

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-511108

(P2025-511108A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 0 7 K	14/72 (2006.01)	C 0 7 K	14/72	Z N A	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 8 6
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 C 0 8 7
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00		4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全60頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-557888(P2024-557888)	(71)出願人	511294534
(86)(22)出願日	令和5年3月31日(2023.3.31)		ユニベルシテ カソリック デ ルーベン
(85)翻訳文提出日	令和6年11月21日(2024.11.21)		ベルギー国, 1 3 4 8 ルーベン - ラ -
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/058572		ヌーベ, プラセ デ ルニベルシテ 1
(87)国際公開番号	WO2023/187201	(74)代理人	100114775
(87)国際公開日	令和5年10月5日(2023.10.5)		弁理士 高岡 亮一
(31)優先権主張番号	22166302.4	(74)代理人	100121511
(32)優先日	令和4年4月1日(2022.4.1)		弁理士 小田 直
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)	(74)代理人	100202751
			弁理士 岩堀 明代
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,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)	(74)代理人	100208580
	最終頁に続く		弁理士 三好 玲奈
		(74)代理人	100227329
			弁理士 延原 愛
		(72)発明者	コンスタンチネスク, ステファン
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トロンボポエチン受容体フラグメントおよびそれらの使用

(57)【要約】

本発明は、トロンボポエチン受容体の細胞外ドメインのフラグメントを含むポリペプチド、前記ポリペプチドを含む融合タンパク質および医薬組成物、ならびにそれらの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

PLKCF SX₂TFX₁X₁LTCFWX₁X₁X₁X₁AAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCFPX₁QX₁X₁VX₂(配列番号66)と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、X₁がD(Asp、アスパラギン酸)またはE(Glu、グルタミン酸)であり、X₂がR(Arg、アルギニン)またはK(Lys、リジン)であり、前記ポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号5を含まない、ポリペプチド。

【請求項 2】

前記アミノ酸配列が、配列番号2、配列番号3、または配列番号4と少なくとも75%の配列同一性を有する、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記ポリペプチドが、C末端テールに正に荷電したアミノ酸配列を有するカルレティキュリン(CALR)の変異体に結合する、請求項1または2に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記アミノ酸配列が、配列番号7および/または117位の少なくとも1つのアミノ酸Asnを含み、前記位置が、配列番号1のアミノ酸配列に関して定義される、請求項1~3のいずれか1項に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記117位のアミノ酸Asnが、グリコシル化されていない、請求項4に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

請求項1~5のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む、融合タンパク質。

【請求項 7】

前記第1のポリペプチドの安定性を増加させ、および/または免疫原性を減少させる第2のポリペプチドをさらに含む、請求項6に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

前記第2のポリペプチドが、好ましくはIgG、IgA、IgD、IgE、またはIgMを含むかまたはからなる群から選択される、免疫グロブリンのFc領域またはその機能的等価物である、請求項7に記載の融合タンパク質。

【請求項 9】

請求項1~5のいずれか1項に記載のポリペプチドまたは前記ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする配列を含む、核酸。

【請求項 10】

請求項9に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 11】

(i)請求項1~5のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項6~8のいずれか1項に記載の融合タンパク質、請求項9に記載の核酸、または請求項10に記載のベクターと、(ii)少なくとも1つの薬学的に許容されるビヒクルとを含む、医薬組成物。

【請求項 12】

医薬として使用するための、請求項1~5のいずれか1項に記載のポリペプチド、請求項6~8のいずれか1項に記載の融合タンパク質、請求項9に記載の核酸、請求項10に記載のベクター、または請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

骨髄増殖性腫瘍(MPN)の処置および/または防止に使用するための、請求項12に記載のポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物。

【請求項 14】

前記MPNが、カルレティキュリン(CALR)の1つ以上の変異により誘導され、好ましくはCALRのC末端に正に荷電したアミノ酸配列の産生をもたらす、請求項13に

10

20

30

40

50

記載のポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物。

【請求項 15】

骨髄増殖性腫瘍 (MPN) を処置および / または防止するためのキットであって、(i) 請求項 12 ~ 14 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物と、(ii) 前記ポリペプチド、融合タンパク質、または医薬組成物を投与するための手段と、任意選択で (iii) さらなる抗がん剤またはワクチンを含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、トロンボポエチン受容体の少なくとも 1 つのフラグメントを含むポリペプチドおよび医薬としてのその使用に関する。また本発明は、骨髄増殖性腫瘍 (MPN) の処置および / または防止にも関する。

【背景技術】

【0002】

悪性血液疾患は、医療制度に深刻な負担を強いている。このようないくつかの状態、たとえば BCR - ABL 陰性骨髄増殖性腫瘍 (MPN) は、高齢者の疾患であり、血栓症および出血を含む多くの合併症を伴い、処置に多くの医療資源を必要とする。MPN は、ほぼ常に致死性である続発性急性骨髄白血病 (AML) と呼ばれる非常に重篤な状態に発展し得る。3 つの主要な MPN 種、すなわち真性多血症 (PV)、本態性血小板血症 (Essential Thrombocythemia) (ET)、および骨髄線維症 (MF) は、小児および青年で発症し得るが、高齢者において最も一般的であり、発症率は、1 年あたり 5000 人に 1 人に達し得る。3 つ全ての疾患において、造血幹細胞 (HSC) の後天性変異が、病態を駆動する TPOR / JAK2 シグナル伝達の病的な活性化をもたらす。

【0003】

JAK2 V617F 変異は、全ての MPN の 70% の原因となり、PV の 96% 超ならびに ET および MF 症例の 60% に存在し、全体の 70% が BCR - ABL 陰性 MPN に関与する。ET および MF の残りの症例の大部分は、カルレチキュリン (CALR) (20 ~ 30%)、N - グリコシル化タンパク質の品質管理およびカルシウム貯蔵のため小胞体に保持されているシャペロン、ならびに / またはトロンボポエチン受容体 (TPOR) (3 ~ 5%) の後天性変異によるものである。

【0004】

JAK2 V617F 変異が、受容体に付随する変異体 JAK2 分子の偽キナーゼドメイン間の相互作用により、サイトカインの非存在下でその細胞内ドメインを介して受容体の二量体化を誘導することにより作用したことが示された。

【0005】

CALR 変異体が、TPOR に結合してそのリガンドのトロンボポエチン (THPO または TPO) の非存在下でその活性化を誘導し、HSC および巨核球における JAK2 - STAT5 経路の持続的な活性化をもたらすこともまた、解明された (Chachoua et al., 2016; Pecquet et al., 2019)。Chachoua et al., 2016 はまた、TPOR のある領域およびその関連する N - グリコシル化部位 (N117) が、CALR 変異体の活性に必要であることも開示している。Pecquet et al., 2019 は、TPOR の FFPLHWLV モチーフが活性化に重要であるが、結合には重要ではないことを記載している。

【0006】

CALR の最後のエクソンのエクソン 9 において異なる変異が同定されている。MPN では、CALR における 60 超のヌクレオチドの欠失または挿入が記載されているが、これらの全てが、同じ +1 フレームシフトをもたらす、これは、メチオニンに富み、正に荷電しており、および保持 KDEL モチーフを欠いている CALR の新規 C 末端 (変異体 C

10

20

30

40

50

テールまたは変異体テールとも表される)の合成に寄与する。CALRの新規テールは、TPORに対する強固な結合を付与する。TPOR-CALR変異体複合体は、細胞表面に移行し、TPORが発現される巨核球前駆体および幹細胞においてJAK2/STAT5経路の構成的活性化を誘導する。

【0007】

ドライバー変異にかかわらず、アウトカムは常に、TPORを介して、および程度は低いものの他のサイトカイン受容体を介してJAK2-STAT5経路の過剰活性化である(JAK2変異体ではEpoR、JAK2変異体およびCALR変異体ではG-CSFR)。今日まで、治療介入は、非特異的JAK2阻害剤に焦点を当てていたが、対立遺伝子負荷(allele burden)、芽球、および線維症を減少させるという意味で適切な臨床応答を提供しなかった。3つ全ての疾患の発症に関するTPORの絶対的な必要性および中心的な役割により、TPORは治療介入の主要な標的となっているが、いまだ十分に研究されてはいない。

【0008】

本発明者らは、TPORの特定のドメインまたはサブドメインが、CALR変異体との相互作用に関与しており、全てのタイプのMPNの発症にとって極めて重要である異常に高いTPORにより誘導されるシグナル伝達を完全に(competete)または部分的に遮断することを示している。

【発明の概要】

【0009】

よって本発明は、配列番号66と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、前記ポリペプチドの前記アミノ酸配列が配列番号5を含まない、ポリペプチドに関する。

【0010】

よって本発明は、配列番号2と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、前記ポリペプチドの前記アミノ酸配列が配列番号5を含まない、ポリペプチドに関する。

【0011】

よって本発明は、配列番号2と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、前記ポリペプチドの前記アミノ酸配列が配列番号6を含まない、ポリペプチドに関する。

【0012】

一部の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号2、配列番号3、または配列番号4と少なくとも75%の配列同一性を有する。

【0013】

一部の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号3、配列番号4、または配列番号5と少なくとも75%の配列同一性を有する。

【0014】

一部の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号5を含まない。

【0015】

一部の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号3または配列番号4と少なくとも75%の配列同一性を有する。

【0016】

一部の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも配列番号7を含む。

【0017】

一部の実施形態では、ポリペプチドは、C末端テールに正に荷電したアミノ酸配列を有するカルレティキュリン(CALR)の変異体に結合する。

【0018】

一部の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号7、および/または117位で少なくとも1つのアミノ酸Asnを含み、前記位置は、配列番号1のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列に関して定義されている。

【0019】

一部の実施形態では、117位のアミノ酸Asnは、グリコシル化されている。

【0020】

一部の実施形態では、117位のアミノ酸Asnは、グリコシル化されていない。

【0021】

本発明はさらに、本発明のポリペプチドを含む融合タンパク質に関する。

【0022】

一実施形態では、融合タンパク質は、第1のポリペプチドの安定性を増加させ、および/または免疫原性を減少させる第2のポリペプチドをさらに含む。

10

【0023】

一実施形態では、融合タンパク質の第2のポリペプチドは、好ましくはIgG、IgA、IgD、IgE、またはIgMを含むかまたはからなる群から選択される、免疫グロブリンのFc領域またはその機能的等価物である。

【0024】

本発明はさらに、本発明のポリペプチドまたは前記ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする配列を含む核酸に関する。

【0025】

さらに本発明は、本発明のポリペプチドまたは前記ポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする核酸を含むベクターに関する。

20

【0026】

本発明はさらに、(i)本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、またはベクターと、(ii)少なくとも1つの薬学的に許容されるビヒクルとを含む医薬組成物に関する。

【0027】

本発明はさらに、医薬として使用するための、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物に関する。

【0028】

一部の実施形態では、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物は、骨髄増殖性腫瘍(MPN)の処置および/または防止に使用するためのものである。

30

【0029】

一部の実施形態では、MPNは、カルレティキュリン(CALR)の1つ以上の変異により誘導され、好ましくはCALRのC末端に正に荷電したアミノ酸配列の産生をもたらす。

【0030】

本発明はさらに、骨髄増殖性腫瘍(MPN)を処置および/または防止するためのキットであって、(i)本発明に係る使用のためのポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物と、(ii)前記ポリペプチド、融合タンパク質、または医薬組成物を投与するための手段と、任意選択で(iii)さらなる抗がん剤とを含む、キットに関する。

40

【発明を実施するための形態】

【0031】

定義

本発明において、以下の用語は、以下の意味を有する。

【0032】

用語「約」は、数字の前にある場合、前記数値の±10%を意味する。

【0033】

用語「アミノ酸置換」は、ポリペプチドにおける1つのアミノ酸の別のアミノ酸との置き換えを指す。一実施形態では、アミノ酸は、たとえば保存的アミノ酸の置き換えといっ

50

た、類似の構造および/または化学的特性を有する別のアミノ酸と置き換えられる。「保守的アミノ酸置換」は、関与する残基の極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性、および/または両親媒性性質の類似性に基づいて行われ得る。たとえば、非極性(疎水性)アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、およびメチオニンを含み;極性中性アミノ酸は、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、アスパラギン、およびグルタミンを含み;正に荷電した(塩基性)アミノ酸として、アルギニン、リジン、およびヒスチジンを含み、負に荷電した(酸性)アミノ酸は、アスパラギン酸およびグルタミン酸を含む。非保守的置換は、これらクラスの1つのメンバーを別のクラスのメンバーと交換することを伴う。たとえば、アミノ酸置換はまた、1つのアミノ酸を異なる構造および/または化学的な特性を有する別のアミノ酸と置き換えること、たとえば、1つのグループ(たとえば極性)からのアミノ酸を異なるグループ(たとえば塩基性)からのアミノ酸と置き換えることをもたらし得る。アミノ酸置換は、当該分野で周知の遺伝的または化学的方法を使用して作製され得る。遺伝的方法は、部位特異的変異誘発、PCR、遺伝子合成などを含み得る。遺伝子操作以外の方法、たとえば化学修飾によりアミノ酸の側鎖を変化させる方法もまた有用であり得ることが企図されている。

10

【0034】

用語「同一性」は、ヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の同一性の測定を指す。一般的に、配列を、最上位の一致が得られるように整列させる。「同一性」自体は、当該技術分野で認識されている意味を有し、公開されている技術を使用して計算され得る。たとえば

: Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis Of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis In Molecular Biology, von Heijne, G., Academic Press, 1987; および Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds, M Stockton Press, New York, 1991を参照されたい。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列間の同一性を測定するための多くの方法が存在しており、用語「同一性」は、当業者に周知である(Carillo and Lipton, SIAM J Applied Math, 1998, 48:1073)。2つの配列間の同一性または類似性を決定するために一般に使用される方法は、限定するものではないが、Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, ed., Academic Press, San Diego, 1994; および Carillo and Lipton, SIAM J Applied Math, 1998, 48:1073に開示されるもの

を含む。同一性および類似性を決定する方法は、コンピュータプログラムで体系化されている。2つの配列間の同一性および類似性を決定するためのコンピュータプログラム法として、限定するものではないが、GCGプログラムパッケージ(Devereux et al., J Molec Biol, 1990, 215:403)、GAPプログラムが挙げられる。例示として、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも、たとえば95%の「同一性」を有するヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、ポリヌクレオチド配列が参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチドあたり平均で最大5つの点変異を含み得ることを除き、参照配列と同一であることが意図される。言い換えると、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るためには、参照配列のヌクレオチドの最大

20

30

40

50

5%が、欠失され得るもしくは別のヌクレオチドと置換され得るか、または参照配列の総ヌクレオチドの最大5%の数のヌクレオチドが、参照配列内に挿入され得る。参照配列のこれらの変異は、参照ヌクレオチド配列の5'末端もしくは3'末端の位置で起こり得るか、または参照配列のヌクレオチドの間で個別にもしくは参照配列内の1つ以上の連続したグループのいずれかに散在してこれらの末端位置の間のいずれかで起こり得る。

【0035】

用語「ペプチドリナー」または「リンカー」は、「スパーサーペプチド」とも呼ばれ、共に2つのペプチドまたはポリペプチドを結合するために使用されるペプチドを指す。一実施形態では、本発明のペプチドリナーは、3~50アミノ酸を含む。ペプチドリナーは、当該分野で公知であるか、または本明細書に記載されている。

10

【0036】

用語「薬学的に許容される賦形剤」は、動物、好ましくはヒトに投与する際に、有害な反応、アレルギー反応、または他の望ましくない反応をもたらさない賦形剤を指す。これは、あらゆる全ての溶媒、分散媒体、コーティング剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。薬学的に許容される担体または賦形剤は、任意のタイプの非毒性の固体、半固体、または液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材料または製剤化助剤を指す。ヒトに投与するためには、FDA局の生物製剤の基準が求める無菌性、発熱性、全般的安全性、および純度の基準に一致しなければならない。

【0037】

用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、非修飾RNAもしくはDNAまたは修飾RNAもしくはDNAであり得る、いずれかのポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを指す。「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、限定するものではないが、一本鎖DNAおよび二本鎖DNA、一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖RNAおよび二本鎖RNA、ならびに一本鎖領域および二本鎖領域の混合物であるRNA、一本鎖、より典型的には二本鎖または一本鎖領域と二本鎖領域の混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を含む。さらに、「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、RNAもしくはDNA、またはRNAおよびDNAの両方を含む三本鎖(triple-stranded)領域を指す。用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」はまた、1つ以上の修飾された塩基を含むDNAまたはRNA、および安定性または他の理由のため修飾された骨格を伴うDNAまたはRNAをも含む。「修飾された」塩基は、たとえば、トリチル化された塩基および通常にない塩基、たとえばイノシンを含む。様々な修飾がDNAおよびRNAになされており；よって「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、通常天然に見出される化学的に、酵素により、または代謝により修飾された形態のポリヌクレオチド；ならびにウイルスおよび細胞の特徴であるキメラ形態のDNAおよびRNAを包有する。「ポリヌクレオチド」はまた、多くの場合オリゴヌクレオチドと呼ばれる、比較的短いポリヌクレオチドも包有する。

20

30

【0038】

用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合、すなわちペプチドアイソスターにより互いに結合した2つ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドまたはタンパク質を指す。「ポリペプチド」は、一般にペプチド、オリゴペプチド、またはオリゴマーと呼ばれる短い鎖、および一般的にタンパク質と呼ばれるより長い鎖の両方を指す。ポリペプチドは、20の遺伝子コードアミノ酸以外のアミノ酸を含み得る。

40

【0039】

用語「タンパク質」は、100超のアミノ酸の配列および/または多量体の実体を指す。本発明のタンパク質は、特定の長さの産物に限定されない。用語「ポリペプチド」または「タンパク質」は、タンパク質の発現後の修飾、たとえばグリコシル化、アセチル化、リン酸化など、ならびに天然に存在するものおよび天然に存在しないものを含む当該分野で公知の他の修飾を指さず、またはこれを除外する。このような修飾は、基本的なテキストおよびより詳述された研究書、ならびに多量の研究文献に十分に記載されている。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、およびアミノ末端またはカルボキシル末端を含む、ポ

50

リペプチドまたはタンパク質のいずれの場所でも起こり得る。同じタイプの修飾が、所定のポリペプチドまたはタンパク質のいくつかの部位で同じまたは様々な程度で存在し得ることが理解されている。また、所定のポリペプチドまたはタンパク質は、多くのタイプの修飾を含み得る。ポリペプチドまたはタンパク質は、ユビキチン化の結果として分岐してもよく、それらは、分岐を含むまたは含まない環状であってもよい。環状ポリペプチドまたはタンパク質、分岐したポリペプチドまたはタンパク質、および分岐した環状ポリペプチドまたはタンパク質は、翻訳後の天然のプロセスからもたらされてもよく、または合成方法により作製されてもよい。修飾は、アセチル化、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol) の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカーの形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化 (arginylation) などのタンパク質へのアミノ酸のアミノの転移RNA媒介付加、およびユビキチン化を含む。たとえば、Proteins - structure and molecular properties", 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wolt, F., "Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects", Posttranslational covalent modification of proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983, pgs. 1-12; Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", Meth Enzymol, 1990, 182:626-646; Rattan et al, "Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging", Ann NY Acad Sci, 1992, 663:48-62を参照されたい。タンパク質は、タンパク質全体またはその部分配列であり得る。

【0040】

用語「融合タンパク質」は、直接またはアミノ酸リンカーを介して共有結合により連結された少なくとも2つの異種ポリペプチドを有するタンパク質を指す。融合タンパク質を形成するポリペプチドは、典型的に、C末端からN末端に連結されるが、これらはまた、C末端とC末端、N末端とN末端、またはN末端とC末端も連結することができる。融合タンパク質のポリペプチドは、任意の順序で融合され得る。またこの用語は、保存的に修飾されたバリエーション、多量体バリエーション、アレル、変異体、部分配列、および融合タンパク質を構成する抗原の種間ホモログを指す。

【0041】

用語「融合した」は、直接または1つ以上のペプチドリナーを介して、ペプチド結合により連結される成分を指す。

【0042】

用語「免疫グロブリン」は、それが何らかの関連する特有の免疫反応性を有するかどうかに関わらず、2つの重鎖および2つの軽鎖の組み合わせを有するタンパク質を指す。

【0043】

用語「～を処置すること (treating)」または「処置 (treatment)」または「軽減 (alleviation)」は、治療的処置および予防的もしくは防止的手段の両方を表し、この目的は、疾患または状態、好ましくは血液がん、より好ましくはMPNを防止または遅延 (減弱) させることである。処置を必要とするものは、すでに疾

10

20

30

40

50

患または状態、好ましくは血液がん、より好ましくはM P Nに罹患しているもの、ならびに疾患または状態、好ましくは血液がん、より好ましくはM P Nを有する傾向のあるもの、または疾患または状態、好ましくは血液がん、より好ましくはM P Nを防止すべきものを含む。対象または哺乳動物が、本発明の方法に係るポリペプチドまたは融合タンパク質の治療量を投与された後に、患者が、以下のうちの1つ以上の観察可能および/または測定可能な低減または非存在：病原細胞の数の低減；病原性である細胞の総数のパーセントの低減；および/または疾患または状態、好ましくは血液がん、より好ましくはM P Nに関連する1つ以上の症状のある程度までの緩和；罹患率および死亡率の低減；ならびにクオリティオブライフの問題の改善を示す場合、当該疾患または状態、好ましくは血液がん、より好ましくはM P Nの「処置」は成功している。疾患または状態、好ましくは血液がん、より好ましくはM P Nの処置の成功および改善を評価するためのパラメータは、医師に周知の通常の手順により容易に測定可能である。

