

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-517613

(P2008-517613A)

(43) 公表日 平成20年5月29日(2008.5.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027	4 B 0 5 0
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 4
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N 9/12	4 B 0 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-538421 (P2007-538421)	(71) 出願人	507139834
(86) (22) 出願日	平成17年10月26日 (2005.10.26)		アシスタンス ビュブリック-オピト ドゥ パリ
(85) 翻訳文提出日	平成19年6月26日 (2007.6.26)		フランス国、75004 パリ、アベニュー・ビクトリア 3
(86) 国際出願番号	PCT/EP2005/055586	(71) 出願人	507138930
(87) 国際公開番号	W02006/045827		アンスティテュ ナショナル ドゥ ラ
(87) 国際公開日	平成18年5月4日 (2006.5.4)		サンテ エ ドゥ ラ ルシエルシュ メ
(31) 優先権主張番号	0411480		ディカル (インセルム)
(32) 優先日	平成16年10月27日 (2004.10.27)		フランス国、75013 パリ、リュ・ド
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(71) 出願人	507138941
			アンスティテュ ギュスターブールシ
			フランス国、94800 ヴィレジュイフ
			、リュ・カミーユ・デムーラン 39
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 真性赤血球増加症に関与する J A K 2 の変異の識別方法

(57) 【要約】

本発明は、真性赤血球増加症の原因となっている、J A K 2 チロシンキナーゼタンパク質の V 6 1 7 F 変異体に関するものである。また、本発明は、赤血球増加症と血小板増加症を骨髄増殖症候群に関連付けることを可能にする、赤血球増加症および血小板増加症の一次診断方法、すなわち、赤血球増加症と血小板増加症を新たな疾病群に再分類することを可能にする、骨髄増殖症候群における J A K 2 V 6 1 7 F 変異体の検出にも関するものであり、そして、特異的阻害剤と s i R N A の識別にも関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下で「JAK2 V617F変異体」と称する、617番アミノ酸に変異を含む、より特徴的にはV617F変異を含むことを特徴とする、単離されたJAK2 (Janusキナーゼ2)タンパク質であり、該タンパク質の配列がSEQ ID No1で表されるか、またはその他の哺乳動物における類似配列であるタンパク質。

【請求項 2】

請求項1に記載のJAK2 V617F変異体をコードするヌクレオチド配列であり、とりわけ、転写開始を示すATGから数えて1849位でt/g変異を有する配列SEQ ID No2。

10

【請求項 3】

ウイルス、プラスミド、または裸DNA型のクローニングベクターおよび/または発現ベクターであり、哺乳動物の細胞で有効なプロモータの制御下で請求項2に記載の配列を含むことを特徴とするベクター。

【請求項 4】

請求項1に記載の組換えJAK2 V617F変異体を発現する哺乳動物の細胞。

【請求項 5】

請求項1に記載の組換えJAK2 V617Fを発現する、ヒトではないトランスジェニック動物。

【請求項 6】

相同組換えまたは部位特異的組換えにより、ゲノム中に少なくともJAK2 V617Fをコードする配列を組み込んだマウスまたはラットであることを特徴とする、請求項5に記載のヒトではないトランスジェニック動物。

20

【請求項 7】

JAK2 V617F/JAK2 V617Fホモ接合体またはJAK2 V617F/JAK2ヘテロ接合体であり、真性赤血球増加症および/またはJAK2 V617Fによって誘発される骨髄増殖症候群を再現することを特徴とする、請求項5または請求項6に記載のヒトではないトランスジェニック動物。

【請求項 8】

配列SEQ ID No3または4の連続する10~30個のヌクレオチドを含み、変異ヌクレオチドt¹⁸⁴⁹を含むプローブまたはプライマー。

30

【請求項 9】

配列SEQ ID No5~11および15~28から選択される、請求項8に記載のプローブまたはプライマー。

【請求項 10】

PV患者またはPVもしくはその他のあらゆる骨髄増殖症候群、とりわけ赤血球増加症、白血球増加症、血小板増加症および骨髄線維症を発症する恐れのある患者のサンプルにおいて、JAK2遺伝子のG1849T変異体の有無を判定するためのエクスピボまたはインピトロでの方法であり、

40

a) 患者の核酸サンプルを得ること、

b) 前記核酸サンプルにおいてJAK2遺伝子のG1849T変異体の有無を検出すること

を含み、

G1849T変異体の存在がPVまたは他のあらゆる骨髄増殖症候群の指標となることを特徴とする方法。

【請求項 11】

請求項8または請求項9に記載の少なくとも一つのプローブとのハイブリダイゼーションの過程を含むことを特徴とする、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

請求項8または請求項9に記載の少なくとも一つのプライマー対を用いたPCR反応に

50

よる増幅の過程を含むことを特徴とする、請求項 10 または請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

個体の mRNA について実施され、RT-PCR 反応を含むことを特徴とする、請求項 10 ~ 12 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 14】

前記プライマーを用いた増幅過程と、それに続く、ハイストリンジェンシーの条件の下で G 1 8 4 9 T 変異領域に対応する配列とハイブリダイズする少なくとも一つのプローブ、好ましくは二つのプローブとのハイブリダイゼーションの過程、そして前記プローブのマーカが生成するシグナルの検出を含み、プローブとプライマーが請求項 8 または請求項 9 で定義されたものであることを特徴とする、請求項 10 ~ 12 のいずれか一つに記載の方法。

10

【請求項 15】

JAK2 遺伝子の G 1 8 4 9 T 変異に特異的な一つまたは複数の SNP (一塩基変異多型)、とりわけ SEQ ID No 17 と 18、23 と 24、あるいは、27 と 28 を用いて、前記核酸サンプルにおいて JAK2 遺伝子の G 1 8 4 9 T 変異体の有無を検出することを含み、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

PV または他のあらゆる骨髄増殖症候群に冒された、あるいはこれらを発症する恐れのある患者のサンプルにおいて JAK2 V 6 1 7 F 変異体の有無を検出するためのエクスピボまたはインピトロでの方法であり、

20

- a) 患者のサンプルを得ること、
 - b) JAK2 V 6 1 7 F 変異体の有無を検出すること
- を含んでおり、

前記変異体の存在が PV または他のあらゆる骨髄増殖症候群の指標となることを特徴とする方法。

【請求項 17】

サンプルを、JAK2 タンパク質の V 6 1 7 F 変異体に特異的な抗体、好ましくは V 6 1 7 F 変異体と変異していない JAK2 タンパク質を区別する能力を有する抗体と接触させることを含み、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

抗体がモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、一本鎖または二本鎖、キメラ抗体、ヒト化抗体、あるいは抗体に結合する断片である抗体 F (a b ') 2 および F (v) であることを特徴とする、請求項 17 に記載の方法。

30

【請求項 19】

ELISA 試験であることを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

51% を超えるヘマトクリット値を有する患者の亜集団に対して実施されることを特徴とする、請求項 10 ~ 19 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 21】

450000 を超える血小板の割合を有する患者の亜集団に対して実施されることを特徴とする、請求項 10 ~ 19 のいずれか一つに記載の方法。

40

【請求項 22】

JAK2 V 6 1 7 F 変異体を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 24】

JAK2 遺伝子の G 1 8 4 9 T 変異の有無を特異的に検出するための、請求項 8 または 9 で定義した一つまたは複数のプライマーあるいはプローブを含む、ガンにおける JAK2 V 6 1 7 F 変異体を検出するためのキット。

【請求項 25】

50

患者が真性赤血球増加症または J A K 2 V 6 1 7 F 変異体が関与する他のあらゆる骨髄増殖症候群、とりわけ赤血球増加症、白血球増加症、血小板増加症および骨髄線維症に冒されているかどうか判定するためのキットであり、J A K 2 遺伝子における G 1 8 4 9 T 変異の有無を特異的に検出するための、請求項 8 または 9 で定義した一つまたは複数のプローブまたはプライマーを含むキット。

【請求項 2 6】

さらに、P C R 増幅のための耐熱ポリメラーゼ、増幅および/またはハイブリダイゼーション過程のための一つまたは複数の溶液、ならびに、マーカの検出を可能にするあらゆる試薬から選択される少なくとも一つの要素を含む、請求項 2 4 または 2 5 に記載のキット。

10

【請求項 2 7】

請求項 2 2 に記載の抗体を含む、患者が真性赤血球増加症または J A K 2 V 6 1 7 F 変異体が関与する他のあらゆる骨髄増殖症候群に冒されているかどうかを判定するためのキット。

【請求項 2 8】

請求項 1 に記載の J A K 2 V 6 1 7 F 変異体の発現を 5 0 % 以上あるいは 9 5 % 以上減少させる能力を有する s i R N A。

【請求項 2 9】

1 9 ~ 2 5 個のヌクレオチド、好ましくは 1 9 個のヌクレオチド長を有し、第一の鎖の配列が、t¹⁸⁴⁹ 変異ヌクレオチドを含む配列 S E Q I D N o 3、S E Q I D N o 4 または S E Q I D N o 1 1 に同一であり、第二の鎖の配列がそれらの配列に相補的であることを特徴とする、請求項 2 8 に記載の s i R N A。

20

【請求項 3 0】

J A K 2 V 6 1 7 F の発現を 8 0 % より多く、あるいは 9 0 % より多く減少させ、野生型 J A K 2 の発現を 2 5 % より少なく、あるいは 5 % より少なく減少させることを特徴とする、請求項 2 8 または 2 9 に記載の s i R N A。

【請求項 3 1】

- U G G A G U A U G U U U C U G U G G A (S E Q I D N o 2 9)、
 - G G A G U A U G U U U C U G U G G A G (S E Q I D N o 3 0)、
 - G A G U A U G U U U C U G U G G A G A (S E Q I D N o 3 1)、
 から構成されるグループから選択されることを特徴とする、請求項 2 8 に記載の s i R N A。

30

【請求項 3 2】

一つまたは複数の化合物による J A K 2 V 6 1 7 F に特異的な阻害を判定することを可能にする方法であり、

a) 一つまたは複数の化合物を、固定および/または阻害に適した条件下で、請求項 1 に記載の J A K 2 V 6 1 7 F タンパク質、J A K 2 V 6 1 7 F を含む膜画分、あるいは、請求項 4 に記載の J A K 2 V 6 1 7 F を発現する細胞と接触させること、および

b) J A K 2 V 6 1 7 F の特異的な固定および/または阻害を検出することから成る過程を含む方法。

40

【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載の複数の分子に対する一連の試験と、J A K 2 V 6 1 7 F に対して 1 μ M 未満、好ましくは 1 0 0 n M 未満の I C 5 0 を有する分子を選択する過程とを含むスクリーニング方法。

【請求項 3 4】

さらに、J A K 2 に対して 5 μ M 未満あるいは 1 μ M 未満の I C 5 0 を有する分子の負の選択を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

J A K 2 V 6 1 7 F のリン酸化の阻害を免疫沈降によって判定する、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか一つに記載のインビトロでのスクリーニング方法。

50

【請求項 36】

エリスロポエチン（Epo）の不在下で分化する能力を有する初代前駆細胞CD34 + JAK2 V617Fに対する、あるいは、JAK2 V617F変異体の導入によって独立因子となった細胞系に対する、請求項32～35のいずれか一つに記載のインビボでのスクリーニング方法。

【請求項 37】

請求項4に記載の細胞を用いた、請求項32～36のいずれか一つに記載のインビボでのスクリーニング方法。

【請求項 38】

医薬品の候補を識別するための方法であり、

a) 真性赤血球増加症を再現している、および/または、JAK2 V617Fの存在に関連する骨髄増殖症候群に冒されている、請求項5～7のいずれか一つで定義したJAK2 V617Fを発現するヒトではないトランスジェニック動物に、化合物を投与すること、

b) 化合物の効果を判定し、真性赤血球増加症の赤芽球の増殖および自然発生的な分化の減少もしくはブロック、またはJAK2 V617Fの存在に関連する細胞増殖の減少が観察される医薬品の候補を選択することからなる過程を含む方法。

【請求項 39】

医薬品製造のための、請求項28～31のいずれか一つに記載のsiRNAの利用方法。

【請求項 40】

悪性血液疾患、特に、真性赤血球増加症、本態性血小板増加症、骨髄性脾腫あるいは原発性骨髄線維症を含む骨髄増殖症候群の治療を目的とする医薬品を調製するための、請求項39に記載の利用方法。

【請求項 41】

JAK2 V617F変異に関連する骨髄増殖症候群、その他の悪性血液疾患、およびJAK2 V617Fを発現する癌腫、黒色腫および神経芽腫のような充実性腫瘍の治療を目的とする医薬品を調製するための、請求項39に記載の利用方法。

【請求項 42】

請求項28～31のいずれか一つに記載のsiRNAと薬学的に許容可能な賦形剤を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、真性赤血球増加症の原因となっている、JAK2チロシンキナーゼタンパク質のV617F変異体に関するものである。また、本発明は、赤血球増加症と血小板増加症を骨髄増殖症候群に関連付けることを可能にする、赤血球増加症および血小板増加症の一次診断方法、すなわち、赤血球増加症と血小板増加症を新たな疾病群に再分類することを可能にする、骨髄増殖症候群におけるJAK2 V617F変異体の検出にも関わるものであり、そして、特異的阻害剤とsiRNAの識別にも関わるものである。

【背景技術】

【0002】

真性赤血球増加症（Polycythemia VeraすなわちPV）は、慢性骨髄増殖症候群のひとつであり、該慢性骨髄増殖症候群は、真性赤血球増加症を、またしばしば血小板増加症および白血球増加症を伴う。それは、造血幹細胞のクローン性の後天性疾患である。PVの造血前駆細胞はエリスロポエチン（Epo）の不在下で、「自然発生コロニー」と呼ばれる赤芽球コロニーを形成する能力がある。インターロイキン3（IL-3）、顆粒球マクローファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、幹細胞因子（SCF）およびインスリン様成長因子（IGF-1）など、その他のいくつかの成長因子に対する

10

20

30

40

50

、P Vの造血前駆細胞の過敏性も証明されている。いくつかのチームがP Vの生理病理学に関心を寄せているが、疾患の原因である分子異常は今日でも未知のままである(H. Pahl, 2000)。

【0003】

いくつかのサイトカインに対するP Vの前駆細胞の過敏性により、サイトカイン受容体に共通のシグナル伝達経路における異常を検査することができる。P Vにおいては分子マーカーの存在はかつて証明されたことがないが、P Vとその他の骨髄増殖症候群との間にある類似性、特にLMCとの間にある類似性を考慮すると、Bcr - Ablによって誘発されるものに近い分子メカニズムが、とりわけ悪性クローンの増殖とその最終分化の原因になっていると考えられる。この仮説は近年、二つの珍しい骨髄増殖症候群において確証が得られており、その一つは、FGF受容体の構成的活性化を誘発する8p11染色体領域における転座に関連する骨髄増殖症候群であり、もう一つは、潜在性の染色体の欠失によりキメラ遺伝子PDGFR - FIP1L1が生じる好酸球増加症候群である。両方の場合において、分子異常により、構成的なチロシンキナーゼ活性を有する融合タンパク質が生じる。

