンパク質分解性の破壊のための特異的阻害分子の標的化によって感染中の免疫応答の調節に関与し得る。いくつかのHECT及びRING E3タンパク質はまた、現在、免疫自己寛容の誘導及び維持に関連づけられる:c-Cbl、Cbl-b、GRAIL、Itch及びNedd4は、それぞれ、T細胞増殖因子の産生及び増殖を下方調節する。

20

【0258】

一実施形態では、CALR由来のポリペプチド又はJAK2由来のポリペプチドを含む本発明のワクチン組成物であって、ポリペプチドがCALRのエクソン9変異体又はJAK2V617Fに由来するワクチン組成物を、第2の有効成分、例えば、免疫刺激物質と組み合わせて投与する。免疫刺激物質は、好ましくは、インターロイキン、例えば、ペグ化インターフェロン-アルファ、IL-21若しくはIL-2、又は化学療法剤である。一部の実施形態では、標的細胞は、ワクチン組成物を投与する前にIFN- $\gamma$ で処置される。一部の実施形態では、IFN- $\gamma$ は、ワクチン組成物を投与する前に、処置される対象に投与される。

30

【0259】

本発明のワクチン組成物は、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fに由来するポリペプチドに加えて、1つ以上のさらなる抗原を含んでもよい。前記抗原は、例えば、がん関連タンパク質に由来する免疫原として活性のペプチドであってもよい。

【0260】

したがって、本発明のワクチン組成物は、エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fに由来するポリペプチド及び/又はその免疫原として活性のペプチド断片に加えて、

- 1) インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)
- 2) IDOの免疫原として活性のペプチド断片
- 3) 1)又は2)の機能的相同体
- 4) 1)、2)又は3)を含むポリペプチド
- 5) 1)、2)、3)又は4)のいずれかをコードする核酸

40

のうちの1つ以上を含んでもよい。

【0261】

前記IDOは、特に、WO2009/143843の配列番号1のIDO、WO2009/143843の配列番号13のIDO、WO2009/143843の配列番号14のIDO、WO2009/143843の配列番号15のIDO、又はWO2009/143843の配列番号1のIDOであってもよい。本発明のワクチン組成物に含有され得る、IDOの有用な免疫原として活性のペプチド断片は、WO2009/143843に記載されている。

50

## 【0262】

本発明のワクチン組成物は、エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fに由来するポリペプチド及び/又はその免疫原として活性のペプチド断片に加えて、

- 1)PD-L1
- 2)PD-L1の免疫原として活性のペプチド断片
- 3)1)又は2)の機能的相同体
- 4)1)、2)又は3)を含むポリペプチド
- 5)1)、2)、3)又は4)のいずれかをコードする核酸

のうちの1つ以上を含んでもよい。

## 【0263】

前記PD-L1は、特に、WO2013/056716の配列番号1のPD-L1であってもよい。本発明のワクチン組成物に含有され得る、PD-L1の有用な免疫原として活性のペプチド断片は、WO2013/056716に記載されている。

## 【0264】

本発明のワクチン組成物は、エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fに由来するポリペプチド及び/又はその免疫原として活性のペプチド断片に加えて、

- 1)トリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼ(TDO)
- 2)TDOの免疫原として活性のペプチド断片
- 3)1)又は2)の機能的相同体
- 4)1)、2)又は3)を含むポリペプチド
- 5)1)、2)、3)又は4)のいずれかをコードする核酸

のうちの1つ以上を含んでもよい。

## 【0265】

前記TDOは、特に、本発明者らによって出願された係属中の出願「Vaccine compositions comprising Tryptophan 2,3-dioxygenase or fragments thereof」の配列番号1のTDOであってもよい。本発明のワクチン組成物に含有され得る、TDOの有用な免疫原として活性のペプチド断片は、前記係属中の出願に記載されている。

## 【0266】

医薬組成物

本発明は、個体において、変異体CALR、特に、エクソン9変異体CALR、又は変異体JAK2、特に、JAK2V617Fの発現に関連する臨床障害を治療し、リスクを低減し、及び/又は予防することが可能な医薬組成物に関する。前記医薬組成物は、特に、ワクチン組成物であり得る。本発明のワクチン組成物は、抗原、例えば、タンパク質、ポリペプチド及び/又は核酸分子を含む「伝統的な」ワクチン組成物であり得る。これらはまた、細胞、例えば、個体を起源とし、後にプロセッシングされた改変細胞を含む組成物の形態、又は複合体分子、例えば、抗体又はTCRを含む組成物の形態であり得る。具体的な実施形態では、本発明のワクチンは、本明細書で開示されるペプチドを含む組成物又は細胞の形態である。

## 【0267】

一般的に、ワクチンは、個体において免疫応答を誘導することが可能な物質又は組成物である。組成物は、「活性成分」、例えば、抗原(例えば、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、核酸など)、他のエレメントのうち1つ以上の抗原を含む核酸構築物、細胞、(例えば、養子移入のための負荷APC、T細胞)、複合体分子(抗体、TCR及びMHC複合体など)、担体、アジュバント及び薬学的担体のうちの1つ以上を含んでもよい。以下に、本発明によるワクチン組成物の種々の成分をより詳細に開示する。

## 【0268】

本発明のワクチン組成物は、骨髄増殖性障害又はMPNを患う個体に投与した場合(エクソン9変異体CALR及び/又は変異体JAK2V617Fの発現を引き起こす)に、配列番号10のエクソン9変異体CALR若しくは配列番号10に対して少なくとも70%の同一性を有するその機能的相同体を発現するか、又は配列番号6のJAK2V617F若しくは配列番号6に対して少なくとも70%の同一性を有するその機能的相同体を発現する腫瘍性若しくはがん細胞、DC又はAPCに対す

10

20

30

40

50

る免疫応答を誘発することが可能である。好ましい実施形態では、臨床状態は、急性骨髄性白血病又は慢性骨髄性白血病である。本発明のワクチン組成物は、ワクチン接種された個体において、エクソン9変異体CALR及び/又は変異体JAK2V617Fを発現する腫瘍性若しくはがん細胞、APC及びDCに対する細胞傷害効果を有するエフェクターT細胞の産生を誘発することが可能である。一部の実施形態では、ワクチンは、本明細書に記載されているペプチドのいずれかを特異的に認識するエフェクターT細胞の産生を誘発する。ワクチン組成物は、ワクチン接種された個体において、本開示のペプチドに特異的な腫瘍浸潤リンパ球の産生を誘発することも可能である。

【0269】

#### 抗原及び他の活性成分

##### タンパク質/ポリペプチドベースのワクチン組成物

本発明のペプチドは、ここでペプチドが提示される場合に抗原として使用できる状態にある。好ましくは、本発明のワクチン組成物は、

1)本明細書の「カルレティキュリン(CALR)」のセクションに記載されているCALRのうちのいずれかであり得る、エクソン9変異体カルレティキュリンCALR、又は「ヤヌスキナーゼ2(JAK2)」のセクションで詳述したJAK2変異体、特に、JAK2V617F、

2)本明細書の「エクソン9変異体CALR及びJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片」のセクションに記載されているペプチドのうちのいずれかであり得る、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fのアミノ酸の連続配列を含むエクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片、

3)MHCクラスI拘束性ペプチド断片又はMHCクラスII拘束性ペプチド断片、例えば、「MHC」のセクションに記載されているMHCクラスI拘束性ペプチド断片又はMHCクラスII拘束性ペプチド断片のうちのいずれかである、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片、

4)1)、2)及び3)によるポリペプチドの機能的相同体、

5)本明細書の「エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又はその断片を含むポリペプチド」のセクションに記載されているポリペプチドのいずれかであり得る、1)、2)、3)及び4)によるポリペプチドのいずれかを含むポリペプチド、

6)1)、2)、3)及び4)によるポリペプチドのいずれかをコードする核酸のうちの1つ以上を含む。

【0270】

本発明のワクチン組成物中の抗原の選択は、当業者によって決定可能なパラメーターに依存することになる。言及されているように、本発明の異なるペプチドのそれぞれは、特定のHLA分子によって細胞表面上に提示される。そのようなものとして、治療する対象をHLA表現型に関して分類する場合、特定のHLA分子に結合することが公知のペプチド(複数可)が選択される。あるいは、目的の抗原は、所与の集団内の種々のHLA表現型の出現率に基づいて選択される。例として、HLA-A2は、白色人種で最も一般的な表現型であり、したがって、HLA-A2に結合するペプチドを含有する組成物は、白色人種の大部分で活性となる。さらに、本発明の抗原/ペプチドを、特定のHLA分子への結合を促進するために、表2に提示されるアンカー残基モチーフに従って修飾してもよい。

【0271】

本発明の組成物は、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片、例えば、「エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片」、「エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又はその断片を含むポリペプチド」及び「MHC」のセクションに記載されているペプチドのいずれかの2つ以上の組合せを含有してもよい。CALR又はJAK2の前記免疫原として活性のペプチド断片は、標的集団のより高い比率を対象とするために、異なるHLA分子とそれぞれ特異的に相互作用することができる。したがって、例として、医薬組成物は、HLA-A分子によって拘束されるペプチドとHLA-B分子によって拘束されるペプチドとの組合せ(例えば、標的集団内のHLA表現型の出現率に対応するHLA-A分子及びHLA-B分子、例えば、HLA-A2及びHLA-B35などを含む)を含有することが

10

20

30

40

50

できる。さらに、組成物は、HLA-C分子によって拘束されるペプチドを含むことができる。

#### 【0272】

ペプチドベースのワクチンの場合、エピトープを、宿主抗原提示細胞による抗原取り込み及びプロセッシングと無関係な外因性負荷によって提示することができる「MHC準備」形態で投与することができる。本発明のペプチドは、短い「MHC準備」形態及びプロテアソームによるプロセッシングを必要とするより長い形態の両方のペプチドを含み、従って、複数の腫瘍抗原を標的とすることができるより複雑なワクチン組成物が得られる。より多数の異なるHLA群がワクチンによって標的とされるほど、ワクチンが多様な集団で機能する可能性がより高くなる。

10

#### 【0273】

##### マルチエピトープワクチン組成物

本発明は、高免疫原性マルチエピトープワクチンにも関する。好ましくは、そのようなワクチンを、他の適切なペプチドと、若しくは互いに、及び/又は以下に記載されているアジュバントと任意選択で組み合わせた、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの最適な免疫原として活性のペプチド断片の同時送達が容易になるように設計すべきである。本発明は、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fに属さないか又はこれらに由来するさらなるタンパク質又はペプチド断片及び/又は以下に記載されているアジュバントと任意選択で組み合わせたエクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片を含む、そのようなマルチエピトープワクチンを包含する。より複雑な組成を有するワクチンの開発を駆動する重要な要因は、例えば、注意深く選択したCTL及びT<sub>H</sub>細胞エピトープの集まりを含むか又はコードするワクチンを設計することによって、複数の腫瘍抗原を標的とするという要望である。したがって、本発明は、一態様では、クラスI及びクラスII拘束性エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fエピトープの両方を含むワクチン組成物に関する。

20

#### 【0274】

したがって、本発明のペプチドは、短い「MHC準備」形態(クラスI拘束性)、及びプロテアソームによるプロセッシングを必要とするより長い形態(クラスII拘束性)の双方のペプチドを含む。したがって、本発明の組成物を、本明細書中で定義されているクラスI拘束性エピトープ及び/又はクラスII拘束性エピトープを含むマルチエピトープワクチンとして提供することができる。

30

#### 【0275】

##### 核酸ベースのワクチン組成物

本発明によるワクチン組成物は、CALR若しくはJAK2ポリペプチド又はその免疫原として活性のペプチド断片をコードする核酸を含むことができる。したがって、前記核酸は、上述のタンパク質及びペプチド断片のいずれかをコードすることができる。核酸は、例えば、DNA、RNA、LNA、HNA、PNAであり得、好ましくは、核酸はDNA又はRNAである。

#### 【0276】

本発明の核酸は、任意の適切なベクター、例えば、発現ベクター内に含まれる場合がある。多数のベクターが利用可能であり、当業者は、特定の目的に有用なベクターを選択することができる。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子又は人工染色体の形態であり得る。適当な核酸配列を、様々な手順によってベクター中に挿入することができる。例えば、DNAを、当技術分野で周知の技術を使用して、適当な制限エンドヌクレアーゼ部位に挿入することができる。本発明による核酸配列とは別に、ベクターは、シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列の1つ以上をさらに含んでもよい。ベクターはまた、さらなる配列、例えば、エンハンサー、ポリAテール、リンカー、ポリリンカー、操作リンカー、多重クロニング部位(MCS)、終止コドン、内部リボソーム侵入部位(IRES)及び組込みのための宿主相同配列又は他の定義されたエレメントを含んでもよい。核酸構築物を工学的に操作する方法は当技術分野で周知である(例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Sambrookら編、Cold Spring Harbor Laboratory、第2版、Cold Spring Harbor、N.

40

50

Y.、1989年を参照のこと)。ベクターは、好ましくは、適切な細胞中でその発現を指令する調節核酸配列に作動可能に連結された核酸を含む発現ベクターである。本発明の範囲内で、前記調節核酸配列は、一般的に、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞、より好ましくは抗原提示細胞中で発現を指令することができるものであるべきである。

【0277】

好ましい一実施形態では、ベクターはウイルスベクターである。ベクターは、細菌ベクター、例えば、弱毒化細菌ベクターでもあり得る。弱毒化細菌ベクターを使用して、感染及び持続部位での持続的な粘膜免疫応答を誘導することができる。様々な組換え細菌をベクターとして使用することができ、例えば、細菌ベクターを、サルモネラ菌、乳酸球菌、及びリステリアからなる群から選択することができる。一般的に、マウスにおいて、強力なCTL誘導及び腫瘍退縮をもたらす異種抗原HPV16 L1又はE7に対する免疫の誘導が示され得る。ベクターは、T細胞刺激性ポリペプチドをコードする核酸をさらに含んでもよい。

10

【0278】

#### 負荷APC

有用な実施形態では、がん疾患に対して導かれる免疫原性応答は、個体由来の抗原提示細胞(APC)上のMHCクラスI又はクラスII分子にロードすること、個体からPBLを単離し、細胞をペプチドとインキュベートした後に注射によって個体に細胞を戻すこと、又は個体から前駆体APCを単離し、サイトカイン及び抗原を使用して細胞をプロフェッショナルAPCに分化させた後に注射によって個体に細胞を戻すことのいずれかによって、本発明のペプチドを投与することによって誘発される。

20

【0279】

したがって、本発明の一態様は、CALR若しくはJAK2又はその免疫原として活性のペプチド断片又は前記タンパク質若しくは前記免疫原として活性のペプチド断片をコードする核酸を含む抗原提示細胞を含むワクチン組成物を提供することである。抗原提示細胞は、T細胞に抗原を提示することが可能である任意の細胞であり得る。好ましい抗原提示細胞は、樹状細胞である。樹状細胞(DC)は、任意の適切なプロトコール、例えば、本明細書で以下に記載されているプロトコールに従った治療手順で調製され、使用することができる。当業者は、プロトコールは異なるHLA型及び異なる疾患を有する個体で使用するために適合され得ることを認識するであろう。

【0280】

樹状細胞(DC)は、50 µg/mlのHLA拘束性ペプチド(GMP品質で合成された)で37 °Cで1時間パルス刺激されてもよく、ペプチド及び $5 \times 10^6$ 個の細胞を1日目及び14日目、次に、4週間毎に皮下投与し、5回のワクチン接種後にさらに白血球搬出を行う。臨床での使用及び品質管理のためのDCの生成は、本質的にNicoletteら(2007年)に記載されているように実施することができる。

30

【0281】

したがって、本発明の一実施形態では、CALR又はJAK2の発現によって特徴付けられる臨床状態(好ましくは、臨床状態は骨髄増殖性であり、例えば、骨髄増殖性がんである)を患う個体を治療するための方法は、*ex vivo*で個体の抗原提示細胞(APC)にペプチドを提示し、その後、処置されたAPCを注射によって個体に戻すことによってペプチドを投与する方法である。これを実施するための少なくとも2つの代替方法が存在する。一方の代替方法は、個体からAPCを単離し、MHCクラスI分子をペプチドとインキュベート(負荷)することである。MHCクラスI分子の負荷は、ペプチドに特異的なMHCクラスI分子を有するAPCがペプチドと結合し、それにより、ペプチドをT細胞に提示することができるようにAPCをペプチドとインキュベートすることを意味する。次に、APCを個体に再注入する。別の代替方法は、樹状細胞の生物学分野でなされた最近の発見に依存する。この場合、単球(樹状細胞前駆体である)を個体から単離し、サイトカイン及び抗原の使用によって*in vitro*でプロフェッショナルAPC(又は樹状細胞)に分化させる。次に、*in vitro*で生成されたDCをペプチドでパルス刺激し、個体に注入する。

40

【0282】

50

### 養子免疫療法/養子移入

本発明の重要な一態様は、*in vitro*で、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fに特異的なT細胞を培養すること及び個体へのこれらの養子移入に関する。養子移入は、既に特異的免疫応答を生じることが可能な実際の免疫系成分を医師が個体に直接移入することを意味する。実施例で示されるように、特異的免疫応答は、健常対象において、エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又はそのペプチド断片に対して惹起され得る。

#### 【0283】

本発明の1つの目的は、例えば、養子移入に有用であり得るエクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fに特異的なT細胞を提供することである。エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fペプチド/MHCクラスI複合体又はエクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fペプチド/MHCクラスII複合体に特異的に結合することが可能なT細胞受容体を含む単離T細胞は個体に養子移入することができ、前記T細胞は、好ましくは、*in vitro*で拡大増殖したT細胞であり、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fペプチドは、本明細書で上述されたエクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fの任意の免疫原として活性のペプチド断片であり得る。*in vitro*でのT細胞の拡大増殖方法は当業者に周知である。本発明は、MHC拘束性エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fペプチド複合体に特異的に結合することが可能なT細胞受容体を含むT細胞を個体、例えば、がん疾患を患うヒトに投与するステップを含み、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fに由来するペプチドが、本明細書で上述された任意のペプチドであり得る、治療方法にも関する。本発明は、さらに、がん又は感染治療用の医薬の調製のための本明細書に記載されているエクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又はそのペプチド断片のいずれかに特異的に結合することが可能なT細胞受容体を含むT細胞の使用に関する。自己T細胞移入は、本質的にWalterら(1995年)に記載されているように実施することができる。一部の実施形態では、T細胞は、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fを特異的に認識する細胞傷害性T細胞である。

