

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6017136号

(P6017136)

(45) 発行日 平成28年10月26日 (2016. 10. 26)

(24) 登録日 平成28年10月7日 (2016. 10. 7)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 9/12 (2006. 01)	C 1 2 N 9/12
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53 D

請求項の数 25 (全 25 頁)

(21) 出願番号	特願2011-534635 (P2011-534635)	(73) 特許権者	505063050
(86) (22) 出願日	平成21年10月22日 (2009. 10. 22)		クエスト ダイアグノスティックス イン
(65) 公表番号	特表2012-507291 (P2012-507291A)		ヴェストメンツ インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成24年3月29日 (2012. 3. 29)		アメリカ合衆国 1 9 8 9 9 デラウェア
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/061691		州 ウィルミントン, デラウェア アヴェ
(87) 国際公開番号	W02010/051214		ニュー 3 0 0
(87) 国際公開日	平成22年5月6日 (2010. 5. 6)	(74) 代理人	230104019
審査請求日	平成24年10月11日 (2012. 10. 11)	弁護士	大野 聖二
審判番号	不服2014-22811 (P2014-22811/J1)	(74) 代理人	100105991
審判請求日	平成26年11月7日 (2014. 11. 7)	弁理士	田中 玲子
(31) 優先権主張番号	61/110, 501	(74) 代理人	100119183
(32) 優先日	平成20年10月31日 (2008. 10. 31)	弁理士	松任谷 優子
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	12/503, 318		
(32) 優先日	平成21年7月15日 (2009. 7. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 J A K 2 核酸中の変異を検出するための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1の少なくとも17個の連続するヌクレオチドで500未満であるヌクレオチドを含有する、配列番号1のヌクレオチド配列のフラグメントからなる単離された核酸であって、該核酸は配列番号1の変異c2035tを含む、上記核酸。

【請求項 2】

該核酸は配列番号1のヌクレオチド2271-2358のヌクレオチド配列の欠失を含む、請求項1記載の単離された核酸。

【請求項 3】

該ヌクレオチドは下表に示す少なくとも1つの配列番号1の変異を更に含有する、請求項1または2に記載の単離された核酸。

エキソン	JAK2 変異核酸; (コドン変化)	JAK2 変異タンパク質; (アミノ酸変化)
12	a2091t; (aac>tac)	N533Y (Asn → Tyr)
	t2127c; (ttg>gtg)	L545V; (Leu → Val)
	t2133c; (ttt>ctt)	F547L; (Phe → Leu)
13	c2180t; (ggc>ggg)	G562 silent; (Gly)
	g2185t; (cga>cta)	R564L; (Arg → Leu)
	g2185a; (cga>caa)	R564Q; (Arg → Gln)
	t2194c; (gta>gca)	V567A; (Val → Ala)
	c2204t; (tac>tat)	Y570 Silent; (Tyr)
	g2205a; (ggg>agt)	G571S; (Gly → Ser)
	g2205c; (ggg>cgt)	G571R; (Gly → Arg)
	c2229t; (ctt>ttt)	L579F; (Leu → Phe)
	c2253a; (cac>aac)	H587N; (His → Asn)
	c2266t; (tca>tta)	S591L; (Ser → Leu)
14	c2312a; (cac>caa)	H606Q; (His → Gln)
	2271-2358 (exon 14 deletion)	S593-N622
15	t2365c; (ctg>ccg)	L624P; (Leu → Pro)
	a2427g; (ata>gta)	I645V; (Ile → Val)

10

20

【請求項 4】

該核酸は検出可能な標識で標識されている、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の単離された核酸。

【請求項 5】

配列番号2の少なくとも10個の連続するアミノ酸で700未満であるアミノ酸を含有する、配列番号2のアミノ酸列のフラグメントからなるポリペプチドであって、該ポリペプチドは配列番号2の変異T514Mを含む、上記ポリペプチド。

30

【請求項 6】

該ポリペプチドは配列番号2のS593-N622のアミノ酸の欠失を含む、請求項 5 記載のポリペプチド。

【請求項 7】

該ポリペプチドは請求項 3 に規定される表に示す少なくとも 1 つの配列番号2の変異を更に含有する、請求項 5 または 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

該ポリペプチドは検出可能な標識で標識されている、請求項 5 から 7 のいずれかに記載のポリペプチド。

【請求項 9】

40

個体における骨髓増殖性疾患を示す変異をin vitroで検出する方法であって、

a) 該個体由来のサンプルを提供し、ここで、該サンプルは配列番号 1 に示されるJAK2核酸を含有しており；

b) 個体由来の核酸を含有するサンプルをJAK2核酸中の 1 つまたはそれ以上の変異の存在または不在について評価し、ここで、該 1 つまたはそれ以上の変異は配列番号1のc2035t、またはc2035tと請求項 3 に規定される表の変異から成る群から選択される少なくとも 1 つの追加の変異であり；そして

c) 該JAK2核酸が該変異を含有する場合に、それは該個体が骨髓増殖性疾患を有することを示すと同定する、ことを含む、上記方法。

50

【請求項 1 0】

該JAK2核酸は配列番号1のヌクレオチド2271-2358のヌクレオチド配列の欠失を含む、請求項 9 記載の方法。

【請求項 1 1】

JAK2核酸はRNAである、請求項 9 または 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

該サンプルは、血液、血清、および血漿から成る群から選択される、請求項 9 から 1 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3】

前記評価段階 b) が、c2035tと請求項 3 に規定される表に示す少なくとも 1 つの配列番号1の変異の存在または不在についてサンプルを評価することを含有する、請求項 9 から 1 2 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 1 4】

該骨髓増殖性疾患は、真性赤血球増加症、本態性血小板血症、特発性骨髓線維症、および分類不能型骨髓増殖性疾患から成る群から選択される、請求項 9 から 1 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5】

該評価段階は、JAK2核酸を増幅し、そして増幅された核酸をJAK2核酸を特異的に検出することができる検出オリゴヌクレオチドとハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズさせることを含む、請求項 9 から 1 4 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 1 6】

該評価段階はJAK2核酸の増幅および増幅された核酸の直接シーケンシング分析の実施を含む、請求項 9 から 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7】

骨髓増殖性疾患を有すると診断された個体の予後を示す変異をin vitroで検出する方法であって、

(a) 配列番号 1 に示されるJAK2核酸サンプル中の 1 つまたはそれ以上の変異の存在または不在を確認し、ここで、該 1 つまたはそれ以上の変異は配列番号1のc2035t、またはc2035tと請求項 3 に規定される表の変異から成る群から選択される少なくとも 1 つの追加の変異であり；そして

30

(b) JAK2核酸サンプル中に該変異が存在する場合に、それは該個体が予後不良であることを示すと同定する、ことを含む上記方法。

【請求項 1 8】

該JAK2核酸は配列番号1のヌクレオチド2271-235のヌクレオチド配列の欠失を含む、請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

個体における骨髓増殖性疾患を示す変異をin vitroで検出する方法であって、

(a) 個体由来のサンプルを配列番号2に示されるJAK2ポリペプチド中の 1 つまたはそれ以上の変異の存在または不在について評価し、ここで、該 1 つまたはそれ以上の変異は配列番号2のT514M、またはT514Mと請求項 3 に規定される表の変異から成る群から選択される少なくとも 1 つの追加の変異であり；そして

40

(b) JAK2ポリペプチド中に該変異が存在する場合に、それは該個体が骨髓増殖性疾患を有することを示すと同定する、ことを含む上記方法。

【請求項 2 0】

該サンプルは、血液、血清、および血漿から成る群から選択される、請求項 1 7 から 1 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 1】

該JAK2ポリペプチドは請求項 3 に規定される表に示す少なくとも 1 つの配列番号2の変

50

異を更に含有する、請求項 17 から 20 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

該骨髓増殖性疾患は、真性赤血球増加症、本態性血小板血症、特発性骨髓線維症、および分類不能型骨髓増殖性疾患から成る群から選択される、請求項 17 から 21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

該評価段階は、変異型 JAK2 ポリペプチドに特異的に結合する抗体を使用することを含む、請求項 17 から 22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

骨髓増殖性疾患を有すると診断された個体の予後を示す変異を *in vitro* で検出する方法 10
であって、

(a) 該個体からの配列番号 2 に示される JAK2 ポリペプチド・サンプル中の 1 つまたはそれ以上の変異の存在または不在を確認し、ここで、該 1 つまたはそれ以上の変異は配列番号 2 の T514M、または T514M と請求項 3 に規定される表の変異から成る群から選択される少なくとも 1 つの追加の変異であり；そして

(b) JAK2 ポリペプチド中に該変異が存在する場合に、それは該個体が予後不良であることを示すと同定する、
ことを含む上記方法。

【請求項 25】

該 JAK2 ポリペプチドは配列番号 2 の S593-N622 のアミノ酸の欠失を含む、請求項 24 記載の方法。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連特許出願の相互参照

本出願は、米国特許出願第 61/110,501 号（2008 年 10 月 31 日出願）および 12/503,318 号（2009 年 7 月 15 日出願）（それぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に基づく優先権を主張するものである。

【0002】

発明の属する分野

30

本発明は疾病の検出の分野、より具体的には造血障害（例えば骨髓増殖性疾患）を有する患者に有用な組成物および診断法に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

以下の発明の背景に関する記載は単に読者の本発明に関する理解を促すために提供するものであり、本発明の従前技術を記述する、またはそれを構成すると認めるものではない。

【0004】

ヤヌスキナーゼはサイトカイン・シグナル伝達に関与するチロシンキナーゼのファミリーである。例えば JAK2 キナーゼは膜結合型サイトカイン受容体（例えばエリスロポエチン受容体（EpoR））とシグナル伝達経路の下流要素（例えば STAT5（シグナル伝達兼転写活性化因子タンパク質 5））の間の介在物質として作用する。例えば以下参照：Schindler, C.W., J. Clin Invest. 109:1133-1137(2002)；Tefferi および Gilliland, Mayo Clin. Proc. 80:947-958(2005)；Giordanetto および Kroemer, Protein Engineering, 15(9):727-737(2002)。サイトカイン受容体／リガンド複合体がそれに結合する JAK2 キナーゼをリン酸化すると、JAK2 が活性化される（同文献）。その後 JAK2 はその基質分子（例えば STAT5）をリン酸化および活性化し、これが核に入り、他の調節タンパク質と相互作用して転写に作用を及ぼす（同文献；Nelson, M.E., および Steensma, D.P., Leuk. Lymphoma 47:177-194(2006)）。 40

