

明 細 書

発明の名称：

イミダゾ [4, 5-b] ピリジン誘導体による固形癌治療のためのバイオマーカー

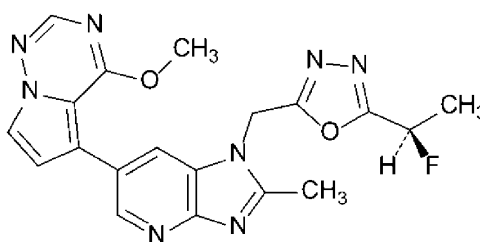
技術分野

[0001] 本発明は、固形癌対象における、イミダゾ [4, 5-b] ピリジン誘導体に対する治療応答を予測するためのバイオマーカーとしての、MYC遺伝子およびその他のがん関連遺伝子の使用、当該バイオマーカーを用いた固形癌の診断および治療方法、ならびに当該バイオマーカーにより特徴づけられる固形癌を治療のための医薬組成物に関する。

背景技術

[0002] イミダゾ [4, 5-b] ピリジン誘導体、特に、下記式 (I)

[化1]



で示される、1-((5-(1R)-1-フルオロエチル)-1,3,4-オキサジアゾール-5-イル)メチル)-6-(4-メトキシピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)-2-メチル-1H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン（以下、化合物Aと称する。）またはその誘導体は、主としてスキップドエクソン型のスプライシング変化を誘導し、強力な抗腫瘍活性を示すCLK（Cdc2様キナーゼ）に対する阻害剤である。特許文献1には、化合物Aまたはその誘導体を含むCLK阻害剤が、癌を含むCLK関連疾患の予防および／または治療の有用であり、卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、血液がんおよび前立腺癌を含む、様々なインビボ癌モデル

において抗腫瘍効果を発揮することが示されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第2017/188374号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

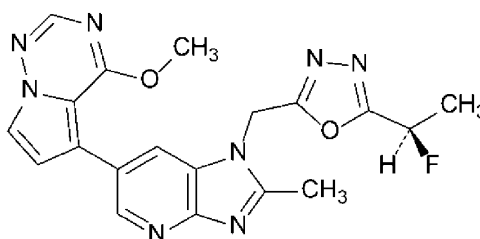
[0004] 本発明は、化合物Aまたはその誘導体の固形癌における抗癌治療有効性を予測し、それによって、化合物Aまたはその誘導体を用いた治療および化合物Aまたはその誘導体と他の薬剤および／または他の療法を併用した治療から、最も利益を得るであろう対象を特定することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者は、固形癌において、化合物Aまたはその誘導体に対して特に高い応答性を示す、CLK阻害に対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴を見出し、この知見に基づいて、鋭意研究を行い、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 固形癌対象における、下記式(1)：

[化2]



で示される、1-((5-(1R)-1-フルオロエチル)-1,3,4-オキサジアゾール-5-イル)メチル)-6-(4-メトキシピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)-2-メチル-1H-イミダゾ[4,5-b]ピリジンまたはその誘導体に対する治療応答を予測するための方法であって、(1)前記対象からの癌組織由来試料中の、CLK阻害に

対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴を検出すること、および
(2) 前記遺伝子の特徴に基づいて、前記対象の、前記式(1)で示される
化合物またはその誘導体に対する応答の見込みを判断することを含む、方法
。

[2] 前記項目[1]に記載の方法であって、
前記遺伝子の特徴が、以下；

- (a) MYC 遺伝子増幅、
- (b) MYC 遺伝子変異、
- (c) MYC 遺伝子染色体位置転位、
- (d) MYC mRNA 量増加、
- (e) MYC タンパク質量増加、
- (f) EGF R 遺伝子変異、
- (g) U2AF1 遺伝子変異、
- (h) POLE 遺伝子減少、
- (i) CDK12 遺伝子減少、
- (j) ATRX、ATR、GNAQ および HIST1H3B の1つ以上から
選択される遺伝子変異および
- (k) MDM4 エキソンスキップ変化

からなる群から選択される1つ以上である、方法。

[3] 前記項目[2]に記載の方法であって、

(1) 前記対象からの癌組織由来試料中の、MYC 遺伝子増幅、MYC 遺伝
子変異、MYC 遺伝子染色体位置転位、MYC mRNA 量増加および／ま
たはMYC タンパク質量増加を検出すること、および

(2) MYC 遺伝子コピー数がMYC 遺伝子コピー数参照と比較して増加し
ている場合、MYC 遺伝子配列がMYC 遺伝子配列参照と比較して変化して
いる場合、MYC 遺伝子染色体位置部位がMYC 遺伝子染色体位置部位参照
と比較して転座している場合、MYC mRNA 量がMYC mRNA 量参
照と比較して増加している場合、および／またはMYC タンパク質量がMY

Cタンパク質量参照と比較して増加している場合に、前記対象が、前記式（1）で示される化合物またはその誘導体に対して特に高い応答性を示すものであると判断することを含む、方法。

〔4〕前記項目〔3〕に記載の方法であって、前記MYC遺伝子がMYCC、MYCNおよびMYCLからなる群から選択される、方法。

〔5〕前記項目〔3〕に記載の方法であって、前記MYC遺伝子コピー数が前記MYC遺伝子コピー数参照と比較して約1.5倍以上の増加を示すか、あるいは前記MYC遺伝子配列が参照と比較してMYCC Q37del、P59L、S146L、あるいはMYCN R45Rfs*86、E445Kであることを示す、方法。

〔6〕前記項目〔3〕に記載の方法であって、前記MYC遺伝子増幅またはMYC遺伝子変異を、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション（aCGH）、一塩基多型（SNP）アレイ、コピー数多型（CNV）シーケンシング、次世代シーケンシング（NGS）またはマルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅（MLPA）によって検出することを含む、方法。

〔7〕前記項目〔3〕に記載の方法であって、前記MYC遺伝子染色体位置部位の転位を、in situ ハイブリダイゼーション（ISH）、蛍光in situ ハイブリダイゼーション（FISH）、次世代シーケンシング（NGS）または比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）によって検出することを含む、方法。

〔8〕前記項目〔3〕に記載の方法であって、前記MYC mRNA量増加を、in situ ハイブリダイゼーション（ISH）、蛍光in situ ハイブリダイゼーション（FISH）、次世代シーケンシング（NGS）、またはリアルタイムPCRあるいはデジタルPCR解析によって検出することを含む、方法。

〔9〕前記項目〔3〕に記載の方法であって、前記MYCタンパク質量増加を、免疫組織化学染色（IHC）、フローサイトメトリー（FACS）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、protein array（Pr

ximity Extension Assay, PEA法), ウェスタンブロットリング(WB)によって検出することを含む、方法。

[10] 前記項目[2]に記載の方法であって、

(1) 前記対象からの癌組織由来試料中の、EGFR遺伝子変異、U2AF1遺伝子変異、POLE遺伝子減少、CDK12遺伝子減少、ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および／またはMDM4エキソンスキップ変化を検出すること、