#### 【0284】

### TCR移入

さらに別の実施形態では、そのようなT細胞を養子移入前に照射して、個体中の増殖を制御することができる。TCR遺伝子移入によってT細胞の特異性を遺伝子的に操作することが可能である(Engelsら、2007年)。これにより、エクソン9変異体CALRペプチド特異性又はJAK2V617Fペプチド特異性を保有するT細胞の個体への移入が可能となる。一般的に、腫瘍又はウイルスの存在しない環境下でのT細胞の拡大増殖、及び注入前のT細胞機能の分析が可能であるため、養子免疫療法のためのT細胞の使用は魅力的である。養子移入におけるTCR遺伝子改変T細胞(異種TCRの発現を指令する発現構築物で形質転換されたT細胞など)の適用は、T細胞株の移入と比較して以下のいくつかの利点を有する:(i)再度導かれるT細胞の生成が一般に利用可能であること。(ii)高親和性又は超高親和性TCRを選択又は作成し、T細胞を工学的に操作するために使用することができること。(iii)コドン最適化又はマウス化TCRを使用して高アピディティT細胞を生成し、安定化TCRのより良好な表面発現が可能となること。T細胞受容体(TCR)遺伝子移入によるT細胞特異性の遺伝子操作は、本質的にMorganら(2006年)に記載されているように実施することができる。

#### 【0285】

### TCRトランスフェクション

既知の抗腫瘍反応性を有するTCRを、初代ヒトTリンパ球に遺伝的に導入することができる。腫瘍特異的CTLクローン由来のTCRアルファ及びベータ鎖をコードする遺伝子を初代T細胞にトランスフェクトし、この方法で腫瘍抗原に対する特異性を有するT細胞を再プログラミングすることができる。TCRのRNAを電気穿孔法によりPBLにトランスフェクトする(Schaftら、2006年)。あるいは、レトロウイルスベクターを使用するTCR遺伝子移入によって新規の特異性を有するT細胞を提供することができる(Morganら、2006年)。しかし、レトロウイルスベクター由来のプロウイルスがトランスフェクトされた細胞のゲノム中に無作為に組み込まれ、その後の細胞増殖を妨害する可能性がある。RNAはトランスフェクトされた細胞中に一過性にしか存在せず、ゲノム中に組み込まれることができないので、TC

10

20

30

40

50

RコードRNAを用いたT細胞の電気穿孔法によってこの不利益が克服される(Schaftら、2006年)。さらに、細胞のトランスフェクションは、実験室で日常的に使用されている。

【0286】

アジュバント及び担体

本発明によるワクチン組成物は、好ましくは、アジュバント及び/又は担体を含む。有用なアジュバント及び担体の例は以下に示される。したがって、エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fポリペプチド、エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片又はその機能的相同体、これらを含むポリペプチド又はこれらをコードする核酸は、本発明の組成物中で、アジュバント及び/又は担体と関連させることができる。

10

【0287】

アジュバントは、ワクチン組成物への混合によってエクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F、又はエクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片に対する免疫応答を増大させるか、又はそうでなければ改変させる任意の物質であり、以下をさらに参照のこと。担体は、エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又はそのペプチド断片が関連することができ、特に本発明のペプチドの提示を補助する足場構造、例えば、ポリペプチド又は多糖である。

【0288】

本発明のペプチドの多くは、比較的小さな分子であり、したがって、本明細書に記載されている組成物中で、ペプチドをアジュバント及び/又は担体などの種々の材料と組み合わせることでワクチン、免疫原性組成物などを生成することが必要とされる場合がある。広義のアジュバントは、免疫応答を促進する物質である。アジュバントについての一般的議論は、Godingの*Monoclonal Antibodies: Principles & Practice*(第2版、1986年)の61~63頁に提供されている。Godingは、目的の抗原が低分子量のものであるか、又は免疫原性が乏しい場合、免疫原性担体へのカップリングが推奨されると記述している。そのような担体分子の例として、キーホールリンペットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、オボアルブミン及びニワトリ免疫グロブリンが挙げられる。種々のサポニン抽出物もまた、免疫原性組成物中のアジュバントとして有用であることが示唆されている。周知のサイトカインである顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をアジュバントとして使用することが提案されている(WO97/28816)。

20

30

【0289】

担体は、アジュバントと無関係に存在してもよい。担体の機能は、例えば、その活性若しくは免疫原性を増加させるためか、安定性を付与するためか、生物学的活性を増加させるためか、又は血清半減期を増加させるために、特にペプチド断片の分子量を増加させることであり得る。さらに、担体は、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fタンパク質、ポリペプチド、その機能的相同体又はペプチド断片のT細胞への提示を補助する場合がある。担体は、当業者に公知の任意の適切な担体、例えば、タンパク質又は抗原提示細胞であってもよい。担体タンパク質は、これらに限定されないが、キーホールリンペットヘモシアニン、血清タンパク質、例えば、トランスフェリン、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、サイログロブリン若しくはオボアルブミン、免疫グロブリン、又はホルモン、例えば、インスリン若しくはパルミチン酸であり得る。ヒトの免疫化のために、担体は、ヒトに許容可能且つ安全な生理学的に許容される担体でなければならない。しかし、破傷風トキソイド及び/又はジフテリアトキソイドは、本発明の一実施形態における適切な担体である。あるいは、担体は、デキストラン、例えば、セファロースであってもよい。

40

【0290】

したがって、本発明の一態様は、組成物中に存在するエクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fタンパク質、ポリペプチド断片、これらに由来するバリエーション又はペプチドが担体、例えば、上記タンパク質など又は抗原提示細胞、例えば、樹状細胞(DC)などに関連することである。

【0291】

50

アジュバントは、例えば、 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 、 $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$ 、 $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)$ 、シリカ、ミョウバン、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、カオリン、炭素、水酸化アルミニウム、ムラミルジペプチド、N-アセチル-ムラミル-L-トレオニル-D-イソグルタミン(thr-DMP)、N-アセチル-ノルヌラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(CGP 11687、nor-MDPとも呼ばれる)、N-アセチルムラミウル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'2'-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(CGP 19835A、MTP-PEとも呼ばれる)、2%スクアレン/Tween-80(登録商標)乳濁液中のRIBI(MPL+TDM+CWS)、リポ多糖及びその種々の誘導体(脂質Aを含む)、フロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント、Merck Adjuvant 65、ポリヌクレオチド(例えば、ポリIC及びポリAU酸)、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)由来のワックスD、コリネバクテリウム・バルバム(*Corynebacterium parvum*)、百日咳菌(*Bordetella pertussis*)、及びブルセラ(*Brucella*)属のメンバーにおいて見出された物質、Titermax、ISCOMS、Quil A、ALUN(US58,767及びUS5,554,372を参照のこと)、脂質A誘導体、コレラ毒素誘導体、HSP誘導体、LPS誘導体、合成ペプチドマトリックス又はGMDP、インターロイキン1、インターロイキン2、モンタニドISA-51及びQS-21からなる群から選択することができる。本発明と共に使用すべき好ましいアジュバントとして、油/界面活性剤ベースのアジュバント、例えば、モンタニドアジュバント(Seppic、Belgiumから入手可能)、好ましくはモンタニドISA-51が挙げられる。他の好ましいアジュバントは、細菌DNAベースのアジュバント、例えば、CpGオリゴヌクレオチド配列を含むアジュバントである。さらなる他の好ましいアジュバントは、ウイルスのdsRNAベースのアジュバント、例えば、ポリI:Cである。イミダゾキニリンは、好ましいアジュバントのさらに別の例である。最も好ましいアジュバントは、ヒトへの使用に適切なアジュバントである。

10

20

30

40

#### 【0292】

モンタニドアジュバント(Seppic、Belgiumから入手可能)は、モンタニドISA-51、モンタニドISA-50、モンタニドISA-70、モンタニドISA-206、モンタニドISA-25、モンタニドISA-720、モンタニドISA-708、モンタニドISA-763A、モンタニドISA-207、モンタニドISA-264、モンタニドISA-27、モンタニドISA-35、モンタニドISA 51F、モンタニドISA 016D及びモンタニドIMSからなる群から、好ましくは、モンタニドISA-51、モンタニドIMS及びモンタニドISA-720からなる群から、より好ましくはモンタニドISA-51からなる群から選択することができる。モンタニドISA-51(Seppic, Inc.)は、様々な界面活性剤を非代謝性鉱物油、代謝性油、又はこれら2つの混合物と組み合わせた油/界面活性剤ベースのアジュバントである。これらを、CALR若しくはJAK2又はそのペプチド断片を含む水溶液との乳濁液として使用するために調製する。界面活性剤は、オレイン酸マンニドである。QS-21(Antigenics; Aquila Biopharmaceuticals、Framingham、MA)は、水溶液として取り扱われる高度に精製された水溶性サポニンである。QS-21及びモンタニドISA-51アジュバントを、無菌の使い捨てバイアル中に提供することができる。

#### 【0293】

周知のサイトカインGM-CSFは、本発明の別の好ましいアジュバントである。GM-CSFは、ここ10年間にわたってアジュバントとして使用されており、好ましくは、WO97/28816に記載されているGM-CSFであり得る。

#### 【0294】

本発明に従って使用することが可能なアジュバントの望ましい機能を、以下の表に列挙する。

#### 【0295】

## 【表 3】

表 3: アジュバントの作用方式

| 作用            | アジュバント型  | 利点  |    |
|---------------|--|---|----|
| 1. 免疫モジュレーション | サイトカインネットワークを改変する一般的に小さな分子又はタンパク質  | 免疫応答の上方調節。Th1 又は Th2 の選択  |    |
| 2. 提示         | その天然の立体構造中で免疫原と相互作用する一般的に両親媒性の分子又は複合体  | 中和抗体応答の増加。より高い応答の持続   | 10 |
| 3. CTL 誘導     | <ul style="list-style-type: none"> <li>免疫原に結合するか又は免疫原を封入することができ、且つ細胞膜と融合するか又は細胞膜を破壊することができる粒子</li> <li>細胞表面 MHC-1 へのペプチドの直接付着のための w/o 乳濁液</li> </ul> | <p>正確なクラス I 拘束性ペプチドが得られるタンパク質のサイトゾルプロセッシング</p> <p>無作為ペプチドが公知の場合の簡便なプロセス</p> | 20 |
| 4. 標的化        | <ul style="list-style-type: none"> <li>免疫原に結合する粒子性アジュバント。クッパー細胞を飽和させるアジュバント</li> <li>マクロファージ及び DC 上のレクチン受容体を標的とする炭水化物アジュバント</li> </ul>               | <p>アジュバント及び免疫原の効率的な使用</p> <p>上記。選択的に標的化する場合に応答型も決定できる</p>                   | 30 |
| 5. デポー生成      | <ul style="list-style-type: none"> <li>短期間用 w/o 乳濁液</li> <li>長期間用ミクロスフィア又はナノスフィア</li> </ul>  | <p>効率</p> <p>単回投与ワクチンが可能</p>  |    |

出典:Cox, J.C.及び Coulter, A.R.(1997 年) Vaccine 15、248~56 頁。

40

## 【 0 2 9 6 】

本発明によるワクチン組成物は、1つを超えるアジュバントを含んでもよい。さらに、本発明は、任意の上記又はその組合せを含む任意のアジュバント物質及び/又は担体をさらに含む治療組成物を包含する。CALR又はJAK2タンパク質、そのバリエーション又はペプチド断片、及びアジュバントを任意の適切な順序で個別に投与することができることも企図される。好ましくは、本発明のワクチン組成物は、モンタニドアジュバント、例えば、モンタニド ISA 51若しくはモンタニド ISA 720又はGM-CSFアジュバントを含む。

## 【 0 2 9 7 】

したがって、本発明は、任意の上記又はその組合せを含むアジュバント物質をさらに含

50

む治療組成物を包含する。抗原、すなわち、本発明のペプチド及びアジュバントを同時又は任意の適当な順序で個別に投与することができることも企図される。

【0298】

投与量及び投与

ワクチン組成物中の本発明のエクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又はエクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片の量は、特定の適用に応じて変化し得る。しかし、ペプチド組成物の単回用量は、好ましくは、約10 $\mu$ g～約5000 $\mu$ g、より好ましくは約50 $\mu$ g～約2500 $\mu$ g、例えば、約100 $\mu$ g～約1000 $\mu$ gの範囲である。特に、治療する個体がヒトである本発明の実施形態では、単回用量は、50 $\mu$ g～500 $\mu$ gの範囲、例えば、80 $\mu$ g～300 $\mu$ gの範囲、例えば、100 $\mu$ g～250 $\mu$ gの範囲のエクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又はエクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fの前記免疫原として活性のペプチド断片であり得る。高い頻度で、ワクチン組成物は、経時的に繰り返し投与される。例えば、ワクチン組成物は、少なくとも2回、好ましくは少なくとも5回、より好ましくは少なくとも10回、例えば、10～20回の範囲で投与されてもよい。ワクチン組成物は、連続して投与されてもよい。投与は、任意の有用な頻度で繰り返されてよい。したがって、例えば、ワクチン組成物は、毎週1回、例えば、2週間に1回、例えば、3週間に1回、例えば、1カ月に1回、例えば、2カ月に1回、例えば、3カ月に1回、例えば、半年に1回、例えば、1年に1回投与されてもよい。特に、ワクチン組成物は、連続して投与されてもよい。投与頻度は、前記時間の中で変更してもよい。一実施形態では、ワクチン組成物は、1～3カ月に1回連続して投与される。投与様式として、皮内投与、皮下投与及び静脈内投与、持続放出処方物（time release formulation）の形態での埋め込みなどが挙げられる。当業者に公知の任意及び全ての投与形態が本明細書に包含される。注射用の免疫原として活性のペプチド組成物の製剤化に相当であることが当技術分野で公知の任意及び全ての従来剤形、例えば、必要に応じて従来薬学的に許容される担体、希釈剤、防腐剤、アジュバント、緩衝液成分などを含有する凍結乾燥形態及び溶液、懸濁液又は乳濁液形態も包含される。

10

20

【0299】

医薬組成物は、当業者に公知の任意の従来プロトコルを使用して調製及び投与することができる。実施例3～5では、本発明によるワクチン組成物の非限定的な調製例が、ワクチンなどの非限定的な投与例と共に示される。当業者は、プロトコルを本明細書に記載されている任意のワクチン組成物に容易に適合させることができることを認識するであろう。本発明のさらなる実施形態では、本発明の医薬組成物は、CALR又はJAK2の発現によって特徴付けられる臨床状態、例えば、骨髄増殖性障害、例えば、がんを患う個体を治療するのに有用である。

30

【0300】

本発明の組成物の免疫防御効果は、当業者に公知のいくつかのアプローチを使用して決定することができる。首尾良い免疫応答も、免疫化後のDTH反応の発生及び/又はワクチン組成物のペプチドを特異的に認識する抗体の検出によって決定することができる。

【0301】

本発明によるワクチン組成物を、治療有効量で個体に投与してもよい。有効量は、様々な要因、例えば、個体の状態、体重、性別及び年齢によって変化し得る。他の要因には、投与様式が含まれる。

40

【0302】

医薬組成物を、様々な経路、例えば、皮下、局所、経口及び筋肉内によって個体に提供することができる。医薬組成物の投与は、経口又は非経口で達成される。非経口送達方法として、局所投与、動脈内（組織に直接）投与、筋肉内投与、皮下投与、髄内投与、髄腔内投与、脳室内投与、静脈内投与、腹腔内投与、又は鼻腔内投与が挙げられる。本発明は、ワクチン組成物を用いる予防及び治療方法で使用するのに適切な局所、経口、全身及び非経口用の薬学的処方物を提供することも目的とする。

【0303】

50

例えば、ワクチン組成物を、錠剤、カプセル剤(それぞれ、持続放出処方物及び徐放処方物を含む)、丸剤、散剤、顆粒剤、エリキシル、チンキ、溶液剤、懸濁剤、シロップ及び乳濁液剤などの経口剤形で、又は注射によって投与することができる。同様に、ワクチン組成物を、静脈内形態(ポラス及び注入の両方)、腹腔内形態、皮下形態、局所形態(閉塞あり又はなし)、又は筋肉内形態(全ての使用形態は、薬学分野の当業者に周知)で投与してもよい。本明細書に記載されている任意の化合物を含む有効であるが非毒性量のワクチンを、予防剤又は治療剤として用いることができる。注射用の免疫原として活性のペプチド組成物の処方に適当であることが当技術分野で公知の任意及び全ての従来の剤形、例えば、必要に応じて従来の薬学的に許容される担体、希釈剤、防腐剤、アジュバント、緩衝液の成分などを含有する凍結乾燥形態及び溶液、懸濁液又は乳濁液形態も包含される。

10

#### 【0304】

本発明によるワクチン組成物の好ましい投与様式として、これらに限定されないが、全身投与、例えば、静脈内又は皮下投与、皮内投与、筋肉内投与、鼻腔内投与、経口投与、直腸投与、膈投与、肺投与、及び一般的に任意の粘膜投与形態が挙げられる。さらに、本明細書で言及される任意の投与形態のための手段が本発明に含まれることが本発明の範囲内にある。

#### 【0305】

本発明によるワクチンを、1回又は任意の回数、例えば、2回、3回、4回又は5回投与することができる。1回を超えるワクチン投与には、得られた免疫応答を追加免疫する効果がある。前の投与と異なる形態又は身体の部分にワクチンを投与することによって、ワクチンをさらに増強することができる。ブースター注射は、同種又は異種ブースター注射のいずれかである。同種ブースター注射は、第1回目及びその後のワクチン接種が同一構築物、より具体的には、同一送達ビヒクル、特に同一ウイルスベクターを含む場合である。異種ブースター注射は、同一構築物が異なるウイルスベクター内に含まれる場合である。

20

#### 【0306】

##### 第2の有効成分

本発明の態様は、本発明で提供されるワクチン組成物を第2の有効成分と組み合わせて使用することである。ワクチン組成物及び第2の有効成分の投与は、連続的又は組合せであり得る。第2の有効成分の例は、がん及び感染の両方について上記に与えられている。さらなる態様は、ワクチン組成物を治療すべき所与の臨床状態のための関連する他の療法と組み合わせて使用することができることである。そのような療法として、手術、化学療法又は遺伝子治療、免疫刺激物質又は抗体を挙げることができ、当業者は所与のシナリオに適切な併用療法を決定することができる。