50

【0005】

非CML骨髓増殖性疾患（MPD）（例えば真性赤血球増加症（PV）、本態性血小板血症（ET）、および慢性特発性骨髓線維症（IMF））、および現時点で分類不能とされている骨髓増殖性疾患（MPD-NC）を含むある種の造血疾患は血液細胞の異常増加を特徴とする。例えばVainchenkerおよびConstantinescu, Hematology(American Society of Hematology), 195-200(2005)参照。この増加は一般に、骨髓にある多能性造血幹細胞の偶発突然変異によって開始される（同文献）。突然変異により、幹細胞は特定の系列の血液細胞を正常よりはるかに多く生成し、それによって赤血球細胞、巨核球、顆粒球、および単球などの細胞の過剰生成が起こる。MPD患者に共通する症状には脾腫大、肝腫大、白血球、赤血球、および／または血小板数の増加、凝血（血栓）、脱力感、目まい、および頭痛がある。PV、ET、およびIMFのような疾患は白血病の前兆であり得るが、（例えば急性転化に至るまでの）病態変化の速度は各疾患によって異なる（同文献）。長い間、変異および他の遺伝子変更によるプロテイン・チロシンキナーゼ（PTK）伝達の摂動はMPDと関係すると考えられてきた。変異型PTK（例えばヤヌスキナーゼ2（JAK2）遺伝子変異）は、MPD患者において構成的に活性となりうる。

10

【0006】

多くのMPDに関与する特定の遺伝子およびそれに付随する突然変異（単数または複数）は知られていない。しかしながら、細胞質性非受容体型チロシンキナーゼであるヤヌスキナーゼ2（JAK2）遺伝子のある1つの変異が多くのMPDで同定されている。このJAK2のV617F変異の発見はMPDの分子病態解明における画期的な出来事であった。例えばこの変異は97%に上るPV患者、また、ETまたはIMF患者の40%以上で報告されている。例えば以下参照：Baxterら, Lancet 365:1054-1060(2005)；Jamesら, Nature 438:1144-1148(2005)；Zhaoら, J. Biol. Chem. 280(24):22788-22792(2005)；Levineら, Cancer Cell, 7:387-397 (2005)；Kralovicsら, New Eng. J. Med. 352(17):1779-1790(2005)；Jonesら, Blood 106:2162-2168(2005)；Steensmaら, Blood 106:1207-2109 (2005)。

20

【0007】

種々の異なるアプローチおよび多くの証拠により、JAK2 V617F変異は、これが存在する場合、MPDの発病機序に関与することが示唆されている。例えばKaushansky, Hematology (Am Soc Hematol Educ Program), 533-7 (2005) 参照。変異は血液サンプル、骨髓、および口腔サンプルから検出されており（例えば以下参照：Baxterら, Lancet 365:1054-1060 (2005)；Jamesら, Nature 438:1144-1148 (2005)；Zhaoら, J. Biol. Chem. 280(24):22788-22792 (2005)；Levineら, Cancer Cell, 7:387-397 (2005)；Kralovicsら, New Eng. J. Med. 352(17):1779-1790 (2005)）、ホモ接合体およびヘテロ接合体細胞集団がMPD患者で報告されている。Baxterら, Lancet 365:1054-1060 (2005)。

30

【0008】

JAK2 V617F置換はJAK2の偽キナーゼ・ドメインに位置するが、これはそのキナーゼ活性の自己阻害を低減して構成的に活性なキナーゼとし、下流のJAK2-STATシグナル伝達経路を増強する（例えばSaharinenら, Mol Cell Biol 20:3387-3395 (2000)；Saharinenら, Mol. Biol Cell 14:1448-1459 (2003)参照）。ヒトにおける他のJAK2変異（転座、点変異、欠失、および挿入など）が報告されている。例えばScottら, N Engl J Med 356:459-468 (2007)；Liら, Blood 111:3863-3866 (2008)を参照されたい。

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Schindler, C.W., J. Clin Invest. 109:1133-1137(2002)

【非特許文献2】TefferiおよびGilliland, Mayo Clin. Proc. 80:947-958(2005)

【非特許文献3】GiordanettoおよびKroemer, Protein Engineering, 15(9):727-737(2002)

【非特許文献4】Nelson, M.E., およびSteensma, D.P., Leuk. Lymphoma 47:177-194(2006)

【非特許文献5】VainchenkerおよびConstantinescu, Hematology(American Society of Hematology), 195-200(2005)

50

【非特許文献 6】Baxterら, Lancet 365:1054-1060(2005)
 【非特許文献 7】Jamesら, Nature 438:1144-1148(2005)
 【非特許文献 8】Zhaoら, J. Biol. Chem. 280(24):22788-22792(2005)
 【非特許文献 9】Levineら, Cancer Cell, 7:387-397 (2005)
 【非特許文献 10】Kralovicsら, New Eng. J. Med. 352(17):1779-1790(2005)
 【非特許文献 11】Jonesら, Blood 106:2162-2168(2005)
 【非特許文献 12】Steensmaら, Blood 106:1207-2109 (2005)
 【非特許文献 13】Kaushansky, Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) ,533-7 (2005)

【非特許文献 14】Saharinenら, Mol Cell Biol 20:3387-3395 (2000)

10

【非特許文献 15】Saharinenら, Mol. Biol Cell 14:1448-1459 (2003)

【非特許文献 16】Scottら, N Engl J Med 356:459-468 (2007)

【非特許文献 17】Liら, Blood 111:3863-3866 (2008)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明の概要

本発明はJAK2遺伝子およびJAK2タンパク質中の新規の変異の同定に基づく。特に、JAK2遺伝子およびタンパク質変異には表2に示す変異が含まれる。更に本発明は、造血疾患（例えば骨髄増殖性疾患）の診断および予後診断に有用な組成物および方法を提供する。

20

【0011】

ある観点では、本発明はSEQ ID NO:1の少なくとも17個のヌクレオチドを含む単離された核酸を提供し、ここでフラグメントは表2に示す変異から選択される変異を有し、単離された核酸は5000ヌクレオチド未満である。ある態様では、単離された核酸は少なくとも1つの更なる表2の変異を有する。別の態様では、単離された核酸は検出可能な標識で標識される。

【0012】

第2の観点では、本発明はSEQ ID NO:2の少なくとも10個の連続するアミノ酸のポリペプチドを提供し、ここでポリペプチドは表2に示す変異から選択される変異を有し、ポリペプチドは1100アミノ酸未満である。ある態様では、ポリペプチドは少なくとも1つの更なる表2の変異を有する。別の態様では、フラグメントは検出可能な標識で標識される。

30

【0013】

別の観点では、本発明は個体における造血疾患の診断法を提供し、該方法は以下を含む：a) 該個体由来のサンプルを提供すること（ここで、該サンプルはJAK2核酸を含有する）、b) 個体由来サンプルをJAK2核酸中の1つまたはそれ以上の変異の存在または不在について評価すること（ここで、1つまたはそれ以上の変異は表2の変異から成る群から選択される）、およびc) JAK2核酸が少なくとも1つの変異を含有する場合に、個体が造血疾患を有すると同定すること。

【0014】

別の観点では、本発明は造血疾患を有すると診断された個体の予後診断を行う方法を提供し、該方法は以下を含む：(a) JAK2核酸サンプル中の1つまたはそれ以上の変異の存在または不在を確認すること（ここで、1つまたはそれ以上の変異は表2の変異から成る群から選択される）；および(b) JAK2核酸サンプル中に1つまたはそれ以上の変異が存在する場合に、個体が予後不良であると同定すること。

40

【0015】

別の観点では、本発明は造血障害を有する個体の治療法を選択する方法を提供し、該方法は以下を含む：個体由来の核酸含有サンプルをJAK2核酸中の1つまたはそれ以上の変異の存在または不在について評価すること（ここで、1つまたはそれ以上の変異は表2に示す変異から成る群から選択される）、およびJAK2核酸中の変異に基づいて治療法を選択すること。

50

【0016】

上記の本発明の観点のいくつかの態様では、JAK2核酸はRNAである。上記の本発明の観点の他の態様では、1つまたはそれ以上の変異の存在または不在はSEQ ID NO:1と比較して行うことができる。上記の本発明の観点の特定の態様では、JAK2核酸は表2に示す変異を2つまたはそれ以上含有する。

【0017】

上記の本発明の観点の更に別の態様では、JAK2核酸サンプル中の1つまたはそれ以上の変異の存在または不在の評価または確認は、JAK2核酸を増幅すること、および、増幅したJAK2核酸をJAK2核酸変異体配列を特異的に検出できる検出オリゴヌクレオチドとハイブリダイズ条件下でハイブリダイズさせることを含む。上記の本発明の観点の他の態様では、JAK2核酸サンプル中の1つまたはそれ以上の変異の存在または不在の評価または確認は、JAK2核酸の増幅および増幅した核酸の直接シーケンシング分析の実施を含む。

10

【0018】

別の観点では、本発明は個体における造血疾患の診断法を提供し、該方法は以下を含む：a) 個体由来のポリペプチド含有サンプルをJAK2ポリペプチド中の1つまたはそれ以上の変異の存在または不在について評価すること（ここで、1つまたはそれ以上の変異は表2の変異から成る群から選択される）、およびb) JAK2ポリペプチドが少なくとも1つの変異を含有する場合に、個体が造血疾患を有すると同定すること。

【0019】

別の観点では、本発明は造血疾患を有すると診断された個体の予後を判定する方法を提供し、該方法は以下を含む：(a) JAK2ポリペプチド・サンプル中の1つまたはそれ以上の変異の存在または不在を確認すること（ここで、1つまたはそれ以上の変異は表2の変異から成る群から選択される）；および(b) JAK2ポリペプチド中に1つまたはそれ以上の変異が存在する場合に、個体が予後不良であると同定すること。

