

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 9 月 14 日(14.09.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/155044 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/00 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/009501
- (22) 国際出願日: 2017 年 3 月 9 日(09.03.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2016-048319 2016 年 3 月 11 日(11.03.2016) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人国立がん研究センター(NATIONAL CANCER CENTER) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地五丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 河野 隆志(KOHNO Takashi); 〒1040045 東京都中央区築地五丁目 1 番 1 号 国立研究開発法人国立がん研究センター内 Tokyo (JP). 後藤 功一(GOTO Koichi); 〒2778577 千葉県柏市柏の葉六丁目 5 番 1 号 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 棚井 澄雄, 外(TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: SECONDARY MUTATION DETECTION METHOD AND SECONDARY MUTATION DETECTION KIT

(54) 発明の名称: 2 次変異検出方法、及び 2 次変異検出キット

(57) Abstract: The present invention provides: a method for detecting a secondary mutation in RET tyrosine kinase, whereby it becomes possible to predict or recognize the occurrence of treatment resistance in a treatment with a RET tyrosine kinase inhibitor and it also becomes possible to provide further treatment selectivity; and a secondary mutation detection kit. The method for detecting a secondary mutation according to the present invention is a method for detecting a secondary mutation in RET tyrosine kinase in a sample from a patient who has undergone a treatment with an inhibitor of the RET tyrosine kinase, said method being characterized by comprising a step of detecting an S904F mutation in the RET tyrosine kinase in the sample.

(57) 要約: 本発明は、RET チロシンキナーゼ阻害剤治療における治療抵抗性の予測又は把握をすることができ、更なる治療選択性を付与することができる RET チロシンキナーゼの 2 次変異の検出方法、及び 2 次変異検出キットを提供する。本発明の 2 次変異の検出方法は、RET チロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療を受けた患者由来の試料における前記 RET チロシンキナーゼの 2 次変異の検出方法であって、前記試料中の RET チロシンキナーゼの S904F 変異を検出する工程を有することを特徴とする。



WO 2017/155044 A1

明 細 書

発明の名称： 2次変異検出方法、及び2次変異検出キット

技術分野

[0001] 本発明は、R E Tチロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療を受けた患者由来の試料における前記R E Tチロシンキナーゼの2次変異の検出方法、及び2次変異検出キットに関する。

背景技術

[0002] チロシンキナーゼ阻害剤（以下、T K Iともいう）を用いた遺伝子異常を標的とした治療は、肺腺がん（以下、L A D Cともいう）に非常に効果的である。しかしながら、大部分のがんは、最終的には標的治療に対する抵抗性を獲得し、長期間の臨床的有用性に対して主な制限を提示している。

標的キナーゼの2次変異は、薬剤に対する抵抗性の主な原因となっている。例えば、A L KやR O S 1キナーゼにおける薬剤に対する抵抗性を付与する変異は、T K Iの結合を立体的に妨害している。

その一方で、E G F RにおけるT 7 9 0 M変異は、A T Pに対する親和性を増加させることにより、抵抗性をもたらしている。以前、本発明者等は、1～2%のL A D Cにおける、R E Tキナーゼ遺伝子のがん化的融合を同定した（例えば、特許文献1参照）。甲状腺髄様がんの治療のために認可されたバンデタニブといったT K Iは、臨床的に有用であるため、上述した融合R E Tキナーゼに関する研究は、精力的に行われている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2 0 1 3 / 0 1 8 8 8 2号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] R E Tキナーゼ遺伝子融合陽性肺がんでは、R E T阻害剤による治療効果が見込まれる。しかしながら、がん細胞が治療抵抗性を獲得すると、その効

果の持続期間が短くなるものと懸念される。そのため、どのような分子機構により、抵抗性が発現し、それをいかに把握し、克服するかが治療における重要課題であると考えられる。

[0005] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、RETチロシンキナーゼ阻害剤治療における治療抵抗性の予測又は把握をすることができ、更なる治療選択性を付与することができる、RETチロシンキナーゼの2次変異の検出方法及び2次変異検出キットを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、RETチロシンキナーゼの2次変異としてS904Fを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] 即ち、本発明は、以下の態様を含む。

[1] RETチロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療を受けた患者由来の試料における前記RETチロシンキナーゼの2次変異の検出方法であって、前記試料中のRETチロシンキナーゼのS904F変異を検出する工程を有することを特徴とする2次変異の検出方法。

[0008] [2] 前記RETチロシンキナーゼは、RET融合キナーゼである前記[1]に記載の2次変異の検出方法。

[0009] [3] RETチロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療を受けた患者由来の試料における前記RETチロシンキナーゼの2次変異を検出するためのキットであって、RETチロシンキナーゼのS904Fを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子を増幅するためのプライマーセット、前記遺伝子の増幅産物又はmRNAに特異的にハイブリダイズするプローブ、及びS904F特異的結合物質からなる群から選ばれる少なくとも一種を含むことを特徴とする2次変異検出キット。

[0010] [4] 前記RETチロシンキナーゼは、RET融合キナーゼである前記[3]に記載の2次変異検出キット。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、RETチロシンキナーゼ阻害剤治療における治療抵抗性の予測又は把握をすることができ、更なる治療選択性を付与することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]患者の胸部におけるCTスキャンの結果である。放射線化学療法及び抗癌剤投与のタイミングと、その効果を対応付けた図である。

[図2]バンデタニブ治療前のリンパ節、及び進行したリンパ節をヘマトキシリン／イオシン染色した生検標本の組織学的解析の結果である。

[図3]バンデタニブ治療前のリンパ節、及び進行したリンパ節から得られたRET-PCR産物におけるサンガー法を用いたシーケンス解析の結果である。

[図4]バンデタニブ治療前の末梢血、及び進行した末梢血から得られたゲノムDNA及びRET-PCR産物におけるサンガー法を用いたシーケンス解析の結果である。

[図5]バンデタニブと複合体を形成した非変異RET及びS904F変異RETの動的構造のシミュレート結果である。

[図6]細胞に導入した非変異CCDC6-RETタンパク質全長、又はS904F-CCDC6-RETタンパク質全長におけるイムノブロット解析の結果である。

[図7]精製したS904F変異体のRETキナーゼドメイン、及び精製した非変異RETキナーゼドメインを用いた、酵素の動態解析の結果である。

[図8]非変異RETタンパク質全長、又はS904F-RETタンパク質全長を安定的に発現するBa/F3細胞のバンデタニブ処置後の生存率の解析結果である。

[図9]非変異RETとS904F変異体におけるバンデタニブとF735の間の相互作用を演繹した図である。

[図10]精製したS904F変異体のRETキナーゼドメイン、及び精製した非変異RETキナーゼドメインを用いて、ATPの濃度を3.125～40

0 nMまで上昇させて *in vitro* キナーゼアッセイを行った結果である。

[図11] バンデタニブ、カボサンチニブ、ポナチニブ、レンバチニブ、アレクチニブにおける *in vitro* キナーゼアッセイ及び Ba/F3 細胞を用いた薬剤感受性試験の結果である。

[図12] 非変異 RET タンパク質と S904F 変異 RET タンパク質の酵素学的動態とバンデタニブの阻害定数を算出した結果である。

[図13] バンデタニブと複合体を形成した RET キナーゼのコンフォメーションにおける自由エネルギー (ΔG) の算出結果である。

[図14] ロングタイムスケール ($1 \mu s$) の分子動態シミュレーションによるバンデタニブと複合体を形成した非変異体と S904F 変異体の間の構造的差異を示す図である。

[図15] バンデタニブと複合体を形成した RET の 715～745 残基と 900～935 残基における主鎖 C α 原子のゆらぎの標準偏差 (Root-mean-square fluctuation; RMSF) を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0013] <<2 次変異検出キット>>

本発明の 2 次変異検出キットは、RET チロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療を受けた患者由来の試料における前記 RET チロシンキナーゼの 2 次変異を検出するためのキットであって、RET チロシンキナーゼの S904F を含むアミノ酸配列をコードする遺伝子を増幅するためのプライマーセット、前記遺伝子の増幅産物又は mRNA に特異的にハイブリダイズするプローブ、及び S904F 特異的結合物質からなる群から選ばれる少なくとも一種を含む。

[0014] RET (Rearranged During Transfection) チロシンキナーゼは、RET 受容体型チロシンキナーゼとも称され、ヒトにおいて 10q11.2 に座乗している遺伝子にコードされているタンパク

質である。

本発明に係る R E T チロシンキナーゼタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、ヒト由来のものであれば、特に限定されないが、G e n b a n k アクセッション番号 N T _ 0 3 3 9 8 5 . 7 で特定されるゲノムの配列のうち 1 2 1 7 5 8 2 ~ 1 2 7 0 8 6 2 番目の D N A 配列からなる遺伝子が挙げられる。

本発明に係る R E T チロシンキナーゼタンパク質は、ヒト由来のものであれば特に限定されないが、上述した遺伝子にコードされるアミノ酸配列からなるものが挙げられる。

