

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-505669

(P2015-505669A)

(43) 公表日 平成27年2月26日(2015.2.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4 B O 2 4
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4 B O 6 3
A61K 31/519 (2006.01)	A61K 31/519	4 C O 8 4
A61K 31/277 (2006.01)	A61K 31/277	4 C O 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-543455 (P2014-543455)
 (86) (22) 出願日 平成24年11月26日 (2012.11.26)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年7月4日 (2014.7.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/SG2012/000444
 (87) 国際公開番号 WO2013/077814
 (87) 国際公開日 平成25年5月30日 (2013.5.30)
 (31) 優先権主張番号 201108800-2
 (32) 優先日 平成23年11月25日 (2011.11.25)
 (33) 優先権主張国 シンガポール (SG)

(71) 出願人 508320723
 シンガポール ヘルス サービスズ ピー
 ーティーイー リミテッド
 シンガポール国, 1 6 8 7 5 3 シンガポ
 ール, サード ホスピタル アベニュー
 3 1, ボウヤー ブロック シー ナンバ
 ー 0 3 - 0 3
 (74) 代理人 100113376
 弁理士 南条 雅裕
 (74) 代理人 100179394
 弁理士 瀬田 あや子
 (74) 代理人 100185384
 弁理士 伊波 興一朗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナチュラルキラー/T細胞リンパ腫 (NK T C L) の感受性予測、診断および治療

(57) 【要約】

ナチュラルキラー/T細胞リンパ腫 (NK T C L) の感受性予測、診断および治療。本発明は、J A K突然変異について試験するステップを含む、対象でのナチュラルキラーT細胞リンパ腫 (NK T C L) の感受性を予測する、および/または、NK T C Lを診断するための方法に関する。本発明はまた、少なくとも1つのJ A K突然変異を含む細胞株を用いて、NK T C Lを治療することが可能な候補薬剤をスクリーニングする方法に関する。本発明は、少なくとも1つのJ A K突然変異を含むNK T C L動物モデルを含む。本発明はまた、NK T C Lの治療のためのJ A K阻害剤を含む。

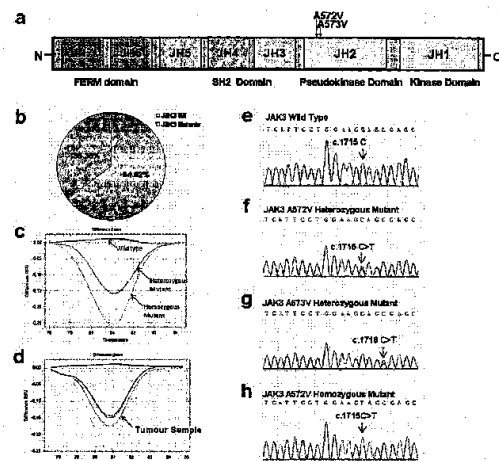


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象でのナチュラルキラーT細胞リンパ腫（NK T C L）の感受性を予測する、および/またはNK T C Lを診断するための方法であって、
少なくとも1つのJ A K 遺伝子について、前記対象の遺伝子型を試験するステップを含み、

ここで、突然変異型J A K 遺伝子の存在は、対象がNK T C Lを発症するリスクがある、および/またはNK T C Lを有することを示す、
方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法であって、

J A K 1、J A K 2、J A K 3 および/またはT Y K 2 遺伝子のうちの少なくとも1つについて、前記対象の遺伝子型を試験するステップを含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法であって、

J A K 3 および/またはJ A K 1 遺伝子のうちの少なくとも1つについて、前記対象の遺伝子型を試験するステップを含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 4】

先行する請求項のいずれか1つに記載の方法であって、

野生型J A K 3 遺伝子が配列番号1を含み、突然変異型J A K 3 遺伝子が配列番号1のヌクレオチド15792におけるCとTの置換および/またはヌクレオチド15795におけるCとTの置換を含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 5】

先行する請求項のいずれか1つに記載の方法であって、野生型J A K 1 遺伝子が配列番号3を含み、突然変異型遺伝子が配列番号3のヌクレオチド124823におけるTとGの置換を含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 6】

先行する請求項のいずれか1つに記載の方法であって、

前記試験のために、前記対象由来の分離血液および/または細胞サンプルを準備するステップをさらに含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 7】

先行する請求項のいずれか1つに記載の方法であって、

前記試験のために、前記対象、前記対象由来の分離血液および/または細胞サンプルから、核酸分子を分離するステップをさらに含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の方法であって、

前記の分離された核酸分子が、ゲノムDNAまたはmRNAを含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 9】

先行する請求項のいずれか1つに記載の方法であって、

前記試験がゲノムDNA、mRNAおよび/またはcDNAに対して行なわれることを特徴とする、
方法。

【請求項 10】

先行する請求項のいずれか1つに記載の方法であって、

10

20

30

40

50

請求項 8 または 9 に記載の方法であって、

前記試験が、配列解析、制限断片長多型分析、ハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) および / または逆転写 PCR を含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 11】

対象でのナチュラルキラー T 細胞リンパ腫 (NK T C L) の感受性を予測する、および / または、NK T C L を診断するための方法であって、

前記対象が野生型または突然変異型 J A K タンパク質を発現するかどうか試験するステップを含み、

ここで、突然変異型 J A K タンパク質の発現は、前記対象が NK T C L を発症するリスクがある、および / または NK T C L を有することを示す、
方法。

10

【請求項 12】

請求項 11 に記載の方法であって、

前記対象が、野生型および / または J A K 1、J A K 2、J A K 3 および / または T Y K 2 タンパク質のうち少なくとも 1 つの突然変異型を発現するかどうか試験するステップを含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 13】

請求項 11 または 12 に記載の方法であって、

前記対象が、野生型または突然変異型の J A K 3 および / または J A K 1 タンパク質を発現するかどうか試験するステップを含むことを特徴とする、
方法。

20

【請求項 14】

請求項 11 から 13 のいずれか一項に記載の方法であって、

野生型 J A K 3 タンパク質が配列番号 2 を含み、前記突然変異型 J A K 3 タンパク質が、配列番号 2 のアミノ酸 572 における A と V の置換および / またはアミノ酸 573 における A と V の置換を含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 15】

請求項 11 から 14 のいずれか一項に記載の方法であって、

野生型 J A K 1 タンパク質が配列番号 4 を含み、前記突然変異型 J A K 1 タンパク質が、配列番号 4 のアミノ酸 652 における Y と D の置換を含むことを特徴とする、
方法。

30

【請求項 16】

請求項 11 から 15 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記試験のために、前記対象由来の分離血液および / または細胞サンプルを準備するステップをさらに含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 17】

請求項 11 から 16 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記試験のために、前記対象、前記対象由来の分離血液および / または細胞サンプルから、少なくとも 1 つのタンパク質を分離するステップをさらに含むことを特徴とする、
方法。

40

【請求項 18】

請求項 11 から 17 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記試験が、タンパク質配列決定および抗体検出法を含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 19】

NK T C L を治療することが可能な薬剤をスクリーニングするための方法であって、

50

以下のステップ：

(i) 少なくとも1つの突然変異型 J A K 遺伝子を含む N K T C L 細胞株を準備するステップ；

(i i) 前記 N K T C L 細胞株を前記薬剤に接触させるステップ；および

(i i i) 哺乳類の N K T C L 細胞株に対する、前記薬剤の効果を判定するステップ；
を含み、

ここで、前記薬剤が、前記 N K T C L 細胞株の生存能力、生育および/または増殖を減少させる能力、および/または、前記 N K T C L 細胞株のアポトーシスを増加させる能力は、薬剤が N K T C L を治療する能力を示す、
方法。

10

【請求項 2 0】

少なくとも1つの J A K タンパク質の活性を低下させることが可能な薬剤をスクリーニングするための方法であって、以下のステップ：

(i) 少なくとも1つの突然変異型 J A K 遺伝子を保有する N K T C L 細胞株を準備するステップ

(i i) 前記 N K T C L 細胞株を前記薬剤に接触させるステップ；および

(i i i) 前記 N K T C L 細胞株に対する前記薬剤の効果を判定するステップ；
を含み、

ここで、前記薬剤が、細胞株の生存能力、生育および/または増殖を減少させる能力、および/または、細胞株のアポトーシスを増加させる能力は、候補薬剤が、少なくとも1つの J A K タンパク質の活性を低下させる能力を示すことを特徴とする、
方法。

20

【請求項 2 1】

請求項 1 9 または 2 0 に記載の方法であって、

前記 N K T C L 細胞株が、突然変異型 J A K 1、J A K 2、J A K 3 および/または T Y K 2 遺伝子のうちの少なくとも1つを保有することを特徴とする、
方法。

【請求項 2 2】

請求項 1 9 から 2 1 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記 N K T C L 細胞株が、突然変異型 J A K 3 遺伝子および/または突然変異型 J A K 1 遺伝子を保有することを特徴とする、
方法。

30

【請求項 2 3】

請求項 1 9 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記 N K T C L 細胞株が、以下の J A K 突然変異：

(i) 配列番号 1 のヌクレオチド 1 5 7 9 2 における C と T の置換；

(i i) 配列番号 1 のヌクレオチド 1 5 7 9 5 における C と T の置換；および

(i i i) 配列番号 3 のヌクレオチド 1 2 4 8 2 3 における T と G の置換
のうち少なくとも1つを保有することを特徴とする、

方法。

40

【請求項 2 4】

N K T C L 動物モデルであって、

少なくとも1つの突然変異型 J A K 遺伝子を含む、

N K T C L 動物モデル

【請求項 2 5】

請求項 2 4 に記載の N K T C L 動物モデルであって、

突然変異型 J A K 1、J A K 2、J A K 3 および/または T Y K 2 遺伝子のうちの少なくとも1つを含むことを特徴とする、
N K T C L 動物モデル。

【請求項 2 6】

50

請求項 24 に記載の N K T C L 動物モデルであって、
突然変異型 J A K 3 遺伝子および / または突然変異型 J A K 1 遺伝子を含むことを特徴とする、

N K T C L 動物モデル。

【請求項 27】

請求項 24 から 26 のいずれか一項に記載の N K T C L 動物モデルであって、
以下の突然変異：

- (i) 配列番号 1 のヌクレオチド 1 5 7 9 2 における C と T の置換；
 - (i i) 配列番号 1 のヌクレオチド 1 5 7 9 5 における C と T の置換；または
 - (i i i) 配列番号 3 のヌクレオチド 1 2 4 8 2 3 における T と G の置換
- のうちの少なくとも 1 つを含むことを特徴とする、

