



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101072870 B

(45) 授权公告日 2013. 01. 30

(21) 申请号 200580042022. 3

G01N 33/53 (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 10. 26

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

CN 1440287 A, 2003. 09. 03, 全文.

0411480 2004. 10. 27 FR

US 2003/0165823 A1, 2003. 09. 04, 全文.

US 5914393 A, 1999. 06. 22, 全文.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 06. 07

Heike L. Pahl. Towards a molecular understanding of polycythemia

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2005/055586 2005. 10. 26

rubra vera. Eur. J. Biochem 267

12. 2000, 267(12), p3395-3401.

(87) PCT申请的公布数据

W02006/045827 FR 2006. 05. 04

Ugo et al.. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. Experimental Hematology 32. 2004, 32p179-187.

(73) 专利权人 巴黎国立医院(AH-HP)

地址 法国巴黎

专利权人 国家健康与医学研究院(INSERM)

古斯塔夫鲁西研究所(IGR)

凡尔赛大学

巴黎十一大

Kawamura et al.. Molecular cloning of L-JAK, a Janus family protein-tyrosine kinase expressed in natural killer cells and activated leukocytes. Proc. Nati. Acad. Sci 91. 1994, 91p6374-6378.

(72) 发明人 威廉·瓦因切克尔 瓦莱丽·于戈

克洛艾·詹姆斯

让-皮埃尔·勒·库埃迪克

妮科尔·卡萨德瓦尔

Saltzman et al.. Cloning and Characterization of Human Jak-2 Kinase: High mRNA Expression in Immune Cells and Muscle Tissue. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 246. 1998, 246p627-633.

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

代理人 顾晋伟 郑斌

审查员 潘天耀

(51) Int. Cl.

C12N 9/12 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 22 页

C12Q 1/68 (2006. 01)

序列表 14 页 附图 11 页

(54) 发明名称

对真性红细胞增多症中 JAK2 突变的鉴定

(57) 摘要

本发明涉及蛋白质酪氨酸激酶 JAK2 的变体 V617F, 所述变体是造成真性红细胞增多症的原因。本发明还涉及用于初步诊断红细胞增多症和血小板增多症的方法, 由此也同样涉及骨髓增生性综合征或者对所述骨髓增生性综合征中的变体 JAK2 V617F 的检测, 从而能够将他们在新的疾病分类学组中重新分类, 并且本发明涉及对特异性抑制剂和 siRNA 的鉴定。

CN 101072870 B

1. 一种包含 617 位氨基酸上突变的分离的 JAK2 蛋白质 (Janus 激酶 2), 其中所述 617 位氨基酸上的突变是由缬氨酸到苯丙氨酸的 V617F 突变, 在以下被称为“JAK2V617F 变体”, 它的序列显示在 SEQ ID No 1 中。

2. 编码根据权利要求 1 的 JAK2V617F 变体的核苷酸序列。

3. 权利要求 2 的核苷酸序列, 其中所述序列是 SEQ ID No 2。

4. 克隆和 / 或表达载体, 其是病毒或质粒载体或者裸 DNA 形式, 其特征在于, 它包含在哺乳动物细胞中的有效的启动子控制下的根据权利要求 2 或 3 的序列。

5. 一种表达根据权利要求 1 的重组 JAK2V617F 变体的哺乳动物细胞。

6. 一种制备表达根据权利要求 1 的重组 JAK2V617F 的非人转基因动物的方法, 其中所述非人转基因动物是通过同源重组或定向重组在其基因组中整合有 JAK2V617F 的编码序列的小鼠或者大鼠。

7. 根据权利要求 6 的方法, 其中所述非人转基因动物是 JAK2V617F/JAK2V617F 纯合体或者 JAK2V617F/JAK2 杂合体, 所述动物出现由 JAK2V617F 诱导的真性红细胞增多症和 / 或骨髓增生综合征。

8. 包含序列 SEQ ID No 3 或 4 的 10 至 30 个连续核苷酸并且包含从标志转录起始的 ATG 开始算起的 t1849 突变核苷酸的探针或者引物。

9. 根据权利要求 8 的探针或引物, 其选自 SEQ ID No 5 至 11 和 12 所示序列。

10. 至少 10 个核苷酸的寡核苷酸, 所述寡核苷酸能够与包含从标志转录起始的 ATG 开始算起的 t1849 突变寡核苷酸的序列 ID No. 4 的 JAK2 基因组 DNA、cDNA 或 mRNA 杂交。

11. 权利要求 10 的寡核苷酸, 其长度为 15 ~ 25 个核苷酸。

12. 特异性地识别 JAK2V617F 变体的单克隆抗体。

13. 产生根据权利要求 12 的抗体的杂交瘤。

14. 一种用于检测肿瘤中 JAK2V617F 变体的试剂盒, 其包含一种或多种引物或探针, 用于特异性地检测 JAK2 基因中 G1849T 突变的存在与否。

15. 权利要求 14 的试剂盒, 其中所述引物或探针为权利要求 8 至 11 中定义的引物或探针。

16. 一种用于确定患者是否患有真性红细胞增多症或涉及 JAK2V617F 变体的任何其它骨髓增生综合征的试剂盒, 其包含一种或多种权利要求 8 至 11 中定义的探针或引物, 用于特异性地检测 JAK2 基因中 G1849T 突变的存在与否。

17. 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述其它骨髓增生综合征选自红细胞增多症、白细胞增多症、血小板增多症或骨髓纤维化症。

18. 根据权利要求 14 至 17 中任一项的试剂盒, 其还包含至少一种选自以下的成分: 用于 PCR 扩增的耐热性聚合酶、一种或多种用于扩增和 / 或杂交步骤的溶液和任何允许检测标记物的试剂。

19. 一种用于确定患者是否患有真性红细胞增多症或涉及 JAK2V617F 变体的任何其它骨髓增生综合征的试剂盒, 其包含根据权利要求 12 的抗体。

20. 一种能够使 JAK2V617F 变体的表达降低超过 50% 或超过 95% 的 siRNA, 其特征在于, 它选自以下序列:

-UGGAGUAUGUUUCUGUGGA (SEQ ID No 29),

-GGAGUAUGUUUCUGUGGAG (SEQ ID No 30), 或

-GAGUAUGUUUCUGUGGAGA (SEQ ID No 31)。

21. 一种用来确定一种或多种化合物对 JAK2V617F 的特异性抑制的体外方法, 其包括以下步骤:

a) 使一种或多种化合物在适于结合和 / 或抑制的条件下与根据权利要求 1 的 JAK2V617F 蛋白质、包含 JAK2V617F 的膜部分、或者根据权利要求 4 的表达 JAK2V617F 的细胞接触, 并且

b) 检测 JAK2V617F 的特异性结合和 / 或抑制。

22. 根据权利要求 21 的体外筛选方法, 其包括对数种分子的连续检测和选择针对 JAK2V617F 的 IC₅₀ 小于 1 μ M 的分子的步骤。

23. 根据权利要求 22 的体外筛选方法, 其中所述针对 JAK2V617F 的 IC₅₀ 小于 100nM。

24. 根据权利要求 22 的体外筛选方法, 其还包括对针对 JAK2 的 IC₅₀ 小于 5 μ M 的分子的负选择。

25. 根据权利要求 24 的体外筛选方法, 其还包括对针对 JAK2 的 IC₅₀ 小于 1 μ M 的分子的负选择。

26. 根据权利要求 21 至 25 任一项的体外筛选方法, 其中通过免疫沉淀法确定 JAK2V617F 磷酸化的抑制作用。

27. 根据权利要求 21 至 26 任一项的体外筛选方法, 其对能够在无促红细胞生成素 (Epo) 条件下进行分化的原代 CD34+JAK2V617F 祖细胞或者对由于 JAK2V617F 变体的引入而已经变成 Epo 非依赖性的细胞系进行。

28. 根据权利要求 21 至 27 任一项的体外筛选方法, 其中应用根据权利要求 5 的细胞。

对真性红细胞增多症中 JAK2 突变的鉴定

技术领域

[0001] 本发明涉及蛋白质-酪氨酸激酶 JAK2 的 V617F 变体,该变体是造成瓦凯红细胞增多症 (Vaquez Polyglobulia) 的原因。本发明还涉及首选用于诊断与骨髓增生性疾病有关的红细胞增多和血小板增多的方法,或者涉及对在新的疾病分类学组中重新分类的骨髓增生性疾病中 JAK2V617F 变体的检测,并且涉及对特定抑制剂和 siRNA 的鉴定。

[0002] 瓦凯红细胞增多症(真性红细胞增多症或 PV)是一种与真正红细胞增多有关的,并经常有血小板增多和白细胞增多的慢性骨髓增生性疾病。它是造血干细胞的克隆性、获得性疾病。PV 的造血祖细胞能够在缺少促红细胞生成素(Epo)的情况下形成成红细胞集落,其被称为“自发性集落”。PV 成红细胞祖细胞对几种另外的生长因子的超敏性也已经表明:白细胞介素-3(IL-3)、粒细胞巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)、干细胞因子(SCF)和胰岛素样生长因子(IGF-1)。几个研究组已经对 PV 的病理生理学产生了兴趣,但是直到今天对该疾病根源的分子异常仍然是未知的(H. Pahl, 2000)。

[0003] PV 祖细胞对几种细胞因子的超敏性导致对涉及细胞因子受体共有的信号转导途径的异常进行研究。在 PV 中从未证实有分子标记物的存在,但是假设在 PV 和另外的骨髓增生性疾病(尤其是 CML)之间存在相似性,看起来可能与由 Bcr-Abl 引起的那些分子机制近似的分子机制是造成恶性克隆的显著增殖和它的终末分化的原因。该假设最近在两种稀少的骨髓增生性疾病中被证实,即与涉及 8p11 染色体区易位有关的骨髓增生性疾病,其引起 FGF 受体的组成性活化,和嗜伊红细胞增多症,其中隐藏性染色体的缺失产生嵌合体基因 PDGFR α -FIP1L1。在这两种情况中,分子异常是引起具有组成性酪氨酸激酶活性的融合蛋白质的原因。

[0004] 已经发现在 PV 中没有再发性细胞遗传异常,即使在 10~15% 患者中检测到 20q 缺失,和约 30% 的 9p 杂合性损失的病例(Kralvics, 2002)中也是如此。然而,这些异常并不是所述疾病所特有的。

[0005] 因为 PV 细胞是非 Epo 依赖性的,所以已经进行了对 Epo 受体(R-Epo)途径的研究。首先,受体在结构上和功能上都是正常的(Hess et al, 1994; Le Couedic et al, 1996; Means et al, 1989)。当 Epo 刺激终止时使 R-Epo 和 JAK2 脱磷酸的 SHP-1 磷酸酶正常地在 RNA 和蛋白质水平上表达(Andersson et al, 1997; Asimakopoulos et al, 1997)。在 R-Epo 信号传导的较低下游处,已经在表现出 PV 的患者的多核嗜中性粒细胞(PNN)研究了 STAT5 的不正常活化,但是还没有发现异常。另一方面,在 14 例被检查的 4 例 PV 中,已经在 PNNs 中证明了 STAT3 的组成性磷酸化作用(Roder, 2001)。最后,已经以免疫组织化学方法并通过流式细胞仪研究了抗凋亡蛋白质 bcl-x1(STAT5 的转录靶)的表达(Silva et al, 1998)。已表明 bcl-x1 在 PV 成红细胞中被超表达,在该蛋白质正常地不再被表达的较成熟的阶段时尤其如此。

[0006] 在瓦凯红细胞增多症中,当前主要的诊断标准是临床用标准(PVSG 标准: Pearson, 2001)。生物学诊断基本上是基于在缺少 Epo 的情况下祖红细胞的生长培养物(检测内源性集落)。由于其准确实施所需的必要专业知识和所需的实质“技术人员耗时

(technician-time)”,该检验不是在每个中心都可以应用,并且只有在通过有经验的实验室进行实施时才是可靠的。此外,为了获得良好的灵敏度,该检验需要来自患者的髓细胞,这对于患者来说是令人厌烦的过程。

[0007] 应用消减式杂交技术,一个德国小组已经克隆了一种在 PV 的 PNNs 中超表达的基因,其被称为 PRV1(真性红细胞增多 1)(Temerinac et al,2000)。PRV-1 蛋白质属于 uPAR 表面受体超家族。在 PV 多核嗜中性粒细胞中,编码 PRV-1 的 mRNA 的超表达能很容易地通过实时 RT-PCR 被检测到;并且形成最近发现的、没有病理生理学作用的疾病标记物。然而,最近出版的研究表明它既不是非常灵敏的也不是非常特异性的。

[0008] Spivak JL et al 在 2003 年(“Chronic myeloproliferative disorder”; Hematology,2003;20024)描述了某些 PV 标记物。嗜中性粒细胞抗原 NBI/CD177 的 mRNA 在 PV 患者的粒细胞中被过表达。然而该标记物似乎不是检测 PV 的可靠手段,某些患者没有显示出这样的过表达或者可能在患有不同于瓦凯红细胞增多症的骨髓增生性疾病中观察到这样的过表达。血小板生成素(thrombopoitin)受体 Mp1 在血小板上的表达降低也在 PV 中被发现。尽管该异常在 PV 中是最显著的,但是它在另外的骨髓增生性疾病中也有发现。另外,它是一种实施起来很困难并且只能在专门的实验室中实施的检验。

[0009] 因此,在本领域内,不存在提供 PV 可靠诊断的方法。另外,唯一可用的治疗方法不是特异性的。这些涉及静脉切开术以维持红细胞比容处于正常的限度内,或者应用细胞毒性剂或者 IFN。

[0010] 根据本发明,我们不但在大约 90%所检验的患者中发现了 JAK2 基因中的突变,而且我们证明了该突变是造成这种酪氨酸激酶组成性活化的原因,以及还显示出它的抑制使其有可能用来阻断 PV 成红细胞的自发性增殖和分化。

[0011] JAK2 属于 Janus 激酶(JAK)家族,该家族集合了几种胞质内酪氨酸激酶:JAK1、JAK2、JAK3 和 TYK2。JAK 蛋白质涉及许多没有内在酪氨酸激酶活性的膜受体的细胞内信号,如同细胞因子受体超家族的某些成员,尤其是 Epo 受体(R-Epo)。JAK2 蛋白由包含 23 个外显子的基因编码。互补 DNA 的大小为 3500 个碱基对并且编码 1132 个氨基酸(130kd)的蛋白质(图 1)。应用 PCR 和测序方法,我们已经确定在大约 90%患有 PV 的患者中,在 JAK2 的外显子 12 中有克隆的、获得性的点突变。正常地编码缬氨酸(V)的“GTC”617 密码子突变成为编码苯丙氨酸(F)的“TTC”。这样的 V617F 突变在 25 个对照或者经检验患有继发性红细胞增多症的患者中没有被发现。另一方面,它在 40%的特发性血小板增多(essential thrombocytaemias)和 50%的骨髓纤维化(myelofibroses)中被发现,这意味着这种突变以与 Bcr-Abl 定义慢性髓性白血病(myeloid leukaemia)相同方式定义了新的骨髓增生性疾病框架。

[0012] 为了检验本发明的变体 JAK2V617F 是否能够用在血液学诊断实验室中常规广泛应用的设备进行有效的检测,我们分析了 119 个来自怀疑患有骨髓增生性疾病的患者的样本。我们已经证明可以通过 Light **Cycler**[®]和 **TaqMan**[®]技术对 JAK2V617F 进行有效的检测,这些技术比测序具有稍微较高的灵敏性。我们随后在 88 名红细胞比容水平在 51%之上的患者中评估 JAK2V617F 作为首选诊断检验的检测价值,并且这显示出所述突变根据 WHO 标准(R = 0.879)和 PVSG 标准(R = 0.717)符合 PV 诊断并且在红细胞增多症的情形下具有 100%的阳性预测值。在此数据的基础上,我们建议应该将在粒细胞中对 JAK2V617F

的检测作为对患有红细胞增多的患者的首选诊断检验,由此避免红细胞量测量、骨髓操作和内源性红细胞系集落形成的体外分析。这样的检测也可以首选扩及到所有的骨髓增生性疾病或它们的疑似存在。这样的检测对慢性血小板增多症将是尤其重要的,因为没有确定的生物学检验可用于确定骨髓增生性疾病。在有关骨髓纤维化症的诊断中和在对于与未确定病原学的血栓症有关的临床现象中,它将同样是一种重要的检测。

[0013] 因此,本发明首次提供了对于与所述突变有关 PV 和骨髓增生性疾病的诊断工具并且开创了靶向治疗这些疾病的道路。更具体地说,我们建议将对 JAK2 V617F 突变的检测作为红细胞增多症的首选诊断检验,这就有可能避免在大部分患者和慢性血小板增多症中对红细胞量和红细胞系内源性集落 (EEC) 的定量测定以及骨髓检验,由此避免冗长的病原学调查。

发明内容

[0014] 由此,根据第一特征,本发明涉及分离的蛋白质 JAK2 (Janus 激酶 2),尤其是人 Janus 激酶 2 蛋白质 (NCBI, 登记号 NM_004972 ;G1 :13325062),其在 617 位氨基酸上包含突变 (cDNA 从 ATG 起始的密码子 617),更具体说是 V617F 突变,在下文中称为变体 JAK2V617F,例如包含突变的如下 SEQ ID No 1 中所示序列:

[0015] SEQ ID No 1

[0016] (V617F 人 Janus 激酶 2 或 JAK2V617F)

[0017] MGMACLTMTMEGTSTSSIQNGDISGNANSMKQIDPVLQVYLYHSLGKSEAD
 [0018] YLTFPSGEYVAEEICIAASKACGITPVYHNMFALMSETERIWYPPNHVFHIDEST
 [0019] RHNVLIRIRFYFPRWYCSGSNRAYRHGISRGAEAPLLDDFVMSYLFAQWRHDF
 [0020] VHGWIKVPVTHETQEECLGMAVLDMMRIAKENDQTPLATYNSISYKTFLPKCIR
 [0021] AKIQDYHILTRKRI RYRFRRFIQQFSQCKATARNLKLKYLINLETLSAFYTEKF
 [0022] EVKEPGSGPSGEEIFATIIITGNGGIQWSRGKHKESETLTEQDLQLYCDFPNIIDVS
 [0023] IKQANQEGSNESRVVTIHKQDGNLEIELSSLREALSFVSLIDGYRRLTADAHHY
 [0024] LCKEVAPPVLENIQSNCHGPI SMDFAISKLKKAGNQTGLYVLRCSPKDFNKYF
 [0025] LTF AVERENVIEYKHCLITKNENEYNSLGT KKNFSSLKDLLNCYQMETVRSDN
 [0026] IIFQFTKCCPPKPKDKSNLLVFR TNGVSDVPTSP TLQRPTHMNQMV FHKIRNEDL
 [0027] IFNESLGQGTFTKIFKGV RREVG DYGQLHETE VLLKVL DKAHRN YSE SFFEAAS
 [0028] MMSKLSHKHLVLNYGVC⁶¹⁷CGDENILVQEFVKFGSLDTYLLKKNKNCINILWK
 [0029] LEVAKQLAWAMHFLEENTLIHG NVCAKNILLI REEDRKTGNPPFIKLSDPGISIT
 [0030] VLPKDILQERIPWVPPECIENPKNLN LATDKWSFGTTLWEICSGGDKPLSALDSQ
 [0031] RKLQFYEDRHQLPAPKWAELANL INNCMDYEPDFRPSFRAIIRDLNSLFTPDYE
 [0032] LLTENDMLPNMRIGALGFSGAFEDRDPTQFEERHLKFLQQLGKGNFGSVEMCR
 [0033] YDPLQDNTGEVVAVKKLQHSTEEHLRDFEREIEILKSLQHDNIVKYKGCYSAG
 [0034] RRNLKLIMEYLPYGSLRDY LQKHKERIDHIKLLQYTSQICKGMEYLGTKRYIHR
 [0035] DLATRNLVENENRVKIGDFGLTKVLPQDKEYYKVKEPGESPIFWYAPESL TES
 [0036] KFSVASDVWSFGVVLYELFTYIEKSKSPPAEFMRMIGNDKQGMIVFHLIELLK
 [0037] NNGRLPRPDGCPDEIYMIMTECWNNNVNQ RPSFRDLALRVDQIRDNMAG