10

【0004】

患者の10%~15%で20qの欠失が検出され、約30%のケースで9pのヘテロ接合性の消失が検出されても、P Vにおいて再発性の細胞遺伝学的異常が見られたことはない(Kralovics, 2002)。しかし、これらの異常は当該疾患に特異的なものではない。

20

【0005】

P V細胞がEpoに依存していないため、Epo受容体(Epo-R)経路に対する研究が行われてきた。まず、受容体は構造レベルでも機能レベルでも正常である(Hess et al., 1994、Le Couedic et al., 1996、Means et al., 1989)。Epoによる刺激が止まるとEpo-RとJAK2を脱リン酸化するフォスファターゼSHP-1は、通常、RNAとタンパク質のレベルで発現する(Andersson et al., 1997、Asimakopoulos et al., 1997)。Epo-Rのシグナル伝達のさらに下流では、P Vを示す患者の多核球(PNN)においてSTAT5の異常な活性化が研究されたが、異常は発見できていない。逆に、STAT3の構成的リン酸化が、研究された14例中4例のP VのPNNで明らかにされた(Roder, 2001)。最後に、STAT5の転写標的である、抗アポトーシスタンパク質bcl-x1の発現が、免疫組織化学およびフローサイトメトリーで研究されている(Silva et al., 1998)。そして、bcl-x1がP Vの赤芽球で高発現すること、とりわけ、通常このタンパク質が発現しなくなる、より成熟した段階で高発現することが示された。

30

【0006】

真性赤血球増加症において、主要な診断基準は現在、臨床的なものである(PVSG基準、Pearson, 2001)。生物学的診断は、主としてEpoの不在下での、赤血球前駆細胞の培養の実施に基づいている(内因性コロニーの検出)。その良好な実施に専門技術が必要であることと、多くの「技術者の時間」が費やされることから、この試験はすべてのセンターで可能なわけではなく、経験を積んだ研究所によって実施されるときにだけ信頼できるものである。さらに、良好な感度を得るために、この試験は患者から採取した骨髄細胞に対して行う必要があり、これは患者にとって無害とは言えない。

40

【0007】

サブトラクティブハイブリダイゼーション法により、ドイツの研究グループが、PRV1(Polycythemia Rubra Vera 1)と呼ばれる、P VのPNNで高発現した遺伝子をクローニングしている(Temerinac et al., 2000)。PRV-1タンパク質は表面受容体uPARのスーパーファミリーに属している。P Vの多核球においてPRV-1をコードしているmRNAの高発現はリアルタイムRT-PCRによって容易に検出可能であり、近年発見された疾患の、生理病理学的役割の

50

ないマーカーを構成する。しかし、最近公刊された研究では、それは特に感度が良いわけでも特異的でもないことが示されている。

【0008】

Spivak J L et al., 2003 (「Chronic myeloproliferative disorders」; Hematology; 2003; 200 24.) では、いくつかのPVマーカーが記載されている。好中球抗原NB1/CD177のmRNAはPV患者の顆粒球において過剰発現する。しかし、患者の中にはこの過剰発現を示さないものもあり、また、この過剰発現が真性赤血球増加症以外の骨髄増殖症候群の患者でも観察されうるため、このマーカーはPVを検出するための信頼できる手段とは考えられない。血小板上のトロンボポエチン受容体Mplの発現が少ないこともPVでは認められている。この異常はPVで支配的だが、その他の骨髄増殖症候群でも見られる。ほかに、専門の研究所でしか実施できない、実現が難しい試験もある。

10

【0009】

このように、従来技術では、信頼できるPV診断を可能にする方法はない。また、利用可能な治療も特異的なものではない。正常範囲内にヘマトクリット値を維持するための瀉血、細胞毒性薬の使用あるいはIFNの使用が問題となる。

【特許文献1】国際公開第02/44321号パンフレット

【特許文献2】国際公開第00/44895号パンフレット

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0010】

本発明の枠組みにおいて、我々は試験した患者の約90%においてJAK2遺伝子に変異を発見しただけではなく、この変異が、このチロシンキナーゼの構成的活性の原因であることも明らかにし、そして、該変異を阻害することによって、PV赤芽球の自然発生的な増殖と分化を妨げることが可能になることを証明した。

【0011】

JAK2はJanusキナーゼファミリー(JAK)に属し、該ファミリーは、JAK1、JAK2、JAK3およびTYK2という複数の細胞質内チロシンキナーゼからなる。JAKタンパク質は多くの膜受容体の細胞内シグナル伝達に参与するものであり、該膜受容体は、サイトカイン受容体スーパーファミリーのいくつかのメンバー、特にEpo受容体(Epo-R)のように、内在的なチロシンキナーゼ活性を有していない。JAK2タンパク質は23個のエクソンを含んだ遺伝子によってコードされている。相補的DNAは3500塩基対のサイズを有し、1132個のアミノ酸からなるタンパク質をコードする(130kD)(図1)。我々はPCRとシーケンシングによって、PV患者の90%近くにおいてJAK2のエクソン12でクローン性の後天的な点変異を識別した。通常バリン(V)をコードしているコドン617「GTC」が、フェニルアラニン(F)をコードする「TTC」に変異している。この変異V617Fは、25人の対照または試験した二次性赤血球増加症患者では見られなかった。逆に、本態性血小板増加症の40%と骨髄線維症の50%では観察され、したがって、この変異は、Bcr-Ab1が慢性骨髄性白血病を定義したように、骨髄増殖症候群の新たな枠を定義するものである。

30

40

【0012】

本発明によるJAK2 V617F変異体を、血液学における診断研究所で従来的に用いられている広く普及した手段で効果的に検出することができるかどうか調べるために、我々は骨髄増殖症の疑いのある患者に由来する119のサンプルを分析した。JAK2 V617FがLightCycler(登録商標)法とTaqMan(登録商標)法によって効果的に検出されることが示されたが、これらの技術はシーケンシングよりわずかに感度が良いものである。次に我々は、51%を超えるヘマトクリット値を有する88人の患者において一次診断試験としてJAK2 V617Fの検出値を算定し、変異が、赤血球増加症において100%の陽性的中率で、WHO基準(R=0.879)とPVSG基準(R=0.717)にしたがったPV診断に対応することを示した。これらのデータに基

50

づいて我々は、赤血球量の測定、骨髄の吸引および内因性赤血球コロニーの形成のインビトロでの分析の実施を避けるべく、顆粒球におけるJAK2 V617Fの検出を赤血球増加症患者の一次診断試験としてみなすべきであることを提案する。また、この検出は骨髄増殖症候群の全体あるいはそれらの疑いに対する一次診断にまで広げることができるものである。この検出は、骨髄増殖症候群を確認するための確実な生物学的試験が存在しない慢性血小板増加症においても特に重要となるものである。また、この検出は骨髄線維症の診断において重要な検査となるものであり、不確定な病因による血栓症に関連する臨床所見に適用することができるものである。

【0013】

このように、本発明は第一に診断手段をもたらし、PVとこの変異に関連する骨髄増殖症候群を対象とする治療に至る道筋を開くものである。より特定的には、我々はJAK2 V617F変異の検出を赤血球増加症の枠組みにおける一次診断試験として提案し、このことによって、大半の患者および慢性血小板増加症における、骨髄の吸引ならびに赤血球と内因性赤血球細胞(EEC)の量の測定を避けることが可能になり、このことによって長期の病因調査を避けることが可能となる。

10

【課題を解決するための手段】

【0014】

このように、第一の特徴として、本発明は単離したJAK2(Janusキナーゼ2)タンパク質、特にヒトJanusキナーゼ2タンパク質(NCBI寄託番号NM_004972、GI:13325062)に関するものであり、該タンパク質は、617番アミノ酸(cDNAの、ATGから数えて617番目のコドン)における変異、より特徴的にはV617F変異を含んでおり、以下ではJAK2 V617F変異体と称し、以下のSEQ ID No 1で示される。

20

【0015】

SEQ ID No 1(V617FヒトJanusキナーゼ2すなわちJAK2 V617F)

MGMACLTMTEMEGTSTSSIQNGDISGNANSMKQIDPVLQVYLYHSLGKSEAD
 YLTFPSGEYVAEEICIAASKACGITPVYHNMFALMSETERIWYPPNHVFHIDEST
 RHNVLRYRIRFYFPRWYCSGSNRAYRHGISRGAEAPLLDDFVMSYLFAQWRHDF
 VHGWIKVPVTHETQEECLGMAVLDMMRIAKENDQTPLAIYNSISYKTFLPKCIR
 AKIQDYHILTRKRIRYRFRRFIQFSQCKATARNLKLKYLINLETLQSAFYTEKF
 EVKEPGSGPSGEEIFATHITGNGGIQWSRGKHKESETLTEQDLQLYCDFPNIIDVS
 IKQANQEGSNESRVVTIHKQDGKNLEIELSSLREALSFVSLIDGYRRLTADAHHY
 LCKEVAPPAVLENIQSNCHGPISMDFAISKLKAGNQTGLYVLRCSPKDFNKYF
 LTFEVERENVIEYKHCLITKNENEYNLSGTKKNFSSLKDLLNCYQMETVRSDN
 IIFQFTKCCPPKPKDKSNLLVFRRTNGVSDVPTSPTLQRPTHMNQMVFHKIRNEDL
 IFNESLGQGTFTKIFKGVRRREVGDYGQLHETEVLKVLDKAHRNYSESFFEAAS
 MMSKLSHKHLVLNYGVCF⁶¹⁷CGDENILVQEFVKFGSLDTYLKKNKNCINILWK
 LEVAKQLAWAMHFLEENTLIHGNVCAKNILLIREEDRKTGNPPFIKLSDPGISIT
 VLPKDILQERIPWVPPECIENPKNLNLATDKWSFGTTLWEICSGGDKPLSALDSQ
 RKLQFYEDRHQLPAPKWAELANLINNCMDYEPDFRPSFRAIIRDNLNSLFTPDYE
 LLTENDMLPNMRIGALGFSGAFEDRDPTQFEERHLKFLQQLGKGNFGSVEMCR
 YDPLQDNTGEVVAVKKLQHSTEEHLRDFEREIEILKSLQHDNIVKYKGVCSYAG
 RRNLKLIMEYLPYGSLRDYLQKHKERIDHIKLLQYTSQICKGMEYLGTKRYIHR
 DLATRNLVENENRVKIGDFGLTKVLPQDKEYYKVKEPGESPIFWYAPESLTES
 KFSVASDVWSFGVVLYELFTYIEKSKSPPAEFMRMIGNDKQGQMIVFHILIELLK
 NNGRLPRPDGCPDEIYMIMTECWNNNVNQRPSFRDLALRVDQIRDNMAG

10

20

30

【0016】

また、本発明は他の哺乳動物の617位が変異したこのタンパク質の等価物、たとえば、ラット(NM__031514)、ブタ、マウス(NM__008413)などの他の哺乳動物のJAK2 V617Fも目的とし、また、変異体の活性および3D構造に影響を与えない一つまたは複数の修飾をさらに含んだ、SEQ ID No 1の変異体も目的としている。

【0017】

また、本発明はSEQ ID No 1をコードするヌクレオチド配列、好ましくはSEQ ID No 2(コドン617においてGTCの代わりにコドンTTCを有する(以下G1849Tと称する、翻訳開始を示すATGから数えて1849位におけるg/t変異)ヒトJAK2遺伝子配列)も対象としている。

40

【0018】

この配列は、ウイルスベクターまたはプラスミドベクター、あるいは哺乳動物の細胞で有効なプロモーターの制御下にある裸DNAに存在しうるものである。したがって、本発明はJAK2 V617Fタンパク質を発現するベクターにも及ぶものである。本発明のベクターはクロニングベクターおよび/または発現ベクターとすることができ、また、宿主細胞、とりわけ哺乳動物の細胞、好ましくはヒトCD34⁺前駆細胞をトランスフェクトするために用いることができる。

50

【0019】

PVおよびその他の骨髄増殖症候群のトランスジェニック動物モデル

【0020】

本発明はまた、組換えJAK2 V617Fを発現する、ヒトではないトランスジェニック動物も対象とする。この動物は、好ましくはマウスまたはラットとすることができる。モデルとして用いられるトランスジェニックのラットまたはマウスは、当業者によって一般的に用いられているあらゆる方法、とりわけ、相同組換えまたはCre-LoxPもしくはFLP-FRTシステムでの部位特異的組換えによってES細胞にノックイン(標的位置への配列の挿入)することで得ることができる。本発明の好ましい実施態様によると、本発明によるトランスジェニック細胞は、宿主細胞のゲノムの一つまたは複数の配列でのJAK2 G1849T変異体の遺伝子ターゲティングによって得られる。より詳細には、導入遺伝子は、宿主細胞のゲノムの相同配列の相同組換えにより安定した方法で挿入される。トランスジェニック動物を産生するためのトランスジェニック細胞を得ようとする場合、宿主細胞は好ましくは胚性幹細胞(ES細胞)である(Thompson et al., 1989)。遺伝子ターゲティングは、標的とする内因性配列と配列の相同性を有している外来DNA配列での相同組換えによる、染色体座の部位特異的な修飾である。さまざまなタイプの遺伝子ターゲティングがある。ここでは、遺伝子ターゲティングは特に、野生型JAK2遺伝子をJAK2 G1849T変異体の遺伝子または遺伝的に類似した他のあらゆる変異体で置換するために用いることができる。この場合、遺伝子ターゲティングは「ノックイン」(K-in)と呼ばれる。あるいは、遺伝子ターゲティングは、野生型JAK2の発現を減らすかまたは消失させてJAK2変異体の遺伝子を導入するために用いることができる。このとき遺伝子ターゲティングは「ノックアウト」(KO)と呼ばれる(Bolkey et al., 1989参照)。本発明による細胞は、導入遺伝子が安定してその細胞のゲノムに組み込まれることと、その発現が内因性遺伝子の調節エレメントによって制御されることを特徴としている。安定した組み込みとは、導入遺伝子を本発明による細胞のゲノムDNAに挿入することを意味する。このように挿入された導入遺伝子は、次に細胞の子孫に伝わる。導入遺伝子の組み込みは、標的である内因性JAK2遺伝子の上流、下流、または中心で行う。任意で、一つまたは複数の正の選択または負の選択の遺伝子を用いることができる。また、レポーター遺伝子部分の両側または挿入すべき完全配列の両側に位置している好ましくは二つの標的遺伝子座と相同的なDNA領域を用いることができる。「相同的なDNA領域」とは、最適なアラインメントの後および比較の後に、通常少なくともおよそ90%~95%のヌクレオチドが同一であり、好ましくは、少なくともおよそ98%~99.5%のヌクレオチドが同一である二つのDNA配列を意味する。比較のための配列の最適なアラインメントは、Smith and Waterman(1981)による局所的相同性アルゴリズム、Neddleman and Wunsch(1970)による局所的相同性アルゴリズム、Pearson and Lipman(1988)による類似性検索法、これらのアルゴリズムを用いるソフトウェア(Wisconsin Genetics Software Packageの中のGAP、BESTFIT、BLAST P、BLAST N、FASTAおよびTFASTA、Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)を用いて行うことができる。細菌および哺乳動物の細胞における相同組換えを行うためには14bpが100%相同であれば十分であるが、より長い相同配列の部分が好ましい(一般的にはこれらの部分は相同配列の各部分について少なくとも2000bpであり、好ましくは少なくとも5000bpである)。好適には、JAK2変異体の配列は内因性型の調節を確実にするエレメントの一群、すなわち、少なくとも内因性JAK2遺伝子のプロモーター、調節配列(エンハンサー、サイレンサー、インシュレーター)、終結シグナルを含んだ一群に挿入される。