10

N K T C L 動物モデル。

【請求項 28】

ナチュラルキラー T 細胞リンパ腫 (N K T C L) を治療する方法であって、
少なくとも 1 つの J A K 阻害剤を対象に投与するステップを含む、

方法。

【請求項 29】

請求項 28 に記載の方法であって、

前記 J A K 阻害剤が、 J A K 1、 J A K 2、 J A K 3 および / または T Y K 2 タンパク質のうちの少なくとも 1 つを阻害することを特徴とする、

20

方法。

【請求項 30】

請求項 28 または 29 に記載の方法であって、

前記 J A K 阻害剤が、 J A K 3 および / または J A K 1 を阻害することを特徴とする、

方法。

【請求項 31】

請求項 28 から 30 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記 J A K 阻害剤が J A K 3 を阻害することを特徴とする、

方法。

【請求項 32】

請求項 29 から 30 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記 J A K 阻害剤が J A K 1 を阻害することを特徴とする、

方法。

30

【請求項 33】

請求項 28 から 32 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記 J A K 阻害剤が、 3 - [(3 R , 4 R) - 4 - メチル - 3 - [メチル (7 H - ピロロ [2 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イル) アミノ] ピペリジン - 1 - イル] - 3 - オキソプロパンニトリル (C P - 6 9 0 , 5 5 0) および / または (E) - 2 - シアノ - 3 - (4 - ニトロフェニル) - N - ((R) - 1 - フェニルエチル) アクリルアミド (W P - 1 0 3 4) を含むことを特徴とする、

40

方法。

【請求項 34】

請求項 28 から 33 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記 J A K 阻害剤が、 3 - [(3 R , 4 R) - 4 - メチル - 3 - [メチル (7 H - ピロロ [2 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イル) アミノ] ピペリジン - 1 - イル] - 3 - オキソプロパンニトリル (C P - 6 9 0 , 5 5 0) を含むことを特徴とする、

方法。

【請求項 35】

請求項 28 から 33 のいずれか一項に記載の方法であって、

前記 J A K 阻害剤が、 (E) - 2 - シアノ - 3 - (4 - ニトロフェニル) - N - ((R

50

) - 1 - フェニルエチル) アクリルアミド (WP - 1034) を含むことを特徴とする、
方法。

【請求項 36】

請求項 28 から 35 のいずれか一項に記載の方法であって、
前記対象が哺乳類を含むことを特徴とする、

方法。

【請求項 37】

請求項 28 から 36 のいずれか一項に記載の方法であって、
前記対象がヒトを含むことを特徴とする、

方法。

10

【請求項 38】

請求項 37 に記載の方法であって、

前記対象が、JAK3 - A572V、JAK3 - A573V および / または JAK1 - Y652D からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異を有することを特徴とする、

方法。

【請求項 39】

ナチュラルキラー T 細胞リンパ腫 (NK T CL) の治療のための薬剤の調製のための、
少なくとも 1 つの JAK 阻害剤の使用。

【請求項 40】

請求項 39 に記載の使用であって、

前記 JAK 阻害剤が、JAK1、JAK2、JAK3 および / または TYK2 タンパク質のうち少なくとも 1 つを阻害することを特徴とする、
使用。

20

【請求項 41】

請求項 39 または 40 に記載の使用であって、

前記 JAK 阻害剤が、JAK1 および / または JAK3 を阻害することを特徴とする、
使用。

【請求項 42】

請求項 39 から 41 のいずれか一項に記載の使用であって、

前記 JAK 阻害剤が、JAK3 を阻害することを特徴とする、
使用。

30

【請求項 43】

請求項 39 から 41 のいずれか一項に記載の使用であって、

前記 JAK 阻害剤が、JAK1 を阻害することを特徴とする、
使用。

【請求項 44】

請求項 39 から 43 のいずれか一項に記載の使用であって、

前記 JAK 阻害剤が、3 - [(3R, 4R) - 4 - メチル - 3 - [メチル (7H - ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 4 - イル) アミノ] ピペリジン - 1 - イル] - 3 - オキソプロパンニトリル (CP - 690, 550) および / または (E) - 2 - シアノ - 3 - (4 - ニトロフェニル) - N - ((R) - 1 - フェニルエチル) アクリルアミド (WP - 1034) を含むことを特徴とする、

使用。

40

【請求項 45】

請求項 39 から 44 のいずれか一項に記載の使用であって、

前記 JAK 阻害剤が、3 - [(3R, 4R) - 4 - メチル - 3 - [メチル (7H - ピロロ [2, 3 - d] ピリミジン - 4 - イル) アミノ] ピペリジン - 1 - イル] - 3 - オキソプロパンニトリル (CP - 690, 550) を含むことを特徴とする、

使用。

50

【請求項 46】

請求項 39 から 44 のいずれか一項に記載の使用であって、
前記 JAK 阻害剤が、(E) - 2 - シアノ - 3 - (4 - ニトロフェニル) - N - ((R) - 1 - フェニルエチル) アクリルアミド (WP - 1034) を含むことを特徴とする、
使用。

【請求項 47】

請求項 39 から 46 のいずれか一項に記載の使用であって、
前記薬剤が、JAK3 - A572V、JAK3 - A573V および JAK1 - Y652D からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異を含む対象での NK T C L の治療のための薬剤であることを特徴とする、
使用。

10

【請求項 48】

ナチュラルキラー T 細胞リンパ腫 (NK T C L) の治療での使用のための、
JAK 阻害剤。

【請求項 49】

請求項 48 に記載の JAK 阻害剤であって、
前記 JAK 阻害剤が、JAK1、JAK2、JAK3 および / または TYK2 タンパク質のうちの少なくとも 1 つを阻害することを特徴とする、
JAK 阻害剤。

【請求項 50】

請求項 48 または 49 に記載の JAK 阻害剤であって、
前記 JAK 阻害剤が、JAK3 および / または JAK1 を阻害することを特徴とする、
JAK 阻害剤。

20

【請求項 51】

請求項 48 から 50 のいずれか一項に記載の JAK 阻害剤であって、
前記 JAK 阻害剤が、JAK3 を阻害することを特徴とする、
JAK 阻害剤。

【請求項 52】

請求項 48 から 50 のいずれか一項に記載の JAK 阻害剤であって、
前記 JAK 阻害剤が、JAK1 を阻害することを特徴とする、
JAK 阻害剤。

30

【請求項 53】

請求項 48 から 52 のいずれか一項に記載の JAK 阻害剤であって、
前記 JAK 阻害剤が、3 - [(3R, 4R) - 4 - メチル - 3 - [メチル(7H - ピロロ[2, 3 - d]ピリミジン - 4 - イル)アミノ]ピペリジン - 1 - イル] - 3 - オキソプロパンニトリル (CP - 690, 550) および / または (E) - 2 - シアノ - 3 - (4 - ニトロフェニル) - N - ((R) - 1 - フェニルエチル) アクリルアミド (WP - 1034) を含むことを特徴とする、
JAK 阻害剤。

【請求項 54】

請求項 48 から 53 のいずれか一項に記載の JAK 阻害剤であって、
前記 JAK 阻害剤が、3 - [(3R, 4R) - 4 - メチル - 3 - [メチル(7H - ピロロ[2, 3 - d]ピリミジン - 4 - イル)アミノ]ピペリジン - 1 - イル] - 3 - オキソプロパンニトリル (CP - 690, 550) を含むことを特徴とする、
JAK 阻害剤。

40

【請求項 55】

請求項 48 から 53 のいずれか一項に記載の JAK 阻害剤であって、
前記 JAK 阻害剤が、(E) - 2 - シアノ - 3 - (4 - ニトロフェニル) - N - ((R) - 1 - フェニルエチル) アクリルアミド (WP - 1034) を含むことを特徴とする、
JAK 阻害剤。

50

【請求項 5 6】

請求項 4 8 から 5 5 のいずれか一項に記載の J A K 阻害剤であって、

前記 N K T C L が、J A K 3 - A 5 7 2 V、J A K 3 - A 5 7 3 V および J A K 1 - Y 6 5 2 D からなる群から選択される少なくとも 1 つの突然変異を含む対象におけるものであることを特徴とする、

J A K 阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がん治療および/または診断に関する。具体的には、ナチュラルキラー/T細胞リンパ腫(NK T C L)の治療および/または診断に関する。

10

【背景技術】

【0002】

ナチュラルキラー(NK)細胞リンパ腫は、非ホジキンリンパ腫(NHL)の一種である。ほとんどのNHL(90%)は、B細胞起源である。NK細胞リンパ腫は、B細胞からは発生しない。しかしながら、NK細胞リンパ腫が発生する正常細胞については、未だ議論がされている。特に、NK細胞リンパ腫が真のNK細胞の存在を意味するのか、または、単に異常な細胞マーカーを有するT細胞の存在を意味するのかどうか議論されている。NK細胞リンパ腫の正確な系列に関する明白な証拠が存在しないので、多くの研究者は、この状態を分類するときにはNK/T細胞リンパ腫(NK T C L)という用語を用いることを好む。

20

【0003】

ナチュラルキラーT細胞リンパ腫(NK T C L)は、特に、アジア諸国および一部の中南米で見られる。それは、アジアにおける成熟T細胞リンパ腫の全事例の半分までを占める(1)。しかしながら、より一般的なB細胞リンパ腫と比べて、その分子特性および病因についてはほとんど知られていない。NK T C Lに関して承認された標準的な第一選択治療が現在のところないために、リンパ腫の当該サブタイプについての基礎科学および臨床研究はほとんど進展がなく、これらの患者の扱いにおいて大きな挑戦を構成し続ける。多剤化学療法および領域照射療法にもかかわらず、5年の全生存は非鼻型NK T C Lではおよそ9%であり、鼻型NK T C Lでは42%である(2, 3)。

30

【0004】

比較的より一般的なB細胞リンパ腫と比べて、NK T C Lの分子特性および病因についてはほとんど知られていない。これは、西洋で相対的に希少であり十分なバイオプシーを得ることが困難であることに一部起因し得る。このように、従来化学療法でのNK T C Lの治療は、これまで芳しくない結果が得られており、結果はほとんど常に、ステージI I IまたはI V疾患を有する患者に関して致命的である。

【0005】

NK T C Lにおける新規の遺伝子異常および潜在的な治療標的、ならびに、NK T C Lのための潜在的な治療剤を同定することが望ましい。

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、がん治療および/または診断、具体的には、ナチュラルキラー/T細胞リンパ腫(NK T C L)の治療および/または診断に関する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

第一の態様によれば、本発明は、少なくとも1つのJ A K 遺伝子について対象の遺伝子型を試験するステップを含む、対象でのナチュラルキラーT細胞リンパ腫(NK T C L)の感受性を予測する、および/またはNK T C Lを診断するための方法に関し、ここで、突然変異型J A K 遺伝子の存在は、対象がNK T C Lを発症するリスクがある、および/