【0044】

用語「バリエーション」は、参照ポリヌクレオチドまたは参照ポリペプチドとそれぞれ異なるが、本質的な特性を保持するポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。ポリヌクレオチドの典型的なバリエーションは、別の参照ポリヌクレオチドと、ヌクレオチド配列が異なる。バリエーションのヌクレオチド配列の変化は、参照ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を変更してもよく、または変更しなくてもよい。ヌクレオチドの変化は、以下に考察されるように、参照配列によりコードされるポリペプチドにアミノ酸の置換、付加、欠失、融合、およびトランケーションをもたらす得る。ポリペプチドの典型的なバリエーションは、別の参照ポリペプチドとアミノ酸配列が異なる。全般的に、参照ポリペプチドおよびバリエーションの配列が全体的に厳密に類似し、多くの領域で同一であるように、差異は限定的である。バリエーションおよび参照ポリペプチドは、任意の組み合わせの1つ以上の置換（好ましくは保存的置換）、付加、欠失、により、アミノ酸配列が異なり得る。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝子コードによりコードされても、されなくてもよい。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドのバリエーション、たとえばアレルバリエーションは、天然に存在してもよく、またはこれは、天然に存在することが既知ではないバリエーションであってもよい。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの天然に存在しないバリエーションは、変異誘発技術または直接合成により作製され得る。バリエーションは、参照ポリペプチドの生物学的な活性のうちの1つ以上を保持すべきである。

【0045】

詳細な説明

トロンボポエチン受容体は、本明細書中T P O Rと呼ばれ、大部分が巨核球、血小板、血球血管芽細胞、および造血幹細胞の細胞膜で発現される膜貫通タンパク質であり、そのリガンドのトロンボポエチンに結合すると、J A K / S T A Tシグナル伝達経路を誘発する。本開示では、T P O Rの完全なアミノ酸配列を、配列番号1 (U n i P r o t I D P 4 0 2 3 8 に対応) と呼ぶ。

【0046】

T P O Rは、3つの機能的ドメイン：トロンボポエチン結合部位を含む細胞外ドメイン (E C D)、膜貫通ドメイン (T M D)、および細胞質/細胞内ドメイン (I C D) を有する635アミノ酸長タンパク質である。特に、E C Dは、4つのサブドメイン、すなわちD 1、D 2、D 3、およびD 4に分割される。

【0047】

本発明は、配列番号66と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、X₁がD (A s p、アスパラギン酸) またはE (G l u、グルタミン酸) であり、X₂が、R (A r g、アルギニン) またはK (L y s、リジン) であり、ポリペプチドの前記アミノ酸配列が配列番号5を含まない、ポリペプチドに関する。

【0048】

配列番号66：

P L K C F S X₂ T F X₁ X₁ L T C F W X₁ X₁ X₁ X₁ A A P S G T Y Q L L Y A Y

P R E K P R A C P L S S Q S M P H F G T R Y V C Q F P X ₁ Q X ₁ X ₁ V X ₂

【0049】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号66と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、アミノ酸配列が、少なくともモチーフTFX₁X₁(配列番号72)、WX₁X₁X₁X₁(配列番号74)、およびX₁QX₁X₁(配列番号76)を含み、X₁が、D(Asp、アスパラギン酸)またはE(Glu、グルタミン酸)である、ポリペプチドに関する。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号66と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフTFED(配列番号60)、WDEEE(配列番号73)、およびDQEE(配列番号75)を含む。

10

【0050】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号66と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフX₂TFX₁X₁(配列番号78)、WX₁X₁X₁X₁(配列番号74)、およびX₁QX₁X₁VX₂(配列番号80)を含み、X₁は、D(Asp、アスパラギン酸)またはE(Glu、グルタミン酸)であり、X₂はR(Arg、アルギニン)またはK(Lys、リジン)である。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号66と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフRTFED(配列番号77)、WDEEE(配列番号73)、およびDQEEVR(配列番号79)を含む。

20

【0051】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号66と少なくとも80%の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号66を含むかまたはからなる。

【0052】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号67と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ポリペプチドの前記アミノ酸配列は、配列番号5を含まない。

【0053】

配列番号67：
P L K C F S R T F E D L T C F W D E E E A A P S G T Y Q L L Y A Y P R E K P R A C P L S S Q S M P H F G T R Y V C Q F P D Q E E V R

30

【0054】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号67と少なくとも80%の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号67と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフRTFED、WDEEE、およびDQEEVRを含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号67を含むかまたはからなる。

40

【0055】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号68と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、X₁は、D(Asp、アスパラギン酸)またはE(Glu、グルタミン酸)であり、X₂は、R(Arg、アルギニン)またはK(Lys、リジン)であり、ポリペプチドの前記アミノ酸配列は、配列番号5を含まない。

【0056】

配列番号68：
Q X ₁ V S L L A S X ₁ S X ₁ P L K C F S X ₂ T F X ₁ X ₁ L T C F W X ₁ X ₁ X ₁ X ₁ A A P S G T Y Q L L Y A Y P R E K P R A C P L S S Q S M P H F G T R Y V C Q F P

50

X₁QX₁X₁VX₂

【0057】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号68と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフQX₁V、SX₁SX₁(配列番号82)、TFX₁X₁、WX₁X₁X₁X₁、およびX₁QX₁X₁を含み、X₁は、D(Asp、アスパラギン酸)またはE(Glu、グルタミン酸)である。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号68と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフQDV、SDSE(配列番号81)、TFED、WDEEE、およびDQEEを含む。

【0058】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号68と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフQX₁V、SX₁SX₁、X₂TFX₁X₁、WX₁X₁X₁X₁、およびX₁QX₁X₁VX₂を含み、X₁は、D(Asp、アスパラギン酸)またはE(Glu、グルタミン酸)であり、X₂は、R(Arg、アルギニン)またはK(Lys、リジン)である。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号68と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフQDV、SDSE、RTFED、WDEEE、およびDQEEVRを含む。

【0059】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号68と少なくとも80%の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号68を含むかまたはからなる。

【0060】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号69と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ポリペプチドの前記アミノ酸配列は、配列番号5を含まない。

【0061】

配列番号69:

QDVSLLASDSEPLKCFSTRTFEDLTCFWDEEEEAAPSGTYQL
LYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVR

【0062】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号69と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフQDV、SDSE、TFED、WDEEE、およびDQEEを含む。

【0063】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号69と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフQDV、SDSE、RTFED、WDEEE、およびDQEEVRを含む。

【0064】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号69と少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号69を含むかまたはからなる。

【0065】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号70と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、X₁は、D(Asp、アスパラギン酸)またはE(Glu、グルタミン酸)であり、X₂は、R(Arg、アルギニン)またはK(Lys、リジン)であり、ポリペプチドの前記アミノ酸配列は、配列番号5を含まない。

【0066】

10

20

30

40

50

配列番号 70 :

【0067】

Q X₁ V S L L A S X₁ S X₁ P L K C F S X₂ T F X₁ X₁ L T C F W X₁ X₁ X₁ X₁ A A P S G T Y Q L L Y A Y P R E K P R A C P L S S Q S M P H F G T R Y V C Q F P X₁ Q X₁ X₁ V X₂ L F F P L H L W V

【0068】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号70と少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号70を含むかまたはからなる。

10

【0069】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号70と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフ Q X₁ V、S X₁ S X₁、T F X₁ X₁、W X₁ X₁ X₁ X₁、および X₁ Q X₁ X₁ を含み、X₁ は、D (A s p、アスパラギン酸) または E (G l u、グルタミン酸) である。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号70と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフ Q D V、S D S E、T F E D、W D E E E、および D Q E E を含む。

【0070】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号70と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフ Q X₁ V、S X₁ S X₁、X₂ T F X₁ X₁、W X₁ X₁ X₁ X₁、および X₁ Q X₁ X₁ V X₂ を含み、X₁ は、D (A s p、アスパラギン酸) または E (G l u、グルタミン酸) であり、X₂ は、R (A r g、アルギニン) または K (L y s、リジン) である。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号70と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフ Q D V、S D S E、R T F E D、W D E E E、および D Q E E V R を含む。

20

【0071】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号71と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ポリペプチドの前記アミノ酸配列は、配列番号5を含まない。

30

【0072】

配列番号 71 :

Q D V S L L A S D S E P L K C F S R T F E D L T C F W D E E E A A P S G T Y Q L L Y A Y P R E K P R A C P L S S Q S M P H F G T R Y V C Q F P D Q E E V R L F F P L H L W V

【0073】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号71と少なくとも80%の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号71を含むかまたはからなる。

40

【0074】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号71と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフ Q D V、S D S E、T F E D、W D E E E、および D Q E E を含む。

【0075】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号71と少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、少なくともモチーフ Q D V、S D S E、R T F E D、W D E E E、および D Q E E V R を含む。

【0076】

50

また本発明は、配列番号 2 と少なくとも 75% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、ポリペプチドの前記アミノ酸配列が配列番号 5 を含まない、ポリペプチドに関する。

【0077】

また本発明は、配列番号 2 と少なくとも 75% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、ポリペプチドの前記アミノ酸配列が配列番号 6 を含まない、ポリペプチドに関する。

【0078】

配列番号 2 は、ECD ドメインのサブドメイン D1 の配列（本明細書中以下で D1 と呼ばれる）に関する。

10

【0079】

配列番号 2 :

PLKCFSRTEFDLTCFWDEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLN

【0080】

配列番号 6 は、野生型 TPOR の完全な細胞外ドメイン（ECD）の配列に関し、ECD のサブドメイン D1、D2、D3、および D4（本明細書中以下で D1D2D3D4 と呼ばれる）を包有する。

【0081】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、単離されたポリペプチドである。

20

【0082】

一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号 1 を含まない。

【0083】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、少なくとも 66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または 100 アミノ酸を含む。

【0084】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、66~464 アミノ酸、66~258 アミノ酸、66~96 アミノ酸、または 66~85 アミノ酸を含む。

30

【0085】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、66~400 アミノ酸、好ましくは 66~300 アミノ酸、より好ましくは 66~200 アミノ酸、さらにより好ましくは 66~150 アミノ酸を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、66~100 アミノ酸、66~95、66~90、または 66~85 アミノ酸を含む。

【0086】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、77~464 アミノ酸、77~258 アミノ酸、77~96 アミノ酸、または 77~85 アミノ酸を含む。

【0087】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、77~400 アミノ酸、好ましくは 77~300 アミノ酸、より好ましくは 77~200 アミノ酸、さらにより好ましくは 77~150 アミノ酸を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、77~100 アミノ酸、77~95、77~90、または 77~85 アミノ酸を含む。

40

【0088】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、81~464 アミノ酸、81~258 アミノ酸、81~96 アミノ酸、または 81~85 アミノ酸を含む。

【0089】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、81~400 アミノ酸、好ましくは 81~300 アミノ酸、より好ましくは 81~200 アミノ酸、さらにより好ましくは 81

50

～ 150 アミノ酸を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、81～100 アミノ酸、81～95、81～90、または81～85 アミノ酸を含む。

【0090】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、85～400 アミノ酸、好ましくは85～300 アミノ酸、より好ましくは85～200 アミノ酸、さらにより好ましくは85～150 アミノ酸を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、85～100 アミノ酸、85～95、または85～90 アミノ酸を含む。

【0091】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、96～400 アミノ酸、好ましくは96～300 アミノ酸、より好ましくは96～200 アミノ酸、さらにより好ましくは96～150 アミノ酸、または96～100 アミノ酸を含む。 10

【0092】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、最大635 アミノ酸を含む。一実施形態では、本ポリペプチドは、最大456 アミノ酸を含む。別の実施形態では、本ポリペプチドは、最大464 アミノ酸を含む。

【0093】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、最大600、500、400、300、または200 アミノ酸を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、最大190、180、170、160、150、140、130、125、120、115、110、105、または100、95、90、または85 アミノ酸を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドは、最大99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71、70、69、68、または67 アミノ酸を含む。 20

【0094】

一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号2と少なくとも80%同一、好ましくは少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一である。一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号2からなる。

【0095】

一実施形態では、配列番号2、3、4、70、または71の中のFFPLHLWV (配列番号83) モチーフは、存在しなくてもよくまたは変異していてもよい。本発明者が示すように、このモチーフの変異は、CALA変異体の結合に関するTPORとD1との間の競合を妨げない。 30

【0096】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号3と少なくとも75%の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号3を含む。

【0097】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号3と少なくとも75%の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号3を含むかまたはからなる。 40

【0098】

配列番号3：

PLKCFSTRFEDLTCFWDEEEAAPSGTYQLLYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVCQFPDQEEVRLFFPLHLWVKNVFLNQTRT

【0099】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号4と少なくとも75%の配列同一 50

性を有し、好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号4を含むかまたはからなる。

【0100】

配列番号4：

Q D V S L L A S D S E P L K C F S R T F E D L T C F W D E E E A A P S G T Y Q L
L Y A Y P R E K P R A C P L S S Q S M P H F G T R Y V C Q F P D Q E E V R L F F
P L H L W V K N V F L N Q T R T

【0101】

一部の実施形態では、ポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号3または配列番号4と少なくとも75%の配列同一性を有する。 10

【0102】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号5と少なくとも75%の配列同一性を有し、好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号5を含むかまたはからなる。

【0103】

配列番号5は、ECDのサブドメインD1およびD2（本明細書中以下でD1D2と呼ばれる）の配列に関する。

【0104】

20

配列番号5：

Q D V S L L A S D S E P L K C F S R T F E D L T C F W D E E E A A P S G T Y Q L
L Y A Y P R E K P R A C P L S S Q S M P H F G T R Y V C Q F P D Q E E V R L F F
P L H L W V K N V F L N Q T R T Q R V L F V D S V G L P A P P S I I K A M G G S
Q P G E L Q I S W E E P A P E I S D F L R Y E L R Y G P R D P K N S T G P T V I
Q L I A T E T C C P A L Q R P H S A S A L D Q S P C A Q P T M P W Q D G P K Q T
S P S R E A S A L T A E G G S C L I S G L Q P G N S Y W L Q L R S E P D G I S L
G G S W G S W S L P V T V D L P G D

【0105】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号5を含まない。一部の実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号5からならない。 30

【0106】

一実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、アミノ酸配列配列番号7を含む。

【0107】

配列番号7：

P L K C F S R T F E D L T C F W D E E

【0108】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、細胞内で作用（「シス」作用）または細胞外で作用（「トランス」作用）し得る。 40

【0109】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、可溶性である。好適には、本発明のポリペプチドの溶解度は、細胞外で作用（「トランス」作用）し得ることを可能にする。

【0110】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、117位でアスパラギン残基（Asn）を含み、前記位置は、配列番号1のアミノ酸配列に関して定義されている。

【0111】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドの1つ以上のアミノ酸は、修飾されている。 50

。翻訳後修飾の例として、限定するものではないが、リン酸化、グリコシル化、ユビキチン化、ニトロシル化、メチル化、アセチル化、脂質付加、およびタンパク質分解が挙げられる。一実施形態では、本発明のポチペプチドの1つ以上のアミノ酸が、グリコシル化されている。本明細書中使用される場合、用語「グリコシル化」は、その部分の1つに可逆的に結合したグリカン、すなわち多糖を伴うアミノ酸の状態を定義する。特定の実施形態では、上記の117位の残基Asnは、グリコシル化されている。

【0112】

一実施形態では、117位のAsnのグリコシル化は、未成熟である。一実施形態では、117位のAsnに結合した未成熟なグリカンは、HexNAc(2)Hex(10)、好ましくはHexNAc(2)Man(9)Glc(1)である。別の実施形態では、117位のAsnに結合した未成熟なグリカンは、HexNAc(2)Hex(9)、好ましくはHexNAc(2)Man(9)、またはHexNAc(2)Man(8)Glc(1)である。別の実施形態では、117位のAsnに結合した未成熟なグリカンは、HexNAc(2)Hex(8)、好ましくはHexNAc(2)Man(8)である。

10

【0113】

別の実施形態では、117位のAsnのグリコシル化は、成熟である。一実施形態では、117位のAsnに結合した成熟したグリカンは、HexNAc(2)Hex(3)Fuc(1)Sias(1)である。別の実施形態では、117位のAsnに結合した成熟したグリカンは、Hex(5)HexNAc(2)dHex(1)である。

【0114】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、修飾されていない117位のアスパラギン残基(Asn)を含む。

20

【0115】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、グリコシル化されていない117位のアスパラギン残基(Asn)を含む。理論により拘束されることを望むものではないが、本発明者らは、本発明のポリペプチドの117位のアスパラギン残基(Asn)(N117)(前記位置は、アミノ酸配列配列番号1に関して定義されている)が、その「トランス」作用(すなわち細胞外作用)に必要とされていない、すなわちCALR変異体との相互作用に必要とされていないことを示した。Chachoua et al., 2016は、258アミノ酸に対応するTPORのD1D2フラグメント領域、およびN117でのその関連するN-グリコシル化部位が、CALR変異体の活性化に必要であることを開示している。本発明において、本発明者らは、TPORのフラグメントを、CALR変異体に結合するフラグメントであり、TPORの活性化に関して競合することができることを定義する。重要なことに、この同定されたフラグメントは、N117が未成熟な糖を欠いている場合であってもTPORに結合する。結果として、本発明のポリペプチドは、N117でグリコシル化を欠いていても、CALR変異体への結合に関して内因性TPORと競合し得る。その結果、本発明のポリペプチドは、有利には、N117がグリコシル化されていない場合であってもCALR変異体によるTPORの活性化を阻害し、可溶性であり得、および細胞外空間から作用することができる。

30

【0116】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、C末端テールに正に荷電したアミノ酸配列を有するカルレティキュリン(CALR)の変異体に結合する。

40

【0117】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列は、配列番号2のアミノ酸配列と比較して少なくとも1つの変異を含み、前記変異は、カルレティキュリンの変異体に関するポリペプチドの親和性を増加させる。

【0118】

本明細書中使用される場合、用語「変異」は、少なくとも1つのアミノ酸の、少なくとも1つの天然および/または非天然の異なるアミノ酸による挿入、欠失、トランケーション、または置換を指す。異なる化学特性を有するアミノ酸の置換の非限定的な例として、

50

正に荷電したアルギンの負に荷電したグルタミン酸との置換、または極性アスパラギンの非極性トリプトファンとの置換が挙げられる。

【0119】

本明細書中使用される場合、用語「親和性」は、2つの分子、好ましくはタンパク質またはポリペプチドの間の「結合親和性」を指す。結合親和性は、通常、解離定数 (K_d) を決定すること、またはたとえば、当該分野で公知の方法を使用して反応の動態 (ミカエリス定数、 K_m) を測定することにより評価される。特に、阻害剤、たとえば競合的阻害剤または非競合的阻害剤の効果を測定する場合、阻害定数 (K_i) を計算することができる。

【0120】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、トロンボポエチン (THPO) に対する本ポリペプチドの結合を防止または低減する少なくとも1つの変異を含む。

【0121】

一部の実施形態では、少なくとも1つの変異は、THPOとの相互作用に関与するポリペプチドの少なくとも1つのドメインに局在している。一部の実施形態では、少なくとも1つの変異は、ポリペプチドの3次元構造を変更し、ここでの3次元構造の変更は、THPOとの相互作用を防止する。

【0122】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、THPOに対する親和性よりも良好なCALR変異体に対する親和性を有する。

【0123】

一実施形態では、「良好な親和性」は、少なくとも1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、またはそれ以上の親和性の差異を意味する。親和性の比較は、 K_d 、 K_m 、または K_i の比較により評価され得る。

【0124】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチド、特にフラグメント領域D1は、フラグメント領域D1D2D3D4よりも良好なCALR変異体との相互作用を有する。よって、本発明のポリペプチドは、フラグメント領域D1D2D3D4よりもCALR変異体に対して効率的に競合する。

【0125】

一実施形態では、本ポリペプチドは、医薬として使用するためのものである。

【0126】

本発明はさらに、本明細書中上述されるポリペプチドと、少なくとも1つの他のポリペプチドとを含む融合タンパク質に関する。融合タンパク質の文脈で本明細書中使用される場合、本発明のポリペプチドを、「第1のポリペプチド」と呼び、少なくとも1つの他のポリペプチドを、「第2のポリペプチド」と呼ぶ。

【0127】

一部の実施形態では、第2のポリペプチドは、第1のポリペプチドの安定性を増加させる。安定性を増加させるとは、限定するものではないが、溶解、トランケーション、不可逆的な翻訳後修飾、またはアンフォールディングを含む修飾または分解に対するポリペプチドの耐性の改善を意味する。実際に、安定性の増加は、生物内のポリペプチドの半減期の増加をもたらす。

【0128】

タンパク質またはペプチドの安定性を測定する方法は、当該分野で公知であり、限定するものではないが、示差走査熱量測定 (DSC)、ブリーチチェイス (bleach-chase)、シクロヘキシミドチェイス (cycloheximide-chase)、円二色性 (CD) 分光法、SDS-PAGE電気泳動を含む。

【0129】

一部の実施形態では、第2のポリペプチドは、第1のポリペプチドの免疫原性を減少させる。免疫原性とは、生物内の検出可能な免疫応答、たとえば1つ以上の抗原に特異的に

10

20

30

40

50

対する抗体、B細胞、ヘルパーT細胞、および/または細胞傷害性T細胞の産生を誘発する能力を意味する。

【0130】

T細胞免疫応答を測定する方法は、当業者に周知であり、限定するものではないが、IFN- γ の産生のモニタリングを含む。

【0131】

一実施形態では、融合タンパク質の第2のポリペプチドは、免疫グロブリンのFc領域またはその機能的等価物である。免疫グロブリンのFcフラグメントは、ジスルフィドにより共に保持された両H鎖のカルボキシ末端部を意味する。