[0038] 本发明还涉及其它哺乳动物中在 617 位上具有突变的这种蛋白质的等同物,例如在大鼠 (NM_031514)、猪、鼠科 (NM-008413) 哺乳动物等中的 JAK2 V617F,以及还包含了不影响所述变体的活性和 3D 结构的一个或多个改变的 SEQ ID No 1 变体。

[0039] 本发明还涉及编码 SEQ ID No 1, 优选 SEQ ID No 2 (在密码子 617 上具有 TTC 密码子而非 GTC 的人 JAK2 基因序列 (在从标志翻译起始的 ATG 开始的 1849 位处具有 g/t 突变,在下文中被称为 G1849T) 的核苷酸序列。

[0040] 该序列可以存在在病毒或质粒载体中,或者是在哺乳动物细胞中有效启动子控制下的裸 DNA。本发明由此扩及到表达 JAK2 V617F 蛋白质的载体。

[0041] 本发明的载体可以是克隆和 / 或表达载体,并且可以用来转染宿主细胞,尤其是哺乳动物细胞,优选人 CD34+ 祖细胞。

[0042] PV 和其它骨髓增生性疾病的转基因动物模型

[0043] 本发明还涉及表达重组 JAK2 V617F 的非人转基因动物。该动物可以优选小鼠或大鼠。能够被用作模型的转基因大鼠或小鼠可通过本领域技术人员常规应用的任何方法获得,尤其是在 ES 细胞中通过应用 Cre-LoxP 或 FLP-FRT 系统的同源重组或定向重组的基因敲入方法 (序列的靶向插入) 所获得的。根据本发明的一个优选实施方案,通过 JAK2G1849T 变体在宿主细胞基因组的一个或多个序列上的基因打靶来获得本发明的转基因细胞。更明确地说,转基因通过同源重组以稳定的方式插入宿主细胞基因组内的同源序列处。当以产生转基因动物为目的期望获得转基因细胞时,宿主细胞优选胚胎干细胞 (ES 细胞) (Thompson et al, 1989)。基因打靶是通过应用与被靶向的内源序列具有序列同源性的外源 DNA 序列的同源重组对染色体基因座进行的定向修饰。有不同类型的基因打靶类型。在此,更具体地是可以基因变体 JAK2 G1849T 或任何其它遗传相似变体通过基因打靶来置换野生型 JAK2 基因。在此情况下,基因打靶被称为“敲入”(K-in)。可选择地,基因打靶可被用来降低或消除野生型 JAK2 的表达,插入 JAK2 变体基因。这是被称为“敲出”的基因打靶 (KO) (见 Bolkey et al, 1989)。本发明的细胞的特征在于,转基因被稳定地整合于所述细胞的基因组中,并且通过内源基因的调节元件控制它的表达。稳定的整合表示转基因插入本发明的细胞的基因组 DNA 中。由此插入的转基因随后遗传给细胞后代。转基因的整合是在靶 JAK2 内源基因的上游、下游或中央发生的。任选地,可以使用一种或多种正或负选择基因。也可以应用靶基因座的 DNA 同源区域,优选总共两个 DNA 同源区域,其位于报道基因部分的任一侧或整个待插入序列的任一侧。“DNA 同源区”的意思是在最优排列和比对之后,通常至少约 90% 至 95% 的核苷酸,优选至少 98% 至 99.5% 的核苷酸一致的两种 DNA 序列。用于比对的序列最佳排列可以应用 Smith-Waterman 局部同源性算法 (1981)、Neddleman-Wunsch 局部同源性算法 (1970)、Pearson 和 Lipman 的相似性搜索方法 (1988)、或使用这些算法的计算机软件 (GAP、BESTFIT、BLAST P、BLAST N、FASTA 和 TFASTA,它们在 Wisconsin Genetics Software Package 中, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)。尽管 100% 同源性的少至 14bp 序列就足以在细菌和哺乳动物细胞中实现同源重组,优选较长部分的同源序列 (对于同源序列的各个部分,通常这些部分的大小是至少 2000bp, 优选至少 5000bp)。有利地是, JAK 变体序列被插入确保内源型调控的元件组中,即至少包含内源 JAK 基因的启动子、调节序列 (增强子、沉默子、绝缘子) 和终止信号的组。

[0044] 根据一个具体的实施方案,转基因 JAK G1849T 至少包含编码序列、正选择盒 (无

论是否侧翼有重组酶作用特异性的位点),例如 Lox/Neo-TK/Lox 盒或 lox/Neo/lox 或 FRT/Neo-TK/FRT 或 FRT/Neo/FRT 盒,其也有可能存在于所述序列的 5' 位置,其特征在于,负选择盒(例如包含 DTA 和 / 或 TK 基因)至少存在于所述转基因的一个末端。本发明的转基因优选直接来源于天然存在于动物细胞内的外源 DNA 序列。可通过例如克隆所需限制性位点的插入和 / 或通过位点特异性重组位点(lox 和 flp 序列)的插入改变这种天然形式的 DNA 序列。

[0045] 为此目的, JAK2G1849T 变体能够在确保其在宿主细胞中增殖的克隆载体中克隆,和 / 或任选地在表达载体中克隆来确保转基因的表达。用来构建本发明的克隆和 / 或表达载体的重组 DNA 技术对于本领域的技术人员是公知的。只用标准技术来克隆、DNA 分离、扩增和纯化;涉及 DNA 连接酶、DNA 聚合酶、限制性内切酶的酶促反应依照生产商的使用说明实施。这些技术和另外的技术通常根据 Sambrook et al, 1989 来实施。所述载体包括质粒、粘粒、噬菌体、逆转录病毒和其它的动物病毒、人工染色体例如 YAC、BAC、HAC 和另外的类似载体。

[0046] 用于产生本发明转基因细胞的方法在 Gordon et al, 1989 中有描述。Keon et al, 1990 对各种用于转染哺乳动物细胞的技术进行了综述。使用标准方法例如显微注射入核的方法例如 (US 4, 873, 191)、通过磷酸钙沉淀、脂质转染、电穿孔的转染 (Lo, 1983)、热激、应用阳离子聚合物 (PEG-聚凝胶 (polybrene)、DEAE-葡聚糖等) 的转化或病毒感染 (Van der Putten et al, 1985) 能够将任选地包含于线性化或非线性化载体中的、或载体片段形式的本发明的转基因插入宿主细胞中。

[0047] 当细胞已经被转基因转化后,它们可以在体外进行培养或者另外地被用来产生非人的转基因动物。在转化之后,细胞被接种在营养层上和 / 或适合的培养基中。使用选择性培养基能够检测含有构建体的细胞。在足够允许集落生长的一段时间后,接下来对它们进行收集并分析以确定是否同源重组事件和 / 或构建体的整合已经发生。为了筛选可能发生了同源重组的克隆,可以将被称作选择性基因的正和负标记物插入同源重组载体中。对于选择发生同源重组事件的细胞的不同系统已经有过描述(参见 US 5627059)。本发明的所述正选择基因优选选自抗生素抗性基因。对于所述抗生素的非详尽名单包括新霉素、四环素、氨基青霉素、卡那霉素、腐草霉素、博来霉素、潮霉素、氯霉素、羧苄青霉素、遗传霉素 (geneticine)、嘌呤霉素。对于本领域的技术人员而言,相应于这些抗生素的抗性基因是公知的;作为一个实例,对于新霉素的抗性基因使得细胞对存在于培养基中的 G418 抗生素具有抗性。正选择基因也可以选自 HisD 基因,其相应的选择剂是组氨酸。正选择基因也可以选自鸟嘌呤-磷酸核糖转移酶 (GpT) 基因,其相应的选择剂是黄嘌呤。正选择基因也可以选自次黄嘌呤-磷酸核糖转移酶基因 (HPRT),其相应的选择剂是次黄嘌呤。允许用来鉴定同源重组事件的选择标记物随后可以影响基因表达,并且如果需要的话可以使用特异性位点重组酶例如对 Lox 位点具有特异性的 Cre 重组酶 (Sauer, 1994; Rajewsky et al, 1996; Sauer, 1998) 或者对 FRT 位点具有特异性的 FLP 重组酶 (Kilby et al, 1993) 将其去除。

[0048] 通过 Southern 印迹分析和 / 或 PCR 技术鉴别阳性集落,即包含已发生至少一个同源重组事件的细胞的集落。在所分离的细胞或本发明的转基因动物的细胞中,相应于转基因的 mRNA 的表达水平也可以通过包括 Northern 印迹分析、原位杂交分析、RT-PCR 在内的技术进行确定。同样地,可以使用针对报道蛋白的抗体鉴定表达转基因的细胞或动物组织。随

后可以应用阳性细胞实施胚胎处理步骤,尤其是将通过同源重组修饰的细胞注射入胚胎。

[0049] 对于小鼠,所述胚胎是从4-6周超排卵的雌性小鼠中获得的。将所述细胞胰蛋白酶化,并且将经过修饰的细胞注射入胚胎的囊胚腔。注射后,将胚胎插入假孕雌性动物的子宫角。随后让雌性动物达到妊娠期满,并且对所获得的后代进行分析以确定含有构建体的突变细胞的存在。分析新生胚胎细胞和胚胎细胞或ES细胞之间的不同表型使得检测嵌合的新生体成为可能。接下来饲养嵌合性胚胎直到成年期。嵌合体或嵌合性动物是其中只有细胞亚群包含已改变的基因组的动物。使具有经修饰的基因的嵌合性动物相互之间进行杂交或者与野生型动物杂交,从而获得杂合的或纯合的后代。随后将雄性和雌性杂合体进行杂交以产生纯合的动物。除非有另外的指示,本发明的非人转基因动物在种系细胞的核苷酸序列中包含稳定的变化。

[0050] 根据本发明的另一个实施方案,本发明的非人转基因细胞可以被用作核的转移 (transfer of a nucleus) 的核供体细胞,或者说核转移 (nuclear transfer) 的核供体细胞。核转移是表示将核从脊椎动物、生物体的成体或胎的活供体细胞转移到同种或不同种的摘除了细胞核的受体细胞的细胞质中。转移的核被重编程 (reprogrammed) 以指导克隆胚胎的发育,随后可以将该胚胎转移到代孕雌性动物从而产生胎儿和新生儿,或者能够用该胚胎在培养物中生产内细胞群 (inner cell mass) 的细胞。可以应用不同的核克隆技术;在这些技术中,对其非详尽的描述可以参照专利申请 WO 9517500、WO 97/07668、WO 9707669、WO 9830683、WO 9901163 和 WO 9937143。

[0051] 因此,本发明也扩及到包含编码 JAK2 V617F 的重组序列的非人转基因动物。这些动物可以是纯合体或杂合体 (JAK2 V617F/JAK V617F 或 JAK2 V617F/JAK2)。具体而言,这些动物出现瓦凯红细胞增多症,而且出现由 JAK2 V617F 诱导的任何骨髓增生性疾病。因此它们能够用来实施酪氨酸激酶抑制剂的筛选,尤其是筛选对 JAK2 V617F 有特异性的抑制剂。

[0052] 另一个可选实施方案是将能够表达 JAK2 V617F 变体的病毒载体 (逆转录病毒或慢病毒或另外的病毒) 注射入造血干细胞、祖细胞或 ES 细胞,也以生产瓦凯红细胞增多症或另外的骨髓增生性疾病模型为目的。

[0053] 诊断工具

[0054] 根据第三特征,本发明涉及在患有或可能表现出骨髓增生性疾病的哺乳动物中,尤其是在表现有红细胞增多症的患者和被怀疑具有瓦凯红细胞增多症、血小板增多 (thrombocytaemia) 和/或骨髓纤维化症状的患者中用来检测 JAK2 V617F 突变存在与否的诊断工具。

[0055] 在这个方面,本发明涉及用于检测上述 SEQ ID No 2 序列中所述突变的存在与否的引物和探针。更具体地,本发明涉及分离的核酸,其具有外显子 12 中或者下述序列 SEQ ID No 3 或 No 4 中至少 10、12、15、20、30、40 或 50 个连续核苷酸 (例如 10 到 30 个核苷酸或 10 到 25 个核苷酸) 的序列,并且包含突变的 t¹⁸⁴⁹ 核苷酸,例如 10 到 30 个核苷酸。

[0056] SEQ ID No 3

[0057] ctcatatgaaccaaagtgtgtttcacaaaatcagaaatgaagatttgatatttaatgaaagccttgccc
aaggcactttttacaaag

[0058] atttttaaaggcgtacgaagagaagtaggagactacgggtcaactgcatgaaacagaagttcttttaaaa

gttctggataaagcac

[0059] acagaaactattcagagtctttctttgaagcagcaagtatgatgagcaagctttctcacaagcatttgg
ttttaattatggagtatg

[0060] tt¹⁸⁴⁹tctgtggagacgagaatattctggttcaggagtttgtaaatttggatcactagatacatatctg
aaaaagaataaaaatt

[0061] gtataaatatattatggaaacttgaagttgctaaacagttggcatgggccatgcattttctagaagaaa
acacccttattcatggga

[0062] atgtatgtgccaaaaatattctgcttatcagagaagaagacaggaagacaggaatcctcctttcatca
aacttagtgatcctgg

[0063] cattagtattacagttttgccaaggacattcttcaggag

[0064] 加下划线的序列指出可用于设计对 1849 位 (SEQ ID No 4) 突变特异的探针或引物的上游或下游区域实例。

[0065] 本发明的不同优选引物和探针的实例

[0066] 关于 DNA 的 PCR 引物：

[0067] JAK2EXON12-PCR_F 有义 5' -GGGTTTCCTCAGAACGTTGA-3' (54804-54823) (SEQ ID No 5)

[0068] JAK2EXON12-PCR_R 反义 5' -TTGCTTTCCTTTTTCACAAGA-3' (55240-55260) (SEQ ID No 6)

[0069] 关于 DNA 的测序引物：

[0070] JAK2EXON12SEQ_F 有义 5' -CAGAACGTTGATGGCAGTTG-3' (54813-54832) (SEQ ID No 7)

[0071] JAK2EXON12SEQ_R 反义 5' -TGAATAGTCCTACAGTGTTCAGTTT-3' (55207-55233) (SEQ ID No 8)

[0072] 关于 cDNA 的 PCR 和测序引物：

[0073] 有义 5' -CAACCTCAGTGGGACAAAGAA-3' (1386-1407) (SEQ ID No 9)

[0074] 反义 5' -GCAGAATATTTTGGCACATACA-3' (2019-2041) (SEQ ID No 10)

[0075] SNP 探针和突变的检测和 siRNA (1829-1870)：

[0076] TTTTAAATTATGGAGTATGTGTCTGTGGAGACGAGAATATTC (SEQ ID No 11)

[0077] 在 LightCycler 上的基因型分型 (PNN 或髓的 DNA)：

[0078] 寡聚“S”(有义)GGCAGAGAGAATTTTCTGAAC (SEQ ID No 15)

[0079] 寡聚“R”(反义)GCTTTCCTTTTTCACAAGATA (SEQ ID No 16)

[0080] 传感体 (sensor) wt GTCTCCACAGACACATACTCCATAA3' -FL (SEQ ID No 17)

[0081] 锚定体 (anchor) JAK25' -LCRed640AAAACCAAATGCTTGTGAGAAAGCT 3' -PH (SEQ ID No 18)

[0082] 在 LightCycler 上的基因型分型 (例如血小板的 cDNA)：

[0083] cJAK2FGCACACAGAACTATTCAGAGTC (SEQ ID No 19)

[0084] cJAK2SAGCAGCAAGTATGATGAGC (SEQ ID No 20)

[0085] cJAK2ACTAGTGATCCAAATTTTACAACT (SEQ ID No 21)

[0086] cJAK2RGTTTtagcaacttcaagtttcc (SEQ ID No 22)

[0087] 传感体 (sensor) wt GTCTCCACAGACACATACTCCATAA3' -FL (SEQ ID No 23)

[0088] 锚定体 (anchor) JAK2 5' -LC

[0089] Red640AAAACCAAATGCTTGTGAGAAAGCT 3' -PH (SEQ ID No 24) 应用 TaqMan 技术进行基因型分型 (例如对于骨髓单核细胞的 DNA) 应用等位基因和单链 DNA 特异性荧光探针进行识别。

[0090] PCR 反应

[0091] 引物序列有义 : AAGCTTTCTCACAAGCATTTGGTTT (SEQ ID No 25)

[0092] 引物序列反义 : AGAAAGGCATTAGAAAGCCTGTAGTT (SEQ ID No 26)

[0093] 报道基因 1 序列 (VIC) : TCTCCACAGACACATAC (SEQ ID No 27)

[0094] 报道基因 2 序列 (FAM) : TCCACAGAAACATAC (SEQ ID No 28)

[0095] 根据另外的特征, 本发明涉及检测样本中 JAK2V617F 突变存在与否的体外或离体诊断方法。

[0096] 应用本发明核酸的检验

[0097] 在第一实施方案中, 通过分析 JAK2 基因的核酸分子能够检测 G1849T 变体 (相应于 JAK2V617F 突变)。在本发明的范围内, “核酸”的意思表示 mRNA、基因组 DNA 或源自 mRNA 的 cDNA。

[0098] 利用特异性探针和特异性引物, 例如上述探针或引物 : 源自 SEQ ID No 3 或 4 和 SEQ ID No 5 到 11、或进一步 SEQ ID No 15 到 24 的序列, 通过测序、扩增和 / 或杂交能够检测 G1849T 变体核酸的存在与否。

[0099] 本发明因此提出了确定采自患有 PV 或者可能发展成 PV 或者任何其它骨髓增生性疾病患者 (尤其红细胞增多症、血小板增多和骨髓纤维化疾病) 的样本中 JAK2 基因的 G1849T 变体存在与否的离体或者体外的方法, 该方法包括以下步骤 :

[0100] a) 从患者获取核酸样本,

[0101] b) 在所述核酸样本中检测 JAK2 基因的 G1849T 变体的存在与否。其特征在于, G1849T 变体的存在是 PV 或任何其它骨髓增生性疾病的指示。

[0102] 可以从任何细胞来源或组织的活组织检查中获得核酸样本。这些细胞必须是造血起源的并且可以从循环血、从造血组织或任何被血细胞污染的流体中获得。能够应用本领域公知的方法例如描述于 Sambrook et al (1989) 的方法提取 DNA。也能够从例如在活组织检查期间获得的组织中应用本领域技术人员众所周知的标准方法, 例如应用 guanidiumthiophenate- 苯酚 - 氯仿的提取方法分离 RNA。

[0103] JAK2 基因的 G1849T 变体可以在 RNA 或 DNA 样本中检测, 优选在扩增之后进行。例如, 分离的 RNA 能够进行逆转录接着进行扩增, 例如应用突变位点特异性寡核苷酸的 RT-PCR 反应或者允许包含突变的区域, 例如外显子 12 或序列 SEQ ID No 3 或 4 扩增的。在本文中词语“寡核苷酸”被用来指定至少 10 个核苷酸, 优选 15 ~ 25 个核苷酸, 优选少于 100 个核苷酸的核酸, 其能够与 JAK2 的基因组 DNA, 与 cDNA 或 mRNA 杂交。