50

または、NKTCCLを有することを示す。

【0008】

本発明はまた、対象が野生型または突然変異型JAKタンパク質を発現するかどうか試験するステップを含む、対象でのナチュラルキラーT細胞リンパ腫(NKTCCL)の感受性を予測する、および/またはNKTCCLを診断するための方法に関し、ここで、突然変異型JAKタンパク質の発現は、対象がNKTCCLを発症するリスクがある、および/または、NKTCCLを有することを示す。

【0009】

第二の態様によれば、本発明は、以下のステップ：

(i) 少なくとも1つの突然変異型JAK遺伝子を含むNKTCCL細胞株を準備するステップ；

(ii) NKTCCL細胞株を薬剤に接触させるステップ；および

(iii) 哺乳類NKTCCL細胞株に対する薬剤の効果を判定するステップ；

を含む、NKTCCLを治療することが可能な薬剤をスクリーニングするための方法に関し、

ここで、薬剤が、NKTCCL細胞株の生存能力、生育および/または増殖を減少させる能力、および/または、NKTCCL細胞株のアポトーシスを増加させる能力は、薬剤がNKTCCLを治療する能力を示す。

【0010】

第三の態様によれば、本発明は、以下のステップ：

(i) 突然変異型JAK遺伝子を保有するNKTCCL細胞株を準備するステップ；

(ii) NKTCCL細胞株を薬剤に接触させるステップ；および

(iii) NKTCCL細胞株に対する薬剤の効果を判定するステップ；

を含む、少なくとも1つのJAKタンパク質の活性を低下させることが可能な薬剤をスクリーニングするための方法に関し、

ここで、薬剤が、生存能力、生育および/または増殖を減少させる能力、および/または、アポトーシスを増加させる能力は、候補薬剤が少なくとも1つのJAKタンパク質の活性を低下させる能力を示す。

【0011】

第四の態様によれば、少なくとも1つの突然変異型JAK遺伝子を含むNKTCCL動物モデルが提供される。

【0012】

第五の態様によれば、本発明は、JAK阻害剤を対象に投与するステップを含む、ナチュラルキラーT細胞リンパ腫(NKTCCL)を治療する方法に関する。

【0013】

本発明はまた、ナチュラルキラーT細胞リンパ腫(NKTCCL)の治療のための薬剤の調製でのJAK阻害剤の使用を含む。

【0014】

本発明はさらに、ナチュラルキラーT細胞リンパ腫(NKTCCL)の治療に用いるためのJAK阻害剤を含む。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、NKTCCLサンプルでのJAK3 A572VおよびA573V突然変異の同定に導く、高解像度融解(HRM)およびサンガーシーケンスのデータを示す。図1(a)は、JAK3遺伝子のJH2シュードキナーゼドメイン上のA572VおよびA573V突然変異の位置を示す。JAK3突然変異を確認するために用いた高解像度融解(HRM)およびサンガーシーケンスのデータを図1(b)~(h)に示す。具体的には：図1(b)は、JAK3 A572VとA573V突然変異の比率を円グラフで示す(n=65)。図1(c)は、3つの遺伝子型：野生型JAK3、ヘテロ接合性JAK3(c.1715C>T, p.A1a572Val)およびホモ接合性JAK3(c.171

10

20

30

40

50

5 C>T, p . A l a 5 7 2 V a l) について、野生型サンプルに標準化したHRM差分プロット(反復試験)を示す。図1(d)は、配列決定されてヘテロ接合性JAK3(c . 1 7 1 8 C>T, p . A l a 5 7 3 V a l) 突然変異と確認されたホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)NKTC Lサンプルの、代表的なHRM差分曲線を示す。とりわけ、JAK3 A 5 7 2 VまたはA 5 7 3 V突然変異のいずれかを有するサンプルに関するHRM差分プロットは、C>T突然変異が同一のため、同様であった。また、代表的なシーケンスクロマトグラムを、JAK3野生型対立遺伝子に関して図1(e)に、A 5 7 2 Vヘテロ接合性突然変異型に関して図1(f)に、A 5 7 3 Vヘテロ接合性突然変異型に関して図1(g)に、およびA 5 7 2 Vホモ接合性突然変異型に関して図1(h)に示す。

【図2】図2は、JAK3およびSTAT5のリン酸化に対するIL-2の効果、および、NKTC L細胞株に対するCP-690, 550処理の効果を示すデータを示す。図2(a)は、組み換えヒトIL-2(200IU/ml)有りまたは無しで培養して、48時間の時点で採取して、JAK3およびSTAT5のリン酸化をイムノプロットティングによりアッセイした、NK-S1(JAK突然変異型)およびKH Y G-1(野生型)細胞に関するイムノプロットティングの結果を示す。NK-S1、KH Y G-1およびK562(コントロール)細胞株を、pan-JAK阻害剤CP-690, 550で処理した評価の結果を図2(b)~2(d)に示す。図2(b)は、48時間の時点でイムノプロットティングにより評価した、サンプルでのSTAT5リン酸化を示す。図2(c)は、72時間の時点でMTSアッセイにより分析した、細胞生存能力を示す。図2(d)は、アネキシンV-FITC染色により評価してフローサイトメトリーにより分析した、72時間における薬剤誘導アポトーシスを示す。実験は少なくとも3回繰り返した。(c)および(d)における結果は、トリPLICATE ± s . e . m . の平均を示す。*は、対応のあるスチューデントt検定によるp<0.05を示す。

【図3】図3は、突然変異型NKTC L細胞株NK-S1の、サイトカイン非依存性の生育を示すデータを提供する。具体的には、NK-S1(JAK3突然変異型)およびKH Y G-1(JAK3野生型)は、組み換えヒトIL-2(0~200IU/ml)有りまたは無しで培養した。細胞生存能力データを、NK-S1に関して図3(a)に、KH Y G-1に関して図3(b)に示す。細胞生存能力を7日間毎日、MTSアッセイによりモニターし、細胞生育を(490nmでの吸光度)-(650nmにおけるリファレンス)として示した。(a)および(b)における結果は、トリPLICATE ± s . d . の平均を示す。

【図4】図4は、JAK3 A 5 7 2 Vの突然変異が、構成的なJAK3の活性およびIL-2非依存性のNKTC L細胞増殖を生じさせることを示すデータを示す。図4Aは、100nMのJAK3 siRNA(si-JAK3)またはコントロールsiRNA(si-Ctrl)で24時間事前処理して72時間まで増殖アッセイを行なった、NK-S1細胞に関するデータを示す(右パネル)。同時に、これらの細胞を採取して、タンパク質抽出物を、リン酸化JAK3(pJAK3)、リン酸化STAT5(pSTAT5)、JAK3、STAT5、または標準化コントロールとしての-アクチンに対する抗体を用いてウェスタンプロットティングを行なった。図4Bは、野生型JAK3(JAK3 WT)または突然変異型JAK3発現ベクター(すなわちJAK3 A 5 7 2 V)で一時的にトランスフェクトされた、KH Y G-1細胞に関するデータを示す。これらの細胞におけるpJAK3、pSTAT5、JAK3およびSTAT5の相対的レベルをウェスタンプロットティングにより検出して(上パネル)、これらの細胞を用いた増殖分析を、IL-2有りまたは無しで48時間行なった(下パネル)。全ての結果は、3回の非依存の実験の平均SEMとして示す。*は、ビヒクルコントロール(ビヒクル)と比較したp<0.05である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

(定義)

10

20

30

40

50

本明細書で用いられる用語「阻害剤」は、タンパク質の活性を低下させることが可能な任意の物質を指し、例えば、JAK阻害剤はJAKタンパク質の活性を低下させることが可能である。具体的には、JAK3阻害剤は、JAK3タンパク質の活性を低下させることが可能である。タンパク質の活性の低下は、例えばタンパク質の発現または生物学的状況でタンパク質が機能するメカニズムの阻害によるなど、直接的または間接的であってよい。例えば、JAK3キナーゼは、ATP分子がATP結合部位に結合することを必要とし得るので、特にATP結合部位に結合してブロッキングすることにより、JAK3キナーゼの活性は減少する。JAKタンパク質の活性もまた、別のタンパク質、例えばサイトカイン受容体の活性を必要とし得るので、このタンパク質の活性の阻害もまた、JAKタンパク質の活性を低下させ得る。あるいは、JAK3キナーゼタンパク質は、対応するmRNAの翻訳など関連のある核酸ドメインの遺伝子発現の阻害により、より少なく発現され得る。

10

【0017】

NKTC Lは、WHO分類に従ったNK/T細胞リンパ腫を指す(6)。用語「ナチュラルキラーT細胞リンパ腫」、NKTC Lおよび「NK/T細胞リンパ腫」は互換的に用いられ、B細胞起源でない非ホジキンリンパ腫(NHL)の一種を指す。NKTC Lは、腫瘍壊死、血管中心性および適切な免疫表現型、特に、CD56、細胞質CD3の存在、およびEBERのほぼ普遍的な存在、の典型的形態を有する。NK/T細胞リンパ腫は、T細胞系統の疾患でありHTLV-I感染と関連する成人T細胞白血病/リンパ腫とは異なる。

20

【0018】

用語「治療」は、疾患、例えばナチュラルキラー/T細胞リンパ腫(NKTC L)と関連する1つまたは複数の症状を緩和、予防および/または除去することを含む。

【0019】

本発明は、がん治療および/または診断、具体的には、ナチュラルキラー/T細胞リンパ腫(NKTC L)の治療および/または診断に関する。

【0020】

第一の態様によれば、少なくとも1つのJAK遺伝子に関して対象の遺伝子型について試験するステップを含む、対象でのナチュラルキラーT細胞リンパ腫(NKTC L)の感受性を予測する、および/または、NKTC Lを診断するための方法が提供され、ここで、突然変異型JAK遺伝子の存在は、対象がNKTC Lを発症するリスクがある、および/またはNKTC Lを有することを示す。ヘテロ接合性またはホモ接合性のいずれかの突然変異型JAK遺伝子の存在は、対象がNKTC Lを発症するリスクがある、および/またはNKTC Lを有することを示す。

30

【0021】

JAK遺伝子の任意の1つまたは任意の組み合わせが試験され得る。試験されるJAK遺伝子は、JAK1、JAK2、JAK3およびTYK2からなる群から選択されてよい。例えば、JAK3および/またはJAK1遺伝子が試験され得る。概して、配列番号1は野生型JAK3遺伝子を示す。一例では、配列番号1のヌクレオチド15792におけるCとTの置換、および/または、ヌクレオチド15795におけるCとTの置換を含む突然変異型JAK3遺伝子の存在は、対象がNKTC Lを発症するリスクがある、および/またはNKTC Lを有することを示す。