30

#### 【0307】

一部の場合、本発明の治療方法をさらなる医学的治療、例えば、化学療法、放射線治療、免疫刺激物質を使用する治療、遺伝子治療、抗体及び/又は抗生物質を使用する治療、並びに樹状細胞を使用する治療と組み合わせることが適切であろう。

#### 【0308】

##### 免疫化のモニタリング

好ましい実施形態では、本発明の医薬組成物はワクチン組成物である。したがって、本発明の目的及び一態様は、本発明のワクチン組成物を投与する個体における免疫化をモニタリングすることである。したがって、医薬組成物は、がん及び/又は感染に対して免疫応答を誘発することが可能な免疫原性組成物又はワクチンであり得る。本明細書中で使用する場合、表現「免疫原性組成物又はワクチン」は、エクソン9変異体CALR又はJAK2V617Fを発現する細胞、例えば、悪性又はがん細胞、APC又はDCに対する少なくとも1つの免疫応答型を誘発する組成物に関する。したがって、そのような免疫応答は、細胞表面上に提示されるHLA/ペプチド複合体を認識し、細胞を溶解することが可能なCTLを生成するCTL応答、すなわち、ワクチンが、ワクチン接種対象中であらうがん細胞に対する細胞傷害効果を有するエフェクターT細胞の産生を誘発すること;抗がん抗体を産生するB細胞応答;及び/又はDTH

40

50

型の免疫応答のうちのいずれかであり得る。本発明の目的は、個体への本発明の組成物の投与後の任意の上記反応のモニタリングによって前記個体の免疫化をモニタリングすることである。

【0309】

一態様では、本発明は、免疫化をモニタリングする方法であって、

i) 個体に由来する血液試料を用意するステップ、

ii) エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又はそのペプチド断片を用意するステップであって、前記タンパク質又はペプチドが、本明細書に記載されているタンパク質又はペプチドのいずれかであり得るステップ、

iii) 前記血液試料が、タンパク質又はペプチドに特異的に結合する、抗体又はT細胞受容体を含むT細胞を含むかどうかを決定するステップ、

iv) これにより、前記タンパク質又はペプチドに対する免疫応答が、前記個体において惹起されたのかどうかを決定するステップ

を含む方法に関する。

【0310】

個体は、好ましくは、ヒト、例えば、エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617F又はエクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fの免疫原として活性のペプチド断片又は前記タンパク質若しくはペプチドをコードする核酸で免疫化されたヒトである。

【0311】

キット

本発明は、

・本明細書に記載されている任意のワクチン組成物、並びに/又は

・エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fタンパク質又はその機能的相同体、並びに/又は

・本明細書に記載されている、エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fの任意の免疫原として活性のペプチド断片、その機能的相同体、及び/又はこれらに由来するペプチド、並びに/又は

・上記の2項のタンパク質をコードする任意の核酸、

並びにキットの使用説明書

を含むキットにも関する。

【0312】

本発明はまた、

・本明細書に記載されている任意のワクチン組成物、並びに/又は

・エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fタンパク質又はその機能的相同体、並びに/又は

・本明細書に記載されている、エクソン9変異体CALR若しくはJAK2V617Fの任意の免疫原として活性のペプチド断片、その機能的相同体、及び/又はこれらに由来するペプチド、並びに/又は

・上記の2項のタンパク質をコードする任意の核酸、

並びに第2の有効成分

を含むキットにも関する。

【0313】

好ましくは、がんを治療する場合に、例えば上記に列挙された化学療法剤の中から第2の有効成分が選択されるように、治療すべき臨床状態に対応して第2の有効成分が選択される。同様に、微生物/ウイルス感染を治療する場合、第2の有効成分は、好ましくは抗生物質及び/又は抗ウイルス剤である。

【0314】

キットの構成成分は、好ましくは、個々の組成物中に含まれる。しかし、キットの構成成分が全て同一組成物内に含まれることも本発明の範囲内である。したがって、キットの構成成分を、同時に、又は任意の順序で連続的に投与してもよい。

10

20

30

40

50

【 0 3 1 5 】  
配列表







|         |   |    |
|---------|---|----|
|         | LQGWTE  |    |
| 配列番号 15 | CALR Long 3 ポリペプチド<br>KMRMRRMRTRRRKMRRKMSP  |    |
| 配列番号 16 | 1型 CALR エクソン9 変異体及び2型 CALR エクソン9 変異体のコンセンサス配列<br>RMRRMRTRRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA |    |
| 配列番号 17 | CALR Long 5 ポリペプチド<br>RRMMRTKMRMRRMRTRRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA                    | 10 |
| 配列番号 18 | スクランブルペプチド2<br>TSMRRRRRRRKRKMMKRM   |    |
| 配列番号 19 | CALR siRNA センス配列<br>GGAGCAGUUUCUGGACGGATT   |    |
| 配列番号 20 | CALR siRNA アンチセンス配列<br>UCCGUCCAGAAACUGCUCCTT  | 20 |
| 配列番号 21 | JAK2V617F 二本鎖1 センス配列<br>GAGUAUGUUUCUGUGGAGATT   |    |
| 配列番号 22 | JAK2V617F 二本鎖1 アンチセンス配列<br>UCUCCACAGAAACAUCUCTT                                       |    |
| 配列番号 23 | JAK2V617F 二本鎖2 センス配列<br>GGAGUAUGUUUCUGUGGAGTT   | 30 |
| 配列番号 24 | JAK2V617F 二本鎖2 アンチセンス配列<br>CUCCACAGAAACAUCUCTT  |    |
| 配列番号 25 | JAK201wt、JAK201 野生型エピトープ<br>VLNYGVCVC   |    |
| 配列番号 26 | HLA-A2 高親和性-結合エピトープ HIV-1<br>ILKEPVHGV  |    |

10

20

30

40

50

#### 【実施例】

#### 【0316】

本発明は、以下の実施例によってさらに例証されるが、本発明に対する制限として解釈されるべきではない。

#### 【0317】

#### [実施例1-CALR]

#### 導入

本研究は、CALR変異慢性骨髄増殖性腫瘍(MPN)を有する患者のCALRエクソン9変異に対する自発的T細胞応答を説明することを目標とした。これらのT細胞応答は、変異体CALR C末端にわたる2つの重複ペプチドに対して導かれた。

## 【0318】

CALR Long1ペプチド及びCALR Long2ペプチドに対するMPN患者の応答

本研究は、地元の倫理委員会に承認され、全ての患者が、研究に参加する前に、ヘルシンキ宣言に従ってインフォームドコンセントにサインした。本発明者らは、ET(n=13)、PMF(n=12)、post-ET MF(n=4)、又は前線維化期MF(n=2)の診断を有する31名のCALRmutのMPN患者を含めた。末梢血単核球(PBMC)をLymphoprepで単離し、10%のジメチルスルホキシドを含むウシ胎仔血清中で凍結させた。最初に、本発明者らは、高感度且つ固体のインターフェロンガンマ(IFN- $\gamma$ )によるEnzyme-Linked ImmunoSPOT(ELISPOT)分泌アッセイを使用して、2つのCALR由来ペプチド、CALR Long1(RRMMRTKMRMRRRTRRKMRKMSPARP、配列番号2)及びCALR Long2(TRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA、配列番号3)に対する自発的T細胞応答の存在について、2名のMPN患者由来のPBMCを精査した(図1A及び1C)。ELISPOTは、がん患者由来のPBMCにおける新規の腫瘍抗原応答の性状解析によって、新規腫瘍抗原に関する特定に焦点を当てる研究の中心的アッセイであることが判明している。したがって、このアッセイは、がん患者における自発的免疫に基づく新規腫瘍抗原の特定に関して以前に利用されている(Andersenら、2005)。

10

## 【0319】

ELISPOTアッセイは、T細胞受容体の誘発に際して、単一T細胞によるサイトカイン、最も多くはIFN- $\gamma$ の抗原誘導性放出の検出に基づく。単一T細胞の反応性は、特別なニトロセルロースのフィルタープレート上で各サイトカインの結合によって検出及び定量化することができる。T細胞が調査されるペプチドエピトープを認識すると、T細胞はサイトカインを放出し、サイトカインは二次サイトカイン特異的抗体にコンジュゲートした酵素を使用して比色反応によって検出される。反応生成物は、スポットとして目視できる。理想的には、各スポットは、単一の活性化細胞によって分泌されたサイトカインを表す。ELISPOTは、以前に記載されているように実施及び分析した(Munirら、2013年)。最適な応答を保証するために、PBMCを様々な濃度で試験した。Moodieらによって記載された、ディストリビューションフリーリサンプリング方法を統計分析のために使用したところ、p値 < 0.05でT細胞応答であると思われた(Moodieら、2010年)。

20

## 【0320】

最初の2名の患者における有望な応答の後、本発明者らは、さらに29名のCALR変異MPN患者由来のPBMCを解析した。患者のPBMCのうちのいくつかは低い生存能を示し、結果として、本発明者らは、18名の患者のCALR Long1に対する応答及び24名の患者のCALR Long2に対する応答を解析することができた。24名の評価可能な患者のうち、10名はETを有し、14名はMFを有し、後者の群は、PMFを有する11名の患者、post-ET MFを有する2名の患者、及び前線維化期MFを有する1名の患者を含んだ。解析により、9名の患者(50%)がCALR Long1に応答し(図1C)、10名の患者(42%)がCALR Long2に応答し(図1D)、これらの患者のうち、6名(32%)がCALR Long1及びLong2の両方に応答した。これらの結果を確認するために、本発明者らは、CALR Long1に対する応答を示した9名の患者のうちの5名に由来する試料においてさらなるELISPOTを実施し、4名の患者で応答が確認された。同様に、本発明者らは、CALR Long2に対する応答を示した10名の患者のうちの5名において補足ELISPOTを実施し、4名の患者において応答を確認した。さらに、本発明者らは、腫瘍壊死因子アルファ(TNF- $\alpha$ )によるELISPOTにおいて、2名の患者由来のPBMCを調査した。興味深いことに、これらの患者のうちの1名で有意なTNF- $\alpha$  応答が検出された(データは示さず)。

30

40

## 【0321】

免疫系は、疾患発症のプロセス全体にわたって腫瘍と密接に相互作用する。それ故に、非進行がんを有する患者ががんに対する免疫応答を維持できる一方、進行ステージでは、がんは免疫応答の回避をなし遂げる(Dunnら、2002年)。ET及びMFは、初期(ET)から進行がんステージ(MF)までの生物学的連続性におけるMPNの異なるステージである(Hasselbalchら、2009年)。実際に、本発明者らは、ETを有する患者においてより高い頻度の応答を観察し、ここで、14名のうちの5名のみ(36%)が応答をしたMFを有する患者と比較して、10名のうちの8名(80%)が応答を示した。この差は、フィッシャーの直接検定によって、p=0.04

50

7で統計的に有意であった。

### 【0322】

#### 応答はCALR変異型によって変化しない

いくつかの刊行物により、異なる型のCALR変異が疾患表現型及び予後に異なる影響を及ぼすことが示されてきた(Tefferi, Wassieら、2014年;Cabagnolsら、2015年;Tefferi, Lashoら、2014年)。したがって、CALRペプチドに対して応答する患者間の変異型に歪度が期待されることになる。本発明者らの24名の評価可能な患者のうち、11名(46%)が1型変異を有し、これらのうち、5名がIFN- $\gamma$  応答を示した(45%)。9名の患者(38%)が2型変異を有し、これらのうち、6名がIFN- $\gamma$  応答を示した(67%)。4名の患者(17%)が1型変異も2型変異も有さず、これらのうち、2名がIFN- $\gamma$  応答を示した(50%)。1型変異を有する患者と2型変異を有する患者の間の応答の差は、統計的有意性に達しなかったが( $p=0.41$ )、このことは、変異型が、CALR変異に対して反応する免疫系の能力に影響を及ぼさないことを示唆する。

### 【0323】

#### T細胞応答解析

次に、本発明者らは、細胞内サイトカイン染色を使用して、CALR Long1及びCALR Long2ペプチドに対する応答を有する4名の患者由来のPBMCを解析することを選択した。この方法は、ELISPOTより感受性が低い、どの免疫細胞がELISPOTで特定したサイトカインを分泌するのかの説明を可能とする。これにより、本発明者らは、反応する細胞がT細胞であるか、そうである場合は、応答する細胞がCD4 T細胞であるかCD8 T細胞であるかを決定することができた。簡潔に言えば、CALR Long1又は対照としてスクランブルペプチド(MRRTM MMMPRRRRRRRKRRSKTRAPRMRK)で細胞を刺激した。表面マーカーとして、本発明者らは、4  $\mu$  lのNIR、10  $\mu$  lのCD4 PerCP、2  $\mu$  lのCD8パシフィックブルー、及び10  $\mu$  lのCD3 FITCを用い、細胞内染色として、本発明者らは、PE-Cy7又はAPCのいずれかとコンジュゲートした2  $\mu$  lの抗TNF- $\alpha$  及び抗IFN- $\gamma$  抗体を使用した。洗浄、透過処理及び染色手順は、以前に記載した方法に従った(Munir, Andersenら、2013年)。細胞内サイトカイン染色から得られる結果により、分析した4名の患者のうち2名において応答が実証された。1名の患者(C42)は、顕著なCD8 T細胞応答及びより穏やかなCD4 T細胞応答でCALR Long1に反応した(図2A)。他の患者(C39)は、CD4 T細胞応答でCALR Long1(データは示さず)とCALR Long2の両方に対して反応した(データは示さず)。特定した応答が、実際に、CALR Long1に対するT細胞応答であったことを確認するために、本発明者らは、以前に記載された方法を使用して、患者C42から樹状細胞を生成した。自己PBMCをCALR Long1でパルス刺激された樹状細胞で3回刺激して、それにより、本発明者らは、CALR Long1特異的T細胞培養物を生成した。細胞内サイトカイン染色を使用して、本発明者らは、T細胞培養物がCALR Long1に対する強力なCD4 T細胞応答及び幾分か弱いCD8 T細胞応答をしたことを実証した(図2B)。これらのデータにより、ELISPOTアッセイで特定した免疫応答が、実際に、変異CALRペプチドに対するT細胞媒介応答であることが示される。T細胞応答の頻度の高い検出により、CALR変異は、抗がん免疫療法のための理想的な標的を表す免疫原性の高いがん抗原をコードすることが示される。

### 【0324】

一般的に、がん免疫療法において変異体抗原を標的とする際の主要な制限は、異なる患者が異なる抗原を呈することであった。この問題は、全てのCALR変異が36個のアミノ酸の連続配列を共有するため、CALRエクソン9変異を標的とするアプローチを制限しないようである。この短い配列は、抗原性ペプチドを特定することができる薬剤を設計するのに最適なサイズである。さらに、2つの最も頻度の高い変異型(1型及び2型)が患者の80%より多くで見られ、これらの型はさらに10個のアミノ酸の連続配列(配列番号11)を共有する。ここで、本発明者らは、2つのCALRコンセンサス配列の免疫原としての可能性について説明する;一方は、1型変異と2型変異の両方に対してコンセンサスであり(CALR Long1)、他方は、36個のアミノ酸の末端配列の変異についてpan-CALRコンセンサスであった(CALR Long2)。最近、CALR変異MPNを有する患者が、いくつかの型のCALR変異を保有する場合があることが示され(Jerominら、2016年)、したがって、最も重要なのは、免疫系が34個のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸の末端配列に対する免疫応答をし、それによって、全てのCALR変異を標的とすることである。本発明者らは、免疫系が、1型変異と2型変異の両方(CALR Long1)及び36個のアミノ酸のコンセンサス配列(CALR Long2)を標的とすることを記載しており、従って、免疫系は、実際に、優勢なCALR変異クローンとさらなるサブクローンの両方を除去する場合がある。したがって、本発明者らの結果により、CALRエクソン9変異が、例えば、ワクチン又は養子細胞療法のための標的として、がん免疫療法のための実行可能な標的であることが示唆される。

【0325】

[実施例2]

#### 患者

患者の末梢血単核球(PBMC)をLymphoprep(Axis Shield, Oslo, Norway)を使用して単離し、10%のジメチルスルホキシド(Sigma-Aldrich)を含むウシ胎仔血清中で凍結させた。患者は、研究に参加する前に、ヘルシンキ宣言に従って、サインしたインフォームドコンセントを提供し、本研究は、地元の倫理委員会によって承認された。CALR Long1特異的T細胞培養物を生成するために、本発明者らは、CALR Long1エピトープに対する強力なCD8<sup>+</sup> T細胞応答及びより穏やかなCD4<sup>+</sup> T細胞応答を有する患者由来の細胞を用いて作業することを選択した。患者は、74歳の白人男性であり、5bpの挿入からなるCALR 33型変異を有する。彼は、本プロジェクトに参加する18年前にETを有すると診断された。彼の診断の14年後に、新たな骨髓生検により、患者が本態性血小板血症性骨髓線維症にまで進行したことが明らかとなった。このプロジェクトのための採血時に、患者をアナグレリドで治療した。

【0326】

#### ペプチド

本発明者らは、KJ Ross-Petersen, Klampenborg, Denmark又はSchafer-N, Copenhagen, Denmarkのいずれかによって提供される、CALR Long1(RRMMRTKMRMRMRTRRRKMRKMSPARP、配列番号2)、CALR Long2(TRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA、配列番号3)、CALR Long3(KMRMRMRTRRRKMRKMSPARP、配列番号15)、CALR Long4(RRMRTRRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA、配列番号1)及びCALR Long5 (RRMMRTKMRMRMRTRRRKMRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA、配列番号17)のペプチドに関して作業することを選択する。陰性対照として、本発明者らは、2つのスクランブルペプチド:MRRTMMMMPRRRRRRKRKRSKTRAPRMRK(配列番号8)又はTSMRRRRRRRKRKMMKRM(配列番号18)のうちの1つを使用した。