20

【0020】

ある観点では、本発明は造血障害を有する個体の治療法を選択する方法を提供し、該方法は以下を含む：個体由来のポリペプチド含有サンプルをJAK2ポリペプチド中の1つまたはそれ以上の変異の存在または不在について評価すること（ここで、1つまたはそれ以上の変異は表2に示す変異から成る群から選択される）、およびJAK2ポリペプチド中の変異に基づいて治療法を選択すること。

30

【0021】

上記の本発明の観点のいくつかの態様では、1つまたはそれ以上の変異の存在または不在はSEQ ID NO:2と比較して行うことができる。上記の本発明の観点の特定の態様では、JAK2ポリペプチドは表2に示す変異を2つまたはそれ以上含有する。上記の本発明の観点の特定の態様では、サンプルの評価またはJAK2ポリペプチド・サンプル中の1つもしくはそれ以上の変異の存在もしくは不在の確認は、変異型JAK2ポリペプチドに特異的に結合する抗体の使用を含む。

【0022】

上記の本発明の観点のいくつかの態様では、JAK2核酸および／またはポリペプチド・サンプルは患者からの生体液由来であり、好ましくはサンプルは血液、血清、または血漿である。

40

【0023】

上記の本発明の観点の特定の態様では、疾患は骨髄増殖性疾患であり、より好ましくは骨髄増殖性疾患は真性赤血球増加症、本態性血小板血症、特発性骨髄線維症、または分類不能型骨髄増殖性疾患である。

【0024】

「腫瘍性疾患」という用語は、新細胞（例えば腫瘍）の異常増殖を特徴とする症状を指す。新生物には固形腫瘍および非固形腫瘍、例えばカルシノーマ、肉腫、白血病などがある。腫瘍性疾患は悪性または良性のいずれであってもよい。

【0025】

50

「骨髄増殖性疾患 (MPD)」または「骨髄増殖性障害」という用語は、造血幹細胞またはその子孫から生じる非リンパ球異形性または腫瘍性症状を含むことを意図する。「MPD患者」にはMPDであると診断された患者が含まれる。「骨髄増殖性疾患」はは特定の分類型の骨髄増殖性疾患 (例えば真性赤血球増加症 (PV)、本態性血小板血症 (ET)、および特発性骨髄線維症 (IMF)) を含むことを意図する。定義には好酸球増加症候群 (HES)、慢性好中球性白血病 (CNL)、骨髄様化生を合併する骨髄硬化 (MMM)、慢性骨髄単球性白血病 (CMML)、若年性骨髄単球性白血病、慢性好塩基球性白血病、慢性好酸球性白血病、および全身性肥満細胞症 (SM) も含まれる。「骨髄増殖性疾患」は分類不能型骨髄増殖性疾患 (UMPDまたはMPD-NC) も含むことを意図する。

【0026】

10

本明細書で使用する「診断する」または「診断」または「診断すること」という用語は、疾患、症候群、もしくは疾病の鑑別もしくは同定、または特定の疾患、症候群、もしくは疾病を有する人の鑑別もしくは同定をいう。

【0027】

本明細書で使用する「予後診断の判定」とは、患者における症状の経過または転帰を予測する過程をいう。「予後診断」という用語は、100%の確度で症状の経過または転帰を予測する能力をいうものではなく、所定の症状／マーカーを示す患者においてある種の経過または転帰が起こる確率が、そのような症状を示さない個体に比較して高い、または低いと同定することをいう。予後診断の本質は特定の疾患および評価すべき症状／マーカーによって異なる。例えば、予後診断は患者が生存できると期待できる期間、疾患が寛解に向かう可能性、または疾患が寛解状態を保持すると期待できる期間として表してもよい。

20

【0028】

本明細書で使用する「治療」、「治療すること」、または「治療する」という用語は、疾患または外傷を緩和することを意図する手段または適用によるケアを指す。疾病または疾患 (例えば骨髄増殖性疾患) の治療によって疾病が改善されることが好ましいが、本明細書で使用する治療という用語は、手段または適用によって特定の疾病に伴う症状が必ずしも寛解されることを示唆、含意、または必要としない。患者の治療によって、有害な副作用が起こるか、または治療による改善を意図した疾病が悪化することさえありうる。

【0029】

「被験体」とは、本明細書に記載するプライマーおよび方法を用いて増幅できるJAK2遺伝子を有するヒトまたは他の任意の動物を意味する。被験体は患者 (疾病の診断または治療のために医療提供者の元を訪れる人) であってもよい。ヒトには出生前および出生後のヒトが含まれる。

30

【0030】

本明細書で使用する「患者」という用語は、医療的ケア、配慮、または処置を受ける人をいう。本明細書の使用では、この用語は疾患 (例えば骨髄増殖性疾患) を有すると診断された人、並びに疾患の兆候を示すがまだ診断されていない人を包含することを意図する。

【0031】

「サンプル」または「患者サンプル」は組織および体液のような生体サンプルを含むことを意図する。「体液」には、それに限定されるわけではないが血液、血清、血漿、唾液、脳脊髄液、胸膜液、涙、乳管液 (lactal duct fluid)、リンパ液、喀痰、尿、羊水、および精液がある。サンプルには「無細胞」の体液が含まれてもよい。「無細胞体液」は全細胞物質の含有量が約1% (w/w) 未満である。血漿または血清は無細胞体液の例である。サンプルには天然または合成起源の標本が含まれてもよい。

40

【0032】

「核酸」または「核酸配列」という用語は、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、またはポリヌクレオチド、およびそれらのフラグメントまたは部分を指し、これらは1本鎖または2本鎖であってもよく、センスまたはアンチセンス鎖であってもよい。核酸はDNAまたはRNAであってもよく、天然または合成起源のものであってもよい。例えば核酸はmRNA

50

、ゲノムDNA、またはcDNAであってもよい。核酸は（例えばポリメラーゼ連鎖反応を用いて）増幅された核酸であってもよい。慣例法である「NTwt###NTmut」は、核酸中の###位が変異体NTmutで置換された野生型ヌクレオチドNTwtを生ずる変異を示すのに用いられる。

【0033】

JAK2核酸配列では、「変異」は参照配列GenBankアクセッション番号NM_004972 (SEQ ID NO:1)と比較して少なくとも1つの核酸の変化を含むJAK2核酸配列を意味する。JAK2核酸中の変異はコードされたポリペプチド配列に変化をもたらしてもよく、またはコードされたポリペプチド配列に関してサイレントであってもよい。アミノ酸配列中の変化は参照アミノ酸配列としてSEQ ID NO:2と比較して判定してもよい。

10

【0034】

本明細書で使用する“接合状態”という用語は、サンプル、細胞集団、または生物体が当該分野で知られる試験法および本明細書に記載する試験法による測定でヘテロ接合性、ホモ接合性、またはヘミ接合性であると考えられることをいう。「核酸の接合状態」という用語は核酸の供与源がヘテロ接合性、ホモ接合性、またはヘミ接合性のいずれであると考えられるかを判定することを意味する。「接合状態」は配列中の1つのヌクレオチドの相違を指すことができる。ある方法では、1つの変異に関するサンプルの接合状態をホモ接合野生型、ヘテロ接合（すなわち野生型対立遺伝子1つと変異型対立遺伝子1つ）、ホモ接合変異型、またはヘミ接合（すなわち1コピーの野生型または変異型対立遺伝子のいずれか）に分類することができる。臨床検査で慣例的に行われる血漿または細胞サンプルの直接シーケンシングでは信頼性のあるヘミ接合体およびホモ接合体の識別は為されないため、ある態様では、これらの種類をグループ化する。例えば野生型核酸が検出されないか、または最少量で検出されるサンプルを「ヘミ接合／ホモ接合変異体」と称する。ある態様では、“最少量”とは約1-2%である。他の態様では、最少量は約1-3%である。更に別の態様では、「最少量」は1%未満である。

20

【0035】

本明細書で使用する「実質的に全ての」という用語は少なくとも約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、または約100%を意味する。

【0036】

核酸に関して本明細書で使用する「実質的に純粋な」とは、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%の核酸がサンプル中に存在することを示す。核酸サンプルは溶液中に存在するか、または乾燥標品であってもよい。

30

【0037】

「単離された」とは、核酸（例えばオリゴヌクレオチド、例えばRNA、DNA、または混合ポリマー）に関して使用する場合、天然に存在するゲノムの大部分から分離されている、そして／または天然でそれらの核酸と共に存在する他の細胞成分から実質的に分離されている核酸を意味する。例えば、（例えば一連の塩基縮合によって）合成された核酸は単離されているとみなされる。同様に、組換え発現、クローニング、プライマー伸長反応による生成（例えばPCR）、またはゲノムからの切り出しが行われた核酸も単離されていると

40

【0038】

本明細書で使用する「フラグメント」とは、少なくとも約15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、200、300、400、500、1000またはそれ以上のヌクレオチド長であるポリヌクレオチドを意味する。

【0039】

「特異的ハイブリダイゼーション」とは、2つの核酸配列が高度の相補性を共有することを示す。特異的ハイブリダイゼーション複合体は許容されるアニーリング条件下で形成され、その後の洗浄段階後もハイブリダイズしたままである。当業者は核酸配列のアニーリングの許容条件を慣例的に決定することができ、これは例えば約6xSSCの存在中65℃で

50

ある。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、一部には、洗浄段階が実施される温度で表してもよい。それらの温度は一般に、所定のイオン強度およびpHでの特定の配列の融解温度 (T_m) より約5°Cから20°C低くなるように選択する。 T_m は、(所定のイオン強度およびpHにおいて) 50%の標的配列が完全にマッチするプローブにハイブリダイズする温度である。 T_m の計算式および核酸のハイブリダイゼーション条件は当該分野で知られている。

【0040】

「実質的に相補的な」とは、特異的にハイブリダイズする2つの配列を意味する。当業者に理解されるように、実質的に相補的な配列は、必ずしもその全長にわたってハイブリダイズする必要はない。