[0015] 本発明者らは、先の出願において、30例の肺腺がんの全トランスクリプトームシーケンシングにより、キネシンファミリーメンバー5B (K I F 5 B) 遺伝子と R E T 受容体型チロシンキナーゼがん遺伝子 (R E T 遺伝子) とのインフレーション (I n - f l a m e) 融合転写産物を同定した。この融合遺伝子は第10染色体 p 1 1、q 1 1 領域間の逆位によって生じるものであった。この K I F 5 B - R E T 遺伝子融合は、日本人肺腺がんの 6 / 3 1 9 (2%) に検出されたが、当該遺伝子融合が検出された6例はいずれも E G F R 変異、K R A S 変異、A L K 融合といった公知のがん遺伝子活性化変異を示さなかった。さらに、この融合転写産物はアメリカ人由来の肺腺がんにおいても存在していた (1 / 8 0 (1%))。これら事実から、当該遺伝子融合は、広い人種において、がん化における責任変異 (ドライバー変異) であることが明らかになった (特許文献1 参照)。

また、甲状腺がんにおいては、C C D C 6 - R E T 遺伝子融合が同定されている。

[0016] このような遺伝子融合は、R E T チロシンキナーゼの恒常的な活性化をもたらすものと考えられ、このような活性化が生じている患者においては、R E T チロシンキナーゼに対する阻害剤が治療において有効性を示すものと考えられる。

[0017] したがって、本発明の2次変異検出キットにおいて、対象とする R E T チ

ロシンキナーゼは、RET融合キナーゼであることが好ましい。

[0018] 本発明において患者とは、がん罹患しているヒトのみならず、がん罹患していると疑いのあるヒトであってもよい。本発明の方法を適用する対象となる「がん」としては、RET遺伝子の発現が認められるがんが好ましく、KIF5B遺伝子又はCCDC6遺伝子とRET遺伝子との融合遺伝子の発現が認められるがんがより好ましい。

がんとしては、皮膚がん、肺がん、大腸がん、胃がん、乳がん、前立腺がん、甲状腺がん、膵がん、卵巣がん、脾臓がん、精巣がん等が挙げられ、肺がん又は甲状腺がんが好ましく、非小細胞肺がんがより好ましく、肺腺がんが特に好ましい。

[0019] 上述した患者由来の試料としては、細胞、組織、臓器、体液（血液、リンパ液等）、消化液、喀痰、肺胞・気管支洗浄液、尿、便等の生体試料；これらの生体試料から得られる核酸抽出物（ゲノムDNA抽出物、mRNA抽出物、mRNA抽出物から調製されたcDNA調製物やcRNA調製物等）やタンパク質抽出物が挙げられる。また、係る試料は、ホルマリン固定処理、アルコール固定処理、凍結処理又はパラフィン包埋処理が施してあるものでもよい。

[0020] 治療に用いられるRETチロシンキナーゼ阻害剤としては、RETチロシンキナーゼに生じる2次変異により、薬剤抵抗性を示されるものであるという観点から、RETチロシンキナーゼの機能を直接的に阻害する物質が好ましく、ATP拮抗阻害剤であることがより好ましい。

係る阻害剤としては、4-（4-ブロモ-2-フルオロアニリノ）-6-メトキシー-7-（1-メチルピペリジン-4-イルメトキシ）キナゾリン（一般名：バンデタニブ（Vandetanib）；VEGFR、EGFR及びRETを標的とする化合物）、4-〔4-〔3-〔4-クロロ-3-（トリフルオロメチル）フェニル〕ウレイド〕フェノキシ〕-N-メチルピリジン-2-カルボアミド（一般名：ソラフェニブ（Sorafinib）；BRAF及びRET等を標的とする化合物）、N-〔2-（ジエチルアミノ）

エチル] - 5 - [(Z) - (5 - フルオロ - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロ - 3 H - インドール - 3 - イリデン) メチル] - 2, 4 - ジメチル - 1 H - ピロール - 3 - カルボキシアミド モノ [(2 S) - 2 - ヒドロキシサクシネート] (一般名: スニチニブ (Sunitinib); PDGFR、VEGFR、RET等を標的とする化合物)、N - (3, 3 - ジメチルインドリン - 6 - イル) - 2 - (ピリジン - 4 - イルメチルアミノ) ニコチンアミド (一般名: モテサニブ (Motesanib); PDGFR、VEGFR、RET等を標的とする化合物)、XL184 / カボザンチニブ (XL184 / Cabozantinib; VEGFR、MET、RET等を標的とする化合物) が挙げられる。

[0021] 実施例において後述するように、本発明者らは、TKIに抵抗性を示した患者由来の末梢血において、RETチロシンキナーゼ遺伝子の2902番目のシトシンがチミンに変異していることが明らかとなった。この2次変異は、再発した腫瘍のRETアレルで生じ、コドン904のセリンからフェニルアラニンへの置換 (S904F) をもたらしめていることが確認された。更に、RET - S904F変異がTKI抵抗性の原因であることが示唆された。

したがって、本発明の2次変異検出キットは、RETチロシンキナーゼのS904Fを認識するキットである。具体的には、RETチロシンキナーゼのS904Fを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子を増幅するためのプライマーセット、前記遺伝子を増幅産物又はmRNAに特異的にハイブリダイズするプローブ、及びS904F特異的結合物質からなる群から選ばれる少なくとも一種を含むものである。

[0022] (プライマーセット)

本発明のキットは、RETチロシンキナーゼのS904Fを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子を増幅するためのプライマーセットを備えていてもよい。

係るプライマーセットを用いて得られた増幅産物をシーケンスすることにより2次変異の有無を評価することができる。また、係るプライマーセッ

ト以外に他のがん遺伝子又はがん抑制遺伝子を増幅するためのプライマーセットを含む、複数のプライマーセットを用いて、マルチプレックスPCRにより複数の遺伝子領域を同時に増幅し、次世代シーケンサーによりS904F変異の有無を含む多項目診断を行ってもよい。

また、SSCP（単鎖高次構造多型）を用いて、係るプライマーセットを用いて得られた増幅産物の電気泳動度の変化を調べることにより変異の有無を評価することもできる。また、係るプライマーセットにおいて、コドン904の2次変異を特異的に認識するプライマーを設けることにより、増幅産物の有無により2次変異の有無を評価することができる。

[0023] 係るプライマーセットを用いた遺伝子増幅方法としては、PCR (Polymerase Chain Reaction) の他に、LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)、NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification)、ICAN (Isothermal and Chimerical primer-initiated Amplification of Nucleic acids)、TRC (Transcription Reverse-Transcription Concerted)、SDA (Strand Displacement Amplification)、TMA (Transcription Mediated Amplification)、SMAP (SMart Amplification Process)、RPA (Recombinase polymerase amplification)、HDA (Helicase-dependent amplification) 等が挙げられる。

[0024] (プローブ)

本発明のキットは、RETチロシンキナーゼのS904Fを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子の増幅産物又はmRNAに特異的にハイブリダイズするプローブを備えていてもよい。

プローブは、安定性やハイブリダイゼーション時の特異性等を向上させる等の目的で、種々の化学修飾を有していてもよい。例えば、ヌクレアーゼ等の加水分解酵素による分解を抑制するために、リン酸残基を、例えば、ホスホロチオエート（P S）、メチルホスホネート、ホスホロジチオネート等の化学修飾リン酸残基に置換してもよい。また、少なくとも一部がペプチド核酸（P N A）等の核酸類似体により構成されていてもよい。

プローブは固相上に固定されていてもよい。固相としては、例えば、ビーズ、板状基板、膜等が挙げられる。

プローブは、例えば、板状基板の表面に固定されてマイクロアレイを形成していてもよい。この場合、例えば、がん組織試料からRNAを抽出して蛍光物質で標識し、マイクロアレイとハイブリダイゼーションさせてマイクロアレイ上のプローブに結合したRNAを検出することにより、がん組織中にRETチロシンキナーゼ遺伝子の2次変異を検出することができる。

[0025] また、RETチロシンキナーゼのS904Fを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子を増幅するためのプライマーセットと、RETチロシンキナーゼのS904Fを含むアミノ酸配列をコードする遺伝子の増幅産物に特異的にハイブリダイズするプローブを用いて、リアルタイムPCRにより2次変異の有無を定量的に評価してもよい。

[0026] （特異的結合物質）

本発明のキットは、RETチロシンキナーゼS904F変異タンパク質に対する特異的結合物質を備えていてもよい。

特異的結合物質としては、例えば、抗体、抗体断片、アプタマー等が挙げられる。抗体は、例えば、マウス等の動物に上記のS904F変異タンパク質を抗原として免疫することにより作製することができる。又は、ファージライブラリー等の抗体ライブラリーのスクリーニング等により作製することができる。また、抗体断片としては、Fv、Fab、scFv等が挙げられる。上記の抗体又は抗体断片は、ポリクローナルであってもよく、モノクローナルであってもよい。