(2) EGFR遺伝子、U2AF1遺伝子、ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子配列が各遺伝子の遺伝子配列参照と比較して変化している場合、および／またはMDM4 mRNA配列がMDM4 mRNA配列参照と比較して変化している場合、および／またはPOLE遺伝子コピー数またはCDK12遺伝子コピー数が、各遺伝子のコピー数参照と比較して減少している場合に、前記対象が、前記式(1)で示される化合物またはその誘導体に対して特に高い応答性を示すものであると判断することを含む、方法。

[11] 前記項目[10]に記載の方法であって、前記U2AF1遺伝子変異がS34F変異またはS34Y変異である、方法。

[12] 前記項目[10]または[11]に記載の方法であって、前記EGFR遺伝子変異、前記U2AF1遺伝子変異、前記POLE遺伝子減少、前記CDK12遺伝子減少、ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される前記遺伝子変異および／または前記MDM4エキソンスキップ変化を、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション(aCGH)、一塩基多型(SNP)アレイ、コピー数多型(CNV)シーケンシングまたはマルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)、RNAシーケンシングによって検出することを含む、方法。

[13] 前記項目[1]から[12]までのいずれか1つに記載の方法であって、前記癌組織由来試料が、前記対象から得られた外科的試料、生検試料、胸水試料、または腹水試料であり、例えば、肺、血液、乳房、消化管(胃

、結腸、直腸)、卵巣、膵臓、肝臓、膀胱、子宮頸部、神経、子宮、唾液腺、腎臓、前立腺、甲状腺、または筋肉の組織のうちの1つ以上から採取されたものである、方法。

[14] 前記項目[1]から[12]までのいずれか1つに記載の方法であって、前記対象がヒト対象である、方法。

[15] 前記項目[1]から[12]までのいずれか1つに記載の方法であって、前記癌が、癌腫、横紋筋肉腫、例えば、胞巣状横紋筋肉腫(骨、腱、軟骨、筋肉、脂肪(fat)、線維、血管、脂肪(adipose)、および/または結合組織に由来する肉腫を含む)などの肉腫、明細胞肉腫、神経芽腫、髓芽腫、星状細胞腫、多形膠芽腫、網膜芽細胞腫、腺扁平上皮癌、癌肉腫、混合性中胚葉腫瘍、奇形癌、肺癌(非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腺癌、および肺扁平上皮癌を含む)、乳癌(転移性乳癌を含む)、消化器癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、卵巣癌、膵臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、膠芽腫、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌(例えば、ウィルム腫瘍)、前立腺癌、甲状腺癌、ならびに頭頸部癌のうちの1つ以上から選択される、方法。

[16] 前記項目[3]から[9]までのいずれか1つに記載の方法であって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌から選択される、方法。

[17] 前記項目[16]に記載の方法であって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌である、方法。

[18] 前記項目[3]から[9]までのいずれか1つに記載の方法であって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、神経芽腫、小細胞肺癌、胞巣状横紋筋肉腫、髓芽腫、多形膠芽腫、および網膜芽細胞腫から選択される、方法。

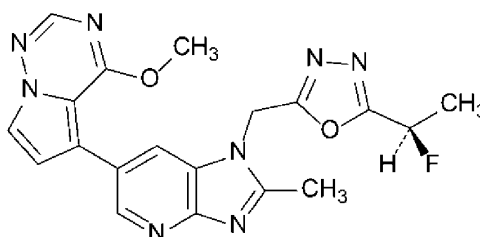
[19] 前記項目[18]に記載の方法であって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が神経芽腫である、方法。

[20] 前記項目[3]から[9]までのいずれか1つに記載の方法であって

て、前記MYC遺伝子がMYCLであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌から選択される、方法。

[21] 固形癌対象における、下記式(1)：

[化3]



で示される、1-((5-(1R)-1-フルオロエチル)-1,3,4-オキサジアゾール-5-イル)メチル)-6-(4-メトキシピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)-2-メチル-1H-イミダゾ[4,5-b]ピリジンまたはその誘導体の療法に対する治療応答を予測するための、

以下(a)～(k)の1つ以上から選択されるバイオマーカー；

- (a) MYC遺伝子増幅、
- (b) MYC遺伝子変異、
- (c) MYC遺伝子染色体位置転位、
- (d) MYC mRNA量増加、
- (e) MYCタンパク質量増加、
- (f) EGFR遺伝子変異、
- (g) U2AF1遺伝子変異、
- (h) POLE遺伝子減少、
- (i) CDK12遺伝子減少、
- (j) ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および
- (k) MDM4エクソンスキップ変化。

[22] 前記項目[21]に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺

伝子がMYCC、MYCNおよびMYCLからなる群から選択される、バイオマーカー。

〔23〕前記項目〔21〕に記載のバイオマーカーであって、前記U2AF1遺伝子の変異がS34F変異またはS34Y変異である、バイオマーカー。

〔24〕前記項目〔21〕から〔23〕までのいずれか1つに記載のバイオマーカーであって、前記癌が、癌腫、横紋筋肉腫、例えば、胞巣状横紋筋肉腫（骨、腱、軟骨、筋肉、脂肪（fat）、線維、血管、脂肪（adipose）、および／または結合組織に由来する肉腫を含む）などの肉腫、明細胞肉腫、神経芽腫、髄芽腫、星状細胞腫、多形膠芽腫、網膜芽細胞腫、腺扁平上皮癌、癌肉腫、混合性中胚葉腫瘍、奇形癌、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腺癌、および肺扁平上皮癌を含む）、乳癌（転移性乳癌を含む）、消化器癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、卵巣癌、膵臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、膠芽腫、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌（例えば、ウィルム腫瘍）、前立腺癌、甲状腺癌、ならびに頭頸部癌のうちの1つ以上から選択される、バイオマーカー。

〔25〕前記項目〔21〕に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌および前立腺癌から選択される、バイオマーカー。

〔26〕前記項目〔25〕に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌である、バイオマーカー。

〔27〕前記項目〔21〕に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、神経芽腫、小細胞肺癌、胞巣状横紋筋肉腫、髄芽腫、多形膠芽腫、および網膜芽細胞腫から選択される、バイオマーカー。

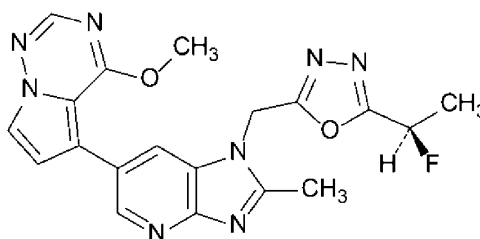
〔28〕前記項目〔27〕に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が神経芽腫である、バイオマーカー。

〔29〕前記項目〔21〕に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺

伝子がMYCLであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌から選択される、バイオマーカー。

[30] CLK阻害に対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴を有する固形癌を治療するための、下記式(1)：

[化4]



で示される、1-((5-(1R)-1-フルオロエチル)-1,3,4-オキサジアゾール-1-イル)メチル)-6-(4-メトキシピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)-2-メチル-1H-イミダゾ[4,5-b]ピリジンまたはその誘導体を有効成分として含む、医薬組成物であって、