【0021】

特徴的な実施態様によると、JAK2 G1849T導入遺伝子は、少なくともコード配

列と、レコンビナーゼの作用に対して特異的な部位に挟まれた、または挟まれていない正の選択のカセット、たとえば、前記配列の5'位に存在することができるLox/Neo-TK/LoxまたはLox/Neo/LoxまたはFRT/Neo-TK/FRTまたはFRT/Neo/FRTカセットを有しており、たとえば一つまたは複数のDTA遺伝子および/またはTK遺伝子を含む負の選択のカセットが導入遺伝子の末端の少なくとも一方に存在していることを特徴としている。本発明の導入遺伝子は、好ましくは動物細胞に天然に存在している外来のDNA配列に直接由来する。この天然の形態のDNA配列は、たとえばクローニングに必要な制限酵素認識部位を挿入すること、および/または、部位特異的組換えの部位(Lox配列およびflp配列)を挿入することで修飾することができる。

10

【0022】

このために、JAK2 G1849T変異体は、宿主細胞内でのその増殖を確実にすることができるクローニングベクターに、および/または任意には、導入遺伝子の発現を確実にすることができる発現ベクターにクローニングすることができる。本発明によるクローニングベクターおよび/または発現ベクターを構築するために用いられるDNA組換え技術は当業者に知られているものである。標準的な技術がクローニング、DNAの単離、増幅、および精製に用いられ、DNAリガーゼ、DNAポリメラーゼ、制限エンドヌクレアーゼに関わる酵素反応は製造者の推薦にしたがって実施される。これらの技術およびその他の技術はほとんどの場合Sambrook et al., (1989)にしたがって行われる。ベクターは、プラスミド、コスミド、バクテリオファージ、レトロウイルス

20

【0023】

本発明によるトランスジェニック細胞を生成するための方法はGordon et al., 1989に記載されている。哺乳動物の細胞をトランスフェクトするためのさまざまな技術がKeon et al., 1990によって概説されている。線状化されたもしくははされていないベクター、またはベクター断片の形状のものに任意に含まれる、本発明による導入遺伝子は、たとえば核へのマイクロインジェクション(米国特許第4873191号明細書)、リン酸カルシウム沈殿によるトランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション(Lo, 1983)、熱ショック、陽イオンポリマー(PEG、ポリブレン、DEAE-デキストランなど)による形質転換あるいはウイルス感染(Van der Putten et al., 1985)といった標準的な方法によって宿主細胞に導入することができる。

30

【0024】

細胞が導入遺伝子によって形質転換されると、細胞はインピトロで培養することができる、あるいは、ヒトではないトランスジェニック動物を産生するために用いることができる。形質転換後、細胞を培養層および/または適切な培地に播種する。構築物を含んだ細胞は選択培地を用いて検出することができる。コロニーが生じるのに十分な時間の後、コロニーを回収し、相同組換えおよび/または当該構築物の組み込みが生じているかどうか判定するために分析する。相同組換えをしていると考えられるクローンのスクリーニングを行うために、選択遺伝子と呼ばれる陽性および陰性のマーカーを相同組換えベクターに挿入することができる。相同組換えが生じた細胞を選択するさまざまなシステムが説明されている(米国特許第5627059号明細書参照)。本発明による前記陽性選択遺伝子は、好ましくは抗生物質耐性遺伝子から選択される。抗生物質としては、網羅的ではないが、ネオマイシン、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、フレオマイシン、ブレオマイシン、ハイグロマイシン、クロラムフェニコール、カルベニシリン、ジェネティシン、ピューロマイシンを挙げることができる。これらの抗生物質に対応する耐性遺伝子は当業者には知られており、たとえばネオマイシン耐性遺伝子は、培養培地における抗生物質G418の存在に対する耐性を細胞に付与する。また、陽性の選択遺伝子はHisD遺伝子から選択することができ、対応する選択剤はヒスチジノールである。また、陽性の

40

50

選択遺伝子はグアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (GpT) 遺伝子から選択することができ、対応する選択剤はキサンチンである。また、陽性の選択遺伝子はヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPR T) 遺伝子から選択することができ、対応する選択剤はヒポキサンチンである。相同組換えを同定することを可能にするために用いられる一つまたは複数の選択マーカーは、後に遺伝子発現に影響を与えることがあり、必要であれば、Lox 部位に特異的なCreリコンビナーゼ (Sauer, 1994、Rajewsky et al., 1996、Sauer, 1998) またはFRT部位に特異的なFLPリコンビナーゼ (Kilby et al., 1993) といった部位に特異的なリコンビナーゼを利用することで除去することができる。

【0025】

陽性のコロニー、すなわち少なくとも一つの相同組換えが生じている細胞を含んだコロニーは、サザンブロット法および/またはPCR法による分析で識別する。単離細胞または本発明によるトランスジェニック動物の細胞における、導入遺伝子に対応するmRNAの発現レベルは、ノーザンブロット法による分析、in situハイブリダイゼーション法による分析、RT-PCR法による分析を含む技術によって判定することもできる。同様に、導入遺伝子を発現している動物細胞または動物組織は、レポータータンパク質に対する抗体を用いて識別することができる。次に、陽性細胞は、胚の操作、とりわけ修飾された細胞を相同組換えによって胚盤胞内へ注入するために用いることができる。

【0026】

マウスでは、胚盤胞は4～6週齢の過剰排卵した雌から得る。細胞をトリプシン処理し、修飾された細胞を胚盤胞の胞胚腔に注入する。注入後、胚盤胞を偽妊娠した雌の子宮角に導入する。次に、雌が満期に達するまで待ち、構築物を有する変異細胞の存在を判定するために、得られた子を分析する。産まれた胎児の細胞と胚盤胞細胞あるいはES細胞との間での異なる表現型を分析することで、キメラの新生児を検出することが可能となる。そして、キメラの胎児を成体まで育てる。キメラまたはキメラ動物は、細胞の一つの亜集団のみに改変したゲノムが存在する動物である。一つまたは複数の修飾された遺伝子を有するキメラ動物は、一般的にはそれらの間でまたは野生型の動物と交配させることで、ヘテロ接合またはホモ接合の子を得ることができる。次に、ヘテロ接合の雄と雌を交配することで、ホモ接合動物を作成する。指示しない限り、本発明によるヒトではないトランスジェニック動物は生殖系列細胞のヌクレオチド配列の安定した変化を含んでいる。

【0027】

本発明のもう一つの実施態様によると、本発明によるヒトではないトランスジェニック細胞は核の移動すなわち核移植の枠組みにおける核のドナー細胞として利用することができる。核移植とは、脊椎動物の成体個体または胎児段階の個体の生きたドナー細胞の核を、同種または異種の除核したレシピエント細胞の細胞質に移すことを意味する。移植された核はクローン胚の成長を導くように再プログラムされ、続いて該クローン胚は胎児および新生児を産生するために受胚雌に移植することができ、あるいは、培養で内細胞塊の細胞を産生するために用いることができる。核クローニング用のさまざまな技術を用いることができ、該技術の中では、網羅的ではないが、特許出願の対象となっている国際公開第95/17500号パンフレット、国際公開第97/07668号パンフレット、国際公開第97/07669号パンフレット、国際公開第98/30683号パンフレット、国際公開第99/01163号パンフレットおよび国際公開第99/37143号パンフレットを挙げることができる。

【0028】

このように、本発明はJAK2 V617Fをコードする組換え配列を含んだ、ヒトではないトランスジェニック動物にまで及ぶものである。これらの動物はホモ接合体あるいはヘテロ接合体 (JAK2 V617F / JAK2 V617F あるいは JAK2 V617F / JAK2) でありうる。これらの動物は、とりわけ真性赤血球増加症を再現するが、JAK2 V617Fによって誘発されるあらゆる骨髄増殖症候群も再現する。したがって、該動物によってチロシンキナーゼ阻害剤を機能的にスクリーニングすること、と

10

20

30

40

50

りわけ JAK2 V617F に特異的な阻害剤のスクリーニングを行うことが可能になる。

【0029】

もう一つの変形例は、真性赤血球増加症またはその他の骨髄増殖症候群のモデルを実現させるために、JAK2 V617F 変異体を発現する能力を有するウイルスベクター（レトロウイルスまたはレンチウイルスまたはその他）を造血細胞株、前駆細胞または ES 細胞に注入することで構成することができる。

【0030】

診断手段

第三の特徴として、本発明は、骨髄増殖症候群に冒された、あるいは骨髄増殖症候群を示す可能性のある哺乳動物において、とりわけ赤血球増加症を示す患者または真性赤血球増加症、血小板増加症および/もしくは骨髄線維症の兆候を示している疑いのある患者において、JAK2 V617F 変異の有無を検出することを可能にする診断手段を目的としている。

10

【0031】

そのため、本発明は、以下に記載した配列 SEQ ID No 2 における変異の有無の検出を可能にするプライマーおよびプローブに関わるものである。より特徴的には、本発明は、エクソン 12 または以下の配列 SEQ ID No 3 または 4 の連続した少なくとも 10 個、12 個、15 個、20 個、30 個、40 個または 50 個のヌクレオチドの配列（たとえば 10 ~ 30 個のヌクレオチドまたは 10 ~ 25 個のヌクレオチド）を有し、また変異ヌクレオチド t¹⁸⁴⁹ を含む、たとえば 10 ~ 30 個のヌクレオチドの単離された核酸にも関するものである。

20

【0032】

SEQ ID No 3

ctcatatgaaccaaattggtgttcacaaaatcagaaatgaagattgatattaatgaaagccttgccaaggcacttttacaag
 atttttaaaggcgtacgaagagaagtaggagactacggcgaactgcatgaaacagaagttctttaaaagtctggataaagcac
 acagaaactattcagagctttcttgaagcagcaagtatgatgagcaagccttctcacaagcatttggtttaaattatggagtatg
 tt¹⁸⁴⁹ tctgtggagacgagaatattctggtcaggagttgtaaaattggatcactagatacatatctgaaaaagaataaaaatt
 gtataaatatattatgaaactgaagttgctaacagttggcatggccatgcattttctagaagaaaacacccttattcatggga
 atgtatgtgccaaaatattctgcttatcagagaagaagacaggaagacaggaatcctccttcatcaaaacttagtgcctgg
 cattagtattacagtttgccaaggacattcttcaggag

30

【0033】

下線を引いた配列は、1849 位における変異に特異的なプローブまたはプライマーの設計を可能にする上流または下流の領域の一例を示している（SEQ ID No 4）。

40

【0034】

本発明のさまざまな好ましいプライマーおよびプローブの例

【0035】

DNA、PCR プライマー：

JAK2 エクソン 12 - PCR F センス 5' - GGGTTTCTCTCAGAACGT
 TGA - 3' (54804 - 54823) (SEQ ID No 5)

JAK2 エクソン 12 - PCR R アンチセンス 5' - TTGCTTTCTCTTTT
 CACAAGA - 3' (55240 - 55260) (SEQ ID No 6)

【0036】

50

DNA、シーケンシングプライマー：

JAK2エクソン12SEQF センス 5' CAGAACGTTGATGGCAGTT
G-3' (54813-54832) (SEQ ID No7)

JAK2エクソン12SEQR アンチセンス 5' TGAATAGTCCTACAGT
GTTTTTCAGTTT-3' (55207-55233) (SEQ ID No8)

【0037】

cDNA、PCRプライマーおよびシーケンシングプライマー：

センス 5' -CAACCTCAGTGGGACAAAGAA-3' (1386-140
7) (SEQ ID No9)

アンチセンス 5' -GCAGAAATATTTTTTGGCACATACA-3' (201
9-2041) (SEQ ID No10)

【0038】

SNPSプローブ、変異検出プローブおよびsiRNAプローブ(1829-1870
):

TTTTAAATTATGGAGTATGTGTCTGTGGAGACGAGAATAT
TC (SEQ ID No11)

【0039】

LightCyclerでの遺伝子型決定(PNNまたは骨髓のDNA)

オリゴ「S」(センス) GGCAGAGAGAATTTTTCTGAAC (SEQ ID
No15)

オリゴ「R」(アンチセンス) GCTTTCCTTTTTTCACAAGATA (SEQ
ID No16)

センサーwt GTCTCCACAGACACATACTCCATAA3'-FL (SE
Q ID No17)

アンカーJAK2 5'-LC Red640AAAACCAAATGCTTGTGAG
AAAGCT3'-PH (SEQ ID No18)

【0040】

LightCyclerでの遺伝子型決定(たとえば血小板のcDNA)

cJAK2F GCACACAGAAACTATTCAGAGTC (SEQ ID No
19)

cJAK2S AGCAGCAAGTATGATGAGC (SEQ ID No20)

cJAK2A CTAGTGATCCAAATTTTACAAACT (SEQ ID N
o21)

cJAK2R GTTTAGCAACTTCAAGTTTCC (SEQ ID No22
)

センサーwt GTCTCCACAGACACATACTCCATAA3'-FL (SE
Q ID No23)

アンカーJAK2 5'-LC Red640AAAACCAAATGCTTGTGAG
AAAGCT3'-PH (SEQ ID No24)

【0041】

Taqman法による遺伝子型決定(たとえば骨髓の単核細胞のDNAにおいて)

対立遺伝子に特異的な蛍光プローブおよび一本鎖DNAによる認識

PCR反応

センスプライマー配列: AAGCTTTCTCACAAAGCATTTGGTTT (SEQ
ID No25)

アンチセンスプライマー配列: AGAAAGGCATTAGAAAGCCTGTAGTT
(SEQ ID No26)

リポーター1配列(VIC): TCTCCACAGACACATAC (SEQ ID N
o27)

リポーター2配列(FAM): TCCACAGAAACATAC (SEQ ID No2

10

20

30

40

50

8)

【0042】

その他の特徴として、本発明は、サンプルにおけるJAK2 V617F変異の有無を検出することを可能にするインビトロまたはエクスピボでの診断方法にも関するものである。

【0043】

本発明の核酸を用いた試験

【0044】

第一の実施態様において、G1849T変異体(JAK2 V617F変異に対応する)はJAK2遺伝子の核酸分子の分析によって検出することができる。本発明の範囲において、「核酸」とはmRNA、ゲノムDNAあるいはmRNAから派生したcDNAを意味する。

10

【0045】

G1849T変異体の核酸の有無は、シーケンシング、増幅ならびに/または、上述した特異的プローブおよび特異的プライマー、つまりSEQ ID No3または4、およびSEQ ID No5~11、あるいはSEQ ID No15~24に由来する配列とのハイブリダイゼーションによって、検出することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0046】

したがって、本発明は、PV患者またはPVもしくは他のあらゆる骨髄増殖症候群、とりわけ赤血球増加症、血小板増加症および骨髄線維症を発症する可能性のある患者のサンプルにおいて、JAK2遺伝子のG1849T変異体の有無を判定するためのエクスピボまたはインビトロでの方法を提案するものであり、該方法は、