[0104] 本发明的寡核苷酸可以应用本领域技术人员任何公知的技术进行标记, 例如放射性的、荧光的或酶的标记物。经标记的寡核苷酸可以被用作探针来检测 JAK2 基因的 G1849T 变体的存在与否。

[0105] 因此, 在本发明中应用的探针和引物是与 JAK2 基因中 1849 位核苷酸 (从标记转

录起始的 ATG 开始计数) 附近区域特异性杂交的探针和引物。

[0106] 在上面说明的方法中, 在对等位基因变异进行检测之前, 所述核酸可以经 PCR 进行扩增。用于检测等位基因变异的方法在例如“MolecularCloning-A Laboratory Manual” Second Edition, Sambrook, Fritsch and Maniatis (CoId Spring Harbor Laboratory, 1989) 和 Laboratory Protocols for Mutation Detection, Ed. U. Landegren, Oxford University Press, 1996 以及 PCR, 2nd edition by Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997 中有描述。

[0107] 在这点上可以组合扩增步骤与接下来的允许在样本之间辨别有关变体存在与否的检测步骤。

[0108] 适于该目的的不同技术在 EP 1186672 中有描述, 例如 DNA 测序、经 SSCP 的测序、DGGE、TGGE 杂交、异源双链体分析、CMC、酶错配切割、基于固相杂交的杂交、DNA 芯片、Taqman™ 杂交相溶液 (US 5210015 和 US 5487972) 和 RFLP 技术。

[0109] 可以应用不同的可选择方法实施检测: FRET、荧光猝灭、偏振荧光 (polarised fluorescence)、化学发光、电-化学发光、放射性法和比色法。

[0110] 本发明的方法可以包括或者排除获取样本并从所述样本提取核酸的步骤。

[0111] 如上所示, 应用的样本可以是个体获得的血液或任何其它体液或组织。在核酸提取和纯化步骤之后, 应用上述引物的 PCR 扩增可被用来改进信号的检测。

[0112] 因此, 本发明的方法可以包括应用所述引物的扩增步骤, 接着是应用在高严格条件下与相应于上述 G1849T 突变区域的序列杂交的至少一种探针, 优选两种探针的杂交步骤, 和对由所述探针的标记物产生的信号进行检测。

[0113] 例如, 本发明特别地涉及用来确定患有 PV 或可能发展成 PV 或任何其它骨髓增生性疾病的患者的样本中 JAK2 基因的 G1849T 变体存在与否的体外方法, 其包括依靠对 JAK2 基因 (尤其是 SEQ ID No 17、18 或 23 和 24) 的 G1849T 突变特异的一种或多种 SNP (单核苷酸多态性) 来检测所述核酸样本中 JAK2 基因 G1849T 变体的存在与否, 该方法的特征在于 G1849T 变体的存在是 PV 或任何其它骨髓增生性疾病的指示。

[0114] 这种依靠 SNP 的检测方法可以应用允许等位基因辨别的 **Taqman®** 技术来实施。基本上, 该方法包括通过特异于等位基因 1849 的荧光探针对单链 DNA 上的 JAK2 所实施的识别步骤, 并且包括 PCR 反应 (应用具有 5' 外切酶活性的聚合酶)、对于对杂交 SNP 的等位基因特异的荧光释放的检测、通过读取终点荧光 (获得显示突变纯合体、杂合体和正常 DNA 族的图像) 对基因型的确定。

[0115] 突变蛋白质 JAK2 V617F 的检测

[0116] 根据另一个实施方案, 能够在 JAK2 蛋白质内直接检测所述变体。

[0117] 为此目的, 本发明涉及用来确定来自患有 PV 或可能发展成 PV 或任何其它骨髓增生性疾病 (尤其是红细胞增多症、血小板增多症和骨髓纤维化症) 的患者的样本中 JAK2 V617F 变体存在与否的离体或体外的方法, 该方法包括以下步骤:

[0118] a) 从患者获取样本,

[0119] b) 检测 JAK2 V617F 变体的存在与否, 其特征在于所述变体的存在是 PV 或任何其它骨髓增生性疾病的指示。

[0120] 可以通过本领域公知的任何合适的方法来检测所述 JAK V617F 变体。

[0121] 更具体地,可以将采自个体的样本与针对 JAK2 蛋白质 V617F 变体的特异性抗体接触,例如能够辨别 V617F 变体和非突变 JAK2 蛋白质(和任何另外的蛋白质)的抗体。

[0122] 本发明的抗体可以是单克隆或多克隆抗体,单链或双链、嵌合的或人化抗体或者是包含本领域已知的相应于抗原结合片段[人的片段、人的 F(ab')₂ 和 F(v)] 的免疫球蛋白分子的部分。

[0123] 这些抗体可以是与例如毒素或标记物免疫偶联的。

[0124] 用于获得多克隆抗体的方案对于本领域的技术人员是众所周知的。典型地,能够通过将 JAK2 V617F 变体经皮下注射施用给先前所制备的白色新西兰兔,从而获得前免疫(pre-immunity)血清的方法获得所述抗体。可以在 6 个不同位点中的每一个位点注射最高 100 μl 的抗原。在第一次注射前的两周制备所述的兔,随后以大约每六周三次的方式周期性的用同样的抗原对其进行刺激。接下来在每次注射后十天获取血清样本。随后,通过应用 JAK2 V317F 蛋白质捕获抗体的亲和色谱来纯化血清从而获得多克隆抗体。

[0125] 考虑到单克隆抗体的高度特异性,所以相对多克隆抗体而言优选单克隆抗体。

[0126] 本领域的技术人员只要了解 JAK2 V617F 变体具有与野生型 JAK2 蛋白质不同的 3D 结构就可以获取所述单克隆抗体。词语“单克隆抗体”表示能够识别唯一抗原表位的抗体。

[0127] 可用纯化的 JAK2 V617F 变体使哺乳动物,例如小鼠、大鼠或其它的哺乳动物免疫来制备单克隆抗体。分离产生抗体的被免疫哺乳动物的细胞并与骨髓瘤或杂交骨髓瘤的细胞融合以产生杂交细胞(杂交瘤)。

[0128] 产生单克隆抗体的杂交瘤细胞被用作抗体的生产来源。本发明也包括不涉及免疫作用的抗体产生技术。例如“噬菌体展示”技术。

[0129] 针对 JAK2 V617F 变体的抗体可以在某些情形中显示出与野生型 JAK2 蛋白质的交叉反应。如果是这种情形,则需要选择对 V617F 变体特异的抗体。在这点上,可以应用例如野生型 JAK2 蛋白质进行亲和色谱,以捕获显示出与野生型 JAK2 有交叉反应的抗体。

[0130] 因此,本发明涉及特异识别 JAK2 V617F 变体的单克隆抗体和产生所述抗体的杂交瘤细胞系。

[0131] 本发明还涉及应用所述抗体检测样本中 JAK2 V617F 变体存在与否的 ELISA 检测。

[0132] 所述抗体的一种可选择应用可以例如由制备和鉴定半抗原聚体(haptamers)组成,所述半抗原聚体是能够进行特异性分子识别的分子类别。

[0133] 半抗原聚体是实际上能够以高亲和性和特异性识别任何类的靶向分子的寡核苷酸或寡肽。

[0134] **试剂盒**

[0135] 根据另一特征,本发明涉及确定患者是否患有瓦凯红细胞增多症或涉及 JAK2 V617F 变体的其它骨髓增生性疾病的试剂盒。

[0136] 本发明的试剂盒可以包含例如上面定义,用于特异性检测 JAK2 基因中 G1849T 突变存在与否的一种或多种探针或引物。

[0137] 该试剂盒还可以包含用于 PCR 扩增的耐热聚合酶、一种或多种用于扩增和/或杂交步骤的溶液以及检测标记物的任何试剂。

[0138] 根据另一个实施方案,所述试剂盒包含例如上面定义的抗体。

[0139] 本发明的试剂盒还可以包含适于在固体载体上进行杂交或免疫反应的任何试剂。

[0140] 本方法和检测试剂盒可以方便地用于红细胞比容水平高于 51% 的患者亚群。本方法和检测试剂盒还可以有利地用于血小板计数超过 450000 的患者亚群。

[0141] 本发明的 siRNA

[0142] 根据第四特征, 本发明还涉及能够将在 617 位上突变的 JAK2, 具体而言是 JAK2 V617F 的表达降低超过 50%、75%、90%、95% 或超过 99% 的 siRNA。这些 siRNAs 可以通过脂质转染法、转导或电穿孔注射入细胞或组织。它们可以被用来特异性地破坏编码 JAK2 V617F 的 mRNA, 因而它们具有大量可能的治疗应用, 尤其是用来治疗瓦凯红细胞增多症。

[0143] siRNA 在 US 60/068562 (CARNEGIE) 中有描述。所述 RNA 的特征在于, 它包含具有双链结构 (ds) 的区域。抑制作用对靶序列是特异性的, RNA ds 区的一条链的核苷酸序列包括至少 25 个碱基并且与靶基因的部分是一致的。RNA ds 区的另一条链的核苷酸序列与第一条链的核苷酸序列互补, 并且与靶基因的所述部分互补。此外, 申请 WO 02/44321 (MIT/MAX PLANCK INSTITUTE) 描述了双链 RNA (或相同类型的寡核苷酸, 化学合成的), 其中各个链的长度为 19 到 25 个核苷酸, 并且所述双链 RNA 可以通过 RNA 干扰方法特异性地抑制靶基因的转录后表达, 从而确定基因的功能并在细胞或体内调节这种功能。最后, WO00/44895 (BIOPHARMA) 涉及抑制指定靶基因在真核细胞中体外表达的方法, 其中由两个分开的单链 RNA 形成的 dsRNA 被插入到细胞内, 该 dsRNA 的一个链具有与靶基因互补的区域, 其特征是, 所述互补区包含至少 25 个连续的核苷酸对。本领域的技术人员可以参考包含在这些文件中的教导来制备本发明的 siRNA。

[0144] 更具体地, 本发明涉及长度为约 15 至 30 个核苷酸、19 至 25 个核苷酸、或优选约 19 个核苷酸的双链 RNA, 它们与包含 G1849T 突变的序列 SEQ ID No 3 互补 (链 1) 和一致 (链 2)。本发明的这些 siRNA 也可以在 3' 末端包含双核苷酸 TT 或 UU。

[0145] 许多方案可用来设计本发明的 siRNA:

[0146] - “siSearch Program” 在:

[0147] http://sonnhammer.cgb.ki.se/siSearch/siSearch_1.6.html (“Improved and automated prediction of effective siRNA”, Chaml AM, Wahlesdelt Cand Sonnhammer ELL, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004)。

[0148] - “SiDirect” 在:

[0149] <http://design.rnai.jp/sidirect/index.php> (Direct: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference, Yuki Naito et al, Nucleic Acids Res, Vol. 32, No Web Server Issue © Oxford University Press, 2004)。

[0150] - “siRNA Target Finder” by Ambion at the address http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_tools.html

[0151] - “siRNA design tool” by Whitehead Institute of Biomedical Research at the MIT at the address <http://jura.wi.mit.edu/pubint/http://iona.wi.mit.edu/siRNAext/>

[0152] 其它的方案列举在:

[0153] <http://web.mit.edu/mmmanus/www/home1.2files/siRNAs.htm>, 尤其在:

[0154] http://athena.bioc.uvic.ca/cgi-bin/emboss.pl?_action=input&_app=

sima

[0155] 例如,对于序列 TATGGAGTATGTT¹⁸⁴⁹TCTGTGGAGA (SEQ ID No12) 而言,有义 siRNA 是 UGGAGUAUGUUUCUGUGGAdTdT (SEQ ID No13),反义 siRNA 是 UCCACAGAAACAUACUCCAdTdT (SEQ ID No 14)。

[0156] 在一个具体实施方案中,检验并选择上述本发明的 siRNAs 在降低,甚至特异性地阻断 JAK2 V617F 的表达、尽可能小的影响野生型 JAK2 表达方面的能力。例如,本发明涉及使 JAK2 V617F 表达降低超过 80%、90%、95%或 99%,并且没有降低野生型 JAK2 表达或者降低野生型 JAK2 表达低于 50%、25%、15%、10%或 5%或甚至 1%的 siRNA。

[0157] 例如,本发明的 siRNA 能够选自以下序列:

[0158] -UGGAGUAUGUUUCUGUGGA (SEQ ID No 29)

[0159] -GGAGUAUGUUUCUGUGGAG (SEQ ID No 30)

[0160] -GAGUAUGUUUCUGUGGAGA (SEQ ID No 31)

[0161] 根据另一个实施方案,本发明涉及 ddRNAi 分子,例如在申请 WO01/70949 (Benitec) 中一般性描述但特异性地靶向 JAK2 V617F 的 ddRNAi 分子。本发明的 ddRNAi 使编码 JAK2 V617F 的序列消失,并且包含 (i) 与 SEQ ID No 3、4 或 11 一致的序列;(ii) 与 (i) 定义的序列互补的序列;(iii) 分开所述序列 (i) 和 (ii) 的内含子;向细胞或组织中引入该构建将产生能够改变 JAK2 V617F 表达的 RNA。

[0162] 本发明还涉及经遗传修饰的非人的动物,其包括一个或多个包含能阻断、延迟或降低动物中 JAK2 V617F 表达的基因构建物的细胞。用于获得所述遗传修饰的动物的方法在 WO 04/022748 (Benitec) 中有描述。

[0163] 筛选方法

[0164] 根据第五特征,本发明的对象是用于筛选 JAK2 V617F 特异性抑制剂的方法。

[0165] “特异性抑制剂”是表示对 JAK2 的 IC₅₀ 值与对 JAK2 V617F 的 IC₅₀ 值之比大于 5、10、25 或甚至 50 的化合物。例如,所述化合物对 JAK2 V617F 的 IC₅₀ 小于 1 μM,优选 100nM,而它对 JAK2 的 IC₅₀ 大于 5 μM 或 10 μM。

[0166] 可以应用本发明的蛋白质、包含所述蛋白质的膜部分、表达所述蛋白质的细胞或者例如上述的非人转基因动物来实施该方法。

[0167] 因此,本发明涉及用来确定一种或多种化合物对 JAK2 V617F 的特异性抑制作用的检测法,其包括如下步骤:在适于固定的条件下,使一种或多种化合物与上述 JAK2 V617F 蛋白质、包含 JAK2 V617F 的膜部分或如上所述表达 JAK2 V617F 的细胞接触,并检测 JAK2 V617F 的特异性固定和 / 或抑制作用。

[0168] 该方法也可以包括对于在野生型 JAK2 上的固定的测量。

[0169] 该方法也可以包括对几种分子的连续检测,并且包括用来选择对于 JAK V617F 的 IC₅₀ 小于 1 μM,优选 100nM 的分子的选择步骤。

[0170] 该方法也可以包括针对 JAK2 的 IC₅₀ 为小于 5 μM 或 1 μM 的上述分子的负选择步骤。

[0171] 本发明涉及体外筛选方法,例如在上述方法中应用免疫沉淀来确定 JAK2 V617F 被抑制的磷酸化作用。

[0172] 本发明还涉及对能够在无促红细胞生成素 (Epo) 条件下进行分化的 CD34-JAK2

V617F 祖细胞的体内筛选。从瓦凯红细胞增多症患者中分离所述细胞。可以将 CD34-JAK2 V617F 细胞置于包含 SCF 和 IL-3 的培养基的培养物中。将所述化合物加到培养基中,并且确定细胞的增殖能力和它们分化为 36+/GPA- 细胞的能力。所选的化合物是观察到能够减少 36+/GPA- 克隆的化合物。因此,本发明涉及应用能够在无促红细胞生成素 (Epo) 条件下进行分化的原代 CD34+JAK2 V617F 祖细胞或者应用由于 JAK2 V617F 变体的引入已经变成因子非依赖性的细胞系的上述筛选方法。可以在半固体培养基中的 CFU-E 型骨髓培养物上实施直接检测所述化合物有关自发集落生长抑制作用的同样类型的检测。

[0173] 也可以应用上述表达重组 JAK V617F 的任何哺乳动物细胞系。

[0174] 本发明还涉及用于鉴定候选医药产品的方法,其包括如下步骤:给表达 JAK2 V617F 的非人转基因动物例如上述动物施用化合物,例如所述动物出现瓦凯红细胞增多症和/或患有与 JAK2 V617F 存在有关的骨髓增生性疾病,确定所述化合物的作用并选择观察到引起降低或阻断瓦凯红细胞增多症中成红细胞增殖和自发性分化或者降低与 JAK2 V617F 的存在相关的细胞增殖的候选医药产品。

[0175] 更具体地说,用诸如上述的 JAK2 V617F K-in 小鼠或 JAK2 V617FK-in 大鼠来实施该方法。

[0176] 在这些化合物中,可以提到例如靶向上述 JAK2 的突变外显子 12 的 siRNA,尤其是靶向包含突变 t¹⁸⁴⁹ 核苷酸的序列 SEQ ID No 3、4 或序列 SEQ ID No 11 的 siRNA。

[0177] 本发明另外的特征涉及特异性地抑制 JAK2 V617F 的上述 siRNA 或者 ddRNA 和化合物在生产医药产品中的用途。所述医药产品的目的在于治疗血癌,尤其是包括真性红细胞增多症、原发性血小板增多症、髓性脾肿大 (myeloid splenomegaly) 或原发性骨髓纤维化症 (primitivemyelofibrosis) 和慢性粒细胞白血病 (chronic myeloid leukaemia) 在内的骨髓增生性疾病。所述医药产品的目的也在于治疗与 JAK2 V617F 突变相关的另外的恶性血液病,和任选的表达 JAK2 V617F 的实体瘤、癌、黑素瘤和神经母细胞瘤。

[0178] 对于说明书的余下部分和实施例可以参考附图,其特征描述于下:

附图说明

[0179] - 图 1:JAK2 在 PV 中主要作用的发现

[0180] 在基础状态中, JAK2 以非磷酸化状态被固定到盒 1(box1)。与 Epo 的结合改变了受体的构象并且能够使 JAK2 磷酸根转移,反过来又使 Epo-R 的胞质内残基磷酸化,由此募集信号转导的不同正 (->) 或负 (-|) 效应物。

[0181] - 图 2:非促红细胞生成素依赖性的 PV CD34+ 祖细胞的培养模型的设计

[0182] 2A- 具有 Epo、SCF 和 IL-3 的培养

[0183] 2B- 没有 Epo 的培养

[0184] - 图 3:对 JAK-STAT、Pi3-K 和 Src 激酶路径的抑制防止自发性红细胞系分化。

[0185] - 图 4:抑制 PV 祖细胞中 JAK2 的方案

[0186] - 图 5:在 PV 祖细胞中 JAK2 抑制的结果

[0187] 5A-36+/gpa- 克隆能力的降低。第一天到第六天 (D1-D6) 在 SCF-IL3 中进行培养,在第五天进行电穿孔,在第六天进行分选 (morpho/36/gpa-)。单独的甲基 SCF。在第 13 天进行计数 (分选后的第七天)。

[0188] 5B- 具有 V617F 突变 (外显子 12) 的 JAK2 的结构。

[0189] - 图 6 :应用 Light **Cycler®**和**TaqMan®**技术在基因组 DNA 中进行 SNP 基因型分析来检测 JAK2 V617F 突变

[0190] A 和 B :通过应用 FRET 杂交探针的 Light **Cycler®**的融解曲线分析检测突变。A :显示在 DNA TF-1 中应用各种 HEL DNA 稀释物的试验。在 1% 稀释物中仍然可以检测到 JAK2 V617F 峰 (57°)。B :代表性患者样本的结果 (#1 :纯合的 ;#2 :杂合的 ;#3 :弱的 ;#4 :非突变的)。