前記遺伝子の特徴が、

以下(a)～(k)から選択される1つ以上である医薬組成物；

- (a) MYC遺伝子増幅、
- (b) MYC遺伝子変異、
- (c) MYC遺伝子染色体位置転位、
- (d) MYC mRNA量増加、
- (e) MYCタンパク質量増加、
- (f) EGFR遺伝子変異、
- (g) U2AF1遺伝子変異、
- (h) POLE遺伝子減少、
- (i) CDK12遺伝子減少、
- (j) ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および

(k) MDM4 エキソンスキップ変化。

[31] 前記項目 [30] に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCC、MYCNおよびMYCLからなる群から選択される、医薬組成物。

[32] 前記項目 [30] に記載の医薬組成物であって、前記U2AF1遺伝子変異がS34F変異またはS34Y変異である、医薬組成物。

[33] 前記項目 [30] から [32] までのいずれか1つに記載の医薬組成物であって、前記癌が、癌腫、横紋筋肉腫、例えば、胞巣状横紋筋肉腫（骨、腱、軟骨、筋肉、脂肪（fat）、線維、血管、脂肪（adipose））、および／または結合組織に由来する肉腫を含む）などの肉腫、明細胞肉腫、神経芽腫、髓芽腫、星状細胞腫、多形膠芽腫、網膜芽細胞腫、腺扁平上皮癌、癌肉腫、混合性中胚葉腫瘍、奇形癌、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腺癌、および肺扁平上皮癌を含む）、乳癌（転移性乳癌を含む）、消化器癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、卵巣癌、膵臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、膠芽腫、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌（例えば、ウィルム腫瘍）、前立腺癌、甲状腺癌、ならびに頭頸部癌のうちの1つ以上から選択される、医薬組成物。

[34] 前記項目 [30] に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌から選択される、医薬組成物。

[35] 前記項目 [34] に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌である、医薬組成物。

[36] 前記項目 [30] に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、神経芽腫、小細胞肺癌、胞巣状横紋筋肉腫、髓芽腫、多形膠芽腫、および網膜芽細胞腫から選択される、医薬組成物。

[37] 前記項目 [36] に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が神経芽腫である、医薬組成物。

〔38〕前記項目〔30〕に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCLであり、かつ、卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌から選択される、医薬組成物。

発明の効果

[0006] 本発明は、固形癌対象における、化合物Aまたはその誘導体の治療有効性を予測するためのバイオマーカーを提供する。これにより、化合物Aまたはその誘導体を用いた療法において、より高い抗癌効果を獲得しうる対象を判別することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0007] [図1]種々のがん関連遺伝子を導入したNIH3T3細胞株に対する化合物Aの感受性評価を示す図である。

[図2]MYCCあるいはMYCNに遺伝子の特徴を有するNIH3T3細胞株に対する化合物Aの感受性評価を示す図である。

[図3]MYCC、MYCNあるいはEGFRに遺伝子の特徴を有する細胞株に対する化合物Aの感受性評価を示す図である。

[図4]MYCC遺伝子増幅を有する細胞株に対する化合物Aの感受性評価を示す図である。

[図5]化合物Aまたはその誘導体の結晶の一例（結晶パターンA）を示す、（a）粉末X線回折、（b）示差走査熱量、及び（c）熱重量分析の各図である。

[図6]化合物Aまたはその誘導体の結晶の一例（結晶パターンB）を示す、（a）粉末X線回折、（b）示差走査熱量、及び（c）熱重量分析の各図である。

発明を実施するための形態

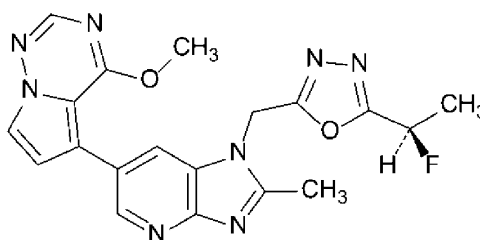
[0008] 以下、本発明の態様に含まれる、固形癌の化合物Aまたはその誘導体に対する治療応答を予測するための方法、そのバイオマーカー、当該バイオマーカーによって特徴付けられる固形癌を治療するための化合物Aまたはその誘導体を含む医薬組成物および前記固形癌の診断および治療法などについて、

詳細に説明する。

[0009] [化合物A]

本発明の範囲内において、化合物Aとは、以下の式(1)：

[化5]



で表される1-((5-(1R)-1-フルオロエチル)-1,3,4-オキサジアゾール-5-イル)メチル)-6-(4-メトキシピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)-2-メチル-1H-イミダゾ[4,5-b]ピリジンを示す。

[0010] また、本発明の範囲内において、化合物Aの誘導体には、前記式(1)の化合物の塩および水和物、あるいはこれらの光学異性体、互変異性体、溶媒和物等を含むものとする。また、この化合物Aの誘導体は、結晶やクラスレートであってもよく、結晶形が単一であっても結晶形混合物や共結晶等であっても良い。

化合物Aの塩としては、薬理的に許容される塩が好ましく、例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩が挙げられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩、アンモニウム塩が挙げられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン[トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン]

、*tert*-ブチルアミン、シクロヘキシルアミン、ベンジルアミン、ジシクロヘキシルアミン、*N*，*N*-ジベンジルエチレンジアミンとの塩が挙げられる。

無機酸との塩の好適な例としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸との塩が挙げられる。

有機酸との塩の好適な例としては、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸との塩が挙げられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、アルギニン、リジン、オルニチンとの塩が挙げられる。

酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、アスパラギン酸、グルタミン酸との塩が挙げられる。

[0011] また、化合物Aまたはその誘導体の製造方法の詳細については、国際公開第2017/188374号に開示されており、その内容を本明細書においても組み込むものとする。

[0012] [固形癌の化合物Aに対する治療応答を予測するための方法]

本発明の固形癌における化合物Aまたはその誘導体に対する治療応答を予測するための方法は、(a) 固形癌対象からの癌組織由来試料中の、CLK阻害に対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴を検出することと、(b) 前記遺伝子の特徴に基づいて、前記対象の、化合物Aまたはその誘導体に対する応答の見込みを判断することを含む。

[0013] 前記CLK阻害に対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴には、遺伝子変化および遺伝子発現変化を含む。ここで、前記遺伝子変化には、遺伝子のゲノム領域における変異、例えば、コピー数変異(CNV)、一塩基変異(SNV)、複数塩基変異(MNV)、小さな塩基配列の挿入または欠失(Indel)、スプライス部位変異、遺伝子融合または染色体位置部位の転位などの変異、あるいはRNAスプライシング変化が含まれていても

よい。ここで、前記遺伝子として、例えば、ACVR1、AKT1、AKT2、AKT3、ALK、AR、ARAF、BMPR1A、BRAF、CASP8、CCNE1、CDK4、CSF1R、CTNNB1、DDR2、EPAS1、ERBB2、ERBB3、ERBB4、ESR1、EZH2、GNA11、GNAQ、GNAS、H3F3A、HRAS、IDH1、IDH2、JUN、KIT、KLF4、KRAS、MAP2K2、MAP2K4、MAPK1、MDM2、MDM4、MET、MITF、MYCC、MYCN、MYCL、MYOD1、MFE2L2、MKX2-1、NRAS、NTRK1、PDGFRA、PIK3CA、PIK3CB、PLCG1、PTEN、RAC1、RAF1、RET、RHOA、SMO、STAT5B、TBL1XR1、TERT、TP53、TSC2、USP8、WT1、EGFR、FGFR1、FGFR2、FGFR3、MAP2K1、U2AF1、ATR、ATRXおよびHIST1H3Bの少なくとも一つを挙げることができる。