【0132】

一部の実施形態では、融合タンパク質の第2のポリペプチドは、IgA、IgD、IgE、IgG、IgMを含むかまたはからなる群から選択される免疫グロブリンのFc領域、およびその機能的等価物である。

【0133】

好ましい実施形態では、免疫グロブリンは、IgG、好ましくはIgG1またはIgG2である。別の実施形態では、免疫グロブリンは、IgAである。別の実施形態では、免疫グロブリンは、IgDである。別の実施形態では、免疫グロブリンは、IgEである。別の実施形態では、免疫グロブリンは、IgMである。

【0134】

好ましい実施形態では、免疫グロブリンは、ヒト免疫グロブリンである。別の実施形態では、免疫グロブリンは、非ヒトの免疫グロブリンである。

【0135】

一部の実施形態では、免疫グロブリンは、たとえば遺伝子的に修飾されており、および/または翻訳後修飾により修飾されている。実際に、この修飾は、融合タンパク質の安定性および/またはその免疫原性を増加させるためである。

【0136】

一実施形態では、本発明の融合タンパク質のポリペプチドは、一本鎖の連続ポリペプチド鎖に配置されている。

【0137】

一実施形態では、本発明の融合タンパク質は、少なくとも1つのペプチドリンカーをさらに含む。一実施形態では、本発明の融合タンパク質のポリペプチドは、1つ以上のペプチドリンカーを介して互いに連結される。

【0138】

当業者に周知の方法を使用して、適切な転写/翻訳制御シグナルと併せて融合タンパク質(フラグメント)のコード配列を含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、*in vitro*での組み換えDNA技術、合成技術、および*in vivo*での組み換え/遺伝子組み換えを含む。たとえば、Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); および Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989) に記載される技術を参照されたい。発現ベクターは、プラスミド、ウイルスの一部であり得、または核酸フラグメントであり得る。発現ベクターは、融合タンパク質(フラグメント)をコードするポリヌクレオチド(すなわちコード領域)が、プロモーターおよび/または他の転写もしくは翻訳制御エレメントと作動可能に会合してクローニングされる発現カセットを含む。本明細書中使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の一部である。「終止コドン」(TAG、TGA、またはTAA)はアミノ酸に翻訳されないが、これは、存在する場合はコード領域の一部とみなされ得るが、いずれかの隣接する配列、たとえばプロモーター、リボソーム、結合部位、転

10

20

30

40

50

写終結コドン、イントロン、5'および3'非翻訳領域などは、コード領域の一部ではない。2つ以上のコード領域は、たとえば単一のベクター上または個別のポリヌクレオチドコンストラクト、たとえば個別の(異なる)ベクター上の、一本鎖のポリヌクレオチドコンストラクトに存在し得る。さらに、任意のベクターが、単一のコード領域を含んでもよく、または2つ以上のコード領域を含んでもよく、たとえば本発明のベクターは、タンパク質分解切断を介して最終的なタンパク質に翻訳後または翻訳と同時に分離される、1つ以上のポリペプチドをコードし得る。さらに、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、本発明の融合タンパク質(フラグメント)をコードするポリヌクレオチドに融合しているかもしくは融合していない異種性コード領域、またはそれらのバリエーションもしくは誘導体をコードし得る。異種性コード領域は、限定するものではないが、特化したエレメントまたはモチーフ、たとえば分泌性シグナルペプチドまたは異種性機能的ドメインを含む。作動可能な会合は、遺伝子産物、たとえばポリペプチドのコード領域が、遺伝子産物の発現が調節配列の影響下または制御下にあるように、1つ以上の制御配列に会合している場合である。2つのDNAフラグメント(たとえば、ポリペプチドコード領域およびそれに会合したプロモーター)は、プロモーター機能の誘導が所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写をもたらす場合、および2つのDNAフラグメント間の連結の性質が、発現制御配列が、遺伝子産物の発現を方向付ける能力を妨害しないまたは転写されるDNA鋳型が転写される能力を妨害しない場合に、「作動可能に会合」している。よって、プロモーター領域は、プロモーターが当該核酸の転写をもたらすことが可能であった場合、ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に会合している。プロモーターは、既定の細胞に限ってDNAの実質的な転写を指示する細胞特異的プロモーターであり得る。プロモーターの他に、他の転写制御エレメント、たとえばエンハンサー、オペレーター、リプレッサー、および転写終結シグナルが、ポリヌクレオチドと作動可能に会合して、細胞特異的転写を指示することができる。好適なプロモーターおよび他の転写制御領域を、本明細書中に開示する。様々な転写制御領域が、当業者に公知である。これらは、限定するものではないが、脊椎動物の細胞で機能する転写制御領域、たとえば限定するものではないが、サイトメガロウイルスからのプロモーターおよびエンハンサーセグメント(たとえばイントロンAと結合した最初期プロモーター)、サルウイルス40からのプロモーターおよびエンハンサーセグメント(たとえば初期プロモーター)、ならびにレトロウイルス(たとえばラウス肉腫ウイルス)からのプロモーターおよびエンハンサーセグメントを含む。他の転写制御領域は、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、およびウサギグロブリンなどの脊椎動物遺伝子に由来するもの、ならびに真核細胞において遺伝子発現を制御することが可能な他の配列を含む。さらなる好適な転写制御領域は、組織特異的プロモーターおよびエンハンサー、ならびに誘導型プロモーター(たとえばテトラサイクリン誘導型プロモーター)を含む。同様に、様々な翻訳制御エレメントが、当業者に公知である。これらは、限定するものではないが、リボソーム結合部位、翻訳開始コドンおよび翻訳終止コドン、ならびにウイルス系に由来するエレメント(特にはCITE配列とも呼ばれる配列内リボソーム進入部位またはIRES)を含む。発現カセットはまた、他の特徴、たとえば複製開始点、および/または染色体組み込みエレメント、たとえばレトロウイルスの末端反復配列(LTR)、またはアデノ随伴ウイルス(AAV)の末端逆位配列(ITR)も含み得る。

【0139】

本明細書中に記載されるように調製された融合タンパク質は、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティクロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィーなどの当該分野で公知の技術により精製され得る。特定のタンパク質を精製するために使用される実際の条件は、正味の電荷、疎水性、親水性などの要因に部分的に依存しており、当業者に明らかである。たとえば、アフィニティクロマトグラフィーの精製では、融合タンパク質が結合する抗体、リガンド、受容体、または抗原を使用することができる。融合タンパク質の純度は、ゲル電気泳動、高圧液体クロマトグラフィーなどを含む周知の様々な分析方法のいずれかにより決定され得る。

10

20

30

40

50

【0140】

一実施形態では、本明細書中上述される融合タンパク質は、医薬として使用するためのものである。

【0141】

本発明はまた、本明細書中上述されるポリペプチドまたは融合タンパク質をコードする配列を含む核酸に関する。

【0142】

一実施形態では、本発明の融合タンパク質をコードする核酸は、融合タンパク質全体をコードする単一の核酸分子または共発現される複数の（たとえば2つ以上の）核酸分子として表され得る。共発現される核酸分子によりコードされるポリペプチドは、たとえばジスルフィド結合または他の手段を介して会合し、機能的融合タンパク質を形成し得る。

【0143】

一実施形態では、核酸分子は、DNAである。別の実施形態では、核酸分子は、たとえばメッセンジャーRNA（mRNA）の形態のRNAである。

【0144】

一実施形態では、核酸は、直鎖状である。別の実施形態では、核酸は、環状である。

【0145】

一実施形態では、本明細書中上述される核酸は、医薬として使用するためのものである。

【0146】

本発明の別の対象は、本発明に係る核酸を含むベクターである。一部の実施形態では、少なくとも1つの核酸分子が、1つのベクターに含まれている。

【0147】

本発明の範囲内において、「少なくとも1つの核酸」との表現は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれ以上の核酸分子を含むことが意図されている。

【0148】

一部の実施形態では、ベクターは、少なくとも1つのポリペプチドおよび/または融合タンパク質の制御された発現を可能にする。本明細書中使用される場合、「制御された発現」との表現は、時間および/または空間が制御された発現を指すことが意図される。言い換えると、本発明に係るポリペプチドの制御された発現は、たとえば特定の臓器などの身体の特定の位置で、および/または特定の時間に起こり得る。

【0149】

ある特定の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。ウイルスベクターの非限定的な例として、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、アルファウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、非統合レンチウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、およびバキュロウイルスが挙げられる。

【0150】

ある特定の実施形態では、ベクターは、非ウイルス性ベクターである。非ウイルス性ベクターの非限定的な例として、無機粒子（たとえば金、リン酸カルシウム）、脂質エマルジョン、脂質ナノ粒子（たとえばリポソーム）、DNA結合タンパク質またはペプチドが挙げられる。

【0151】

一実施形態では、本明細書中上述されるベクターは、医薬として使用するためのものである。

【0152】

本発明はさらに、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、またはベクターと、薬学的に許容されるビヒクルとを含む医薬組成物に関する。

【0153】

一部の実施形態では、薬学的に許容されるビヒクルは、溶媒、希釈剤、担体、賦形剤、

10

20

30

40

50

分散媒体、コーティング剤、抗菌剤、抗真菌剤、等張剤、吸収遅延剤、およびそれらのいずれかの組み合わせを含むかまたはからなる群から選択される。担体、希釈剤、溶媒、または賦形剤は、本ポリペプチドまたはその誘導体と適合性であり、個体へ投与された後に有害ではないという意味で「許容可能」でなければならない。典型的に、ビヒクルは、個体、好ましくはヒト個体に投与した場合に有害反応、アレルギー反応、または他の望ましくない反応を生じない。

【0154】

ヒトへの投与の特定の目的のため、本医薬組成物は、たとえばアメリカ食品医薬品局（FDA）または欧州医薬品庁（EMA）などの規制局が要求する無菌性、発熱性、全般的な安全性、および純度を満たさなければならない。

10

【0155】

一部の実施形態では、担体は、水または食塩水（たとえば生理食塩水）であり得、これらは無菌的かつパイロジェンフリーである。好適な賦形剤は、マンニトール、デキストロース、ラクトース、スターチ、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含む。

【0156】

治療的使用のために許容される担体、溶媒、希釈剤、および賦形剤は、医薬の分野で周知であり、たとえばRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro ed. 1985)に記載されている。好適な薬学的な担体、溶媒、賦形剤、または希釈剤の選択は、意図される投与経路および標準的な薬学の実務に関して行われ得る。医薬組成物は、担体、賦形剤、溶媒、または賦形剤として、またはそれに加えて、いずれかの適切な結合剤、滑剤、懸濁化剤、コーティング剤、または可溶化剤を含み得る。保存剤、安定化剤、色素、およびさらには香味料を、本医薬組成物に提供してもよい。

20

【0157】

一部の実施形態では、ポリペプチド、融合タンパク質、核酸、またはベクターは、送達粒子、特に、たとえば脂質、タンパク質、ポリペプチドまたはポリマーなどの他の天然または合成の化合物と組み合わせた送達粒子に含まれ得る。

【0158】

本発明の範囲内において、前記送達粒子は、本発明に係るポリペプチド、核酸、または核酸ベクターを標的の細胞、組織、または臓器に提供または「送達」することが意図されている。

30

【0159】

一部の実施形態では、送達粒子は、陽イオン性脂質を含むリポプレックス；脂質ナノエマルジョン；固体脂質ナノ粒子；ペプチドベースの粒子；ポリマーベースの粒子、特に天然および/または合成ポリマーを含むポリマーベースの粒子；ならびにそれらの混合物の形態であり得る。

【0160】

一部の実施形態では、ポリマー系粒子は、合成ポリマー、特にポリエチレンイミン（PEI）、 dendrimer、ポリ（DL-ラクチド）（PLA）、ポリ（DL-ラクチド-コ-グリコシド）（PLGA）、ポリメチルメタクリレート、およびポリリン酸エステルを含み得る。

40

【0161】

一部の実施形態では、送達粒子は、その表面に、ポリペプチド、核酸、または核酸ベクターを標的の細胞、組織、または臓器に方向付けるために好適な1つ以上のリガンドをさらに含む。

【0162】

一実施形態では、本医薬は、それを必要とする対象の血液がんの処置および/または防止のためのものである。好ましい実施形態では、本医薬は、それを必要とする対象の骨髄増殖性腫瘍（MPN）の処置および/または防止のためのものである。

50

【0163】

本明細書中使用される場合、用語「対象」は、動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトを指す。一実施形態では、対象は雄性である。別の実施形態では、対象は雌性である。一実施形態では、対象は、「患者」であり、すなわち対象は、医療の受診を待機しているか、または医療を受診しているか、または過去/現在/将来に、血液がん、好ましくはMPNを治癒もしくは処置および/または血液がん、好ましくはMPNの症状を軽減することを目的とする医療もしくは処置の対象であった/ある/あり得る。一部の実施形態では、対象は、血液がん、好ましくはMPNの発症に関してモニターされている。一実施形態では、対象は、血液がん、好ましくはMPNの防止処置を受けている。一実施形態では、対象は、成年（たとえば18歳超の対象）である。別の実施形態では、対象は、小児（たとえば18歳未満の対象）である。

10

【0164】

本発明はまた、血液がん、好ましくは骨髄増殖性腫瘍（MPN）の処置および/または防止に使用するための、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、または医薬組成物に関する。

【0165】

本明細書中使用される場合、MPNは、主に造血幹細胞に影響し、骨髄系列の細胞の異常な増殖を誘導するJAK/STAT経路の病的な構成的活性化により引き起こされる血液がんのタイプを指す。

【0166】

一実施形態では、MPNは、本態性血小板血症（ET）または原発性線維症骨髄線維症（PMF）である。

20

【0167】

一実施形態では、本発明に係るポリペプチドは、MPNを誘導するJAK/STATの構成的活性化を軽減、減少、および/または抑制する。

【0168】

MPNはまた、CALRの変異にしばしば関連しており、CALRは、小胞体（ER）に常在する可溶性タンパク質であり、ERのタンパク質品質管理機構においてシャペロンとしての役割を果たし、新生N-グリコシル化タンパク質のグリカンに結合し、適切にフォールディングされるまでER内でこれらの糖タンパク質を保持する。

30

【0169】

手短に述べると、CALRのフレームシフト変異は、(i)そのER保持の喪失、(ii)TPORの異常な活性化、ならびに(iii)細胞表面でのCALRの存在および血液中のCALRの循環をもたらす得る。これら変異の1つの結末は、そのER保持シグナル配列を含まないCALRにおける塩基性アミノ酸に富むカルボキシル末端（C-ter）テールの形成である。

【0170】

一実施形態では、MPNは、少なくとも部分的に、カルレティキュリン（CALR）をコードする遺伝子の1つ以上の変異により誘導される。一実施形態では、CALR変異体のアミノ酸配列は、野生型ヒトカルレティキュリンのアミノ酸配列（UniProt ID number P27797）である配列番号8と比較して少なくとも1つの変異を含む。

40

【0171】

一実施形態では、1つ以上の変異は、エクソン9における挿入および/または欠失からなり、CALRのC末端に正に荷電したアミノ酸配列の産生をもたらす。

【0172】

本明細書中使用される場合、正に荷電したアミノ酸は、互換可能に塩基性アミノ酸と呼ばれ、中性pHでそれらの側鎖に正の電荷を保有するアミノ酸であり、アルギニン、リジン、ヒスチジン、および全ての正に荷電した非天然のアミノ酸を包有する。

【0173】

50

一部の実施形態では、MPNを誘導するCALR変異体は、配列番号9の配列を含む。

【0174】

一部の実施形態では、CALRの1つ以上の変異は、配列番号10～配列番号45を含むかまたはからなる群から選択されるアミノ酸配列を有するC-terテールをもたらす。

【0175】

一部の実施形態では、CALRの1つ以上の変異は、配列番号10または配列番号11に記載されるアミノ酸配列を有するC-terテールをもたらす。

【0176】

一実施形態では、CALRの1つ以上の変異は、配列番号10に記載のアミノ酸配列を有するC-terテールをもたらす、これは、CALR del52とも呼ばれるCALR変異体L367fs*46に対応する。別の実施形態では、CALRの1つ以上の変異は、配列番号11に記載のアミノ酸配列を有するC-terテールをもたらす、これは、CALR ins5とも呼ばれるCALR変異体K385fs*47に対応する。

【0177】

一部の実施形態では、本発明に係るポリペプチドまたは融合タンパク質は、本明細書中上述されるCALRの変異体に結合する。

【0178】

一部の実施形態では、MPNは、(i)1つ以上のCALR変異、および(ii)別の遺伝子の1つ以上の変異により誘導される。一部の実施形態では、1つ以上のCALR変異は、他の遺伝子の1つ以上の変異の作用を増幅する。

【0179】

一実施形態では、1つ以上のCALR変異はおよび他の遺伝子の1つ以上の変異は、同じ細胞で起こる。別の実施形態では、1つ以上のCALR変異はおよび他の遺伝子の1つ以上の変異は、個別の細胞または細胞群で起こる。

【0180】

一部の実施形態では、MPNは、1つ以上のCALR変異およびTPORをコードする遺伝子の1つ以上の変異により誘導される。一部の実施形態では、TPORの変異は、R102P、P106L、G509N、およびK39Nを含むかまたはからなる群から選択される。一部の実施形態では、TPORの変異は、R102Pである。

【0181】

一部の実施形態では、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、または医薬組成物は、CALR変異体を発現する細胞またはCALR変異体およびTPOR変異体の両方を発現する細胞の増殖を阻害する。

【0182】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物は、さらなる抗がん剤または抗がんワクチンと併用して投与される。

【0183】

ある特定の実施形態では、さらなる抗がん剤またはワクチンは、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物と併用して、同時にまたは逐次的に投与される。

【0184】

一実施形態では、さらなる抗がん剤またはワクチンは、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物と同時に投与される(すなわち、任意選択で共製剤での同時投与)。一実施形態では、さらなる抗がん剤またはワクチンは、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物と異なる時間に投与される(すなわち、さらなる抗がん剤またはワクチンが、本ポリペプチドを投与する前または後に投与される逐次的投与)。一部の実施形態では、さらなる抗がん剤またはワクチンは、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物と同じ方法で、またはそのさらなる抗がん剤もしくはワクチンの通常の投与経

10

20

30

40

50

路を使用して投与され得る。

【0185】

一部の実施形態では、本発明に係るポリペプチド、核酸、ベクター、または医薬組成物は、経口、非経口、局所、噴霧吸入により、直腸、頬側、腔投与されるか、または埋め込み型リザーバーを介して投与される。本明細書中使用される投与という用語は、皮下、静脈内、筋肉内、眼内、関節内、関節滑液嚢内、胸骨内 (intrasternal)、髄腔内、肝内、病巣内、および頭蓋内の注射または注入技術を含む。

【0186】

好ましい実施形態では、本発明のポリペプチド、核酸、ベクター、または医薬組成物は、非経口、皮下、静脈内投与されるか、または埋め込み型リザーバーを介して投与される。

10

【0187】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチド、核酸、ベクター、または医薬組成物は、たとえば眼内、筋肉内、皮下、皮内、経皮、または静脈内の注射または注入などの注射に適合した形態にある。

【0188】

注射に適合した形態の例として、限定するものではないが、液剤、たとえば滅菌水溶液、分散剤、エマルジョン、懸濁剤、使用前に液体を添加することにより液剤または懸濁剤を調製するための使用に好適な固体形態、たとえば散剤、リポソーム形態などが挙げられる。

20

【0189】

処置は、一定期間にわたる単回投与または複数回の投与からなり得る。本発明に係るポリペプチド、核酸、ベクター、または医薬組成物は、長期間、たとえば少なくとも2または4または6または8週間にわたり、持続的放出を提供するために徐放製剤に製剤化され得る。好ましくは、持続的放出は、少なくとも4週間にわたり提供される。

【0190】

ある特定の実施形態では、投与されるポリペプチド、核酸、ベクター、または医薬組成物の有効量は、投与のために選択される物質、投与が単回投与または複数回投与であるかどうか、ならびに年齢、身体状態、体格、体重、性別、および処置されるがんの重症度を含む対象のパラメータを含む様々なパラメータに依存し得る。

30

【0191】

一部の実施形態では、本発明に係るポリペプチド、核酸、ベクター、または医薬組成物は、治療上有効量でそれを必要とする対象に投与される。

【0192】

「治療上有効量」は、個体に有意な負のもしくは有害な副作用を引き起こすことなく、がんの1つ以上の症状の進行、増悪、もしくは悪化を遅延もしくは停止させるため；またはがんの症状を軽減させるため；またはがんを治癒するために必要かつ十分なレベルまたは量を意味する。ある特定の実施形態では、本発明に係るポリペプチドの有効量は、約0.001mg~約3,000mg/投与量単位、好ましくは約0.05mg~約1,000mg/投与量単位の範囲であり得る。

40

【0193】

本発明の範囲内において、約0.001mg~約3,000mgは、投与量単位あたり約0.001mg、0.002mg、0.003mg、0.004mg、0.005mg、0.006mg、0.007mg、0.008mg、0.009mg、0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.2mg、0.3mg、0.4mg、0.5mg、0.6mg、0.7mg、0.8mg、0.9mg、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、5

50

00 mg、550 mg、600 mg、650 mg、700 mg、750 mg、800 mg、850 mg、900 mg、950 mg、1,000 mg、1,100 mg、1,150 mg、1,200 mg、1,250 mg、1,300 mg、1,350 mg、1,400 mg、1,450 mg、1,500 mg、1,550 mg、1,600 mg、1,650 mg、1,700 mg、1,750 mg、1,800 mg、1,850 mg、1,900 mg、1,950 mg、2,000 mg、2,100 mg、2,150 mg、2,200 mg、2,250 mg、2,300 mg、2,350 mg、2,400 mg、2,450 mg、2,500 mg、2,550 mg、2,600 mg、2,650 mg、2,700 mg、2,750 mg、2,800 mg、2,850 mg、2,900 mg、2,950 mg、および3,000 mgを含む。