[0027] アプタマーとは、標識物質に対する特異的結合能を有する物質である。アプタマーとしては、核酸アプタマー、ペプチドアプタマー等が挙げられる。上記のタンパク質に特異的結合能を有する核酸アプタマーは、例えば、systematic evolution of ligand by exponential enrichment (SELEX) 法等により選別することができる。また、上記のS904F変異タンパク質に対する特異的結合能を有するペプチドアプタマーは、例えば酵母を用いたTwo-hybrid法等により選別することができる。

[0028] 特異的結合物質は、上記のS904F変異タンパク質に特異的に結合することができるれば特に制限されず、市販のものであってもよい。

[0029] 例えば、固定したがん組織の薄切標本を上記の特異的結合物質を用いて免疫染色することにより、上記のS904F変異タンパク質の存在を検出することができる。上記のタンパク質の存在の検出は、ウエスタンブロッティング法により行ってもよいし、ELISA法により行ってもよいし、フローサイトメトリー解析等により行ってもよい。

[0030] RETチロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療を受けた患者由来の試料において、2次変異としてのS904F変異タンパク質の存在は、TKIに対する治療抵抗性を示唆する。

[0031] <<2次変異検出方法>>

本発明の2次変異検出方法は、RETチロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療を受けた患者由来の試料における前記RETチロシンキナーゼの2次変異の検出方法であって、前記試料中のRETチロシンキナーゼのS904F変異を検出する工程を有する。

[0032] 上記の検出工程は、RETチロシンキナーゼのS904F変異を検出する工程であれば特に限定されない。例えば、上述した2次変異検出キットを用いて遺伝子レベル又はタンパク質レベルでS904F変異を検出することができる。

2次変異の遺伝子レベルでの検出は、RT-PCR、DNAアレイ解析、

ノーザンブロッティング、in situハイブリダイゼーション等により行うことができる。また、2次変異のタンパク質レベルでの検出は、免疫染色、ELISA、ウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー解析等により行うことができる。

実施例

[0033] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0034] [実施例1]

57才の日本人女性（以下、患者という）は、気管支鏡検査及び縦隔鏡検査で縦隔リンパ節転移によりLADCと診断された。この患者は、シスプラチンとビンoreルビンの同時放射線化学療法を受け、部分応答を示した。しかしながら、2年後に多発性骨転移を引き起こしていた。この患者は、ゲフィニチブ、ペメトレキセド、ドセタキセル、ジェムシタビン、及びS-1からなる2回目から6回目までの化学療法を受けた。6回目の化学療法の際、右頸部リンパ節症を発症した（図1左、矢印参照）。即ち、いくつかの化学療法を受けた後に、LADCを再発している。

この患者は、RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) を用いたCCDC6-RETの検出に基づき、発明者らによる医師主導臨床試験LURET (Lung Cancer with RET Rearrangement Study; 臨床試験登録番号: UMIN000010095) に登録された。

毎日300mgバンデタニブの投与を開始して、3か月後に腫瘍サイズは縮小した（図1真中、矢印参照）ものの、投与開始6か月後に別の頸部リンパ節症を発症し、LADCを再発した（図1右、矢印参照）。

バンデタニブ治療前のリンパ節、及び進行したリンパ節をヘマトキシリン／イオシン染色した生検標本の組織学的解析から、再発した腫瘍は、バンデタニブ治療前の腫瘍と同様の組織学的特徴を有していた（図2参照）。

バンデタニブ治療前のリンパ節、及び進行したリンパ節から得られた R T-PCR 産物におけるサンガー法を用いたシーケンス解析により、両者は、CCDC6 のエクソン 1 が RET のエクソン 15 に連結している融合 CCDC6-RET の転写産物を有していた（図 3 参照）。

更に、バンデタニブ治療前の末梢血、及び進行した末梢血から得られたゲノム DNA 及び R T-PCR 産物におけるサンガー法を用いたシーケンス解析により、進行した末梢血にのみ、2902 番目のシトシンがチミンに変異していることが明らかとなった。この変異は、再発した腫瘍の RET アレルで生じ、コドン 904 のセリンからフェニルアラニンへの置換（S904F）をもたらしていることが確認された（図 4 参照）。

[0035] [実施例 2]

バンデタニブと複合体を形成した RET キナーゼの共結晶を用いた結晶構造解析の結果から、バンデタニブと複合体を形成した非変異 RET 及び S904F 変異 RET の動的構造をシミュレートした。50 ns × 15 回のシミュレーションで観察された平均 2 ナノ秒の構造を重ね合わせ、F735、S/F904、及びバンデタニブに注目した（図 5 参照）。

構造解析の結果から、RET キナーゼドメインにおけるグリシンリッチループ（GRL）、特にフェニルアラニン 735 の側鎖が、ATP 結合能を制御していることが明らかとなった。この ATP 結合能の制御は、ATP 結合能を有するオープンフォームと ATP 結合不能のクローズドフォームの 2 つの選択的な立体構造異性体を形成することにより行われることが明らかとなった。そして、バンデタニブと複合体を形成した RET キナーゼドメインの分子動態シミュレーション結果から、S904F 変異体は、新規の立体構造異性体を形成することが示された（図 5 及び 9 参照）。

[0036] 次いで、非変異 CCDC6-RET タンパク質全長、又は S904F CCDC6-RET タンパク質全長におけるイムノブロット解析を行った。非変異 CCDC6-RET cDNA をコードする発現ベクター、及び S904F CCDC6-RET cDNA をコードする発現ベクターをそれぞれ内

在性のRETを発現していないH1299肺がん細胞に導入した。このトランスフェクタントをバンデタニブに暴露した。0、0.1、0.5、1.0、5.0、又は10 μ Mのバンデタニブ処理6時間後のチロシン905及びチロシン1015のリン酸化レベルを決定した（図6参照）。CCDC6-RETタンパク質全量に対するリン酸化CCDC6-RETタンパク質の割合を底に示す（図6参照）。

[0037] S904F変異体を強制発現させた培養細胞において、融合CCDC6-RETのチロシン905の自己リン酸化は、高濃度のバンデタニブを添加しても維持されていた。S904FのIC₅₀は、非変異体のIC₅₀より遥かに高く、1 μ M以上だった（図6参照）。

[0038] 精製したS904F変異体のRETキナーゼドメイン、及び精製した非変異RETキナーゼドメインを用いて、5 μ MのATPの存在下で30分間、3連で酵素の動態解析を行った（図7参照）。In vitroキナーゼアッセイの結果、S904F変異体のバンデタニブに対するIC₅₀は、608 nMであり、非変異体のIC₅₀56 nMより10倍以上高かった（図7参照）。

[0039] 次に、非変異RETタンパク質全長、又はS904F RETタンパク質全長を安定的に発現するBa/F3細胞のバンデタニブ処置後の生存率を調べた（図8参照）。図8に示されるように、S904F変異体を発現するBa/F3細胞は、WTを発現するBa/F3細胞よりバンデタニブに対して非感受性を示した。

[0040] 図6～8における結果から、RET-S904F変異がバンデタニブ抵抗性の原因であることが示唆された。また、in vitroキナーゼアッセイやBa/F3細胞を用いた薬剤感受性試験において、IC₅₀、GI₅₀値を測定すると、RET-S904F変異体は、バンデタニブのみならず、カボサンチニブ、ポナチニブ、レンバチニブ、アレクチニブにも抵抗性を示した（図11参照）。

[0041] 図5に示されるように、Intermediateと命名された新規立体

構造異性体は、GRLのF735の側鎖の薬剤結合部位に向けた突出によって特徴づけられている。次いで、非変異RETとS904F変異体におけるバンデタニブとF735の間の相互作用を演繹した（図9参照）。50ns×15のシミュレーションから生じさせたF735とバンデタニブの平均構造をthick stickとコリーポーリングーコルタンの空間充填モデルで表した（図9参照）。15の軌道において観察された全ての構造を用いたところ、F735における炭素原子と7バンデタニブにおけるメチル基の炭素原子間の原子間距離は、オープン／クロズド立体構造異性体における非変異体、オープン／クロズド立体構造異性体におけるS904F変異体、及びIntermediate立体構造異性体におけるS904F変異体、それぞれにおいて、 $14.8 \pm 3.8 \text{ \AA}$ 、 $13.9 \pm 4.0 \text{ \AA}$ 、 $5.1 \pm 0.9 \text{ \AA}$ であった。

[0042] 次いで、精製したS904F変異体のRETキナーゼドメイン、及び精製した非変異RETキナーゼドメインを用いて、ATPの濃度を3.125～400nMまで上昇させてin vitroキナーゼアッセイを行った（図10参照）。得られたデータをミカエリス－メンテンの方程式にあてはめ、 $K_{m[ATP]}$ を算出した。非変異RETキナーゼドメインの $K_{m[ATP]}$ は、 $38.11 \mu\text{M}$ であり、S904F変異体のRETキナーゼドメインの $K_{m[ATP]}$ は、 $27.25 \mu\text{M}$ であった。