また、前記遺伝子発現変化には、前記遺伝子変化に基づく、もしくは基づかないmRNA量の増減、あるいはタンパク質量の増減が含まれる。

[0014] 本発明の一の実施形態において、CLK阻害に対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴は、MYC遺伝子増幅、MYC遺伝子変異またはMYC遺伝子染色体位置部位転位であってよく、これらはそれぞれ各参照との比較により検出される。好ましくは、MYC遺伝子コピー数がMYC遺伝子コピー数参照と比較して増加している場合、MYC遺伝子配列がMYC遺伝子配列参照と比較して変化している場合、またはMYC遺伝子染色体位置部位がMYC遺伝子染色体位置部位参照と比較して転座している場合に、前記対象を、化合物Aまたはその誘導体に対して特に高い応答性を示す対象と判断することができる。

[0015] 前記MYC遺伝子増幅は、参照と比較してコピー数の増加が観察されるものであればよく、これに限定されるものでないが、好ましくは、約1.5倍以上の増加を示すものであってよい。また、これに限定されるものでないが、本発明の他の実施形態では、約2倍以上、約4倍以上、約10倍以上、あ

るいは約20倍以上の増加を示すものであってもよい。

- [0016] 前記MYC遺伝子変異は、MYC遺伝子のゲノム領域内における一塩基変異（SNV）、複数塩基変異（MNV）、小さな挿入または欠失（Indel）、スプライス部位変異、遺伝子融合などの変異であってよい。
- [0017] 前記MYC遺伝子変異は、これに限定されるものではないが、好ましくは、MYCC Q37del、P59L、S146L、MYCN R45Rfs*86および／またはE445Kであってよい。
- [0018] 本発明の好適な実施形態では、MYC遺伝子はMYCC、MYCNおよびMYCLから選択することができる。
- [0019] 本発明の一の実施形態では、前記MYC遺伝子増幅またはMYC遺伝子変異を、当該技術分野においてよく知られた検出手法、例えば、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション（aCGH）、一塩基多型（SNP）アレイ、コピー数多型（CNV）シーケンシング、リアルタイムPCRあるいはデジタルPCRによるコピー数多型（CNV）解析、次世代シーケンシング（NGS）、またはマルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅（MLPA）によって検出することができる。
- [0020] また、前記MYC遺伝子染色体位置部位の転位に関しても同様に、当該技術分野においてよく知られた検出手法、例えば、in situ ハイブリダイゼーション（ISH）、蛍光in situ ハイブリダイゼーション（FISH）、次世代シーケンシング（NGS）、または比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）によって検出することができる。前記MYC遺伝子コピー数参照、MYC遺伝子配列参照および／またはMYC遺伝子染色体位置部位参照は、同一対象からの非癌組織由来試料から得られたものであるか、あるいは当該技術分野においてよく知られたデータベース等、例えばcBioPortal FOR CANCER GENOMICSから得られたものであってもよい。
- [0021] 本発明の一の実施形態において、CLK阻害に対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴は、MYC mRNA量増加またはMYCタンパク

質量増加であってよく、これは参照との比較により検出される。好ましくは、MYC mRNA量がMYC mRNA量参照と比較して増加している場合に、またはMYCタンパク質量がMYCタンパク質量参照と比較して増加している場合に、前記対象を、化合物Aまたはその誘導体に対して特に高い応答性を示す対象と判断することができる。

[0022] 前記MYC mRNA量増加および／またはMYCタンパク質量の増加は、これに限定されるものではないが、MYC遺伝子増幅、MYC遺伝子変異および／またはMYC遺伝子染色体位置部位転位に起因するものであってよい。

[0023] 前記MYC mRNA量増加は参照と比較してmRNA量の増加が、MYCタンパク質量の増加は、参照と比較してタンパク量の増加がそれぞれ観察されるものであればよい。

[0024] 前記MYC mRNA量の検出は、当該技術分野においてよく知られた検出手法、例えば、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH)、蛍光*in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)、次世代シーケンシング (NGS)、またはリアルタイムPCRあるいはデジタルPCR解析、によって検出することができる。

[0025] 前記MYC mRNA量の参照は、同一対象からの非癌組織由来試料から得られたものであるか、あるいは当該技術分野においてよく知られたデータベース等、例えばcBioPortal FOR CANCER GENOMICSから得られたものであってもよい。

[0026] 前記MYCタンパク質量の検出は、当該技術分野においてよく知られた検出手法、例えば、免疫組織化学染色 (IHC)、フローサイトメトリー (FACS)、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、*protein array* (Proximity Extension Assay, PEA法)、ウェスタンブロットティング (WB) によって検出することができる。

[0027] 前記MYCタンパク質量の参照は、同一対象からの非癌組織由来試料から得られたものであるか、あるいは当該技術分野においてよく知られたデータ

ベース等、例えばcBioPortal FOR CANCER GENOMICSから得られたものであってもよい。

[0028] 本発明の一の実施形態では、CLK阻害に対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴はU2AF1遺伝子変異であって、これは参照との比較により検出される。好ましくは、前記U2AF1遺伝子の遺伝子配列がU2AF1遺伝子配列参照と比較して変化している場合には、前記対象を、化合物Aまたはその誘導体に対して特に高い応答性を示す対象であると判断することができる。

[0029] 前記U2AF1遺伝子変異は、当該遺伝子のゲノム領域内における一塩基変異（SNV）、複数塩基変異（MNV）、小さな挿入または欠失（Indel）、スプライス部位変異、遺伝子融合などの変異であってもよいが、好ましくは、S34F変異またはS34Y変異である。

[0030] 本発明の一の実施形態では、CLK阻害に対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴は、EGFR遺伝子変異、POLE遺伝子減少、CDK12遺伝子減少、ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および／またはMDM4エキソンスキップ変化であって、これらはそれぞれ各参照との比較により検出される。好ましくは、前記EGFR遺伝子の遺伝子配列がEGFR遺伝子配列参照と比較して変化している場合、前記POLE遺伝子コピー数がPOLE遺伝子コピー数参照と比較して減少している場合、前記CDK12遺伝子コピー数がCDK12遺伝子コピー数参照と比較して減少している場合、ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子の遺伝子配列が、それぞれ対応する遺伝子配列参照と比較して変化している場合、および／または前記MDM4 mRNA配列がMDM4 mRNA配列参照と比較して変化している場合に、前記対象を化合物Aまたはその誘導体に対して特に高い応答性を示す対象であると判断することができる。

[0031] 前記EGFR遺伝子変異、ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および／またはMDM4エキソ

ンスキップ変化はそれぞれ、一塩基変異（S N V）、複数塩基変異（M N V）、小さな挿入または欠失（I n d e l）、スプライス部位変異、遺伝子融合などの変異、および／またはRNAスプライシング変化であってもよい。