20

a) 患者の核酸のサンプルを得ること、

b) 前記核酸のサンプルにおけるJAK2遺伝子のG1849T変異体の有無を検出すること

を含んでおり、

G1849T変異体の存在がPVまたは他のあらゆる骨髄増殖症候群の指標となることを特徴としている。

【0047】

核酸のサンプルはどのような細胞源または組織生検からも得ることができる。これらの細胞は造血性のものに由来する必要がある、循環血液、造血組織または血液細胞が入ったあらゆる液体から得ることができる。DNAは、Sambrook et al. (1989)に記載されている方法のような、従来技術で知られているあらゆる方法を用いて抽出することができる。またRNAも、たとえば生検時に得られる組織などから、グアニジウムチオフェネート-フェノール-クロロホルムによる抽出のような、当業者によく知られている標準的な方法を用いて単離することができる。

30

【0048】

JAK2遺伝子のG1849T変異体は、RNAまたはDNAのサンプルにおいて、好ましくは増幅後に検出可能である。たとえば、変異部位に特異的なオリゴヌクレオチド、あるいは、たとえばエクソン12またはSEQ ID No3もしくは4のような変異を含む領域を増幅することを可能にするオリゴヌクレオチドを用いるRT-PCR反応のように、単離されたRNAを逆転写にかけ、次に増幅することができる。「オリゴヌクレオチド」という表現は、ここでは少なくとも10個、好ましくは15~25個のヌクレオチド、好ましくは100個未満のヌクレオチドからなる核酸を指すために用い、JAK2のゲノムDNA、cDNAまたはmRNAとハイブリダイズする能力がある。

40

【0049】

本発明のオリゴヌクレオチドは、放射性標識、蛍光標識または酵素標識などの当業者に知られたあらゆる技術によって標識することができる。標識されたオリゴヌクレオチドはJAK2遺伝子のV617F変異体の有無を検出するためのプローブとして用いることが

50

できる。

【0050】

このように、本発明で有効なプローブおよびプライマーは1849位（転写開始を示すATGからのナンバリング）のヌクレオチドの近くでJAK2遺伝子の領域と特異的にハイブリダイズするものである。

【0051】

上述した方法において、核酸は対立遺伝子の変異の検出前にPCRで増幅することができる。対立遺伝子の変異の検出方法は、たとえば「Molecular Cloning - A Laboratory Manual」第二版、Sambrook、Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)、およびU. Landegren編、Laboratory Protocols for Mutation Detection, Oxford University Press, 1996、およびNewton & GrahamによるPCR第2版、BIOS Scientific Publishers Limited, 1997で説明されている。

10

【0052】

したがって、増幅過程の後に、目的の変異体の有無に応じてサンプルを選別することを可能にする検出過程を組み合わせたことが可能である。

【0053】

このために採用されるさまざまな技術は欧州特許第1186672号明細書に示されており、該技術とはたとえば、DNAシーケンシング、SSCP、DGGE、TGGEのハイブリダイゼーションによるシーケンシング、ヘテロ二本鎖分析、CMC、酵素によるミスマッチの切断、「ハイブリダイゼーションベースの固相ハイブリダイゼーション」、DNAチップ、Taqman（登録商標）液相ハイブリダイゼーション（米国特許第5210015号明細書および米国特許第5487972号明細書）、ならびにRFLP法などである。

20

【0054】

検出は、FRET、蛍光消光、偏光蛍光、化学発光、電気化学発光、放射能および比色分析法といったその他のさまざまな方法を用いて行うことができる。

【0055】

本発明による方法は、サンプルを得ることおよびそのサンプルの核酸を抽出することからなる過程を含んでいてもいなくてもよい。

30

【0056】

上述したように、用いるサンプルは個体から得られた血液もしくは他のあらゆる体液または組織とすることができる。核酸の抽出過程および精製過程の後、上述したプライマーを用いたPCR増幅をシグナルの検出を向上させるために用いることができる。

【0057】

このように、本発明による方法は前記プライマーを用いた増幅過程と、その後続く、ハイストリンジェンシーの条件の下で上述したG1849T変異領域に対応する配列とハイブリダイズする少なくとも一つのプローブ、好ましくは二つのプローブとのハイブリダイゼーション過程、そして前記プローブの標識によって生成したシグナルの検出を含むことができる。

40

【0058】

たとえば、本発明はより特徴的には、PV患者、またはPVもしくは他のあらゆる骨髄増殖症候群を発症する可能性のある患者のサンプルにおいて、JAK2遺伝子のG1849T変異体の有無を判定するためのインビトロでの方法を目的とし、該方法は、JAK2遺伝子のG1849T変異に特異的な一つまたは複数のSNP（一塩基変異多型）、とりわけSEQ ID No 17と18、あるいは、23と24を用いて、前記核酸のサンプルにおいてJAK2遺伝子のG1849T変異体の有無を検出することを含むものであり、G1849T変異体の存在がPVまたは他のあらゆる骨髄増殖症候群の指標となること

50

を特徴としている。

【0059】

SNPを用いたこの検出は、対立遺伝子の識別を可能にする Taqman (登録商標) 法によって実施することができる。基本的に、この方法は一本鎖DNAにおける JAK2 を1849対立遺伝子に特異的な蛍光プローブによって認識することで構成され、PCR反応(5'エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼによる)、ハイブリダイズしたSNPの対立遺伝子に特異的な蛍光発光の検出、最終的な蛍光を読み取ることによる遺伝子型の決定(ホモ接合変異DNA、ヘテロ接合変異DNAおよび正常DNAのクラスタを示す画像の取得)を含んでいる。

【0060】

JAK2 V617F変異タンパク質の検出

【0061】

もう一つの実施態様によると、変異体はJAK2タンパク質内で直接検出することができる。

【0062】

そのために、本発明は、PVまたは他のあらゆる骨髄増殖症候群、とりわけ赤血球増加症、血小板増加症および骨髄線維症に冒された、またはこれらを発症する可能性のある患者のサンプルにおいて、JAK2 V617F変異体の有無を検出するためのエクスピオあるいはインピトロでの方法を目的とし、該方法は、

- a) 患者のサンプルを得ること、
- b) JAK2 V617F変異体の有無を検出すること

を含んでおり、

前記変異体の存在がPVまたは他のあらゆる骨髄増殖症候群の指標となることを特徴としている。

【0063】

前記JAK2 V617F変異体は従来技術で知られているあらゆる適切な方法で検出することができる。

【0064】

より特徴的には、個体から得られたサンプルは、タンパク質JAK2のV617F変異体に特異的な抗体、たとえばV617F変異体と変異していないJAK2タンパク質(およびその他のあらゆるタンパク質)とを区別する能力をもった抗体と接触させることができる。

【0065】

本発明の抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、一本鎖または二本鎖、キメラ抗体、ヒト化抗体、あるいは、抗原と結合する断片[ヒト断片、ヒトF(ab')₂およびF(v)]に対応することが従来技術で知られている部分を含む免疫グロブリン分子の部分とすることができる。

【0066】

これらの抗体は、たとえば毒素またはマーカーとの免疫複合体とすることができる。

【0067】

ポリクローナル抗体を得るための手順は当業者には良く知られている。典型的には、そのような抗体は、免疫前血清を得るために事前に用意したニュージーランドホワイトウサギにJAK2 V617F変異体を皮下注射で投与することで得ることができる。抗原は6箇所異なった部位に部位あたり100μlまで注射することができる。ウサギは最初の注射の二週間前に用意し、続いて同一の抗原によって、6週間ごとにおよそ3回、定期的に刺激を与える。そして、血清サンプルを各注射の10日後に得る。次に、ポリクローナル抗体を、抗体を捕捉するためにJAK2 V617Fタンパク質を用いてアフィニティークロマトグラフィーにより血清から精製する。

【0068】

モノクローナル抗体は特異性が高いため、ポリクローナル抗体より好ましい。

10

20

30

40

50

【0069】

JAK2 V617F変異体が野生型JAK2タンパク質とは異なった3D構造を有しているため、このようなモノクローナル抗体を得ることは当業者にとって可能である。「モノクローナル抗体」という表現は、抗原のエピトープだけを認識することができる抗体を意味している。

【0070】

モノクローナル抗体は、哺乳動物、たとえばマウス、ラット、あるいは他の哺乳動物に、精製されたJAK2 V617F変異体で免疫付与することで得ることができる。抗体を産生する免疫付与した哺乳動物の細胞を単離し、雑種細胞(ハイブリドーマ)を産生するために骨髄腫または異種骨髄腫の細胞と融合させる。

10

【0071】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞を抗体の産生源として用いる。免疫付与を必要としない抗体の生成技術も本発明の目的である。たとえば「ファージディスプレイ」法である。

【0072】

JAK2 V617F変異体に対する抗体は、ある種の場合には野生型JAK2タンパク質との交差反応を示すことがある。これに該当する場合、V617F変異体に特異的な抗体を選択することが必要となる。したがって、たとえば野生型JAK2との交差反応を示しうる抗体を捕捉するために、野生型JAK2タンパク質でのアフィニティークロマトグラフィーを用いることができる。

20

【0073】

このように、本発明はJAK2 V617F変異体を特異的に認識するモノクローナル抗体ならびに該抗体を産生するハイブリドーマ系を目的としている。

【0074】

また、本発明は、サンプルにおけるJAK2 V617F変異体の有無を検出するための前記抗体を用いたELISA法も対象とする。

【0075】

抗体の利用に代わる方法は、たとえば、特定の分子の認識を可能にする分子クラスであるハプタマーを調製し、識別することからなる。

【0076】

ハプタマーは、高い親和性と特異性で標的分子のいかなるクラスも実質的に認識することができるオリゴヌクレオチドまたはオリゴペプチドである。

30

【0077】

キット

【0078】

もう一つの特徴によると、本発明は、患者が真性赤血球増加症またはJAK2 V617F変異体が関与する他のあらゆる骨髄増殖症候群に冒されているかどうかを判定するためのキットに関するものである。

【0079】

本発明のキットは、JAK2遺伝子におけるG1849T変異の有無を特異的に検出するための、上記で定義した一つまたは複数のプローブまたはプライマーを含むことができる。

40

【0080】

またキットは、PCR増幅のための耐熱ポリメラーゼ、増幅および/またはハイブリダイゼーション過程のための一つまたは複数の溶液、ならびに、マーカの検出を可能にするあらゆる試薬も含むことができる。

【0081】

もう一つの実施態様において、キットは上記で定義した抗体を含んでいる。

【0082】

さらに、本発明のキットは、固体担体上でのハイブリダイゼーションまたは免疫反応に

50

適したあらゆる試薬を含むことができる。

【0083】

検出方法および検出キットは、好適には、51%を超えるヘマトクリット値を示す患者の亜集団に対して用いられる。また、検出方法および検出キットもまた、好適には、450000を超える血小板の割合を示す患者の亜集団に対して用いられる。

【0084】

本発明の siRNA

【0085】

第四の特徴として、本発明はまた、617位が変異した JAK2、特に JAK2 V617F の発現を 50% 以上、75% 以上、90% 以上または 95% 以上、あるいは 99% 以上減少させることを可能にする siRNA も対象としている。これらの siRNA は、リポフェクション、形質導入あるいはエレクトロポレーションによって細胞または組織内に注入することができる。この siRNA によって、数多くの可能な治療法の適用とりわけ真性赤血球増加症の治療を必要とさせる、JAK2 V617F をコードする mRNA を特異的に破壊することが可能となる。

10

【0086】

siRNA は米国特許第 60/068562 号明細書 (CARNEGIE) に記載されている。この RNA は、二本鎖 (ds) 構造の領域を有することを特徴とする。阻害は標的配列に特異的であり、RNA の ds 領域の一方の鎖のヌクレオチド配列は少なくとも 25 個の塩基を含み、標的遺伝子の部分と同一である。RNA の ds 領域の他方の鎖のヌクレオチド配列は前者の鎖および標的遺伝子の部分に対して相補的である。また、国際公開第 02/44321 号パンフレット (MIT/MAX PLANCK INSTITUTE) は二本鎖 RNA (あるいは化学的に合成された同一の性質のオリゴヌクレオチド) を記載しており、該 RNA の各鎖は 19 ~ 25 個のヌクレオチド長を有し、RNA 干渉プロセスによって標的遺伝子の転写後の発現を特異的に阻害することで、遺伝子の機能を判定し、細胞または個体におけるこの機能を変化させる能力をもっている。最後に、国際公開第 00/44895 号パンフレット (RIBOPHARMA) は真核細胞における所与の標的遺伝子の発現をインビトロで阻害する方法を対象としており、該方法において、別々の二つの一本鎖 RNA で形成された dsRNA が細胞内に導入され、dsRNA の一方の鎖は、標的遺伝子と相補的な、25 対未満の連続したヌクレオチドを有する領域を有することを特徴としている。本発明の siRNA を調製するために、当業者はこの文書に含まれる教示内容を参照することができる。

20

30

【0087】

より特徴的には、本発明は、G1849T 変異を含む SEQ ID No 3 の配列に相補的 (鎖 1) な、および同一 (鎖 2) の、およそ 15 ~ 30 個のヌクレオチド、19 ~ 25 個のヌクレオチド、好ましくは約 19 個のヌクレオチド長の二本鎖 RNA を対象としている。本発明のこれらの siRNA は、さらに 3' 末端にジヌクレオチド TT または UU を含むことができる。

【0088】

多くのプログラムが本発明の siRNA を設計するために利用可能である。

40

- 「siSearch Program」、http://sonnhammer.cgb.ki.se/siSearch/siSearch_1.6.html (「Improved and automated prediction of effective siRNA」, Chalk AM, Wahlesdelt C, and Sonnhammer ELL, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004)。

- 「SiDirect」、<http://design.rnai.jp/sidirect/index.php> (Direct: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference, Yuki Naito et

50

al, Nucleic Acids Res, Vol. 32, No. Web Server issue, Oxford University Press (著作権), 2004)。

- 「siRNA Target Finder」、Ambion、http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_tools.html。

- 「siRNA design tool」、Whitehead Institute of Biomedical Research、MIT、<http://jura.wi.mit.edu/pubint/http://iona.wi.mit.edu/siRNAext/>。

10

【0089】

その他のプログラムは以下にリストされている。

<http://web.mit.edu/mmcmanus/www/home1.2/files/siRNAs.html>、とりわけ、

http://athena.bioc.uvic.ca/cgi-bin/embosss.pl?__action=input&__app=sirna。

【0090】

たとえば、配列 T A T G G A G T A T G T T¹⁸⁴⁹ T C T G T G G A G A (SEQ ID No 12) に対しては、センス siRNA は U G G A G U A U G U U U C U G U G G A d T d T (SEQ ID No 13) であり、アンチセンス siRNA は U C C A C A G A A A C A U A C U C C A d T d T (SEQ ID No 14) である。