40

【0022】

概して、配列番号3は野生型JAK1遺伝子を示す。別の例では、配列番号3のヌクレオチド124823におけるTとGの置換を含む突然変異型JAK1遺伝子の存在は、対象がNKTC Lを発症するリスクがある、および/またはNKTC Lを有することを示す。突然変異型のJAK1およびJAK3遺伝子の両方の存在もまた、対象がNKTC Lを発症するリスクがある、および/またはNKTC Lを有することを示す。

【0023】

前記の方法は、対象由来の分離細胞サンプルに対して行なってよい。分離細胞サンプル

50

は、血液由来および/または腫瘍サンプルであってよい。したがって、前記の方法は、試験するために対象から分離細胞サンプルを準備するステップをさらに含んでよい。前記の方法は、前記の試験のために、対象、血液サンプルおよび/または分離細胞サンプルから核酸分子を分離するステップをさらに含んでよい。分離核酸分子は、ゲノムDNAまたはmRNAを含んでよい。特に、試験は、ゲノムDNA、mRNAおよび/またはcDNAについて行われてよい。

【0024】

任意の適切な技術を試験に用いてよい。例えば、試験は、配列解析、制限断片長多型分析、ハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)および/または逆転写PCRによってよい。特に、サンガーシーケンスおよび高解像度融解のような技術を、試験のために用いてよい。

10

【0025】

本発明の別の態様では、対象が野生型または突然変異型JAKタンパク質を発現するかどうか試験するステップを含む、対象でのナチュラルキラーT細胞リンパ腫(NKTCCL)の感受性を予測する、および/またはNKTCCLを診断するための方法が提供され、ここで、突然変異型JAKタンパク質の発現は、対象がNKTCCLを発症するリスクがある、および/またはNKTCCLを有することを示す。

【0026】

JAKタンパク質の任意の1つまたは任意の組み合わせが試験され得る。試験されるJAKタンパク質は、JAK1、JAK2、JAK3およびTYK2からなる群から選択されてよい。例えば、JAK3および/またはJAK1タンパク質が試験され得る。概して、配列番号2は野生型JAK3タンパク質を示す。一例では、配列番号2のアミノ酸572におけるAとVの置換、および/または、アミノ酸573におけるAとVの置換を含む突然変異型JAK3遺伝子の存在は、対象がNKTCCLを発症するリスクがある、および/またはNKTCCLを有することを示す。

20

【0027】

概して、配列番号4は野生型JAK1タンパク質を示す。別の例では、配列番号4のアミノ酸652におけるYとDの置換を含む突然変異型JAK1タンパク質の存在は、対象がNKTCCLを発症するリスクがある、および/またはNKTCCLを有することを示す。突然変異型のJAK3およびJAK1タンパク質の両方の存在もまた、対象がNKTCCLを発症するリスクがある、および/またはNKTCCLを有することを示す。

30

【0028】

前記の方法は、対象由来の分離血液および/または細胞サンプルに対して行なってよい。分離細胞サンプルは腫瘍由来であってよい。したがって、前記の方法は、試験のために対象から分離血液および/または細胞サンプルを準備するステップをさらに含んでよい。前記の方法は、前記試験のために、対象、血液サンプルおよび/または分離細胞サンプルからタンパク質分子を分離するステップをさらに含んでよい。

【0029】

任意の適切な方法を用いて、関連のある野生型および/または突然変異型JAKタンパク質を発現しているかどうか検出してよい。例えば、試験は、タンパク質配列決定および/または抗体検出によってよい。特に、関連のある野生型および/または突然変異型JAKタンパク質に対して特異性を有する少なくとも1つの抗体を用いた酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)が用いられてよい。

40

【0030】

本発明の第二の態様では、以下のステップ：

- (a) 少なくとも1つの突然変異型JAK遺伝子を含むNKTCCL細胞株を準備するステップ；
 - (b) NKTCCL細胞株を薬剤に接触させるステップ；および
 - (c) NKTCCL細胞株に対する、薬剤の効果を判定するステップ；
- を含む、NKTCCLを治療することが可能な薬剤をスクリーニングするための方法が提

50

供され、

ここで、薬剤が、NKTC L細胞株の生存能力、生育および/または増殖を減少させる能力、および/または、NKTC L細胞株のアポトーシスを増加させる能力は、薬剤がNKTC Lを治療する能力を示し得る。

【0031】

本発明の第三の態様では、以下のステップ：

(i) 少なくとも1つの突然変異型JAK遺伝子を保有するNKTC L細胞株を準備するステップ

(ii) NKTC L細胞株を薬剤に接触させるステップ；および

(iii) NKTC L細胞株に対する薬剤の効果を判定するステップ；

を含む、少なくとも1つのJAKタンパク質の活性を低下させることが可能な薬剤をスクリーニングするための方法が提供され、

ここで、薬剤が、細胞株の生存能力、生育および/または増殖を減少させる能力、および/または、細胞株のアポトーシスを増加させる能力は、候補薬剤が、少なくとも1つのJAKタンパク質の活性を低下させる能力を示す。

【0032】

NKTC L細胞株は、突然変異型JAK1、JAK2、JAK3またはTYK2遺伝子の任意の1つまたは任意の組み合わせを保有してよい。例えば、NKTC L細胞株は、突然変異型JAK3遺伝子および/または突然変異型JAK1遺伝子を保有してよい。特に、哺乳類のNKTC L細胞株は、以下の突然変異：

(i) 配列番号1のヌクレオチド15792におけるCとTの置換(JAK3遺伝子中)；

(ii) 配列番号1のヌクレオチド15795におけるCとTの置換(JAK3遺伝子中)；および

(iii) 配列番号3のヌクレオチド124823におけるTとGの置換(JAK1遺伝子中)

の少なくとも1つを保有してよい。

【0033】

第四の態様によれば、本発明はまた、少なくとも1つの突然変異型JAK遺伝子を含むNKTC L動物モデルに関する。例えば、NKTC L動物モデルは、突然変異型JAK1、JAK2、JAK3およびTYK2遺伝子からなる群から選択される少なくとも1つの突然変異を含んでよい。具体的には、NKTC L動物モデルは、突然変異型JAK3遺伝子および/または突然変異型JAK1遺伝子を含む。より具体的には、NKTC L動物モデルは、少なくとも1つの以下：

(i) 配列番号1のヌクレオチド15792におけるCとTの置換；

(ii) 配列番号1のヌクレオチド15795におけるCとTの置換；または

(iii) 配列番号3のヌクレオチド124823におけるTとGの置換

の突然変異を含む。

【0034】

NKTC L動物モデルはまた、NKTC Lを治療することができる候補薬剤のスクリーニングに有用であり得る。

【0035】

第五の態様によれば、少なくとも1つのJAK阻害剤を対象に投与するステップを含む、ナチュラルキラーT細胞リンパ腫(NKTC L)を治療する方法が提供される。任意の適切なJAK阻害剤が用いられ得る。本発明の別の態様では、ナチュラルキラーT細胞リンパ腫(NKTC L)の治療のための薬剤を調製するための、少なくとも1つのJAK阻害剤の使用が提供される。本発明の別の態様では、ナチュラルキラーT細胞リンパ腫(NKTC L)の治療に用いるためのJAK阻害剤が提供される。JAK阻害剤は、JAK3タンパク質の活性を低下させることが可能であり得る。

【0036】

10

20

30

40

50

例えば、JAK阻害剤は、JAK1、JAK2、JAK3および/またはTYK2の少なくとも1つを阻害し得る。したがって、前記の阻害剤はpan-JAK阻害剤であり得る。1つの具体的な例では、JAK阻害剤は、JAK3および/またはJAK1を阻害し得る。より具体的には、JAK阻害剤はJAK3を阻害し得て、または、JAK阻害剤はまたJAK1も阻害し得る。

【0037】

第一の具体例では、JAK阻害剤は、3-[(3R,4R)-4-メチル-3-[メチル(7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-イル)アミノ]ピペリジン-1-イル]-3-オキソプロパンニトリル(CP-690,550としても知られる)を含んでよい。第二の具体例では、(E)-2-シアノ-3-(4-ニトロフェニル)-N-((R)-1-フェニルエチル)アクリルアミド(WP-1034としても知られる)を含んでよい。

10

【0038】

JAK阻害剤が投与される対象は哺乳類を含んでよい。対象はヒトを含んでよい。対象は、ホモ接合性またはヘテロ接合性の突然変異を、少なくとも1つのJAK遺伝子/JAKタンパク質に保有してよい。例えば、対象は、ホモ接合性またはヘテロ接合性の突然変異を、JAK1/JAK1、JAK2/JAK2、JAK3/JAK3および/またはTYK2/TYK2に保有してよい。具体的には、対象は、ホモ接合性またはヘテロ接合性の突然変異を、JAK1/JAK1および/またはJAK3/JAK3に保有してよい。より具体的には、対象は、JAK3-A572V、JAK3-A573VおよびJAK1-Y652Dからなる群から選択される少なくとも1つの突然変異を有してよい。しかしながら、対象は、ホモ接合性の野生型表現型を含んでもよい。対象は、ホモ接合性の野生型、ヘテロ接合性またはホモ接合性の突然変異型遺伝子を保有していようとなかろうと、JAK遺伝子のうちの任意の1つ、その転写および/または翻訳産物(タンパク質)の発現が増加してよい。

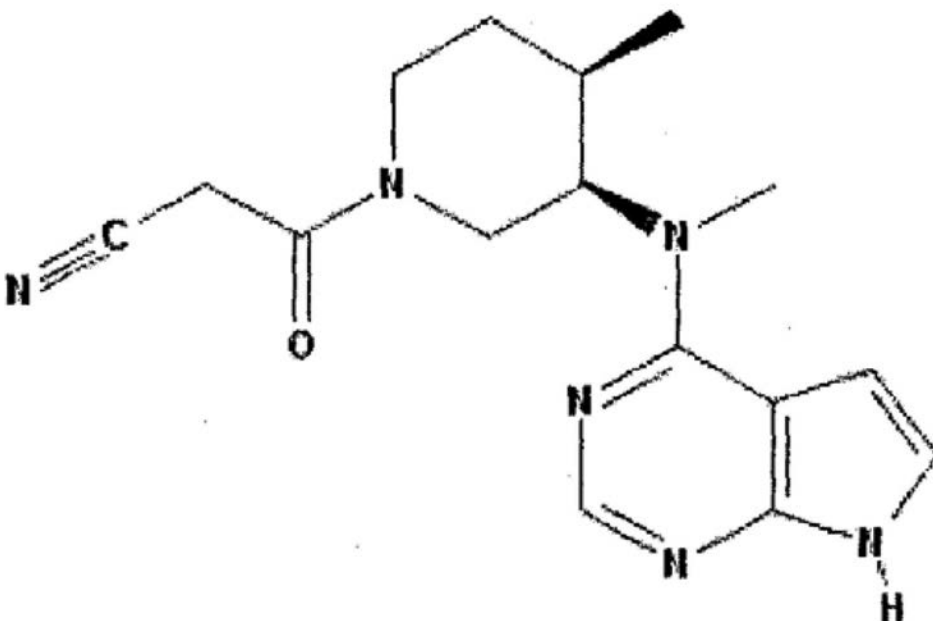
20

【0039】

CP-690,550はJAK阻害剤である。それは、トファシチニブ、タソシチニブ、または商品名XELJANZとして知られる。その化学名は、3-[(3R,4R)-4-メチル-3-[メチル(7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-イル)アミノ]ピペリジン-1-イル]-3-オキソプロパンニトリルであり、その構造式は：