10

【0041】

標的核酸を特異的に増幅する(すなわち特定の標的核酸配列を増幅する)または特異的に検出する(すなわち特定の標的核酸配列を検出する)ためのプライマーまたはプローブとして使用するオリゴヌクレオチドは、一般に、標的核酸に特異的にハイブリダイズする能力を有する。

【0042】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、主に所定の間隔で配列された同一の単量体ユニットから成るバックボーン上に塩基の配列を有する分子であると理解される。塩基は、そのオリゴヌクレオチドの塩基に相補的な塩基配列を有する核酸との結合内に入り込めるような形態でバックボーン上に配列されている。最も一般的なオリゴヌクレオチドは糖リン酸ユニットのバックボーンを有する。2'位に水酸基を有さないオリゴデオキシリボヌクレオチドおよびこの位置に水酸基を有するオリゴリボヌクレオチドを区別してもよい。オリゴヌクレオチドには、水酸基の水素が有機基(例えばアシル基)で置換された誘導体も含まれる。プライマーまたはプローブとして機能する方法のオリゴヌクレオチドは、一般に少なくとも約10-15ヌクレオチド長、より好ましくは約15-25ヌクレオチド長であるが、より短い、またはより長いオリゴヌクレオチドを方法に使用してもよい。正確なサイズは多くの因子に依存し、これはオリゴヌクレオチドの根本的な機能または用途に依存する。オリゴヌクレオチドの生成は任意の方法、例えば化学合成、DNA複製、逆転写、PCR、またはそれらの組み合わせによって行ってもよい。オリゴヌクレオチドを改変してもよい。例えば、検出可能なシグナルを生成する物質(例えばフルオロフォア)でオリゴヌクレオチドを標識してもよい。

20

30

【0043】

本明細書で使用する「検出可能な標識」とは、核酸またはポリペプチドと結合する分子(単数)もしくは化合物(単数)または分子群もしくは化合物群であり、核酸またはポリペプチドの同定に使用されるものをいう。ある場合には、検出可能な標識は直接検出してもよい。他の場合には、検出可能な標識は結合対の一部であって、その後の時点で検出してもよい。検出可能な標識からのシグナルは種々の方法によって検出してもよく、これは検出可能な標識の性質による。検出可能な標識は同位元素、蛍光部分、着色物質などがある。検出可能な標識の検出法の例として、それに限定されるわけではないが分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電磁的、放射化学的、または化学的方法、例えば蛍光、化学蛍光、もしくは化学発光、または他の任意の好適な方法がある。

40

【0044】

「変異型JAK2ポリペプチドに特異的に結合する抗体」とは、その抗体が変異型JAK2ポリペプチドに選択的に結合し、野生型JAK2ポリペプチドとは結合しないことを意味する。抗体の選択的結合は、その抗体が少なくとも90%の割合で変異型JAK2ポリペプチドに結合し、変異型および野生型JAK2ポリペプチドを識別することを含むことを意図する。

【0045】

本明細書でJAK2に関して使用する「活性化ドメイン」という用語は、一般に細胞の活性化(例えば細胞増殖)に関与するドメインを指す。活性化ドメインの例はキナーゼまたは偽キナーゼ・ドメインである。

50

【0046】

本明細書で使用する“偽キナーゼ・ドメイン”とは、ポリペプチドの一部またはポリペプチドの一部をコードする核酸であって、その部分が機能性キナーゼと相同性を示すが触媒活性を有さないものを指す。偽キナーゼ・ドメインは“キナーゼ様ドメイン”とも呼ばれる。偽キナーゼ・ドメインの一例はJAK2偽キナーゼ・ドメイン（別名JH2ドメイン）である。JAK2偽キナーゼ・ドメイン（JH2）のN-末端部分は、JAK2の活性を負に調節する調節ドメインである。

【0047】

「キナーゼ・ドメイン」という用語は、ポリペプチドの一部またはポリペプチドの一部をコードする核酸であって、その部分がポリペプチドのキナーゼ活性（例えばチロシンキナーゼ活性）に必要であるものを指す。

10

【0048】

本発明のある方法では、変異は「JAK2キナーゼ活性に影響を及ぼし」てもよい。JAK2キナーゼ活性への影響には、キナーゼ活性が上昇する、低下する、構成的になる、完全に停止する、またはより多くの、より少ない、もしくは異なる標的に影響を与えることがある。キナーゼ活性に影響を与える変異はキナーゼ・ドメインまたはキナーゼ・ドメインに係するドメイン（例えばJAK2偽キナーゼ・ドメイン）中に存在してもよい。

【0049】

本明細書で使用する「含有する（including）」という用語は含む（comprising）という用語と同じ意味を有する。

20

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】図1は、エクソン13変異（図1A）、エクソン14欠失（図1B）、およびエクソン15変異（図1C）の一連の代表的なシーケンシング・クロマトグラムを示す。矢印は変異型ヌクレオチドの位置を示し、点は欠失したヌクレオチドを示す。

【図2】図2は、JAK2遺伝子構造の図を、エクソン12-15中のいくつかの変異型残基と共に示す。

【発明を実施するための形態】

【0051】

発明の詳細な説明

30

本発明は骨髄増殖性疾患に関係付けられているJAK2核酸およびタンパク質中の新規の変異の発見に基づく。変異を表2に示す。

【0052】

JAK2核酸

JAK2ゲノム核酸はヒト9番染色体に位置する。ヒトJAK2ゲノム配列の代表的なものには、それに限定されるわけではないがGenBankアクセッション番号：NG_009904、CM000260、CM000671、GL000069がある。これらの配列は参照により本明細書に組み込まれる。

【0053】

ヒトJAK2 mRNAの全てまたは一部の配列の例として、それに限定されるわけではないがGenBankアクセッション番号：NM_004972のヒトJAK2 mRNAがある。これらの配列は参照により本明細書に組み込まれる。代表的なJAK2 mRNAの配列はSEQ ID NO:1である。

40

【0054】

本発明のJAK2核酸には、例えばSEQ ID NO:1のJAK2ヌクレオチド配列の一部と実質的に同一であり、以下の表2に示す変異の1つまたはそれ以上を更に含む核酸がある。いくつかの態様では、JAK2核酸は少なくとも10、12、14、16、18、20、25、30、40、50、75、100、またはそれ以上のヌクレオチド長である。他の態様では、JAK2核酸は6000、5000、4000、3000、2000、1000、750、500、400、300、または200ヌクレオチド長未満である。

【0055】

生体サンプルの回収および調製

本発明の方法および組成物を使用して、個体から得た生体サンプルを用いてJAK2遺伝子

50

および／またはJAK2タンパク質中の変異を検出することができる。当業者に知られる任意の方法に従って核酸（DNAまたはRNA）をサンプルから単離することができる。必要により、サンプルを遠心分離などによって回収または濃縮してもよい。サンプルの細胞を（例えば酵素処理、加熱処理、界面活性剤処理、超音波処理、またはそれらを組み合わせた処理によって）溶解してもよい。溶解処理は、ポリメラーゼ連鎖反応を用いる検出のために十分な量の個体細胞由来核酸を得るために行う。あるいはまた、JAK2遺伝子の変異は、米国特許出願第11/408,241号（公開番号US 2007-0248961）（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法に従って、無細胞体液を用いて検出してもよい。

【0056】

血漿または血清の調製法

血漿および血清の調製法は当該分野で知られている。「フレッシュ」の血漿もしくは血清、または凍結（保存）／解凍した血漿もしくは血清のいずれを使用してもよい。凍結（保存）した血漿または血清は解凍および使用まで-20から-70℃の保存条件に保持すべきである。「フレッシュ」の血漿または血清は使用まで冷蔵または氷上に配し、できるだけ速やかに核酸（例えばRNA、DNA、または総核酸）の抽出を行う。方法の例を以下に記載する。

【0057】

核酸抽出および増幅

増幅すべき核酸は、生体サンプル（例えば生物体、細胞培養液、組織サンプルなど）由来であってもよい。生体サンプルは任意の動物（好ましくは哺乳動物）を含む被験体由来であってもよい。好ましい被験体はヒトであり、疾病の診断または治療のために医療提供者の元を訪れる患者であってもよい。生体サンプルは生命の様々な段階、例えば胎児、若年成人、成人などから得てもよい。特に好ましい被験体は、JAK2変異の存在を試験すべきヒトである。

【0058】

DNAまたはRNAの単離に好適な種々の抽出方法がある。好適な方法にはフェノール／クロロホルム抽出がある。Maniatisら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, page 16.54 (1989)参照。DNAおよびRNAを得るのに好適な多くの市販のキットがあり、それらには限定されるわけではないがQIAamp（商標） mini blood kit、Agencourt Genfind（商標）、Roche Cobas（登録商標）、Roche MagNA Pure（登録商標）、またはEppendorf Phase Lock Gels（登録商標）を用いるフェノール：クロロホルム抽出、およびNucliSens extraction kit（Biomérieux社、フランス マーシーレトワール）がある。他の方法では、mRNAはMagNA Pure LC mRNA HS kitおよびMagNA Pure LC Instrument（Roche Diagnostics社、Roche Applied Science、インディアナ州インディアナポリス）を用いて患者の血液／骨髄サンプルからmRNAを抽出してもよい。

【0059】

総核酸、DNA、およびRNAを血液、血清、血漿、および骨髄、または他の造血組織から単離するための多くの方法が当該分野で知られている。事実、多くの報告されているプロトコル、並びに市販のキットおよびシステムを使用することができる。非限定的な例として、それらのキット、システム、および報告されているプロトコルの例を以下に記載する。市販のキットには以下がある：Qiagen社の製品（例えばQiaAmp DNA Blood MiniKit（カタログ番号51104、Qiagen社、カリフォルニア州バレンシア）、QiaAmp RNA Blood MiniKit（カタログ番号52304、Qiagen社カリフォルニア州バレンシア））；Promega社の製品（例えばWizard Genomic DNA Kit（カタログ番号A1620、Promega社、ウィスコンシン州マディソン）、Wizard SV Genomic DNA Kit（カタログ番号A2360、Promega社、ウィスコンシン州マディソン）、SV Total RNA Kit（カタログ番号X3100、Promega社、ウィスコンシン州マディソン）、PolyATract System（カタログ番号Z5420、Promega社、ウィスコンシン州マディソン）、またはPurYield RNA System（カタログ番号Z3740、Promega社、ウィスコンシン州マディソン））。