[0191] C. 通过**TaqMan®**等位基因特异性扩增检测突变。显示出应用 HELDNA 稀释物 (HEL 100 到 1% :空心正方形 ;TF-1 细胞 :空心圆) 和一些代表性患者样本的试验 (黑色交叉)。#a :纯合的患者 ;#b :杂合的患者 ;#c :弱的患者 ;#d :非突变的患者。

[0192] - 图 7 :建议的用来诊断红细胞增多症 (即红细胞比容水平超过 51%) 的诊断数据表

[0193] 在数据表的每一阶段中紧接于每一项 (n) 所标明的是所涉及患者的数量,只有显示了所有临床数据的患者才被列于此 (n = 81)。作为首选诊断测试的对于 JAK2 V617F 的检测已经使 81 名患者中的 58 名患者不必经过另外的调查来诊断 PV 型骨髓增生性疾病。

[0194] - 图 8 和 9 :在用 JAK2 V617F Jak2(siRNA#1,3 和 4) 特异性 siRNA 处理后 24 小时, V617F Jak2 在 HEL 细胞中的表达降低。

[0195] 0 到 6 :用 siRNA V617F Jak2 处理的 (1 到 6) 或者没有用 siRNA V617FJak2 处理的 (0)HEL 细胞。

[0196] C+ :用 V617F Jak2RV 载体转染的 293HEK 细胞

[0197] C- :293HEK

[0198] - 图 10 :在用 Jak2 V617 特异性 siRNA 处理后 24 小时,WT Jak2 在 K562 细胞中表达的水平仍然没有变化。

[0199] Je :用 siRNA WT Jak2 处理的 K562 细胞

[0200] 0 到 6 :用 siRNA V617F Jak2 处理的 K562 细胞

[0201] C- :293HEK (无 JAK2 的表达)

[0202] 实施例 1 :在 39/43 名患者中鉴定 JAK2 V617F 突变

[0203] 病理性祖细胞的细胞培养模型的设计和能够让我们证实 JAK2-STAT5、P13 激酶和 Src 激酶路径的生物化学抑制剂的应用对 PV 祖细胞的非 Epo 依赖性分化是必须的 (Ugo et al 2004)。这些结果再次确认了我们的假设,引起 PV 的主要分子损伤肯定是导致信号传导途径失调的关键蛋白质的异常造成的,例如赋予酪氨酸激酶组成型活性的突变。不过,通过对 43 名患有瓦凯红细胞增多症患者的研究,使得有可能鉴定由 JAK2 蛋白质所起到的关键作用, JAK2 蛋白质是处于这些不同的信号传导途径最上游的蛋白质,并且它是细胞因子受体信号传导途径所共有的,在 PV 中已经描述了有关它的反应异常。我们用三个互相补充的方法检查了 JAK2 蛋白质激酶在 PV 病理生理学过程中所涉及的情况 :

[0204] - 功能性方法 (在 PV 细胞中用干扰 RNA 抑制 JAK2)

[0205] - 基因组方法 (对所述基因的 23 个外显子进行测序), 以及

[0206] - 生物化学方法,用该方法研究 JAK2 磷酸化的异常,引起组成性活化的原因。

[0207] 所应用的生物学材料已经取得红细胞增多症患者的同意并且是取自诊断目的样

本的剩余物,它们被送到 **Hôtel** Dieu Central haematologylaboratory,或者它们是采自治疗性放血术。

[0208] 1.1. 功能性研究

[0209] 通过用 JAK2 序列 (AMBION, Huntingdon, England) 特异性 siRNA 经电穿孔转导 PV 成红细胞的方法研究 JAK2 在瓦凯红细胞增多症患者成红细胞中的功能,该 siRNA 识别位于 JAK2 mRNA 外显子 15 上的序列作为靶。我们已经表明对 JAK2 的抑制强烈地降低了 PV 祖细胞在缺少 Epo 的条件下的克隆能力和“自发性”分化。用 siRNA JAK2 转染的正常成红细胞祖细胞与对照的 siRNA 相比,产生克隆潜力降低了 70%,这证实了用 siRNA JAK2 转染的功效。在 PV 中,在无 Epo 的培养模型中研究 JAK2 抑制在成红细胞祖细胞中的作用,这使得可以研究恶性克隆的细胞。我们比较了用 siRNA JAK2 转染之后相对于对照 siRNA, PV 成红细胞祖细胞的产生克隆潜力、凋亡和分化。对没有用 Epo 培养的 PV 祖细胞产生克隆成潜力的研究表明,与对照 siRNA 相比,在用 siRNA JAK2 转染之后,克隆的数量有非常显著的减少。这些细胞的凋亡的流式细胞分析表明,用 siRNA JAK2 与用非相关 siRNA 转染的细胞相比,细胞凋亡有显著地增加 (70 对 53%)。有关 siRNA JAK2 对分化影响 (通过流式细胞术检测血型糖蛋白 A 的获取) 的研究表明,用 siRNA JAK2 转染的祖细胞与用对照 siRNA 转染的祖细胞之间仅有轻微的差异。

[0210] 因此,细胞研究的结果表明,JAK2 对于 PV 祖红细胞的非 Epo 依赖性分化而言是必须的。生物化学研究 (免疫沉淀) 的初始结果表明,与正常细胞相比,在使 PV 祖红细胞丧失细胞因子后,JAK2 有更加延长的磷酸化作用。

[0211] 1.2. JAK2 的基因组研究

[0212] 应用正常个体的基因组 DNA 实施关于 23 个外显子的 PCR。在细胞培养后从体外获取的红细胞系细胞中提取基因组 DNA 后,我们接下来检查了三名患有 PV 的患者。

[0213] 我们在所检测 3 名患者的 2 名患者中确定了定位于 JAK2 外显子 12 中的点突变。该突变涉及编码序列的碱基 1849 ([从 ATG 开始计数], GenBank NM_004972) 并且使 JAK2 蛋白质的密码子转变 (V617F)。

[0214] - 正常的 617 密码子:缬氨酸 (V) 的 gtc 编码

[0215] - 突变的 617 密码子:苯丙氨酸 (F) 的 ttc 编码

[0216] 应用在 Internet 上公开的数据库,我们能够核实它不是已知的多态性。

[0217] 我们随后扩大了分组。到此为止在所检测的 43 个病例中,有 39 名 PV 患者已经发现了所述突变。没有发现在对照 (15 个被检测的病例) 或患有继发性红细胞增多症的患者 (18 个被检测的病例) 中携带所述突变。

[0218] 患者的测序结果

[0219] - 在所检测的 43 例 PV 中,39 例中有所述突变 (90%)

[0220] - 2/3 为杂合体

[0221] - 13/39 “杂合体”即 30% 的病例 (与在 9p 上杂合性的损失比例相同)。

[0222] 对照

[0223] - 在所检测的 33 例对照中没有一例检测到所述突变:

[0224] - 包括 15 个正常个体

[0225] - 和 18 例继发性红细胞增多症 (没有自发性集落)

[0226] 这种 JAK2 异常的发现说明了对涉及 PV 的大量生长因子 (Epo、TPO、IL-3、IL-6、GM-CSF、胰岛素) 的超敏性。实际上, JAK2 是涉及这些细胞因子受体的信号传导途径的蛋白质。

[0227] 而且, JAK2 与 R-Epo 的结合是特别的, 因为 JAK2 以组成性的方式被固定到 R-Epo: 在高尔基体中启动的 JAK2/R-Epo 结合对于在成红细胞膜上 R-Epo 的处理是必须的。因此, 引起 JAK2 与 R-Epo 结合变异的 JAK2 异常可以说明髓质增生 (medullary hyperplasia) 在成红细胞系上的显著性, 而该蛋白质涉及许多信号传导途径。同样地, Moliterno et al (Moliterno et al, 1998; Moliterno and Spivak, 1999) 已经证明了与糖基化缺失有关的 mp1 的有缺陷膜表达。可能地是, JAK2 与 R-Epo 的同功作用对于处理 c-mp1 是必须的。那么 JAK2 的异常就能够解释在 PV 中发现的 c-mp1 膜表达的缺失。

[0228] JAK2 结合到 R-Epo 的近侧结构域 (proximal domain) 上, 在高度保守的结构域位置, Box2。在缺少 Epo 刺激条件下, JAK2 以组成性的方式被固定到 R-Epo, 但是它是非磷酸化的形式, 所以是非活化的。在受体经 Epo 刺激后, 两个 JAK2 分子被磷酸化, 并且接下来使 R-Epo 磷酸化, 这使得随后能够征召 (recruitment) 涉及信号转导的其它蛋白质, 例如蛋白质 STAT5、Grb2、P13K 的磷酸化。与所有的 JAK 一样, JAK2 蛋白质含有功能性激酶结构域 (JH2)、没有酪氨酸激酶活性的假激酶结构域 (JH2) 和几个保守结构域 (JH3-JH7), 这是 JAK 家族成员的特征。JH2 结构域似乎涉及对 JAK2 的酪氨酸激酶活性的调节。根据可用的 JAK2 蛋白质图谱数据 (Lindauer, 2001), 617 位氨基酸位于这个 JH2 结构域, 并且根据模型研究, 该氨基酸位于对于调节激酶活性而言特别重要的区域。

[0229] 除了该发现 (理解细胞因子非依赖性的机制、不同 SNP 的分析) 在病理生理学上的益处之外, 对患者中所述突变的证明首次提供了能够确认诊断的检测。从医学诊断的观点看, 对于 JAK2 突变的研究能够在属于恶性克隆的多核嗜中性粒细胞上进行。

[0230] 本发明还可确定对该突变蛋白质特异性激酶抑制类型的特定治疗、或基因疗法。

[0231] 实施例 2: 检测 JAK2V617F 突变体用于首选诊断红细胞增多症

[0232] 2.1 患者、材料和方法

[0233] 在测序和两种用于 JAK2V617F 检测的 SNP 基因型分型技术之间的比较患者细胞

[0234] 分析怀疑有 MPD 的 119 个样本 (即红细胞增多症、血小板增多症、白细胞增多症)。用 58 个样本进行前景分析并且对 61 个存档的骨髓样本进行回顾性分析。

[0235] 依照使用说明 (Eurobio, France) 应用密度梯度方法分离外周粒细胞。应用 Ficoll 密度梯度离心从骨髓中分离单核细胞。依照标准程序提取基因组 DNA。为了确定 Light **Cycler**[®] 和 **Taqman**[®] 技术的敏感性, 将源自纯合体样本的具有最少剩余野生型等位基因的 DNA 用正常 DNA 连续稀释。

[0236] 细胞系

[0237] 应用来自在 TF-1 细胞系 (非突变的) 的 DNA 中具有突变纯合形式 (JAK2 V617F) 的人红白血病细胞系 (HEL) 的 DNA 连续溶液 (1、0.5、0.1、0.05、0.01) 作为标准阳性对照。在富含胎牛血清的 MEM- α 培养基 (Invitrogen) 中培养所述细胞系。

[0238] 通过对应用 FRET 杂合探针的 Light **Cycler**[®] 的融解曲线的分析检测突变

[0239] 设计引物和探针来扩增和杂交 JAK2 的外显子 12 的靶序列。在 3' 位置用荧光素标记的供体俘获探针涵盖了突变位点 (1849G/T) 的位置, 并且邻近的接受体锚定探针

(acceptor anchor probe) 在它的 5' 末端用 Light **Cycler**[®] Red 640 (LCRed640) 标记; 它的 3' 末端被磷酸化以避免其延长。在 Light **Cycler**[®] 仪器 (Roche Diagnostics, Meylan, France) 上实施扩增和融解曲线的分析。终反应体积为 20 μ l, 其应用了 10ng DNA、14 μ l 的 LightCycler FastStart DNA Master 混合物、3mM MgCl₂、0.2 μ M 引物、每种探针 0.075 μ M。简单地说, 样本被加热到 95°C 持续 10 分钟, 45 个循环的 PCR 扩增 (在 95°C 10 秒、在 53°C 10 秒、在 72°C 15 秒) 接着是 95°C 的变性步骤持续 10 秒, 两个杂交步骤在 63°C 和 45°C 条件下各自持续 30 秒, 融解曲线的范围在 45 到 70°C (0.1°C / 秒) 之间。通过标绘关于温度的荧光导数曲线 [2(dF12/F11)/dT 对 T] 依照 Light **Cycler**[®] 程序实施所述分析。分别在 57 和 63°C 观察到突变的峰和 WT。

[0240] 通过应用 **TaqMan**[®] 对等位基因的特异性扩增来检测所述突变

[0241] 设计两种引物来扩增包含 1849 位 SNP 的 92bp 的产物。设计两种具有不同荧光着色的 MGB 荧光探针, 其中一个探针靶向 WT 等位基因, 另一个探针靶向突变的等位基因。应用基于 **Taqman**[®] PCR 的方法在 96 孔板上实施基因型分型。终反应体积是 12 μ l, 其使用了 10ng 基因组 DNA、6.25 μ l 的 **TaqMan**[®] Universal Master Mix 和 0.31 μ l 的 40 \times Assays-on-Deamd SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems)。所述的板被加热到 95°C 持续 10 分钟, 接着是 40 个在 92°C 条件下持续 15 秒的变性循环和在 60°C 持续 1 分钟的匹配 / 延伸。在 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) 上实施热循环。应用 SDS 程序 1.3 版实施分析。通过对源自 WT 探针的荧光曲线 (Rn) 与后 PCR 荧光读数产生的突变 JAK2 的 Rn 的可视检查来实施终点等位基因辨别的基因型分型。

[0242] 红细胞增多症患者和样本的采集

[0243] 在诊断时, 在进行任何形式的治疗之前, 我们评估了 88 名红细胞比容水平超过 51% 的患者, 并且我们研究了所存在的 WHO 和 PVSG 标准。选择 51% 的值作为红细胞比容水平正常范围的上限 (Pearson TC et al., Polycythemia Vera Updated: Diagnosis, Pathobiology and Treatment. Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program.) 2000 : 51-68)。收集骨髓细胞用于产生克隆检测, 并且收集额外的细胞用于 DNA 提取。在不同的实验室中测量血清促红细胞生成素 (Epo), 由此, 当测量值在每个实验室的正常范围较低值以下时被报告为低, 依此类推被报告为正常或高。依照前述纯化源自同一患者的外周粒细胞, 每次的血样都是可用的。在收到知情同意之后收集骨髓和血液样本。

[0244] EEC 检测

[0245] 使用先前描述的血浆凝块培养技术 (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 :630 to 633) 在同一实验室内 (**Hôtel** Dieu, Paris) 实施所有的红细胞系 Epo 反应的体外检测。

[0246] 统计学分析

[0247] 应用 Spearman 等级相关系数 (R) 进行标记物的相关性分析。

[0248] 2.2 结果

[0249] 基于 PCR 的基因型分型技术用于检测突变 JAK2V617F 的可行性和灵敏性

[0250] 为了评估测序、Light **Cycler**[®] 和 **Taqman**[®] 技术检测 JAK2 V617F 突变的功

效,我们以平行的方式应用 3 种技术在采自怀疑患有 MPD 患者的 119 个样本中研究了所述突变的存在。在 83/119 的样本中有效地检测到 JAK2 V617F 突变,并且有 35 个样本应用三种技术中的任何一种没有检测到所述突变。只有一个样本中,测序没有检测到两种 Light **Cycler**®和**Taqman**®技术所揭示的所述突变,由此暗示后者可能更加灵敏。

[0251] 为了评估所述技术的敏感性,我们使用了两种不同的方法:我们检测了具有纯合突变的 HEL 细胞系 DNA 在非突变的 TF-1 细胞系 DNA 中的连续稀释物,和源自 JAK2 V617F 突变纯合体患者的基因组 DNA 在正常 DNA 中的连续稀释物。测序未能检测到的突变等位基因在 TF-1 细胞系 DNA 中稀释的 HEL 细胞系 DNA 中有 5%,并且在正常 DNA 中稀释的来自具有纯合突变的患者的 DNA 中有 10%。Light **Cycler**®和**Taqman**®技术的灵敏度是相等的,稍微好于测序,并且对来自稀释于 TF-1 细胞系 DNA 中的 HEL 细胞系 DNA 而言其达到 0.5 至 1% (图 6),和对在正常 DNA 中稀释的来自具有纯合突变的患者的 DNA 而言其达到 2 至 4%。

[0252] 在诊断时患有红细胞增多症的患者特征

[0253] 在诊断时 88 名红细胞比容水平超过 51% 的患者主要特征总结于表 1 中。

[0254] 表 1:患者特征

[0255]

	WHO 标准		PVSG 标准		WHO 和 PVSG 标准	
	PV n = 61	特发性 红细胞增多症 n = 11	PV n = 45	特发性 红细胞增多症 n = 21	继发性 红细胞增多症 n = 5	Hct>50% 但是没有 AE n = 3
性别比 (男性/女性)	38/23	11/0	28/17	18/3	4/1	3/0
平均年龄 (范围)	61 (23 to 92)	57 (24 to 81)	58 (23 to 92)	60 (53 to 81)	65 (55 to 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 (x/10 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
平均血小板计数 (x/10 ⁹) ± σ	463 ± 148	212 ± 38	503 ± 149	245 ± 60.4	212 ± 29	175 ± 19
脾肿大	16/55	0/11	14/39	0/21	0/5	0/3
EEC 存在	59/60	1/11	43/44	11/21	0/5	0/3
低 Epo 水平	39/47	2/8	27/33	10/17	0/3	1/1
正常 Epo 水平	8/47	6/8	6/33	7/17	3/3	0/1
细胞生成异常	7/32	0/3	6/23	0/7	nd	0/1
阳性 JAK2V617F	57/61	0/11	43/45	8/21	0/5	0/3

[0256] 依照 PVSG 和 WHO 标准将 88 名红细胞比容水平超过 51% 的患者诊断为 4 组：瓦凯病 (PV)、特发性红细胞增多症、继发性红细胞增多症和当测量的红细胞量没有增加时的“非绝对性红细胞增多症 (noabsolute erythrocytosis)” (非 AE)。因为一些临床数据没有得到, 有 8 名患者没有任何明确的诊断。Hct: 红细胞比容; Hb: 血红蛋白; WBC: 白细胞; EEC: 内源性红细胞系集落; Epo: 促红细胞生成素; σ: 标准偏差。依照 WHO 标准 (Pierre R. et al., editors, World Health Organization Classification of Tumors; Pathology and Genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon; IARC Press: 2001: 32 to 34) 和 PVSG 标准 (Pearson TC, Messinezy M. The diagnostic criteria of polycythaemia rubra vera. Leuk Lymphoma 1996; 22 Suppl 1: 87 to 93) 这些患者可以被分为 4 个主要组: 61 名和 45 名患者被诊断为 PV, 5 名患者患有继发性红细胞增多症, 11 名和 21 名患者患有特发性红细胞增多症和 3 名患者具有非绝对性红细胞增多症 (正常红细胞量)。有 7 名患者的临床数据是不完全的, 这说明依照 WHO 标准或 PVSG 标准不能确认

PV 的诊断。由于两种分类的 A1 标准间的差异,6 名没有测量红细胞量的患者可以依照 WHO 分类标准进行分类,但是不能依照 PVSG 分类标准进行分类。一名患者显示出既有缺氧又有 EEC 形成,由此造成了诊断的困难。在 35 名患者中实施细胞遗传分析;在 32 名 PV 患者(WHO 标准)中,有 7 名显示出细胞遗传异常:5 名患者具有三体性 9,1 名具有 7q- 和 1 名患者在染色体 18 上具有额外的物质。