30

【化1】



40

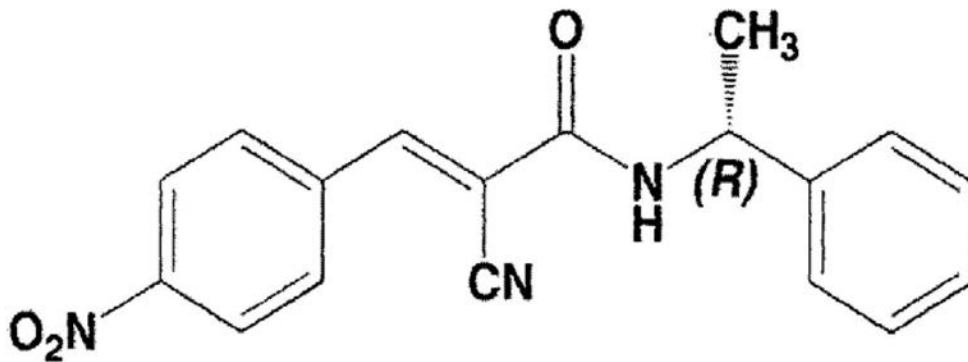
50

である。

【0040】

WP-1034は、急性骨髄性白血病においてアポトーシス促進および白血病抑制の効果を有すると記載されている(Faderlら, Anticancer Research 25:1841-1850(2005))(8)。それはチロシンキナーゼ阻害剤のチルホスチンファミリーのメンバーであり、主にJak-Statパスウェイの阻害剤として研究されている。その化学構造および名称は以下である：

【化2】



10

20

WP1034-(E)-2-シアノ-3-(4-ニトロフェニル)-N-((R)-1-フェニルエチル)アクリルアミド

【0041】

本発明を一般的に記載したが、説明の目的で提供されて本発明の限定を意図しない以下の実施例を参照することにより、同一のものがより容易に理解されるであろう。

【実施例】

【0042】

ナチュラルキラー/T細胞リンパ腫(NKTCCL)の分子論的病因はよく知られていない。NK/T細胞リンパ腫を生じさせる遺伝子変異は、完全には同定されていない。本研究では、Janusキナーゼ3(JAK3)体細胞活性化の突然変異(A572VおよびA573V)を、4人のNKTCCL患者のうち2人の全エキソーム配列決定により同定した。さらに、JAK3突然変異の有病率の検証を、サンガーシーケンスおよび高解像度融解(HRM)分析により追加の61事例で決定した。合計で、65事例のうち23事例(35.4%)が、JAK3突然変異を有していた。JAK3 A572V突然変異を有する突然変異型NKTCCL細胞株は、IL-2非依存性の生育および構成的なJAK3とSTAT5のリン酸化を示し、その発がんの役割を示唆した。JAK3突然変異の機能的特性は、細胞生育の増加を導くサイトカイン非依存性のJAK/STATの構成的な活性化におけるその関与を支持する。これらの突然変異は、NKTCCLの病因において重大な役割を果たし得る。さらに、JAK3突然変異型および野生型NKTCCL細胞株は、いずれも、新規のpan-JAK阻害剤CP-690,550で処理すると、用量依存的にリン酸化STAT5が減少し、細胞生存能力が低下し、アポトーシスが増加した。CP-690,550はpan-JAK阻害剤であり、JAK3に対してだけでなくJAK1に対しても阻害作用を有する。このことは、重要であり得る。なぜならば、JAK-STATシグナリングパスウェイ系でのそれらの機能において、JAK1とJAK3はクロストークしており、一方の阻害に应答して、もう一方の何らかの補完的な上方制御があり得るからである。例えば、JAK3が阻害される場合は、JAK3の減少した活性を補うためにJAK1が上方制御され得て、このことは、JAK-STATシグナリングを保ち得る。逆もまた当てはまる。さらに例を挙げると、JAK1だけでなくJAK3の活性も低下させることが可能なpan-JAK阻害剤を用いたNKTCCLの治療は、JAK-STATシ

30

40

50

グナリングの阻害に特に効果的であり得る。

【0043】

それ故に、脱調節化 JAK / STAT パスウェイを標的とすることは、NK T CL 患者の有望な治療となり得る。これらの知見は、NK T CL 患者の扱いに対して重要な暗示を有する。

【0044】

(材料および方法)

<組織サンプル>

対応する新鮮な凍結組織および末梢血サンプルを、4人の承諾を得たNK T CL 患者から取得した。本発明者らは、検証のために、さらに61人のNK T CL 患者由来のパラフィン包埋組織ブロックを確認した。NK T CL の診断は、造血およびリンパ組織の腫瘍の2008年世界保健機関(WHO)分類に従って行なった(6)。全てのサンプルは、シングヘルスの血液病理学者により中心的にレビューされた。本研究は、シンガポールのシングヘルスを中心とした治験審査委員会により承認された。

10

【0045】

<DNAの分離>

凍結組織および対応する血液サンプル(paired blood sample)のDNAを、それぞれ、DNeasy Blood and Tissue Mini Kit(Qiagen)およびQIAmp DNA Blood Midi Kit(Qiagen)を用いて、メーカーの説明書に従って分離した。ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)サンプルに関しては、各サンプル由来の1つまたは2つの10μMスライスからゲノムDNAを抽出して、パラフィンをキシレンにより除去して、組織を100%エタノールで2回洗浄した後、一晚、プロテイナーゼKで消化した。それから、DNeasy Blood and Tissue Mini Kit(Qiagen)を用いてDNAを抽出した。

20

【0046】

<Janusキナーゼにおける体細胞突然変異の検出>

各サンプルから抽出されたゲノムDNAは、全ゲノムがREPLI-g WGA Midi Kit(Qiagen)で増幅された。JAK1、JAK2、JAK3およびTyk2のコーディングエクソン配列をサンガーシーケンスにより配列決定して突然変異を検出した。突然変異が腫瘍においてのみ検出されたが対応する血液サンプルでは検出されなかった場合に、突然変異の体細胞起源を確認した。

30

【0047】

突然変異の配列情報を以下の表1および添付のゲノムDNA、タンパク質およびcDNA配列リスト(配列番号1~配列番号6)に、以下の配列名称とともに示す:

配列番号1 - JAK3野生型ゲノムDNA

配列番号2 - JAK3野生型アミノ酸配列

配列番号3 - JAK1野生型ゲノムDNA

配列番号4 - JAK3野生型アミノ酸配列

配列番号5 - JAK3野生型cDNA

配列番号6 - JAK1野生型cDNA

40

【0048】

【表 1】

表 1：JAK1 および JAK3 の突然変異情報

	タンパク質	ORF ¹	cDNA	遺伝子
JAK1	Y652D ⁶	T1954G	T2203G ²	T124823G ⁴
JAK3	A572V ⁷	C1715T	C1815T ³	C15792T ⁵
JAK3	A573V ⁷	C1718T	C1818T ³	C15795T ⁵

表 1 の注：

¹ORF：オープンリーディングフレーム、コーディング領域、ATG から始まる

²NCBI 参照配列：NM_002227.2 (配列番号 6)

³NCBI 参照配列：NM_000215.3 (配列番号 5)

⁴NCBI 参照配列：NG_023402.1 (配列番号 3)

⁵NCBI 参照配列：NG_007273.1 (配列番号 1)

⁶NCBI 参照配列：NP_002218.2 (配列番号 4)

⁷GenBank：AAC50950.1 (配列番号 2)

10

【0049】

<高解像度融解 (HRM) および双方向のサンガーシーケンス分析を用いた突然変異検証>

20

高解像度融解 (HRM) およびサンガーシーケンスを用いて JAK1 および JAK3 の突然変異を確認し、NKTC L 患者個体群でのそれらの有病率を検証した。両方の方法を組み合わせれば、FFPE サンプルにおける突然変異検出の精度が非常に改善する。JAK2 V617F 突然変異もまた、両方の方法で配列決定した。検証に用いたプライマーセットの配列を表 2 にリスト化し (下記参照)、対応する配列名称で添付の配列リストに含ませる。

【0050】

【表 2】

表 2：サンガーシーケンスおよびHRM分析に用いた検証プライマーセット

プライマー名	プライマー配列 (5' → 3')	検出方法/ 産物サイズ	配列名称
JAK1__Seq __Exon14F	CTGGCCTGAGACATTCCTATG	サンガーシーケ ンス/144bp	配列番号7
JAK1__Seq __Exon14R	TGAAAGAGAACACACTTACTCTCCAC		配列番号8
JAK1__HRM __Exon14F	GCATGATGAGACAGGTCTCCCAC	HRM/83bp	配列番号9
JAK1__HRM __Exon14R	GAGAACACACTTACTCTCCACGTC		配列番号10
JAK2__Seq __Exon12F	CAGCAAGTATGATGAGCAAGC	サンガーシーケ ンス/121bp	配列番号11
JAK2__Seq __Exon12R	ACAGATGCTCTGAGAAAGGC		配列番号12
JAK2__HRM __Exon12F	GCTTTCTCACAAGCATTTGG	HRM/85bp	配列番号13
JAK2__HRM __Exon12R	GGCATTAGAAAGCCTGTAGT		配列番号14
JAK3__Seq __Exon12F	GCAGGTCTGTGAGCACAAAAT	サンガーシーケ ンス/167bp	配列番号15
JAK3__Seq __Exon12R	ACTGTCTCCAGCCATGCAC		配列番号16
JAK3__HRM __Exon12F	CCACCTTCCCAGTCATTC	HRM/64bp	配列番号17
JAK3__HRM __Exon12R	GAGATGCCGGTACGACACTTG		配列番号18