【0060】

血漿または血清からのRNAの抽出

血漿RNAは非常に感受性が高く、相対的に存在量が多く、欠失（例えばエクソン14の欠失）の検出が容易なため、DNAの試験の代わりとすることができる。循環細胞外デオキシリボ核酸（DNA）（腫瘍誘導または腫瘍関連細胞外DNAを含む）も血漿および血清中に存在する。Stroun, M.ら, *Oncology* 46:318-322, (1989) 参照。このDNAは上記のRNA抽出法の際にも様々な程度で抽出されるので、RNA抽出物を更に精製し、痕跡量のDNAを除去してから更なるRNA分析に移行することが（臨床目的によっては）所望または必要とされうる。これはDNaseを用いて、例えばRashtchian, A., *PCR Methods Applic.* 4:S83-S91, (1994) に報告される方法によって以下のように行ってもよい。

【0061】

ガラスビーズ、シリカ粒子、またはケイ藻抽出：Boom, R.ら, *J. Clin. Micro.* 28:495-503 (1990) ; Cheung, R.C.ら, *J Clin Micro.* 32:2593-2597 (1994) の方法に従って、またはそれを改変して、シリカ粒子、ガラスビーズ、またはケイ藻を用いてRNAを血漿または血清から抽出することができる。

【0062】

酸性グアニジンチオシアネート／フェノール／クロロホルム抽出：別法として、Chomczynski, P. および Sacchi, N., *Analytical Biochemistry* 162:156-159, (1987) に報告されている酸性グアニジンチオシアネート／フェノール／クロロホルム抽出法を用いて、以下のように血漿または血清からRNAを抽出してもよい。

【0063】

核酸抽出の別法：別法を用いてRNAを体液から抽出してもよく、それらには限定されるわけではないが塩化セシウム・グラジエントによる遠心分離（例えばChirgwin, J.M.ら, *Biochemistry* 18:5294-5299, (1979) の方法）およびゼラチンを用いる血漿または血清からの細胞外RNAの共沈殿（例えばFournie, G.J.ら, *Analytical Biochemistry* 158:250-256, (1986) の方法をRNA抽出に合わせて改変したもの）がある。

【0064】

核酸増幅の別法

使用することができる核酸増幅の別法にはRT-PCRの変法（定量RT-PCRなど）、例えばWang, A.M.ら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9717-9721, (1989) またはKaret, F.E.ら, *Analytical Biochemistry* 220:384-390, (1994) に報告されている方法を改変したものがある。使用することができる別の核酸増幅法または変異検出法はリガーゼ連鎖反応（LCR）であり、Wiedmannら, *PCR Methods Appl.* 3:551-564, (1994) に報告されている。他の増幅法または変異検出法は対立遺伝子特異的PCR（ASPCR）である。ASPCRはテンプレートとプライマーの3'末端塩基間のマッチまたはミスマッチを利用するものであり、当該分野で知られている。例えば米国特許第5,639,611号参照。

【0065】

別の変異検出法は核酸シーケンシングである。シーケンシングは任意の数の当該分野で知られる方法、キット、または系を用いて実施できる。ある例では色素ターミネーター化学およびABIシーケンサー（Applied Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティ）を用いる。シーケンシングは1塩基測定法、例えば1ヌクレオチドプライマー伸長（“SNaPshot（登録商標）”シーケンシング法）または対立遺伝子もしくは変異特異的PCRを伴ってもよい。SNaPshot（登録商標）Multiplex Systemは10個のSNP（1塩基多型）まで多重化できる、プライマー伸長に基づく方法である。その化学は未標識のオリゴヌクレオチド・プライマー（単数または複数）のジデオキシ1塩基伸長法に基づく。各プライマーは蛍光標識されたddNTPおよびAmpliTaq（登録商標）DNAポリメラーゼ FSの存在下で相補的なテンプレートに結合する。このポリメラーゼはプライマーをヌクレオチド1個分だけ伸長し、1個のddNTPをその3'末端に付加する。SNaPshot（登録商標）Multiplex Systemが市販されている（ABI PRISM（登録商標）SNaPshot（登録商標）Multiplex kit, Applied Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティ）。ABI PRISM（登録商標）SNaPshot（登録商標）Multiplex kitを用いて生成された産物をGeneScan（登録商標）Analysis So

10

20

30

40

50

ftware（バージョン3.1またはそれ以上）で、ABI PRISM（登録商標）310 Genetic Analyzer、ABI PRISM（登録商標）3100 Genetic Analyzer、またはABI PRISM（登録商標）3700 DNA Analyzerを用いて分析できる。

【0066】

JAK2 DNAおよびRNA変異の検出のための代表的な方法

核酸（例えば総核酸）の患者生体サンプルからの抽出は、任意の好適な方法を用いて行うことができる。次に、総核酸標本またはRNA標本を用いてRT-PCR反応を実施し、患者RNAの一部を特異的に増幅する。ワンステップRT-PCRシステムの一例はSuperscript III System（Invitrogen社、カリフォルニア州カールスバッド）である。RT-PCR反応の他の方法およびシステムは当該分野で知られており、市販もされている。非限定的な例として、JAK2のプライマー対は5' -TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTA AAT GCT GTC CCC CAA AG-3'（順方向プライマー、SEQ ID NO:6）および5' -CAG GAA ACA GCT ATG ACC CCA TGC CAA CTG TTT AGC AA-3'（逆方向プライマー、SEQ ID NO:7）であってもよい。次いで、RT-PCR産物を（例えばゲル精製によって）精製し、得られた精製産物のシーケンシングを行ってもよい。核酸のシーケンシング法は当該分野で知られている；シーケンシング法の一例としてABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティ）がある。その後、JAK2核酸中の1つまたはそれ以上の変異の存在または不在に関する分析を行ってもよい。シーケンシング結果を分析し、サンプル中に存在する野生型と変異型核酸との比率を測定してもよい。

【0067】

JAK2変異の存在または不在の確認は、核酸中で、検出しようとする変異を含有するJAK2遺伝子の好適な部分のシーケンシングによって行うことができる。例えばJAK2遺伝子の各アンプリコンを順方向および逆方向プライマーでシーケンシングする。別の方法では、1つまたはそれ以上のエンドヌクレアーゼ制限酵素での消化に対する感受性を変化させるJAK2変異を用いて変異を検出してもよい。別の態様では、1つまたはそれ以上のJAK2変異の存在を対立遺伝子特異的増幅によって確認してもよい。更に別の態様では、1つまたはそれ以上のJAK2変異の存在をプライマー伸長によって確認してもよい。更に別の態様では、1つまたはそれ以上のJAK2変異の存在をオリゴヌクレオチド・ライゲーションによって確認してもよい。別の態様では、1つまたはそれ以上のJAK2変異の存在を、検出可能な標識が施与させた変異型JAK2配列を含有するプローブとのハイブリダイゼーションによって確認してもよい。JAK2変異の存在または不在は任意の既知の、または今後開発される方法によって確認してもよい。

【0068】

変異型JAK2タンパク質の検出

本発明によれば、JAK2変異の存在または不在は、変異型JAK2遺伝子にコードされるJAK2タンパク質（SEQ ID NO:2）を分析することによって確認することもできる。変異には表2に示すものがある。タンパク質レベルでのJAK2変異の検出は、当該分野で知られる任意の方法によって行ってもよい。ある態様では、JAK2変異の検出は、JAK2タンパク質を単離し、そのアミノ酸配列決定を実施することによって行う。これには、シーケンシングの前にタンパク質分解法または化学的方法によってタンパク質を断片化する必要がある。アミノ酸配列の決定法は当該分野で知られている。

【0069】

変異型JAK2タンパク質の検出は、例えば抗体、アプタマー、リガンド／基質、他のタンパク質もしくはタンパク質フラグメント、他のタンパク質結合物質、またはフラグメントの質量分析を用いて行うことができる。好ましくは、タンパク質検出物質は本発明の変異型JAK2タンパク質に特異的であり、従って変異型タンパク質と野生型タンパク質または別の変異体を識別できる。これは一般に、例えば変異型および野生型タンパク質間で相違があるタンパク質の領域に結合する検出物質を選択または設計することによって行うことができる。

【0070】

変異型JAK2タンパク質の検出のための好ましい物質は、変異型タンパク質に選択的に結合できる抗体である。野生型および変異型JAK2タンパク質間を識別できる抗体は、当該分野で知られる任意の好適な方法で作製することができる。抗体はモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、1本鎖もしくは2本鎖、キメラもしくはヒト化抗体、または抗原結合フラグメントに相当することが当該分野で知られている部分を含有する免疫グロブリン分子の一部であってもよい。

【0071】

ポリクローナル抗体の製造法は当該分野で知られている。一般に、抗体の作製は、変異を含有する変異型JAK2タンパク質免疫原性フラグメントをニュージーランド・ホワイ種ウサギに（例えば皮下注射によって）投与することによって行う。JAK2抗原は一般に複数の部位に注射し、複数回（例えばおよそ2週間毎に）注射を反復して免疫応答を惹起する。

10

【0072】

好ましくは、ウサギにアジュバントを同時に投与して、抗JAK2免疫を増強する。その後、（例えば同じJAK2抗原を用いて抗体を捕捉するアフィニティー・クロマトグラフィーによって）血清サンプルからポリクローナル抗体を精製する。抗体は、天然型JAK2と交差反応する抗体を除去することによって変異特異的としてもよい。

【0073】

変異型JAK2タンパク質のインビトロ検出法には、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ウェスタンブロット、免疫沈降、免疫蛍光、およびタンパク質アレイ／チップ（例えば抗体またはアプタマーのアレイ）がある。免疫アッセイおよび関連するタンパク質検出法に関する更なる情報についてはCurrent Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, N.Y.,および、Hage, "Immunoassays", Anal Chem. 1999 Jun. 15; 71(12):294R-304Rを参照されたい。アミノ酸変異体を検出する更なる方法には、限定されるわけではないが電気泳動（例えば2次元電気泳動）の移動度の変化、トリプシンによるペプチド消化の変化、セルベースまたは無細胞アッセイにおけるJAK2キナーゼ活性の変化、リガンドまたは抗体結合パターンの変化、等電点の変化、および直接アミノ酸シーケンシングがある。