10

【0194】

ある特定の実施形態では、本発明に係るポリペプチドは、約0.001 mg/kg ~ 約100 mg/kg、約0.01 mg/kg ~ 約50 mg/kg、好ましくは約0.1 mg/kg ~ 約40 mg/kg、好ましくは約0.5 mg/kg ~ 約30 mg/kg、約0.01 mg/kg ~ 約10 mg/kg、約0.1 mg/kg ~ 約10 mg/kg、より好ましくは約1 mg/kg ~ 約25 mg/kg 対象の体重/日を送達するために十分な投与量レベルで投与される。

【0195】

一部の実施形態では、投与される核酸またはベクターの有効量は、約 1×10^5 ~ 約 1×10^{15} コピー/投与量単位の範囲であり得る。

20

【0196】

本発明の範囲内において、約 1×10^5 ~ 約 1×10^{15} コピーは、投与量単位あたり 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 、 4×10^5 、 5×10^5 、 6×10^5 、 7×10^5 、 8×10^5 、 9×10^5 、 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、 9×10^{13} 、 1×10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 、および 1×10^{15} コピーを含む。

30

【0197】

非経口投与に好適な製剤は、抗酸化剤、バッファー、静菌薬、および製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質を含み得る水性および非水性の滅菌注射剤；ならびに懸濁化剤および増粘剤を含み得る水性および非水性の滅菌懸濁剤を含む。製剤は、単用量または複数用量の容器、たとえば密閉されたアンプルおよびバイアルで提示されてもよく、使用の直前に、滅菌液体の担体、たとえば注射水の添加のみを必要とするフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存され得る。即時注射の液体および懸濁剤は、滅菌散剤、顆粒剤、および錠剤から調製され得る。本発明で使用するための製剤は、問題の製剤のタイプを考慮して、当該分野で慣例的な他の作用物質をさらに含んでもよくたとえば経口投与に適した作用物質は、香味料を含んでもよい。

40

【0198】

本発明の別の目的は、(i) 本発明に係る少なくとも1つのポリペプチド、少なくとも1つの融合タンパク質、少なくとも1つの核酸、少なくとも1つのベクター、少なくとも

50

1つの医薬組成物、または少なくとも1つのワクチン、および(i i)前記ポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物を投与する手段を含むキットである。一実施形態では、キットは、疾患、好ましくは血液がん、より好ましくはMPNを処置および/または防止するためのものである。

【0199】

ある特定の実施形態では、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物を投与するための手段は、シリンジ、トロカール、カテーテル、カップ、スパチュラなどを含み得る。

【0200】

一実施形態では、キットは、好ましくは血液がんを処置するため、より好ましくはMPNを処置するための抗がん剤またはワクチンをさらに含む。 10

【0201】

一部のさらなる態様では、本発明はまた、医薬の製造または調製のための、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物の使用にも関する。

【0202】

本発明はまた、血液がん、好ましくは骨髄増殖性腫瘍(MPN)、好ましくはカルレティキュリン(CALR)をコードする遺伝子の1つ以上の変異により誘導されるMPNを処置および/または防止するための医薬の製造のための、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物にも関する。 20

【0203】

本発明はまた、それを必要とする対象の血液がん、好ましくは骨髄増殖性腫瘍(MPN)、好ましくはカルレティキュリン(CALR)をコードする遺伝子の1つ以上の変異により誘導されるMPNを処置および/または防止する方法であって、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物の治療上有効量を前記対象に投与するステップを含む、方法にも関する。

【0204】

本発明はまた、がん細胞の増大の阻害に使用するための、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物にも関する。

【0205】

本発明はまた、それを必要とする個体のがん細胞の増大を阻害する方法であって、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物の治療上有効量を個体に投与するステップを少なくとも含む、方法にも関する。 30

【0206】

本発明はまた、がんを有する個体の全生存の改善に使用するための、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物にも関する。

【0207】

本発明はまた、がんを有する個体の全生存を改善する方法であって、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物の治療上有効量を個体に投与するステップを少なくとも含む、方法にも関する。 40

【0208】

本発明はまた、がんを有する個体の予後の改善に使用するための、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物にも関する。

【0209】

本発明はまた、がんを有する個体の予後を改善する方法であって、少なくとも、本発明に係るポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクター、または医薬組成物の治療上有効量を個体に投与するステップを含む、方法にも関する。

【図面の簡単な説明】

【0210】

【図1】図1A~1Iは、CALR del52変異体テールがTpOR細胞外ドメイン 50

と直接相互作用することを示す。図1A：増殖アッセイ。pMX-IRES-GFPにおいてhTpoRを安定して発現する細胞BaF3細胞に、表記のCALRバリエーションまたは空のベクター(pMSCV-IRES-mCherry)を感染させ、FACSによりソーティングした。250,000個を洗浄し、サイトカインを含まない完全培養培地10mLに播種し、自動細胞計数器を使用して毎日計数した(n=3)。値は、三連の技術的反復実験による3つの独立した実験の平均値(±SD)を表す(n=6~9)。図1B：NanoLuc-TpoRとCALR del52-HaloTagの完全長またはN末端からトランケートされたものとの間のNanoBRET。5つの独立した実験の平均値(±SD)を示す(N=5、n=20)。二元配置ANOVAの後にSIDAK多重比較検定を行った。****：p<0.0001、ns：有意差なし。図1C~1E：供与体飽和アッセイ(Donor Saturation Assay)(DSA)実験での特異的相互作用対非特異的相互作用の理論的プロファイル。HEK293Tに、漸増量のHaloTagコンストラクトおよび固定量のNanoLucドナーをトランスフェクトした。陰性対照は、空のNanoLucベクターである(n=4)。図1C：CALR del52 完全長のDSA。図1D：CALR del52 P-CDメインのDSA。図1E：CALR del52 CドメインのDSA。図1F：HA-hTpoRと、CALR del52-FLAGの完全長または表記されたN末端のトランケーション型との代表的な共免疫沈降。図1G：HEK293T細胞培養物の上清からのCALR del52種のELISA。値は、3つのELISA実験の平均値を表す。1元ANOVAの後にTukeyの多重比較検定を行った。****：p<0.0001。図1H：hTpoRまたは空のベクターの存在下でのCALR del52の完全長またはP-CDメインの表面局在。抗FLAG抗体、および表記のコンストラクトを共トランスフェクトしたHEK293T上のAPCにカップリングした抗マウス二次抗体を使用したフローサイトメトリー解析。図1I：hTpoRおよび表記のCALRトランケーション型によるSTAT5の転写活性。HEK293Tに、STAT5、JAK2、およびSTAT5の転写活性を反映するSpLucホタルルシフェラーゼレポーターをコードするcDNAと共に、HA-hTpoRおよびCALRのトランケーション型を一過性にトランスフェクトし、ウミシイタケルシフェラーゼを含む対照レポーター(pRLTK)で正規化した。三連で行った3つの独立した実験の平均値(±SD)を示す(N=3、n=9)。二元配置ANOVAの後にSIDAK多重比較検定を行った。***：p<0.001、**：p<0.0001。

10

20

30

【図2】図2A~2Fは、CALR del52-TpoRの相互作用および変異体テールにより駆動される二量体化に関する。図2A~C：5つの異なる交換の時点での、CALR del52単独またはCALR del52のC末端に対応するTpoR ECDと複合体形成したCALR del52からの代表的なペプチドの重水素取り込み。図2Aに示されるペプチドは、CALR WT、および差次的取り込みを示さないCALR del52に共通するCドメインの末端に対応する。図2Bに示されるペプチドは、変異体テールを含み、高い差次的取り込みを示す。図2Cに示されるペプチドは、変異体テールの最後のアミノ酸に対応する。図2D：還元剤(DTT)の存在下または非存在下での表記のCALR変異体の非変性ウェスタンブロット。クーマシーブルーによる染色。図2E：二量体化を評価するためのCALR del52-FLAG 完全長またはトランケート型によるCALR del52-HA 完全長の共免疫沈降。変性条件での代表的なウェスタンブロットを示す。図2F：Tpo、CALR del52 完全長、またはC末端のトランケーション型の存在下でのhTpoRの二量体化の架橋試験。変性条件および還元条件での代表的なウェスタンブロットを示し、表記の条件でのhTpoRモノマーおよびo-PDMの架橋した二量体を示す。

40

【図3】図3A~3Gは、CALR del52とTpoR D1D2の相互作用を示す。図3A：HA-hTpoR ECDドメインと、表記のCALR del52-FLAGまたはCALR del52 Y109F/D135L-FLAGとの代表的な共免疫沈降。図3B：CALR del52(変異ありまたはなし)によるTpoR種の相対的

50

な共免疫沈降の定量化。ウェスタンブロットの定量化を、Image Jで行った。全ライセート中のTpOR種の発現に関して正規化したCALR del52におけるTpOR種の比率(+SD)を示す(N=2、n=6)。二元配置ANOVAの後にSIDAK多重比較検定を行った。***: p < 0.001, *: p < 0.05 ns: 有意差なし。

図3C: NanoLuc-TpORサブドメインおよびCALR del52-HaloTag 完全長またはN末端からのトランケート型の間のNanoBRET。2つの独立した実験の平均値(±SD)を示す(N=3, n=12)。図3D~3F: CALR del52単独または本明細書に記載される重要な領域に対応するCALR del52-D1D2複合体からの代表的なペプチドの重水素取り込み。図3Dに示されるペプチドは、NDメインのアミノ酸50~74に対応する。図3Eに示されるペプチドは、グリカンの結合に關与する残基C105およびY109を含む。図3Fに示されるペプチドは、変異体のC末端を含む。図3G: 重水素中で60分のインキュベーションでの未成熟グリカンを含むsD1D2と複合体形成したCALR del52とCALR del52単独との間の相対的な差次的な重水素取り込み。ドットは、質量分析により検出される個々のペプチドを表す。Y軸は、相対的な重水素の交換の差を表す。正の値は、sD1D2の存在下でより保護されているCALR del52の領域を示し、負の値は、sD1D2の存在下であまり保護されていない領域を表す。

【図4】図4A~4Cは、CALR del52変異体テールおよびTpOR D1D2の間の相互作用部位に関する。図4A: 重水素中での1時間のインキュベーションでの、CALR del52の非存在下または存在下での成熟グリカンを有するTpOR full ECDの間の相対的重水素取り込み分析。保護されたことを示すドットは、記載された(Lau et al., 2021)ペプチドレベルの有意性の試験(ハイブリッドモード)により有意な差次的重水素取り込み(p < 0.001)を示す。図4B: 5つの異なる交換時点での成熟TpOR full ECD単独(D1D4)またはCALR del52と複合体形成した成熟TpOR full ECD(CALR del52-D1D4)からのFSRTFEDペプチドの重水素取り込み。図4C: hTpORおよび表記のCALRトランケート型によるSTAT5の転写活性。HEK293Tに、STAT5、JAK2、およびSTAT5の転写活性を反映するSpLucホタルルシフェラーゼレポーターをコードするcDNAと共に、HA-hTpORおよびCALRのトランケート型を一過性にトランスフェクトし、ウミシイタケルシフェラーゼを含む対照レポーター(pRLTK)で正規化した。三連で行った3つの独立した実験の平均値(±SD)を示す。二元配置ANOVAの後にSIDAK多重比較検定を行った。***: p < 0.001, ****: p < 0.0001。

【図5】図5A~5Dは、骨髄増殖性腫瘍におけるTPORDメインを含む融合タンパク質(TPOR-Fc)に結合したCALR del52の阻害の原理を裏付けるグラフのセットである。漸増濃度の可溶性D1D2D3D4-Fc(図5A)、D1D2-Fc(図5B)およびD1-Fc(図5C)による競合実験。実験は、NanoLuciferaseにカップリングしたTpOR/TPORおよびHaloTagにカップリングしたCALR del52の等価のcDNAを共発現する細胞において行った。TPORとCALR del52との間の相互作用を、BRET比に基づき測定する。図5Dは、漸増量のN117Q変異を伴うヒトD1ドメインの存在下でのTpOR完全長およびCALR del52の間の結合の代用として使用されるNanoBRETシグナルを例示する。

【図6】図6は、生細胞でのCALR変異体-TPORの相互作用のin transでの阻害を示すヒストグラムである。表記のFc-融合タンパク質または対照とのインキュベーション後の細胞の細胞表面でのCALR del52の検出を示す。

【図7】図7は、CALR変異体の阻害剤としての可溶性D1のin vivo有効性を示すグラフである。グラフは、4から24週間までの表記のマウスの血中血小板濃度を表す。

【図8】図8は、漸増量のヒトD1 WTおよびFFPLHLWLVMモチーフの変異体の存在下でのTPOR 完全長およびCALR del52の間の結合の代用として使用さ

10

20

30

40

50

れる NanoBRETシグナルを例示するグラフである。

【図9】図9は、四量体複合体の形成の間の TPOR および CALR del52 変異体の相互作用を表す三次元構造のモデルである。

【図10】図10は、漸増量のヒト D1 WT、およびモチーフ QDV、SDSE、FSR、WDEE、または EAP の変異体の存在下での TPOR 完全長および CALR del52 の間の結合の代用として使用される NanoBRETシグナルを例示する。

【0211】

実施例

本発明を、以下の実施例によりさらに例示する。

【0212】

本明細書中使用される場合、用語「変異体テール」は、配列番号50のアミノ酸配列を有する CALR del52 のC末端テールを指す。

【0213】

実施例1：CALR del52 の変異体テールは、TpOR細胞外ドメインと直接相互作用し、TpORおよびCALRの二量体化を媒介する

材料および方法

変異原性：全てのCALR del52 変異体を、代替的に QuickChange (Agilent)、KLD enzyme mix (NEB) の手順を製造社の指示に従って使用して作製したか、または Genscript から購入した。全てのコンストラクトを、シーケンシングにより確認した。

【0214】

Ba/F3 増殖アッセイ：まず、Ba/F3 に、pMX-IRES-GFP および CALR バリエーションにおけるヒト TpOR または 空のベクター (pMSCV-IRES-mCherry) を形質導入し、類似のレベルの GFP および mCherry に関して FACS によりソーティングした。250,000 個の細胞を洗浄し、サイトカインを含まない 10 mL の RPMI、10% の FBS に播種し、Coulter 自動細胞計数器にて三連で毎日計数した。この実験を、3つの異なる生物学的反復実験で行った (N=3)。

【0215】

BRET：TpOR および エリスロポエチン受容体 (EpoR) をコードする cDNA を、改変 pNL-N ベクター (Promega) にクローニングし、受容体に対する Nano-ルシフェラーゼの N 末端融合体を産生した。WT および del52 CALR 変異体をコードする cDNA を、pHT-C ベクターにクローニングし、HaloTag 融合コンストラクト (Promega) を作製した。これらのコンストラクトを一過性にトランスフェクトした HEK-EBNA 細胞を、450 BP (ドナー) および 600 LP (アクセプター) ビルトインフィルタを使用して 37 °C で、GloMax Discover マルチプレートリーダー (Promega) 上にて生物発光共鳴エネルギー転移 (Bioluminescence Resonance Energy Transfer / BRET) に関して分析した。

【0216】

共免疫沈降およびウェスタンブロット：HEK293T を、10 cm 培養皿に入れ、上記のコンストラクトをコードする cDNA を一過性トランスフェクトした。コンフルエントな細胞を、トランスフェクションから 48 時間後に NP-40 バッファーで溶解した。事前の洗浄後、サンプルを、2 µg/mL の抗 FLAG 抗体 (Genscript, カタログ番号 A00187) または 対応する アイソタイプ対照 (Genscript カタログ番号 A01730) と共に、4 °C で一晩インキュベートした。結合したタンパク質を、40 µL/mL の r プロテイン G アガロース (ThermoFisher, 20397) を用いて 4 °C で 3 時間下降させた。次に、サンプルを遠心分離し、3 回洗浄し、免疫沈降したタンパク質を、SDS-PAGE の後に、HA-hTpOR、HA-CALR del52、または抗 CALR 変異体テール (SAT602) に関する抗 HA 抗体 (Roche, 3F10) で顕色することにより分析した。

10

20

30

40

50

【0217】

ELISA：トランスフェクションから48時間後のHEK293Tの上清からの可溶性CALR変異体種のレベルを測定するために、ポリクローナルウサギ抗体（Myelopros, Vienna, Austriaにより提供されるSAT602）を、ELISAプレートをコーティングするために使用した。この抗体は、CALR変異体のC末端配列に由来するペプチドに対して作製された。ブロッキング（PBS中5%のBSA+0.05%のTween-20）の後、プレートを、ブロッキングバッファーで希釈した培養培地のサンプルでプロービングし、Expi-293F細胞（Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium）で産生された精製変異体-CALRタンパク質を、定量化のための標準物質として含めた。検出のため、抗マウスIgG-HRP抗体（Southern Biotech, Birmingham, AL）と組み合わせた抗CALR抗体（FMC75, Abcam, Cambridge, United Kingdom）を使用し、TMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン, Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium）を、基質として添加した。吸光度を、マイクロプレートリーダー（SpectraMax i3, Molecular Devices, Silicon Valley, CA）において450nmおよび620nmで測定した。

【0218】

フローサイトメトリー：CALR del52種の細胞表面局在の評価のため、実験の48時間前に、HEK293Tに、表記のCALR del52種および完全長のヒトTpoR（hTpoR）または空のベクターを一過性にトランスフェクトした。細胞を、トリプシン処理を用いずに剥離させ、抗FLAG抗体またはIgG対照（一次）およびAPCカップリングヤギ抗マウス抗体（二次）で染色した。単一の蛍光ベクター（GFPまたはmCherry）をトランスフェクトした細胞またはAPCカップリング抗体で染色した補償ビーズを、補償制御のために使用した。2つのコンストラクトを共トランスフェクトした細胞の30,000事象を、各条件に関してBD LSRFortessa（商標）Cell Analyzerで獲得した。獲得後の分析を、FlowJoで行った。TpoR変異体の細胞表面局在の評価のため、HEK293Tに、表記の変異体または空の対照ベクターをトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後、細胞を、上述のように処理し、APC抗体にカップリングした抗HAで染色した。トランスフェクトした細胞の30,000事象を、各条件に関してFACSVerse（商標）を使用して獲得し、HA-APCの染色陽性の細胞のパーセンテージを、トランスフェクトした細胞の中で決定した。

【0219】

水素-重水素交換質量分析（HDx-MS）：水素-重水素交換質量分析を、Synapt G2-Siを備えたHDx技術を伴うWaters nanoAcquity UPLCで行った。全ての精製組み換えタンパク質を、平衡バッファー（H₂Oに溶解した5mMのK₂HPO₄、5mMのKH₂PO₄、pH7）中の20μMの濃度で使用した。組み換え成熟D1D2D3D4とCALR del52との間の相互作用の分析のため、まずタンパク質を、1:1のモル濃度で室温にて30分間、次いで4で3時間共に混合した。次に、タンパク質を0で維持した。標識は、標識バッファー（D₂Oに溶解した5mMのK₂HPO₄、5mMのKH₂PO₄、pD7）中で20倍希釈のサンプルを用いて、6つの異なるインキュベーション時間（0、0.25、1、5、20、および60分）の間20で行った。インキュベーション後、反応を、クエンチバッファー（30mMのTCEPを伴う0.05MのK₂HPO₄、0.05MのKH₂PO₄、pH2.3）中で1:1の希釈を使用してクエンチした後、ペプシンカラム（Enzymate BEH Pepsin 2.1x30 Column, Waters カタログ番号186007233）の中に150~75μL/分の動的な流速で注入した。混合は全て、PAL-RTCのロボットステーションにより自動的に行った。ペプシン消化からもたら

されるペプチドを、ACQUITY BEH C18 1.7 μM VANGUARD Pre-カラム (Waters Cat. 186009375) で捕捉し、ACQUITY UPLC C18 1.7 μM 1.0 x 100 mm カラム (Waters Cat. 186002346) で分離し、Waters SYNAPT G2-Si 四重極 - 飛行時間型質量分析計の中に静電噴霧した。測定は、イオンモビリティを伴うHDM Seモードで行った。ロックマス較正は、ロイシン-エンケファリンの注入によって行った (m/z = 556.277)。ペプチドを、PLGS3.0ソフトウェア (Waters) を使用して三連で同定した。同定したペプチドを、誤差範囲10 ppm、最大長35 a. a、アミノ酸あたりの最小産物0.2を使用し、各ペプチドが3回の反復実験中3回同定されることを必要とするDynamX3.0 (Waters) によってさらに解析した。データを、ペプチドレベルの有意性試験 (Lau et al., 2021) を行うDeuterios 2.0を使用して統計学的に分析した。

【0220】

結果

カルレティキュリンドメインは、球状のNドメイン (16~197位)、中央のプロリンリッチドメイン (198~308位)、および酸性Cドメイン (309~417ドメイン) を含む。一部のCALR変異体、特にCALR del52では、C末端テールは正に荷電している。正に荷電した変異体テールが果たす役割を調べるために、CALR del52のC末端の段階的トランケート物 (truncature) である、I型CALR変異体のプロトタイプを試験した。394位までのC末端部のトランケーション、よって最後の18アミノ酸を除去することは、完全長CALR del52により誘導されるものと類似のサイトカイン依存的造血性細胞株 (Ba/F3) の自律的成長を可能にした (図1A、「CALR del52」と比較した「CALR del52 A394*」)。最大387位までのさらなるトランケーションは、依然として低いが自律的な増殖を可能にし (図1A、「CALR del52 M387*」)、さらなるトランケーションは、CALRの活性を完全に消失させた (図1A、「CALR del52 M377*」、「CALR del52 M371*」、およびエクソン9の欠失を表す「CALR EXON 9」)。