20

【0091】

特定の実施態様によると、上記の本発明の siRNA は、野生型 JAK2 の発現にできるだけ影響を与えずに JAK2 V617F の発現を減少させる能力、ひいては特異的にブロックする能力について試験、選別されている。たとえば本発明は、JAK2 V617F の発現を 80% より多く、90% より多く、95% より多くまたは 99% より多く減少させ、野生型 JAK2 についてはまったく減少させない、あるいは、50% 未満、25% 未満、15% 未満、10% 未満または 5% 未満、さらには 1% 未満の減少とすることが可能な、siRNA を目的とするものである。

【0092】

30

たとえば、本発明の siRNA は、

- U G G A G U A U G U U U C U G U G G A (SEQ ID No 29)、

- G G A G U A U G U U U C U G U G G A G (SEQ ID No 30)、

- G A G U A U G U U U C U G U G G A G A (SEQ ID No 31)、

から構成されるグループから選択することができる。

【0093】

もう一つの実施態様では、本発明は、国際公開第 01/70949 号パンフレット (Benitec) に包括的に記載されている ddRNAi 分子に関するものであるが、JAK2 V617F を特異的に標的としている。本発明の ddRNAi は、JAK2 V617F をコードしている配列を消失させることを可能にするものであり、該 ddRNAi は、(i) SEQ ID No 3、4 または 11 と同一の配列、(ii) (i) で定義した配列に相補的な配列、(iii) 前記配列 (i) および (ii) を隔てるイントロン、そして JAK V617F の発現を変化させる能力をもった RNA を産生する細胞または組織にこの構築物を導入することを含んでいる。

40

【0094】

また、本発明は、JAK2 V617F の発現をブロックし、遅らせ、または減少させる能力を持った遺伝子構築物を含む一つまたは複数の細胞を有する、遺伝的に修飾された、ヒトではない動物も対象としている。このような遺伝的に修飾された動物を産生する方法は国際公開第 04/022748 号パンフレット (Benitec) に示されている。

【0095】

50

スクリーニング方法

【0096】

第五の特徴として、本発明は JAK2 V617F の特異的阻害剤のスクリーニング方法を目的としている。

【0097】

「特異的阻害剤」とは、JAK2 V617F の IC50 に対する JAK2 の IC50 の比率が 5、10、25 あるいは 50 を超える化合物を意味する。たとえば、この化合物は JAK2 V617F の IC50 が 1 μM 未満、好ましくは 100 nM 未満であるのに対し、JAK2 の IC50 は 5 μM または 10 μM を超える。

【0098】

この方法は、本発明のタンパク質、前記タンパク質を含んだ膜画分、前記タンパク質を発現する細胞、あるいは上述したヒトではないトランスジェニック動物を用いて実施することができる。

【0099】

このように、本発明は、JAK2 V617F の特異的阻害を一つまたは複数の化合物によって判定することを可能にする試験を対象とし、該試験は、一つまたは複数の化合物を、固定、特異的な固定の検出および/または JAK2 V617F の阻害の検出に適した条件下で、上記の JAK2 V617F タンパク質、JAK2 V617F を含む膜画分、あるいは上記の JAK2 V617F を発現する細胞と接触させることからなる過程を含んでいる。

【0100】

この方法はさらに野生型 JAK2 への固定の測定を含むことができる。

【0101】

また、この方法は複数の分子に対する一連の試験で構成することができ、JAK2 V617F に対して 1 μM 未満、好ましくは 100 nM 未満の IC50 を示す分子を選択する過程を含むことができる。

【0102】

さらにこの方法は、JAK2 に対して 5 μM または 1 μM 未満の IC50 を示す前述した分子の負の選択を行う過程を含むことができる。

【0103】

本発明は、JAK2 V617F のリン酸化の阻害を免疫沈降によって判定する、上述したインビトロでのスクリーニングを対象とする。

【0104】

また、本発明は、エリスロポエチン (Epo) の不在下で分化する能力がある CD34 + JAK2 V617F 前駆細胞に対する、インビボでのスクリーニングも対象としている。このような細胞は真性赤血球増加症の患者から単離する。CD34 + JAK2 V617F 細胞は SCF および IL-3 を含んだ培地で培養することができる。化合物を培養培地に加え、細胞の増殖能力および 36 + / GPA - 細胞に分化する能力を判定する。36 + / GPA - クローンの数の減少が観察される化合物を選択する。このように、本発明は、エリスロポエチン (Epo) の不在下で、または JAK2 V617F 変異体の導入によって独立因子となった細胞系上で分化する能力がある、CD34 + JAK2 V617F の初代前駆細胞を用いた上記スクリーニング方法を対象としている。同様のタイプの分析を半流動培地における CFU - E 型の骨髄培養物に対して行うことができ、コロニーの自然発生的な増加の阻害について化合物を直接試験することができる。

【0105】

また、組換え JAK V617F を発現する上記の哺乳動物のあらゆる細胞系を利用することもできる。

【0106】

また、本発明は医薬品の候補を識別するための方法も対象としており、該方法は、真性赤血球増加症を再現し、および/または、JAK2 V617F の存在に関連する骨髄増

10

20

30

40

50

殖症候群に冒されている、上述した J A K 2 V 6 1 7 F を発現する、ヒトではないトランスジェニック動物に化合物を投与することと、化合物の効果を判定し、真性赤血球増加症における赤芽球の増殖および自然発生的な分化の減少もしくはブロックまたは J A K 2 V 6 1 7 F の存在に関連する細胞増殖の減少が観察される医薬品候補を選択することとからなる過程を含んでいる。

【 0 1 0 7 】

より特徴的には、この方法は、上述した J A K 2 V 6 1 7 F K - i n マウスまたは J A K 2 V 6 1 7 F K - i n ラットで実施する。

【 0 1 0 8 】

これらの化合物のうち、たとえば前述した J A K 2 の変異したエクソン 1 2 を標的とする s i R N A、特に、変異ヌクレオチド t¹⁸⁴⁹を含んだ配列 S E Q I D N o 3、4 または配列 S E Q I D N o 1 1 を標的とする s i R N A を挙げることができる。

10

【 0 1 0 9 】

もう一つの特徴として、本発明は、医薬品の製造のために、前記 s i R N A または上記の d d R N A i および J A K 2 V 6 1 7 F を特異的に阻害する化合物を利用することを対象としている。前記医薬品はとりわけ、血液の癌、特に真性赤血球増加症、本態性血小板増加症、骨髄性脾腫つまり原発性骨髄線維症、および慢性骨髄性白血病 (L M C) を含む骨髄増殖症候群の治療を目的としている。また、前記医薬品は、J A K 2 V 6 1 7 F 変異に関連するその他の悪性血液疾患、場合によっては J A K 2 V 6 1 7 F を発現する充実性腫瘍、癌腫、黒色腫および神経芽腫の治療も目的としている。

20

【 0 1 1 0 】

明細書の以下の部分および実施例については、以下に説明した図面を参照するものとする。

【 0 1 1 1 】

図面の説明

【 0 1 1 2 】

図 1 : P V における J A K 2 の主要な役割の発見

平常時では、J A K 2 はリン酸化していない状態でボックス 1 に固定されている。E p o との結合によって受容体の立体構造が変化し、J A K 2 のリン酸転移が可能となり、それを受けて J A K 2 は E p o - R の細胞質内残基をリン酸化し、シグナル伝達のさまざまな正のエフェクター () または負のエフェクター () を動員する。

30

【 0 1 1 3 】

図 2 : エリスロポエチンの不在下で分化できる P V の C D 3 4 + 前駆細胞の培養モデルの設定

2 A : E p o、S C F および I L - 3 を用いた培養。

2 B : E p o の不在下での培養。

【 0 1 1 4 】

図 3 : J A K - S T A T、P i 3 - K および S r c キナーゼ経路の阻害による赤血球の自然発生的な分化の抑制。

【 0 1 1 5 】

図 4 : P V 前駆細胞における J A K 2 の阻害の手順。

【 0 1 1 6 】

図 5 : P V 前駆細胞における J A K 2 の阻害の結果

5 A : 3 6 + / g p a - のクローニング能力の減少。1 ~ 6 日目に S C F - I L 3 において培養し、5 日目にエレクトロポレーションを行い、6 日目に選別する (形態 / 3 6 + / g p a -) 。

メチル S C F のみ。1 3 日目 (選別後 7 日目) に計数を行う。

5 B : V 6 1 7 F 変異を有する J A K 2 の構造 (エクソン 1 2) 。

【 0 1 1 7 】

図 6 : L i g h t C y c l e r (登録商標) 法および T a q M a n (登録商標) 法による

50

、ゲノムDNAにおけるJAK2 V617F変異を検出するためのSNPの遺伝子型決定分析。

AおよびB：FRETハイブリダイゼーションプローブを用いたLightCycler（登録商標）の融解曲線分析による変異の検出。A：TF-1のDNAにおけるさまざまな希釈度のHELのDNAを用いた実験の結果が示されている。JAK2 V617Fのピーク（57）は1%の希釈度でも依然として検出可能である。B：代表的な患者のサンプルの結果を示している（#1：ホモ接合体、#2：ヘテロ接合体、#3：弱い、#4：変異なし）。

C：TaqMan（登録商標）を用いた対立遺伝子に特異的な増幅による変異の検出。HELのDNAの希釈物での実験（100～1%のHEL：白抜きの四角、TF-1細胞：白抜きの丸）と代表的な患者のいくつかのサンプル（黒の十字）を示している。#a：ホモ接合体の患者、#b：ヘテロ接合体の患者、#c：弱い患者、#d：変異のない患者。

【0118】

図7：赤血球増加症（つまり51%を超えるクリマトクリット値）を診断するために提案する診断シート。

シートの各段階についての患者の数は各欄の端に記載されており（n）、ここではすべての臨床データを示す患者のみをリストしている（n=81）。一次診断試験であるJAK2 V617Fの検出の結果、81人中58人の患者において、PV型の骨髄増殖症候群を診断するためのその他の調査を避けた。

【0119】

図8および図9：HEL細胞におけるJAK2 V617Fの発現が、JAK2 V617Fに特異的なsiRNA（siRNA#1、#3および#4）による処理の24時間後に減少する。

0～6：JAK2 V617FのsiRNAで処理した（1～6）または処理していない（0）HEL細胞。

C+：JAK2 V617F RVベクターでトランスフェクトした293HEK細胞。

C-：293HEK。

【0120】

図10：K562細胞におけるWT JAK2の発現レベルは、JAK2 V617Fに特異的なsiRNAによる処理の24時間後にも変化しなかった。

Je：WT JAK2のsiRNAで処理したK562細胞。

0～6：JAK2 V617FのsiRNAで処理したK562細胞。

C-：293HEK（JAK2の発現なし）。

【実施例1】

【0121】

43人中39人の患者におけるJAK2 V617F変異の識別

【0122】

疾病状態にある前駆細胞の培養モデルの設定と生化学的阻害剤の利用によって、JAK2-SSTAT5、PI3キナーゼおよびSrcキナーゼの経路がPV前駆細胞のEpoに依存しない分化に必要であることが明らかになった（Ugo et al, 2004）。これらの結果は、PVが原因である原発性の分子異常が、シグナル伝達経路に構成的活性を与えるチロシンキナーゼの変異のような、シグナル伝達経路の脱制御につながる主要タンパク質の異常であるという、我々の仮説を裏付けている。とはいえ、JAK2タンパク質の主要な役割は真性赤血球増加症に冒された43人の患者に対する検査により特定することができたのであり、該タンパク質はこれらのさまざまなシグナル伝達経路の最も上流に位置するタンパク質で、サイトカイン受容体のシグナル伝達経路に共通しているものであり、該受容体に対する応答の異常はPVにおいて説明されてきている。我々は、

- 機能的アプローチ（RNA干渉によるPV細胞におけるJAK2の阻害）、

10

20

30

40

50

- ゲノム的アプローチ (遺伝子の 23 個のエクソンのシーケンシング)、および、
 - 構成的活性化の原因となる JAK2 のリン酸化の異常を発見するための生化学的アプローチ
 という 3 つの補足的なアプローチによって、PV の病理における JAK2 プロテインキナーゼの関与を研究した。

【0123】

用いた生物材料は、赤血球増加症に冒されている、承諾を得た患者に由来するものであり、診断目的で採取され、Hotel Dieu の Laboratoire Central d'Hématologie に送られたサンプルの残りとして、治療のための瀉血に対応するものである。

【0124】

1.1 機能的な研究

真性赤血球増加症に冒された患者の赤芽球における JAK2 の機能の研究は、JAK2 の mRNA のエクソン 15 に位置する配列を標的として認識する、JAK2 配列に特異的な siRNA (AMBION、Huntingdon、イギリス) を、エレクトロポレーションによって PV の赤芽球に形質導入することで行った。我々は、JAK2 の阻害によって、Epo の不在下での PV 前駆細胞のクローニング能力と「自然発生的な」分化がかなり減少することを示した。JAK2 の siRNA をトランスフェクトした正常な赤芽球前駆細胞は、コントロール siRNA と比較してクローン化能力が 70% 減少しており、このことは、JAK2 の siRNA によるトランスフェクションが有効であることを確認している。PV では、赤芽球前駆細胞において JAK2 を阻害する効果が Epo 不在の培養モデルにおいて研究されており、これによって悪性クローン細胞の研究が可能となっている。我々は、JAK2 の siRNA によるトランスフェクション後の PV の赤芽球前駆細胞のクローン化能力、アポトーシスおよび分化を、コントロール siRNA の場合と比較した。Epo の不在下で培養した PV 前駆細胞のクローン化能力の研究により、コントロール siRNA の場合と比較して、JAK2 の siRNA をトランスフェクトした後にコロニーの数が明らかに減少したことが示された。これらの細胞のアポトーシスについてのフローサイトメトリー分析は、JAK2 の siRNA をトランスフェクトした細胞では、関連のない siRNA の場合と比較してアポトーシスが顕著に増加したことを示している (70% 対 53%)。分化に対する JAK2 の siRNA の効果に関する研究 (フローサイトメトリーで検出されたグリコフォリン A の回収) では、コントロール siRNA と JAK2 の siRNA をトランスフェクトした前駆細胞の間ではわずかな違いを示しただけである。

【0125】

したがって、細胞研究の結果は、PV の赤芽球前駆細胞が Epo に依存せずに分化するには JAK2 が必要であることを示している。生化学的研究 (免疫沈降) の第一の結果は、PV の赤血球前駆細胞をサイトカインから遮断すると、正常細胞と比較して、JAK2 のより長いリン酸化が起こることを示している。

【0126】

1.2 JAK2 のゲノム的研究

23 個のエクソンに対する PCR をゲノム DNA に基づいて正常な被験者に対して行った。そして、細胞培養後にインビトロで得られた赤血球細胞のゲノム DNA を抽出した後に、3 人の PV 患者について研究した。

【0127】

我々は、JAK2 のエクソン 12 に位置し、試験した 3 人の患者のうち 2 人に存在した点変異を識別した。この変異はコード配列の 1849 番塩基 ([ATG から開始したナンバリング]、GenBank NM_004972) に関与し、JAK2 タンパク質のコドン 617 を変化させる (V617F)。