[0032] 前記P O L E 遺伝子減少またはC D K 1 2 遺伝子減少は、各参照と比較してコピー数の減少が観察されるものであればよい。

[0033] 前記癌組織由来試料は、前記対象から得られた外科的試料、生検試料、胸水試料、または腹水試料であってもよく、例えば、肺、血液、乳房、消化管（胃、結腸、直腸）、卵巣、膵臓、肝臓、膀胱、子宮頸部、神経、子宮、唾液腺、腎臓、前立腺、甲状腺、または筋肉の組織のうちの1つ以上から採取されたものであってもよい。

[0034] 前記対象は、これに限定されるものではないが、好ましくはヒト対象である。

[0035] 前記固形癌は、癌〔例、大腸癌（例、結腸癌、直腸癌、肛門癌、家族性大腸癌、遺伝性非ポリポーシス大腸癌、消化管間質腫瘍）、肺癌（例、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、悪性中皮腫）、中皮腫、膵臓癌（例、膵管癌、膵内分泌腫瘍）、咽頭癌、喉頭癌、食道癌、胃癌（例、乳頭腺癌、粘液性腺癌、腺扁平上皮癌）、十二指腸癌、小腸癌、乳癌（例、浸潤性乳管癌、非浸潤性乳管癌、炎症性乳癌）、卵巣癌（例、上皮性卵巣癌、性腺外胚細胞腫瘍、卵巣性胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍）、精巣腫瘍、前立腺癌（例、ホルモン依存性前立腺癌、ホルモン非依存性前立腺癌、去勢療法抵抗性前立腺癌）、肝臓癌（例、肝細胞癌、原発性肝癌、肝外胆管癌）、甲状腺癌（例、甲状腺髄様癌）、腎臓癌（例、腎細胞癌（例、淡明細胞型腎細胞癌）、腎盂と尿管の移行上皮癌）、子宮癌（例、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫）、妊娠性絨毛癌、脳腫瘍（例、髄芽細胞腫、神経膠腫、松果体星細胞腫瘍、毛様細胞性星細胞腫、びまん性星細胞腫、退形成性星細胞腫、下垂体腺腫）、網膜芽細胞腫、皮膚癌（例、基底細胞腫、悪性黒色腫）、肉腫（例、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、軟部肉腫、紡錘細胞肉腫、明細胞肉腫）、悪性骨腫瘍、膀胱癌、原発不明癌〕のうちの1つ以上から選択することができる。

- [0036] 本発明の好適な実施形態では、前記癌が、癌腫、横紋筋肉腫、例えば、胞巢状横紋筋肉腫（骨、腱、軟骨、筋肉、脂肪（f a t）、線維、血管、脂肪（a d i p o s e）、および／または結合組織に由来する肉腫を含む）などの肉腫、明細胞肉腫、神経芽腫、髓芽腫、星状細胞腫、多形膠芽腫、網膜芽細胞腫、腺扁平上皮癌、癌肉腫、混合性中胚葉腫瘍、奇形癌、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腺癌、および肺扁平上皮癌を含む）、乳癌（転移性乳癌を含む）、消化器癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、卵巢癌、膵臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、膠芽腫、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌（例えば、ウィルム腫瘍）、前立腺癌、甲状腺癌、ならびに頭頸部癌のうちの1つ以上から選択することができる。
- [0037] 本発明の好適な実施形態では、前記遺伝子の特徴が、卵巢癌および、胃癌、肺癌、乳癌、肝細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、直腸癌、胆管癌、膵臓癌、ブドウ膜黒色腫、肉腫、前立腺癌、結腸癌、皮膚黒色腫、中皮腫、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸部癌、精巢胚細胞腫瘍、胸腺腫、甲状腺癌、腎細胞癌、腎臓腎乳頭細胞癌、副腎皮質癌、褐色細胞腫、食道癌、子宮癌肉腫、肺扁平上皮癌、膀胱尿路上皮癌（C e l l S y s t . 2 0 1 8 M a r 2 8 ; 6 (3) : 2 8 2 - 3 0 0 , e 2）から選択される固形癌の癌組織由来試料における、MYCC遺伝子増幅、MYCC遺伝子変異またはMYCC遺伝子染色体位置部位転位であってよい。
- [0038] 本発明の特に好適な実施形態では、前記遺伝子の特徴が、卵巢癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌の癌組織由来試料における、MYCC遺伝子増幅、MYCC遺伝子変異またはMYCC遺伝子染色体位置部位転位であってよい。
- [0039] 本発明の好適な実施形態では、前記遺伝子の特徴が、胃癌、肺癌、乳癌、肝細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、胆管癌、ブドウ膜黒色腫、肉腫、前立腺癌、結腸癌、皮膚黒色腫、中皮腫、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸部癌、精巢胚細胞腫瘍、副腎皮質癌、褐色細胞腫、食道癌、子宮癌肉腫、肺扁平上皮癌、膀胱尿路上皮癌（C e l l S y s t . 2 0 1 8 M a r

28 ; 6 (3) : 2 8 2 - 3 0 0 . e 2) から選択される固形癌の癌組織由来試料における、MYCN遺伝子増幅、MYCN遺伝子変異またはMYCN遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0040] 本発明の好適な実施形態では、前記遺伝子の特徴が、卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、神経芽腫、小細胞肺癌、胞巣状横紋筋肉腫、髄芽腫、多形膠芽腫、および網膜芽細胞腫から選択される固形癌の癌組織由来試料における、MYCN遺伝子増幅、MYCN遺伝子変異またはMYCN遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0041] 本発明の特に好適な実施形態では、前記遺伝子の特徴が、神経芽腫組織由来試料における、MYCN遺伝子増幅、MYCN遺伝子変異またはMYCN遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0042] 本発明の好適な実施形態では、前記遺伝子の特徴が、卵巣癌および、胃癌、肺癌、乳癌、肝細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、直腸癌、胆管癌、ブドウ膜黒色腫、肉腫、前立腺癌、結腸癌、皮膚黒色腫、中皮腫、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸部癌、精巣胚細胞腫瘍、胸腺腫、副腎皮質癌、食道癌、子宮癌肉腫、肺扁平上皮癌、膀胱尿路上皮癌 (Cell Syst. 2018 Mar 28 ; 6 (3) : 2 8 2 - 3 0 0 . e 2) から選択される固形癌の癌組織由来試料における、MYCL遺伝子増幅、MYCL遺伝子変異またはMYCL遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0043] 本発明の好適な実施形態では、前記遺伝子の特徴が、卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌から選択される固形癌の癌組織由来試料における、MYCL遺伝子増幅、MYCL遺伝子変異またはMYCL遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0044] 本発明のさらなる実施形態では、前記治療応答の予測結果にしたがい、固形癌の治療を必要とする対象に対し、化合物Aまたはその誘導体を用いた療法をおこなうことを含むものであってよい。前記療法は、化合物Aまたはその誘導体を、前記対象に投与することを含むものであってよい。また、前記療法は、化合物Aまたはその誘導体を単独投与することに加えて、他の薬剤

と組みあわせた併用投与および／または他の療法との併用療法を含むものであってもよい。

[0045] [バイオマーカー]

本発明のバイオマーカーは、固形癌対象における、前記化合物Aまたはその誘導体の療法に対する治療応答を予測するための、以下の(a)～(k)から選択される1つ以上のバイオマーカーである；