10

20

30

【0051】

HRM曲線分析を用いて点変異の存在を判別した。関連のある突然変異を含む標的DNAフラグメントをゲノムDNAサンプルから増幅するために、SsoFast (商標) EvaGreen Supermix (登録商標) (BioRad, Cat. No. 172-5200) を用いた。HRMプライマーを終濃度600nMで用いて、BioRadのCFX96リアルタイムPCR検出システムを用いて反復して反応を行なった。サイクルおよび融解条件は以下のとおりにした：1サイクルの98 2分；39サイクルの98 5秒、58 10秒；1サイクルの95 30分、および、0.2 /秒で72 から95 まで上昇させる融解。Biorad Precision Melt Analysis (商標) ソフトウェアを用いてHRM曲線を分析した。野生型の曲線から外れるHRM差分曲線を、突然変異有りとみなした。

40

【0052】

サンガーシーケンスのために、Invitrogen Platinum Taqポリ

50

メラゼ (Cat. No. 10966-083) を用いて、95 10分; 39サイクルの95 30秒; 60 30秒、72 1分、そして72 10分の最後の伸長のサイクルでPCRを行なった。ABI BigDye Terminator v3.1 (Cat. No. 4337457) を用いて、96 1分; 29サイクルの96 10秒; 50 5秒および60 4分のサイクルでシーケンスPCRを行なった。結果として生じた産物をABI 3730 DNAアナライザーに供した。

【0053】

<細胞株、細胞生存能力およびアポトーシス分析>

NK-S1は、以前に報告されたNK T C L 異種移植片から確立された細胞株である(7)。異種移植片は、JAK1 (Y652D) およびJAK3 (A572V) 突然変異の両方を有することが分かった同一患者由来の精巣の転移腫瘍から取得した。抗生物質、熱不活化FBS (10%) およびウマ血清 (ES) (10%) で補充されたDMEM培地中で、60よりも多い継代培養でNK-S1を培養した。表現型分析は、細胞内染色により、表面CD3⁻CD56⁺、およびグランザイムB⁺を示した。NK-S1 NK T C L 細胞株をシーケンスして、JAK3 A572Vに関してホモ接合性突然変異、およびJAK1コドン652の突然変異を有することを確認した。KHYG-1は、Japanese Collection of Research Bioresourcesから取得したIL-2依存性の侵襲性NK白血球細胞株であり、抗生物質、熱不活化FBS (10%)、ES (10%) および200IU/mlの組み換えヒトIL-2 (プロロイキン、ノバルティス) で補充されたRPMI培地中で培養した⁷。KHYG-1をシーケンスして、JAK3のコドン572とコドン573、およびJAK1のコドン652とコドン658に関して野生型であることが分かった。K562 (CCL-234, ATCC) は、BCR-ABL融合遺伝子陽性の慢性骨髄性白血病 (CML) 細胞株である。

【0054】

pan-JAK阻害剤であるCP-690, 550 (Selleck Chemical, Cat. No. S5001) に対するNK T C L 細胞株の感受性を試験するために、細胞を 2×10^4 細胞/100 μ L/ウェルで96ウェルプレートにまいて、様々な濃度のCP-690, 550で、またはビヒクルコントロールで処理した。Cell Titer 96 (登録商標) Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit (Promega) を用いたMTSアッセイにより生存能力を評価して、吸光度を490nmと650nmの両方で読み取った(参考文献どおり)。薬剤誘導アポトーシスの程度を、アネキシンV-FITC (BD Biosciences) 染色により評価した。データの取得は、FACS Calibur フローサイトメーター (BD Biosciences) で行なった。

【0055】

<イムノブロットティング>

組み換えヒトIL-2 (プロロイキン、ノバルティス) 有りまたは無しで、または、CP-690, 550の存在下または不存在下で、インキュベート後、指示された時間間隔で細胞を採取した。細胞を氷冷リン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄して、50 μ lの氷冷RIPA緩衝液 [25mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 1% ノニデットP-40, 1% デオキシコレートナトリウム, 0.1% SDS, 1x ホスファターゼ阻害剤 (Cat. No. 78420, Thermo Fisher Scientific), 1x プロテアーゼ阻害剤 (Cat. No. 12978000, Roche Diagnostics) および1mM オルトバナデートナトリウム] 中で溶解させた。その後、細胞溶解物を氷上で10秒間、20Ampで2回超音波処理して、氷上でさらに15分間攪拌した。14,000gで15分間、4 で遠心分離後、上清を除去して、Bio-Rad Protein assay (Cat. No. 500-0006, Bio-Rad Laboratories) を用いてタンパク質濃度を決定した。Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (Cat. No. 165-8006, Bio-Rad Laboratories) を用いて、タ

ンパク質サンプルを、5%スタッキングおよび8%分離のSDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離して、Mini Trans-blot Electrophoretic Transfer Cell (Cat. No. 170-3930 EDU, Bio-Rad Laboratories) を用いて100Vで120分間、0.45 μM ニトロセルロース膜 (Cat. No. 162-0115, Bio-Rad Laboratories) 上にトランスファーした。PBST中5%ミルクで膜をブロッキングして、その後、PBST中5%のBSAおよび5mMのオルトバナデートナトリウム中で、ウサギ抗-ホスホ-jak1 (Tyr 1022/1023) (Cat. No. 3331, Cell Signaling)、ウサギ抗-ホスホ-JAK3 (Tyr 980/981) (D44E3) (Cat. No. 5031, Cell Signaling)、マウス抗-ホスホ-Stat5 (Tyr 694) (Cat. No. 9356, Cell Signaling) およびウサギ抗-ホスホ-stat3 (Tyr 705) (D3A7) (Cat. No. 9145, Cell Signaling) で一晩インキュベーションして、エンハンスド化学発光 (ECL) (Cat. No. 3407, Thermo Fisher Scientific, Cat. No. RPN 2132, Amersham) を用いて可視化した。Jak1に対する抗体 (6G4) (Cat. No. 3344, Cell Signaling)、Jak3に対する抗体 (Cat. No. 3775, Cell Signaling)、Stat5に対する抗体 (Cat. No. 9363, Cell Signaling) および -アクチンに対する抗体 (Cat. No. A1978, Sigma) を用いて、非リン酸化タンパク質を検出し、またはローディングコントロールとした。全ての抗体は、推奨される希釈で用いた。

10

20

【0056】

(結果)

サンガーシーケンスを用いて、リンパ節外NK T CLを有する4人の患者由来の新鮮な凍結腫瘍および血液検体におけるJAK1、JAK2、JAK3およびTyk2のエクソン領域をシーケンスした。2つのJAK3突然変異、A572V (p. Ala572Val, c. 1715C>T) およびA573V (p. Ala573Val, c. 1718C>T)、および新規のJAK1突然変異、Y652D (p. Tyr652Asp, c. 1954T>G) を同定した。興味深いことに、JAK3 A572VおよびJAK1 Y652Dの突然変異は同一サンプルに見いだされた。JAK3突然変異の両方とも、JH1キナーゼドメインに対して自己抑制的作用を有することが知られているJH2シュードキナーゼドメイン上のエクソン12に位置する (図1a)。JAK1およびJAK3において同定された3つのミスセンス突然変異は、全て、起源が体細胞であることが確認されて、ポリフェン (Polyphen) により、おそらく損傷であると予測された。

30

40

【0057】

同定された突然変異を、追加の61人のENK T CL患者のFFPEサンプル中で検証して、それらの有病率を確認した。この検証試験から、JAK3突然変異を有する別の21人の患者をサンガーシーケンスにより同定した。合計で、65人のNK T CL患者のうち、23人の患者 (35.4%) が、JAK3突然変異を有することが分かった (図1b)。高解像度融解 (HRM) 分析を40個のFFPEサンプルについて実施し、14個のJAK3突然変異型を検出した (35%)。JAK3突然変異を有する23人の患者のうち、ヘテロ接合性A572Vが17人、ホモ接合性A572Vが2人、ヘテロ接合性A573V突然変異型が2人、ホモ接合性A573V突然変異型が1人、そして、A572VとA573Vの両方のヘテロ接合性突然変異を有する患者が1人いた (図1c~h)。さらにJAK1 Y652D突然変異型は見られなかった。加えて、典型的なBCR/ABL陰性の慢性骨髄増殖性障害を有する患者および他のクローン性血液がん、例えば骨髄異形成症候群および急性骨髄性白血病を有する、様々な患者の大部分に存在することが最近になって判明した、JAK2 V617F (p. Val617Pheまたはc. 1849G>T) 突然変異を有する患者は見られなかった。

【0058】

50

(考 察)

< J A K 3 ^{A 5 7 2 V} 活性化突然変異は、サイトカイン非依存性の生育をもたらす >

I L - 2 は、N K 細胞の増殖および活性化に必要とされる必須のサイトカインである (4)。J A K 1 および J A K 3 は、S T A T 転写因子のリン酸化を介して I L - 2 受容体シグナリングを仲介する (5)。同定された活性化 J A K 3 突然変異の機能的な重要性を踏まえて、我々は、J A K 3 突然変異が、ホモ接合性 J A K 3 ^{A 5 7 2 V} 突然変異を有する N K T C L 細胞株 (N K - S 1) に対して I L - 2 非依存性の生育をもたらすことができるか試験した。J A K - 突然変異型 (N K - S 1) 細胞は、I L - 2 非依存性の生育 (図 3) および J A K 3 と S T A T 5 の両方の構成的なリン酸化 (図 2 a) を示した。対照的に、J A K 3 - 野生型 K H Y G - 1 細胞は、明らかに I L - 2 依存性であった (図 3 および図 2 a)。重要なことに、J A K 3 s i R N A で処理した N K - S 1 細胞は、コントロール s i R N A で処理した細胞と比較して、細胞増殖が有意に低減し、また、J A K 3 および S T A T 5 の自己リン酸化も減少した (図 4 A)。相反的に、突然変異型 J A K 3 (J A K 3 ^{A 5 7 2 V}) c D N A を一時的に過剰発現する K H Y G - 1 細胞は、I L - 2 非依存性の増殖および J A K 3 および S T A T 5 の自己リン酸化を示した (図 4 B)。これらの結果は、J A K 3 活性化の突然変異は機能対立遺伝子によるものであり、I L - 2 非依存的な様式で J A K / S T A T パスウェイの構成的活性に寄与することを示す。

10

【 0 0 5 9 】

本研究は、J A K 突然変異が、J A K 3 ^{A 5 7 2 V} と J A K 1 ^{Y 6 5 2 D} の両方の突然変異を有する患者サンプル由来の異種移植片から確立された N K T C L 細胞株において、サイトカイン非依存性の生育をもたらすことを証明した。N K - S 1 は、同定された J A K 1 および J A K 3 突然変異を有さないことが試験された野生型 K H Y G - 1 と対照的に (図 2 a)、I L - 2 非依存性な生育 (図 3)、構成的な J A K 3 および S T A T 5 のリン酸化 (図 2 a) を示した。