【0327】

#### CALRmutエピトープに特異的なT細胞培養物の生成

最初に、MACS CD14 MicroBeads(Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)を使用して、新鮮なPBMCをCD14<sup>+</sup>細胞について濃縮した。これを0日目とみなした。得られた単球枯渇細胞培養物を末梢血リンパ球(PBL)と称した。濃縮細胞をCellGro(CellGenix GmbH, Freiburg, Germany)を使用して培養し、GM-CSF(1000U/ml)及びIL-4(250U/ml)(両方ともPeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)で刺激した。翌日、fast樹状細胞(fastDC)を生成するために、本発明者らは、IFN- $\gamma$ (1000U/ml)(PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)、PolyI:C(20  $\mu$ g/ml)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)及びCALR Long1ペプチドを含む成熟カクテルで濃縮細胞の半分を処理した。PBLをX-VIVO培地(Lonza Group Ltd., Basel, Switzerland)中で終夜培養し、次いで、fastDCの半分で刺激した。fastDCの他の半分は後で使用するために凍結させた。

【0328】

濃縮細胞の他の半分は、7日目まで培養し、この時点で、これらの細胞を上記と同じ成熟カクテルで処理し、成熟樹状細胞(mDC)を生成した。翌日、これらのmDCを使用してPBLを刺激した。9日目に、IL-2(120U/ml)(Novartis, Basel, Switzerland)及びIL-7(40U/ml)(PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)を添加した。14日目に、本発明者らは、2日目に凍結させていたfastDCを解凍し、これらの細胞を使用してPBLを刺激した。16日目及び24日目に、本発明者らは、上記で言及した濃度のIL-2及びIL-7を添加した。

【0329】

10

20

30

40

50

### IFN- の濃縮及びCD4<sup>+</sup> T細胞のクローニング

T細胞培養の38日目に、本発明者らは、CALRLong1ペプチドで4時間T細胞を刺激し、次に、MACS IFN- 分泌アッセイを使用してIFN- 分泌細胞を単離した。単離した細胞を急速拡大プロトコールを使用して拡大した。CALRLong1ペプチドの刺激に対して反応した細胞の大多数はCD4<sup>+</sup> T細胞であり、したがって、本発明者らは、EasySep Human CD4単離キット(StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada)を使用してREP培養からCD4<sup>+</sup> T細胞を単離した。次いで、濃縮CD4<sup>+</sup> T細胞を限界希釈によってクローニングし、増殖したT細胞クローンを、フィーダー細胞と高用量のIL-2(6000U/ml)を使用して急速に拡大させた。クローン細胞のT細胞受容体のクローノタイピングを、以前に記載された変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法によって実施した。

10

【0330】

#### 標的細胞

標的細胞として、本発明者らは、自己CD14<sup>+</sup>単球及びB細胞(BCL)を使用した。上述のように、CD14<sup>+</sup>単球をMACS CD14 MicroBeadキットを使用して単離した。自己B細胞株をHealth Protection Agency Culture Collections, Salisbury, UKのドナーBCLのEBVトランスフェクションを使用して生成した。

【0331】

#### 細胞内サイトカイン染色

アッセイの1日前に、凍結T細胞を解凍し、CD107a発現を調査する実験において、ペプチド又は標的細胞の添加後に、CD107a-PE抗体を細胞に直接添加した。1時間の刺激後、タンパク質輸送阻害剤であるBrefeldin A(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を細胞に添加し、次いで、4時間刺激した。細胞をCD3-APC-H7、CD4-FITC、CD8-PerCP、IFN- -APC、TNF- -BV421及びFixable Viability Stain 510(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)で染色し、透過処理試薬/希釈液及び固定-透過処理緩衝液(AH Diagnostics, Aarhus, Denmark)で透過処理及び洗浄した。細胞は、FACS Canto II(BD Biosciences)により獲得し、FACS Divaソフトウェアを使用して解析した。全てのエフェクター細胞刺激は、他に特定されていないければ、三連のウェルで実行した。

20

【0332】

#### siRNA媒介CALRサイレンシング

アンチセンス鎖に3'末端dTオーバーハングを有するCALRの標的化サイレンシングのためのサイレンサーであるsiRNA二本鎖を、Invitrogen(Invitrogen, Paisley, UK)から入手した。CALR siRNA二本鎖は、センス配列GGAGCAGUUUCUGGACGGATT(配列番号19)及びアンチセンス配列UCCGUCCAGAAACUGCUCCTT(配列番号20)からなった。サイレンサーであるsiRNA二本鎖をRNaseを含まない水中に再懸濁して25 µMの濃度とし、次に、-20 °Cで保存した。

30

【0333】

自己CD14<sup>+</sup>単球をCellGro、GM-CSF(1000U/ml)及びIL-4(250U/ml)を用いて培養し、翌日、以前に記載した電気穿孔パラメーター(Metら、2011年)を使用して、CALR siRNAが陰性対照のsiRNA(Invitrogen)のいずれかをトランスフェクトした。簡潔には、単球を2回洗浄し、Opti-MEM培地(Invitrogen)に懸濁させ、1ml当たり10<sup>7</sup>個の細胞の最終細胞密度に調整した。細胞懸濁液(200 µl)を氷上で5分間予めインキュベートし、次に、5 µlのCALR siRNA又は10 µlの陰性対照のsiRNAと一緒に、2mmギャップの電気穿孔に移し、BTX 830方形波電気穿孔器(Harvard Apparatus, Holliston MA, USA)を使用してパルス刺激した。電気穿孔の設定は、単一パルス、250V、2msに調整した。電気穿孔の直後に、単球を、1000U/mlのGM-CSF及び250U/mlのIL-4を含む予熱したCellGroに移した。電気穿孔した単球をインキュベートし、本明細書で特定した実験解析に使用した。FITC siRNA(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)がトランスフェクトされた単球のフローサイトメトリー解析を使用して、適切なトランスフェクション効率を確保した。

40

【0334】

#### 結果

CALRLong1特異的T細胞は、いくつかのCALRmutエピトープを認識する

50

本発明者らは、CALRLong1ペプチドに対する強力なCD8<sup>+</sup> T細胞応答を有するCALRmut患者由来のCALRLong1-特異的T細胞培養物を確立した。PBLを自己樹状細胞で3回刺激し、細胞内サイトカイン染色(ICS)を使用してT細胞を解析した。驚くべきことに、CD8<sup>+</sup> T細胞はCALRLong1に対して応答を示さなかった(データは示さず)。しかし、CD4<sup>+</sup> T細胞は、CALRLong1に反応した(図7)。次に、本発明者らは、これらのCALRLong1-特異的T細胞が、CALRmut C末端の他のエピトープを認識することができるかどうかを調査した。T細胞は、CALRLong3、CALRLong4及びCALRLong5の両方による刺激に反応し(図7)、一方、T細胞は、CALRLong2による刺激の際には応答せず(図7)、このことは、応答が変異配列の最初に対するものであることを示唆した。CALRLong4ペプチドは、全てのCALRmut患者に見られる共有された36個のアミノ酸のC末端を含むため、本発明者らは、48時間のアッセイにおいて自発的ex-vivo ELISPOT応答について、ドナー由来のPBMCを試験した。高いバックグラウンドにもかかわらず、本発明者らは、Moodieら(2010年)により与えられた規則によって定義されるその患者のCALRLong4ペプチドに対する有意な応答を見出した(示さず)。

10

20

30

40

50

### 【0335】

#### 高濃縮CALRLong1特異的CD4<sup>+</sup> T細胞のクローニング

より高い純度のCALRLong1特異的CD4<sup>+</sup> T細胞集団を得るために、本発明者らは、MACSのIFN- $\gamma$ 分泌アッセイを使用してCALRLong1特異的T細胞を濃縮した。このことにより、CALRLong1特異的CD4<sup>+</sup> T細胞の比率が増加した(図8A)。CD4<sup>+</sup> T細胞のほぼ40%がCALRLong1ペプチドに対して反応したため、次に、本発明者らは、培養物中のCD4<sup>+</sup> T細胞を濃縮して、CALRLong1特異的CD4<sup>+</sup> T細胞のクローンを確立した。本発明者らは、ICSを使用して、CD4<sup>+</sup> T細胞培養物のうちの1つがCALRLong1に対して100%特異的であることを実証した。(図8A)。フローサイトメトリーによる免疫表現型の決定により、培養物が純粋なCD4<sup>+</sup> T細胞培養物であることが明らかとなり(図8B)、CD4<sup>+</sup> CALRLong1特異的T細胞のT細胞受容体の表現型の決定により、T細胞がクローンであることが確認された(データは示さず)。

### 【0336】

#### CALRLong1特異的T細胞は自己CALRmut細胞による刺激に際して活性化される

CALRエクソン9変異体が免疫系によって標的とされるかどうかを評価するために、CALRLong1特異的T細胞がCALRmut細胞を認識し、これによる刺激で活性化されることを実証することが重要である。標的細胞として、本発明者らは、PCR解析によって決定した、71%のCALRmut対立遺伝子負荷を有するCD14<sup>+</sup>単球及び0%のCALRmut対立遺伝子負荷を有する自己EBV形質転換不死化B細胞を使用した。CALRLong1特異的T細胞は、自己CD14<sup>+</sup>単球による刺激の際に活性化され、1:1のエフェクター:標的比でおよそ80%のT細胞がサイトカインを分泌した(図9A)。同じエフェクター:標的比のB細胞による刺激によって、1.7%のT細胞からサイトカインが分泌された(図9C)。さらに、エフェクター:標的比が3:1である場合には、より少ないT細胞が活性化された(図9B)。標的細胞の純度分析により、CD14<sup>+</sup>単球の高濃縮が明らかとなった(図9D)。

### 【0337】

#### CALRmut標的細胞によるT細胞活性化は標的細胞による抗原提示に依存する

T細胞認識及び活性化が変異体CALR抗原の存在に依拠することを証明するために、本発明者らは、抗原提示を促進するために、評価前の24時間、標的細胞をIFN- $\gamma$  (300U/ml)により刺激することを決定した。IFN- $\gamma$  によるCALRmut単球の刺激によりT細胞の活性化は有意に増大したが、IFN- $\gamma$  処理B細胞で刺激したT細胞では活性化に変化は見られなかった(図10A)。次に、本発明者らは、材料及び方法において記載されたようにCALRのsiRNAを自己CD14<sup>+</sup>選別骨髄細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後にsiRNAがトランスフェクトされた標的細胞でT細胞を刺激することにより、陰性対照と比較して、IFN- $\gamma$  /TNF- $\alpha$  二重陽性T細胞の比率のほぼ50%の低下が導かれた(図10B)。FITC-コンジュゲートsiRNAがトランスフェクトされた骨髄細胞のフローサイトメトリー解析(図10C)は、適切なトランスフェクション効率を示した。

### 【0338】

#### CALRmut特異的応答は、拘束エレメントとしてのHLA-DRでHLA II拘束される

次に、本発明者らは、CALRmut特異的T細胞によるCALRmut標的細胞の認識がCD4-HLA II相互作用に依存するかどうかを調査した。本発明者らは、細胞を使用する前の30分間、HLA IIブロッキングモノクローナル抗体(Tu39、BioLegend、San Diego、CA、USA)でCD14<sup>+</sup>単球をインキュベートした。標的細胞上のHLA IIをブロッキングすることにより、活性化T細胞の比率は有意に低減した(図6A)。次に、本発明者らは、HLA-DQブロッキング抗体又はHLA-DRブロッキング抗体(Abcam、Cambridge、UK)のいずれかでCALRLong1特異的T細胞を20分間処理し、その後、細胞をCALRLong1ペプチドにより刺激した。HLA-DQ抗体で処理したT細胞(図11B、中央)は、抗体で処理しなかった細胞(図11B、上)とちょうど同程度に活性化された。しかし、HLA-DR特異的抗体で処理したT細胞(図11B、下)では、反応は見られなかった。

10

## 【0339】

CD4<sup>+</sup> CALRLong1特異的T細胞は自己CD34<sup>+</sup>細胞を認識し、その刺激によって活性化される

CALRエクソン9変異は、早期変異事象であることが知られており、それ故に、CD34<sup>+</sup>造血幹細胞が、この変異を同様に保有することが示された。したがって、本発明者らは、CD4<sup>+</sup> CALRLong1特異的T細胞が自己CD34<sup>+</sup>細胞を認識することができるかどうかを調査し始めた。本発明者らは、新たに吸引した骨髓と上記の凍結保存したCD14<sup>+</sup>枯渇PBMCの両方からCD34<sup>+</sup>細胞を濃縮し、標的細胞としてCD34<sup>+</sup>細胞を使用した。標的細胞数が制限されたことにより、骨髓由来CD34<sup>+</sup>細胞を用いる実験は、エフェクター：標的比5:1で二連で実施した。PBMC由来CD34<sup>+</sup>細胞を用いる実験は、5%ヒト血清を含むX-VIVOでの濃縮後、48時間細胞を休ませた後に実施した。骨髓由来CD34<sup>+</sup>細胞は、実際に、陰性対照ペプチドによる刺激(図12A、下)と比較して、エフェクター：標的比3:1でCD4<sup>+</sup> CALRLong1特異的T細胞を活性化することができた(図12A、上)。エフェクター：標的比5:1におけるPBMC由来CD34<sup>+</sup>細胞によるT細胞の刺激により、陰性対照ペプチドで刺激したT細胞(図12C、下)と比較して、さらに多量の活性化T細胞が示された(図12C、上)。濃縮標的細胞の純度は、フローサイトメトリー解析で解析して、>50%であった(図12B及び12D)。

20

## 【0340】

CD4<sup>+</sup> CALRLong1特異的T細胞はCALRLong1エピトープを呈する標的細胞に対して細胞傷害性である

本発明者らは、CALRLong1ペプチド又はスクランブル対照」ペプチドで自己B細胞をパルス刺激した。CALRLong1でパルス刺激したB細胞は、特異的T細胞によって広く認識された(図13A)。次に、本発明者らは、CD4<sup>+</sup> CALRLong1特異的T細胞が標的細胞に対して細胞傷害性であるかどうかを調査した。標準Cr<sup>51</sup>細胞傷害性アッセイでは、CD4<sup>+</sup>T細胞は、実際に、CALRLong1でパルス刺激したB細胞に対して細胞傷害性であることが示され、最大殺傷効果は、40:1のエフェクター：標的比で45%であった(図13B)。さらに、本発明者らは、CALRLong1又はスクランブル対照ペプチドでパルス刺激したB細胞による刺激後のCD4<sup>+</sup> CALRLong1特異的T細胞上の脱顆粒マーカーCD107aの発現を調査し、CD107aがCALRLong1ペプチドで刺激したT細胞上で上方調節されたことを示した(図13C)。同時に、本発明者らは、CALRLong1特異的バルク培養物中のCD4<sup>+</sup> T細胞のマイナー画分が、CALRLong1ペプチドによる刺激に際してCD107aを上方調節することを示し(図13D)、バルク培養物中のCD4<sup>+</sup> T細胞は細胞傷害能も有することを実証した。

30

40

## 【0341】

## [実施例3]

CARL変異体エピトープCALRLong1(RRMMRTKMRMRMRTRRRKMRRKMSPARP)、CALRLong2(TRRKMR RKMSPARPRTSCREACLQGWTEA)、CALRLong4(RRMRTRRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA)及びCALRLong5(RRMMRTKMRMRMRTRRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA)に対する免疫応答について、実施例1に記載されたIFN- $\gamma$ によるELISPOTによって、健常ドナー由来のPBMCを解析した。健常ドナーは、これらのCARL変異体エピトープ全てに対して強力な免疫応答を呈した(図14、15、16、17)。

## 【0342】

TNF- $\alpha$  ELISPOTを使用してCALRLong1(図18A)及びCALRLong2(図18B)に対する反応性につ

50

いても健常ドナーを解析し、ドナーのうちの数名がペプチドに対して応答を呈した。留意すべきことに、CALRLong1及びCALRLong2に対するTNF- $\alpha$  応答を有する患者の全てが、ELISPOTにおけるIFN- $\gamma$  応答も呈した(図14~15)。細胞内サイトカイン染色を使用して健常ドナー由来細胞を解析して、本発明者らは、数名のドナーにおいて、CALRLong1ペプチドに対するCD4 $^{+}$  T細胞応答を特定した(示さず)。

#### 【0343】

これらの実験後に、本発明者らは、全CALR変異体のC末端が、実際に免疫原性であると結論付けた。しかし、本発明者らは、配列の残りの部分よりもより免疫原性である変異体配列の部分が存在する可能性があるかと推測した。本発明者らは、全44個のアミノ酸配列を36個の九量体エピトープに分割することによって、この「免疫原性ホットスポット」を探索した。IFN- $\gamma$  によるELISPOTを使用して、本発明者らは、10名の健常ドナーにおいて、これら36個の九量体エピトープに対する自発的免疫応答を調査した。全ての健常ドナーが、CALR変異体の九量体エピトープのうちの一つに対して少なくとも1回の免疫応答を呈したが、CALR変異体エピトープに対する応答のほとんどがCALR変異体C末端の最初の半分に限られることが明らかであった(図19)。IFN- $\gamma$ 放出細胞の表現型を明瞭にするために、本発明者らは、九量体エピトープのいくつかに対して強力な応答を有する5名のドナーを解析したところ、再び、応答のほとんどがCD4 $^{+}$  T細胞応答であった(図20)。しかし、1名のドナーは、ペプチドB11に対してCD8 $^{+}$  T細胞応答を示した(図20)。

#### 【0344】

##### [実施例4-JAK2]

変異体JAK2ペプチドVLNYGVCFC(配列番号7)に対して反応性であるT細胞を調製した。ペプチドに対して特異的なT細胞培養物の確立については以前に記載されている(Munir S、Andersen GH、Met Oら HLA-restricted CTL that are specific for the immune checkpoint ligand PD-L1 occur with high frequency in cancer patients. Cancer Res. 2013年)。簡潔には、HLA-A2陽性健常ドナー由来の末梢血単核球(PBMC)をJAK201負荷自己樹状細胞で刺激し、続いて、IL-2、IL-7、及びIL-12で刺激した。樹状細胞の生成は、本発明者らが以前に公開した方法に従った。(Munir S、Andersen GH、Met Oら HLA-restricted CTL that are specific for the immune checkpoint ligand PD-L1 occur with high frequency in cancer patients. Cancer Res. 2013年)。HLA-A2高親和性結合エピトープHIV-1(ILKEPVHGV;配列番号26)及びJAK201(JAK201wt)野生型エピトープ(VLNYGVCVC;配列番号25)を対照として使用した。これらの細胞は、変異体JAK2ペプチドに反応して活性化され、変異体JAK2ペプチドを提示する細胞を殺傷することが可能であった。T細胞は、JAK2変異を有するがん細胞が提示された場合にも活性化され、これらのがん細胞を殺傷することが可能であった。これは、siRNAで実施した実験によって示されたように(図6)、変異JAK2ペプチドを発現する細胞の能力に依存していた。