【0221】

重要なことに、グリカン依存的結合を消失し、変異体テールのらせん度を妨害するCALR del52 Y109F/D135L変異体は、Ba/F3の自律的増殖を可能にできなかった (図1A、「CALR del52 Y109F/D135L」)。

【0222】

CALR del52のN末端のトランケーション型もまた、作製し、CALR del52の変異体テールが、未成熟グリカンの非存在下で受容体との直接結合を媒介し得るかどうかを探索した。生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) を使用して、生細胞においてTpORとCALR del52のN末端のトランケーション型との間の直接相互作用を測定した。厳密に述べると、CALR del52のNドメインの完全な欠失 (CALR del52 P-Cドメイン-HT) またはNドメインおよびPドメインの完全な欠失 (CALR del52 C-ドメイン-HT) は、受容体との直接相互作用を完全に遮断しなかった (図1B)。

【0223】

相互作用の特異性を、漸増量のリガンド (すなわちCALRバリエント) が全てのレシーバー結合部位の占有により迅速なシグナル飽和をもたらす供与体飽和アッセイ (DSA) により検証した (図1C~E)。

【0224】

変異体テールのみが存在する場合、TpORに対する小さいが有意な結合が観察され、テールが、Halotagコンストラクトに融合する際に適切なフォールディングおよび安定性のためCドメインの少なくとも一部を必要としたことが示唆された。これらの結果を検証し、TpORに対するCテールの結合のみを探索するために、共免疫沈降を、C末

端にFLAGタグを含むCALR del52コンストラクトについて行った。TpORと、変異体テールにのみ対応するフラグメントまでのCALR del52のC末端トランケーション型との間の相互作用が検出された(図1F)。

【0225】

次に、CALR del52のC末端フラグメントを、これらが機能的アッセイにおいて完全長と類似の挙動をするかどうかを試験した。細胞上清に関するELISAを使用して、完全長CALR del52と比較してCALR del52 P-Cドメインまたは変異体テール単独の分泌を測定した。興味深いことに、P-Cドメインは強く分泌されたが、変異体テール単独は分泌されなかった(図1G)。

【0226】

次に、フローサイトメトリーを使用して、TpORの存在下または非存在下でCALR del52完全長またはP-Cドメインの表面局在を評価した。CALR del52の完全長およびさらにはP-Cドメインは、強い表面発現を示した(図1H)。興味深いことに、両方のCALR del52種(完全長およびP-Cドメイン)は、TpORを共発現する細胞において高い表面局在を有し、TpORがこれらを細胞表面で保持することが示唆される(図1H)。

【0227】

最後に、機能的な転写アッセイを使用して、CALR del52のCドメインに融合したPドメインが、EpORではなくTpORを介して小さいが有意なSTAT5転写活性を誘導するために十分であることを示した(図1I)。

【0228】

まとめると、これらの結果は、TpORに対するCALR del52の直接結合が、未成熟糖との変異体テールおよびNDドメインの相互作用の両方により媒介されるが、活性化は、変異体テールの存在に厳密に依存することを示している。活性化は、グリカン依存的相互作用によりさらに強化される。

【0229】

次に、HDx-MSを使用して、3つのCALR del52変異体(すなわちFGNE T W G V T K A A E - 配列番号51; T K A A E K Q M K D K Q D E E Q R T R R M M R T K M - 配列番号52; およびQ W G T E A - 配列番号53)ならびに成熟グリカンを含むTpORの完全な細胞外ドメインの間の可能性のある全ての相互作用部位をマッピングした。これらの2つの組み換えタンパク質を、独立して産生し、1:1のモル比で溶液に混合した後、重水素交換を行った。結果から、変異体テールを含む複数のペプチドにおいて有意な($p < 0.001$)交換の差異が明らかとなり(図2A)、変異体テールと成熟TpOR細胞外ドメインとの間の直接相互作用を確認した。この差次的な交換は、残基406 Q W G T E A 411(配列番号53, 図2C)を包含最後尾の残基では観察されず、変異体テールの最後尾の部分がこの相互作用に関与していないことを示した。

【0230】

CALR変異体のオリゴマー化がTpOR活性化に重要であり(Araki et al., 2019; Rivera et al., 2021)、C末端のシステインより前のトランケーション型が増殖に影響しなかったことから、CALR del52種のオリゴマーのプロファイルを、非変性条件において還元剤の存在下または非存在下と比較した。オリゴマーのプロファイルの差異は、還元剤(DTT)の存在下または非存在下では観察されず、CALR del52 A394*およびCALR del52完全長はいずれも、類似のオリゴマー種をもたらした(図2D)。対照的に、オリゴマー種は、CALR c-テールで完全に消失し、変異体テールがオリゴマー化に必要であり、C末端のシステインとは無関係であるという事実を裏付けている(図2D)。

【0231】

機能的アッセイと同じセットのCALR del52を使用して(図1A参照)。二量体化における変異体テールの役割を、増殖アッセイで使用したのと同じCALR del52のFLAGタグトランケーション型と、HA-タグ完全長CALR del52と

10

20

30

40

50

の共免疫沈降によりさらに探索した。本発明者らは、CALR del52 完全長、CALR del52 A394*およびCALR del52 M387*の強い共免疫沈降を観察した(図2E)。このことは、これらのトランケーションが、Ba/F3非依存的増殖を誘導する保存された能力と合致している。これらの安定性の強い増加にも関わらず、さらなるトランケーション型(CALR del52 M377*およびCALR del52 M371*)は、HA-CALR del52完全長の免疫沈降の激減をもたらした(図2E)、変異体テールがCALR del52の二量体化に直接関与していることが確認された。

【0232】

次に、架橋アプローチを使用して、CALR del52 完全長またはC末端のトランケーション型とTpORの二量体化を試験した。システイン架橋を介したTpORの二量体化を検出するために、JAK2結合部位後の受容体の細胞内ドメインをトランケートし、細胞内システインを除去し、マウスTpOR L501Cと相同なL508C点変異を挿入し、システイン残基を、活性であることが示された二量体の向きにした(Stark et al., 2011)。これらのTpORトランケーション型は、活性化される能力を保持する。機能的アッセイと一致して、M387までのトランケーション(CALR del52、CALR del52 A394*、およびCALR del52 M387*)は、依然としてTpOR膜貫通型ドメインの二量体化を可能にしたが、さらなるトランケーション(CALR del52 M377*およびCALR del52 M371*)は、二量体の形成を可能にできなかった(図2F)。

【0233】

実施例2: TpOR D1D2は、グリカンおよび変異体テールを介したCALR del52への完全な結合を媒介するために十分である

材料および方法

共免疫沈降/ウェスタンブロッティング、BRET、HDx-MSに関しては実施例1を参照されたい。

【0234】

結果

以前の知見により、CALR del52によるTpORの活性化が、TpORの細胞外ドメインにより媒介され、それぞれTpOR D1およびD2ドメインに存在するAsn117、およびより少ない程度でAsn178のグリコシル化に依存することが示された(Chachoua et al., 2016; C. Pecquet et al., 2019)。TpOR ECDのC末端のトランケーション型の共免疫沈降を使用して、D3D4の欠失が、受容体に対するCALR del52の結合に影響しないことが示された(CALR del52-FLAG, sD1D2に関して図3A~B)。D2ドメインの欠失は、D1ドメイン単独と比較して小さいが有意な共免疫沈降の低減をもたらした(CALR del52-FLAG, sD1に関して図3A~B)。

【0235】

次に、グリカン結合能を欠いているCALR del52 Y109F/D135L変異体(Kapoor et al., 2004)を使用した。予測されるように、グリカン依存的結合の喪失は、共免疫沈降の比率の激減をもたらした(CALR del52 Y109F/D135L-FLAGに関して図3A~B)。厳密に述べると、共免疫沈降の比率の差異は、グリカン結合の非存在下では、D1単独とD1F2との間で検出されず(CALR del52 Y109F/D135L-FLAGに関して図3A~B、sD1とsD1D2との比較)、CALR del52変異体テールがTpOR D1と排他的に相互作用することを示唆した。

【0236】

次に、CALR del52トランケーション型とTpOR ECDのサブドメインとの間のBRETアッセイを行い、生細胞での直接的な相互作用を測定した。共免疫沈降の結果を確認すると、完全長CALR del52についてD1D2とD1との間のBRE

10

20

30

40

50

Tシグナルの低下が観察された(CALR del52-HTに関して図3C、NL-sD1D2 to NL-sD1との比較)。対照的に、受容体ECDに対するCALR del52 P-CドメインまたはCドメインのみの結合は、D3D4またはD2D3D4のトランケーション後に類似であるかまたはわずかに高かった。(CALR del52 P-Cドメイン-HTおよびCALR del52 C-ドメイン-HT、NL-sD1D2およびNL-sD1に関して図3C)。

【0237】

上記の結果をまとめると、これは、CALR del52変異体テールが受容体のD1ドメインと直接相互作用することを確認した。

【0238】

次に、Schneider細胞において複合体として産生されたCALR del52-D1D2を精製した。簡潔に述べると、ショウジョウバエS2細胞(Thermo Fisher Scientific)において産生されたヒトTpoRおよびヒトCALR変異体del52の細胞外ドメインを、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、Superdex 200 Increase 10/300カラム(GE Healthcare)にロードすることにより分取した。溶離は、バッファーTNG(Tris-NaCl-グリセロール)pH 7.5によって0.5ml/分で行い、0.5mLの画分を回収し、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロットにより分析した。画分のタンパク質を、抗His5抗体(Qiagen)によって免疫沈降し、エンドグリコシダーゼH(NEB)またはN-グリコシダーゼF(NEB)で処置した。HDx-MSを使用して、同じ細胞で産生したCALR del52およびTpoR D1D2(sD1D2)の間の全ての相互作用部位を検出した。CALR del52単独およびCALR del52-TpoR D1D2複合体の間の重水素取り込みの比較により、CALR変異体が2つの主なドメインを介してTpoRと相互作用することが示された。まず、最高の重水素取り込みの差異は、カルレティキュリンの推定上のグリカン結合部位で観察された(図3E)。この領域は、特にC105、Y109、D135およびW319を含んでおり、これらは全て糖部分の結合に関して重要であることが報告されている(Gopalakrishnapai et al., 2006)。重要なことに、この領域は、に示されるように成熟TpoRの結合に関与せず、これが、未成熟グリカンとの相互作用に特に関与していることが確認された。第2に、CALR del52変異体テールを含む複数のペプチドは等しく、CALR del52-sD1D2複合体とCALR del52単独との間の高い程度の差次的な取り込みを示した(データを示していない)。これにより、変異体テールが、受容体の成熟型に対する結合のみならず、未成熟TpoRに対する結合にも関与していることが確認され、この相互作用は、CALRグリカン結合ポケットと、TpoR D1D2のAsn117上の未成熟な糖部分との間の強力な相互作用によりさらに強化された(Chachoua et al., 2016)。最後に、CALR del52のPドメインは、TpoR D1D2ドメイン(sD1D2)と複合体形成すると、重水素取り込みにより一層到達しやすく(図3G)、これが以前に示唆されたように(Araki et al., 2016)、受容体との相互作用に関与していないことを実証した。

【0239】

実施例3：TpoR細胞外ドメインとCALR del52変異体テールの相互作用の包括的なモデル

材料および方法

変異誘発：全てのアラニンスキャン変異体を、代替的にQuickChange(Agilent)、KLD enzyme mix(NEB)の手順を製造社の説明書に従って使用して作製したが、またはGenscriptから購入した。全てのコンストラクトを、シーケンシングにより確認した。

【0240】

転写Dual Luciferaseアッセイ：転写Dual Luciferase

10

20

30

40

50

を、Chachoua et al., 2016に記載されるように行った。簡潔に述べると、アラニンスキャニングのため、HEK293Tおよび2aに、STAT5、マウスJAK2および表記のヒトTpOR変異体をコードするプラスミド(全てpMX-IRE5-GFPベクターにおける)、ならびに空のベクターのCALR WT、CALR del52(pMSCV-IRE5-mCherryにおける)をトランスフェクトした。他のアッセイでは、HEK293TまたはヒトTpOR WTに、表記のCALR種をトランスフェクトした。いずれの場合においても、SpLucレポーターを、STAT5転写活性化の読み出しとして使用し、pRLTKを内部対照として使用した(Promega)。細胞を、表記の25 ng/mlのrhTpO (Milteneyi Biotech)によって刺激したか、または刺激しなかった。

10

【0241】

分子動力学およびドッキングシミュレーション: CALR Del52のTpOR細胞外領域および膜貫通領域の配列を、二次構造、内因性障害、およびアクセシビリティの傾向(Barik et al., 2020)に関して、最先端技術の予測因子によってプロファイリングした。最も近い鋳型を、Phyre2によって回収した。Modeler 9.21、Alpha-Fold2、およびRosetta Foldingを使用して、3Dモデルを有効に構築し、2つのCALR del52変異体の間の相互作用界面を同定した。HDx-MSのデータを使用して、四量体複合体の形成におけるTpORおよびCALR del52の間の接触を同定した。CALRと接触するTpORのER特異的G3M9のグリカン、NMRデータと一貫する立体配置でGlycopackによってモデル化し、残りは、SAGSデータベースに合致して構築された複合体型である。HDx-MSにより同定された接触およびTpOR二量体のTM領域の立体配置に関する固体-NMRのデータを、全体的な2CALR-2TpORモデルを作製する際の制約として使用した。この糖タンパク質(glycoproteic)4量体を、TpORのTM領域に適合する1607 POPC分子の脂質二重層ならびに4量体の残りを水和する溶媒領域を説明するTIP3P水分子および63ナトリウムイオンにある、環境の全原子表示の中に入れた。約150万個の原子からなるこれらのシステム全体を、OpenMMを使用して完全な分子の動態サイクルに供した。最初に、システムを、L-BFGアルゴリズムを使用して1kJ/モル濃度の閾値まで最小化した。次に、加熱を、NPTアンサンブルにおいて、2fsの時間刻みのLangevin integratorを使用して、1barの圧力および340bar nmの膜表面張力で0~300Kまで13nsの期間にわたり徐々に行い、この高い時間刻みを達成するために水素結合を拘束した。次に、産生を20ns継続した。可視化および分析を、MDTrajライブラリーを使用するVMD 1.9.3および施設内のPython 3.6スクリプトを使用して行った。

20

30

【0242】

結果

最初に、CALR del52変異体テールとTPOR ECDとの間の相互作用部位を、大部分の変異体では1度に3~4個のアミノ酸またはこれらのうち3個では8個のアミノ酸を変異させることにより、完全長TpORのD1D2ドメインの完全なアラニンスキャニングを行うことにより探索した。変異体テールは、活性化にとって厳密に必要なが、グリカンを通して起こる結合にとっては必要ではないことから、得られた変異体を、STAT5転写ルシフェラーゼアッセイにおいてCALR del52完全長またはトロンボポエチン(Tpo)リガンドによって活性化されるその能力に関して探索した。結果により、完全長の受容体のCALR del52依存的活性化を阻害することができる変異体の大部分が、D1ドメインまたはD2のC末端に位置していることが明らかとなった(データを示していない)。阻害性変異は、特に、TpORのN末端で密集しており、D1ドメインの内面/側面に集中していた。

40

【0243】

変異体テールの結合におけるD1の重要な役割を考慮して、CALR del52 P

50

- CドメインとD1アラニン変異体の相互作用をさらに探索し、完全長CALR del 52で得た結果と類似の結果が見いだされ(データを示していない)、それらが、変異体テールによって媒介される結合または活性化を防止することにより作用することを示唆した。

【0244】

CALR del 52変異体テールにおける塩基性残基(Arg)の非常に高い割合を考慮して、変異体テールとの相互作用に關与し得るTpORの酸性残基を調べた。残基37PLKCFSTRFEDLTCFWDEEE56(配列番号7)を含むTpORのまさにN末端で酸性残基に富む1つの伸長領域は、TpORの活性化に潜在的に重要であると思われた。試験した62の変異体のうち、CALR del 52媒介活性化を阻害するもの全てが、TpORのTPo誘導活性化を等しく防止したが、その逆は当てはまらなかった(データを示していない)。このことは、活性化のためにTpOにより使用される全ての部位がCALR del 52によっても使用され、TpORおよびCALR del 52を共発現する細胞におけるTpOの作用の減少を説明していることを示唆しているが、またCALR del 52がTpオリガンドにより使用されないさらなる部位も使用することをも示唆している。

10

【0245】

TpOR ECD上のCALR del 52変異体テールの結合部位をさらに探索するために、HDx-MSを行い、完全な成熟TpOR ECD(標識されたD1D4)、または本発明者らが上述の変異体テール(図2A参照)を介して相互作用したことを示したCALR del 52-D1D4複合体の間の差次的重水素交換比率を測定した。TpOR ECDの範囲領域のうち、3つのペプチド、すなわち41FSRTFED47ペプチド(配列番号59)、51WDEEEAAPGST62ペプチド(配列番号61)、および272WSLPVT277ペプチド(配列番号64)が、CALR del 52の存在下で有意な差次的重水素交換を呈した(図4A)。アラニンスキャニングデータと一致して、44TFED47フラグメント(配列番号60)を含む41FSRTFED47ペプチド(配列番号59)は、最も強力な重水素交換の差異を示し(図4A~B)、次いで高度に負に荷電した51WDEEEAAPGST62フラグメント(配列番号61)が強力な重水素の交換の差異を示したが、55E AAPGST62(配列番号63)を含む別のペプチドが2つの条件の間で有意な効果の差異を示さなかったため(不図示)、その差次的な重水素交換は、51WDEE54フラグメント(配列番号62)によるものであった。なお驚くべきことに、小さいが有意な交換の差異がまた、D2ドメインのC末端に存在する272WSLPVT277ペプチド(配列番号64)でも検出された。他の検出されたペプチドは、2つの条件間で有意な重水素還元交換を示さなかったが、配列範囲が不完全であるため、2つのタンパク質間の他の相互作用部位の非存在を排除することはできなかった。

20

30

【0246】

TpORとCALR del 52変異体テールの相互作用をさらに探索するため、分子動力学(MD)を使用してTpOR D1D2ドメインの構造を得た。モデルを作製した後、2つの複合体グリカンをグリコシル化部位Asn117およびAsn178に結合させた。モデルの安定性を評価するために、5MDシミュレーションの試行を、陽溶媒においてそれぞれ1 μ sの長さで行った。最終的なモデルは、AlphaFold 2.0により最近公開されたものと一致した。配列分析は、TpOR D1D2が、過剰量の11の負に荷電した酸性アミノ酸を伴う不均衡な荷電した組成物を有することを示している(データ不図示)。さらに、モデルは、TpOR表面の1つの伸長した(S1)および第2のより局在化した(S2)負に荷電した領域を同定する。これらの酸性領域は、CALR変異体の高度に塩基性のC末端テールとの相互作用を特に受けやすく、これは、残基394まで広範囲のらせん構造を採用することが示された。変異体テールは、実際に、塩基性残基(Lys/Arg)および疎水性残基(Met)を多く含んでいる。

40

【0247】

50

T p o Rの活性化における酸性残基と比較した疎水性残基の役割を評価するために、全ての塩基性残基（アルギニン（R）およびリジン（K）残基）または全ての疎水性残基（メチオニン（M）残基）を、G l y（G）またはA s n（Q）に変異させ、それぞれC A L R d e l 5 2 R / K t G、C A L R d e l 5 2 R / K t Q、C A L R d e l 5 2 M t GおよびC A L R d e l 5 2 M t Qを提供した。結果は、疎水性残基のG l yまたはA s nへのいずれかへの変異が、らせんの向きの調節の後に観察されるものと定量的に類似のT p o Rの活性化の減少をもたらすことを示した（図4C、C A L R d e l 5 2 M t GおよびC A L R d e l 5 2 M t Q）。対照的に、塩基性残基のA s nまたはG l yのいずれかへの変異（C A L R d e l 5 2 R / K t GおよびC A L R d e l 5 2 R / K t Q）は、C A L R d e l 5 2がT p o Rを活性化する能力の完全な喪失をもたらした（図4C）。これらの結果は、以前に公開されたデータ（E l f e t a l . , 2 0 1 6）と一致しており、変異体テールとT p o R E C Dとの間の相互作用が、塩基性 - 酸性相互作用に本質的に依存することを示唆している。

【0248】

次に、i n s i l i c oでのシミュレーションを行い、T p o R D 1 D 2ドメインに対する変異体テール単独の最も安定した相互作用部位を探索した。C A L R d e l 5 2変異体テールをモデル化した後、ドッキング試行を、T p o R D 1 D 2 - C A L R d e l 5 2の変異体テール複合体最適化検索のためにH A D D O C Kでの入力として設定されたT p o Rの酸性領域に基づく複合体の3つの主な開始立体配置を使用して行った。上位の立体配置を、5 0 0 n sの分子動力学試行を使用してさらに最適化し、変異体の最後の残基がアンフォールディングとなる3つの最終的なポーズを得て（データ（sata）を示していない）、F T I Rのデータを確認した。