20

【 0 0 6 0 】

< N K T C L 細胞株に対する C P - 6 9 0 , 5 5 0 の効果 >

p a n - J A K 阻害剤である C P - 6 9 0 , 5 5 0 が J A K - S T A T パスウェイを抑制する能力を評価した。活性化 J A K タンパク質は、S T A T タンパク質を直接リン酸化するので、J A K 突然変異型細胞株 (N K - S 1) および野生型 N K T C L 細胞株 (K H Y G - 1) を増加する濃度の C P - 6 9 0 , 5 5 0 で処理して、イムノブロッティングにより p S T A T 5 を分析した (図 2 b)。N K - S 1 と K H Y G - 1 の両方の細胞株は、阻害剤で治療すると、用量依存的な p S T A T 5 の低減 (図 2 a) および細胞生存能力の低下 (図 2 b) を示した。C P - 6 9 0 , 5 5 0 は、その S T A T 5 リン酸化は活性化 J A K 3 とは独立であるので、コントロール K 5 6 2 細胞株において p S T A T 5 を阻害しなかった (図 2 b)。アネキシン V 染色により示されるように、N K - S 1 の生存能力の低下は、アポトーシスの増加と関連した (図 2 c)。

30

【 0 0 6 1 】

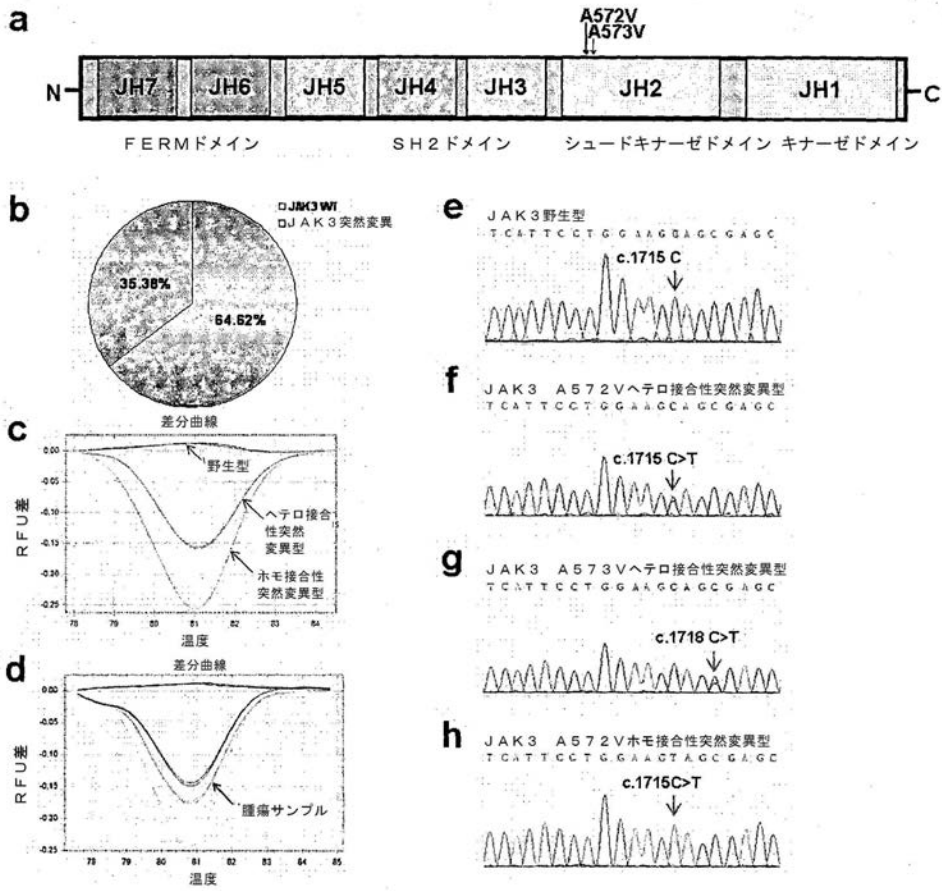
要するに、ナチュラルキラー/T細胞リンパ腫 (N K T C L) の J a n u s キナーゼ (J A K) のエキソン配列決定により、J A K 3 ^{A 5 7 2} と A 5 7 3 V および J A K 1 ^{Y 6 5 2 D} の突然変異型が N K T C L 患者で同定されて、J A K 3 突然変異型の有病率は 3 5 . 4 % であることが確認された。J A K 3 ^{A 5 7 2 V} 突然変異を有する突然変異型 N K T C L 細胞株は、I L - 2 非依存性の生育および構成的な J A K 3 と S T A T 5 のリン酸化を示し、対応する核酸ドメインにおける突然変異に関する発がんの役割を示唆した。インビトロの試験は、p a n - J a k 阻害剤が N K T C L 患者の新規治療薬となり得ることを示唆する。p a n - J A K - 阻害剤である C P - 6 9 0 , 5 5 0 は、細胞の生存能力を低下させて、J A K 3 野生型 (K H Y G - 1) および突然変異型 (N K - S 1) 細胞株の両方でアポトーシスを引き起こすことが示された。K H Y G - 1 は I L - 2 依存的な N K T C L 細胞株であり、したがって、p a n - J A K 阻害剤に対するその感受性。

40

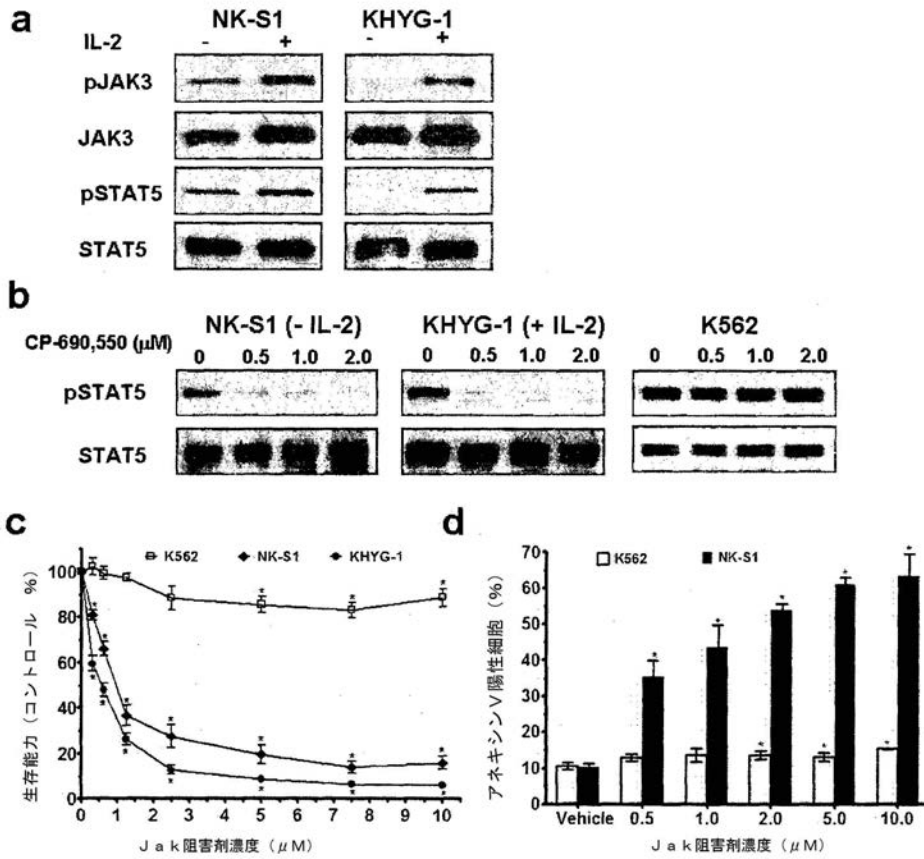
[参 考 文 献]

1. Kwong YL, Anderson BO, Advani R, Kim WS, Levine AM, Lim ST. Management of T-cell and natural-killer-cell neoplasms in Asia: consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009. *The lancet oncology* 2009; **10**(11): 1093-1101.
2. Au WY, Ma SY, Chim CS, Choy C, Loong F, Lie AK *et al.* Clinicopathologic features and treatment outcome of mature T-cell and natural killer-cell lymphomas diagnosed according to the World Health Organization classification scheme: a single center experience of 10 years. *Ann Oncol* 2005; **16**(2): 206-214. 10
3. Vose J, Armitage J, Weisenburger D. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J Clin Oncol* 2008; **26**(25): 4124-4130.
4. Suzuki R, Handa K, Itoh K, Kumagai K. Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). I. Proliferative response and establishment of cloned cells. *J Immunol* 1983; **130**(2): 981-987.
5. Lu L, Zhu J, Zheng Z, Yan M, Xu W, Sun L *et al.* Jak-STAT pathway is involved in the induction of TNF-beta gene during stimulation by IL-2. *European journal of immunology* 1998; **28**(3): 805-810. 20
6. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 2008; **117**(19): 5019-5032.
7. Loong SL, Hwang JS, Lim ST, Yap SP, Tao M, Chong TW *et al.* An Epstein-Barr virus positive natural killer lymphoma xenograft derived for drug testing. *Leukemia & lymphoma* 2008; **49**(6): 1161-1167.
8. Faderl *et al.*, WP-1034, a novel JAK-STAT inhibitor, with proapoptotic and antileukemic activity in acute myeloid leukemia (AML). *Anticancer Research* **25**: 1841-1850 (2005) 30