[0257] JAK2 V617F 的存在对应于有关 PV 的 PVSG 和 WHO 标准

[0258] 在 45 名依照 PVSG 标准诊断患有 PV 的患者中有 43 名存在 (96%),在 61 名应用 WHO 标准诊断患有 PV 的患者中有 57 名存在 JAK2 V617F (93%) (表 1)。依照 PVSG 标准被分类为非 PV 的 29 名患者中 8 名表明有该突变,但是 19 名按照 WHO 标准被分类为非 PV 的患者中没有该突变;依照 PVSG 标准这 8 名患者被认为是 IE,依照 WHO 标准被认为是 PV。在被诊断为 SE 的患者中和具有正常红细胞量(“非 AE”)的患者中不具有所述突变。因此 JAK2 V617F 的存在与否相当于在依照 WHO 标准的 76/80 的患者中 (95% $R = 0.879, p < 0.0001$) 和依照 PVSG 标准的 64/74 的患者中 (86.5%, $R = 0.717, p < 0.0001$) 的阳性 PV 诊断。此外,因为依照 WHO 标准被诊断为非 PV 的患者没有一个具有该突变, JAK2V617F 的检测在绝对性红细胞增多症范围内具有 100% 的预测值。

[0259] 一些作者 (Mossuz P. et al., Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. Haematologica 2004;89:1194 to 1198) 考虑将对血清促红细胞生成素水平的测量作为绝对性红细胞增多症患者的首选诊断检测,其具有 97% 的特异性,并且如果 Epo 水平在正常范围较低值之下的话,对 PV 的诊断而言具有 97.8% 的预测值。在我们的研究中, Epo 水平和依照 WHO 和 PVSG 标准的 PV 诊断之间的相关性分别在 50/61 (82%, $R = 0.488, p = 0.0002$) 和 39/56 (70%, $R = 0.358, p = 0.0067$) 的患者中被观测到。我们随后在存在或缺少 V617F JAK2 的条件下比较血清 Epo 水平,发现 52/68 的患者 (76%, $R = 0.416, p = 0.0004$) 显示出充分的相关性。

[0260] JAK2 V617F 突变的存在对应于形成 EEC 的能力。

[0261] 三个不同的组已经表明经 JAK2 V617F 转染的 Epo 依赖性细胞系对于它们的生长而言是非 Epo 依赖性的并且具有 Epo 超敏性,由此在 PV 中模拟所述祖红细胞的非依赖性和超敏性。因此,我们提出假设,携带有 JAK2 V617F 的患者也显示出 EEC 的形成。在 20 名患有红细胞增多症但没有 EEC 形成的患者中,一名患者表明具有所述突变,这引起对 JAK2 V617F 检测的阳性预测价值的疑问;然而,即使这名患者没有显示出 EEC,他/她满足了 WHO 和 PVSG 的许多阳性标准,这使得在两种分类标准中该患者被分类为 PV。因此应该认为该名患者是“EEC 假阴性”而不是“JAK2 假阳性”。在 67 名具有 EEC 形成的患者中,62 名患者携带有 JAK2 V617F 突变,应用灵敏性检测技术有 5 名患者没有检测到突变。在这 5 名患者中,分别有 4/5 和 2/5 的患者可以依照 WHO 和 PVSG 标准被分在 PV 组中。总之,在所分析的 87 名患者中, JAK2V617F 突变的存在与否在 81/87 的患者中对应于形成 EEC 的能力或缺陷 (93.1%, $R = 0.824, p < 0.0001$)。

[0262] JAK2 V617F 突变在骨髓单核细胞 (BMMC) 中的存在对应于它在外周粒细胞中的存在。

[0263] 为了检查在诊断时应用外周血粒细胞来检测 JAK2 V617F 突变是否可以避免检测骨髓细胞,我们比较了根据每种方法所获得的结果:在诊断时,在 50 名 (包括 35

例 PV、8 例 SE 和 8 例疑似 MPD) 其骨髓样本和外周血样本都可利用的患者中实施测序、Light **Cycler®**和**Taqman®**。在所有病例中检测到的突变一致 (34 例突变、16 例非突变)。

[0264] III- 结论

[0265] 于是我们提出一种新的 PV 诊断数据表, 其中应用灵敏技术对粒细胞中 JAK2 V617F 的检测作为诊断红细胞增多症的第一步, 除了明显的继发性红细胞增多症的情况 (图 7)。该方法有以下几个优点: 所述方法避免了必须对同位素红细胞实施的测量, 其不总是可以利用的并且它的结果有时会引起争论。所述方法也能够避免骨髓步骤和 EEC 检测, 它们是耗时的并且没有被很好的标准化。所述方法极大地减少了阳性 PV 诊断的花费, 因为只有红细胞比容水平超过 51% 的患者和 JAK2 V617F 阴性的患者需要经受实际上用来表征红细胞增多症的所有检查。即使在红细胞增多症的情形下, 对 JAK2 V617F 单独的检测将会支持 PV 的诊断, 但是实施骨髓活组织检查仍然是可以应用的, 因为它可以揭示骨髓纤维化的征兆或母细胞 (blastic cells) 的存在, 由此确认 PV 的白血病转化。不过我们感觉到应该实施骨髓活组织检查用于可选的应用细胞遗传学分析的研究。

[0266] 在 30% 的 ET、50% 的 IMF 和很少的非定性 MPD 中也检测到 JAK2V617F, 由此划定出一个具有不同临床征兆的新的 MPD 组。这些差异的原因仍然是未知的并且仍然太早而不能将这些疾病分成一个具有共同的病理生理学原因和不同表型的单一骨髓增生性实体。接下来精确的临床研究将更加明确的表征 PV、ET、IMF 和其它携带 JAK2 V617F 的极少数 MPD 之间的共同征兆, 尤其是关于绝对性红细胞增多、Epo 水平、骨髓纤维化和细胞遗传异常。由此预期, 应用对 JAK2 V617F 的检测作为用于诊断慢性白细胞增多症、血小板增多症和红细胞增多症的起始工具。JAK2 V617F 的存在不但将会提供对 MPD 分组的新定义, 而且会非常确定地形成研发特异靶向疗法的基础。

[0267] 实施例 3 :V617F JAK2 突变特异性 siRNA 抑制 V617F JAK2, 但不抑制 JAK2WT

[0268] 相应于 SEQ ID No 25 至 27 的 siRNA1、3 和 4 抑制由 HEL 细胞系表达的突变蛋白质 V617F JAK2, 但不抑制由 K562 细胞系表达的野生型 JAK2 蛋白质。该结果显示在图 8、9 和 10 中。

[0269] 参考文献

[0270] -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.

[0271] -Asimakopoulou, 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.

[0272] -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.

- [0273] -Hess, G. , Rose, P. , Gamm, H. , Papadileris, 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.
- [0274] -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.
- [0275] -Le Couedic, 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.
- [0276] -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 autoregulation. *Protein Eng* 14, 27-37.
- [0277] -Means, R. T. , Krantz, S. B. , Sawyer, S. , and Gilbert, H. (1989). Erythropoietin receptors in polycythemia vera *J Clin Invest* 84,1340.
- [0278] -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.
- [0279] -Moliterno, A. R. , and Spivak, J. L. (1999). Posttranslational processing of the thrombopoietin receptor is impaired in polycythemia vera. *Blood* 94,2555-61.
- [0280] -Pahl, H. L. (2000). Towards a molecular understanding of polycythemia rubra vera. *Eur J Biochem* 267,3395-401.
- [0281] -Pearson (2001). Evaluation of diagnostic criteria in polycythemia vera. *Semin Hematol*. 38,21-4.
- [0282] -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.
- [0283] -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.
- [0284] -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.
- [0285] -Ugo, V. , Marzac, C. , Teyssandier, I. , Larbret, F. , Lécluse, 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.

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 巴黎国立医院 (AH-HP)
- [0003] 国家健康与医学研究院 (INSERM)
- [0004] 古斯塔夫鲁西研究所 (IGR)
- [0005] 凡尔赛大学
- [0006] 巴黎十一大
- [0007] <120> 对真性红细胞增多症中 JAK2 突变的鉴定
- [0008] <130>D 22 707
- [0009] <140>PCT/EP2005/055586
- [0010] <141>2005-10-26
- [0011] <150>FR04-11480
- [0012] <151>2004-10-27
- [0013] <160>31
- [0014] <170>PatentIn Ver. 3. 3
- [0015] <210>1
- [0016] <211>1132
- [0017] <212>PRT
- [0018] <213>人
- [0019] <220>
- [0020] <223>变体 JAK2 V617F.
- [0021] <400>1
- [0022] Met Gly Met Ala Cys Leu Thr Met Thr Glu Met Glu Gly Thr Ser Thr
- [0023] 1 5 10 15
- [0024] Ser Ser Ile Tyr Gln Asn Gly Asp Ile Ser Gly Asn Ala Asn Ser Met
- [0025] 20 25 30
- [0026] Lys Gln Ile Asp Pro Val Leu Gln Val Tyr Leu Tyr His Ser Leu Gly
- [0027] 35 40 45
- [0028] Lys Ser Glu Ala Asp Tyr Leu Thr Phe Pro Ser Gly Glu Tyr Val Ala
- [0029] 50 55 60
- [0030] Glu Glu Ile Cys Ile Ala Ala Ser Lys Ala Cys Gly Ile Thr Pro Val
- [0031] 65 70 75 80
- [0032] Tyr His Asn Met Phe Ala Leu Met Ser Glu Thr Glu Arg Ile Trp Tyr
- [0033] 85 90 95
- [0034] Pro Pro Asn His Val Phe His Ile Asp Glu Ser Thr Arg His Asn Val
- [0035] 100 105 110
- [0036] Leu Tyr Arg Ile Arg Phe Tyr Phe Pro Arg Trp Tyr Cys Ser Gly Ser
- [0037] 115 120 125
- [0038] Asn Arg Ala Tyr Arg His Gly Ile Ser Arg Gly Ala Glu Ala Pro Leu

[0039]	130	135	140
[0040]	Leu Asp Asp Phe Val Met Ser Tyr Leu Phe Ala Gln Trp Arg His Asp		
[0041]	145	150	155
[0042]	Phe Val His Gly Trp Ile Lys Val Pro Val Thr His Glu Thr Gln Glu		
[0043]		165	170
[0044]	Glu Cys Leu Gly Met Ala Val Leu Asp Met Met Arg Ile Ala Lys Glu		
[0045]		180	185
[0046]	Asn Asp Gln Thr Pro Leu Ala Ile Tyr Asn Ser Ile Ser Tyr Lys Thr		
[0047]		195	200
[0048]	Phe Leu Pro Lys Cys Ile Arg Ala Lys Ile Gln Asp Tyr His Ile Leu		
[0049]		210	215
[0050]	Thr Arg Lys Arg Ile Arg Tyr Arg Phe Arg Arg Phe Ile Gln Gln Phe		
[0051]		225	230
[0052]	Ser Gln Cys Lys Ala Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu Lys Tyr Leu Ile		
[0053]		245	250
[0054]	Asn Leu Glu Thr Leu Gln Ser Ala Phe Tyr Thr Glu Lys Phe Glu Val		
[0055]		260	265
[0056]	Lys Glu Pro Gly Ser Gly Pro Ser Gly Glu Glu Ile Phe Ala Thr Ile		
[0057]		275	280
[0058]	Ile Ile Thr Gly Asn Gly Gly Ile Gln Trp Ser Arg Gly Lys His Lys		
[0059]		290	295
[0060]	Glu Ser Glu Thr Leu Thr Glu Gln Asp Leu Gln Leu Tyr Cys Asp Phe		
[0061]		305	310
[0062]	Pro Asn Ile Ile Asp Val Ser Ile Lys Gln Ala Asn Gln Glu Gly Ser		
[0063]		325	330
[0064]	Asn Glu Ser Arg Val Val Thr Ile His Lys Gln Asp Gly Lys Asn Leu		
[0065]		340	345
[0066]	Glu Ile Glu Leu Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Ser Phe Val Ser Leu		
[0067]		355	360
[0068]	Ile Asp Gly Tyr Tyr Arg Leu Thr Ala Asp Ala His His Tyr Leu Cys		
[0069]		370	375
[0070]	Lys Glu Val Ala Pro Pro Ala Val Leu Glu Asn Ile Gln Ser Asn Cys		
[0071]		385	390
[0072]	His Gly Pro Ile Ser Met Asp Phe Ala Ile Ser Lys Leu Lys Lys Ala		
[0073]		405	410
[0074]	Gly Asn Gln Thr Gly Leu Tyr Val Leu Arg Cys Ser Pro Lys Asp Phe		
[0075]		420	425
[0076]	Asn Lys Tyr Phe Leu Thr Phe Ala Val Glu Arg Glu Asn Val Ile Glu		
[0077]		435	440
			445

[0078]	Tyr Lys His Cys Leu Ile Thr Lys Asn Glu Asn Glu Glu Tyr Asn Leu
[0079]	450 455 460
[0080]	Ser Gly Thr Lys Lys Asn Phe Ser Ser Leu Lys Asp Leu Leu Asn Cys
[0081]	465 470 475 480
[0082]	Tyr Gln Met Glu Thr Val Arg Ser Asp Asn Ile Ile Phe Gln Phe Thr
[0083]	485 490 495
[0084]	Lys Cys Cys Pro Pro Lys Pro Lys Asp Lys Ser Asn Leu Leu Val Phe
[0085]	500 505 510
[0086]	Arg Thr Asn Gly Val Ser Asp Val Pro Thr Ser Pro Thr Leu Gln Arg
[0087]	515 520 525
[0088]	Pro Thr His Met Asn Gln Met Val Phe His Lys Ile Arg Asn Glu Asp
[0089]	530 535 540
[0090]	Leu Ile Phe Asn Glu Ser Leu Gly Gln Gly Thr Phe Thr Lys Ile Phe
[0091]	545 550 555 560
[0092]	Lys Gly Val Arg Arg Glu Val Gly Asp Tyr Gly Gln Leu His Glu Thr
[0093]	565 570 575
[0094]	Glu Val Leu Leu Lys Val Leu Asp Lys Ala His Arg Asn Tyr Ser Glu
[0095]	580 585 590
[0096]	Ser Phe Phe Glu Ala Ala Ser Met Met Ser Lys Leu Ser His Lys His
[0097]	595 600 605
[0098]	Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu
[0099]	610 615 620
[0100]	Val Gln Glu Phe Val Lys Phe Gly Ser Leu Asp Thr Tyr Leu Lys Lys
[0101]	625 630 635 640
[0102]	Asn Lys Asn Cys Ile Asn Ile Leu Trp Lys Leu Glu Val Ala Lys Gln
[0103]	645 650 655
[0104]	Leu Ala Trp Ala Met His Phe Leu Glu Glu Asn Thr Leu Ile His Gly
[0105]	660 665 670
[0106]	Asn Val Cys Ala Lys Asn Ile Leu Leu Ile Arg Glu Glu Asp Arg Lys
[0107]	675 680 685
[0108]	Thr Gly Asn Pro Pro Phe Ile Lys Leu Ser Asp Pro Gly Ile Ser Ile
[0109]	690 695 700
[0110]	Thr Val Leu Pro Lys Asp Ile Leu Gln Glu Arg Ile Pro Trp Val Pro
[0111]	705 710 715 720
[0112]	Pro Glu Cys Ile Glu Asn Pro Lys Asn Leu Asn Leu Ala Thr Asp Lys
[0113]	725 730 735
[0114]	Trp Ser Phe Gly Thr Thr Leu Trp Glu Ile Cys Ser Gly Gly Asp Lys
[0115]	740 745 750
[0116]	Pro Leu Ser Ala Leu Asp Ser Gln Arg Lys Leu Gln Phe Tyr Glu Asp

[0117]	755	760	765
[0118]	Arg His Gln Leu Pro Ala Pro Lys Trp Ala Glu Leu Ala Asn Leu Ile		
[0119]	770	775	780
[0120]	Asn Asn Cys Met Asp Tyr Glu Pro Asp Phe Arg Pro Ser Phe Arg Ala		
[0121]	785	790	795
[0122]	Ile Ile Arg Asp Leu Asn Ser Leu Phe Thr Pro Asp Tyr Glu Leu Leu		
[0123]	805	810	815
[0124]	Thr Glu Asn Asp Met Leu Pro Asn Met Arg Ile Gly Ala Leu Gly Phe		
[0125]	820	825	830
[0126]	Ser Gly Ala Phe Glu Asp Arg Asp Pro Thr Gln Phe Glu Glu Arg His		
[0127]	835	840	845
[0128]	Leu Lys Phe Leu Gln Gln Leu Gly Lys Gly Asn Phe Gly Ser Val Glu		
[0129]	850	855	860
[0130]	Met Cys Arg Tyr Asp Pro Leu Gln Asp Asn Thr Gly Glu Val Val Ala		
[0131]	865	870	875
[0132]	Val Lys Lys Leu Gln His Ser Thr Glu Glu His Leu Arg Asp Phe Glu		
[0133]	885	890	895
[0134]	Arg Glu Ile Glu Ile Leu Lys Ser Leu Gln His Asp Asn Ile Val Lys		
[0135]	900	905	910
[0136]	Tyr Lys Gly Val Cys Tyr Ser Ala Gly Arg Arg Asn Leu Lys Leu Ile		
[0137]	915	920	925
[0138]	Met Glu Tyr Leu Pro Tyr Gly Ser Leu Arg Asp Tyr Leu Gln Lys His		
[0139]	930	935	940
[0140]	Lys Glu Arg Ile Asp His Ile Lys Leu Leu Gln Tyr Thr Ser Gln Ile		
[0141]	945	950	955
[0142]	Cys Lys Gly Met Glu Tyr Leu Gly Thr Lys Arg Tyr Ile His Arg Asp		
[0143]	965	970	975
[0144]	Leu Ala Thr Arg Asn Ile Leu Val Glu Asn Glu Asn Arg Val Lys Ile		
[0145]	980	985	990
[0146]	Gly Asp Phe Gly Leu Thr Lys Val Leu Pro Gln Asp Lys Glu Tyr Tyr		
[0147]	995	1000	1005
[0148]	Lys Val Lys Glu Pro Gly Glu Ser Pro Ile Phe Trp Tyr Ala Pro		
[0149]	1010	1015	1020
[0150]	Glu Ser Leu Thr Glu Ser Lys Phe Ser Val Ala Ser Asp Val Trp		
[0151]	1025	1030	1035
[0152]	Ser Phe Gly Val Val Leu Tyr Glu Leu Phe Thr Tyr Ile Glu Lys		
[0153]	1040	1045	1050
[0154]	Ser Lys Ser Pro Pro Ala Glu Phe Met Arg Met Ile Gly Asn Asp		
[0155]	1055	1060	1065