更に、非変異RETタンパク質とS904F変異RETタンパク質の酵素的動態とバンデタニブの阻害定数を算出した（図12参照）。精製したS904F変異キナーゼドメインは、非変異体よりも、ATPに対してより低い解離定数（ $K_{m[ATP]}$ ）とより高い触媒定数（ K_{cat} ）を有していた。S904F変異体におけるATP親和性の増加は、バンデタニブを含む多数のATP拮抗阻害剤に対する抵抗性と一致している（図11参照。）。

[0043] [実施例3]

図13に、バンデタニブと複合体を形成したRETキナーゼのコンフォメーションにおける自由エネルギー（ ΔG ）を示す。算出された自由結合エネ

ルギー (ΔG) から、Intermediate 立体構造異性体 (図 13 中、Intermediate) における RET キナーゼドメインに対するバンデタニブの親和性は、オープン／クローズド立体構造異性体における親和性より顕著に低いことが示唆された。このことは、バンデタニブに対する S904F の阻害定数 (K_i) が非変異体の K_i より高いことと一致している (図 12 参照)。

[0044] [実施例 4]

図 14 に、ロングタイムスケール ($1 \mu s$) の分子動態シミュレーションによるバンデタニブと複合体を形成した非変異体と S904F 変異体の間の構造的差異を示す。E734、F735、R770、D771、S/F904、pY905、K907、R912、及びバンデタニブの平均構造を $1 \mu s \times 3$ 回のシミュレーションにより創出し、thick stick で表した。904 残基におけるセリンからフェニルアラニンへの置換は、R912 を含むアクチベーションループの柔軟性を減少させた。この S904F 変異体の動力学的特徴は、E734-R912 間の水素結合の形成をもたらした。このように、Intermediate 立体構造異性体は、バンデタニブと相互作用する S904F 変異によって引き起こされたアロステリックな構造変化によって生み出されたことが示された。Intermediate 立体構造異性体は、この異常な水素結合ネットワークにより安定化されている。

特に、このシミュレーションによれば、E734、D771、及び R912 からなる水素結合のネットワーク構造は、オープン／クローズド立体構造異性体の形成に重要であり、WT (非変異体) と S904F 変異体の間で異なっていることが示された。

[0045] [実施例 5]

図 15 に、バンデタニブと複合体を形成した RET の 715~745 残基と 900~935 残基における主鎖 $C\alpha$ 原子のゆらぎの標準偏差 (Root-mean-square fluctuation; RMSF) を示す。RMSF 値は、 $1 \mu s \times 3$ の分子動力学的軌道を用いて計算した。S904

F変異は、アクチベーションループ（位置は矢で示す）における910～915残基における柔軟性を減少させたことに加えて、グリシンリッチループ（GRL）における733～735残基における柔軟性を減少させた。図14に示されるように、S904F変異体の異常な分子動態の特徴から、E734に隣接するF735の側鎖が突出することにより、水素結合ネットワークが変形し、薬剤に対する親和性が減少している。また、バンダニブとの共結晶構造を鋳型にして行ったシミュレーション実験では、S904F変異体において、グリシンリッチループや活性型ループ上に相互作用を示す変化が認められ、変異に伴ってキナーゼの安定性に変化が生じていることが示された（図示せず）。一方、ATPとの組み合わせでは変異による変化は認められなかった（図示せず）。

[0046] 本発明において、RET TKIを処置された患者に生じたがんにおけるRETの2次変異が初めて見いだされた。S904F変異は、薬剤耐性に関連する新規の変異である。この変異は、新たな立体構造異性体を生み出し、係る立体構造異性体は、多くのアロステリック効果を仲介し、バンダニブの結合を不安定化させ、ATPに対する親和性を増加させている。特に、新規の立体構造異性体は、変異RETタンパク質がバンダニブと相互作用しているときのみ生じたものと考えられる。

よって、構造変化が薬剤不存在下でも生じている他の薬剤耐性キナーゼと異なり、本発明で見いだされたRET変異は、薬剤と相互作用したときのみ、構造変化をもたらし、薬剤耐性に導くものと考えられる。

産業上の利用可能性

[0047] 肺がんにおいて、EGFRチロシンキナーゼ遺伝子の治療抵抗性変異を検出し、陽性例に抵抗性を克服する薬剤を投与するという、検査を含めた臨床試験が進行している。このような個別化治療法は、今後多くの分子標的治療において広く行われるものと考えられる。

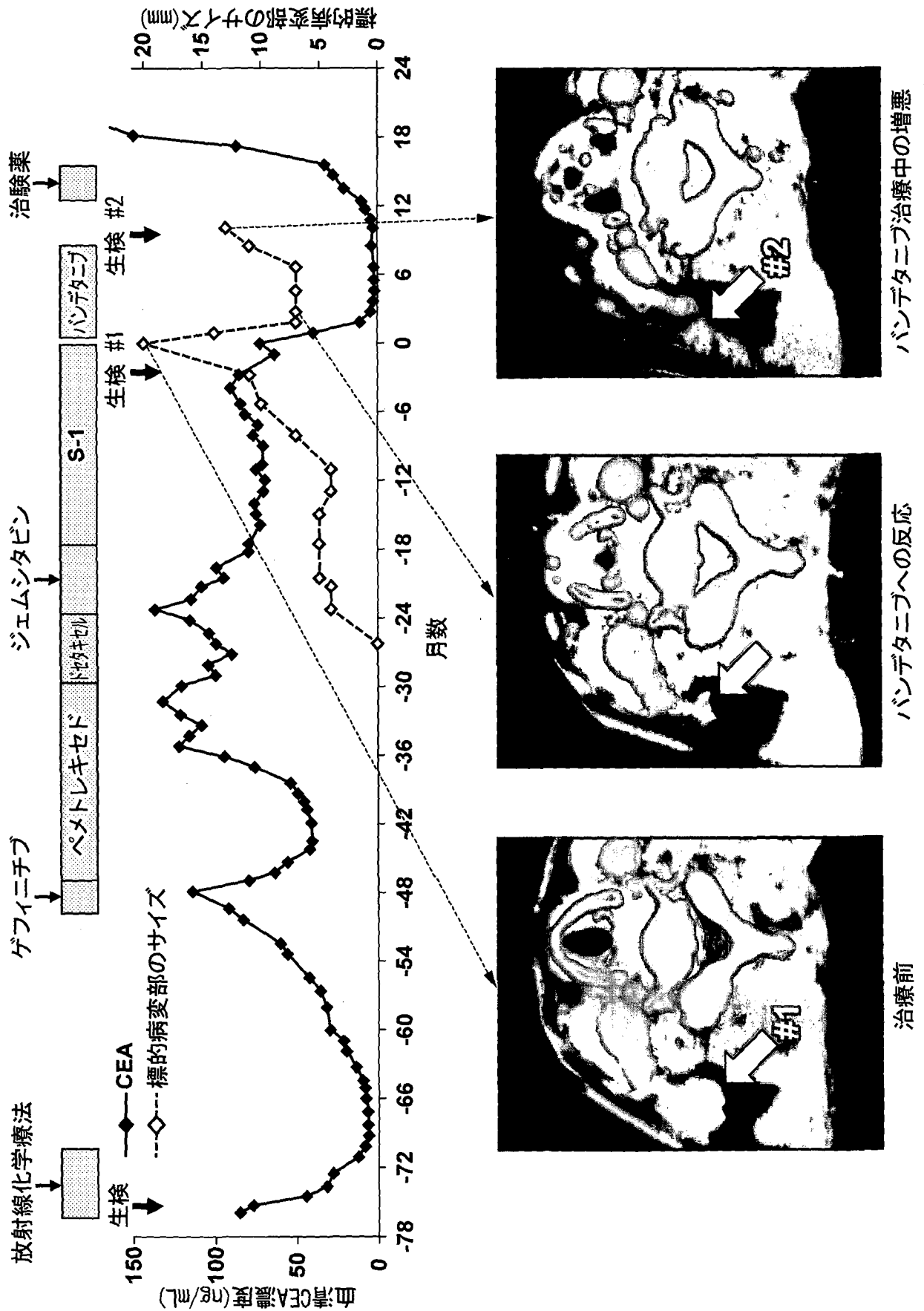
本発明において見出した2次変異は、複数のRETチロシンキナーゼ阻害剤への治療抵抗性に関わることが推察される。また、甲状腺がんの治療にお

いても、RETチロシンキナーゼ阻害剤が使われることを考慮すると、RETチロシンキナーゼ阻害剤を用いたがん個別化治療において、同様の産業上の展開が見込まれる。RETチロシンキナーゼ阻害剤は、国内外の製薬企業で精力的に開発が進められており、既にFDA承認薬が複数存在する。今後、治療抵抗性を克服できる薬剤が見出される可能性が高いことから、本発明は、産業上の利用価値が極めて高いものと考えられる。