- ・ 通常のコドン 617: パリン (V) をコードする gtc。
- ・ 変異したコドン 617: フェニルアラニン (F) をコードする ttc。

10

20

30

40

50

【0128】

インターネット上に公開されているデータベースにより、我々はそれが既知の多型ではないことを確認した。

【0129】

次に、我々は被験者群を広げた。現在、変異は試験した43ケースのうち39人のPV患者で見ついている。対照（試験した15ケース）あるいは二次性赤血球増加症の患者（試験した18ケース）では変異を有する者は見つからない。

【0130】

患者におけるシーケンシングの結果

- ・試験した43のPV中39の変異（90%）。
- ・2/3のヘテロ接合体。
- ・13/39、つまり30%のケースが「ホモ接合体」（9pでのヘテロ接合性の喪失と同じ割合）。

【0131】

コントロール

- ・試験した33人の対照中0例の変異。
- うち、15人は正常な被験者。
- 18人は二次性赤血球増加症（自然発生的なコロニーなし）。

【0132】

JAK2のこの異常の発見は、PVに関わる多くの成長因子（Epo、TPO、IL-3、IL-6、GM-CSF、インスリン）に対する過敏性を説明している。実際、JAK2はこれらサイトカインの受容体のシグナル伝達経路に關与するタンパク質である。

【0133】

さらに、JAK2とEpo-Rとの連関は、JAK2が構成的にEpo-Rに固定されるという点で特徴的である。つまり、ゴルジ装置内で開始されるJAK2/Epo-Rの連関は、赤芽球の膜でのEpo-Rのプロセッシングに必要である。したがって、JAK2とR-Epoとの連関の変化の原因となっているJAK2の異常は、赤芽球系での骨髄の過形成の優位性を説明しうるが、一方、このタンパク質は多くのシグナル伝達経路に關与するものである。また、Moliterno et coll (Moliterno et al., 1998、Moliterno et Spivak, 1999)は、グリコシル化の欠如に關連するmplの膜発現の欠如を立証している。Epo-Rから類推して、JAK2がc-mplのプロセッシングに必要である可能性がある。JAK2の異常は、PVで見られるc-mplの膜発現の欠如を説明するものであろう。

【0134】

JAK2は、その近位ドメインにおいて、Epo-Rの、よく保存されたドメインであるBox2に結合する。Epoによる刺激がないとき、JAK2は構成的にEpo-Rに固定されるが、リン酸化していない形態であり、したがって非活性的である。Epoによる受容体の刺激後、二つのJAK2分子はリン酸化し、そしてEpo-Rをリン酸化するのだが、このことによって、STAT5、Grb2、PI3Kタンパク質のようなシグナル伝達に關与するその他のタンパク質を動員し、リン酸化することが可能になる。JAK2タンパク質はすべてのJAKと同様、機能的なキナーゼ領域（JH1）、チロシンキナーゼ活性のない偽キナーゼ領域（JH2）および、JAKファミリーのメンバーに特徴的な複数の保存ドメイン（JH3~JH7）を有している。JH2ドメインはJAK2のチロシンキナーゼ活性の調整に關与すると考えられる。JAK2タンパク質のマッピングに關する入手可能なデータ（Lindauer, 2001）によると、617番アミノ酸はこのJH2ドメインに位置し、モデル化の研究によると、キナーゼ活性の調節に特に重要な領域に位置している。

【0135】

この発見（サイトカインに依存しないメカニズムの理解、さまざまなSMPの分類）の生理病理学的利点を越えて、患者における変異の実証は、診断の確認を可能にする試験を

10

20

30

40

50

初めて提供するものである。医療診断のアプローチにおいて、JAK2の変異の検査は、悪性クローンに属する血液多核球に対して行うことができるものである。

【0136】

また、本発明は、変異タンパク質に特異的なキナーゼを阻害するタイプの特異的な処理、あるいは遺伝子治療の開発を提供するものでもある。

【実施例2】

【0137】

赤血球増加症の一次診断のためのJAK2 V617F変異体の検出

【0138】

2.1 患者、材料および方法

JAK2 V617Fを検出するための、シーケンシングと二つのSNP遺伝子型決定法の比較。

【0139】

患者の細胞

MPD（すなわち赤血球増加症、血小板増加症、白血球増加症）の疑いがある119のサンプルを分析した。58の血液サンプルをこのために採取し、骨髓バンクの61のサンプルを遡及的に分析した。

【0140】

製造者（Eurobio、フランス）の指示にしたがって密度勾配を用いて末梢顆粒球を単離した。Ficollを用いた勾配遠心法を利用して骨髓の単核細胞を単離した。標準的な手順でゲノムDNAを抽出した。LightCycler（登録商標）法およびTaqMan（登録商標）法の感度を知るために、最少残基の野生型対立遺伝子とのホモ接合のサンプルに由来するDNAを、正常DNAで連続希釈した。

【0141】

細胞系

標準的なポジティブコントロールであるTF-1細胞系（変異なし）のDNAにおける、ホモ接合性で変異した（JAK2 V617F）ヒト赤白血病細胞系（HEL）のDNAの連続希釈物（1、0.5、0.1、0.05、0.01）を用いた。この細胞系を、ウシ胎児血清を加えたMEM-培地（Invitrogen）中で成長させた。

【0142】

FRETハイブリダイゼーションプローブを用いたLightCycler（登録商標）の融解曲線分析による変異の検出

JAK2のエクソン12の標的配列の増幅および該配列とのハイブリダイゼーションのために、プライマーとプローブを設計した。変異部位の位置（1849G/T）を、3'をフルオレセインで標識したドナーキャプチャープローブと、5'末端をLightCycler（登録商標）Red640（LCRed640）で標識した、隣接するアクセプターアンカープローブで覆い、該アンカープローブの3'末端は伸長を避けるためにリン酸化した。増幅および融解曲線分析はLightCycler（登録商標）の機器（Roche Diagnostics、Meylan、フランス）で実施した。最終的な反応体積は20μlであり、10ngのDNA、14μlのLightCycler FastStart DNA Master混合物、3mMのMgCl₂、0.2μMのプライマー、0.075μMの各プローブが含まれている。簡単に説明すると、サンプルを95で10分間加熱し、45サイクル（95で10秒、53で10秒、72で15秒）のPCR増幅の後、95で10秒間の変性過程と、それぞれ30秒にわたる63と45での二回のハイブリダイゼーション過程を行い、そして融解曲線は45と70（0.1/秒）の間に含まれる領域にあった。LightCycler（登録商標）プログラム上での分析は、温度に対する蛍光産物の曲線[Tに対する2(dF12/F11)/dT]をプロットすることで行った。変異体およびWTのピークはそれぞれ57と63で見られた。

【0143】

10

20

30

40

50

TaqMan (登録商標)を用いた対立遺伝子に特異的な増幅による変異の検出

1849位でのSNPを含む92bpの産物を増幅するために二つのプライマーを設計した。二つのMGB蛍光プローブを、異なる色で蛍光標識して、一つはWT対立遺伝子を標的とし、もう一つは変異対立遺伝子を標的とするよう設計した。96ウェルプレート上で、TaqMan (登録商標)PCRに基づく方法を用いて遺伝子型決定を行った。最終的な反応体積は12.5 μ lであり、10ngのゲノムDNA、6.25 μ lのTaqMan (登録商標)Universal Master Mixおよび0.31 μ lの40x Assays-on-Demand SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems)が含まれている。プレートを95で10分間加熱し、その後、92で15秒の40回の変性サイクルと60で1分間の対合/伸長を行った。熱サイクルは7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)で行った。分析はSDSプログラムのバージョン1.3を用いて実施した。最終的な対立遺伝子の識別のための遺伝子型決定は、PCR後の蛍光読み取りに基づいて得られた変異JAK2の蛍光の曲線(Rn)に対する、WTプローブに由来するRnの目視による判定で行った。

10

【0144】

赤血球増加症の患者とサンプルの採集

何らかの治療を行う前に、診断時に、51%を超えるヘマトクリット値を有する88人の患者を調べ、WHO基準およびPVSG基準の有無について検査した。51%という値はヘマトクリット値の正常域の上限である (Pearson TC et al., A Polycythemia Vera Updated: Diagnosis, Pathobiology, and Treatment. Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.) 2000: 51-68)。骨髓細胞をクローン化の測定のために採取し、過剰量の細胞をDNA抽出のために採取した。血清中のエリスロポエチン(Epo)をさまざまな研究所で測定し、その結果、該エリスロポエチンが各研究所の正常域の下限値より低いときには低いとの報告を、同様に正常あるいは高いとの報告を受けた。同じ患者に由来する末梢顆粒球を先述のように精製し、各時間における血液サンプルを利用できるようにした。骨髓サンプルおよび血液サンプルをインフォームドコンセントを得た後に採取した。

20

【0145】

EECの分析

Epoに対する赤血球の応答特性のインビトロでの測定を、同一の研究所 (Hotel Dieu、パリ)において、先述した凝固血漿培養法によって行った (Casadevall N, Dupuy E, Molho-Sabatier P, Tobelem G, Varet B, Mayeux P. Autoantibodies against erythropoietin in a patient with pure red-cell aplasia. N. Engl. J. Med. 1996; 334: 30-633)。

30

【0146】

統計分析

マーカーの相関関係はスピアマンの順位相関係数(R)を用いて求めた。

40

【0147】

2.2 結果

JAK2 V617F変異を検出するためのPCRに基づく遺伝子型決定法の実行可能性と感度

JAK2 V617F変異を検出するためのシーケンシング、LightCycler (登録商標)法およびTaqman (登録商標)法の効率を評価するために、MPDの疑いのある患者に由来する119のサンプルにおいて、3つの方法を平行して利用して該変異の存在を調査した。JAK2 V617F変異は119サンプル中83サンプルで効果的に検出され、35サンプルは3つの方法のいずれによっても変異を示さなかった。1サ

50

ンプルのみにおいて、シーケンシングではLightCycler（登録商標）とTaqman（登録商標）の二つの方法で明らかになった変異を検出できなかったことから、後者の方法がより感度が良いことが示唆される。

【0148】

方法の感度を評価するため、二つの異なった方法を用いた。つまり、変異のないTF-1細胞系のDNAにおける、ホモ接合性で変異したHEL細胞系のDNAの連続希釈液を試験し、また、正常DNAにおける、JAK2 V617F変異についてホモ接合の患者に由来するゲノムDNAの連続希釈液を試験した。シーケンシングでは、TF-1細胞系のDNAで希釈した5%未満のHEL細胞系のDNA、正常DNAで希釈した10%未満のホモ接合性の変異患者のDNAでは、変異した対立遺伝子を検出できなかった。LightCycler（登録商標）法およびTaqman（登録商標）法の感度は同等で、シーケンシングをわずかに上回っており、TF-1細胞系のDNAで希釈したHEL細胞系のDNAでは0.5~1%（図6）、正常DNAで希釈したホモ接合性の変異患者のDNAでは2~4%まで可能であった。

10

【0149】

診断時の赤血球増加症患者の特徴

診断時に51%を超えるヘマトクリット値を有する88人の患者の主要な特徴を表1にまとめた。

【0150】

【表 1】

	WHO 基準		PVSG 基準		WHO と PVSG の基準	
	PV n = 61	突発性赤血球 増加症 n = 11	PV n = 45	突発性赤血球 増加症 n = 21	二次性赤血球 増加症 n = 5	Ht>50%だが AE ではない n = 3
性別比 (男/女)	38/23	11/0	28/17	18/3	4/1	3/0
平均年齢 (範囲)	61 (23 ~ 92)	57 (24 ~ 81)	58 (23 ~ 92)	60 (53 ~ 81)	65 (55 ~ 77)	48.6
平均 Ht (%) +/-σ	59 +/- 4.6	54.6 +/- 1.44	59.2 +/- 4.5	57.8 +/- 4.2	55.8 +/- 3.1	53.3 +/- 0.8
平均 Hb (g/dL)+/-σ	19.2 +/- 1.39	18.3 +/- 0.34	19.3 +/- 1.41	19 +/- 1.0	18.9 +/- 0.8	18.6 +/- 0.5
平均 WBC (x10 ⁹)+/-σ	12.2 +/- 4.4	7.0 +/- 2.5	13.5 +/- 4.9	8.2 +/- 2.5	8.8 +/- 1.9	6.6 +/- 0.4
血小板の 平均数 (×10 ⁹)+/-σ	463 +/- 148	212 +/- 38	503 +/- 149	245 +/- 60.4	212 +/- 29	165 +/- 19
脾腫	16/55	0/11	14/39	0/21	0/5	0/3
EEC の存在	59/60	1/11	43/44	11/21	0/5	0/3
低い Epo レベル	39/47	2/8	27/33	10/17	0/3	1/1
正常 Epo レベル	8/47	6/8	6/33	7/17	3/3	0/1
細胞遺伝 学的異常	7/32	0/3	6/23	0/7	nd	0/1
JAK2V617F 陽性	57/61	0/11	43/45	8/21	0/5	0/3

10

20

30

【 0 1 5 1 】

51%を超えるヘマトクリット値を有する88人の患者をPVSG基準とWHO基準にしたがって診断し、真性赤血球増加症(PV)、突発性赤血球増加症、二次性赤血球増加症、および測定した赤血球量の増加していないときの「絶対的赤血球増加症ではない」(AEではない)という四つのグループに分けた。8人の患者は、いくつかの臨床データが入手不可能であったため、決定的な診断を得ることができなかった。Ht:ヘマトクリット、Hb:ヘモグロビン、WBC:白血球、EEC:内因性赤血球コロニー、Epo:エリスロポエチン、σ:標準偏差。患者は、WHO基準(Pierre R. et al., editeurs. World Health Organization Classification of Tumours; Pathology and Genetics of tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001: 32-34)とPVSG基準(Pearson TC, Messinezy M. The diagnostic criteria of polycythaemia rubra vera. Leuk Lymphoma 1996: 22 Suppl 1: 87-93)のそれぞれに応じて、PV診断を受けた61~45人の患者、二次性赤血球増加症の5人、突発性赤血球増加症の11~21人、そして絶対的赤血球増加症ではない3人(正常な赤血球量)の、4つの主要グループに分けることができた。臨床データは7人の患者に

40

50

ついて不完全であったが、それは、P Vの診断がWHO基準でもP V S G基準でも確認できなかったということである。二つの分類におけるA 1基準の間にある違いのために、赤血球量の測定を行っていない6人の患者はWHO分類に入れることはできるが、P V S G分類には入れることができない。一人の患者は低酸素血症とE E Cの形成を同時に示し、したがって診断が困難であった。細胞遺伝学的分析を35人の患者で行い、32人のP V患者(WHO基準による)のうち7人が細胞遺伝学的異常を有し、そのうち5人が9トリソミーを、1人が7qトリソミーを有しており、そして1人が18番染色体に付加的な物質を有していた。