【0249】

自由エネルギー（G）を、P r o d i g yを使用してさらに推定した。T p o R D 1 D 2に関するC A L R d e l 5 2変異体テールの高い結合親和性と一致した、非常に大きな負の値の自由エネルギー（ $G < - 9 \text{ kcal/mol}$ 、データを示していない）を示す複合体の非常に多数の微視状態が存在した。よって、T p o R - D 1のN末端領域で見出されたさらなる小さな負のクラスター領域でさえも、単独で、C A L R d e l 5 2変異体テールに対し有意な親和性を有する。興味深いことに、このT p o R - D 1領域を結合するプロセスにおいて、C A L R d e l 5 2変異体テールは、T p o RのN末端で見出されるらせんの転位およびアンフォールディングを誘導することができる。M D実験により示された。コンピューター上の作業により、C A L R d e l 5 2変異体テールが、D 1（および部分的にD 2）で主に見出される連続した酸性領域だけでなく、D 1のN末端領域の小さな酸性パッチの両方を標的とする非常に多数のマイクロ立体配置において非常に高い親和性でT p o Rと結合する能力を有することが示された。C A L R d e l 5 2がそのレクチンおよび変異体テールの両方を介して非常に多くの方法でそのT p o R「プレイ（pray）」に結合することができる「アナコンダ」作用は、主に、電荷の相補性により誘導される相乗的な非局在化作用によるものであり、これは、C A L R d e l 5 2変異体テールの有意なフレキシビリティと組み合わせて、2つの相互作用物質の非常に大きな領域にわたり拡大され、この方法ではT p o Rに対してより厳格な形状を成形することができる。このことは、局所介入（たとえば点変異による）が、2つの分子対象間の全体的な相互作用を単に調節し、これを完全に破壊するのではないことを示唆した。4 4 T F E D 4 7モチーフのT、E、およびD残基は、アラニンスキャニングおよびH D X - M Sデータと一致して、ポーズ2として表示されるモデルによるM DシミュレーションによりC A L R d e l 5 2変異体テール上の負に荷電した残基と直接相互作用することが予測される。同様に、ポーズ3は、C A L R d e l 5 2変異体テールのA r gと5 1 W D E E 5 4（配列番号62）の5 3 E E 5 4との間の相互作用だけでなく、6 4 Q L L Y 6 8（配列番号65）モチーフのQ 6 4との間の相互作用も予測した。両モチーフのアラニンへの変異は、C A L R d e l 5 2誘導活性化の喪失をもたらした。

【0250】

変異体テールのみを使用したMDシミュレーションは、後者が、様々なマイクロ立体配置において受容体に結合することができることを示した。しかしながら、完全長CALR de152に対するTpORの結合はまた、NDメインとAsn117上の未成熟グリカンとの間の強力な相互作用も伴う。よって、AlphaFold 2.0予測を使用して、TpORのモデル化を完成させ、POPC脂質二重層に挿入される受容体の完全な細胞外ドメインを得た。TpORモノマーは、CALR de152の存在下で活性な立体配置と同様に界面で残基L508とそれらのTMDメインを介して二量体化した(図2F)。CALR de152二量体を、実験データおよびエネルギー最小化に基づきグリカン結合ドメインおよび変異体テールを介してTpORの二量体にドッキングさせた(データを示していない)。この最終的な構造は、上述のHDx-MSおよびアラニンスキャニングデータと一致して、主な相互作用部位が44TFED47(配列番号60)モチーフの周辺に位置している立体配置に変異体テールを配置する。同様に、重要な残基を含むNDメインポケットと相互作用する受容体のAsn117上の未成熟グリカンは、C105、Y109、D135、およびW319を含むグリカンの結合に参与した。

10

【0251】

次に、20nsの分子動力学シミュレーションを、4量体全体で行った。この複合体は、非常にフレキシブルなPDメインを除き、この時間枠の間非常に安定していた(ビデオを示していない)。TPORおよびCALRの分子間の接触を、シミュレーションの過程にわたり分析した。大部分の接触は、塩基性相互作用に依存しており、シスおよびトランスの両方で起こり、これにより、TpOR二量体をさらに安定化させた。

20

【0252】

よって、本明細書において、CALR de152が、TpOR D1ドメインと2つの領域を介して相互作用するモデルを提唱する。第1に、変異体は、TpOR D1ドメインの内面/側面上の複数の負に荷電した残基と直接相互作用する。TpORおよびCALR de152の間のこの相互作用は、CALRグリカン結合ドメインおよび主にTpORのAsn117上の未成熟糖部分の間の強力な相互作用によりさらに安定化される。よってこの、TpORの2つの異なる部位に結合するCALR変異体タンパク質のアナコンダ作用は、受容体に対するその高い親和性および特異性の両方を説明する。

【0253】

実施例4：CALR変異体の結合に関するFcカップリングTpOR ECD
材料および方法

30

TPOR細胞外ドメインの異なるフラグメントに対するhuIgG1またはmuIgG2B(実験に応じて)のFcフラグメントの融合を行った。このような方法は、TNFの病理学的作用を捕捉し遮断することができる、腫瘍壊死因子(TNF)の細胞外ドメインとFcフラグメントとの間の融合タンパク質である、Etanercept(登録商標)で処置される関節リウマチを含むいくつかの病態の処置に使用して成功した(Zhao et al., 2019; Korth-Bradley J.M. et al., 2000)。TPORのCALR変異体の結合および活性化の阻害のため、TPOR受容体の3つのFcカップリング可溶性種を開発した。これらの可溶性種は、受容体の細胞外ドメイン全体(D1D2D3D4と称される)、受容体の第1の2つのドメイン(D1D2と称される)、または排他的に受容体の第1のドメイン(D1と称される)のいずれかを含む。全てが、C末端を介してFcフラグメントにカップリングされる。これらの作用様式は2要素である。第1に、これらは、循環するCALR変異体の捕捉分子として作用し、これによりその不安定なサイトカイン作用を防止する(Pecquet et al., 2019)。第2に、これらは、CALR変異体に対する結合に関して表面に露出した結合TPORと競合する。

40

【0254】

生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)を使用して、これらの可溶性種がTPORに対するCALR変異体の結合を防止する能力を試験した(実施例1参照)。技術は、生細胞においてNanoLucタグ分子(本明細書において、TPOR)とHaloTagカ

50

カップリングパートナー（ここではCALR del52）との間の相互作用を直接試験することを可能にする。NanoLucおよびHaloTagは、非常に近位にあり（< 10 nm）、NanoLuc（ドナー）およびHaloTag（アクセプター）の間のエネルギー転移は、BRET比のシフトをもたらし、これは、2つのパートナー間の近接性に関する読み出しとして使用される。

【0255】

結果

3つ全ての可溶性融合タンパク質、すなわちFc-D1、Fc-D1D2、およびFc-D1D2D3D4は、完全長TPORに対するCALR変異体の結合を阻害することができる（図5A～C）。D1ドメインが単独でこの結合を防止することができるという事実は、CALR変異体と受容体との間の相互作用が、融合タンパク質（本明細書ではIgGのFcフラグメントとの）に含まれる場合であっても、D1ドメインを介して排他的に起こり得ることを示唆している。

10

【0256】

重要なことに、図5Dは、TPORとのCALR変異体相互作用の阻害が、117位のNグリコシル化の存在に依存しないことを示している。よって、未成熟N-グリカンの存在は、CALR変異体によるTPORの完全な活性化にとって必要である（Chachoua et al., Blood 2016）が、CALR変異体-TPORの相互作用の阻害は、未成熟N-グリコシル化に依存しない。具体的には、N117を欠いたD1の変異体は、完全長TPORに対するCALR変異体の結合を阻害することができるままである（図5D）。

20

【0257】

実施例5：TpOR ECDフラグメントD1は、TpORに対するCALR変異体の結合をin transで阻害することができる。

材料および方法

Fcに融合されるTPORの可溶性細胞外ドメイン（ECD）種、すなわちD1-FcおよびD1D2D3D4-Fcを、培養HEK293T細胞によるそれらの分泌の後に収集した。これらを、CALR変異体と共にそれらの表面でヒトTPORを安定して発現する造血性細胞株Baf3細胞の培養培地に添加した（Balligand et al., Leukemia 2016）。FcカップリングTPOR種がCALR変異体およびTPORの間の相互作用を防止する能力を、対照ビヒクルまたは同じ濃度のFcフラグメント単独、D1-FcもしくはD1D2D3D4-Fcフラグメントの存在下で細胞表面CALR変異体のレベルを測定することにより評価した。測定は、生細胞の細胞表面で変異体CALRを特異的に認識する抗体によるフローサイトメトリーにより行った。

30

【0258】

結果

試験した濃度で、D1-Fc融合タンパク質は、細胞表面上のCALR変異体のレベルを50%超低減することができた。このことは、Fc対照がCALR変異体の細胞表面レベルを調節しなかったため、D1-Fcに特異的であった（図6）。D1-Fcと比較して、D1D2D3D4-Fcは、TPORおよびCALRの間の相互作用を阻害する能力がより低く、阻害は50%未満であった（図6）。これらの結果は、(i) D1-Fcが、TpORに対する変異体CALRの結合をin transで阻害できること（細胞外空間から作用する）および(ii) D1-FcがD1D2D3D4-Fcよりも強力な阻害剤であることを実証している。

40

【0259】

実施例6：本態性血小板血症の処置のためのTpOR ECDフラグメントのin vivoでの適用

材料および方法

次に、遺伝子操作したマウスモデルを使用して、CALR変異体の内因性レベルを発現させた。マウスは、Balligand et al., 2020に記載されるように

50

本態性血小板血症の表現型を示す。簡潔に述べると、小さいガイドRNA (sgRNA) を、p x 330 ベクター (Addgene # 42230) にクローニングした。作製したベクターを、受精したB6D2マウス受精卵の核にマイクロインジェクションした。del52変異を作製する場合、Balligand et al., 2020に記載されるように、一本鎖オリゴDNAを鋳型として共注射して相同組み換え修復(HDR)を行った。選択した子をC57BL/6-DBA/2 (B6D22.F1) マウスと交配させ、その後の世代は、PCRスクリーニングによるCalrエクソン9のdel52変異の存在に基づき選択した。これらのマウスからの骨髓細胞を単離し、可溶性D1種(Fcフラグメントにカップリングしていない)または対照として使用される空のベクターのいずれかのDNAを含むウイルス粒子を、細胞に形質導入した。レシピエントマウスに、致死量の放射線を照射し、感染細胞を移植した。これらのマウスの表現型を、24週間にわたり経過観察して、ET表現型の読み出しとして使用される血小板濃度を測定することにより、可溶性D1種が*in vivo*で本態性血小板血症の発症を防止する能力を評価した。

10

【0260】

結果

予測される通り、ET (CALR del52 + pMEGIX) を有する対照マウスは、患者において観察されるET表現型を連想させる高レベルの循環中血小板を示した(図7)。全く対照的に、細胞にTPORの可溶性D1ドメイン(CALR del52 + pMEGIX-可溶性D1)を感染させた場合、これらは、ET表現型を発生せず、野生型同腹仔と類似の血小板レベルを示した(図7)。このことにより、可溶性D1分子を介したCALR変異体の阻害が、*in vivo*で疾患の発症を防止することができることが示された。

20

【0261】

実施例7: FFPLHLWVは、相互作用に関与していない

材料および方法

D1のFFPLtAAAAおよびHLWVtAAAAの変異体を、Genscriptから購入した。全てのコンストラクトを、シーケンシングにより確認した。

【0262】

生物発光共鳴エネルギー転移(BRET)を使用して、D1-Fc変異体(「FFPLtAAAA」および「HLWVtAAAA」)が完全長TpORとCALR del52との間の相互作用と競合する能力を試験し、その有効性を非変異体D1-Fc融合タンパク質と比較した(実施例1参照)。技術は、生細胞において、NanoLucタグ分子(ここではTPOR)およびHalotagカップリングパートナー(ここではCALR del52)の間の相互作用を直接試験することを可能にする。NanoLucおよびHalotagは、近位にあり(< 10 nm)、NanoLuc(ドナー)およびHalotag(アクセプター)の間のエネルギー転移は、BRET比のシフトをもたらし、これは、2つのパートナー間の近接性に関する読み出しとして使用される。

30

【0263】

D1のFFPLtAAAA変異体(配列番号87)

QDVSLLASDSEPLKCFSTRTFEDLTCFWDEEEAAPSGTYQL
LYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVQCQFPDQEEVRLAA
AAHLWVKNVFLNQT

40

【0264】

D1のHLWVtAAAA変異体(配列番号88)

QDVSLLASDSEPLKCFSTRTFEDLTCFWDEEEAAPSGTYQL
LYAYPREKPRACPLSSQSMPHFGTRYVQCQFPDQEEVRLFF
PLAAAANKVFLNQT

【0265】

結果

50

これらの結果は、D1を含むポリペプチドが、FFPLHLWVモチーフとは無関係にTPORと競合できることを実証する。実際に、このモチーフのアラニンへの変異は、D1がTPOR-CALR変異体の相互作用を防止する能力をむしろ増加させる(図8)。

【0266】

実施例8：TPOR-CALR変異体複合体の包括的モデル

材料および方法

AlphaFold2およびRosetta Foldingからの鑄型を使用して、4量体3Dモデルを効率的に構築し、2つのCALR変異体間の相互作用界面を同定した。HDx-MSデータを使用して、4量体複合体の形成におけるTPORおよびCALR Del52の間の接触を同定した。CALRと接触したTPORのER特異的G1M9グリカンを、NMRデータ60と一貫する立体配置でGlycopack 59によりモデル化し、残りは、複合体タイプであり、SAGS Database 61, 62に沿って構築した。TPOR二量体のTM領域立体配置におけるHDx-MSにより同定された接触および固体NMRデータを、2CALR-2TpoRモデル全体を作製する際の制約として使用した。この糖タンパク質(glycoproteic)4量体を、CHARMM-GUI server 63を使用して、TpoRのTM領域に適合する1907 POPCの脂質二重層、ならびに4量体の残りを水和する溶媒領域を説明する478479 TIP3P水分子、1328塩化物、および1402ナトリウムイオンにある、環境の全原子表示(full-atom representation)の中に入れた。約100万の原子からなるこれらのシステム全体を、NAMD v.2.13.64 CHARMM36力場65-67を使用して、最小化の開始(tart minimization)、300Kへの加熱、次いで0Kへの冷却、および最終的に最小化の拡張(final extended minimization)から構成される穏やかなシミュレートされたアニリング手順に供した。同じ手順を使用して、TPOR-CALR Ins5複合体を構築した。TpoR-CALR-Del52/ins5モデルを、3回の分子動力学試行にさらに供して、立体配置の標本空間を探索した。

【0267】

結果

本発明者らの実験データに基づき、完全なTPOR-CALR変異体の4量体複合体の原子モデルを作製した。データは、TPORに対するCALR del52のC末端単独の結合が、様々なマイクロ立体配置で起こり得るが、44TFED47の中心にある伸長したS1酸性領域が相互作用にとって重要であることを示した。さらに、完全長CALR del52に対するTPORの結合もまた、NDメインの特定の残基およびAsn117上の未成熟N-グリカンの間の強力な相互作用を伴う。AlphaFold 2.0を使用して、TPORのモデル化を完成させ、受容体の完全な細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインを作製した。TPOR単量体は、CALR del52の存在下での活性な立体配置と同様に、界面において、それらのTMドメインを介して残基L508と二量体化した(図2F)。結合が、TPORのAsn117上の未成熟N-グリカンとCALR NDメインの残基との間、およびTPOR S1酸性領域とCALR変異体のC末端との間で同時に起こることを示す実験データを考慮して、CALR del52二量体をTPORの二量体にドッキングさせた。最終的な構造は、上記結果と一致して、主要な相互作用部位が44TFED47モチーフの周辺に位置している立体配置に変異体のC末端を配置する。同様に、TpoRのAsn117上の未成熟N-グリカンは、C105、Y109、およびW319を含むN-グリカン結合に関与する重要な残基を含むNDメインポケットと相互作用する(図9)。この糖タンパク質4量体を、POPC脂質二重層に埋め込み、ウォーターボックス(合計約100万個の原子)を、100nsで全ての原子の三連の分子動力学シミュレーションに供した。複合体は、非常にフレキシブルなPドメインを除き、この時間枠の間安定したままであった。シミュレーションの間に同定された大部分の接触は、塩基性-酸性の相互作用に依存し、シスおよびトランスの両方で起こり、これによりTpoR二量体をさらに安定化させた。これらは、44TFED47モチーフを伴った

が、同様に、D1に存在する伸長した陰性パッチの96PDQEE100および154WEEP157を含む他の陰性パッチも伴った(表1)。

【0268】

【表1】

表1: CALR del52-TpoR4量体複合体の三連の100nsのMD試行の間のCALR del52およびTpoRの間の接触。接触を、距離 $< 8 \text{ \AA}$ を有する残基として定義する。フレームの60%超に存在する接触(三連の平均)のみを示す。

	CALR del52 残基	接触の%
R43	R388	68.33 ± 44.78
R43	M391	66.33 ± 46.91
R43	S392	65.67 ± 46.45
R43	P393	65.67 ± 46.45
T44	R379	87.00 ± 14.35
T44	R382	73.00 ± 37.48
T44	T383	85.00 ± 21.21
T44	R384	89.33 ± 15.08
T44	K386	100.00 ± 0.00
T44	M387	66.67 ± 46.44
T44	R388	77.33 ± 32.06
T44	K390	63.00 ± 14.17
T44	M391	84.33 ± 22.16
F45	R379	89.67 ± 11.90
F45	R382	82.67 ± 23.81
F45	T383	68.33 ± 44.78
F45	K386	100.00 ± 0.00
F45	M391	76.67 ± 23.46
E46	R378	76.67 ± 33.00
E46	R379	100.00 ± 0.00
E46	M380	96.33 ± 5.19
E46	R381	67.33 ± 46.20
E46	R382	99.33 ± 0.94

E46	T383	100.00 ± 0.00
E46	R384	96.33 ± 2.87
E46	K386	99.00 ± 1.41
D47	R379	99.00 ± 1.41
D47	T383	73.67 ± 37.24
D47	R384	100.00 ± 0.00
D47	K386	64.00 ± 24.18
D47	R388	71.00 ± 41.01
L48	R379	79.67 ± 28.76
Y63	D71	62.00 ± 43.85
Y63	A72	60.00 ± 43.20
Y63	V321	64.00 ± 44.03
Y63	K322	64.67 ± 36.06
F95	R379	76.00 ± 33.94
P96	R376	62.67 ± 23.46
P96	R379	80.33 ± 23.70
D97	R372	80.00 ± 28.28
D97	M375	74.00 ± 36.77
D97	R376	97.67 ± 1.70
D97	R379	99.67 ± 0.47
Q98	M371	67.67 ± 40.79
Q98	R372	72.67 ± 21.23
Q98	M375	82.33 ± 24.98
Q98	R376	83.00 ± 15.51
Q98	R379	98.33 ± 1.25

10

20

30

40

50

Q98	R382	74.33 ± 21.76
E99	M371	61.67 ± 22.94
E99	R372	61.33 ± 43.74
E99	M375	99.33 ± 0.94
E99	R379	92.67 ± 5.79
E100	R372	70.00 ± 21.77
V101	R379	82.67 ± 23.81
R102	R379	70.00 ± 31.19
R102	R382	68.67 ± 23.10
A134	K390	72.67 ± 17.21
P135	K390	81.33 ± 16.82
P136	R389	67.33 ± 33.48
P136	K390	75.33 ± 15.20
S137	K386	63.67 ± 39.53
S137	M387	63.00 ± 40.47
S137	R388	63.67 ± 42.19
S137	R389	98.00 ± 2.83
S137	K390	100.00 ± 0.00
S137	M391	90.33 ± 9.18
S137	S392	90.00 ± 10.80
S137	A394	63.33 ± 40.30
I138	R388	90.67 ± 1.70
I138	R389	99.67 ± 0.47
I138	K390	100.00 ± 0.00
I138	M391	100.00 ± 0.00
I138	S392	100.00 ± 0.00
I138	P393	100.00 ± 0.00
I138	A394	100.00 ± 0.00
I138	R395	98.33 ± 1.25
I138	R397	99.00 ± 0.82
I139	A394	94.00 ± 4.32
K140	P393	93.67 ± 4.92
K140	A394	100.00 ± 0.00
K140	R395	82.00 ± 3.74
K140	P396	64.67 ± 24.23
K140	R397	88.33 ± 8.34
M142	A394	65.67 ± 39.08
M142	R395	73.33 ± 34.24
M142	P396	80.67 ± 25.25

M142	R397	80.00 ± 26.87
Q151	P396	77.00 ± 25.15
Q151	R397	81.67 ± 25.93
Q151	T398	82.33 ± 22.22
Q151	S399	70.33 ± 35.78
I152	R397	100.00 ± 0.00
S153	A394	99.00 ± 1.41
S153	R395	100.00 ± 0.00
S153	P396	91.00 ± 12.73
S153	R397	100.00 ± 0.00
S153	T398	68.67 ± 22.22
W154	R389	62.67 ± 25.53
W154	A394	99.33 ± 0.94
W154	R395	100.00 ± 0.00
W154	P396	73.67 ± 13.60
W154	R397	100.00 ± 0.00
E155	R388	94.67 ± 0.47
E155	R389	100.00 ± 0.00
E155	K390	99.67 ± 0.47
E155	M391	72.00 ± 32.57
E155	S392	100.00 ± 0.00
E155	P393	100.00 ± 0.00
E155	A394	100.00 ± 0.00
E155	R395	100.00 ± 0.00
E155	P396	100.00 ± 0.00
E155	R397	100.00 ± 0.00
E155	C400	71.67 ± 37.28
E155	R401	64.33 ± 42.68
E155	E402	72.00 ± 33.98
E155	A403	89.00 ± 9.63
E156	R385	70.00 ± 40.31
E156	K386	99.67 ± 0.47
E156	M387	74.67 ± 6.65
E156	R388	94.67 ± 2.05
E156	R389	100.00 ± 0.00
E156	K390	100.00 ± 0.00
E156	S392	73.67 ± 37.24
E156	R395	100.00 ± 0.00
E156	R397	100.00 ± 0.00