- (a) MYC遺伝子増幅、
- (b) MYC遺伝子変異、
- (c) MYC遺伝子染色体位置転位、
- (d) MYC mRNA量増加、
- (e) MYCタンパク質量増加、
- (f) EGFR遺伝子変異、
- (g) U2AF1遺伝子変異、
- (h) POLE遺伝子減少、
- (i) CDK12遺伝子減少、
- (j) ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および
- (k) MDM4エキソンスキップ変化。

[0046] 前記MYC遺伝子増幅、MYC遺伝子変異またはMYC遺伝子染色体位置部位転位はそれぞれ、各参照との比較により検出される。好ましくは、MYC遺伝子コピー数がMYC遺伝子コピー数参照と比較して増加している場合、前記MYC遺伝子の遺伝子配列がMYC遺伝子配列参照と比較して変化している場合、もしくは前記MYC遺伝子染色体位置部位がMYC遺伝子染色体位置部位参照と比較して転座している場合に、前記対象を、化合物Aまたはその誘導体に対して特に高い応答性を示す対象であると判断することができる。

[0047] 前記MYC遺伝子増幅は、参照と比較してコピー数の増加が観察されるものであればよく、かつ、これに限定されるものでないが、好ましくは、約1

、5倍以上の増加を示すものであってよい。また、これに限定されるものではないが、本発明の他の実施形態では、約2倍以上、約4倍以上、約10倍以上、あるいは約20倍以上の増加を示すものであってもよい。

[0048] 前記MYC遺伝子変異は、MYC遺伝子のゲノム領域内における一塩基変異（SNV）、複数塩基変異（MNV）、小さな挿入または欠失（Indel）、スプライス部位変異、遺伝子融合などの変異であってもよい。

[0049] 前記MYC遺伝子変異は、これに限定されるものではないが、好ましくは、MYCC Q37del、P59L、S146L、MYCN R45Rfs*86および/またはE445Kであってもよい。

[0050] 本発明の好適な実施形態において、前記MYC遺伝子はMYCC、MYCNおよびMYCLからなる群から選択することができる。

[0051] 前記MYC mRNA量の増加またはMYCタンパク質量の増加は、参照との比較により検出される。好ましくは、MYC mRNA量がMYC mRNA量参照と比較して増加している場合に、もしくはMYCタンパク質量がMYCタンパク質量参照と比較して増加している場合に、前記対象を化合物Aまたはその誘導体に対して特に高い応答性を示す対象であると判断することができる。

[0052] 前記MYC mRNA量の増加またはMYCタンパク質量増加は、MYC遺伝子増幅、MYC遺伝子変異またはMYC遺伝子染色体位置部位転位に起因するものであってよいが、これに限定されるものではない。

[0053] 前記U2AF1遺伝子変異は、参照との比較により検出される。好ましくは、前記U2AF1遺伝子の遺伝子配列がU2AF1遺伝子配列参照と比較して変化している場合に、前記対象を、化合物Aまたはその誘導体に対して特に高い応答性を示す対象であると判断することができる。

[0054] 前記U2AF1遺伝子変異は、当該遺伝子のゲノム領域内における一塩基変異（SNV）、複数塩基変異（MNV）、小さな挿入または欠失（Indel）、スプライス部位変異、遺伝子融合などの変異であってもよいが、好ましくは、S34F変異またはS34Y変異である。

- [0055] 前記EGFR遺伝子変異、POLE遺伝子減少、CDK12遺伝子減少、ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および／またはMDM4エキソンスキップ変化はそれぞれ、各参照との比較により検出される。好ましくは、前記EGFR遺伝子の遺伝子配列がEGFR遺伝子配列参照と比較して変化している場合、前記POLE遺伝子コピー数がPOLE遺伝子コピー数参照と比較して減少している場合、前記CDK12遺伝子コピー数がCDK12遺伝子コピー数参照と比較して減少している場合、ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子の遺伝子配列が、それぞれの対応する遺伝子配列参照と比較して変化している場合、および／または前記MDM4 mRNA配列がMDM4 mRNA配列参照と比較して変化している場合に、前記対象を化合物Aまたはその誘導体に対して特に高い応答性を示す対象であると判断することができる。
- [0056] 前記EGFR遺伝子変異、ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および／またはMDM4エキソンスキップ変化はそれぞれ、一塩基変異（SNV）、複数塩基変異（MNV）、小さな挿入または欠失（Indel）、スプライス変異、遺伝子融合などの変異、および／またはRNAスプライシング変化であってもよい。
- [0057] 前記POLE遺伝子減少またはCDK12遺伝子減少は、各参照との比較においてコピー数の減少が観察されるものであればよい。
- [0058] なお、前記バイオマーカーの検出に用いられる参照はいずれも、同一対象からの非癌組織由来試料から得られたものであるか、あるいは当該技術分野においてよく知られたデータベースから得られたものであってもよい。また、検出手法についても、当該技術分野においてよく知られた検出手法を用いることができ、これに限定されるものではないが、好ましくは、前述の検出手法を用いることができる。
- [0059] 前記対象は、これに限定されるものではないが、好ましくはヒト対象である。

[0060] 前記固形癌は、癌〔例、大腸癌（例、結腸癌、直腸癌、肛門癌、家族性大腸癌、遺伝性非ポリポーシス大腸癌、消化管間質腫瘍）、肺癌（例、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、悪性中皮腫）、中皮腫、膵臓癌（例、膵管癌、膵内分泌腫瘍）、咽頭癌、喉頭癌、食道癌、胃癌（例、乳頭腺癌、粘液性腺癌、腺扁平上皮癌）、十二指腸癌、小腸癌、乳癌（例、浸潤性乳管癌、非浸潤性乳管癌、炎症性乳癌）、卵巢癌（例、上皮性卵巢癌、性腺外胚細胞腫瘍、卵巣性胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍）、精巣腫瘍、前立腺癌（例、ホルモン依存性前立腺癌、ホルモン非依存性前立腺癌、去勢療法抵抗性前立腺癌）、肝臓癌（例、肝細胞癌、原発性肝癌、肝外胆管癌）、甲状腺癌（例、甲状腺髄様癌）、腎臓癌（例、腎細胞癌（例、淡明細胞型腎細胞癌）、腎盂と尿管の移行上皮癌）、子宮癌（例、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫）、妊娠性絨毛癌、脳腫瘍（例、髓芽細胞腫、神経膠腫、松果体星細胞腫瘍、毛様細胞性星細胞腫、びまん性星細胞腫、退形成性星細胞腫、下垂体腺腫）、網膜芽細胞腫、皮膚癌（例、基底細胞腫、悪性黒色腫）、肉腫（例、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、軟部肉腫、紡錘細胞肉腫、明細胞肉腫）、悪性骨腫瘍、膀胱癌、原発不明癌〕のうちの1つ以上から選択することができる。