20

【0074】

診断手段

JAK2核酸は、造血疾患を有する（または発症する可能性がある）個体の診断手段として使用することができる。あるいはまた、JAK2変異状態を単独で使用して、または他の臨床パラメータと併用して、造血疾患を有すると診断された患者の予後を判定してもよい。JAK2核酸の変異の例を表1および2に示す。

30

【0075】

ある態様では、JAK2核酸は検出可能な標識を更に含み、これを患者サンプル中の変異型JAK2核酸を検出するためのプローブ（「JAK2プローブ」）として使用する。当該分野で知られる方法により、JAK2プローブを検出可能な標識で標識することができる。有用な標識には例えば以下がある：蛍光色素（例えばCy5（登録商標）、Cy3（登録商標）、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体、テキサスレッド、FAM、JOE、Cal Fluor Red 610（登録商標）、Quasar 670（登録商標））、放射性同位元素（例えば ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、高電子密度試薬（例えば金）、酵素（例えばホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、 β ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、比色標識（例えばコロイド金）、磁気標識（例えばDynabeads（商標））、ビオチン、ジゴキシゲニン、または抗血清もしくはモノクローナル抗体の入手が可能なハプテンおよびタンパク質。他の標識にはリガンドまたはオリゴヌクレオチド（それぞれ相当する受容体またはオリゴヌクレオチド相補体と複合体を形成できる）がある。標識は検出すべき核酸に直接導入するか、または検出すべき核酸にハイブリダイズもしくは結合するプローブ（例えばオリゴヌクレオチド）もしくは抗体に結合させることができる。

40

【0076】

50

他の態様では、JAK2プローブはTaqMan（登録商標）プローブ、分子ビーコン、およびスコープオン（例えばScorpion（商標）プローブ）である。これらのタイプのプローブは蛍光クエンチングの原理に基づいており、ドナー・フルオロフォアおよびクエンチング部分を含む。本明細書で使用する「フルオロフォア」という用語は、特定の波長（励起周波数（excitation frequency））の光を吸収し、次いでより長い波長（発光周波数（emission frequency））の光を放射する分子をいう。本明細書で使用する「ドナー・フルオロフォア」という用語は、クエンチャー部分の近傍にあるとクエンチャーに発光エネルギーを供与または転移するフルオロフォアを意味する。クエンチャー部分へのエネルギーの供与の結果、ドナー・フルオロフォア自体は特定の発光周波数の光を、クエンチャー部分が近傍に位置しない場合より少ない量で発光する。

10

【0077】

本明細書で使用する「クエンチャー部分」とは、ドナー・フルオロフォアの近傍で、ドナーによって生成された放出エネルギーを取り込み、そのエネルギーを熱として消散するか、またはドナーの発光波長より長い波長の光として発光する分子を意味する。後者の場合、クエンチャーはアクセプター・フルオロフォアとみなされる。クエンチャー部分は近接（すなわち衝突）クエンチングによって、またはフェルスターもしくは蛍光共鳴エネルギーエネルギー移動（「FRET」）によって作用する。FRETによるクエンチングは通常、TaqMan（登録商標）プローブに使用され、近接クエンチングは分子ビーコンおよびScorpion（商標）型プローブに用いられる。好適なクエンチャーは特定のフルオロフォアの蛍光スペクトルに基づいて選択される。有用なクエンチャーには、例えばBlack Hole（商標）クエンチャー BHQ-1、BHQ-2、およびBHQ-3（Biosearch Technologies社）、およびATTO-シリーズのクエンチャー（ATTO 540Q、ATTO 580Q、およびATTO 612Q；Atto-Tec社）がある。

20

【0078】

スコープオン・プライマーを用いて、配列特異的プライミングおよびPCR産物の検出が1つの分子で実施できる。スコープオン・プライマーはハイブリダイズしていない状態では、ステム・ループ構造を保持している。フルオロフォアは5'末端に結合しており、3'末端に結合した部分によってクエンチングされているが、好適な態様では、この配置は逆でもよい。ステムの3'部分は、プライマーの伸長産物に相補的な配列を含む。この配列は、特異的プライマーの5'末端に増幅可能でないモノマーを介して結合されている。プライマー部分の伸長後、特異的プローブ配列は伸長されたアンプリコン中のその相補体に結合することができ、これによってヘアピン・ループが開く。このことにより蛍光のクエンチングが阻止され、シグナルが観察される。特異的標的は、逆向きプライマーおよびスコープオン・プライマーのプライマー部分により増幅され、伸長産物を生ずる。スコープオン・プライマーのプローブ要素（例えばJAK2プローブ）が伸長産物に結合することにより、フルオロフォアがクエンチャーから分離され、蛍光シグナルが生成される。

30

【0079】

TaqMan（登録商標）プローブ（Heidraら，Genome Res 6: 986-994, 1996）はTaqポリメラーゼの蛍光誘導性5'エキソヌクレアーゼ活性を用いてcDNAサンプル中の標的配列の量を測定する。TaqMan（登録商標）プローブは、通常5'塩基に、またはその近傍にドナー・フルオロフォアを、そして一般的に3'塩基に、またはその近傍にクエンチング部分を含有するオリゴヌクレオチドである。クエンチャー部分はTAMRAのような色素であるか、または4-（4-ジメチルアミノフェニルアゾ）安息香酸（DABCYL）のような非蛍光分子であってもよい。Tyagiら，16 Nature Biotechnology 49-53（1998）参照。照射を受けると、励起された蛍光ドナーは蛍光発光ではなくFRETによって近傍のクエンチング部分にエネルギーを移動させる。従って、ドナーとクエンチャーが近接していることにより、ドナーの蛍光発光は阻止され、プローブは無傷である。

40

【0080】

TaqMan（登録商標）プローブはPCR産物の内部領域にアニールするように設計する。ポリメラーゼ（例えば逆転写酵素）がTaqMan（登録商標）プローブが結合しているテンプレ

50

ートを複製すると、その5'エキソヌクレアーゼ活性によりプローブが開裂される。これによってクエンチャーの活性が停止し（FRETが無くなる）、ドナー・フルオロフォアは蛍光を発し始め、これはプローブ開裂の比率に比例してサイクル毎に増加する。レポーター色素の蛍光の増加（プライマーは標識されていないことに留意）でモニタリングすることによって、PCR産物の蓄積を検出する。クエンチャーがアクセプター・フルオロフォアであれば、PCR産物の蓄積はアクセプター・フルオロフォアの蛍光の減少をモニタリングことによって検出できる。

【0081】

本発明のJAK2ポリペプチドには、例えば、SEQ ID NO:2のJAK2アミノ酸配列の一部と実質的に同一であり、1つまたはそれ以上の以下の表2に示す変異を更に含むポリペプチドがある。これらのポリペプチドを、骨髄増殖性疾患を有する（または発症する可能性がある）個体の診断手段として使用することができる。あるいはまた、JAK2変異状態を単独で使用して、または他の臨床パラメータと併用して、骨髄増殖性疾患を有すると診断された患者の予後を判定してもよい。ある態様では、JAK2ポリペプチドは少なくとも10、12、14、16、18、20、25、30、40、50、75、100、またはそれ以上のアミノ酸を有する。ある態様では、JAK2ポリペプチドは1100、1000、900、800、700、600、500、または400未満のアミノ酸を有する。

【0082】

JAK2変異の検出のためのキット

本発明はJAK2変異を検出するためのキットも提供する。キットは少なくとも、SEQ ID NO:1の標的JAK2核酸配列を増幅することができるプライマー対および標的中のJAK2変異を検出する手段を含む。好ましくは、キットのプライマー対を使用する増幅により、少なくとも20、40、60、80、100、125、150、200、300、500、またはそれ以上のヌクレオチドを有する反応生成物が得られる。好適なプライマー対には、例えばSEQ ID NO:6および7の配列を有するプライマーがある。反応生成物中のJAK2変異を検出するための好適な手段は、検出可能な標識が施与されたJAK2プローブ（例えば本明細書に記載するもの）を使用する。

【0083】

診断、検出、および予後診断

JAK2変異の存在、例えば表2に示す変異の単独での存在、互いの組み合わせでの存在、または他のJAK2変異との共存を疾病の指標とすることができる。

【0084】

いかなる理論にも拘束されることを望まないが、JAK2変異によってキナーゼ・ドメインの活性化ループが偽キナーゼ・ドメインから脱離され、それによってJAK2-STAT経路の構成的活性化が起こると信じられる。偽キナーゼ・ドメイン中の変異は、キナーゼ活性に対する偽キナーゼ・ドメインの自己阻害機能を不活性化すると期待される。ヒト癌に関係するチロシンキナーゼ中の活性化変異のかなりの数が、自己阻害ドメイン中に存在する機能喪失型対立遺伝子（例えばチロシンキナーゼの構成的活性化をもたらす点変異および欠失）である。従って、JAK2変異の試験には、偽キナーゼ・ドメインの大部分が含まれるべきである。

【0085】

いかなる理論にも拘束されることを望まないが、ホモロジー・モデリング法から、残基537-543（エクソン12中の変異のホットスポット）はJAK2のSH2およびJH2ドメインを架橋するループ領域内にあることが示唆されている。予測されるモデルでは、D407-K655、S411-E653、K415-E685、およびF408-H608間（それぞれSH2およびJH2ドメインにある）の陽極性（positive polar）または疎水性相互作用は予測されるインターフェイスに密集しており、JH2-JH1相互作用を更に支持している（21）。従って、このループ領域の変異はJH2-JH1相互作用を破壊し、構成的キナーゼ活性化、例えばdel/F537-K539ins/L、del/N542-E543、H538QK539L、およびK539L（全て、JAK2活性化の増加およびサイトカイン非依存性過敏性増殖（hypersensitive proliferation）を示し、K539Lでは骨髄増殖性表現型を示す）