#### 【0345】

T細胞の特異性を、最初にELISPOTによって解析した。IFN- $\gamma$  及びTNF- $\alpha$  の両方の有意なJAK201ペプチド特異的放出は、ELISPOTによって容易に検出可能であり(図21a)、T細胞が、実際に、JAK201ペプチドに特異的であることを示唆した。JAK201変異体ペプチド(配列番号7)とJAK201野生型(配列番号25)ペプチドの間の差は、バリンからフェニルアラニンへの置換のみであり、次に、本発明者らは、この2つのペプチド間の交差反応性の可能性について精査した。ELISPOTを用いて、本発明者らは、JAK201wtペプチドと比較して、JAK201ペプチドで刺激した場合には、特異的T細胞が、IFN- $\gamma$  及びTNF- $\alpha$  を有意により多く放出したことを示した(図21b)。これは、ICSによって確認された(示さず)。Cr $^{51}$ 細胞傷害性アッセイを使用して、本発明者らは、変異体ペプチドと野生型ペプチドの間でいくらかの交差反応性を観察した。しかし、特異的T細胞は、標的細胞を殺傷するよう活性化されるために、JAK201ペプチドと比較して、より高濃度のJAK201wtペプチドを必要とし、T細胞が、実際に、JAK201wtペプチドと比較して、JAK201ペプチドに対してより高親和性であることを実証した(図21c)。

#### 【0346】

次に、標準Cr<sup>51</sup>細胞傷害性アッセイを使用して、本発明者らは、CD8<sup>+</sup> JAK201特異的T細胞が、実際に、細胞傷害性エフェクター細胞であることを示した。それ故に、TAP欠乏T2細胞をJAK201又はHIV対照ペプチドでパルス刺激すると、表面上にJAK201ペプチドを呈する細胞のみがT細胞によって殺傷された(データは示さず)。本発明者らは、特異的T細胞がJAK201ペプチドでパルス刺激したHLA-A2トランスフェクトK562細胞のみを認識することができるため、標的細胞の殺傷はHLA-A2によるJAK201提示に依存し、一方で、ペプチドを含まないHLA-A2トランスフェクトK562細胞又はJAK201ペプチドでパルス刺激したHLA-A3トランスフェクトK562細胞は認識されないことをさらに実証した(図21d)。

#### 【0347】

次に、本発明者らは、JAK2V617F変異を保有するがん細胞を認識し、殺傷するJAK201特異的T細胞の能力を調査した。UKE-1、SET-2及びTHP-1は、HLA-A2陽性である急性骨髄性白血病がん細胞株である。THP-1細胞はJAK2wtであり、一方UKE-1細胞はJAK2V617F変異についてホモ接合性であり、SET-2はJAK2V617F変異についてヘテロ接合性である。本発明者らは、最初に、UKE-1がん細胞株に対するJAK201特異的T細胞反応について調査した。UKE-1細胞は、UKE-1細胞によるT細胞の刺激によってELISPOTで検出されるIFN- $\gamma$ 放出が生じたため、JAK201特異的T細胞を活性化することができた(図22a)。さらに、アッセイ前に100U/mlのIFN- $\gamma$ で2日間処理したUKE-1細胞によるJAK201特異的T細胞の刺激により、T細胞からより多くのIFN- $\gamma$ の放出が生じた(図22a)。IFN- $\gamma$ はイムノプロテアソームを誘導し、細胞表面上のHLAクラスIを上方調節して、標的細胞による抗原提示を全体として促進することが知られている。次に、UKE-1細胞を細胞傷害性アッセイにおいて標的細胞として使用すると、UKE-1細胞はJAK201特異的T細胞によって効率的に溶解し、IFN- $\gamma$ によるUKE-1細胞の処置後に溶解が増加した(図22b)。最初に、SET-2細胞はT細胞によって溶解されなかったが、IFN- $\gamma$ による刺激後には、このがん細胞は、T細胞によって同様に溶解された(示さず)。

#### 【0348】

次いで、本発明者らは、JAK201特異的T細胞による標的細胞の認識のためのJAK2V617F変異の細胞内発現の重要性について調査した。したがって、JAK2V617F変異をサイレンシングするために、本発明者らは、UKE-1細胞にJAK2V617FのsiRNAをトランスフェクトし、トランスフェクト細胞を標的細胞として使用し、以前に記載されたようにモックトランスフェクトUKE-1細胞と認識について比較した。アンチセンス鎖における3'末端のオーバーハングdT塩基によるJAK2V617Fの標的化サイレンシングのためのサイレンサーとしてのsiRNA二本鎖(二本鎖1として、センス配列5'-GAGUAUGUUUCUGUGGAGATT-3'(配列番号21)、アンチセンス配列5'-UCUCCACAGAAACAUCUCTT-3'(配列番号22)、及び二本鎖2として、センス配列5'-GGAGUAUGUUUCUGUGGAGTT-3'(配列番号23)、アンチセンス配列5'-CUCCACAGAAACAUCUCTT-3'(配列番号24))は、Invitrogen(Invitrogen, Paisley, UK)から入手した。JAK2V617Fのサイレンシング実験のためには、UKE-1細胞を、以前に記載された電気穿孔パラメータを使用して、JAK2V617FのsiRNAをトランスフェクトした。電気穿孔の直後に、UKE-1細胞を予熱した10%ウシ胎仔血清を含有するRPMI 1640に移し、インキュベーター中に置き、トランスフェクションの22時間後の標準Cr<sup>51</sup>細胞傷害性アッセイにおける標的細胞として使用した。重要なことに、siRNAがトランスフェクトされたUKE-1細胞の殺傷は抑止されたが、一方、モックトランスフェクト細胞は依然としてJAK201特異的T細胞によって殺傷された(図22c)。このことにより、標的細胞の殺傷は、実際に、JAK2V617F変異の細胞内発現に依存することが示された。さらなる対照として、本発明者らは、JAK201特異的T細胞がJAK2wt急性骨髄性白血病がん細胞株THP-1を殺傷しなかったことを、標準Cr<sup>51</sup>細胞傷害性アッセイにおいて観察した(データは示さず)。

#### 【0349】

最後に、JAK2V617F変異を発現する細胞の認識について確認するために、本発明者らは、対照として神経増殖因子受容体(NGFR)をコードするmRNAを使用して、JAK2V617F変異をコードするmRNAをJAK2wt THP-1細胞にトランスフェクトし、これらの細胞をサイトカイン放出及びグランザイムBアッセイにおける標的細胞として使用した。トランスフェクト細

10

20

30

40

50

胞におけるNGFRの発現は、PEコンジュゲート抗NGFR mAbでトランスフェクションの20時間後に制御され、細胞の74%がトランスフェクトされたことを示した。ELISPOTアッセイにおける標的細胞としてトランスフェクト細胞を使用して、本発明者らは、JAK201特異的T細胞が、NGFRトランスフェクト細胞と比較して、JAK2V617Fトランスフェクト細胞に反応してIFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 及びグランザイムBを特異的に放出することを実証することができた(図22d)。フィラデルフィア染色体陰性慢性MPNを有する患者の50%超がJAK2V617F変異を保有する。この後天的体細胞変異は、骨髄悪性腫瘍で排他的に見出され、これをがん特異的抗原とする。結果として、JAK2V617Fは、がん免疫療法における魅力的な標的である。

#### 【0350】

本研究において、本発明者らは、JAK2V617FがT細胞によって特異的に認識されるかどうかを調査した。最初に、本発明者らは、V617F変異をまたぐHLA-A2拘束JAK2ペプチドに特異的なCD8<sup>+</sup> T細胞培養物を確立した。これらの特異的T細胞は、変異JAK2ペプチドで刺激した場合、及びJAK2V617F変異を保有するがん細胞で刺激した場合にTNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ の両方を放出した。本発明者らは、特異的T細胞が、JAK2V617F変異を保有するがん細胞を選択的に殺傷すること、及びIFN- $\gamma$ によるJAK2V617F変異がん細胞の処置により殺傷が増加することをさらに示した。重要なことに、JAK2V617Fの短い干渉RNAを用いるトランスフェクションによるJAK2V617F変異の下方調節により、T細胞に媒介される殺傷が抑止された。最後に、JAK2wt白血病細胞におけるJAK2V617F変異のノックインによりJAK201特異的T細胞が刺激され、より多くのサイトカイン及びグランザイムBが分泌されたため、JAK2V617F変異を発現する細胞の特異的認識が確認された。

#### 【0351】

結論として、免疫系は、JAK2V617F変異を有するがん細胞を有効に標的とすることができ、JAK2V617Fに対する新たな治療モダリティとしての特異的がん免疫療法の基礎となる。それ故に、JAK2V617F変異を標的とするJAK201ペプチドによるワクチン接種又は養子細胞療法は、JAK2V617F陽性MPNを標的とする方法になり得る。T細胞を工学的に操作して、変異標的を標的とする改変T細胞受容体を発現させることができる。しかし、変異体のエピトープと野生型JAK2のエピトープの間の交差反応性は、この選択肢を活用する前にさらに考慮されなければならない。

(参照文献)

10

20

Andersen MH, Reker S, Kvistborg P, Becker JC, Thor Straten P. Spontaneous immunity against Bcl-xL in cancer patients. *J Immunol* 2005; **175**: 2709–14.

Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J *et al.* Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution. *Leukemia* 2015; **29**: 249–252.

Cox, J.C., and Coulter, A.R. (1997). Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine* **15**, 248-56

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting : from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; **3**: 991–998.

10

Hasselbalch HC. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: the advanced phase of an untreated disseminated hematological cancer. Time to change our therapeutic attitude with early upfront treatment? *Leuk Res* 2009; **33**: 11–18.

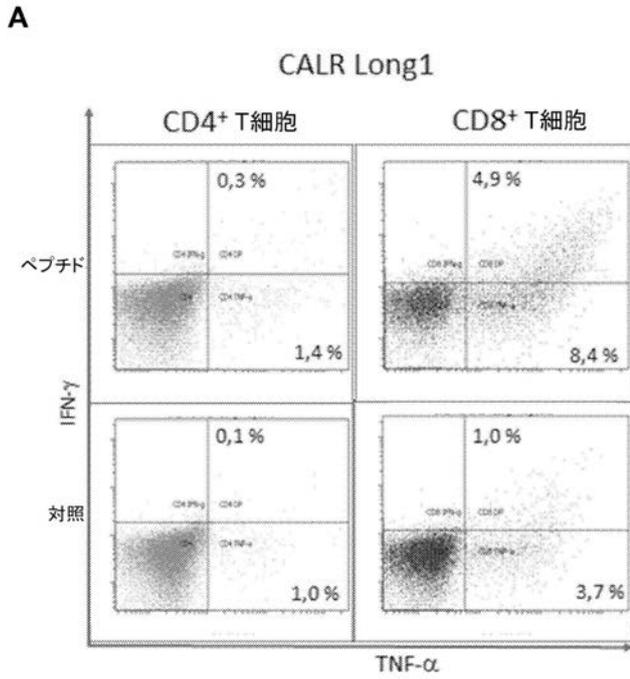
Jeromin S, Kohlmann A, Meggendorfer M, Schindela S, Perglerova K, Nadarajah N *et al.* Next-generation deep-sequencing detects multiple clones of CALR mutations in patients with BCR-ABL1 negative MPN. *Leukemia* 2016; **30**: 973–976. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD *et al.* Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* 2013; **369**: 2379–2390.

20

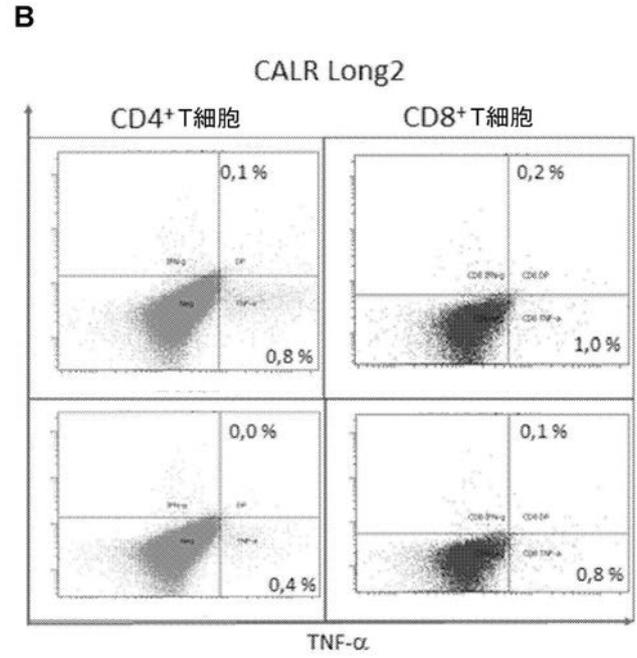
- Met Ö, Balslev E, Flyger H, Svane IM. High immunogenic potential of p53 mRNA-transfected dendritic cells in patients with primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011; **125**: 395–406.
- Moodie Z, Price L, Gouttefangeas C, Mander a., Janetzki S, Löwer M *et al.* Response definition criteria for ELISPOT assays revisited. *Cancer Immunol Immunother* 2010; **59**: 1489–1501.
- Munir S, Andersen GH, Met Ö, Donia M, Frøsig TM, Larsen SK *et al.* HLA-restricted CTL that are specific for the immune checkpoint ligand PD-L1 occur with high frequency in cancer patients. *Cancer Res* 2013; **73**: 1764–1776. 10
- Munir S, Andersen GH, Svane IM, Andersen MH. The immune checkpoint regulator PD-L1 is a specific target for naturally occurring CD4(+) T cells. *Oncoimmunology* 2013; **2**: e23991.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC *et al.* Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013; **369**: 2391–2405.
- Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015; **348**: 158 69–74. 20
- Tefferi *et al.* Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European LeukemiaNet (ELN) consensus report. *Blood*. 2013, 122; (8): 1395-1398.
- Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Belachew A, Wassie E, Ketterling RP *et al.* Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* 2014; **28**: 1568–1570.
- Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, Gangat N, Belachew AA, Lasho TL *et al.* Type 1 vs Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol* 2014; **89**: E121–E124. 30



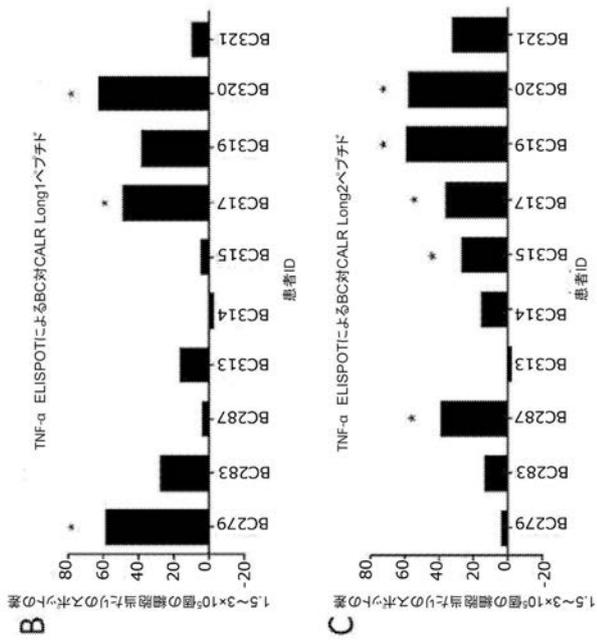
【 図 2 - 1 】



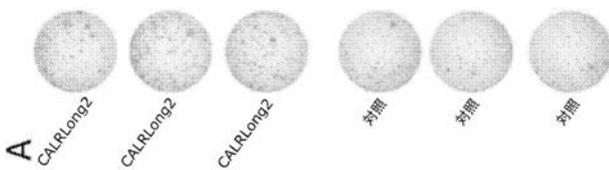
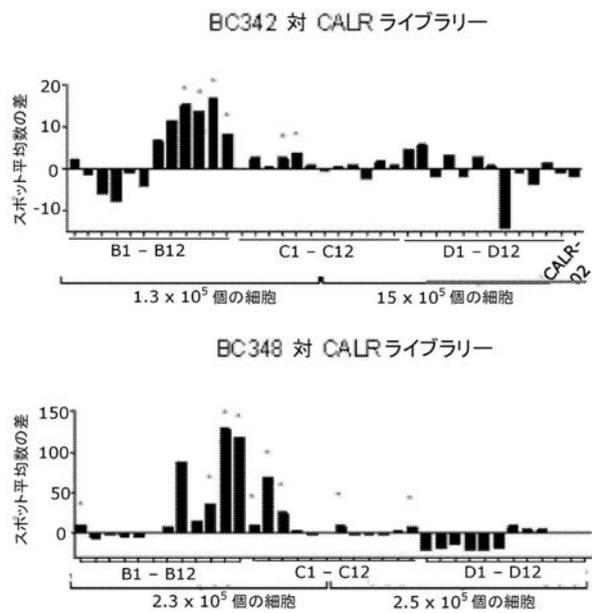
【 図 2 - 2 】