[0061] 本発明の好適な実施形態では、前記固形癌が、癌腫、横紋筋肉腫、例えば、胞巣状横紋筋肉腫（骨、腱、軟骨、筋肉、脂肪（*f a t*）、線維、血管、脂肪（*a d i p o s e*）、および／または結合組織に由来する肉腫を含む）などの肉腫、明細胞肉腫、神経芽腫、髓芽腫、星状細胞腫、多形膠芽腫、網膜芽細胞腫、腺扁平上皮癌、癌肉腫、混合性中胚葉腫瘍、奇形癌、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腺癌、および肺扁平上皮癌を含む）、乳癌（転移性乳癌を含む）、消化器癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、卵巢癌、膵臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、膠芽腫、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌（例えば、ウィルム腫瘍）、前立腺癌、甲状腺癌、ならびに頭頸部癌のうちの1つ以上から選択することができる。

[0062] 本発明の好適な実施形態では、卵巢癌および、胃癌、肺癌、乳癌、肝細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、直腸癌、胆管癌、膵臓癌、ブドウ膜黒色腫、肉腫、

前立腺癌、結腸癌、皮膚黒色腫、中皮腫、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸部腺癌、精巣胚細胞腫瘍、胸腺腫、甲状腺癌、腎細胞癌、腎臓腎乳頭細胞癌、副腎皮質癌、褐色細胞腫、食道癌、子宮癌肉腫、肺扁平上皮癌、膀胱尿路上皮癌（Cell Syst. 2018 Mar 28; 6（3）：282-300, e2）から選択される固形癌における、バイオマーカーとしてのMYCC遺伝子増幅、MYCC遺伝子変異またはMYCC遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0063] 本発明の特に好適な実施形態では、卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌における、バイオマーカーとしてのMYCC遺伝子増幅、MYCC遺伝子変異またはMYCC遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0064] また、本発明の他の好適な実施形態では、胃癌、肺癌、乳癌、肝細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、胆管癌、ブドウ膜黒色腫、肉腫、前立腺癌、結腸癌、皮膚黒色腫、中皮腫、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸部腺癌、精巣胚細胞腫瘍、副腎皮質癌、褐色細胞腫、食道癌、子宮癌肉腫、肺扁平上皮癌、膀胱尿路上皮癌（Cell Syst. 2018 Mar 28; 6（3）：282-300, e2）から選択される固形癌における、バイオマーカーとしてのMYCN遺伝子増幅、MYCN遺伝子変異またはMYCN遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0065] 本発明の好適な実施形態では、卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、神経芽腫、小細胞肺癌、胞巣状横紋筋肉腫、髄芽腫、多形膠芽腫、および網膜芽細胞腫から選択される固形癌における、バイオマーカーとしてのMYCN遺伝子増幅、MYCN遺伝子変異またはMYCN遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0066] 本発明の特に好適な実施形態では、神経芽腫における、バイオマーカーとしてのMYCN遺伝子増幅、MYCN遺伝子変異またはMYCN遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0067] また、本発明の他の好適な実施形態では、卵巣癌および、胃腺癌、肺腺癌、乳癌、肝細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、直腸腺癌、胆管癌、ブドウ膜黒色腫

、肉腫、前立腺腺癌、結腸腺癌、皮膚黒色腫、中皮腫、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸部腺癌、精巣胚細胞腫瘍、胸腺腫、副腎皮質癌、食道癌、子宮癌肉腫、肺扁平上皮癌、膀胱尿路上皮癌 (Cell Syst. 2018 Mar 28; 6 (3) : 282-300. e2) から選択される固形癌における、バイオマーカーとしてのMYCL遺伝子増幅、MYCL遺伝子変異またはMYCL遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0068] 本発明の好適な実施形態では、卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌から選択される固形癌における、バイオマーカーとしてのMYCL遺伝子増幅、MYCL遺伝子変異またはMYCL遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0069] 本発明のバイオマーカーは、前記化合物Aまたはその誘導体の療法に対する治療応答を予測するための、バイオマーカーとして用いることができる。

[0070] [医薬組成物]

本発明の医薬組成物は、前記化合物Aまたはその誘導体を有効成分として含む、CLK阻害に対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴を有する固形癌を治療するための医薬組成物である。

[0071] 前記遺伝子の特徴は、以下(a)～(k)の1つ以上から選択されてもよい；

- (a) MYC遺伝子増幅、
- (b) MYC遺伝子変異、
- (c) MYC遺伝子染色体位置転位、
- (d) MYC mRNA量増加、
- (e) MYCタンパク質量増加、
- (f) EGFR遺伝子変異、
- (g) U2AF1変異、
- (h) POLE遺伝子減少、
- (i) CDK12遺伝子減少、
- (j) ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から

選択される遺伝子変異および

(k) MDM4 エキソンスキップ変化。

前記MYC遺伝子増幅、MYC遺伝子変異またはMYC遺伝子染色体位置部位転位はそれぞれ、各参照との比較により検出される。

[0072] 前記MYC遺伝子増幅は、参照と比較してコピー数の増加が観察されるものであればよく、かつ、これに限定されるものでないが、好ましくは、約1.5倍以上の増加を示すものであってよい。また、これに限定されるものでないが、本発明の他の実施形態では、約2倍以上、約4倍以上、約10倍以上、あるいは約20倍以上の増加を示すものであってもよい。

[0073] 前記MYC遺伝子変異は、MYC遺伝子のゲノム領域内における一塩基変異(SNV)、複数塩基変異(MNV)、小さな挿入または欠失(Indel)、スプライス部位変異、遺伝子融合などの変異であってもよい。

[0074] 前記MYC遺伝子変異は、これに限定されるものではないが、好ましくは、MYCC Q37del、P59L、S146L、MYCN R45Rfs*86および／またはE445Kであってもよい。

[0075] 本発明の好適な実施形態において、前記MYC遺伝子はMYCC、MYCNおよびMYCLからなる群から選択することができる。

[0076] 前記MYC mRNA量および／またはMYCタンパク質量の増加は、参照との比較により検出される。

[0077] 前記MYC mRNA量および／またはMYCタンパク質量の増加は、これに限定されるものではないが、MYC遺伝子増幅、MYC遺伝子変異またはMYC遺伝子染色体位置部位転位に起因するものであってよい。

[0078] 前記U2AF1遺伝子変異は、参照との比較により検出される。

[0079] 前記U2AF1遺伝子変異は、当該遺伝子のゲノム領域内における一塩基変異(SNV)、複数塩基変異(MNV)、小さな挿入または欠失(Indel)、スプライス部位変異、遺伝子融合などの変異であってもよいが、好ましくは、S34F変異またはS34Y変異である。

[0080] 前記EGFR遺伝子変異、POLE遺伝子減少、CDK12遺伝子減少、

A T R X、A T R、G N A QおよびH I S T 1 H 3 Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および／またはMDM4エキソンスキップ変化はそれぞれ、各参照との比較により検出される。