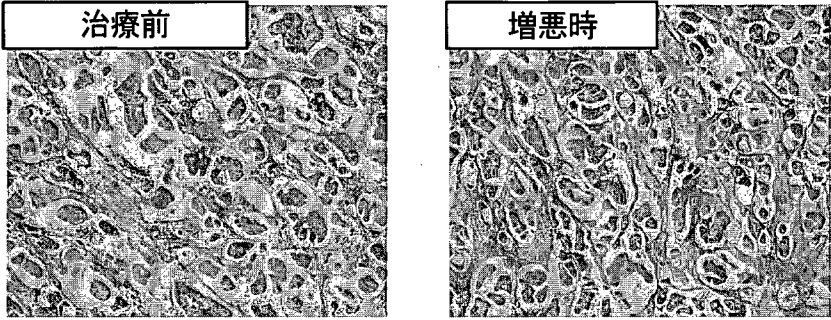
請求の範囲

- [請求項1] R E T チロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療を受けた患者由来の試料における前記 R E T チロシンキナーゼの 2 次変異の検出方法であって、
- 前記試料中の R E T チロシンキナーゼの S 9 0 4 F 変異を検出する工程を有することを特徴とする 2 次変異の検出方法。
- [請求項2] 前記 R E T チロシンキナーゼは、R E T 融合キナーゼである請求項 1 に記載の 2 次変異の検出方法。
- [請求項3] R E T チロシンキナーゼ阻害剤を用いた治療を受けた患者由来の試料における前記 R E T チロシンキナーゼの 2 次変異を検出するためのキットであって、
- R E T チロシンキナーゼの S 9 0 4 F を含むアミノ酸配列をコードする遺伝子を増幅するためのプライマーセット、前記遺伝子の増幅産物又は m R N A に特異的にハイブリダイズするプローブ、及び S 9 0 4 F 特異的結合物質からなる群から選ばれる少なくとも一種を含むことを特徴とする 2 次変異検出キット。
- [請求項4] 前記 R E T チロシンキナーゼは、R E T 融合キナーゼである請求項 3 に記載の 2 次変異検出キット。

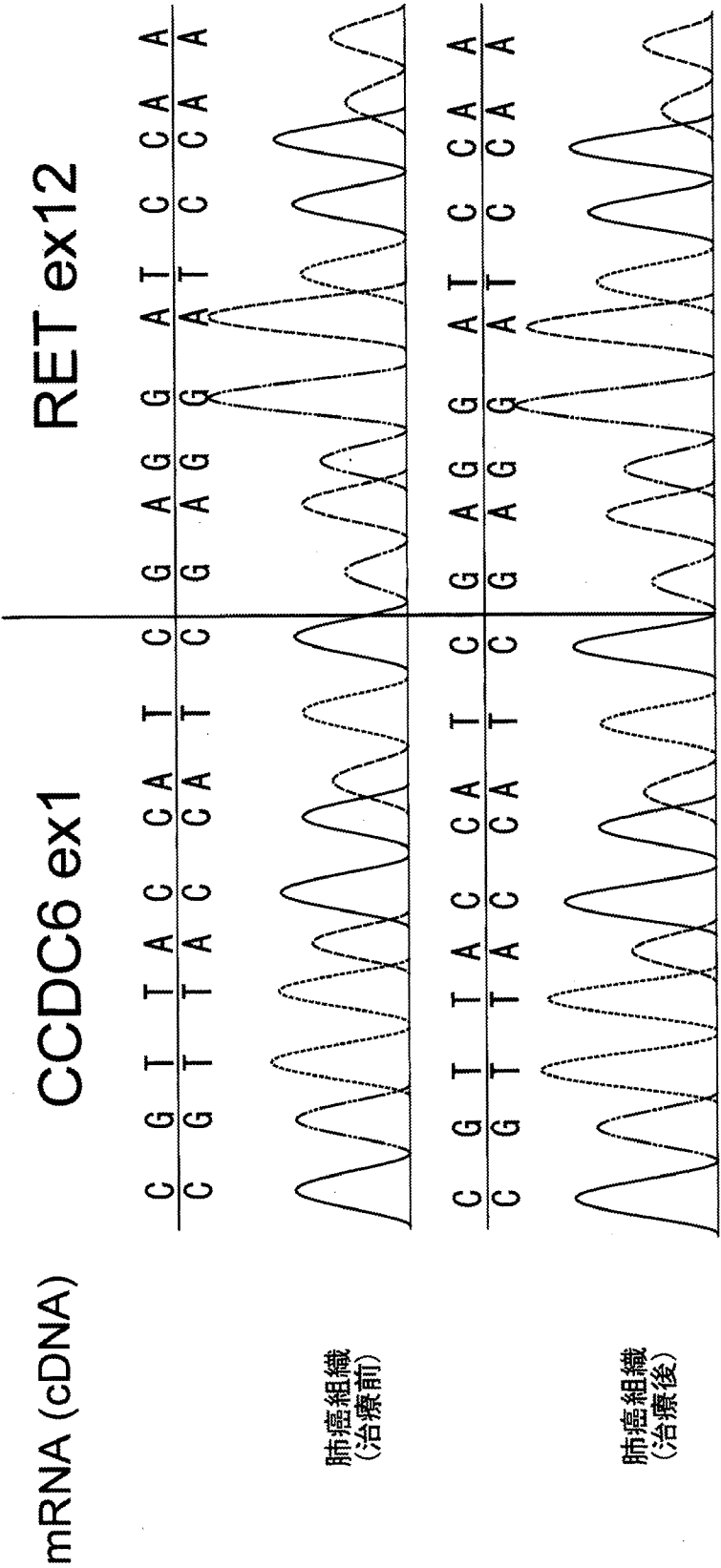
[図1]



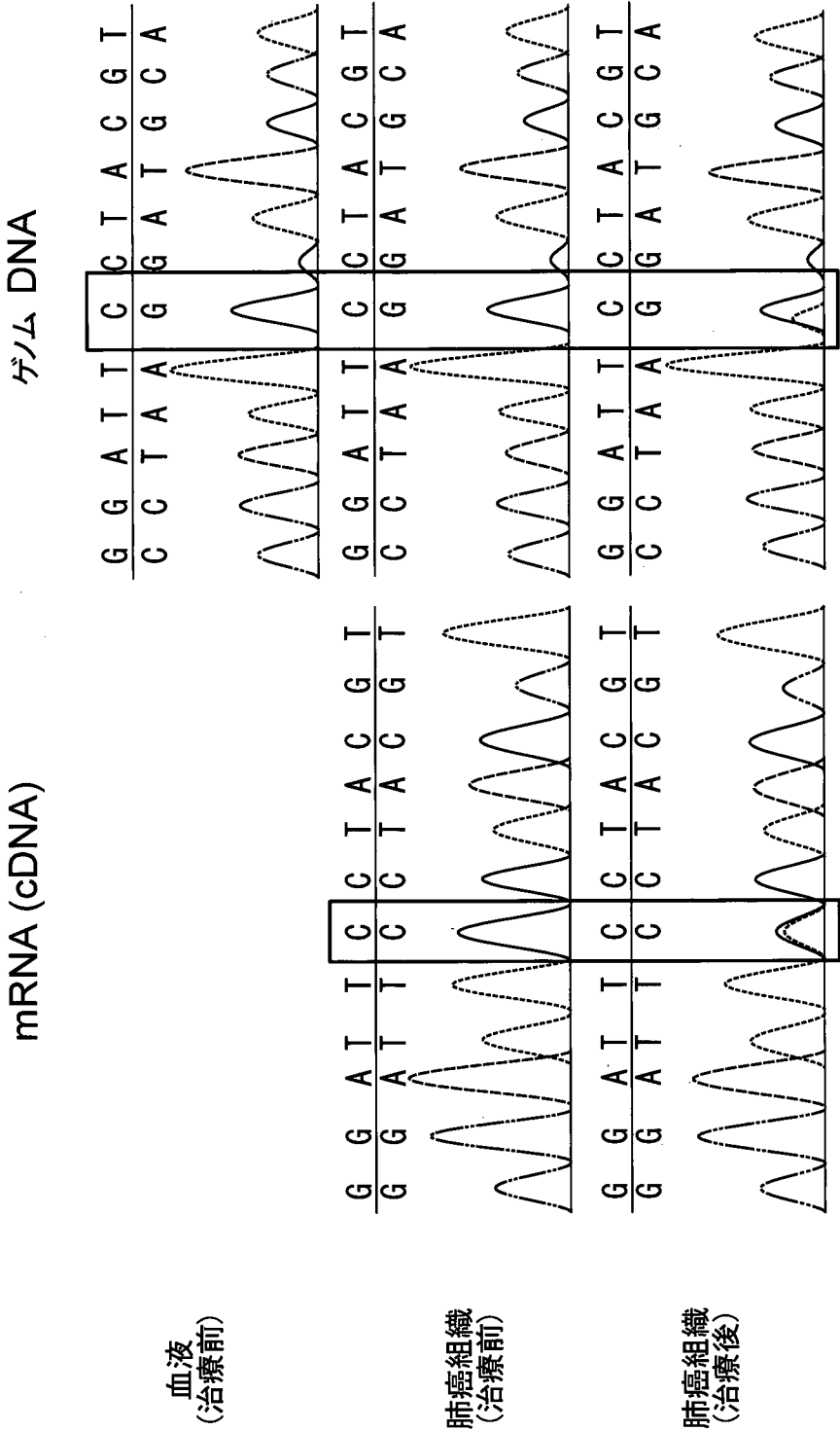
[図2]