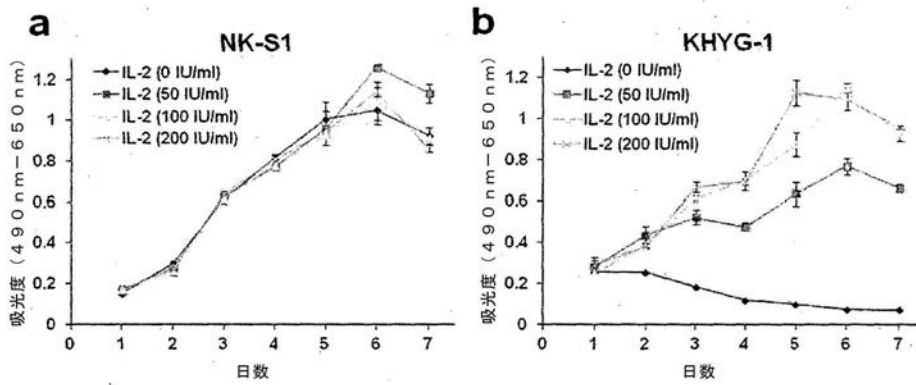
【 図 1 】



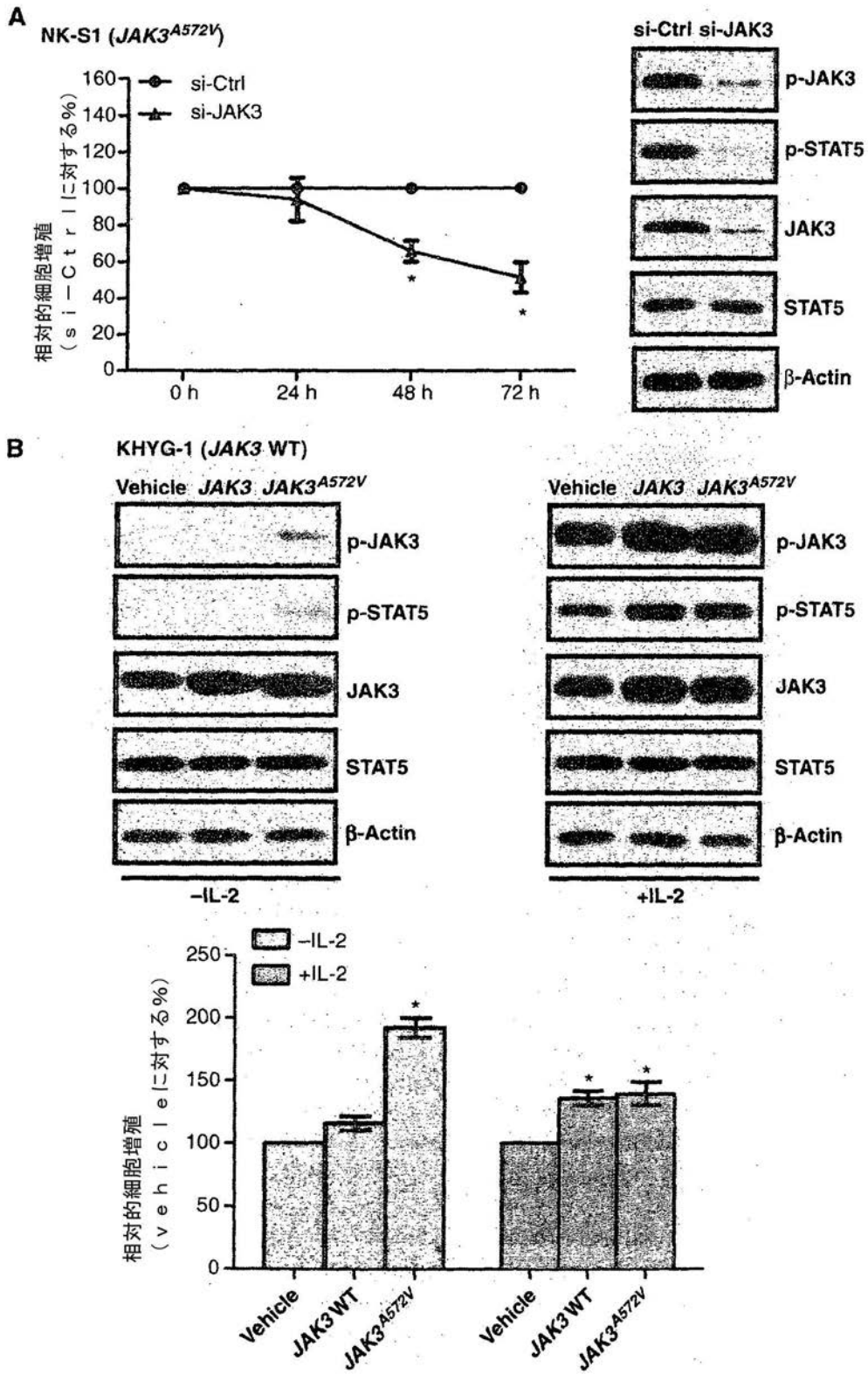
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【 配 列 表 】

2015505669000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/SG2012/000444

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/00 C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	P COPPO ET AL: "STAT3 transcription factor is constitutively activated and is oncogenic in nasal-type NK/T-cell lymphoma", LEUKEMIA, vol. 23, no. 9, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 1667-1678, XP055060524, ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/leu.2009.91	19-21
Y	abstract	2, 6-10, 12, 16-19, 21, 25
A		1, 3-5, 11, 13-15, 22-24, 26, 27, 38, 47, 56
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 April 2013		Date of mailing of the international search report 01/08/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Celler, Jakob

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/SG2012/000444

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>M. TSUTSUI ET AL: "Frequent STAT3 activation is associated with Mcl-1 expression in nasal NK-cell lymphoma", INTERNATIONAL JOURNAL OF LABORATORY HEMATOLOGY, vol. 32, no. 4, 1 November 2009 (2009-11-01), pages 419-426, XP055060525, ISSN: 1751-5521, DOI: 10.1111/j.1751-553X.2009.01204.x</p>	19-21
Y	abstract	2,6-10, 12, 16-19, 21,25
A		1,3-5, 11, 13-15, 22-24, 26,27, 38,47,56
A	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>TYNER JEFFREY W ET AL: "RNAi screening of the tyrosine kinome identifies therapeutic targets in acute myeloid leukemia", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 111, no. 4, 15 February 2008 (2008-02-15), pages 2238-2245, XP002589106, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2007-06-097253 [retrieved on 2007-11-19] abstract</p>	1-27,38, 47,56
X	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>M. G. CORNEJO ET AL: "Constitutive JAK3 activation induces lymphoproliferative syndromes in murine bone marrow transplantation models", BLOOD, vol. 113, no. 12, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 2746-2754, XP055060736, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2008-06-164368 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: right;">-/--</p>	24-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/SG2012/000444

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	W0 01/52892 A2 (GENZYME CORP [US]) 26 July 2001 (2001-07-26)	38,47,56
Y	abstract	2,6-10,
A	page 11 - page 12	12, 16-19, 21,25
X,P	----- KOO GHEE CHONG ET AL: "Janus kinase 3-activating mutations identified in natural killer/T-cell lymphoma", CANCER DISCOVERY SEP 2011 LNKD- PUBMED:22049316,, vol. 2, no. 7, 1 July 2012 (2012-07-01), pages 591-597, XP009168996, ISSN: 2159-8290, DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0028 the whole document -----	1,3-5, 11, 13-15, 20, 22-24, 26,27 1-27,38, 47,56

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SG2012/000444

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SG2012/000444**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-27, 38, 47, 56

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/SG2012/000444

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-27, 38, 47, 56

Subject matter of the above claims as characterised by the combination of technical feature of NKTC1 and the presence of mutant JAK molecules in said cells.

2. claims: 28-37

Subject matter of the above claims as characterised by the constellation of technical features of clam 28.

3. claims: 39-46

Subject matter of the above claims as characterised by the constellation of technical features of clam 39.

4. claims: 48-55

Subject matter of the above claims as characterised by the constellation of technical features of clam 48.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/SG2012/000444

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0152892	A2	26-07-2001	
		AT 369844 T	15-09-2007
		AU 2968701 A	31-07-2001
		CA 2397774 A1	26-07-2001
		DE 60129926 T2	19-06-2008
		EP 1250137 A2	23-10-2002
		IL 150763 A	16-06-2010
		JP 2004500376 A	08-01-2004
		JP 2012041354 A	01-03-2012
		US 2004209799 A1	21-10-2004
		US 2009280081 A1	12-11-2009
		WO 0152892 A2	26-07-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D	4 C 2 0 6
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)		G 0 1 N 33/50	Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	A	
C 1 2 N 9/99 (2006.01)		C 1 2 N 9/99		
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)		C 1 2 Q 1/02		
A 0 1 K 67/027 (2006.01)		A 0 1 K 67/027		
		G 0 1 N 33/53	M	

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

(72) 発明者 テ ビン ティーン

シンガポール国 1 6 8 7 5 3 シンガポール ボウヤー ブロック シー # 0 3 - 0 3 サード
 ホスピタル アベニュー 3 1 シンガポール ヘルス サービスズ ピーティーイー リ
 ミテッド内

(72) 発明者 リン ソン タイ

シンガポール国 1 6 8 7 5 3 シンガポール ボウヤー ブロック シー # 0 3 - 0 3 サード
 ホスピタル アベニュー 3 1 シンガポール ヘルス サービスズ ピーティーイー リ
 ミテッド内

F ターム(参考) 2G045 CB01 DA36 FB03

4B024 AA01 AA12 CA03 CA04 CA12 CA20 HA08 HA11

4B063 QA05 QA12 QA13 QA19 QA20 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QQ62

QR08 QR32 QR35 QR42 QR55 QR62 QR72 QS16 QS25 QS34

4C084 AA17 NA14 ZB26

4C086 AA01 AA02 CB05 MA01 MA04 NA14 ZB26

4C206 AA01 AA02 HA13 MA01 MA04 NA14 ZB26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015505669A5	公开(公告)日	2016-01-21
申请号	JP2014543455	申请日	2012-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡保健服务集团有限公司		
申请(专利权)人(译)	新加坡卫生Sabishizu私人有限公司		
[标]发明人	テビンティーン リンソantai		
发明人	テビンティーン リンソantai		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K45/00 A61P35/00 A61K31/519 A61K31/277 G01N33/53 G01N33/15 G01N33/50 C12N15/09 C12N9/99 C12Q1/02 A01K67/027		
CPC分类号	C12Q1/6886 A01K67/0275 A01K2267/0331 A61K31/165 A61K31/277 A61K31/519 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/5011 G01N33/57407 G01N33/57426 G01N2333/912 G01N2333/91215 G01N2800/50		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61K45/00 A61P35/00 A61K31/519 A61K31/277 G01N33/53.D G01N33/15.Z G01N33/50.Z C12N15/00.A C12N9/99 C12Q1/02 A01K67/027 G01N33/53.M		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024 /CA12 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA05 4B063/QA12 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ62 4B063/QR08 4B063 /QR32 4B063/QR35 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB05 4C086 /MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/HA13 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA14 4C206/ZB26		
优先权	201108800 2011-11-25 SG		
其他公开文献	JP2015505669A		

摘要(译)

自然 - KilleifT-细胞淋巴瘤 (NKTCL) 易感性预测 , 诊断和治疗。本发明涉及用于预测受试者中自然杀伤T细胞淋巴瘤 (NKTCL) 易感性和/或诊断NKTCL的方法 , 包括测试JAK突变。本发明还涉及使用包含至少一个JAK突变的细胞系筛选能够治疗NKTCL的候选试剂的方法。本发明包括包含至少一个JAK突变的NKTCL动物模型。本发明还包括用于治疗NKTCL的JAK抑制剂。