【0152】

P VのP V S G基準とWHO基準に対応するJ A K 2 V 6 1 7 Fの存在

P V S G基準によりP Vとして診断された45人の患者のうち43人(96%)でJ A K 2 V 6 1 7 Fが存在し、WHO基準で診断された61人の患者のうち57人(93%)で存在した(表1)。しかし、P V S G分類にしたがってP Vでないとして分類された29人の患者のうち8人は変異を示したのに対し、WHO分類にしたがってP Vでないとして分類された患者19人は変異を示さなかった。これら8人の患者はP V S G基準によればI Eであると考えられ、WHO基準によればP Vであると考えられる。S Eと診断された患者も正常な赤血球量を有する患者(「A Eではない」)も変異を有していなかった。したがって、J A K 2 V 6 1 7 Fの有無は、WHO基準を用いた場合には80人中76人の患者で(95%、 $R = 0.879$ 、 $p < 0.0001$)、P V S G基準を用いた場合には74人中64人の患者で(86.5%、 $R = 0.717$ 、 $p < 0.0001$)、P Vの陽性診断に対応する。さらに、WHO基準でP Vでないとして診断された患者はいずれも変異を有していなかったため、J A K 2 V 6 1 7 Fの検出は絶対的赤血球増加症においては100%の予測値を有することになる。

【0153】

一部の著者(Mossuz P. et al., Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. Haematologica 2004; 89: 1194 - 1198)は血清Epoレベルの測定を、絶対的赤血球増加症の患者に対する一次診断試験と考えており、Epoレベルが正常域の下限値の下にあれば、P Vの診断について97%の特異度と97.8%の予測値を有する。我々の研究において、EpoレベルとWHO基準およびP V S G基準によるP V診断との相関関係は、それぞれ61人中50人(82%、 $R = 0.488$ 、 $p = 0.0002$)および56人中39人(70%、 $R = 0.358$ 、 $p = 0.0067$)の患者で見られた。次に、我々はJ A K 2 V 6 1 7 Fの存在下または不在下で血清Epoレベルを比較し、68人の患者のうち52人(76%、 $R = 0.416$ 、 $p = 0.0004$)が適切な相関関係を有することを見出した。

【0154】

J A K 2 V 6 1 7 F変異の存在はE E Cを形成する能力に対応する。

【0155】

異なる三つのチームにより、J A K 2 V 6 1 7 FをトランスフェクトしたEpoに依存する細胞系が、増殖についてはEpoに依存しておらずEpoに対して過敏であり、P Vにおいて説明されている赤血球前駆細胞の非依存性および過敏性と似た振る舞いを見せることが示されている。したがって我々は、J A K 2 V 6 1 7 Fを有する患者がE E Cの形成も示すという仮説を立てた。E E Cの形成をまったく示さない20人の赤血球増加症患者のうち、一人は変異を示し、J A K 2 V 6 1 7 Fの検出に関する陽性の予測値に疑問が生じた。しかし、この患者がE E Cも全く示さなくとも、該患者は多くの陽性のWHO基準およびP V S G基準を満たしており、該患者を両方の分類法においてP Vとして分類することができる。したがって、この患者は「J A K 2について偽陽性」というよりも「E E Cについて偽陰性」と捉えるべきである。E E Cを有する67人の患者のうち、62人はJ A K 2 V 6 1 7 Fを有しており、5人の患者は検出に感度のある方法を用い

た際には変異していなかった。これら5人の患者のうち、5人中4人と5人中2人は、それぞれWHO基準とPVSG基準にしたがってPVグループに分類することができた。全体では、分析した87人の患者のうち、JAK2 V617F変異の有無が、87人中81人の患者(93.1%、R=0.824、 $p < 0.0001$)においてEECを形成する能力の有無に対応していた。

【0156】

骨髄の単核細胞(BMMC)におけるJAK2 V617F変異の存在は、末梢顆粒球における該変異の存在に対応している。

【0157】

診断時にJAK2 V617F変異を検出するために末梢血顆粒球を用いることで骨髄細胞の分析の実施を避けられるかどうかを検討するために、我々は、骨髄サンプルと末梢血サンプルが診断時に両方利用可能な50人の患者について(35人のPV患者、8人のSE患者および8人のMPDの疑いのある者を含む)、シーケンシング法、LightCycler(登録商標)法およびTaqMan(登録商標)法のそれぞれで得られた結果を比較した。すべての場合(変異のある34人、変異のない16人)で、変異は同様に検出された。

10

【0158】

III - 結論

このように、我々は、明白な二次的赤血球増加症の場合を除き、顆粒球におけるJAK2 V617Fを感度の良い方法で検出することが赤血球増加症の診断の最初のステップである(図7)、新規なPV診断カードを提案する。このアプローチにはいくつかの利点があり、常に実行可能というわけではなく結果を検討しなくてはならないことのある、アイソトープを有する赤血球量の測定を避けることができる。また、骨髄の吸引や、時間がかかり標準化されていないEEC分析の実行を避けることもできる。これによりPVの陽性診断のコストが大きく低下するのだが、それは、51%を超えるヘマトクリット値を有しJAK2 V617Fについて陰性の患者のみが、赤血球増加症を特徴づけるために実際に行う全ての調査を受けることになるからである。赤血球増加症におけるJAK2 V617Fの検出だけでPVの診断が支持されても、骨髄の生検の実施は依然として有効であるが、それは、該生検を行うことで骨髄線維症の兆候または芽球細胞の存在を明らかにすることができ、それによりPVの白血病性形質転換が確認されるからである。しかし、骨髄の生検は、細胞遺伝学的分析とともに、随意的な研究として行われるべきものであると考えられる。

20

30

【0159】

また、30%のET、50%のIMF、そして特徴が明らかにされていない、稀ないくつかのMPDにおいてもJAK2 V617Fが検出され、これにより、異なる臨床所見を伴うMPDの新しいグループを決定した。これらの違いの理由はまだ分かっておらず、共通の生理病理学的原因と異なる表現型とによってこれらの病気を一つの骨髄増殖群にまとめるにはまだ早い。今後の詳しい臨床研究によって、より特定の、PV、ET、IMFおよびJAK2 V617Fを有するその他の稀なMPDの間で共通する兆候が、特に絶対的赤血球増加症、Epoレベル、骨髄線維症そして細胞遺伝学的異常の枠組みで、よりの確に特徴づけられるであろう。したがって、慢性的白血球増加症、血小板増加症および赤血球増加症の診断における最初的手段としてJAK2 V617Fの検出を用いることも考えられる。JAK2 V617Fの存在はMPDグループの新たな定義を可能とするだけでなく、確実に、特異的ターゲティング療法の開発の基礎となるものでもある。

40

【0160】

実施例3: JAK2 V617Fを阻害するがWT JAK2は阻害しない、JAK2 V617F変異に特異的なsiRNA。

【0161】

SEQ ID No 25~27に対応するsiRNA 1、3および4は、HEL系で

50

発現する JAK2 V617F 変異タンパク質を阻害するが、K562 系で発現する野生型 JAK2 タンパク質は阻害しない。結果は図 8、図 9 および図 10 に示している。

【0162】

参考文献

- Andersson, P., LeBlanc, K., Eriksson, B. A., and Samuelsson, J. (1997). No evidence for an altered mRNA expression or protein level of haematopoietic cell phosphatase in CD34+ bone marrow progenitor cells or mature peripheral blood cells in polycythaemia vera. *Eur J Haematol* 59, 310-7. 10
- Asimakopoulos, F.A., Hinshelwood, S., Gilbert, J.G., Delibrias, C.C., Gottgens, B., Fearon, D.T., and Green, A.R. (1997). The gene encoding hematopoietic cell phosphatase (SHP-1) is structurally and transcriptionally intact in polycythemia vera. *Oncogene* 14, 1215-22.
- Casadevall, N., Vainchenker, W., Lacombe, C., Vinci, J., Chapman, J., Breton-Gorius, J., and Varet, B. (1982). Erythroid progenitors in Polycythemia Vera. demonstration of their hypersensitivity to erythropoietin using serum-free cultures. *Blood* 59, 447-451. 20
- Hess, G., Rose, P., Gamm, H., Papadiliris, S., Huber, C., and Seliger, B. (1994). Molecular analysis of the erythropoietin receptor system in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol* 88, 794-802. 30
- Kralovics, R., Guan, Y., and Prchal, J.T. (2002). Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol* 30, 229-36.
- Lecouedic, J.P., Mitjavila, M.T., Villeval, J.L., Feger, F., Gobert, S., Mayeux, P., Casadevall, N., and Vainchenker, W. (1996). Missense mutation of the erythropoietin receptor is a rare event in human erythroid malignancies. *Blood* 87, 1502-11. 40
- Lindauer, K., Loerting, T., Liedl, K.R., and Kroemer, R.T. (2001). Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autorégulation. *Protein Eng* 14, 27-37. 50

- Means, R.T., Krantz, S.B., Sawyer, S., and Gilbert, H. (1989). Erythropoietin receptors in polycythemia vera. *J Clin Invest* 84, 1340.
- Moliterno, A.R., Hankins, W.D., and Spivak, J.L. (1998). Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with Polycythemia Vera. *N Engl J Med* 338, 572-580.
- Moliterno, A.R., and Spivak, J.L. (1999). Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood* 94, 2555-61.
- Pahl, H.L. (2000). Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur J Biochem* 267, 3395-401.
- Pearson (2001). Evaluation of diagnostic criteria in polycythemia vera. *Semin Hematol.* 38, 21-4.
- Roder S, S. C., Meinhardt G, Pahl HL. (2001). STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp Hematol* 29, 694-702.
- Silva, M., Richard, C., Benito, A., Sanz, C., Olalla, I., and Fernandez-Luna, J.L. (1998). Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med* 338, 564-71.
- Temerinac, S., Klippel, S., Strunck, E., Roder, S., Lubbert, M., Lange, W., Azemar, M., Meinhardt, G., Schaefer, H.E., and Pahl, H.L. (2000). Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood* 95, 2569-76.
- Ugo, V., Marzac, C., Teyssandier, I., Larbret, F., Lecluse, Y., Debili, N., Vainchenker, W., and Casadevall, N. (2004). Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in Polycythemia Vera. *Experimental Hematology* 32, 179-187.

【図面の簡単な説明】

【0163】

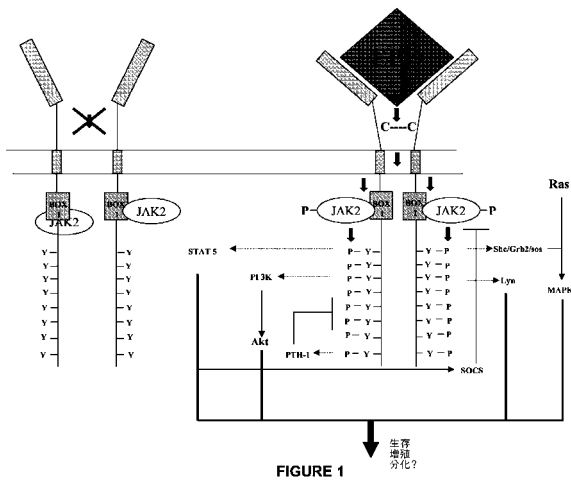
【図1】PVにおけるJAK2の主要な役割を示した図。

【図2】エリスロポエチンの不在下で分化できるPVのCD34+前駆細胞の培養モデルの設定を示した図。

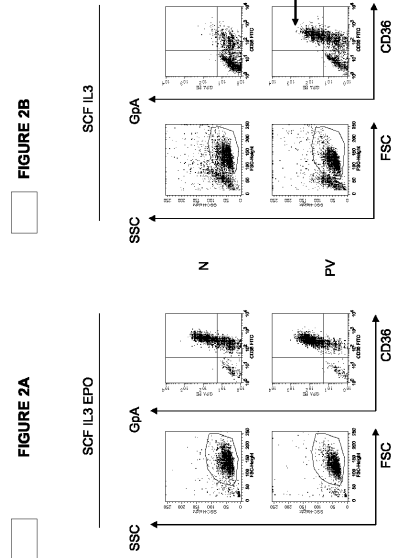
【図3】JAK-STAT、Pi3-KおよびSrcキナーゼ経路の阻害による赤血球の自然発生的な分化の抑制を示した図。

- 【図4】PV前駆細胞におけるJAK2の阻害の手順を示した図。
- 【図5】PV前駆細胞におけるJAK2の阻害の結果を示した図。
- 【図6A】FRETハイブリダイゼーションプロブを用いたLightCycler(登録商標)の融解曲線分析による変異の検出を示したグラフ。
- 【図6B】FRETハイブリダイゼーションプロブを用いたLightCycler(登録商標)の融解曲線分析による変異の検出を示したグラフ。
- 【図6C】TaqMan(登録商標)を用いた対立遺伝子に特異的な増幅による変異の検出を示したグラフ。
- 【図7】赤血球増加症(つまり51%を超えるクリマトクリット値)を診断するために提案する診断シートを示した図。
- 【図8】JAK2 V617Fに特異的なsiRNA(siRNA#1、#3および#4)を示した図。
- 【図9】JAK2 V617Fに特異的なsiRNA(siRNA#1、#3および#4)による処理により減少した、HEL細胞におけるJAK2 V617Fの発現を示した図。
- 【図10】JAK2 V617Fに特異的なsiRNAによる処理によって変化しない、K562細胞におけるWT JAK2の発現レベルを示した図。

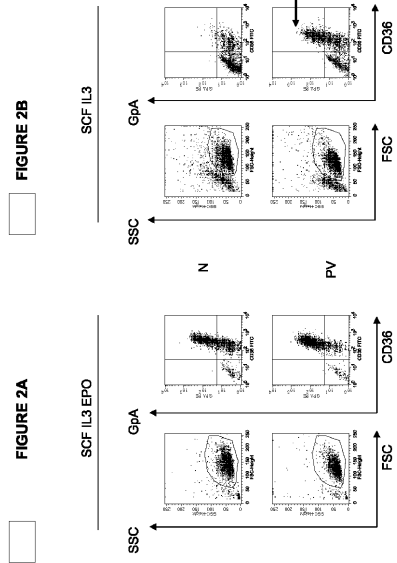
【図1】



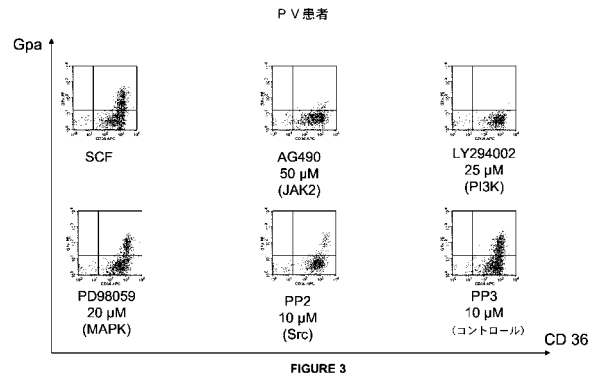
【図2A】



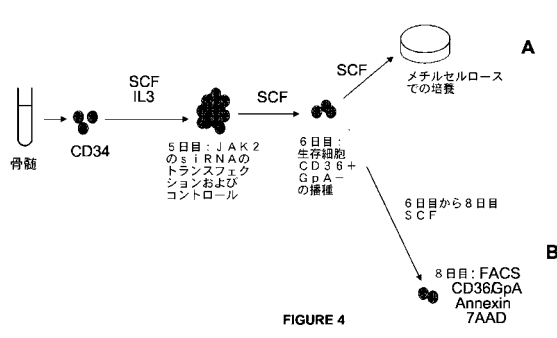
【 図 2 B 】



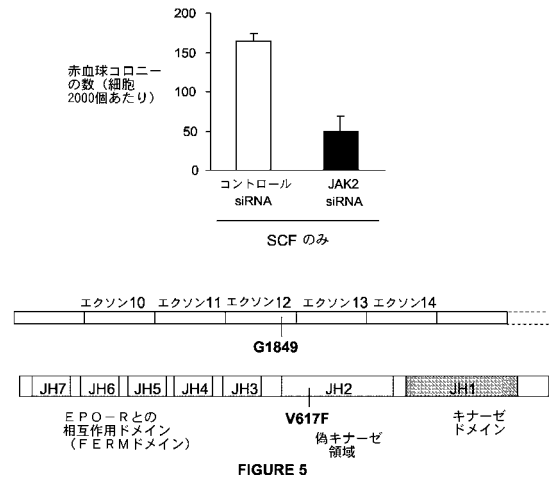
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 A 】