10

20

30

40

50

E156	C400	66.00 ± 44.59
E156	R401	65.00 ± 44.64
P157	K386	100.00 ± 0.00
P157	R389	100.00 ± 0.00
P157	K390	94.33 ± 7.32
P157	R397	73.67 ± 14.06
A158	R382	80.33 ± 20.07
A158	T383	78.67 ± 5.73
A158	R385	100.00 ± 0.00
A158	K386	100.00 ± 0.00
A158	M387	99.33 ± 0.47
A158	R388	99.67 ± 0.47
A158	R389	100.00 ± 0.00
A158	K390	99.67 ± 0.47
A158	M391	60.67 ± 43.39
P159	R382	88.67 ± 10.40
P159	R385	97.00 ± 0.82
P159	K386	100.00 ± 0.00
P159	R389	91.00 ± 8.83
E160	R382	99.67 ± 0.47
E160	T383	63.67 ± 15.17
E160	R385	79.67 ± 10.21
E160	K386	100.00 ± 0.00
I161	K386	89.67 ± 6.85
S162	R385	77.00 ± 21.23
S162	R389	71.00 ± 38.91
Y167	R395	60.67 ± 32.07
D175	W408	81.33 ± 24.31
P176	W408	77.67 ± 29.47
S232	S399	61.00 ± 35.05
S232	E402	70.33 ± 41.96
A233	S399	60.67 ± 34.50
A233	E402	64.00 ± 41.41
L234	R397	100.00 ± 0.00
L234	T398	95.33 ± 4.64
L234	S399	96.00 ± 4.32
L234	C400	80.33 ± 27.11
L234	R401	81.67 ± 22.48
L234	E402	69.67 ± 41.49

T235	R397	99.33 ± 0.94
T235	T398	67.67 ± 45.73
A236	R395	98.67 ± 1.89
A236	P396	97.33 ± 3.77
A236	R397	100.00 ± 0.00
A236	T398	99.67 ± 0.47
A236	S399	97.67 ± 3.30
A236	C400	66.67 ± 47.14
E237	R389	89.33 ± 15.08
E237	R395	100.00 ± 0.00
E237	P396	100.00 ± 0.00
E237	R397	100.00 ± 0.00
E237	T398	100.00 ± 0.00
E237	S399	100.00 ± 0.00
E237	C400	99.67 ± 0.47
E237	R401	74.33 ± 35.59
E237	E402	66.67 ± 45.73
G238	R389	92.00 ± 9.93
G238	R395	100.00 ± 0.00
G238	P396	100.00 ± 0.00
G238	R397	100.00 ± 0.00
G238	T398	99.33 ± 0.94
G238	S399	61.00 ± 17.68
G238	C400	67.33 ± 42.71
G239	R395	100.00 ± 0.00
G239	P396	93.67 ± 2.87
G239	R397	100.00 ± 0.00
S240	P396	69.67 ± 21.48
S240	R397	100.00 ± 0.00
S240	T398	87.00 ± 9.27
S240	S399	78.33 ± 27.18
S240	E402	60.33 ± 42.46
C241	R397	100.00 ± 0.00
L242	T398	63.33 ± 29.80
L242	E402	67.00 ± 46.67
W253	W408	82.67 ± 24.51
W253	T409	67.00 ± 24.12
Q255	W408	78.67 ± 30.17
W272	W408	66.00 ± 46.68

S273	G407	60.67 ± 43.52
S273	W408	75.33 ± 34.18
L274	C404	75.00 ± 14.99
L274	L405	75.33 ± 30.07
L274	Q406	85.67 ± 19.57
L274	G407	69.00 ± 43.84

L274	W408	81.67 ± 25.93
L274	T409	62.33 ± 44.39
P275	Q406	77.67 ± 15.63
P275	G407	77.67 ± 29.49
P275	W408	82.67 ± 24.51
P275	T409	72.67 ± 38.66

10

20

30

40

50

【0269】

またこのモデルが、類似であるがより長いC末端を保有するCALR Ins5 (CALR 2型変異体)と適合性であるかどうかを評価するために、同様にCALR Ins5 - TpoR4量体複合体を、CALR del52と同じ手順に従って作製し、この複合体を、三連で全原子の分子動力学シミュレーションに供した。CALR del52と同様に、複合体は、100 nsの時間枠にわたり安定したままであった。シミュレーション時間枠にわたる相互作用残基の分析は、44TFED47モチーフ、96PDQEE100モチーフが、26QDV28モチーフに加えてCALR - Ins5 - TpoR4量体複合体において保存されていることを明らかにした(表2)。

【0270】

10

【表2】

表2: CALR Ins5-TpoR4量体複合体の三連の100 nsのMD試行際のCALR Ins5およびTpoRの間の接触。接触を、距離<8 Åを有する残基として定義する。フレームの60%超に存在する接触(三連の平均)のみを示す。

	CALR Ins5 残基	接触の%
S25	S411	64.00 ± 45.28
D27	K409	65.33 ± 46.20
D27	M410	66.67 ± 47.14
D27	S411	66.67 ± 47.14
D27	P415	63.67 ± 45.17
D27	C419	60.33 ± 42.99
V28	M410	66.00 ± 46.68
V28	S411	66.67 ± 47.14
V28	P412	66.67 ± 47.14
V28	A413	66.67 ± 47.14
V28	R414	66.67 ± 47.14
V28	P415	66.67 ± 47.14

V28	R416	66.67 ± 47.14
V28	C419	65.00 ± 46.01
S29	R414	60.33 ± 42.82
S29	P415	66.67 ± 47.14
S29	R416	65.67 ± 46.45
S29	R420	65.67 ± 39.72
S29	E421	65.67 ± 46.44
S29	C423	61.33 ± 43.86
L30	P415	64.67 ± 45.79
L31	M410	66.33 ± 46.91
L31	S411	66.00 ± 46.68
L31	A413	65.33 ± 46.23
L31	R414	63.67 ± 45.17
L31	P415	66.67 ± 47.14

20

30

40

50

L31	R416	62.33 ± 44.39
L31	S418	61.67 ± 44.03
L31	C419	66.67 ± 47.14
A32	R414	66.67 ± 47.14
A32	P415	66.67 ± 47.14
A32	R416	66.67 ± 47.14
A32	T417	65.33 ± 46.23
A32	S418	64.67 ± 45.11
A32	C419	73.67 ± 36.54
A32	E421	81.00 ± 8.64
S33	P415	66.67 ± 47.14
S33	R416	65.00 ± 46.01
S33	T417	60.00 ± 43.20
S33	S418	63.00 ± 44.77
S33	R420	68.00 ± 45.25
F41	M410	66.67 ± 47.14
R43	K405	89.33 ± 10.14
R43	R408	65.33 ± 46.23
R43	K409	66.67 ± 47.14
R43	M410	66.67 ± 47.14
R43	S411	65.00 ± 45.98
T44	R401	97.33 ± 3.09
T44	R401	91.67 ± 7.93
T44	T402	75.67 ± 33.71
T44	R404	77.00 ± 32.53
T44	R404	74.00 ± 16.57
T44	K405	100.00 ± 0.00
T44	M406	81.33 ± 22.29
F45	R397	82.67 ± 16.76
F45	R398	95.33 ± 6.60
F45	R401	75.00 ± 18.24
F45	R401	66.67 ± 47.14
F45	R404	78.00 ± 11.31
F45	K405	97.67 ± 3.30
E46	M394	67.00 ± 28.89
E46	R397	94.67 ± 7.54
E46	R397	65.33 ± 32.43
E46	R398	98.33 ± 1.25
E46	R398	87.33 ± 17.91

E46	R401	100.00 ± 0.00
E46	R401	74.00 ± 36.77
E46	T402	98.00 ± 2.83
E46	R404	69.67 ± 32.25
E46	R404	62.67 ± 17.56
E46	K405	100.00 ± 0.00
D47	R397	62.33 ± 43.74
D47	R398	97.33 ± 3.77
D47	R398	78.67 ± 16.44
D47	R401	88.67 ± 16.03
D47	T402	67.67 ± 40.88
D47	K405	93.33 ± 4.92
L48	R398	78.67 ± 29.47
T49	M410	60.33 ± 42.99
F51	M410	66.67 ± 47.14
D53	P415	63.33 ± 44.97
E55	R414	60.67 ± 43.52
M84	S411	65.67 ± 46.45
M84	P412	66.67 ± 47.14
M84	A413	66.00 ± 46.67
H86	R414	66.67 ± 47.14
F87	S411	64.00 ± 45.37
F87	P412	66.67 ± 47.14
F87	A413	66.67 ± 47.14
F87	R414	66.67 ± 47.14
G88	R414	64.67 ± 45.76
R90	M410	66.67 ± 47.14
R90	S411	66.67 ± 47.14
R90	P412	66.67 ± 47.14
R90	A413	66.67 ± 47.14
R90	R414	65.67 ± 46.45
R90	P415	68.67 ± 42.91
F95	R398	74.00 ± 34.67
F95	R398	63.67 ± 34.76
P96	R395	70.67 ± 40.78
P96	R398	77.33 ± 23.92
P96	R398	64.67 ± 29.41
D97	R387	62.67 ± 43.28
D97	R391	72.33 ± 39.13

10

20

30

40

50

D97	T392	63.67 ± 43.18
D97	M394	78.00 ± 31.11
D97	M394	66.67 ± 47.14
D97	R395	86.67 ± 18.86
D97	R395	75.67 ± 28.29
D97	R398	100.00 ± 0.00
D97	R398	94.00 ± 8.49
Q98	M394	99.00 ± 1.41
Q98	R395	68.67 ± 43.61
Q98	R398	100.00 ± 0.00
Q98	R398	99.67 ± 0.47
E99	M390	67.00 ± 30.47
E99	R391	95.33 ± 5.91
E99	M394	100.00 ± 0.00
E99	M394	83.33 ± 22.17
E99	R395	98.33 ± 1.70
E99	R395	73.67 ± 19.60
E99	R397	64.67 ± 34.99
E99	R398	99.67 ± 0.47
E99	R398	93.00 ± 5.72
E99	R401	60.67 ± 34.99
E100	M394	99.00 ± 1.41
E100	R398	80.33 ± 27.81
E100	R398	66.67 ± 23.58
V101	M394	100.00 ± 0.00
V101	R397	60.00 ± 42.59
V101	R398	81.00 ± 26.87
V101	R398	72.33 ± 7.72
V101	R401	63.33 ± 27.72
R102	M390	67.67 ± 45.73
R102	M394	68.00 ± 40.41
R102	R398	67.33 ± 46.20
R102	R401	65.67 ± 24.36
L103	R397	82.00 ± 22.69
L103	R398	65.33 ± 46.20
L103	R401	62.67 ± 37.38
L132	M410	65.33 ± 46.23
A134	M410	63.67 ± 45.11
A134	S411	62.00 ± 10.61

P135	M410	66.00 ± 46.67
P135	S411	91.00 ± 12.73
P135	P412	79.33 ± 17.33
P135	A413	69.33 ± 23.47
P136	R407	89.33 ± 11.73
P136	P412	60.67 ± 42.97
S137	R407	95.67 ± 5.44
S137	K409	84.00 ± 21.92
S137	M410	65.33 ± 32.15
I138	R407	81.33 ± 25.00
I138	K409	66.67 ± 18.12
I138	S411	66.67 ± 23.30
I138	P412	65.67 ± 46.44
I138	R414	62.67 ± 44.58
K140	P412	60.33 ± 19.57
E155	R407	79.33 ± 27.82
E155	K409	99.33 ± 0.47
E155	M410	71.33 ± 38.44
E155	S411	99.67 ± 0.47
E155	P412	88.67 ± 10.34
E155	R414	66.00 ± 46.68
E156	M406	80.00 ± 17.68
E156	R407	100.00 ± 0.00
E156	R408	95.00 ± 7.07
E156	K409	99.67 ± 0.47
E156	M410	68.00 ± 24.06
P157	K405	98.00 ± 1.41
P157	M406	93.67 ± 4.11
P157	R407	100.00 ± 0.00
P157	K409	60.67 ± 22.66
A158	R404	93.00 ± 5.35
A158	K405	100.00 ± 0.00
A158	M406	100.00 ± 0.00
A158	R407	100.00 ± 0.00
A158	R408	91.33 ± 11.56
P159	R403	94.00 ± 3.56
P159	R404	100.00 ± 0.00
P159	K405	100.00 ± 0.00
P159	K405	68.33 ± 43.38

10

20

30

40

50

P159	M406	100.00 ± 0.00
P159	R407	100.00 ± 0.00
P159	R408	100.00 ± 0.00
P159	R408	66.33 ± 46.91
P159	K409	98.33 ± 1.70
P159	K409	64.33 ± 22.17
E160	R400	65.67 ± 46.45
E160	R401	95.00 ± 3.27
E160	R403	74.67 ± 10.96
E160	R403	67.33 ± 32.83
E160	R404	100.00 ± 0.00
E160	R404	78.67 ± 29.47
E160	K405	100.00 ± 0.00
E160	K405	78.67 ± 30.17
E160	M406	100.00 ± 0.00
E160	M406	67.00 ± 30.24
E160	R407	77.67 ± 10.50
E160	R408	91.33 ± 11.56
I161	R404	64.67 ± 28.29
I161	K405	95.00 ± 3.74
I161	K405	61.00 ± 40.60
R174	A430	61.00 ± 43.69
D175	Q425	86.33 ± 19.33
D175	A430	64.33 ± 41.59
P176	L424	71.67 ± 38.66
P176	Q425	94.00 ± 8.49
P176	G426	100.00 ± 0.00
P176	W427	84.67 ± 17.52
P176	T428	99.00 ± 1.41
P176	E429	91.33 ± 7.59
P176	A430	65.67 ± 41.02
K177	L424	61.33 ± 34.62
K177	Q425	92.33 ± 10.84
K177	G426	100.00 ± 0.00
K177	G426	63.33 ± 43.56
K177	W427	100.00 ± 0.00
K177	T428	100.00 ± 0.00
K177	E429	99.00 ± 1.41
K177	E429	63.00 ± 44.77

K177	A430	96.00 ± 5.66
N178	Q425	90.67 ± 13.20
N178	G426	100.00 ± 0.00
N178	G426	64.33 ± 43.38
N178	W427	100.00 ± 0.00
N178	W427	64.33 ± 43.56
N178	T428	100.00 ± 0.00
N178	T428	62.67 ± 43.93
N178	E429	99.00 ± 1.41
N178	E429	61.67 ± 42.63
N178	A430	99.00 ± 1.41
S179	Q425	61.00 ± 35.56
S179	G426	98.00 ± 2.83
S179	W427	96.33 ± 5.19
S179	T428	96.33 ± 5.19
S179	E429	96.67 ± 4.71
S179	A430	95.33 ± 3.40
T180	T428	86.33 ± 18.62
T180	E429	86.00 ± 18.40
G181	Q425	69.00 ± 43.84
G181	G426	91.67 ± 8.50
G181	T428	72.67 ± 10.08
P182	A422	63.00 ± 44.77
P182	L424	66.67 ± 47.14
P182	Q425	67.67 ± 45.73
P182	G426	78.67 ± 21.64
E237	R408	60.67 ± 43.52
G238	K409	62.67 ± 43.02
W253	R416	65.00 ± 29.88
Q255	R416	89.33 ± 7.93
W269	P415	83.00 ± 14.97
W269	R416	69.67 ± 32.87
W269	T417	76.00 ± 29.13
W269	S418	85.67 ± 14.70
W269	S418	68.67 ± 20.95
W269	C419	98.67 ± 1.25
W269	C419	68.67 ± 38.13
W269	R420	74.67 ± 14.34
W269	R420	63.00 ± 44.70

10

20

30

40

50

G270	P415	77.67 ± 16.13	S273	A413	73.00 ± 28.25
S271	P415	61.33 ± 31.90	S273	R414	72.33 ± 35.61
W272	S411	93.67 ± 5.79	S273	R416	95.67 ± 5.44
W272	P412	85.67 ± 16.78	L274	S411	75.67 ± 32.29
W272	A413	99.67 ± 0.47	L274	P412	98.67 ± 1.25
W272	R414	99.67 ± 0.47	L274	A413	100.00 ± 0.00
W272	P415	100.00 ± 0.00	L274	R414	100.00 ± 0.00
W272	R416	100.00 ± 0.00	L274	R416	90.00 ± 3.56
W272	T417	84.33 ± 19.40	P275	A413	76.33 ± 26.60
W272	S418	79.00 ± 14.72	P275	R414	67.67 ± 24.42
W272	C419	67.67 ± 38.73	P275	R416	94.00 ± 7.12

10

【0271】

これらの実験データおよび原子シミュレーションは、CALR変異体が本質的にD1ドメイン上にあるTPORの2つの領域を介して相互作用することを示す。変異体のC末端は、S1陰性パッチにより表されるTPOR D1ドメインの内面/側面上の複数の負に荷電した残基と直接相互作用する。

【0272】

20

実施例9：CALRに対するTPORの結合に關与するD1からの残基の同定
材料および方法

NanoBRET法に関しては実施例4を参照されたい。

【0273】

図10は、漸増量のヒトD1 WTおよび変異体の存在下で、TPOR 完全長およびCALR del52の間の結合に関する代用として使用したNanoBRETシグナルを例示する。これらのデータは、モチーフ

【化1】

QDV、SDSE、WDEE、EAAP、およびFSR

30

における残基を含むTPORの荷電した残基が、D1がCALR変異体 - TPOR相互作用の競合物質として作用する最大の能力にとって重要であることを示す。HDx - MSおよび/または分子動力学シミュレーションを介して同定された重要な残基も、下線で示す。

【0274】

これらの結果は、(i) CALR変異体のC末端およびTpOR D1ドメイン上の陰性パッチの間の相互作用を示すHDx - MSの結果、および(ii)変異体CALRとの重要な相互作用物質としてのさらなる負に荷電した残基を同定する分子動力学シミュレーションと相関する。このような残基の喪失は、D1がCALR変異体 - TPORの相互作用の競合物質として作用する能力の低減をもたらす。