【 図 3 】

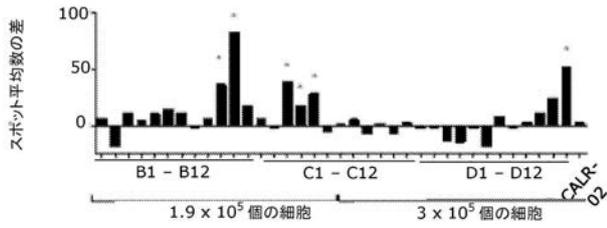


【 図 4 - 1 】



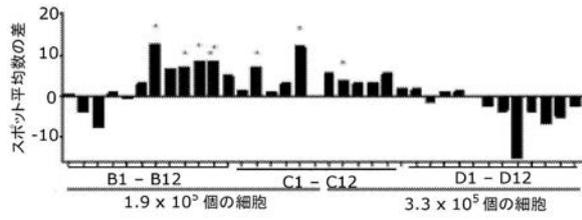
【 図 4 - 2 】

BC306 対 CALR ライブラリー

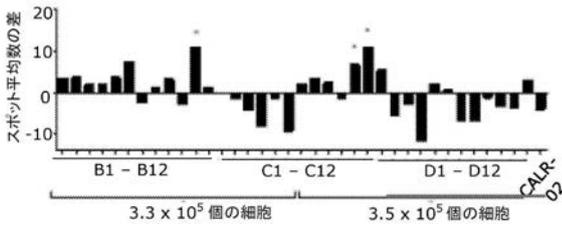


【 図 4 - 3 】

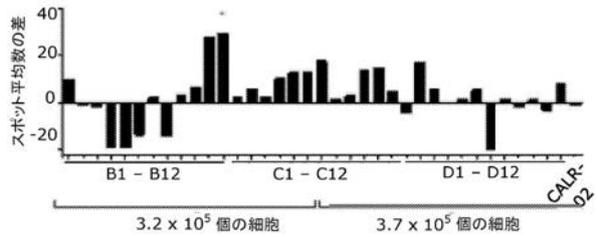
BC339 対 CALR ライブラリー



BC346 対 CALR ライブラリー

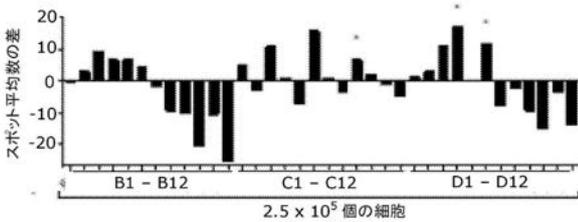


BC338 対 CALR ライブラリー



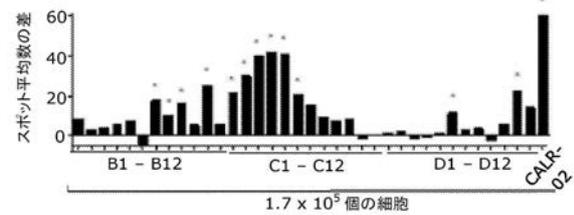
【 図 4 - 4 】

TOK 対 CALR ライブラリー

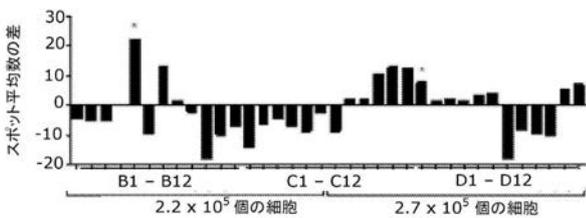


【 図 4 - 5 】

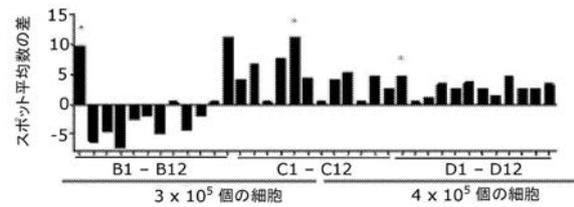
BC317 対 CALR ライブラリー



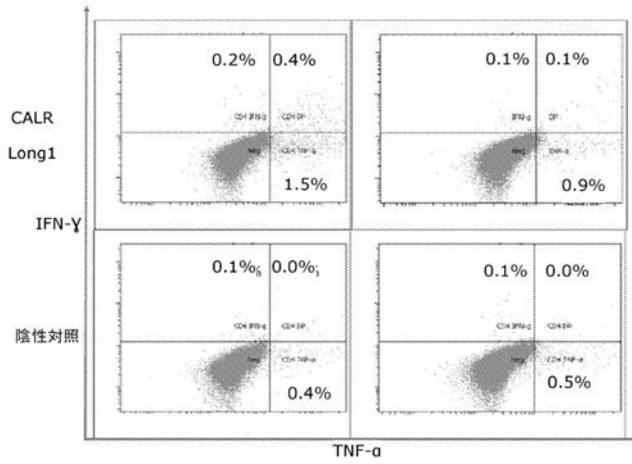
BC337 対 CALR ライブラリー



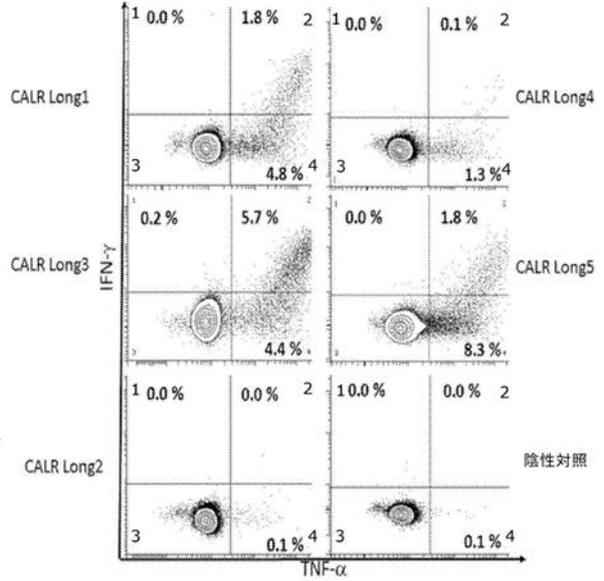
BC351 対 CALR ライブラリー



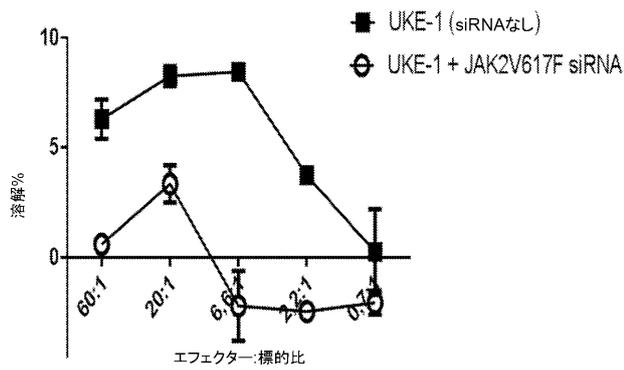
【 図 5 】



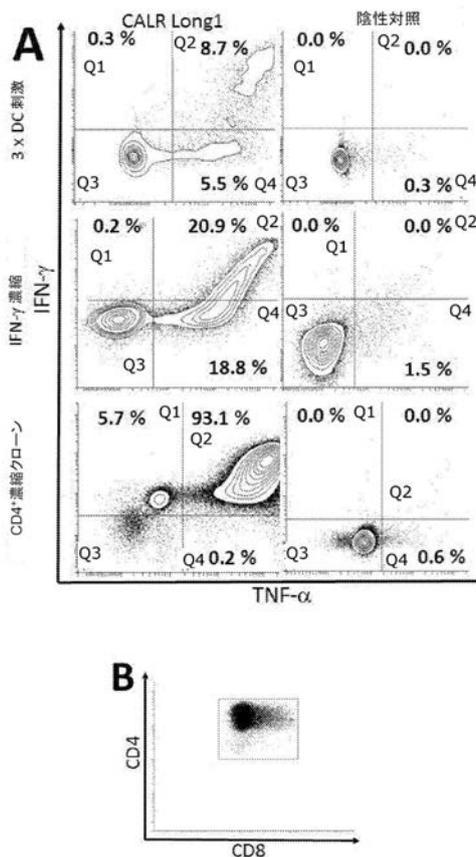
【 図 7 】



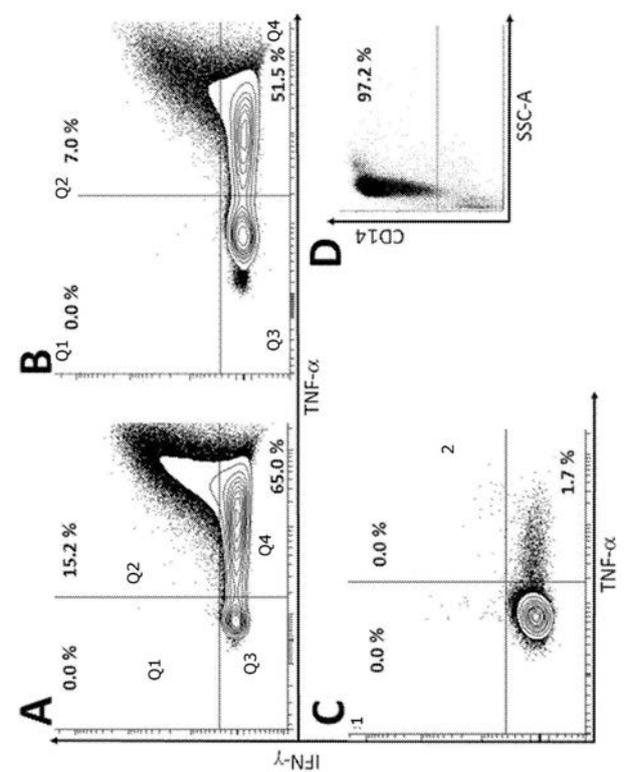
【 図 6 】



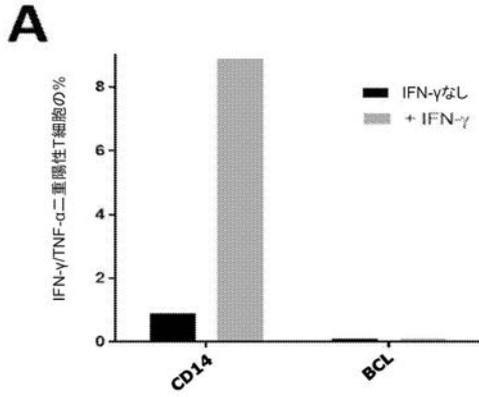
【 図 8 】



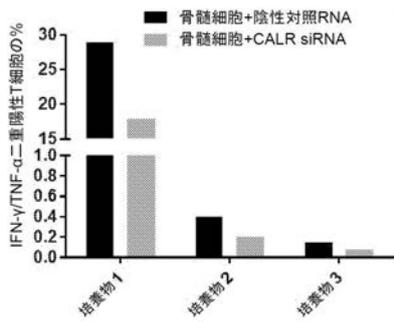
【 図 9 】



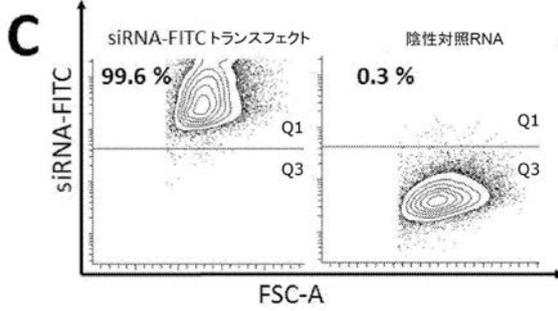
【 図 1 0 - 1 】



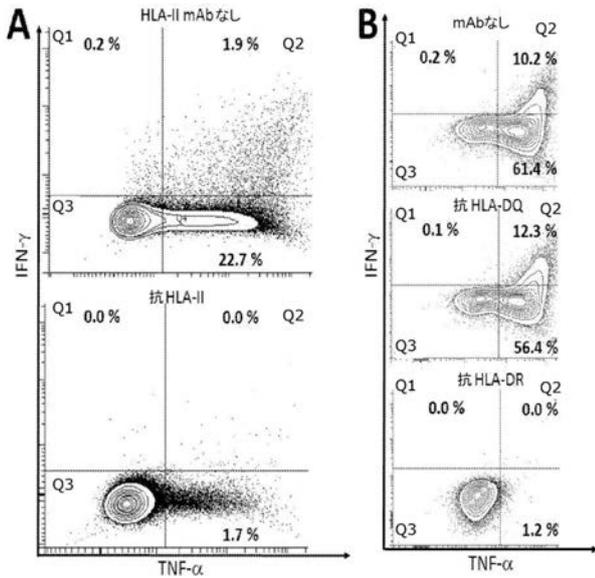
**B**



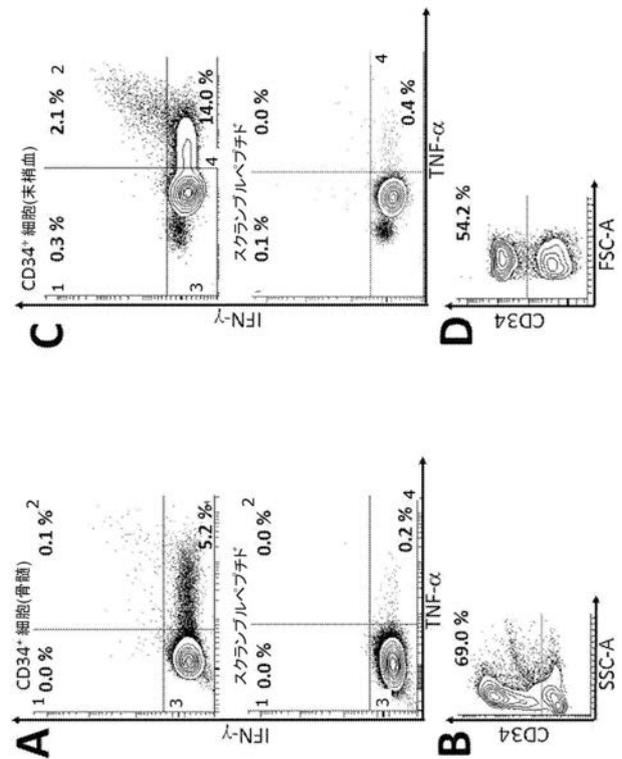
【 図 1 0 - 2 】



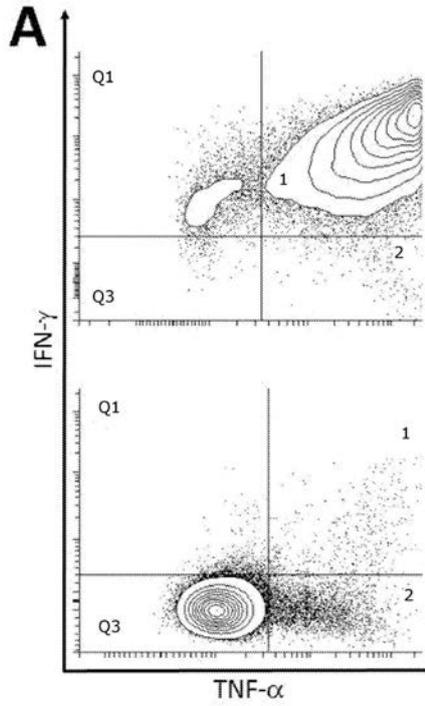
【 図 1 1 】



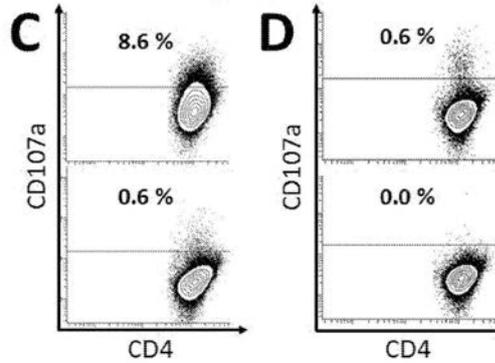
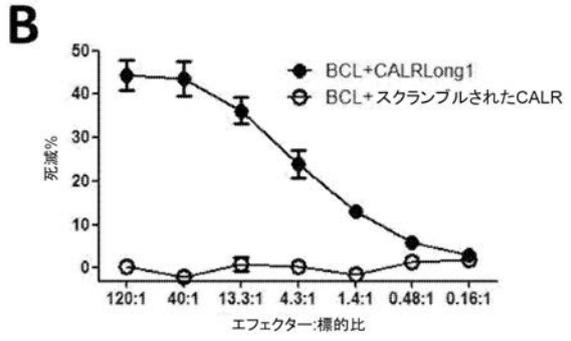
【 図 1 2 】