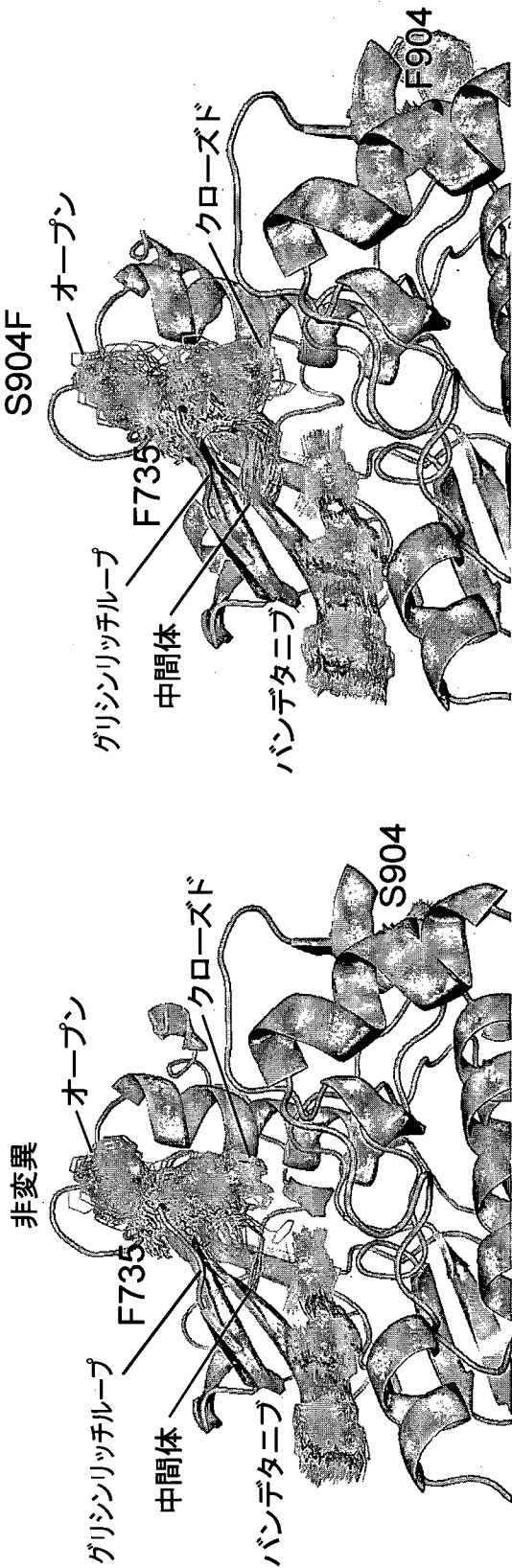
[図3]



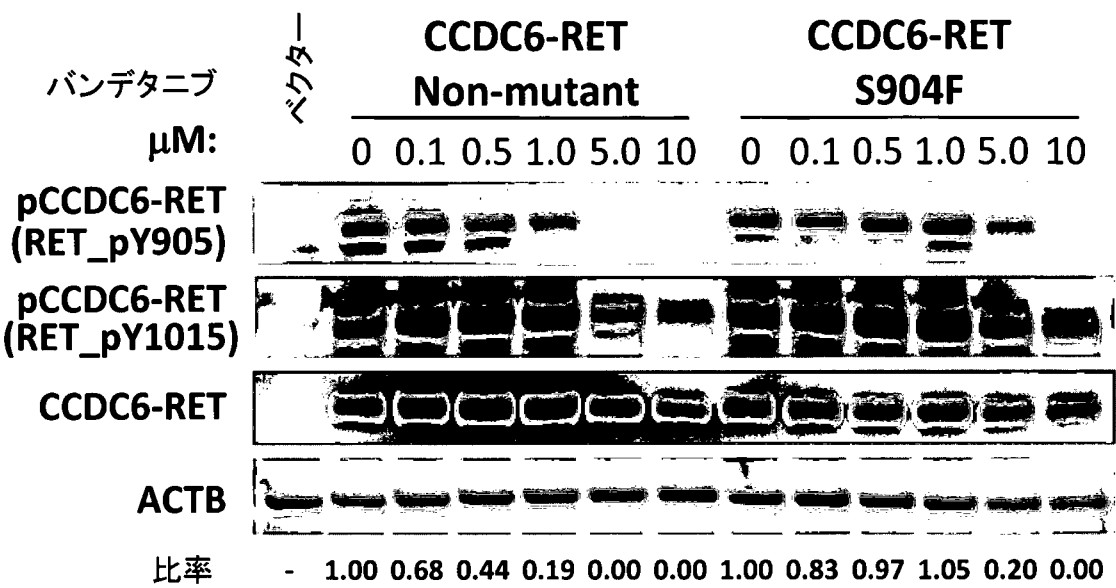
[図4]



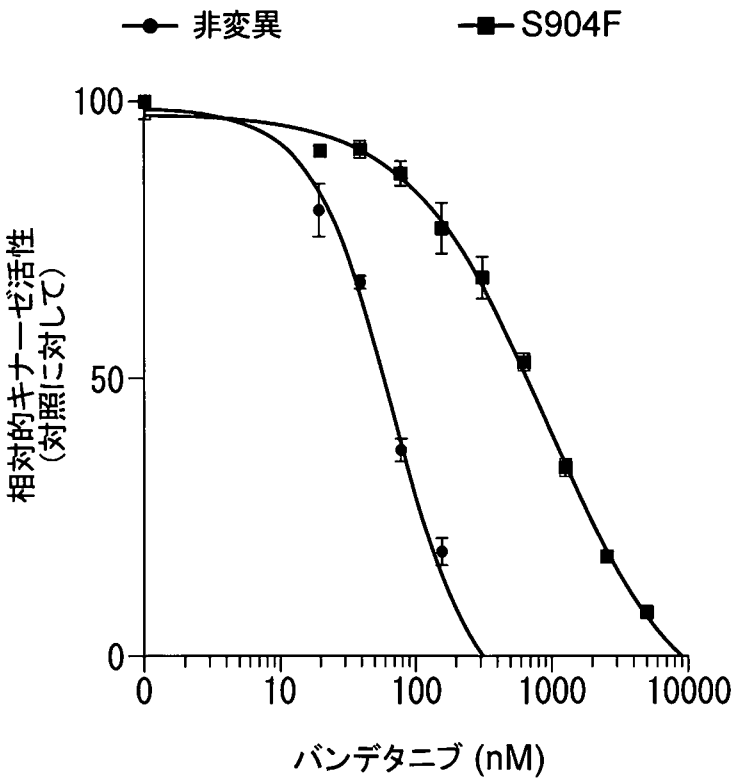
[図5]



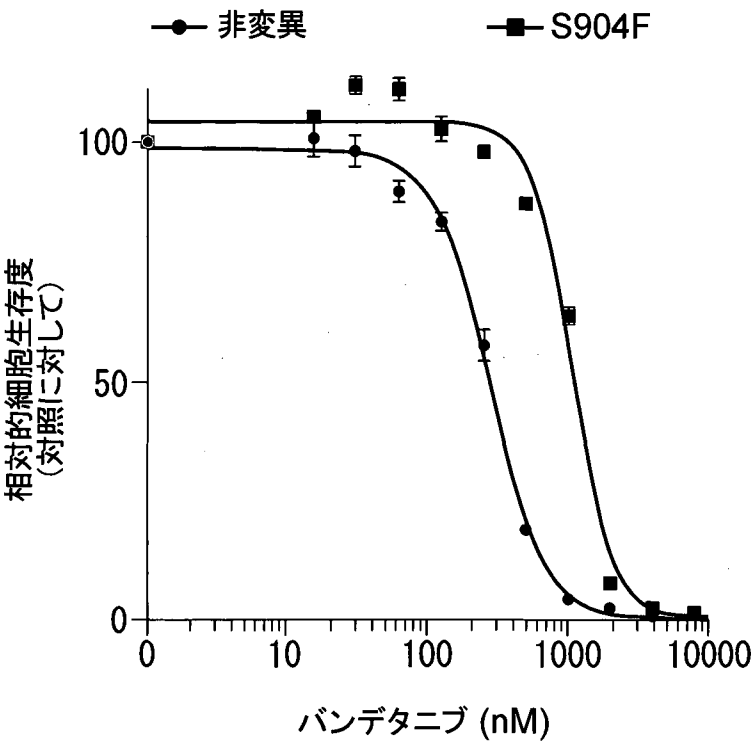
[図6]