40

50

【 図 面 】

【 図 1 - 1 】

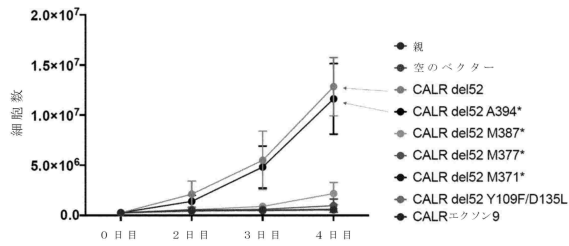


図 1 A

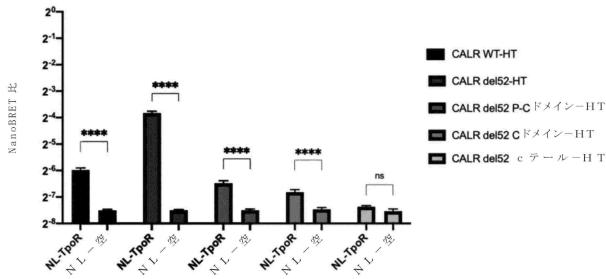


図 1 B

【 図 1 - 2 】

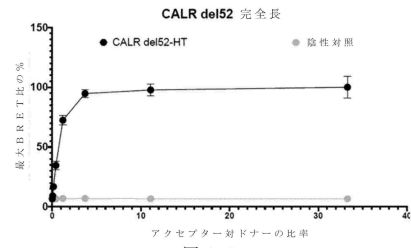


図 1 C

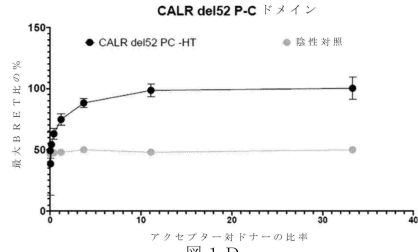


図 1 D

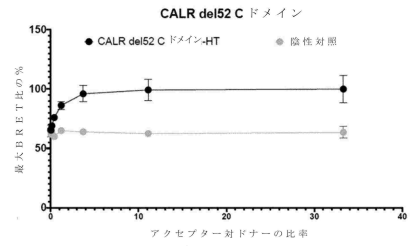


図 1 E

10

20

30

40

50

【 図 1 - 3 】

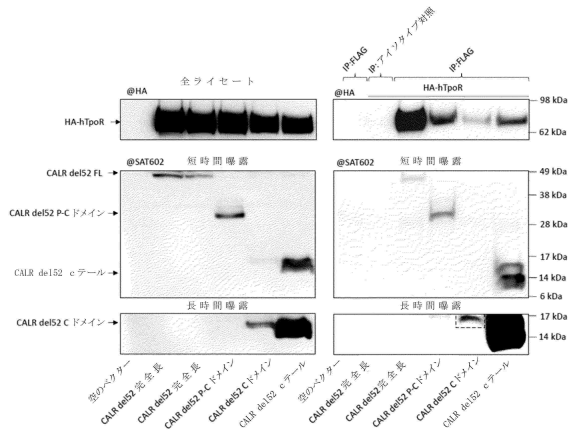


図 1 F

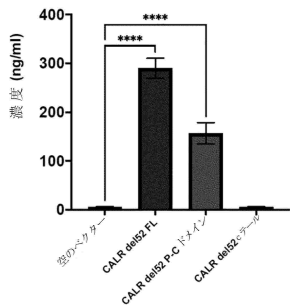


図 1 G

【 図 1 - 4 】

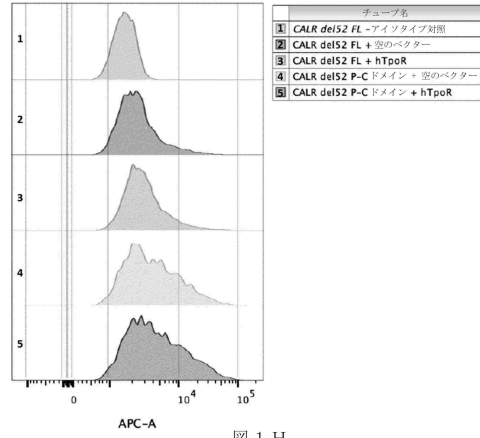


図 1 H

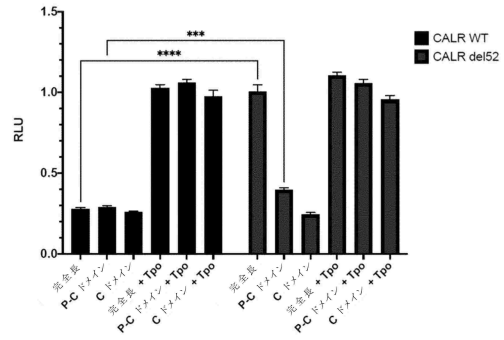


図 1 I

10

20

【 図 2 - 1 】

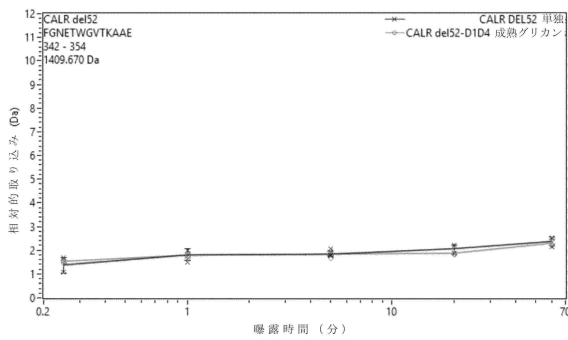


図 2 A

【 図 2 - 2 】

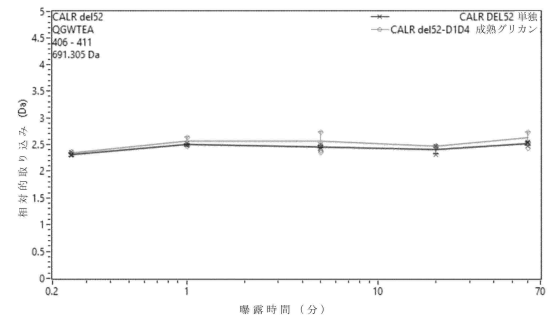


図 2 C

30

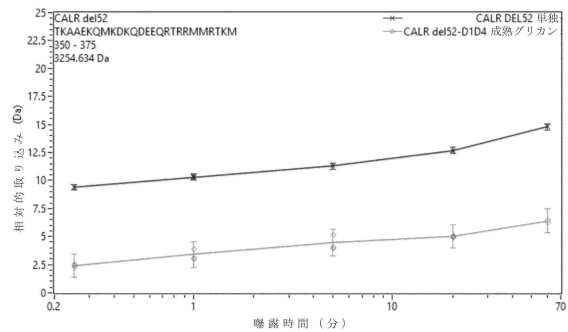


図 2 B

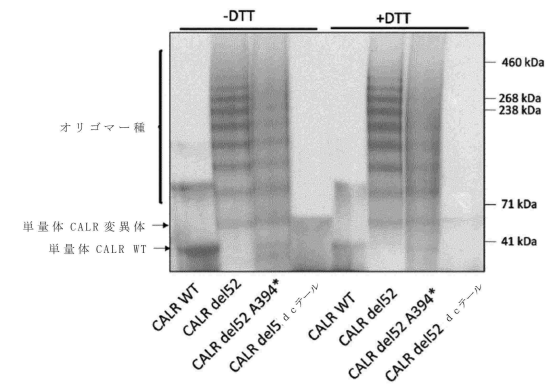


図 2 D

40

50

【 図 2 - 3 】

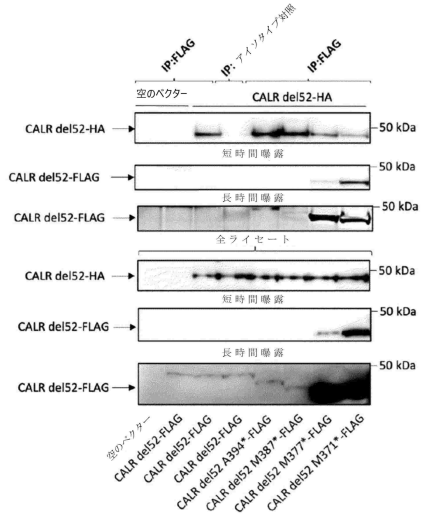


図 2 E

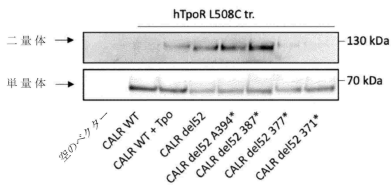


図 2 F

【 図 3 - 1 】

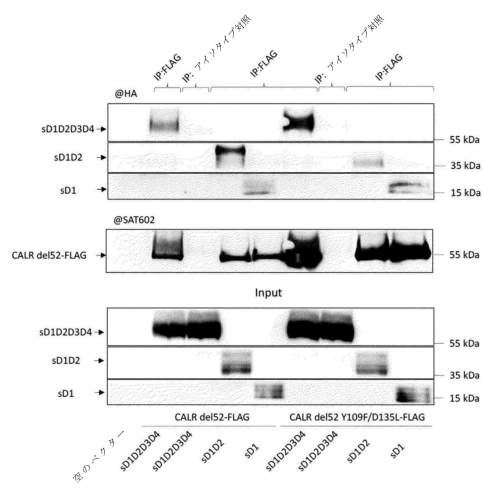


図 3 A

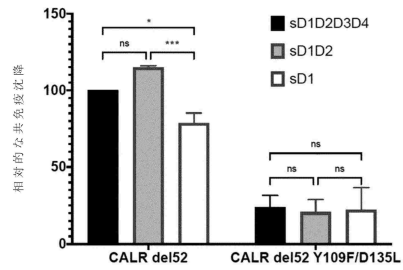


図 3 B

【 図 3 - 2 】

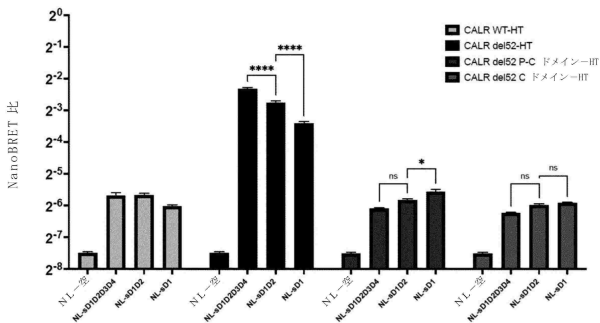


図 3 C

【 図 3 - 3 】

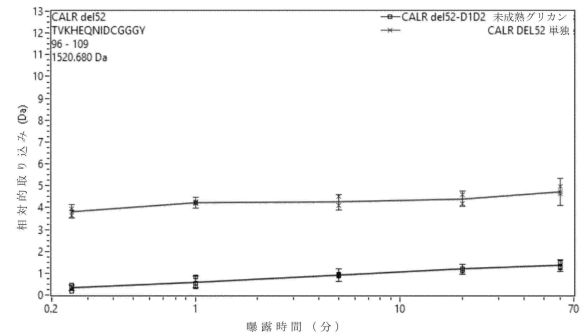


図 3 E

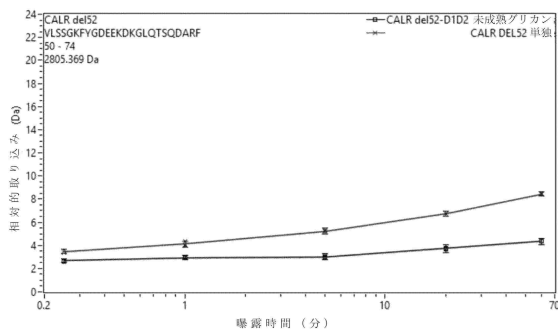


図 3 D

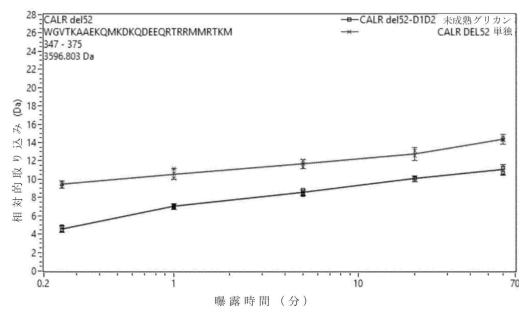


図 3 F

10

20

30

40

50

【 図 3 - 4 】

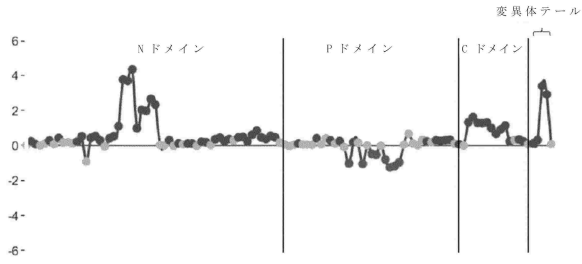


図 3 G

【 図 4 - 1 】

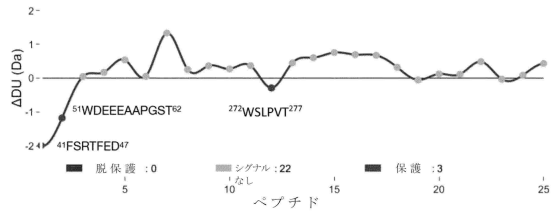


図 4 A

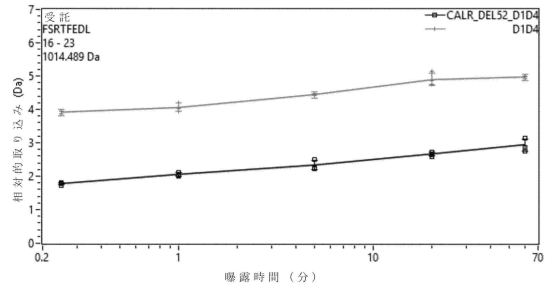


図 4 B

10

20

【 図 4 - 2 】

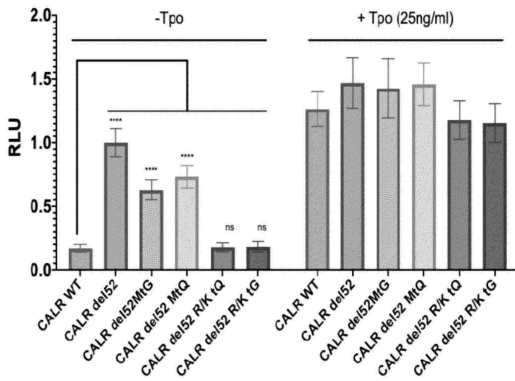


図 4 C

【 図 5 - 1 】

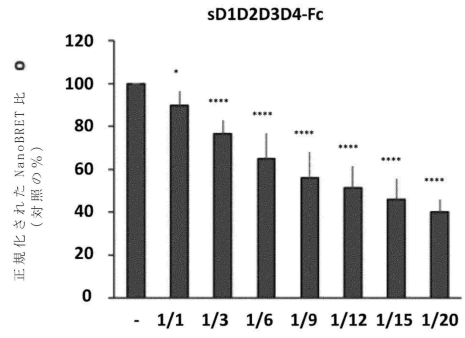


図 5 A

30

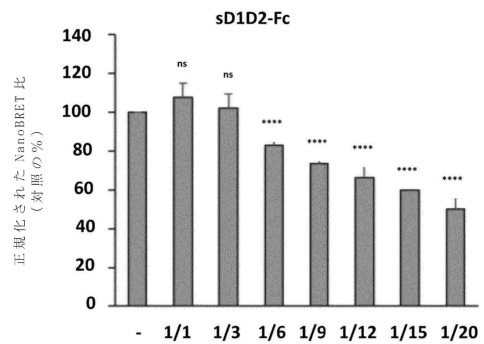


図 5 B

40

50

【 図 5 - 2 】

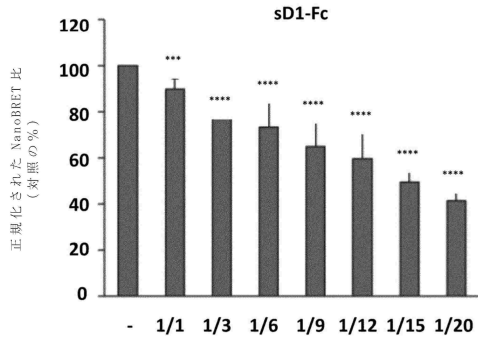


図 5 C

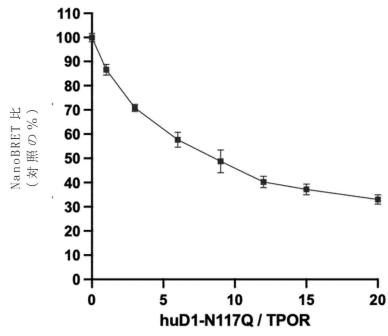
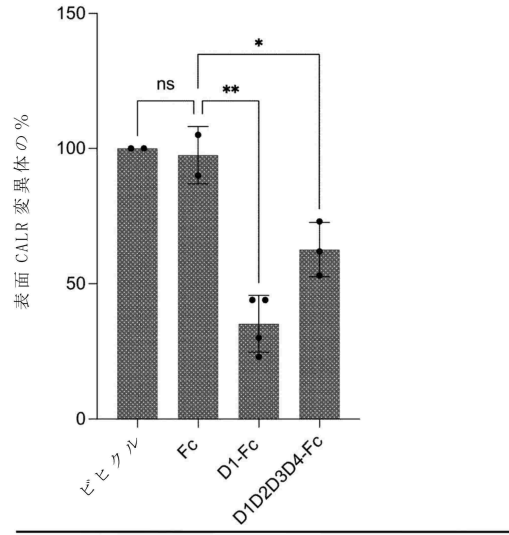


図 5 D

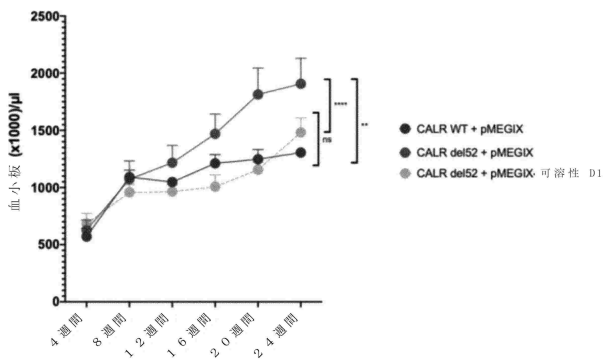
【 図 6 】



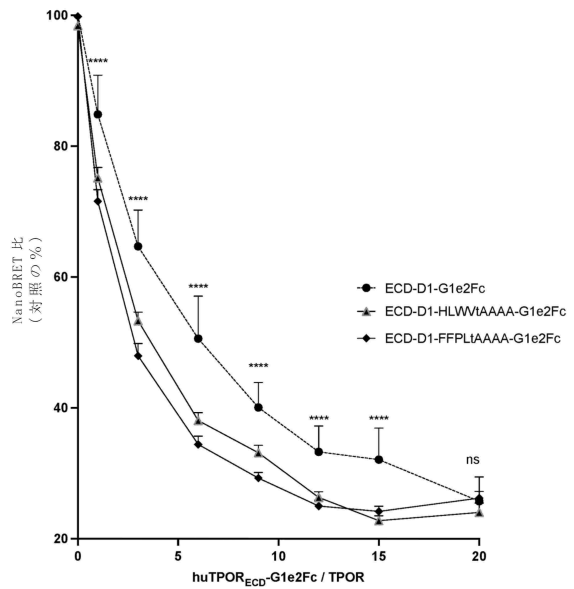
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

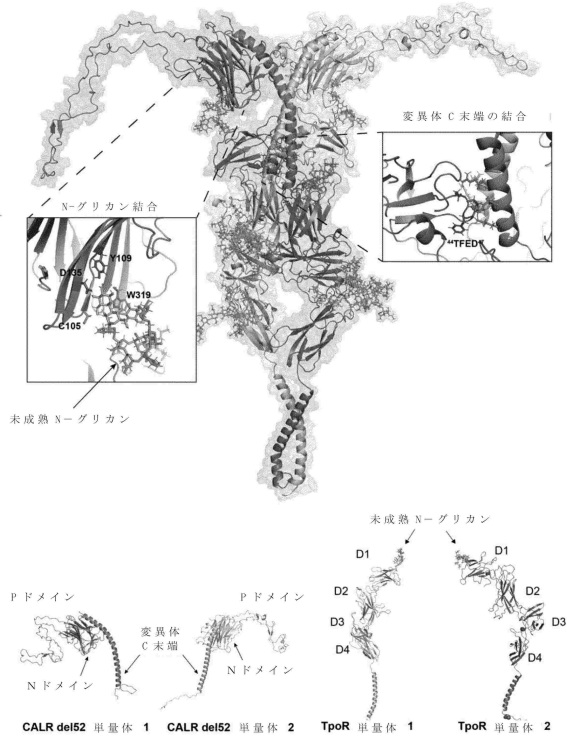


30

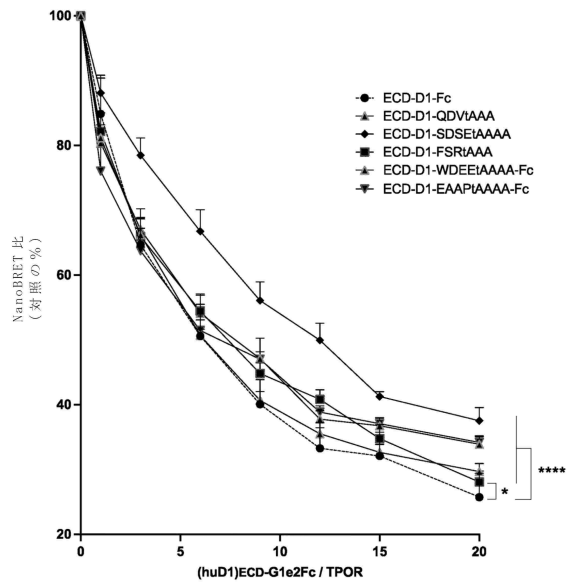
40

50

【 図 9 】



【 図 10 】



10

20

【 配列表 】

[202551110800001.xml](#)

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/058572

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K14/71 C07K14/715 A61K38/18 C07K14/47		
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 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) EPO-Internal, WPI Data, Sequence Search, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/36467 A2 (SCHERING CORP [US]) 25 May 2001 (2001-05-25) page 27, line 33 sequence 10 ----- -/--	1-15
<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 :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 16 June 2023	Date of mailing of the international search report 30/06/2023	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Niebuhr-Ebel, K	

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/058572

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>CHACHOUA ILYAS ET AL: "Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants", BLOOD</p> <p>, vol. 127, no. 10 10 March 2016 (2016-03-10), pages 1325-1335, XP055963575, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2015-11-681932 Retrieved from the Internet: URL:http://ashpublications.org/blood/article-pdf/127/10/1325/1392277/1325.pdf abstract page 1329; figure 3A page 1330, right-hand column - page 1331, right-hand column, paragraph 1 figure 4</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>PECQUET CHRISTIAN ET AL: "Calreticulin mutants as oncogenic rogue chaperones for TpoR and traffic-defective pathogenic TpoR mutants", BLOOD</p> <p>, vol. 133, no. 25 20 June 2019 (2019-06-20), pages 2669-2681, XP055963576, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2018-09-874578 Retrieved from the Internet: URL:http://ashpublications.org/blood/article-pdf/133/25/2669/1557501/blood874578.pdf abstract page 2677, left-hand column, paragraph 2 page 2679, right-hand column, last paragraph</p> <p>-----</p>	1-15
A	<p>VARGHESE LEILA N. ET AL: "The Thrombopoietin Receptor: Structural Basis of Traffic and Activation by Ligand, Mutations, Agonists, and Mutated Calreticulin", FRONTIERS IN ENDOCRINOLOGY, vol. 8, 31 March 2017 (2017-03-31), XP055810012, DOI: 10.3389/fendo.2017.00059 figure 3</p> <p>-----</p>	1-15

10

20

30

40

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/058572

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
a.	<input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed.
b.	<input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). <input type="checkbox"/> accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.	<input type="checkbox"/> With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3.	Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/058572

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0136467	A2	25-05-2001	
		AU 1919201 A	30-05-2001
		CA 2392109 A1	25-05-2001
		EP 1230368 A2	14-08-2002
		JP 2003523179 A	05-08-2003
		MX PA02005058 A	07-11-2002
		WO 0136467 A2	25-05-2001

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	

,MC,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

2 . P Y T H O N

ベルギー国，1 1 5 0 ブリュッセルズ，ブテ 8 ，アベニュー デ タービュレン 1 9 9

(72)発明者 ネデレック，オードリー

ベルギー国，1 2 0 0 ヴォルヴェ サイント ランバート，1 9 2 アベニュー ドゥ プリンス
ヘリティエー

(72)発明者 パパドポウロス，ニコラス

ベルギー国，1 1 9 0 ブリュッセルズ，1 0 ，プラセ デ ラルチチュード セント

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA02 BA08 BA20 BA23 BA41 CA53
DA39 DB63 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB27
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA13 NA14 ZB26 ZB27
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA21 BA41 CA40 DA50 DA75 EA28
FA74