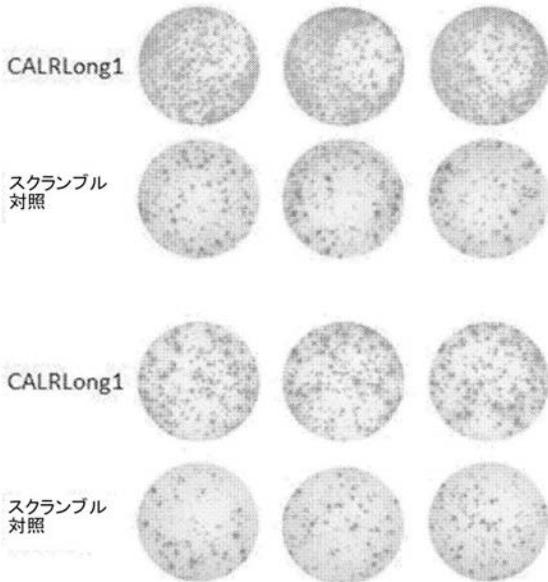
【 図 1 3 - 1 】



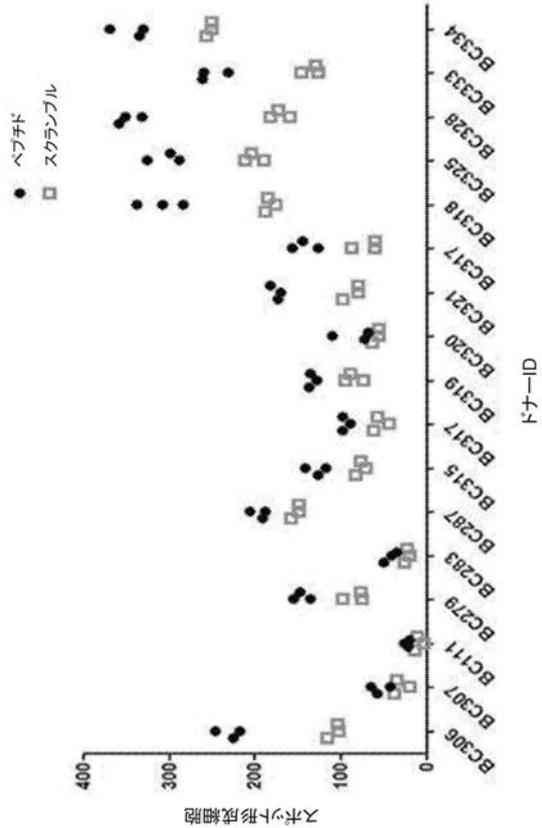
【 図 1 3 - 2 】



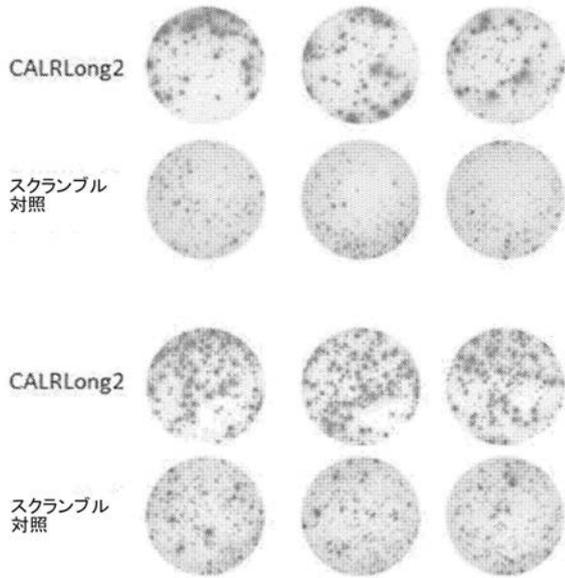
【 図 1 4 - 1 】



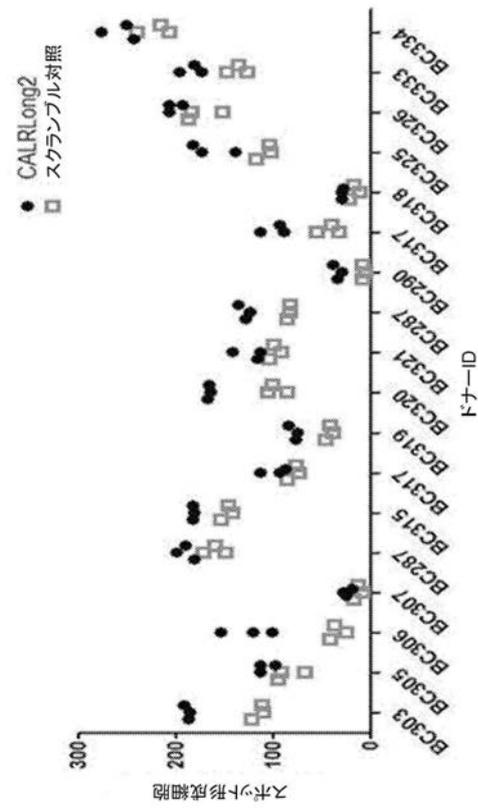
【 図 1 4 - 2 】



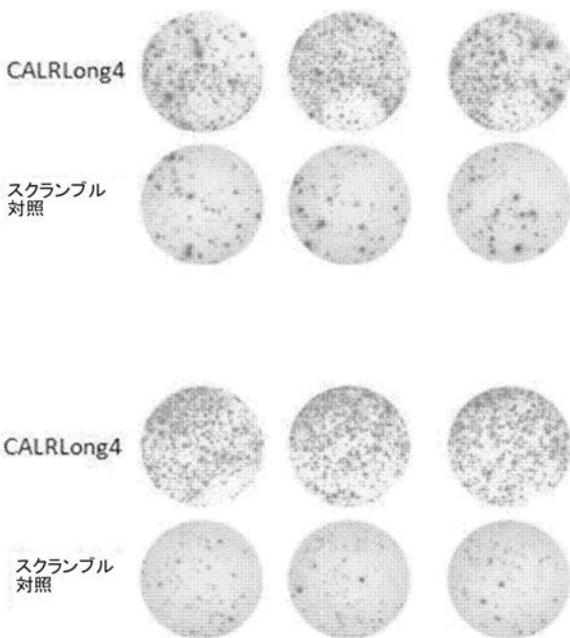
【 図 1 5 - 1 】



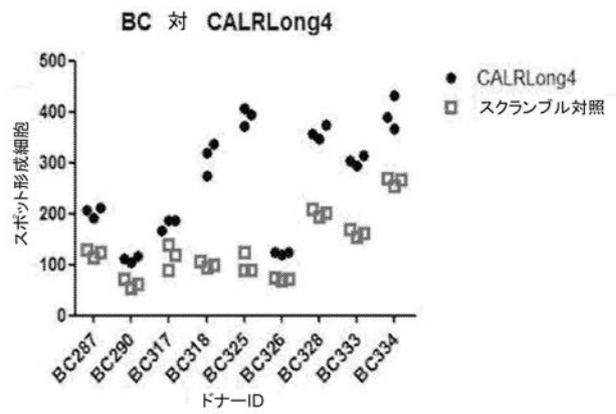
【 図 1 5 - 2 】



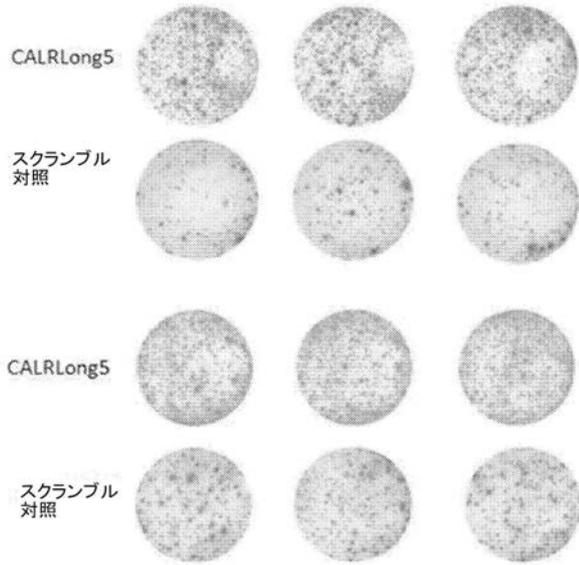
【 図 1 6 - 1 】



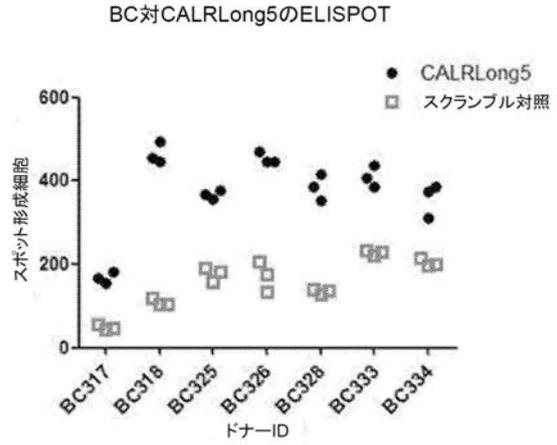
【 図 1 6 - 2 】



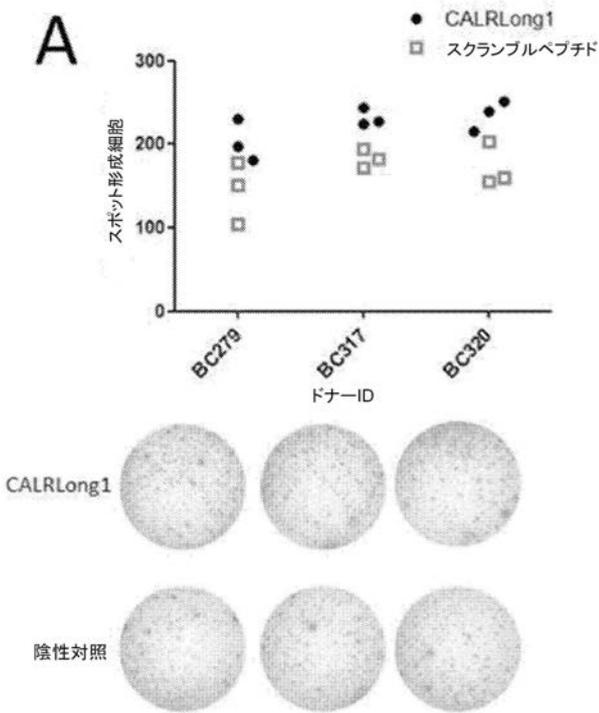
【 図 1 7 - 1 】



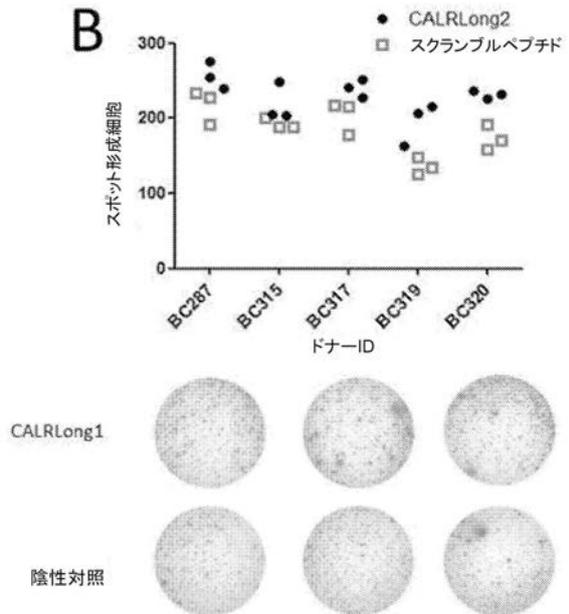
【 図 1 7 - 2 】



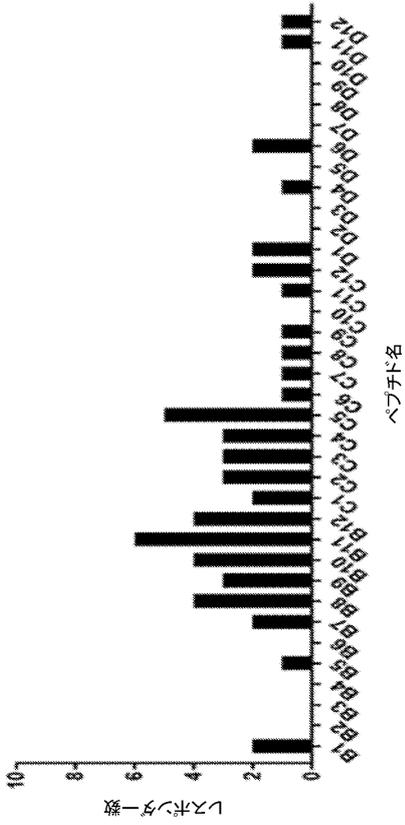
【 図 1 8 - 1 】



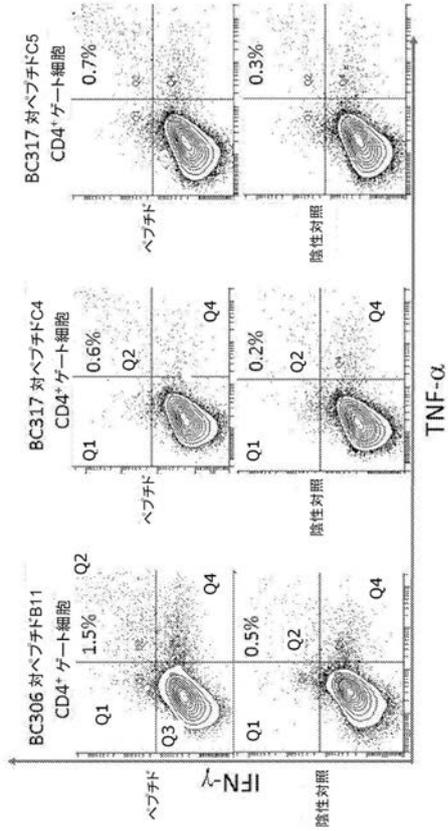
【 図 1 8 - 2 】



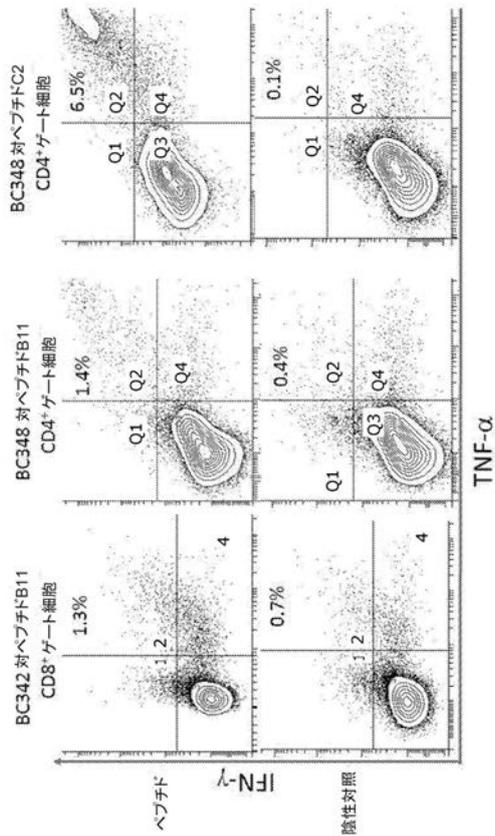
【 図 19 】



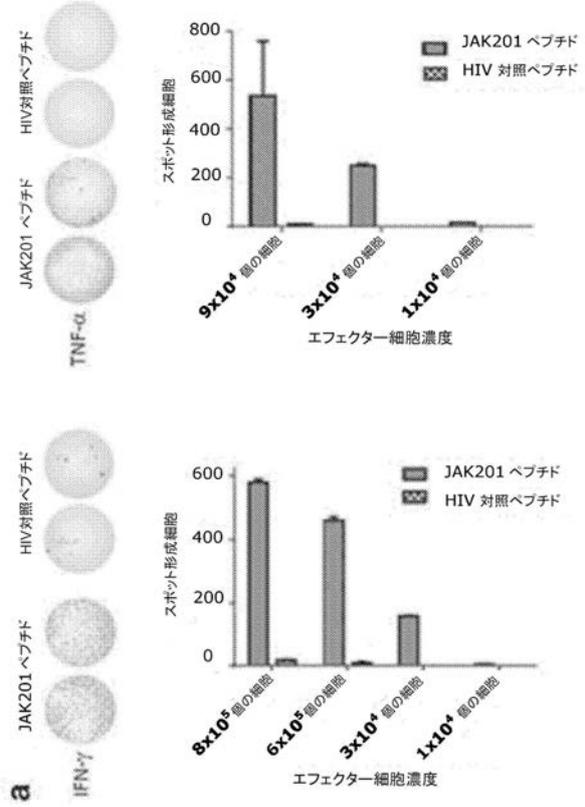
【 図 20 - 1 】



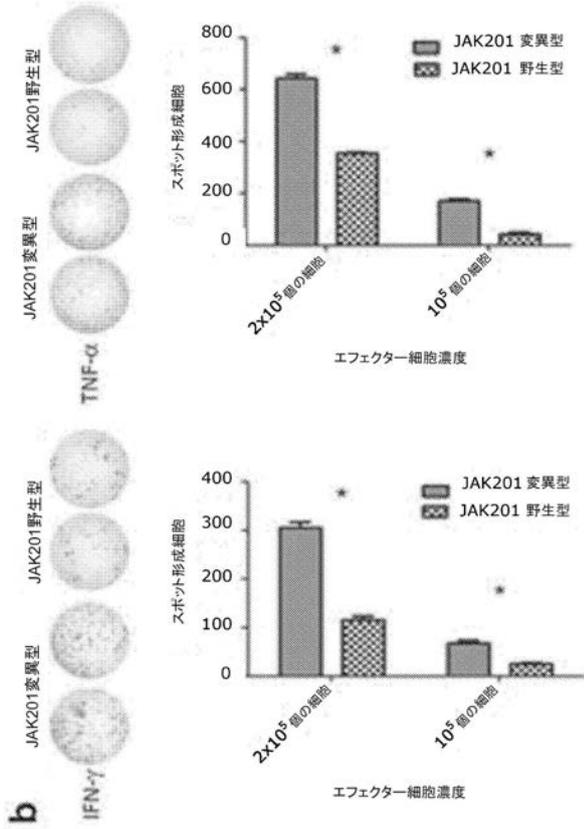
【 図 20 - 2 】



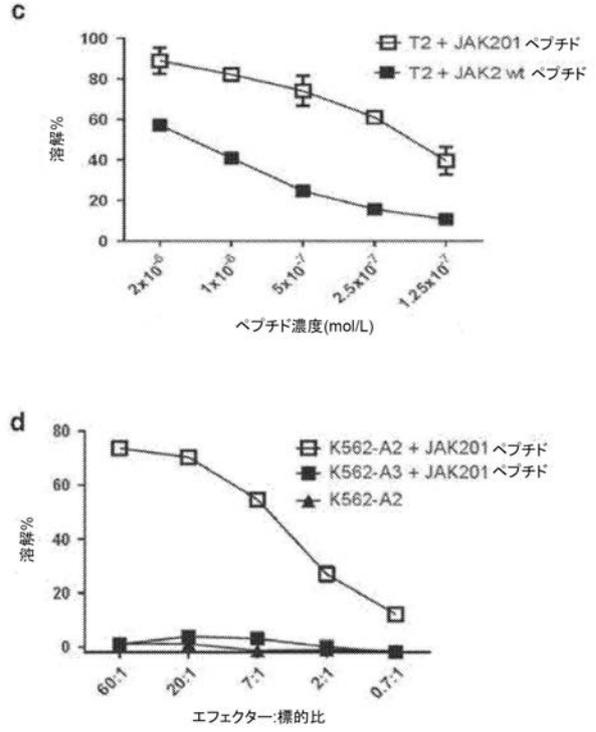
【 図 21 - 1 】



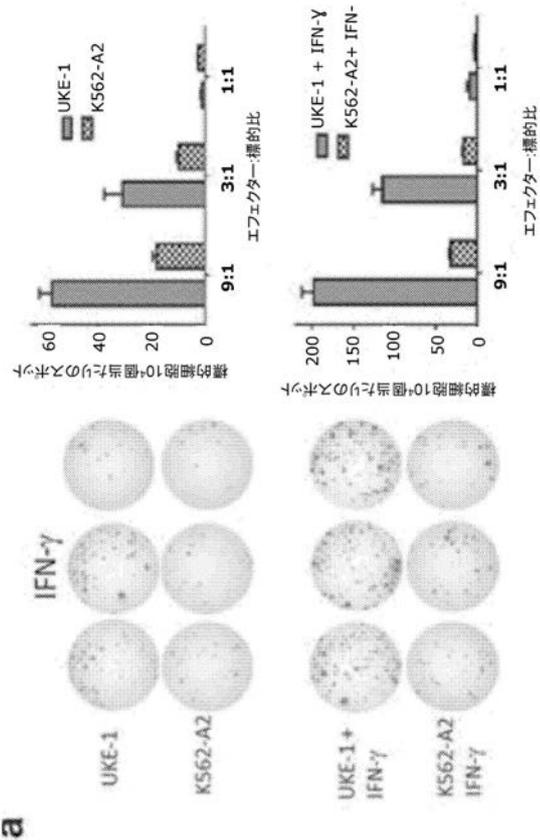
【図 2 1 - 2】



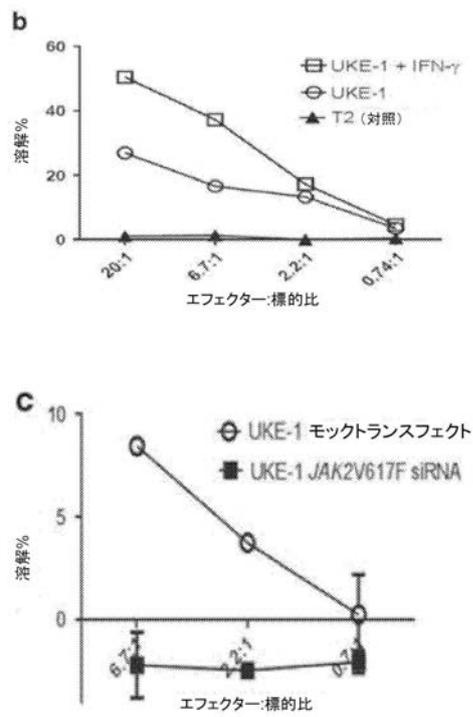
【図 2 1 - 3】



【図 2 2 - 1】

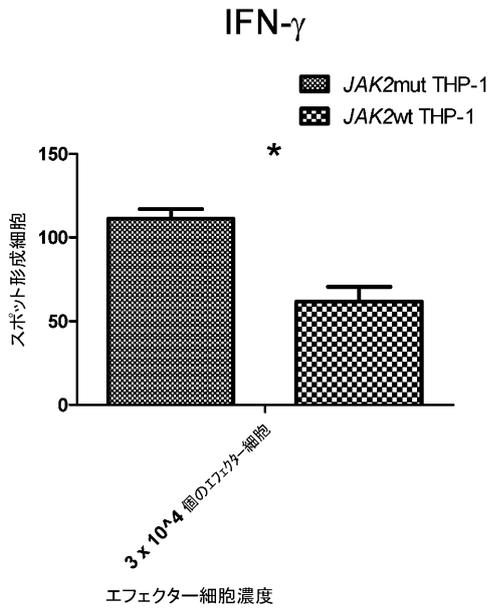


【図 2 2 - 2】



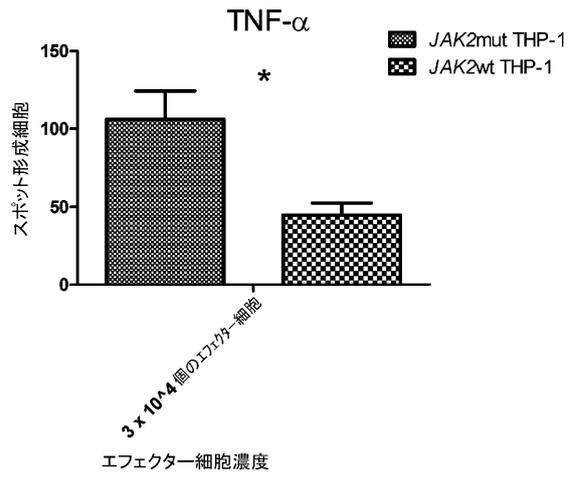
【 図 2 2 - 3 】

d



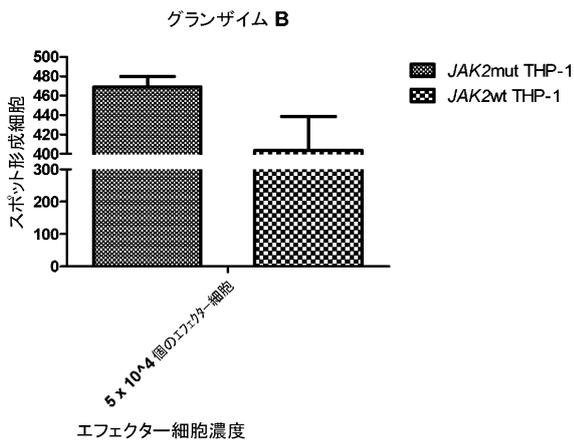
【 図 2 2 - 4 】

d (続き)



【 図 2 2 - 5 】

d (続き)



【配列表】

2019517544000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/DK2017/050190 |
|---|

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. A61K39/00 A61P35/00<br>ADD.   |  |   |  |  |
|--|--|---|--|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |   |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>A61K   |  |   |  |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  |  |   |  |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search  |  |   |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |   |  |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |  |  |
| X  | EP 2 808 338 A1 (CEMM FORSCHUNGSZENTRUM<br>FÜR MOLEKULARE MEDIZIN GMBH [AT])<br>3 December 2014 (2014-12-03)<br><br>paragraphs [0006], [0008] - [0010]<br>page 14, lines 8-39<br>page 15, lines 31-33,45-53<br>paragraphs [0314], [0317] - [0331],<br>[0334] - [0346]<br>sequences<br>4,112,32,132,144,128,8,12,136,140,44,<br>sequences<br>124,16,76,24,40,100,120,84,72,116,28,96,36<br>,80,48<br><br>-----<br>-/--  | 1-11,16,<br>20-26,<br>28-30,<br>34-36,<br>38-92,<br>97-99,<br>103-106 |  |  |
| <input checked="" type="checkbox"/>  | Further documents are listed in the continuation of Box C.   | <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.          |  |  |
| * Special categories of cited documents :  |  |   |  |  |
| <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;">           *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br/>           *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date<br/>           *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)<br/>           *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br/>           *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="vertical-align: top;">           *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<br/>           *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<br/>           *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<br/>           *&amp;* document member of the same patent family         </td> </tr> </table> |  |   | *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>*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)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*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<br>*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<br>*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<br>*&* document member of the same patent family |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>*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)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*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<br>*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<br>*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<br>*&* document member of the same patent family |   |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>23 November 2017  |  | Date of mailing of the international search report<br>01/12/2017      |  |  |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |  | Authorized officer<br>Noë, Veerle                                     |  |  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DK2017/050190

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |   |
|--|---|---|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.   |
| X  | WO 2016/087514 A1 (CEMM FORSCHUNGSZENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN GMBH [AT])<br>9 June 2016 (2016-06-09)<br>abstract<br>example 1<br>page 2, last paragraph<br>pages 6-7; sequences 35-70<br>-----   | 68,69   |
| X  | VANNUCCHI A M ET AL: "Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value.",<br>LEUKEMIA SEP 2014,<br>vol. 28, no. 9, September 2014 (2014-09),<br>pages 1811-1818, XP002766532,<br>ISSN: 1476-5551<br>abstract<br>page 1813, column 2, last paragraph<br>-----                      | 68,69   |
| A  | THORSTEN KLAMPFL ET AL: "Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms",<br>NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, THE -<br>NEJM -, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY,<br>vol. 369, no. 25,<br>19 December 2013 (2013-12-19), pages<br>2379-2390, XP002733585,<br>ISSN: 0028-4793, DOI:<br>10.1056/NEJMOA1311347<br>the whole document<br>----- | 1-11,16,<br>20-26,<br>28-30,<br>34-36,<br>38-92,<br>97-99,<br>103-106 |
| A  | J. NANGALIA ET AL: "Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2",<br>NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE,<br>vol. 369, no. 25,<br>10 December 2013 (2013-12-10), pages<br>2391-2405, XP055148137,<br>ISSN: 0028-4793, DOI:<br>10.1056/NEJMOa1312542<br>the whole document<br>-----<br>-/--                                    | 1-11,16,<br>20-26,<br>28-30,<br>34-36,<br>38-92,<br>97-99,<br>103-106 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/DK2017/050190

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |  |
|--|--|--|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| X  | <p>WO 2007/047653 A2 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]; SCHEINBERG DAVID A [US]; MAY RENA J) 26 April 2007 (2007-04-26)</p> <p>abstract<br/> page 1, paragraph 2<br/> page 2, paragraph 2<br/> page 4, paragraph 2 - page 6, paragraph 2<br/> page 8, paragraph 1 - page 13, paragraph 1<br/> page 13, last paragraph - page 14, paragraph 2<br/> page 15, paragraph 3 - page 18, paragraph 2<br/> page 19, paragraph 2<br/> claims 1-52; examples 2,4,5,6</p> <p>-----</p>        | <p>1,2,8,<br/> 12-25,<br/> 27,28,<br/> 31-33,<br/> 37-67,<br/> 70-88,<br/> 93-96,<br/> 100-102,<br/> 107-110</p> |
| X  | <p>Rena May: "Generation of Specific Human CD8+ T Cell Responses to the Myeloproliferative Disorder Associated V617F Mutated JAK2 Kinase by Use of Analog Peptide Vaccine Candidates." Blood Journal",</p> <p>1 January 2005 (2005-01-01), XP55428025, Retrieved from the Internet:<br/> URL:<a href="http://www.bloodjournal.org/content/106/11/3512">http://www.bloodjournal.org/content/106/11/3512</a><br/> [retrieved on 2017-11-23]<br/> the whole document</p> <p>-----</p> | <p>73,76,<br/> 80,81,<br/> 93-96,<br/> 100-102,<br/> 107-110</p>   |
| X  | <p>WO 2006/045827 A1 (ASSIST PUBL HOPITAUX DE PARIS [FR]; EDICALE INSERM INST NAT DE LA [FR]) 4 May 2006 (2006-05-04)<br/> page 1, paragraph 1<br/> page 5, lines 21-26<br/> page 19, line 13 - page 21, line 7</p> <p>-----</p>   | <p>68,69</p>   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DK2017/050190**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.:  
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:

see additional 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 an 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.:
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 Application No. PCT/DK2017/050190

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 3-7, 9-11, 26, 30, 34-36, 89-92, 97-99, 103-106(completely); 1, 2, 8, 16, 20-25, 28, 29, 38-88(partially)