[図7]

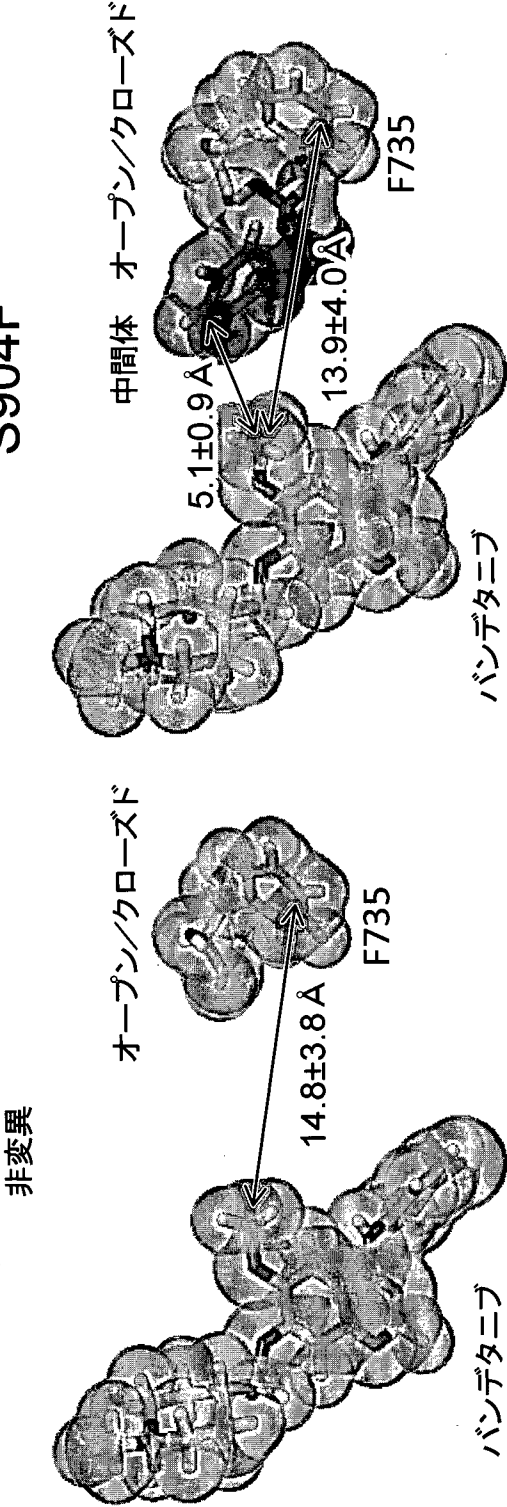


[図8]

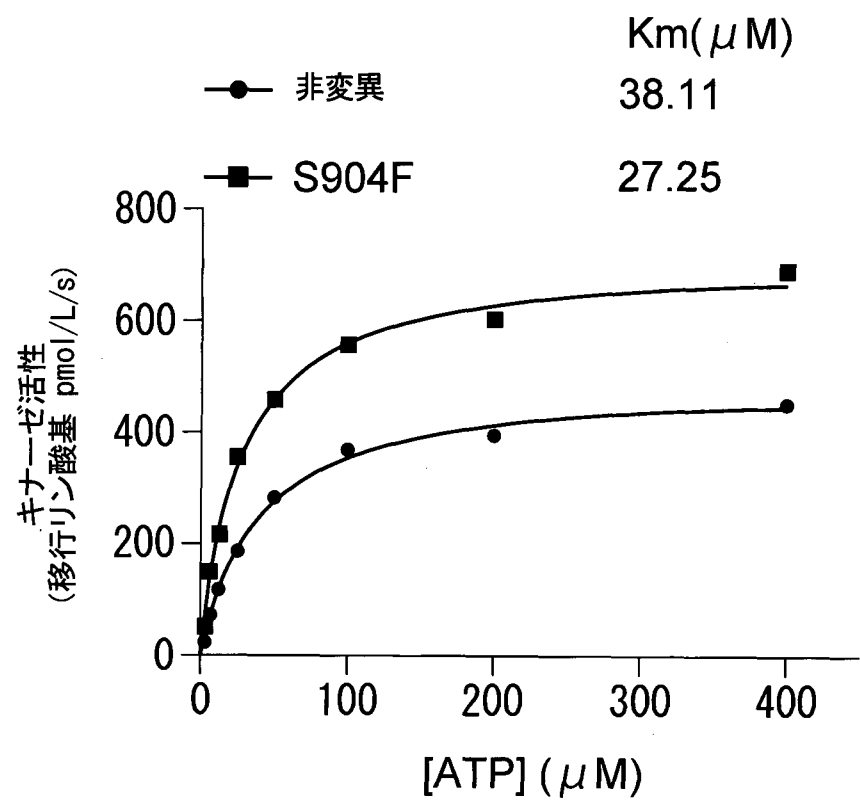


[図9]

S904F



[図10]



[図11]

阻害剤	IC ₅₀ キナーゼアッセイ (nM)		GI ₅₀ Ba/F3 細胞生存度アッセイ (nM)	
	RET キナーゼドメイン		CCDC6-RET	
	非変異 (N)	S904F (S) 変化率 (倍) (S/N)	非変異 (N)	S904F (S) 変化率 (倍) (S/N)
バンデタニブ	56	608 10.86	278.2	1,070 3.85
カボザンチニブ	219.5	2,307 10.51	326.5	1,707 5.23
ポナチニブ	39.97	292.3 7.31	9.18	85.84 9.35
レンバチニブ	<1	11.16 >11	176.1	863.3 4.90
アレクチニブ	39.53	124.2 3.14	250.6	591.3 2.36

[図12]

RET キナーゼ	K_i (μ g/ml) (μ g/ml)	$K_m[ATP]$ (μ M)	V_{max} (μ mol P* L^{-1} * s^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	$k_{cat}/K_m[ATP]$ (μ M $^{-1}$ * s^{-1})
非変異	11.57	38.11	491.2	2.18×10^{-2}	5.73×10^{-4}
S904F	43.09	27.25	714.0	3.22×10^{-2}	1.18×10^{-3}

精製した、S904F変異体及び非変異RETキナーゼドメインを使用して、酵素反応速度分析を行った。

[図13]

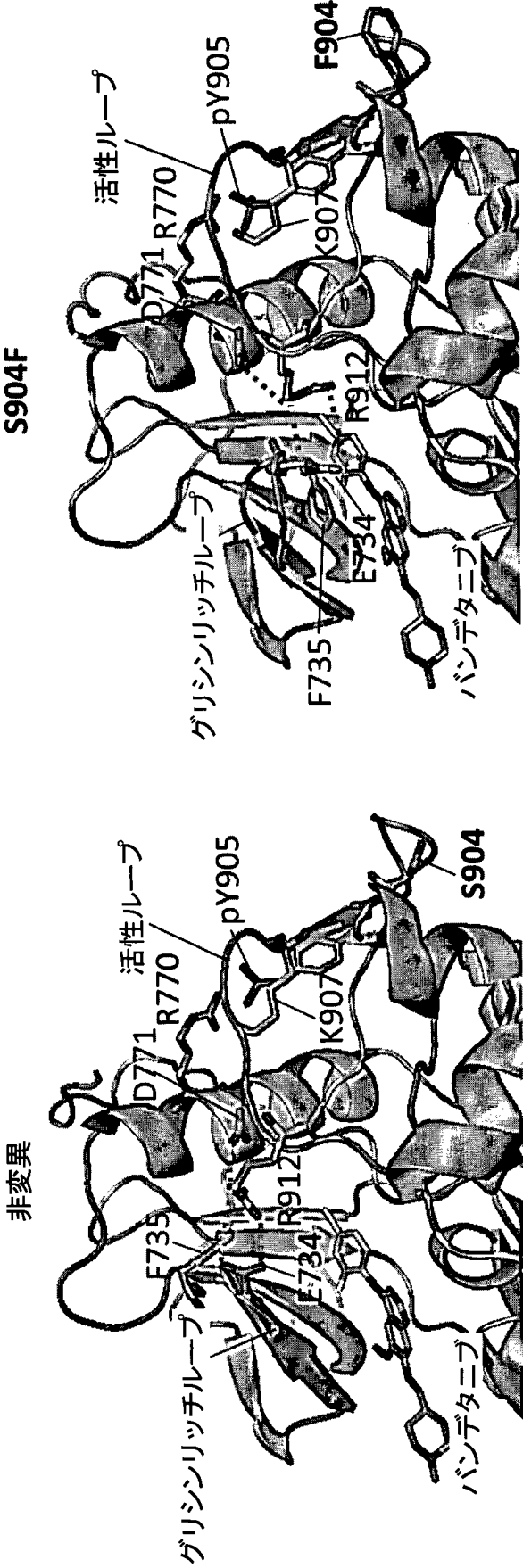
RET キナーゼ	コンフォマー	ΔG (kcal/mol)	占有率 (%)
		バンドタニブ	
非変異	オープン/クローズド	-13.07 ± 0.22	(98.9)
	中間体	計算せず* (1.1)	
S904F	オープン/クローズド	-14.28 ± 1.12	(77.6)
	中間体	-11.16 ± 0.64	(22.4)