[0156]	Lys Gln Gly Gln Met Ile Val Phe His Leu Ile Glu Leu Leu Lys	
[0157]	1070 1075 1080	
[0158]	Asn Asn Gly Arg Leu Pro Arg Pro Asp Gly Cys Pro Asp Glu Ile	
[0159]	1085 1090 1095	
[0160]	Tyr Met Ile Met Thr Glu Cys Trp Asn Asn Asn Val Asn Gln Arg	
[0161]	1100 1105 1110	
[0162]	Pro Ser Phe Arg Asp Leu Ala Leu Arg Val Asp Gln Ile Arg Asp	
[0163]	1115 1120 1125	
[0164]	Asn Met Ala Gly	
[0165]	1130	
[0166]	<210>2	
[0167]	<211>5097	
[0168]	<212>DNA	
[0169]	<213>人	
[0170]	<220>	
[0171]	<223> 在 jak2 基因中的 G1849T 突变	
[0172]	<400>2	
[0173]	ctgcaggaag gagagaggaa gaggagcaga agggggcagc agcggacgcc gctaacggcc	60
[0174]	tccctcggcg ctgacaggct gggccggcgc ccggctcgct tgggtgttcg cgtcgccact	120
[0175]	tcggcttctc ggccggtcgg gccctcggc ccgggcttgc ggcgcgcgtc ggggctgagg	180
[0176]	gctgctgcgg cgcagggaga ggcctggtcc tcgctgccga gggatgtgag tgggagctga	240
[0177]	gcccacactg gagggccccc gagggcccag cctggaggtc gttcagagcc gtgcccgcc	300
[0178]	cggggcttcg cagacctga cccgccgggt aggagccgcc cctgcgggct cgagggcgcg	360
[0179]	ctctggtcgc ccgatctgtg tagccggttt cagaagcagg caacaggaac aagatgtgaa	420
[0180]	ctgtttctct tctgcagaaa aagagctct tctctctct cccgcgacgg caaatgttct	480
[0181]	gaaaaagact ctgcatggga atggcctgcc ttacgatgac agaaatggag ggaacatcca	540
[0182]	cctttctat atatcagaat ggtgatattt ctggaaatgc caattctatg aagcaaatag	600
[0183]	atccagttct tcagggtgat ctttaccatt cccttgggaa atctgaggca gattatctga	660
[0184]	cctttccate tggggagtat gttgcagaag aaatctgtat tgctgcttct aaagcttgtg	720
[0185]	gtatcacacc tgtgtatcat aatatgtttg ctttaatgag tgaacagaa aggatctggt	780
[0186]	atccacccaa ccatgtcttc catatagatg agtcaaccag gcataatgta ctctacagaa	840
[0187]	taagatttta ctttctcgt tggattgca gtggcagcaa cagagcctat cggcatggaa	900
[0188]	tatctegagg tgctgaagct cctttcttg atgactttgt catgtettac ctctttgctc	960
[0189]	agtggcggca tgattttgtg cacggatgga taaaagtacc tgtgactcat gaaacacagg	1020
[0190]	aagaatgtct tgggatggca gtgttagata tgatgagaat agccaaagaa aacgatcaaa	1080
[0191]	ccccactggc catctataac tctatcagct acaagacatt cttaccaaaa tgtattcgag	1140
[0192]	caaagatcca agactatcat attttgacaa ggaagcgaat aaggtagaca ttctcgagat	1200
[0193]	ttattcagca attcagccaa tgcaaagcca ctgccagaaa cttgaaactt aagtatctta	1260
[0194]	taaatctgga aactctgcag tctgccttct acacagagaa atttgaagta aaagaacctg	1320

[0195]	gaagtgggcc ttcaggtgag gagatttttg caaccattat aataactgga aacgggtggaa	1380
[0196]	ttcagtggtc aagaggaaa cataaagaaa gtgagacact gacagaacag gatttacagt	1440
[0197]	tatattgcga ttttctaata attattgatg tcagtattaa gcaagcaaac caagagggtt	1500
[0198]	caaatgaaag ccgagttgta actatccata agcaagatgg taaaaatctg gaaattgaac	1560
[0199]	ttagctcatt aagggagct ttgtctttcg tgtcattaat tgatggatat tatagattaa	1620
[0200]	ctgcagatgc acatcattac ctctgtaaag aagtagcacc tccagccgtg cttgaaaata	1680
[0201]	tacaaagcaa ctgtcatggc ccaatttcga tggattttgc cattagtaaa ctgaagaaag	1740
[0202]	caggtaatca gactggactg tatgtacttc gatgcagtcc taaggacttt aataaatatt	1800
[0203]	ttttgacttt tgctgtcag cgagaaaatg tcattgaata taaactgt ttgattacaa	1860
[0204]	aaaatgagaa tgaagagtac aacctcagtg ggacaaagaa gaacttcagc agtcttaaag	1920
[0205]	atcttttgaa ttgttaccag atggaaactg ttcgctcaga caatataatt ttccagtta	1980
[0206]	ctaatgctg tccccaaaag ccaaaagata aatcaaacct tctagtcttc agaacgaatg	2040
[0207]	gtgtttctga tgtaccaacc tcaccaacat tacagaggcc tactcatatg aaccaaatgg	2100
[0208]	tgtttcacaa aatcagaaat gaagatttga tatttaatga aagccttggc caaggcactt	2160
[0209]	ttacaaagat ttttaaaggc gtacgaagag aagtaggaga ctacggtaa ctgcatgaaa	2220
[0210]	cagaagttct tttaaaagtt ctggataaag cacacagaaa ctattcagag tctttcttg	2280
[0211]	aagcagcaag tatgatgagc aagctttctc acaagcattt ggttttaaat tatggagtat	2340
[0212]	gtttctgtgg agacgagaat attctggttc aggagtttgt aaaatttga tctactagata	2400
[0213]	catatctgaa aaagaataaa aattgtataa atatattatg gaaacttgaa gttgctaaac	2460
[0214]	agttggcatg ggccatgcat tttctagaag aaaacacct tattcatggg aatgtatgtg	2520
[0215]	ccaaaaatat tctgcttate agagaagaag acaggaagac aggaaatcct ctttcatca	2580
[0216]	aacttagtga tcttggcatt agtattacag ttttgcaaaa ggacattctt caggagagaa	2640
[0217]	taccatgggt accacctgaa tgcatgaaa atcctaaaaa tttaaattg gcaacagaca	2700
[0218]	aatggagttt tgggtaccact ttgtgggaaa tctgcagtgg aggagataaa cctctaagtg	2760
[0219]	ctctggatc tcaaagaaag ctacaatttt atgaagatag gcatcagctt cctgcaccaa	2820
[0220]	agtgggcaga attagcaaac cttataaata attgtatgga ttatgaacca gatttcaggc	2880
[0221]	cttcttcag agccatcata cgagatctta acagtttgtt tactccagat tatgaactat	2940
[0222]	taacagaaaa tgacatgtta ccaaatatga ggataggtgc ctagggttt tctggtgcct	3000
[0223]	ttgaagaccg ggatcttaca cagtttgaag agagacattt gaaatttcta cagcaacttg	3060
[0224]	gcaagggtaa ttttgggagt gtggagatgt gccggtatga ccctctacag gacaacactg	3120
[0225]	gggaggtggc cgctgtaaaa aagcttcagc atagtactga agagcaccta agagactttg	3180
[0226]	aaagggaaat tgaatcctg aatccctac agcatgacaa cattgtaaag tacaaggag	3240
[0227]	tgtgctacag tgctggtcgg cgtaatctaa aattaattat ggaatattta ccatatggaa	3300
[0228]	gtttacgaga ctatcttcaa aaacataaag aacggataga tcacataaaa cttctgcagt	3360
[0229]	acacatctca gatatgcaag ggtatggagt atcttggtag aaaaaggat atccacaggg	3420
[0230]	atctggcaac gagaaatata ttggtggaga acgagaacag agttaaatt ggagattttg	3480
[0231]	ggttaaccaa agtcttgcca caagacaaag aatactataa agtaaaagaa cctggtgaaa	3540
[0232]	gtccatatt ctggtatgct ccagaatcac tgacagagag caagtttct gtggctcag	3600
[0233]	atgtttggag ctttggagtg gttctgtatg aacttttcac atacattgag aagagtaaaa	3660

[0234]	gtccaccagc ggaatttatg cgtatgattg gcaatgacaa acaaggacag atgacgtgt	3720
[0235]	tccattgat agaactttg aagaataatg gaagattacc aagaccagat ggatgccag	3780
[0236]	atgagatcta tatgatcatg acagaatgct ggaacaataa tgtaaatcaa cgccccctct	3840
[0237]	ttagggatct agctcttoga gtggatcaaa taagggataa catggctgga tgaagaaat	3900
[0238]	gaccttcatt ctgagaccaa agtagattta cagaacaaag ttttatattt cacattgctg	3960
[0239]	tggactatta ttacatatat cattattata taaatcatga tgctagccag caaagatgtg	4020
[0240]	aaaatatctg ctcaaaactt tcaaagtta gtaagttttt cttcatgagg ccaccagtaa	4080
[0241]	aagacattaa tgagaattcc ttagcaagga ttttgaaga agtttcttaa acattgtctg	4140
[0242]	ttaacatcac tcttgtctgg caaaagaaaa aaaatagact tttcaactc agcttttga	4200
[0243]	gacctgaaaa aattattatg taaatttgc aatgttaaag atgcacagaa tatgtatgta	4260
[0244]	tagtttttac cacagtggat gtataatacc ttggcatctt gtgtgatgtt ttacacacat	4320
[0245]	gagggctggt gttcattaat actgttttct aattttcca tagttaatct ataattaatt	4380
[0246]	acttcactat acaacaaat taagatgttc agataattga ataagtacct ttgtgtcctt	4440
[0247]	gttcatttat atcgctggcc agcattataa gcagggtgat acttttagct tgtagtcca	4500
[0248]	tgtactgtaa atattttca cataaagga acaaatgtct agttttattt gtataggaaa	4560
[0249]	tttccctgac ctaaataat acattttgaa atgaacaag cttacaaga tataatctat	4620
[0250]	tttattatgg tttcccttgt atctatttgt ggtgaatgtg tttttaaat ggaactatct	4680
[0251]	ccaattttt ctaagactac tatgaacagt tttcttttaa aattttgaga ttaagaatgc	4740
[0252]	caggaatatt gtcaccttt gagctgctga ctgccaataa cattcttoga tctctgggat	4800
[0253]	ttatgctcat gaactaaatt taagcttaag ccataaaata gattagattg tttttaaaa	4860
[0254]	atggatagct cattaagaag tgcagcaggt taagaatfff ttctaaaga ctgtatattt	4920
[0255]	gaggggttcc agaatttgc attcagctca tagaagagat ttatttctt ttagagggg	4980
[0256]	aatgaggta aataagtaaa aaagtatgct tgtaattttt attcaagaat gccagtagaa	5040
[0257]	aattcataac gtgtatcttt aagaaaaatg agcatacatc ttaaactctt tcaatta	5097
[0258]	<210>3	
[0259]	<211>554	
[0260]	<212>DNA	
[0261]	<213> 人	
[0262]	<220>	
[0263]	<223> 具有 G1849T 突变的 SEQ ID No2 的片段	
[0264]	<400>3	
[0265]	ctcatatgaa ccaaatggtg tttcacaaaa tcagaaatga agatttgata tttaatgaaa	60
[0266]	gccttgcca aggcactttt acaaagatff ttaaaggcgt acgaagagaa gtaggagact	120
[0267]	acggtcaact gcatgaaaca gaagttcttt taaaagttct ggataaagca cacagaaact	180
[0268]	attcagagtc tttctttgaa gcagcaagta tgatgagcaa gctttctcac aagcatttgg	240
[0269]	ttttaatta tggagtatgt ttctgtggag acgagaatat tctggttcag gagttttaa	300
[0270]	aatttggatc actagataca tatctgaaaa agaataaaaa ttgtataaat atattatgga	360
[0271]	aacttgaagt tgctaaacag ttggcatggg ccatgcatff tctagaagaa aacaccctta	420
[0272]	ttcatgggaa tgtatgtgcc aaaaatattc tgcttatcag agaagaagac aggaagacag	480

[0273]	gaaatcctcc tttcatcaaa cttagtgatc ctggcattag tattacagtt ttgccaagg	540
[0274]	acattettca ggag	554
[0275]	<210>4	
[0276]	<211>94	
[0277]	<212>DNA	
[0278]	<213> 人	
[0279]	<220>	
[0280]	<223> 具有 G1849T 突变的 SEQ ID No3 的片段	
[0281]	<400>4	
[0282]	gatgagcaag ctttctcaca agcatttggg tttaaattat ggagtatggt tctgtggaga	60
[0283]	cgagaatatt ctggttcagg agtttgtaaa attt	94
[0284]	<210>5	
[0285]	<211>20	
[0286]	<212>DNA	
[0287]	<213> 人工序列	
[0288]	<220>	
[0289]	<223>PCR 引物 (54804-54823)	
[0290]	<400>5	
[0291]	gggtttcctc agaacgttga	20
[0292]	<210>6	
[0293]	<211>21	
[0294]	<212>DNA	
[0295]	<213> 人工序列	
[0296]	<220>	
[0297]	<223>PCR 引物 (55240-55260)	
[0298]	<400>6	
[0299]	ttgctttcct ttttcacaag a	21
[0300]	<210>7	
[0301]	<211>20	
[0302]	<212>DNA	
[0303]	<213> 人工序列	
[0304]	<220>	
[0305]	<223> 测序引物 (54813-54832)	
[0306]	<400>7	
[0307]	cagaacgttg atggcagttg	20
[0308]	<210>8	
[0309]	<211>27	
[0310]	<212>DNA	
[0311]	<213> 人工序列	

[0312]	<220>		
[0313]	<223> 测序引物 (55207-55233)		
[0314]	<400>8		
[0315]	tgaatagtcc tacagtgttt tcagttt	27	
[0316]	<210>9		
[0317]	<211>21		
[0318]	<212>DNA		
[0319]	<213> 人工序列		
[0320]	<220>		
[0321]	<223>PCR 和测序引物 (1386-1407)		
[0322]	<400>9		
[0323]	caacctcagt gggacaaaga a	21	
[0324]	<210>10		
[0325]	<211>23		
[0326]	<212>DNA		
[0327]	<213> 人工序列		
[0328]	<220>		
[0329]	<223>PCR 和测序引物 (2019-2041)		
[0330]	<400>10		
[0331]	gcagaatatt tttggcacat aca	23	
[0332]	<210>11		
[0333]	<211>42		
[0334]	<212>DNA		
[0335]	<213> 人工序列		
[0336]	<220>		
[0337]	<223>SNP 探针和突变的检测和 siRNA (1829-1870)		
[0338]	<400>11		
[0339]	ttttaatta tggagtatgt gtctgtggag acgagaatat tc	42	
[0340]	<210>12		
[0341]	<211>23		
[0342]	<212>DNA		
[0343]	<213> 人		
[0344]	<220>		
[0345]	<223> 包含 G1849T 突变的序列		
[0346]	<400>12		
[0347]	tatggagtat gtttctgtgg aga	23	
[0348]	<210>13		
[0349]	<211>21		
[0350]	<212>RNA		

[0351]	<213> 人	
[0352]	<220>	
[0353]	<221>misc_feature	
[0354]	<222>(20)..(21)	
[0355]	<223>n 是 T	
[0356]	<220>	
[0357]	<223> 有义 siRNA	
[0358]	<400>13	
[0359]	uggaguaugu uucuguggan n	21
[0360]	<210>14	
[0361]	<211>21	
[0362]	<212>RNA	
[0363]	<213> 人	
[0364]	<220>	
[0365]	<221>misc_feature	
[0366]	<222>(20)..(21)	
[0367]	<223>n 是 T	
[0368]	<220>	
[0369]	<223> 反义 siRNA	
[0370]	<400>14	
[0371]	uccacagaaa cauacu ccan n	21
[0372]	<210>15	
[0373]	<211>21	
[0374]	<212>DNA	
[0375]	<213> 人工序列	
[0376]	<220>	
[0377]	<223> 寡 " S " (有义)	
[0378]	<400>15	
[0379]	ggcagagaga attttctgaa c	21
[0380]	<210>16	
[0381]	<211>21	
[0382]	<212>DNA	
[0383]	<213> 人工序列	
[0384]	<220>	
[0385]	<223> 寡 " R " (反义)	
[0386]	<400>16	
[0387]	gctttccttt ttcacaagat a	21
[0388]	<210>17	
[0389]	<211>25	

[0390]	<212>DNA	
[0391]	<213> 人工序列	
[0392]	<220>	
[0393]	<223>" 传感体 wt"	
[0394]	<400>17	
[0395]	gtctccacag acacatactc cataa	25
[0396]	<210>18	
[0397]	<211>25	
[0398]	<212>DNA	
[0399]	<213> 人工序列	
[0400]	<220>	
[0401]	<223>JAK2 引物	
[0402]	<400>18	
[0403]	aaaaccaaat gcttgtgaga aagct	25
[0404]	<210>19	
[0405]	<211>23	
[0406]	<212>DNA	
[0407]	<213> 人工序列	
[0408]	<220>	
[0409]	<223>cJAK2F	
[0410]	<400>19	
[0411]	gcacacagaa actattcaga gtc	23
[0412]	<210>20	
[0413]	<211>19	
[0414]	<212>DNA	
[0415]	<213> 人工序列	
[0416]	<220>	
[0417]	<223>cJAK2S	
[0418]	<400>20	
[0419]	agcagcaagt atgatgagc	19
[0420]	<210>21	
[0421]	<211>24	
[0422]	<212>DNA	
[0423]	<213> 人工序列	
[0424]	<220>	
[0425]	<223>cJAK2A	
[0426]	<400>21	
[0427]	ctagtgatec aaattttaca aact	24
[0428]	<210>22	

[0429]	<211>21	
[0430]	<212>DNA	
[0431]	<213> 人工序列	
[0432]	<220>	
[0433]	<223>cJAK2R	
[0434]	<400>22	
[0435]	gtttagcaac ttcaagtttc c	21
[0436]	<210>23	
[0437]	<211>25	
[0438]	<212>DNA	
[0439]	<213> 人工序列	
[0440]	<220>	
[0441]	<223>" 传感体 wt"	
[0442]	<400>23	
[0443]	gtctccacag acacatactc cataa	25
[0444]	<210>24	
[0445]	<211>25	
[0446]	<212>DNA	
[0447]	<213> 人工序列	
[0448]	<220>	
[0449]	<223>JAK2 引物	
[0450]	<400>24	
[0451]	aaaaccaa at gcttgtgaga aagct	25
[0452]	<210>25	
[0453]	<211>25	
[0454]	<212>DNA	
[0455]	<213> 人工序列	
[0456]	<220>	
[0457]	<223> 有义引物序列	
[0458]	<400>25	
[0459]	aagctttctc acaagcattt ggttt	25
[0460]	<210>26	
[0461]	<211>26	
[0462]	<212>DNA	
[0463]	<213> 人工序列	
[0464]	<220>	
[0465]	<223> 反义引物序列	
[0466]	<400>26	
[0467]	agaaaggcat tagaaagcct gtagtt	26

[0468]	<210>27	
[0469]	<211>17	
[0470]	<212>DNA	
[0471]	<213> 人工序列	
[0472]	<220>	
[0473]	<223>" 报道基因 1" 的序列 (VIC)	
[0474]	<400>27	
[0475]	tctccacaga cacatac	17
[0476]	<210>28	
[0477]	<211>15	
[0478]	<212>DNA	
[0479]	<213> 人工序列	
[0480]	<220>	
[0481]	<223>" 报道基因 2" 的序列 (FAM)	
[0482]	<400>28	
[0483]	tccacagaaa catac	15
[0484]	<210>29	
[0485]	<211>19	
[0486]	<212>RNA	
[0487]	<213> 人工序列	
[0488]	<220>	
[0489]	<223>siRNA	
[0490]	<400>29	
[0491]	uggaguaugu uucugugga	19
[0492]	<210>30	
[0493]	<211>19	
[0494]	<212>RNA	
[0495]	<213> 人工序列	
[0496]	<220>	
[0497]	<223>siRNA	
[0498]	<400>30	
[0499]	ggaguauguu ucuguggag	19
[0500]	<210>31	
[0501]	<211>19	
[0502]	<212>RNA	
[0503]	<213> 人工序列	
[0504]	<220>	
[0505]	<223>siRNA	
[0506]	<400>31	