A vaccine composition for use in treatment of prophylaxis of myeloproliferative disorder comprising a peptide of the C-terminus exon 9 mutant of CALR. Kit of parts comprising the vaccine composition. Method of detection of the exon 9 mutant reactive T cells. Molecule binding specifically to the peptide fragment. Method of treatment comprising administering the vaccine composition. Method of monitoring the immunisation. Method of treatment comprising administering the vaccine composition. Method of monitoring the immunisation. A composition comprising cells specifically recognizing exon 9 mutant CALR. A peptide derived from CALR or an exon 9 mutant of CALR and a pharmaceutical composition comprising the peptide and a method of treatment comprising administering the peptide.

---

2. claims: 12-15, 17-19, 27, 31-33, 37, 93-96, 100-102, 107-110(completely); 1, 2, 8, 16, 20-25, 28, 29, 38-88(partially)

A vaccine composition for use in treatment of prophylaxis of myeloproliferative disorder comprising a peptide of the JAK2V617F mutant (comprising at least amino acid 617). Kit of parts comprising the vaccine composition. Method of detection of the exon 9 mutant reactive T cells. Molecule binding specifically to the peptide fragment. Method of treatment comprising administering the vaccine composition. Method of monitoring the immunisation. . A composition comprising cells specifically recognizing JAK2V617F. A peptide derived from JAK2 of of JAK2V617F and a pharmaceutical composition comprising the peptide and a method of treatment comprising administering the peptide.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DK2017/050190

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date   |            |
|--|------------------|-------------------------|--------------------|------------|
| EP 2808338                             | A1               | 03-12-2014              | AU 2014320262 A1   | 10-03-2016 |
|  |                  |                         | CA 2924370 A1      | 19-03-2015 |
|  |                  |                         | CN 105916876 A     | 31-08-2016 |
|  |                  |                         | DK 2808338 T3      | 06-06-2016 |
|  |                  |                         | EP 2808338 A1      | 03-12-2014 |
|  |                  |                         | EP 3020727 A1      | 18-05-2016 |
|  |                  |                         | ES 2577289 T3      | 14-07-2016 |
|  |                  |                         | JP 2016537012 A    | 01-12-2016 |
|  |                  |                         | KR 20160068754 A   | 15-06-2016 |
|  |                  |                         | PL 2808338 T3      | 30-09-2016 |
|  |                  |                         | PT 2808338 E       | 15-06-2016 |
|  |                  |                         | RU 2016114509 A    | 18-10-2017 |
|  |                  |                         | SG 11201601193T A  | 28-04-2016 |
|  |                  |                         | US 2015079091 A1   | 19-03-2015 |
|  |                  |                         | US 2016251723 A1   | 01-09-2016 |
|  |                  |                         | WO 2015036599 A1   | 19-03-2015 |
|  |                  |                         | -----              |            |
| WO 2016087514                          | A1               | 09-06-2016              | EP 3227341 A1      | 11-10-2017 |
|  |                  |                         | US 2017269092 A1   | 21-09-2017 |
|  |                  |                         | WO 2016087514 A1   | 09-06-2016 |
| -----                                  |                  |                         |                    |            |
| WO 2007047653                          | A2               | 26-04-2007              | NONE               |            |
| -----                                  |                  |                         |                    |            |
| WO 2006045827                          | A1               | 04-05-2006              | AT 382082 T        | 15-01-2008 |
|  |                  |                         | AU 2005298636 A1   | 04-05-2006 |
|  |                  |                         | BR PI0517398 A     | 14-10-2008 |
|  |                  |                         | CA 2585062 A1      | 04-05-2006 |
|  |                  |                         | CA 2647086 A1      | 04-05-2006 |
|  |                  |                         | CA 2754028 A1      | 04-05-2006 |
|  |                  |                         | CN 101072870 A     | 14-11-2007 |
|  |                  |                         | DE 602005004008 T2 | 12-02-2009 |
|  |                  |                         | DK 1692281 T3      | 13-05-2008 |
|  |                  |                         | EP 1692281 A1      | 23-08-2006 |
|  |                  |                         | EP 1895000 A1      | 05-03-2008 |
|  |                  |                         | ES 2296229 T3      | 16-04-2008 |
|  |                  |                         | FR 2877013 A1      | 28-04-2006 |
|  |                  |                         | HK 1094974 A1      | 03-04-2008 |
|  |                  |                         | JP 5090171 B2      | 05-12-2012 |
|  |                  |                         | JP 5290884 B2      | 18-09-2013 |
|  |                  |                         | JP 6103691 B2      | 29-03-2017 |
|  |                  |                         | JP 2008517613 A    | 29-05-2008 |
|  |                  |                         | JP 2009278982 A    | 03-12-2009 |
|  |                  |                         | JP 2013135673 A    | 11-07-2013 |
|  |                  |                         | KR 20070104338 A   | 25-10-2007 |
|  |                  |                         | PT 1692281 E       | 06-02-2008 |
|  |                  |                         | US 2006288432 A1   | 21-12-2006 |
|  |                  |                         | US 2008076135 A1   | 27-03-2008 |
|  |                  |                         | US 2009162849 A1   | 25-06-2009 |
|  |                  |                         | US 2012066776 A1   | 15-03-2012 |
|  |                  |                         | US 2013189683 A1   | 25-07-2013 |
| US 2014249204 A1                       | 04-09-2014       |                         |                    |            |
| WO 2006045827 A1                       | 04-05-2006       |                         |                    |            |
| ZA 200703433 B                         | 27-08-2008       |                         |                    |            |
| -----                                  |                  |                         |                    |            |

## 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 35/02 (2006.01)   | A 6 1 P 35/02   | 4 H 0 4 5  |
| A 6 1 K 39/39 (2006.01)   | A 6 1 K 39/39   |            |
| A 6 1 K 35/76 (2015.01)   | A 6 1 K 35/76   |            |
| A 6 1 K 48/00 (2006.01)   | A 6 1 K 48/00   |            |
| A 6 1 K 35/12 (2015.01)   | A 6 1 K 35/12   |            |
| A 6 1 K 35/15 (2015.01)   | A 6 1 K 35/15   | Z          |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01)   | A 6 1 K 45/00   |            |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01)   | A 6 1 P 43/00   | 1 2 1      |
| A 6 1 K 38/20 (2006.01)   | A 6 1 K 38/20   |            |
| A 6 1 K 31/43 (2006.01)   | A 6 1 K 31/43   |            |
| A 6 1 K 31/522 (2006.01)  | A 6 1 K 31/522  |            |
| A 6 1 K 31/7076 (2006.01) | A 6 1 K 31/7076 |            |
| A 6 1 K 38/21 (2006.01)   | A 6 1 K 38/21   |            |
| A 6 1 K 38/02 (2006.01)   | A 6 1 K 38/02   |            |
| A 6 1 K 47/64 (2017.01)   | A 6 1 K 47/64   |            |
| C 0 7 K 16/30 (2006.01)   | C 0 7 K 16/30   | Z N A      |
| C 0 7 K 14/82 (2006.01)   | C 0 7 K 14/82   |            |
| C 0 7 K 14/725 (2006.01)  | C 0 7 K 14/725  |            |
| C 1 2 N 15/12 (2006.01)   | C 1 2 N 15/12   |            |

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72)発明者 ホルムストローム, モルテン オレボ  
デンマーク国 4 0 0 0 ロスキレ, オデンスヴァイ 6 0

(72)発明者 ハッセルバルヒ, ハンス  
デンマーク国 2 8 6 0 セーボー, マイ アッレ 9 0

Fターム(参考) 4C076 CC41 EE41 EE59  
4C084 AA02 AA07 AA13 BA44 DA12 DA24 NA05 NA14 ZA02 ZA51  
ZB09 ZB26 ZB27 ZC75  
4C085 AA03 BB11 BB23 EE01 EE03 FF17 FF19 FF24  
4C086 AA01 AA02 CB07 CC04 EA04 MA01 MA02 MA04 NA05 NA14  
ZA02 ZA51 ZB26 ZB27 ZC75  
4C087 AA01 AA02 BB44 BB65 BC83 CA12 NA05 NA14 ZA02 ZA51  
ZB26 ZB27 ZC75  
4H045 AA11 AA30 CA41 DA50 DA76 DA86 EA20 FA74