をもたらす。例えばScottら, N Engl J Med 356:459-468 (2007) 参照。

【0086】

以下の測定の1つまたはそれ以上を用いて患者の診断を行うことができる：特定のJAK2変異の存在または不在の測定、サンプルの接合状態の測定、および、サンプル中の変異型および野生型JAK2核酸またはmRNAの比率の測定。例えば、本発明の方法によって特定のJAK2変異を保有することが明らかになった患者に更なる試験によってMPD診断を検証することを勧めるか、または、変異の検出を用いてMPDの予備的診断を最終的に確定してもよい（例えば、患者がMPDの症状を有し、更に特定のMPDを示すことが知られてる特定のJAK2変異の試験が陽性である場合に、患者にMPD（例えばPV）の最終診断が下されてもよい）。同様に、本発明の方法を用いて無症候性MPD患者（例えばかなり早期の段階にあるMPD患者）の診断を行ってもよい。また、治療中のMPD患者においてJAK2変異を検出してもよい；変異型および野生型JAK2核酸の比率またはサンプルの接合状態が治療中に変化した場合に、異なる診断を下してもよい。

10

【0087】

以下の測定の1つまたはそれ以上を用いて患者を治療することができる：特定のJAK2変異の存在または不在の測定、サンプルの接合状態の測定、および、サンプル中の変異型および野生型JAK2核酸の比率の測定。医師または治療実施者は1つまたはそれ以上の測定に基づいて治療または治療計画を実施する、見合わせる、または変更してもよい。更に、変異を有する癌性細胞の数はMPDの経過に伴って変化しうるものであり、JAK2変異の比率、接合状態、および／または存在もしくは不在のモニタリングによって疾病の状態または治療の有効性が明らかになりうる。例えば、治療によって変異型癌性細胞数が低下するか、または時間と共に疾病が悪化し、罹患細胞数が増加するかもしれない。更に、1つまたはそれ以上の測定結果は、患者の予後診断およびクオリティ・オブ・ライフの決断の助けとなりうる。例えば化学療法のような痛みと衰弱を伴う治療を継続するか否か、またはどのくらいの期間継続するかを決断を行いうる。

20

【0088】

サンプルの接合状態および野生型／変異型核酸の比率は当該分野で知られる方法（例えば配列特異的定量検出法）によって測定することができる。他の方法は、標準的なシーケンシング電気泳動図（例えばABIシーケンシング・システム（Applied Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティ）から作製されるもの）から得られるシーケンシング・ピークの曲線下面積の測定を伴う。例えば電気泳動図上で特定のヌクレオチドを示す位置においてシングル・ピーク（例えば“G”）だけが存在する場合、これはサンプル中の核酸がその位置では単一のヌクレオチド、“G”だけを含有することを示す。その後、1つの対立遺伝子しか検出されないの、サンプルをホモ接合と分類することができる。電気泳動図上の同じ位置に2つのピーク、例えば“G”および“T”のピークが存在すれば、これはサンプルが2種類の核酸を含有することを示す；すなわち、1つの種は当該のヌクレオチド位置に“G”を有し、他方は当該のヌクレオチド位置に“T”を有する。その後、1つより多い対立遺伝子が検出されるので、サンプルをヘテロ接合と分類することができる。

30

【0089】

2つのピークのサイズの測定を（例えばそれぞれの曲線下面積を測定することによって）行い、2つの異なる核酸種の比率を算出することができる。野生型核酸と変異型核酸との比率を用いて疾患の進行のモニタリング、治療の決定、または診断を行うことができる。例えば特定のJAK2変異を有する癌性細胞の数はMPDの経過に伴って変化しうる。ベースラインとなる比率を疾患の早期に確立し、後の測定で野生型核酸に対する変異型核酸の比率がより高ければ、疾患が悪化しているか、または治療が無効であることを示している；すなわち、患者における変異を有する細胞の数が増加している可能性がある。野生型核酸に対する変異型核酸の比率がより低ければ、治療が有効である、または疾患が進行していない；すなわち、患者における変異を有する細胞の数が減少している可能性がある。

40

【実施例】

【0090】

50

実施例 1：JAK2変異の検出

7ヶ月（2007年11月から2008年6月）にわたってMPDの疑いがあると診断された約20,000人の患者のサンプルを回収し、エクソン12-15の全領域にわたってJAK2遺伝子変異のスクリーニングを行った。分析のため、エチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）抗凝血剤を含有するラベンダー（Lavender。紫色のキャップが付いた試験管）に5ミリリットルの血液を採取した。すぐに核酸抽出を行えない場合は、血液サンプルを48時間以内の間、冷蔵（冷凍ではない）または室温で保存した。

【0091】

NucliSens抽出キット（bioMerieux社、ノースカロライナ州ダーラム）を用い、製造者の説明書に従って、末梢血血漿から総核酸を抽出した。次いで、総RNAの逆転写（ランダム・プライマーを使用。55℃、30分間）によって第1のcDNA鎖を調製した後、Platinum Taq DNAポリメラーゼを用いるSuperScript IIIワンステップRT-PCRシステム（Invitrogen社、カリフォルニア州カールスバッド）を使用してPCR反応を行った。JAK2 エクソン12-15の増幅には以下のプライマーセットおよび条件を用いた：5' -TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTA AAT GCT GTC CCC CAA AG-3'（順方向プライマー、SEQ ID NO:6）および5' -CAG GAA ACA GCT ATG ACC CCA TGC CAA CTG TTT AGC AA-3'（逆方向プライマー、SEQ ID NO:7）；最初の段階は94℃2分間、次いで、94℃15秒間、60℃30秒間、および68℃1分間を40サイクル、そして68℃7分間を1段階。491 bpの増幅産物をMultiscreen PCRプレート（Millipore社、マサチューセッツ州ビレリカ）でろ過精製し、ABI Prism BigDye（登録商標）Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kitを用いて両方向でシーケンシングを行い、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer（Applied Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティ）で検出した。その後、シーケンス・データについて、ABI Prism（登録商標）SeqScapeソフトウェア（Applied Biosystems社、カリフォルニア州フォスターシティ）によりJAK2配列（アクセッション番号NM004972）を参照として用いて、塩基の読み取り、集積、および分析を行った。

【0092】

表1に、MPDの疑いがある多数の血液サンプル由来のJAK2遺伝子のエクソン12（SEQ ID NO:3）、エクソン13（SEQ ID NO:4）、エクソン14（SEQ ID NO:5）、およびエクソン15の変異分析を示す。

【0093】

10

20

30

【表 1】

表 1: 変異分析

エクソン*	変異	コドン変化	症例数	シーケンシング のパターン#	
12	サイレント	H531	1	ヘテロ接合体	
12	重複	dupl/V536-F547	2	ヘテロ接合体	
12	欠失	del H538	1	ヘテロ接合体	10
12	欠失	del/H538-K539	1	ヘテロ接合体	
12	欠失	del/N542-E543	5	ヘテロ接合体	
12	欠失	del/E543-D544	3	ヘテロ接合体	
12	挿入/欠失 (indels)	del/F537-K539 ins/K	1	ヘテロ接合体	
12	挿入/欠失	del/F537-K539 ins/L	2	ヘテロ接合体	
12	挿入/欠失	del/H538-K539 ins/L	4	ヘテロ接合体	20
12	挿入/欠失	del/R541-E543 ins/K	1	ヘテロ接合体	
12	挿入/欠失	del/I540-D544 ins/MK	1	ヘテロ接合体	
12	挿入/欠失	del/N542-D544 ins/N	1	ヘテロ接合体	
12	ミスセンス	T514M	2	ヘテロ接合体	30
12	ミスセンス	N533Y	1	ヘテロ接合体	
12	ミスセンス	K539L	2	ヘテロ接合体	
12	ミスセンス	H538Q K539L	1	ヘテロ接合体	
12	ミスセンス	K539L L545V	1	ヘテロ接合体	
12	ミスセンス	F547L	1	ヘテロ接合体	
13	サイレント	G562	2	ヘテロ接合体	40
13	サイレント	Y570	4	ヘテロ接合体	
13	サイレント	F556	1	ヘテロ接合体	
13	ミスセンス	R564L	3	ヘテロ接合体	

【表 2】

13	ミスセンス	R564Q	2	ヘテロ接合体	10
13	ミスセンス	V567A	1	ヘテロ接合体	
13	ミスセンス	G571S	3	ヘテロ接合体	
13	ミスセンス	G571R	1	ヘテロ接合体	
13	ミスセンス	L579F	1	ヘテロ接合体	
13	ミスセンス	H587N	1	ヘテロ接合体	
13	ミスセンス	S591L	1	ヘテロ接合体	
14	欠失	S593-N622	2	ヘテロ接合体	
14	ミスセンス	H606Q	1	ヘテロ接合体	
14	ミスセンス	V617F	>2000	ヘテロ/ホモ	
14	ミスセンス	V617I	1	ヘテロ接合体	20
14	ミスセンス	V617F C618R	2	ヘテロ/ホモ	
14	ミスセンス	C618R	1	ヘテロ接合体	
15	ミスセンス	L624P	1	ヘテロ接合体	
15	ミスセンス	I645V	1	ヘテロ接合体	

*エクソン 12 (残基 511-547); エクソン(残基 548-592); エクソン(残基 593-622).