[0507] gaguauguuu cuguggaga

19

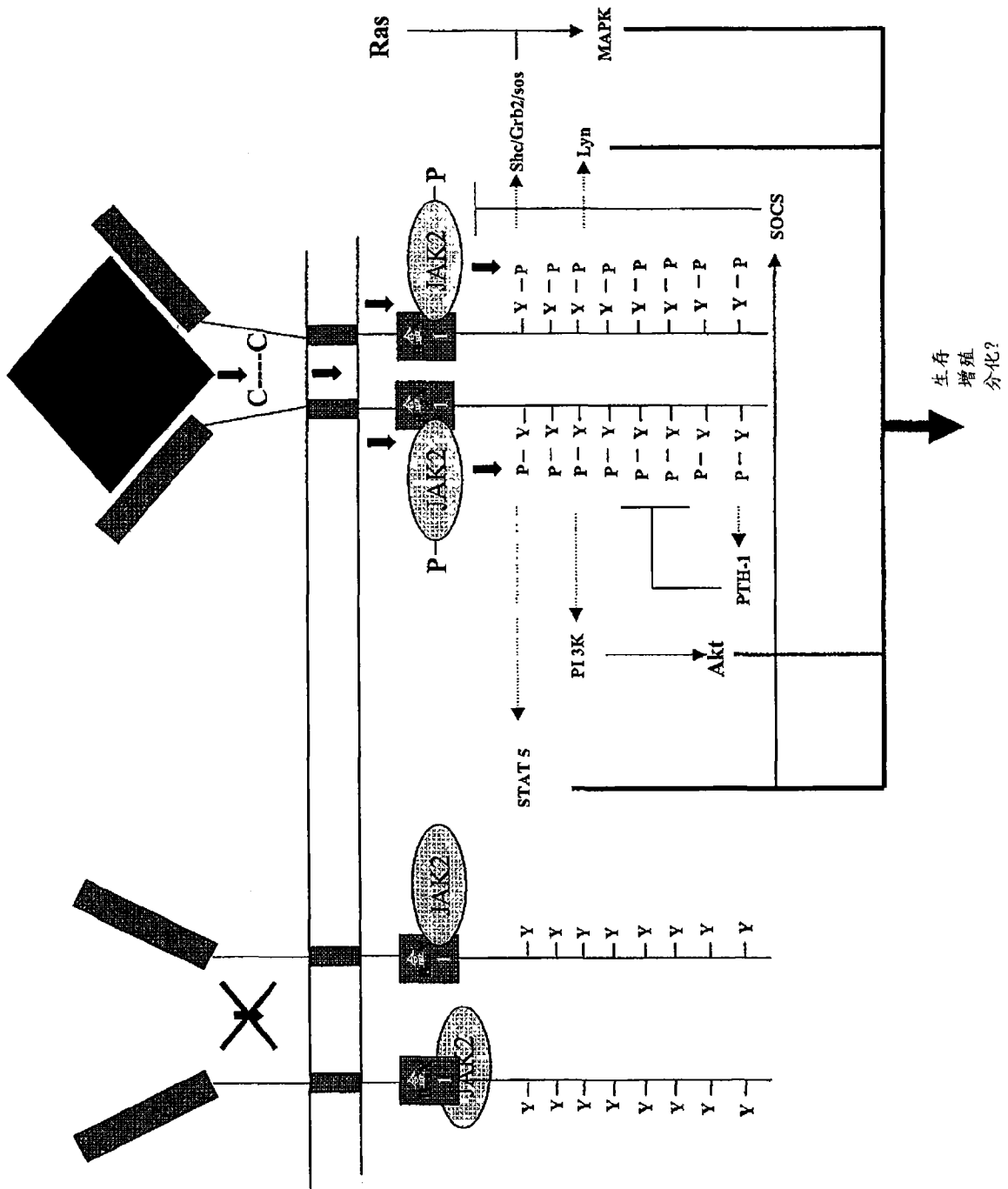


图1

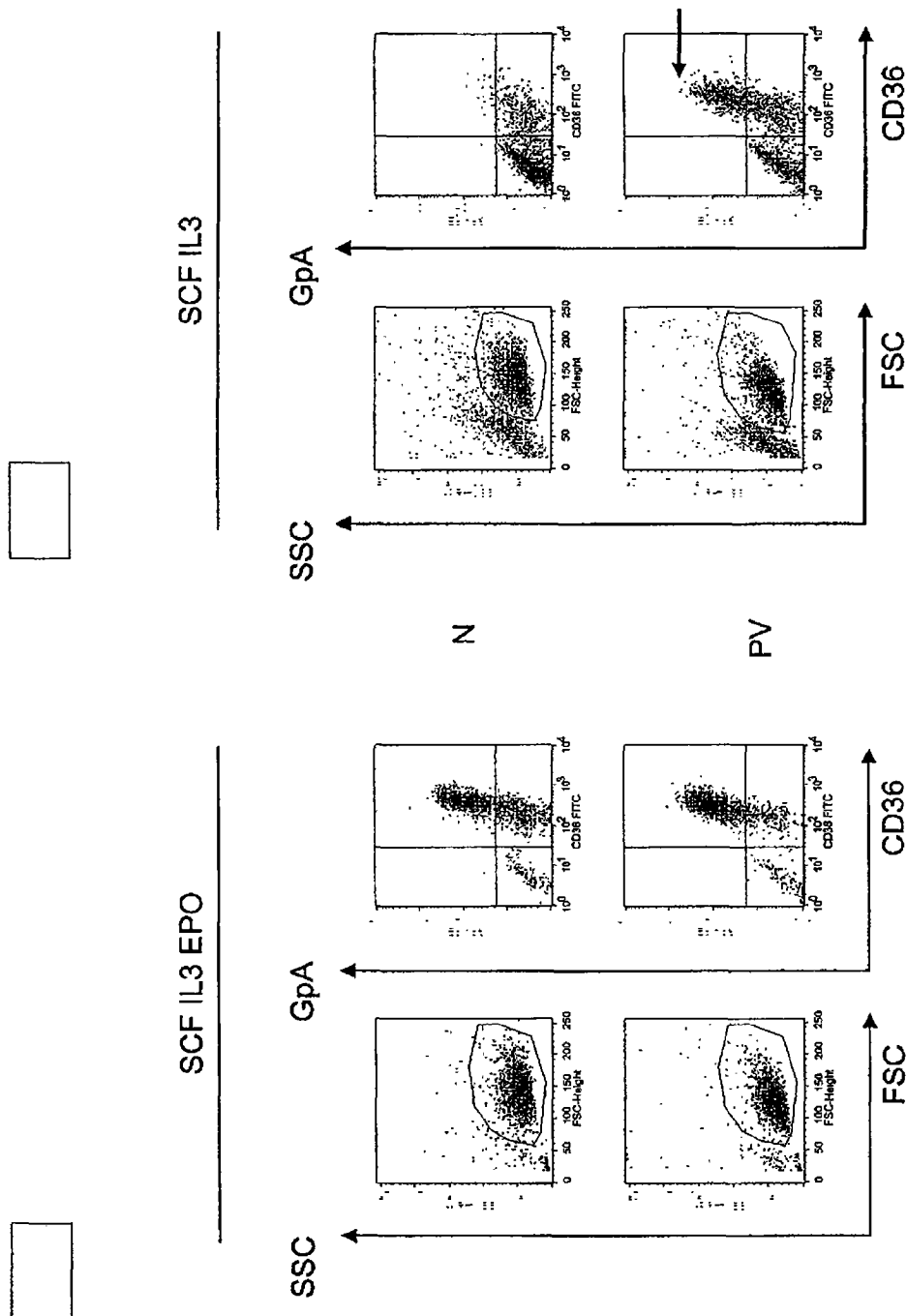


图 2B

图 2A

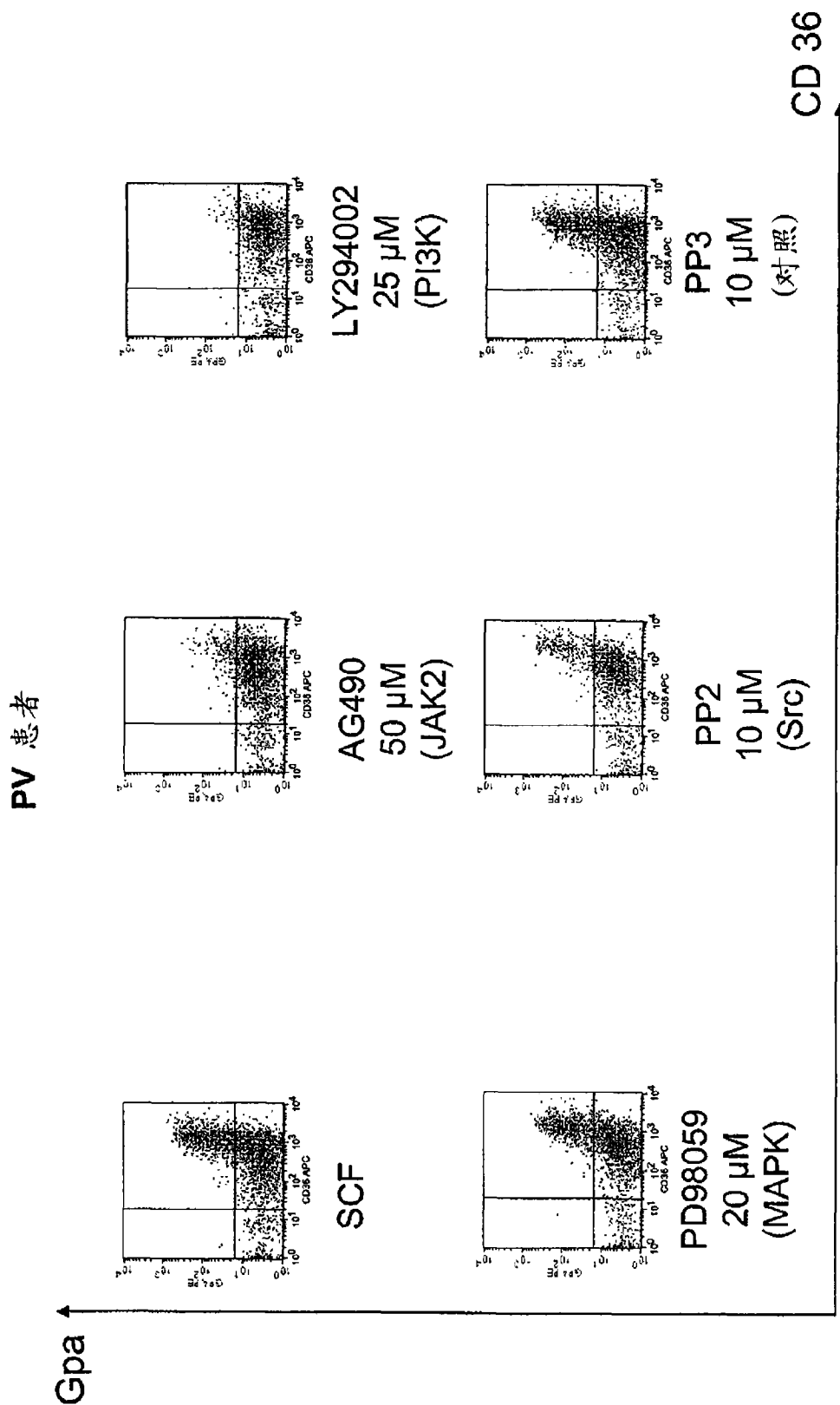


图 3

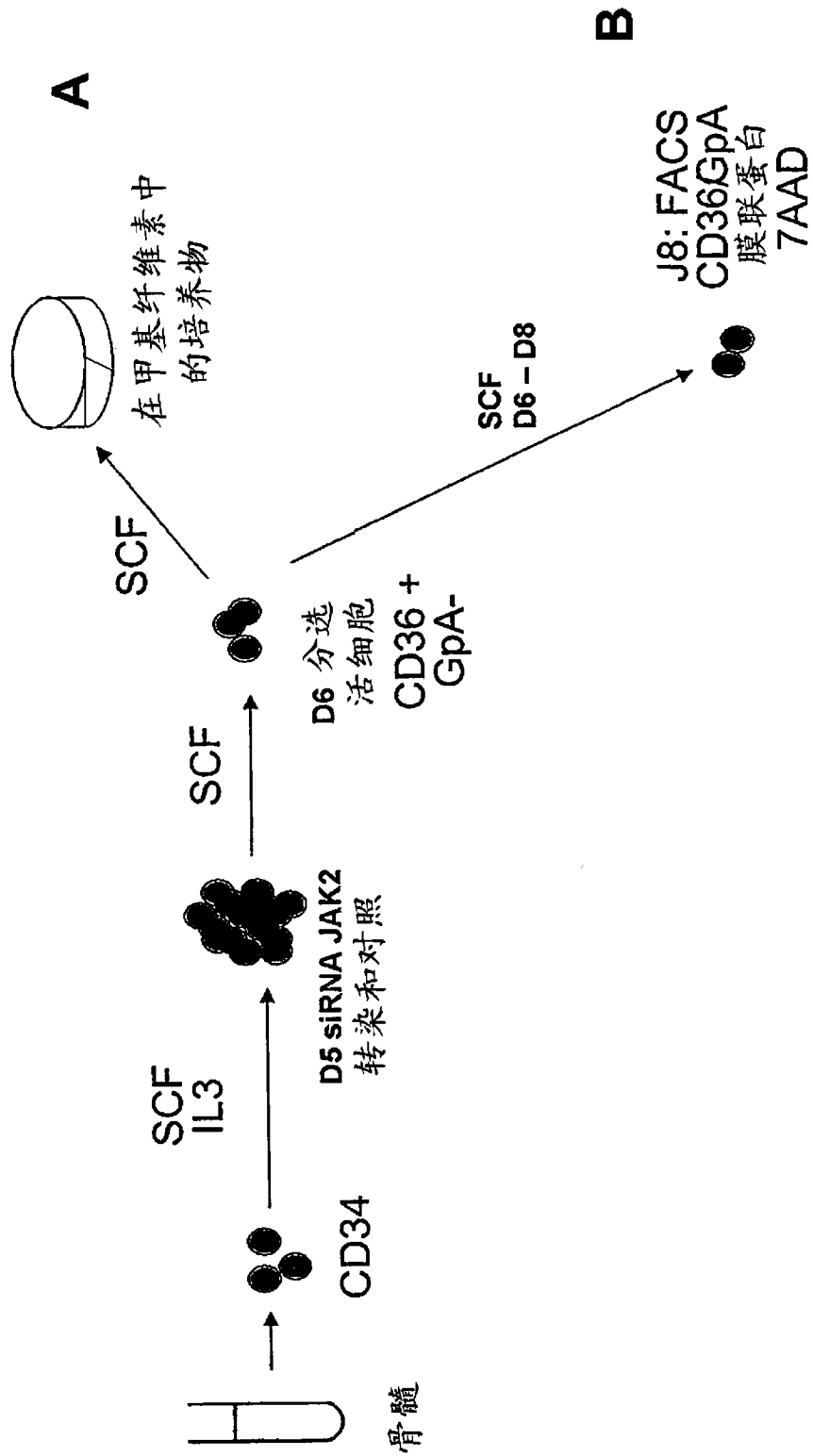


图 4

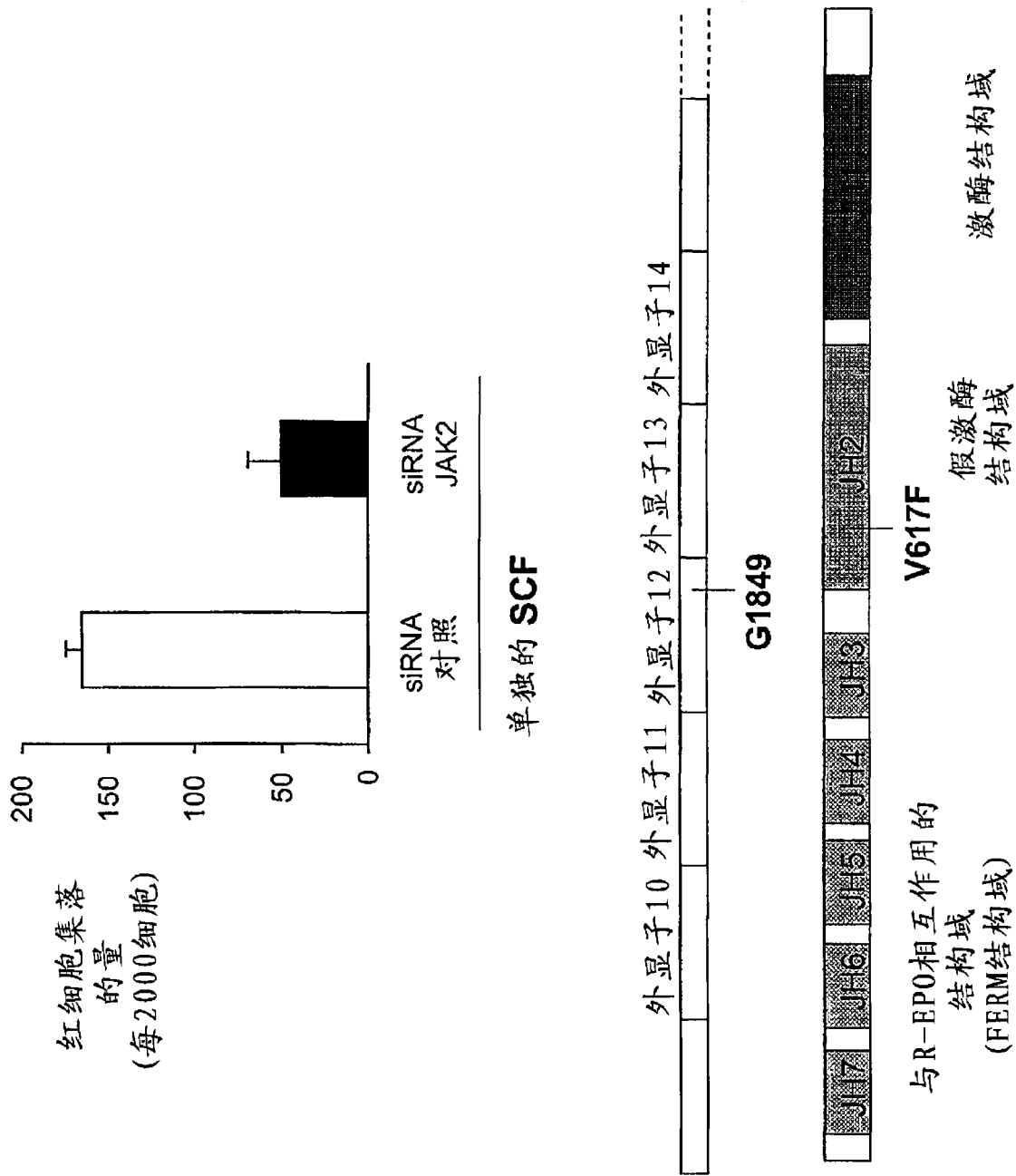


图5

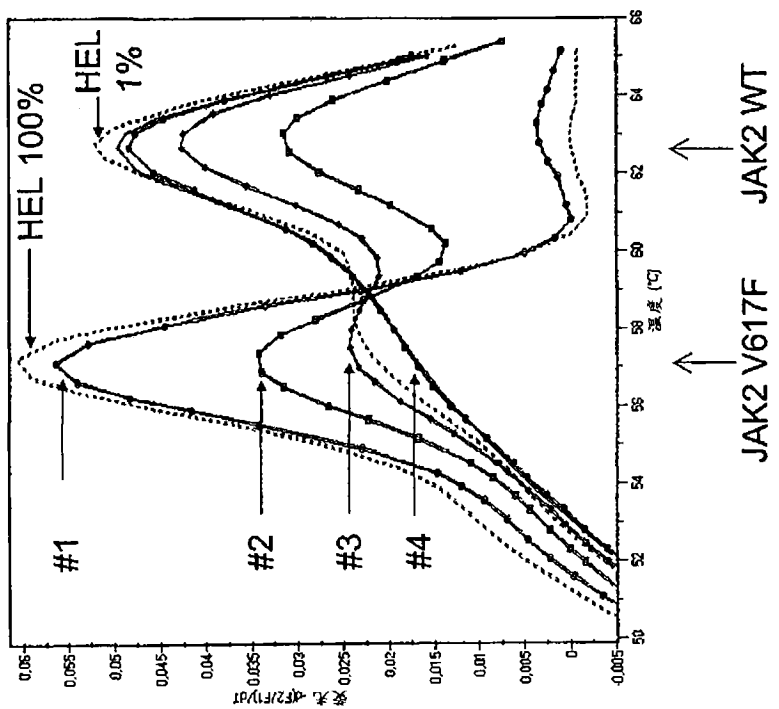


图6B

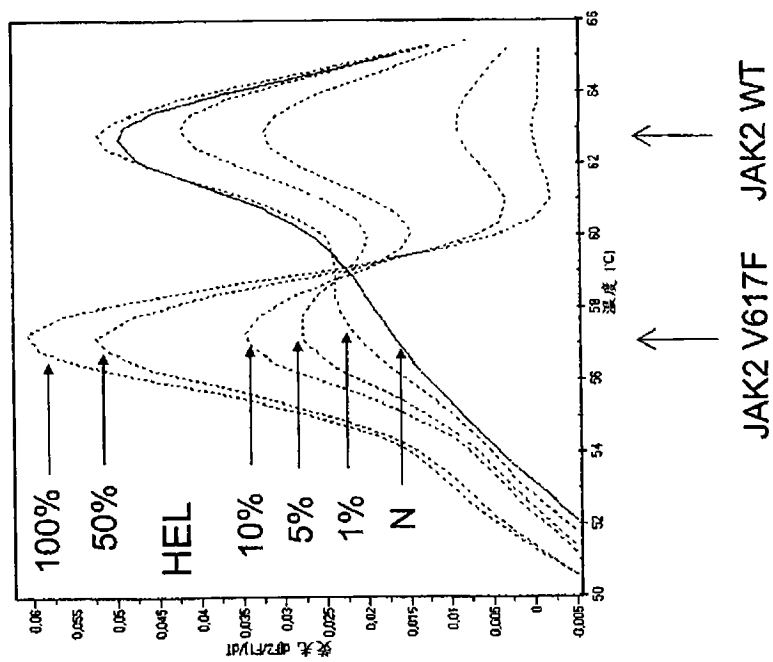


图6A

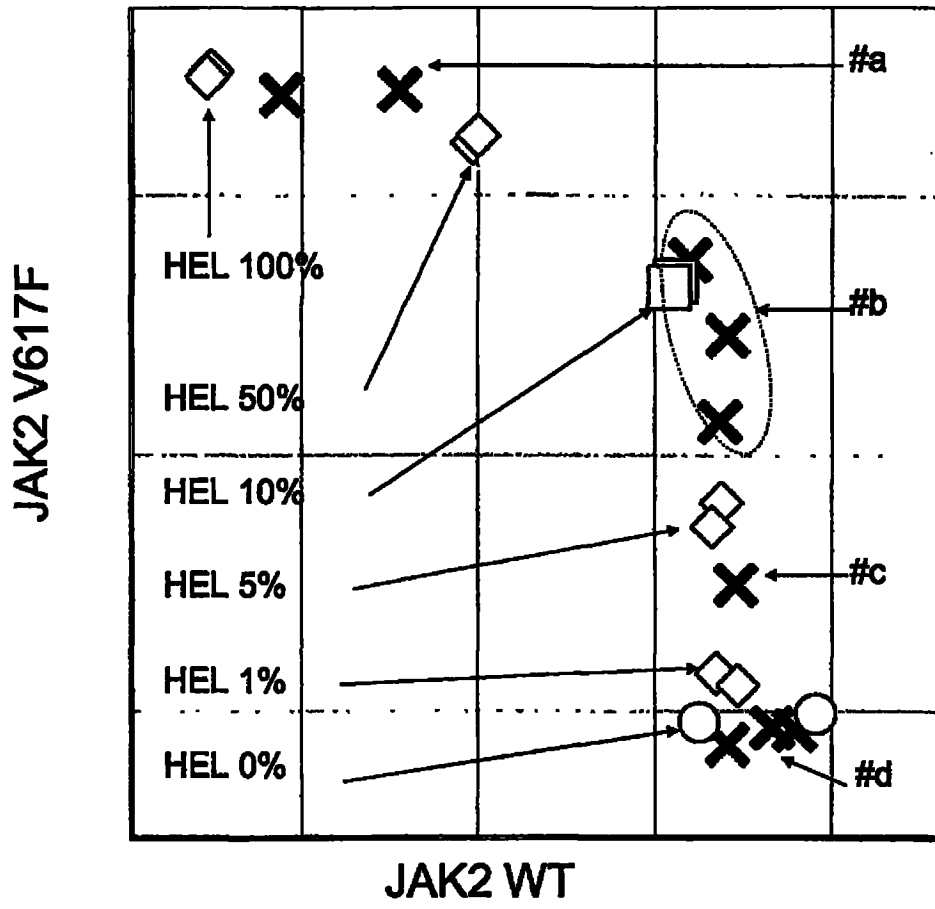


图6C

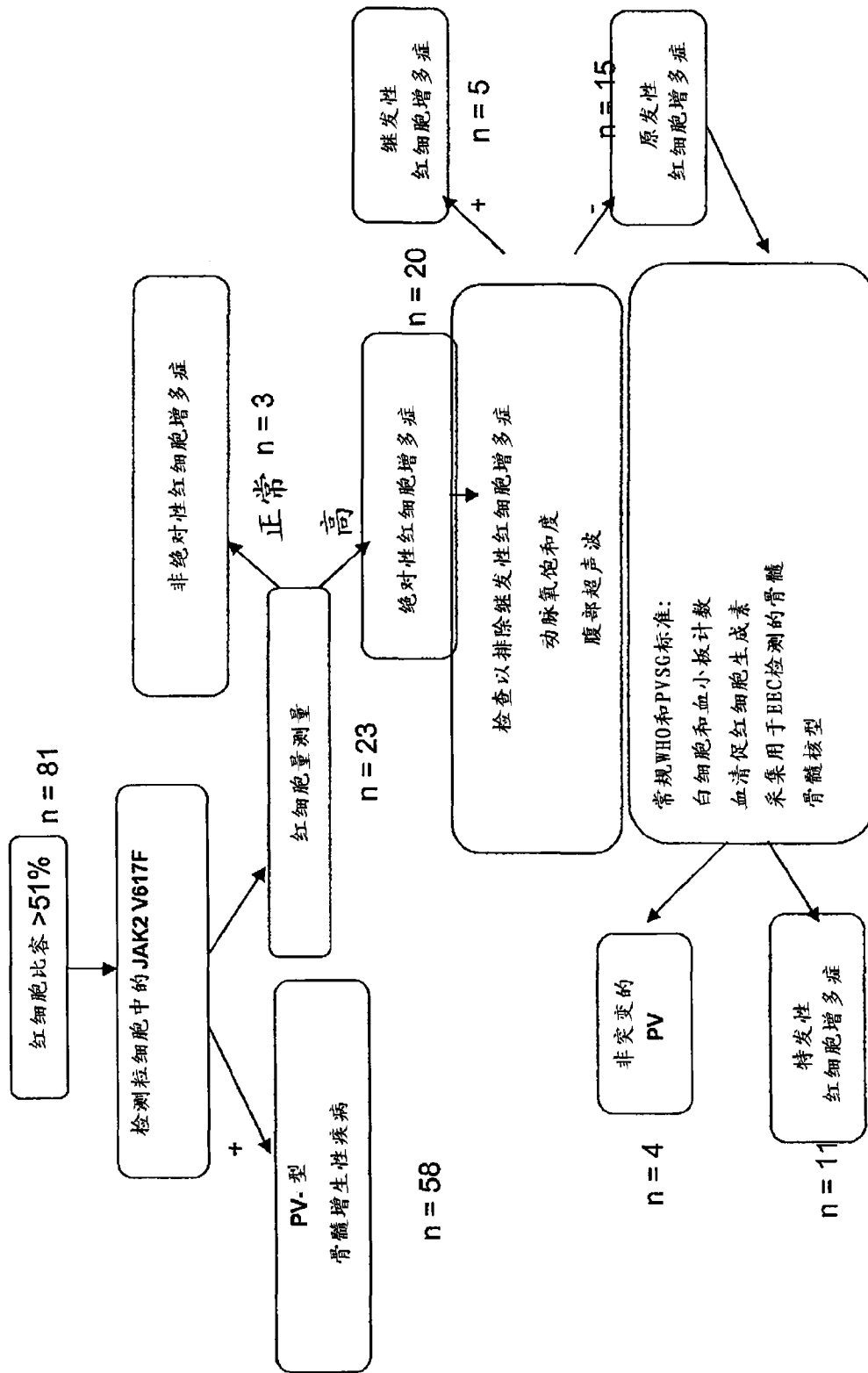


图7

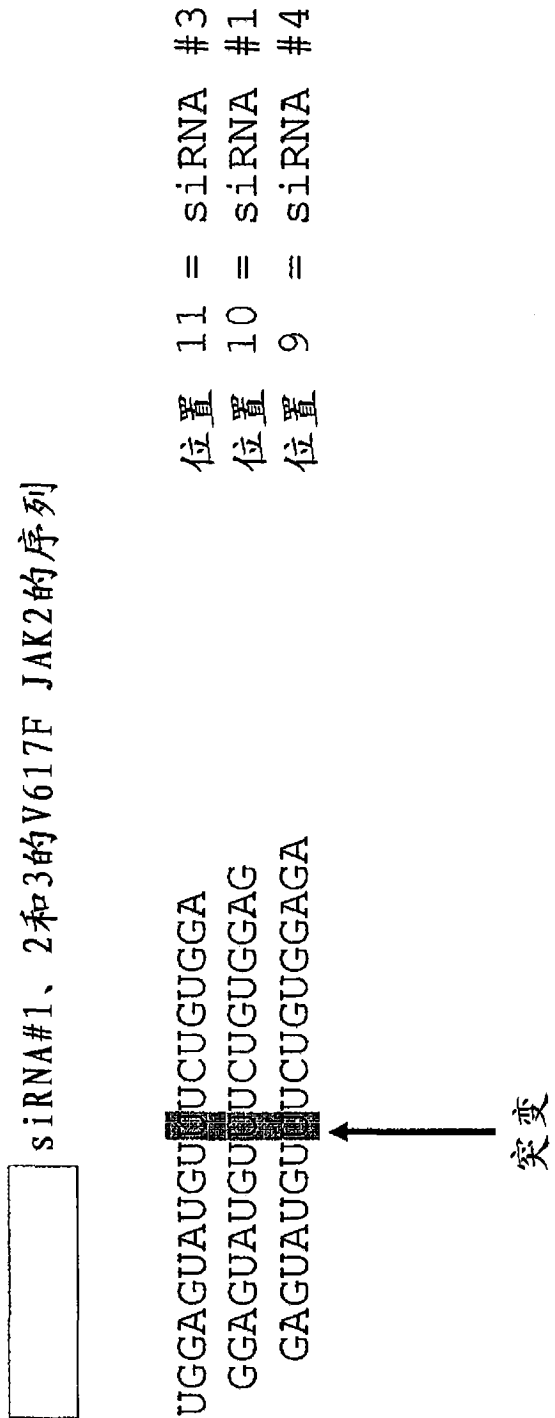


图8

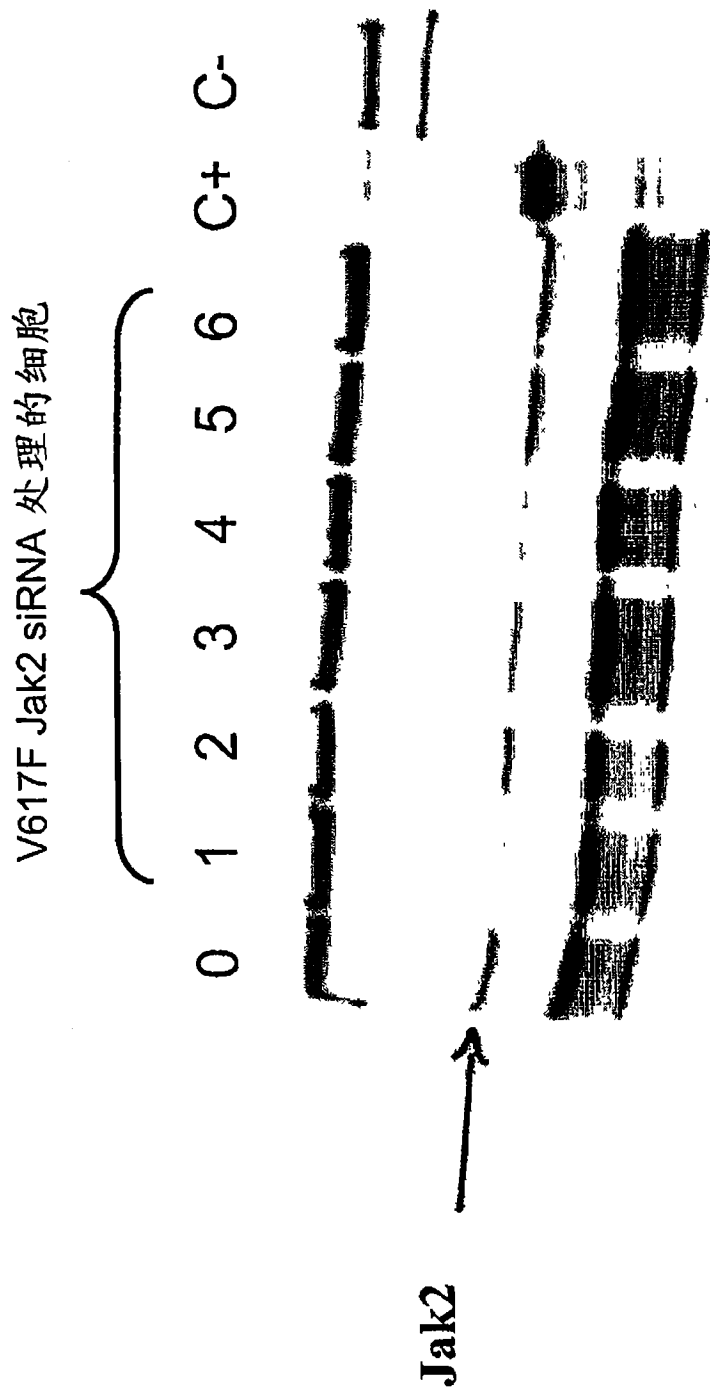
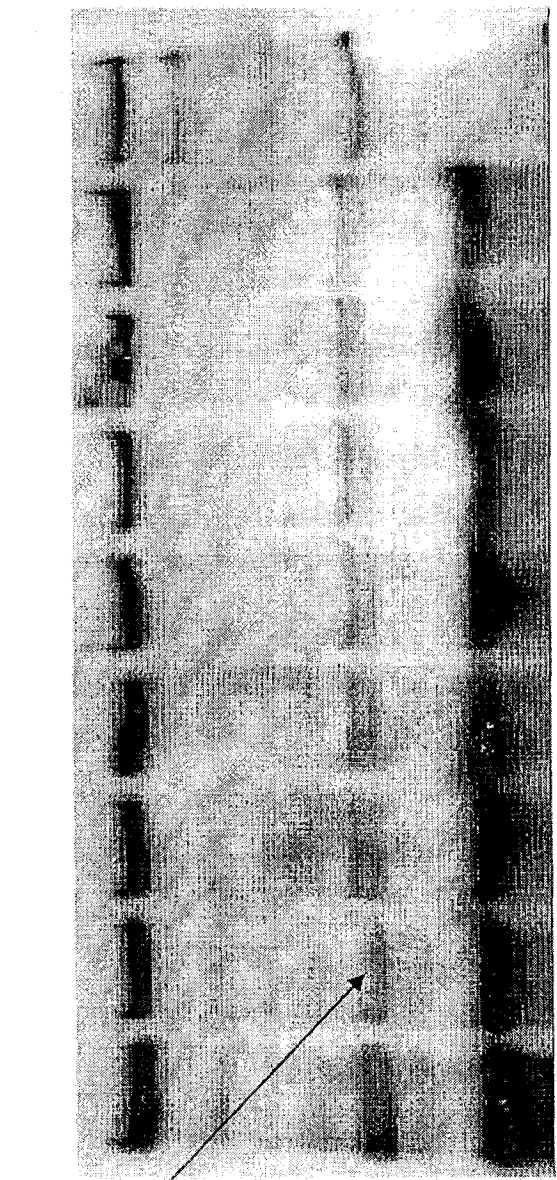


图9

通过非特异性JAK2 V617F siRNA
降低WT JAK2的表达
(阳性对照)



Jak2

图10

专利名称(译)	对真性红细胞增多症中JAK2突变的鉴定		
公开(公告)号	CN101072870B	公开(公告)日	2013-01-30
申请号	CN200580042022.3	申请日	2005-10-26
[标]申请(专利权)人(译)	巴黎国立医院(AH-HP) 国家健康与医学研究院(INSERM) 巴黎第十一大学		
申请(专利权)人(译)	巴黎国立医院(AH-HP) 国家健康与医学研究院(INSERM)		
当前申请(专利权)人(译)	巴黎国立医院(AH-HP) 国家健康与医学研究院(INSERM)		
[标]发明人	威廉瓦因切克尔 瓦莱丽于戈 克洛艾詹姆斯 妮科尔卡萨德瓦尔		
发明人	威廉·瓦因切克尔 瓦莱丽·于戈 克洛艾·詹姆斯 让-皮埃尔·勒·库埃迪克 妮科尔·卡萨德瓦尔		