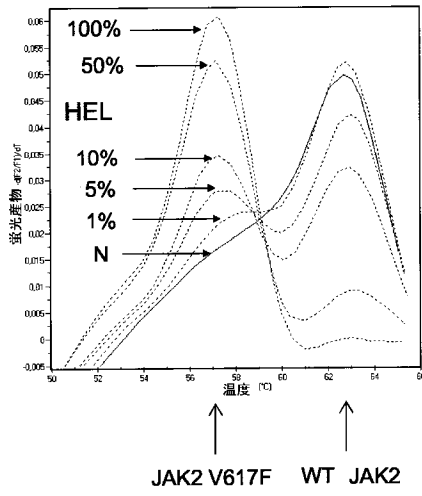


FIGURE 6A

【 図 6 B 】

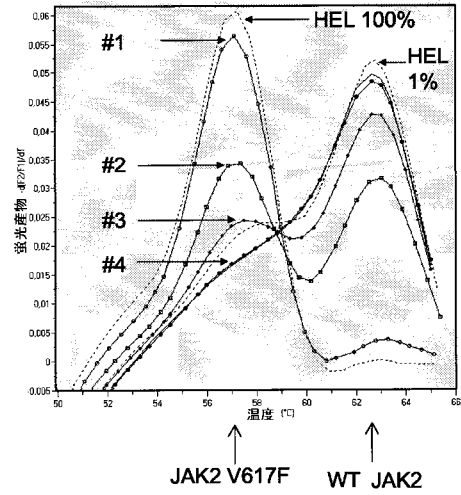


FIGURE 6B

【 図 6 C 】

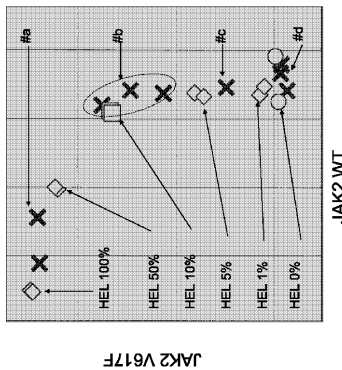


FIGURE 6C

【 図 8 】

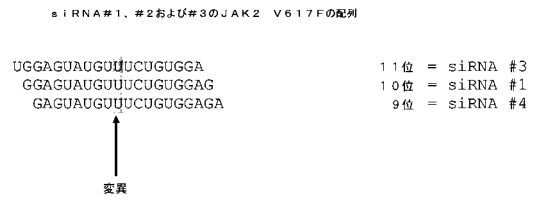


FIGURE 8

【 図 7 】

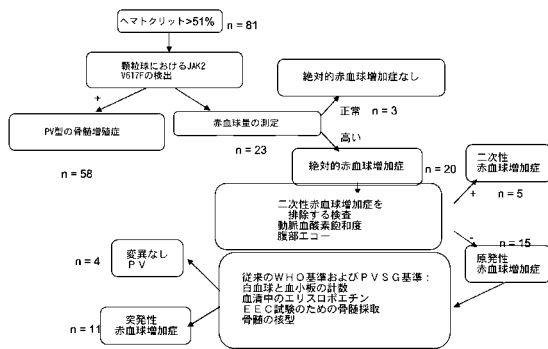


FIGURE 7

【 図 9 】

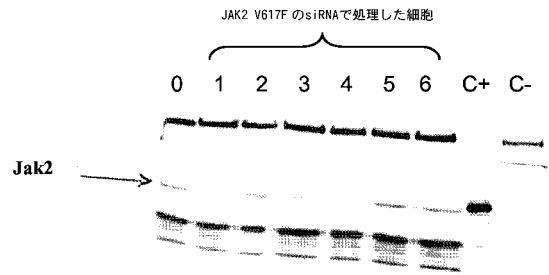


FIGURE 9

【 図 1 0 】

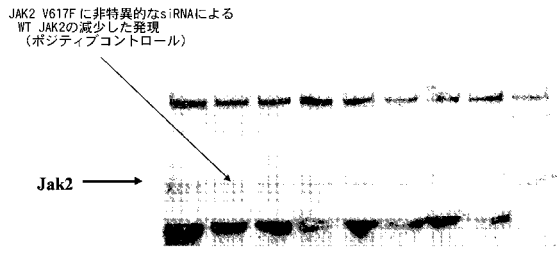


FIGURE 10

【 配 列 表 】

2008517613000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2005/055586

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N9/12 C12Q1/68 G01N33/53		
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) C12N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	DATABASE UniProt 'Online! 7 June 2005 (2005-06-07), "Janus kinase 2." XP002369149 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q506Q0 Database accession no. Q506Q0 the whole document	1-42
P,X	JAMES CHLOE ET AL: "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera" NATURE (LONDON), vol. 434, no. 7037, April 2005 (2005-04), pages 1144-1148, XP002369147 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-42
	----- -/-	
<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 document 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	*Z* 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 22 February 2006	Date of mailing of the international search report 13/03/2006	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Trommsdorff, M	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/055586

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>THE CANCER GENOME PROJECT BAXTER E J ET AL: "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 365, no. 9464, 19 March 2005 (2005-03-19), pages 1054-1061, XP004798459 ISSN: 0140-6736 the whole document</p>	1-42
A	<p>UGO V ET AL: "Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 32, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 179-187, XP002324352 ISSN: 0301-472X the whole document</p>	
A	<p>US 5 914 393 A (COLEMAN ET AL) 22 June 1999 (1999-06-22) the whole document</p>	
A	<p>SALTZMAN ALAN ET AL: "Cloning and characterization of human Jak-2 kinase: High mRNA expression in immune cells and muscle tissue" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 246, no. 3, 29 May 1998 (1998-05-29), pages 627-633, XP002324351 ISSN: 0006-291X the whole document</p>	
A	<p>PAHL H L: "TOWARDS A MOLECULAR UNDERSTANDING OF POLYCYTHEMIA RUBRA VERA" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 267, no. 12, June 2000 (2000-06), pages 3395-3401, XP000982035 ISSN: 0014-2956 the whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/055586

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see supplemental sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplemental sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.

PCT/EP2005/055586

Continuation of Box II.1

Although claims 10-21 relate to a diagnostic method practised on the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the product or composition.

Although claim 32 relates to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the product or composition.

Continuation of Box II.2

Claims No.: -

The current claims 28, 30 and 39-42 relate to a compound characterised by a desirable attribute or property, namely its ability to reduce the expression of the JAK2 V617F variant. The claims encompass all the siRNAs that have this attribute or property, yet the application provides support in the description (Article 612-6 of the French Intellectual Property Code) and/or adequate disclosure (Article 612-5 of the French Intellectual Property Code) for only a very limited number of such compounds. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it does not appear possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Regardless of the above, the claims also lack clarity since they attempt to define the compound in terms of the result which is to be achieved. Again, this lack of clarity is such that it is not possible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. The search was therefore directed only to the siRNAs defined in terms of their structure (see claims 29 and 31).

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, C-VI, 8.5) if the defects that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2005/055586

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5914393 A	22-06-1999	US 6019966 A	01-02-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2005/055586

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE C12N9/12 C12Q1/68 G01N33/53		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N C12Q		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>DATABASE UniProt 'Online! 7 juin 2005 (2005-06-07), "Janus kinase 2." XP002369149 extrait de EBI accession no. UNIPROT:Q506Q0 Database accession no. Q506Q0 le document en entier</p>	1-42
P, X	<p>JAMES CHLOE ET AL: "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera" NATURE (LONDON), vol. 434, no. 7037, avril 2005 (2005-04), pages 1144-1148, XP002369147 ISSN: 0028-0836 le document en entier</p>	1-42
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention	
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément	
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)	*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier	
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	*G* document qui fait partie de la même famille de brevets	
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
22 février 2006	13/03/2006	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Trommsdorff, M	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2005/055586

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>THE CANCER GENOME PROJECT BAXTER E J ET AL: "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders" LANCET THE, LANCET LIMITED. LONDON, GB, vol. 365, no. 9464, 19 mars 2005 (2005-03-19), pages 1054-1061, XP004798459 ISSN: 0140-6736 le document en entier -----</p>	1-42
A	<p>UGO V ET AL: "Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera" EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 32, no. 2, février 2004 (2004-02), pages 179-187, XP002324352 ISSN: 0301-472X le document en entier -----</p>	
A	<p>US 5 914 393 A (COLEMAN ET AL) 22 juin 1999 (1999-06-22) le document en entier -----</p>	
A	<p>SALTZMAN ALAN ET AL: "Cloning and characterization of human Jak-2 kinase: High mRNA expression in immune cells and muscle tissue" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 246, no. 3, 29 mai 1998 (1998-05-29), pages 627-633, XP002324351 ISSN: 0006-291X le document en entier -----</p>	
A	<p>PAHL H L: "TOWARDS A MOLECULAR UNDERSTANDING OF POLYCYTHEMIA RUBRA VERA" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 267, no. 12, juin 2000 (2000-06), pages 3395-3401, XP000982035 ISSN: 0014-2956 le document en entier -----</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2005/055586**Cadre II Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 2 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
voir FEUILLE ANNEXÉE PCT/ISA/210
2. Les revendications n°^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir FEUILLE ANNEXÉE PCT/ISA/210
3. Les revendications n°^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre III Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 3 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prétaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^{os}.
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^{os}.

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

Demande Internationale No. PCT/EP2005 /055586

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre II.1

Bien que les revendications 10-21 concernent une méthode de diagnostic appliquée au corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/a la composition.
Bien que la revendication 32 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/a la composition.

Suite du cadre II.2

Revendications nos.: -

Les revendications 28, 30, 39-42 présentes ont trait à un composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir sa capacité à diminuer l'expression du variant JAK2 V617F. Les revendications couvrent tous les siRNA présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article L.612-6 CPI et/ou un exposé au sens de l'Article L.612-5 CPI que pour un nombre très limité de tels composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative est impossible. En conséquence, une recherche n'a été effectuée que pour les siRNAs définis de façon structurelle (voire revendications 29 et 31).

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II. Si la demande devait être poursuivie dans la phase régionale devant l'OEB, il est rappelé au déposant qu'une recherche pourrait être effectuée durant la procédure d'examen devant l'OEB (voir Directive OEB C-VI, 8.5) à condition que les problèmes ayant conduit à la déclaration conformément à l'Article 17(2) PCT aient été résolus.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2005/055586

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5914393 A	22-06-1999	US 6019966 A	01-02-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 A	4 C 0 8 6
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 4 5 A	
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577 B	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/573 (2006.01)	G 0 1 N 33/573 Z	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

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

(71)出願人 507138952

ユニヴェルシテ ドゥ ヴェルサイユ - サン クァンタン アン イヴェリーヌ
フランス国、 7 8 0 3 5 ヴェルサイユ、リュ・デュ・ルフジュ 2 3

(71)出願人 507139845

ユニヴェルシテ パリ - シュド
フランス国、 9 1 4 0 0 オルセー、リュ・ジョルジュ・クレマンソー 1 5、パティマーン 3
0 0

(74)代理人 100080447

弁理士 太田 恵一

(72)発明者 ヴァンシャンケ、ウィリアム

フランス国、 7 5 0 0 5 パリ、リュ・ジェオフロワ・サン・ヒレール 7

(72)発明者 ウーゴ、ヴァレリー

フランス国、 7 5 0 1 1 パリ、アヴェニュー・レドル・ローラン 1 6 6

(72)発明者 ジャム、クローエ

フランス国、 9 2 1 2 0 モントルージュ、リュ・イポリット・ムーラン 3

(72)発明者 レ クェディック、ジャン - ピエール

フランス国、 7 7 4 2 0 シャンプ・スール・マーヌ、アレー・ポール・エリュアール 1 8

(72)発明者 カザデバル、ニコル

フランス国、 7 5 0 1 3 パリ、リュ・デュ・ジャヴロ 6 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA10 CA04 DA02 EA02 EA04 FA02 GA11 HA11

4B050 CC07 DD07 LL01 LL03

4B063 QA01 QA17 QA19 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25

QS36 QX02

4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA13

4B065 AA90X AA90Y AB01 BA01 CA29 CA46

4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA51 ZA96 ZB21

ZB26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2008517613A5	公开(公告)日	2009-03-05
申请号	JP2007538421	申请日	2005-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	援助狮砖鸦片到巴黎 国家研究所德Rasante埃杜拉尔外壳格哈德·医学酒店CELM 古斯塔夫研究所Cie的 单威赛引用巴黎第十一		
申请(专利权)人(译)	援助Pyuburikku - OPITO巴黎 国家研究所德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (Inserumu) 古斯塔夫研究所 - 渣油 Université电凡尔赛 - 圣关丹安妮Iverinu 巴黎大学 - 南基		
[标]发明人	ヴァンシャンケウィリアム ウーゴヴァレリー ジャムクローエ レクエディックジャンピエール カザデバルニコル		
发明人	ヴァンシャンケ、ウィリアム ウーゴ、ヴァレリー ジャム、クローエ レクエディック、ジャン-ピエール カザデバル、ニコル		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 C12N5/10 C12Q1/68 C12N9/12 G01N33/574 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/53 G01N33/573 A61K31/713 A61P7/00 A61P19/08 A61P35/00 A61P43/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61P7/00 A61P19/08 A61P35/00 A61P43/00 C12N9/1205 C12Q2600/156 G01N33/57426 G01N33/ /57496 G01N2333/91215 G01N2500/04 C12N15/113 C12Q1/6813 C12Q1/6883		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 C12N5/00.B C12Q1/68.A C12N9/12 G01N33/574.A G01N33/543.545. A G01N33/577.B G01N33/53.D G01N33/573.Z A61K31/713 A61P7/00 A61P19/08 A61P35/00 A61P43 /00.105 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024 /FA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B050/CC07 4B050/DD07 4B050/LL01 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063 /QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA29 4B065 /CA46 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA51 4C086/ZA96 4C086/ZB21 4C086/ZB26		
代理人(译)	太田圭一		
优先权	2004011480 2004-10-27 FR		
其他公开文献	JP5090171B2 JP2008517613A		
摘要(译)			

分离的JAK2 (Janus激酶2) 蛋白质是氨基酸617的突变，尤其是突变V617F，其序列存在于SEQ ID No.1中，或其他哺乳动物中的类似序列，是新的。编码变体JAK2 V617F的核苷酸序列尤其是SEQ ID No 2，其具有来自标记转录起始的ATG的1849位的t / g突变。