【0094】

実施例 2：更なる JAK2 変異

表 2 に、シーケンシングによって同定された新規の JAK2 変異の更なる具体例を、推定されるアミノ酸置換と共に示す。

【0095】

【表 3】

表 2:エクソン 12, 13, 14, および 15 の変異

エクソン 12	
JAK2 変異核酸; (コドン変化)	JAK2 変異タンパク質; (アミノ酸変化)
ミスセンス変異	
c2035t; (acg>atg)	T514M; (Thr → Met)
a2091t; (aac>tac)	N533Y (Asn → Tyr)
t2127c; (ttg>gtg)	L545V; (Leu → Val)
t2133c; (ttt>ctt)	F547L; (Phe → Leu)
del: 欠失; ins: 挿入	
エクソン 13	
JAK2 変異核酸; (コドン変化)	JAK2 変異タンパク質; (アミノ酸変化)
ミスセンス変異	
t2160g ttt>gtt	F556V (Phe → Val)
c2180t; (ggc>ggg)	G562 サイレント; (Gly)
g2185t; (cga>cta)	R564L; (Arg → Leu)
g2185a; (cga>caa)	R564Q; (Arg → Gln)
g2193t; (gta>tta)	V567L; (Val → Leu)
t2194c; (gta>gca)	V567A; (Val → Ala)
c2204t; (tac>tat)	Y570 サイレント; (Tyr)
g2205a; (ggg>agt)	G571S; (Gly → Ser)
g2205c; (ggg>cgt)	G571R; (Gly → Arg)
c2229t; (ctt>ttt)	L579F; (Leu → Phe)
c2253a; (cac>aac)	H587N; (His → Asn)
c2266t; (tca>tta)	S591L; (Ser → Leu)
エクソン 14	
JAK2 変異核酸; (コドン変化)	JAK2 変異タンパク質; (アミノ酸変化)
エクソン 14 ミスセンスおよび欠失変異	
c2312a; (cac>caa)	H606Q; (His → Gln)
2271-2358 (エクソン 14 欠失)	S593-N622
エクソン 15	
エクソン 15 ミスセンス変異	
t2365c; (ctg>ccg)	L624P; (Leu → Pro)
a2427g; (ata>gta)	I645V; (Ile → Val)

【0096】

特に明記しない限り、本明細書で使用する全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野における通常の技術者が共通して理解するのと同じ意味を有する。

【0097】

本発明について本明細書に例証的に記載したが、これは任意の要素（単数または複数）、制限（単数または複数）（本明細書には具体的に開示していない）を欠いた状態で実施

10

20

30

40

50

してもよい。従って、例えば「含む」、「包含する」、「含有する」等の用語は広義かつ無制限に解釈すべきである。更に、本明細書で使用する用語および表現は制限ではなく説明のための用語として使用するものであり、それらの用語および表現の使用においては、表記および説明する特長の同等物またはその一部のいずれをも除外することを意図せず、認識されるように、本発明の特許請求の範囲内で種々の改変を行うことができる。

【0098】

従って、好ましい態様および更なる特長によって本発明を具体的に開示したが、当業者は本明細書において具体化した本発明の改変、改良、および変更の手段をとってもよく、それらの改変、改良、および変更は本発明の範囲内に含まれるとみなされることは理解されるべきである。本明細書に記載する物質、方法、および実施例は好ましい態様を表すもので、例証であって、本発明の範囲を制限することを意図するものではない。

10

【0099】

本発明について、本明細書において広範かつ一般的に記載した。包括的な開示の中に含まれるより狭い分類および亜群もそれぞれ本発明の一部を成す。これには、その属から対象物を除外する条件または負の限定付きの本発明の包括的な説明が含まれ、除外されたものが本明細書に具体的に記載されているか否かは関係がない。

【0100】

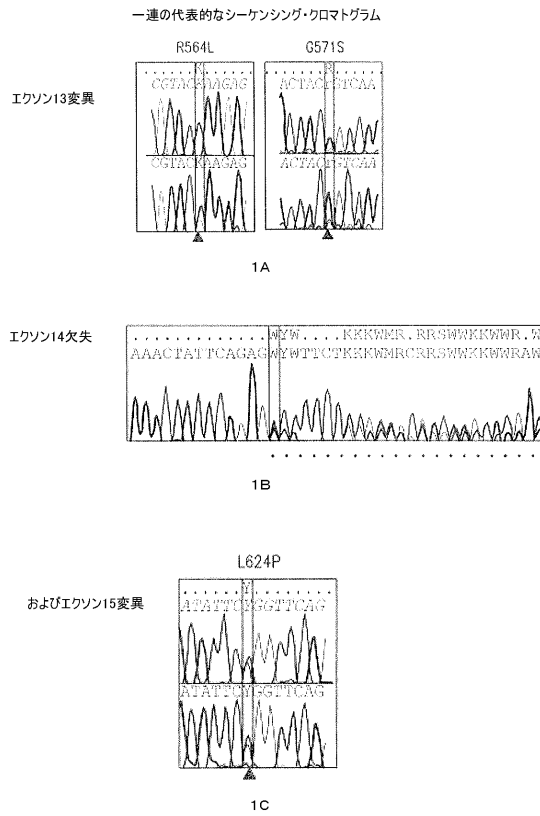
更に、本発明の特長または観点をマーカッシュで記載する場合、当業者に認識されるように、本発明はマーカッシュ群の任意の個別メンバーまたはメンバーのサブグループでも記述される。

20

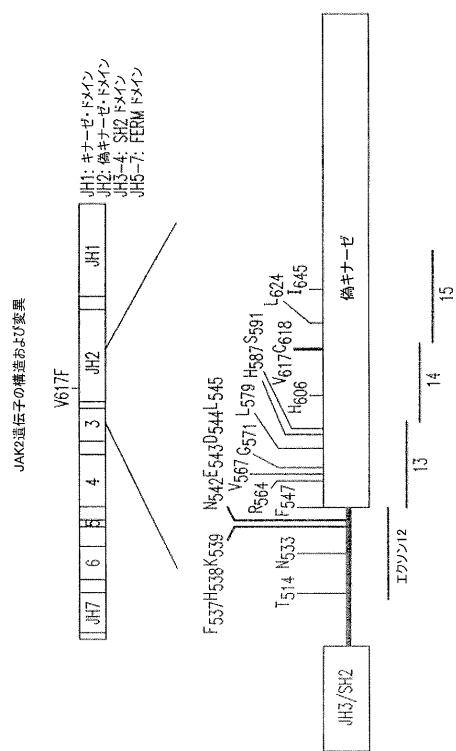
【0101】

本明細書に記載する全ての文献、特許出願、特許、および他の文献は、そのそれぞれが個別で参照により組み込まれるのと同じ程度に、参照によりその全体が明確に本明細書に組み込まれる。不一致がある場合は、本明細書（定義を含む）が優先する。

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(72)発明者 アルビタル, マヘル

アメリカ合衆国 92679 カリフォルニア州 コト デ カザ, リバー ロック 3

(72)発明者 マ, ワンロン

アメリカ合衆国 92656 カリフォルニア州 アリソ ヴィエホ, ホークスムーア 35

合議体

審判長 田村 明照

審判官 高堀 栄二

審判官 三原 健治

(56)参考文献 米国特許出願公開第2007/0248961 (US, A1)

国際公開第2007/124309 (WO, A1)

Clin. Cancer Res. (2008. October. 1) Vol. 14, No. 1
9 Suppl., p. B12 (Abs. B12)

J. Mol. Diagn. (2009. Jan) Vol. 11, No. 1, p. 49-53

Sus scrofa clone UMNp1381 microsatellite se
quence., [online], GenBank, 2006年8月13日, Acc. No:

DQ837774, [検索日] 平成27年10月26日, URL, [http://www. n
cbi.nlm.nih.gov/nuccore/111378807/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/111378807/)

Leuk. Lymphoma (2008. Mar.) Vol. 49, No. 3, p. 388-3
97

Blood (2008. Apr.) Vol. 111, No. 7, p. 3863-3866

N. Engl. J. Med. (2007) Vol. 356, No. 5, p. 459-468

Hum. Pathol. (2008. Jun.) Vol. 39, No. 6, p. 795-810

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N15/00-15/09

C12Q1/68

PubMed

CA/REGISTRY (STN)

JSTPlus (JDreamII)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

专利名称(译)	用于检测JAK2核酸中的突变的组合物和方法		
公开(公告)号	JP6017136B2	公开(公告)日	2016-10-26
申请号	JP2011534635	申请日	2009-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	奎斯特诊断投资公司		
申请(专利权)人(译)	在莱茵公寓公司Quest Diagnostics公司		
当前申请(专利权)人(译)	在莱茵公寓公司Quest Diagnostics公司		
[标]发明人	アルビタルマヘル マワンロン		
发明人	アルビタル,マヘル マ,ワンロン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N9/12 C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	C12N9/1205 C12Q1/6883 C12Q2600/118 C12Q2600/156 C12Y207/10001 G01N33/573 G01N2333 /91205 G01N2800/22 G01N2800/56		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N9/12 C12Q1/68.A G01N33/53.D		
代理人(译)	田中玲子 松任谷裕子		
优先权	61/110501 2008-10-31 US 12/503318 2009-07-15 US		
其他公开文献	JP2012507291A JP2012507291A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开的发明基于JAK2基因和JAK2蛋白中的新突变的鉴定。本发明提供了用于诊断造血疾病的组合物和方法，包括例如骨髓增生性疾病。本发明还提供了用于确定被诊断患有造血疾病的个体的预后的组合物和方法。

エキソ	JAK2 変異核酸; (コドン変化)	JAK2 変異タンパク質; (アミノ酸変化)
12	a2091t; (aac>tac)	N533Y (Asn → Tyr)
	t2127c; (ttg>gtg)	L545V; (Leu → Val)
	t2133c; (ttt>ctt)	F547L; (Phe → Leu)
13	c2180t; (ggc>ggg)	G562 silent; (Gly)
	g2185t; (cga>cta)	R564L; (Arg → Leu)
	g2185a; (cga>caa)	R564Q; (Arg → Gln)
	t2194c; (gta>gca)	V567A; (Val → Ala)
	c2204t; (tac>tat)	Y570 Silent; (Tyr)
	g2205a; (ggf>agt)	G571S; (Gly → Ser)
	g2205c; (ggf>cgt)	G571R; (Gly → Arg)
	c2229t; (ctt>ttt)	L579F; (Leu → Phe)
	c2253a; (cac>aac)	H587N; (His → Asn)
	c2266t; (tca>tta)	S591L; (Ser → Leu)
	c2312a; (cac>caa)	H606Q; (His → Gln)
	2271-2358 (exon 14 deletion)	S593-N622
15	t2365c; (ctg>cag)	L624P; (Leu → Pro)
	a2427g; (ata>gta)	I645V; (Ile → Val)