IPC分类号	C12N9/12 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C12N9/1205 G01N2333/91215 C12Q2600/156 G01N33/57496 G01N2500/04 C12Q1/6813 C12Q1/6883 G01N33/57426 C12N15/113 A61P7/00 A61P19/08 A61P35/00 A61P43/00		
代理人(译)	郑斌		
优先权	2004011480 2004-10-27 FR		
其他公开文献	CN101072870A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及蛋白质酪氨酸激酶JAK2的变体V617F，所述变体是造成真性红细胞增多症的原因。本发明还涉及用于初步诊断红细胞增多症和血小板增多症的方法，由此也同样涉及骨髓增生性综合征或者对所述骨髓增生性综合征中的变体JAK2 V617F的检测，从而能够将他们在新的疾病分类学组中重新分类，并且本发明涉及对特异性抑制剂和siRNA的鉴定。

	WHO 标准		PVSG 标准		WHO 和 PVSG 标准	
	PV n = 61	特发性 红细胞增多症 n = 11	PV n = 45	特发性 红细胞增多症 n = 21	继发性 红细胞增多症 n = 5	Hct > 50% 但是没有 AE n = 3
性别比 (男性/女性)	38/23	11/0	28/17	18/3	4/1	3/0
平均年龄 (范围)	61 (23 to 92)	57 (24 to 81)	58 (23 to 92)	60 (53 to 81)	65 (55 to 77)	48.6
平均 Hct (%) ± 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 (x/10 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
平均血小板计数 (x/10 ⁹) ± σ	463 ± 148	212 ± 38	503 ± 149	245 ± 60.4	212 ± 29	175 ± 19
脾肿大	16/55	0/11	14/39	0/21	0/5	0/3
BEC 存在	59/60	1/11	43/44	11/21	0/5	0/3
低 Epo 水平	39/47	2/8	27/33	10/17	0/3	1/3
正常 Epo 水平	9/47	6/8	6/33	7/17	3/3	0/3
细胞生成异常	7/32	0/3	6/23	0/7	nd	0/1
阳性 JAK2V617F	57/61	0/11	43/45	8/21	0/5	0/3