結合自由エネルギー値 (ΔG) は、MP-CAFEIにより求めた。

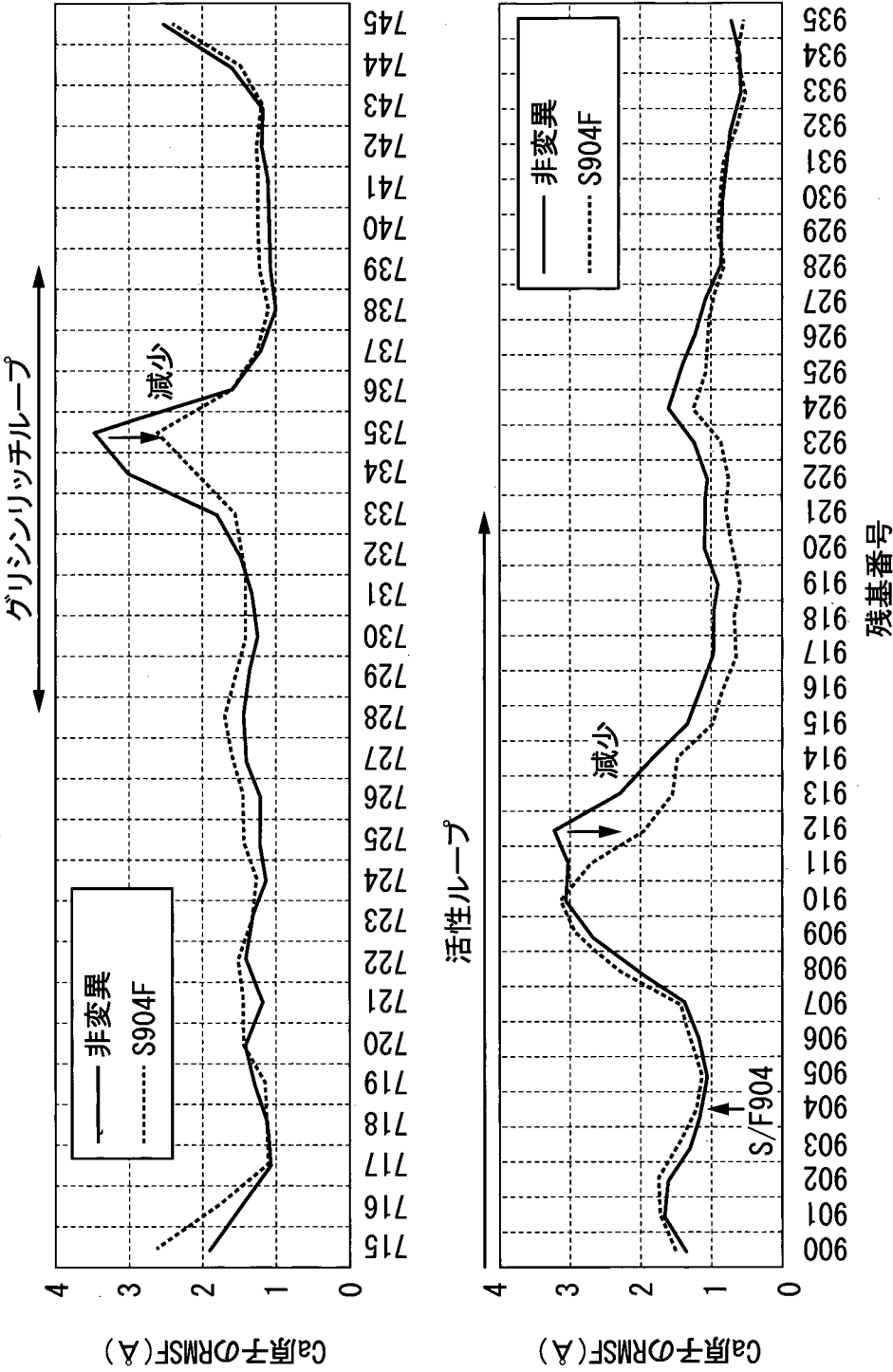
バンドタニブとの複合体中でのRETキナーゼのそれぞれの立体構造の占有率は、長時間スケール (1 μ s) のMD軌道を使って求めた。

* 中間体の立体構造をとる非変異-バンドタニブは、この立体構造が短時間スケール (50ns) 及び長時間スケール (1 μ s) のどちらにおいても非常に過渡的であるため、 ΔG は計算しなかった。このことは、バンドタニブとの複合体中の非変異RETが不安定であることを示している。

[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/009501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/00(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i

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)

C12N15/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Motonobu SAITO, Takashi KONO, "Haigan ni Okeru Driver Idenshi no Saishin Chiken", Annual Review Kokyuki, 30 January 2016 (30.01.2016), pages 50 to 56, page 50, right column, line 10 to page 51, right column, line 5, page 54, left column, line 4 to page 55, left column, line 8	1-4
A	COSCI, B et al., In silico and in vitro analysis of rare germline allelic variants of RET oncogene associated with medullary thyroid cancer, Endocrine-Related Cancer, 2011, Vol. 18, p. 603-612, ISSN 1351-0088, Table 2, 3	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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 March 2017 (30.03.17)

Date of mailing of the international search report
11 April 2017 (11.04.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/009501

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GEORGE PRIYA DOSS, C. et al., In silico profiling and structural insights of missense mutations in RET protein kinase domain by molecular dynamics and docking approach, Mol. Biosyst., 2014, Vol. 10, p. 421-436, ISSN 1742-2051, Table 5, 6	1-4
A	ELISEI, Rossella et al., Not all new RET mutations show transforming activity when analyzed by in silico and in vitro assays, Endocrine Society, 2011, Presentation Number: P1-718, ISSN 0163-769X	1-4
A	CASELLA, Francesca et al., Clinical impact of RET genetic screening of in the management of medullary thyroid carcinoma (MTC) patients: 20 years of experience, European Thyroid Journal, Vol. 3, Suppl 1, 2014, p. 81, OP20, ISSN 2235-0640	1-4
A	ELISEI, R et al., Not all new RET mutations show transforming activity when analyzed by in silico and in vitro assays, European Thyroid Journal, 2011, p. 98, OP76, ISSN 2235-0640	1-4
A	KNOWLES, Phillip P. et al., Structure and Chemical Inhibition of the RET Tyrosine Kinase Domain, J. Biol. Chem., 2006, Vol. 281, No. 44, p. 33577-33587, ISSN 1083-351X	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	齋藤元伸、河野隆志、肺癌におけるドライバー遺伝子の最新知見, Annual Review 呼吸器, 2016.01.30, p. 50-56, 第50頁右欄10行-第51頁右欄第5行, 第54頁左欄第4行-第55 頁左欄第8行	1-4
A	COSCI, B et al., In silico and in vitro analysis of rare germline allelic variants of RET oncogene associated with medullary thyroid cancer, Endocrine-Related Cancer, 2011, Vol. 18, p. 603-612,	1-4

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30.03.2017

国際調査報告の発送日

11.04.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小倉 梢

4N

4504

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	ISSN 1351-0088, Table 2, 3	
A	GEORGE PRIYA DOSS, C. et al., In silico profiling and structural insights of missense mutations in RET protein kinase domain by molecular dynamics and docking approach, Mol. Biosyst., 2014, Vol. 10, p. 421-436, ISSN 1742-2051, Table 5, 6	1-4
A	ELISEI, Rossella et al., Not all new RET mutations show transforming activity when analyzed by in silico and in vitro assays, Endocrine Society, 2011, Presentation Number: P1-718, ISSN 0163-769X	1-4
A	CASELLA, Francesca et al., Clinical impact of RET genetic screening of in the management of medullary thyroid carcinoma (MTC) patients: 20 years of experience, European Thyroid Journal, Vol. 3, Suppl 1, 2014, p. 81, OP20, ISSN 2235-0640	1-4
A	ELISEI, R et al., Not all new RET mutations show transforming activity when analyzed by in silico and in vitro assays, European Thyroid Journal, 2011, p. 98, OP76, ISSN 2235-0640	1-4
A	KNOWLES, Phillip P. et al., Structure and Chemical Inhibition of the RET Tyrosine Kinase Domain, J. Biol. Chem., 2006, Vol. 281, No. 44, p. 33577-33587, ISSN 1083-351X	1-4