- [0081] 前記E G F R遺伝子変異、A T R X、A T R、G N A QおよびH I S T 1 H 3 Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および／またはMDM4エキソンスキップ変化はそれぞれ、一塩基変異（S N V）、複数塩基変異（M N V）、小さな挿入または欠失（I n d e l）、スプライス部位変異、遺伝子融合などの変異、および／またはR N Aスプライシング変化であってもよい。
- [0082] 前記P O L E遺伝子減少またはC D K 1 2遺伝子減少は、参照との比較において減少が観察されるものであればよい。
- [0083] なお、前記遺伝子の特徴を固形癌において検出するために用いられる参照は、いずれも、同一対象からの非癌組織由来試料から得られたものであるか、あるいは当該技術分野においてよく知られたデータベースから得られたものであってもよい。また、検出手法についても、当該技術分野においてよく知られた検出手法を用いることができ、これに限定されるものではないが、好ましくは、前述の検出手法を用いることができる。
- [0084] 前記固形癌は、癌〔例、大腸癌（例、結腸癌、直腸癌、肛門癌、家族性大腸癌、遺伝性非ポリポーシス大腸癌、消化管間質腫瘍）、肺癌（例、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、悪性中皮腫）、中皮腫、膵臓癌（例、膵管癌、膵内分泌腫瘍）、咽頭癌、喉頭癌、食道癌、胃癌（例、乳頭腺癌、粘液性腺癌、腺扁平上皮癌）、十二指腸癌、小腸癌、乳癌（例、浸潤性乳管癌、非浸潤性乳管癌、炎症性乳癌）、卵巣癌（例、上皮性卵巣癌、性腺外胚細胞腫瘍、卵巣性胚細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍）、精巣腫瘍、前立腺癌（例、ホルモン依存性前立腺癌、ホルモン非依存性前立腺癌、去勢療法抵抗性前立腺癌）、肝臓癌（例、肝細胞癌、原発性肝癌、肝外胆管癌）、甲状腺癌（例、甲状腺髄様癌）、腎臓癌（例、腎細胞癌（例、淡明細胞型腎細胞癌）、腎盂と尿管の移行上皮癌）、子宮癌（例、子宮頸部癌、子宮体部癌、子宮肉腫）、妊娠性絨毛癌、脳腫瘍（例、髄芽細胞腫、神経膠腫、松果体星細胞腫瘍、毛様細胞

性星細胞腫、びまん性星細胞腫、退形成性星細胞腫、下垂体腺腫）、網膜芽細胞腫、皮膚癌（例、基底細胞腫、悪性黒色腫）、肉腫（例、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、軟部肉腫、紡錘細胞肉腫、明細胞肉腫）、悪性骨腫瘍、膀胱癌、原発不明癌]のうちの1つ以上から選択することができる。

[0085] 本発明の好適な実施形態では、前記固形癌は、癌腫、横紋筋肉腫、例えば、胞巣状横紋筋肉腫（骨、腱、軟骨、筋肉、脂肪（f a t）、線維、血管、脂肪（a d i p o s e）、および／または結合組織に由来する肉腫を含む）などの肉腫、明細胞肉腫、神経芽腫、髓芽腫、星状細胞腫、多形膠芽腫、網膜芽細胞腫、腺扁平上皮癌、癌肉腫、混合性中胚葉腫瘍、奇形癌、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腺癌、および肺扁平上皮癌を含む）、乳癌（転移性乳癌を含む）、消化器癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、卵巢癌、脾臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、膠芽腫、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌（例えば、ウィルム腫瘍）、前立腺癌、甲状腺癌、ならびに頭頸部癌のうちの1つ以上から選択することができる。

[0086] 本発明の好適な実施形態では、卵巢癌および、胃癌、肺癌、乳癌、肝細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、直腸癌、胆管癌、脾臓癌、ブドウ膜黒色腫、肉腫、前立腺癌、結腸癌、皮膚黒色腫、中皮腫、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸部腺癌、精巢胚細胞腫瘍、胸腺腫、甲状腺癌、腎細胞癌、腎臓腎乳頭細胞癌、副腎皮質癌、褐色細胞腫、食道癌、子宮癌肉腫、肺扁平上皮癌、膀胱尿路上皮癌（C e l l S y s t . 2 0 1 8 M a r 2 8 ; 6 （ 3 ） : 2 8 2 - 3 0 0 . e 2）から選択される固形癌においてみられる、M Y C C 遺伝子増幅、M Y C C 遺伝子変異またはM Y C C 遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0087] 本発明の特に好適な実施形態では、卵巢癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌においてみられる、M Y C C 遺伝子増幅、M Y C C 遺伝子変異またはM Y C C 遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0088] また、本発明の他の好適な実施形態では、胃癌、肺癌、乳癌、肝細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、胆管癌、ブドウ膜黒色腫、肉腫、前立腺癌、結腸癌、皮

膚黒色腫、中皮腫、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸部腺癌、精巢胚細胞腫瘍、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、褐色細胞腫、食道癌、子宮癌肉腫、肺扁平上皮癌、膀胱尿路上皮癌（Cell Syst. 2018 Mar 28; 6 (3) : 282-300. e2）から選択される固形癌においてみられる、MYCN遺伝子増幅、MYCN遺伝子変異またはMYCN遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0089] 本発明の好適な実施形態では、卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、神経芽腫、小細胞肺癌、胞巣状横紋筋肉腫、髓芽腫、多形膠芽腫、および網膜芽細胞腫から選択される固形癌においてみられる、MYCN遺伝子増幅、MYCN遺伝子変異またはMYCN遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0090] 本発明の特に好適な実施形態では、神経芽腫においてみられる、MYCN遺伝子増幅、MYCN遺伝子変異またはMYCN遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0091] また、本発明の他の好適な実施形態では、卵巣癌および、胃癌、肺癌、乳癌、肝細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、直腸癌、胆管癌、ブドウ膜黒色腫、肉腫、前立腺癌、結腸癌、皮膚黒色腫、中皮腫、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸部扁平上皮癌および子宮頸部腺癌、精巢胚細胞腫瘍、胸腺腫、副腎皮質癌、食道癌、子宮癌肉腫、肺扁平上皮癌、膀胱尿路上皮癌（Cell Syst. 2018 Mar 28; 6 (3) : 282-300. e2）から選択される固形癌においてみられる、MYCL遺伝子増幅、MYCL遺伝子変異またはMYCL遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0092] 本発明の好適な実施形態では、卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌から選択される固形癌においてみられる、MYCL遺伝子増幅、MYCL遺伝子変異またはMYCL遺伝子染色体位置部位転位であってよい。

[0093] 本発明の医薬組成物は、前記遺伝子の特徴を有する固形癌を治療するために用いることができる。また、本発明の医薬組成物は、単独投与のみならず、他の薬剤と組みあわせて、前記固形癌の治療を必要とする対象に投与する

ことができる。さらに、本発明の医薬組成物は、他の療法との併用療法に用いられるものであってもよい。

- [0094] 本明細書において、本発明の各態様にかかる一実施形態中で説明された各特定事項は、任意に組み合わせて新たな実施形態としてもよく、このような新たな実施形態も、本発明の各態様に包含され得るものとして理解されるべきである。

実施例

- [0095] 以下、本発明を実施例等によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例等により何ら限定されるものではない。

[0096] 1. 化合物Aの薬剤感受性評価 (in vitro法)

例1：種々の遺伝子変異における評価

本評価は、国際公開第2018/181863号に記載のMANO法の定法に基づいて、以下のとおり実施した。

- [0097] (1) 細胞株

HEK (Human Embryonic Kidney) 293細胞及びマウス3T3線維芽細胞は、ATCC (American Type Culture Collection) から入手し、10%FBSを補充したダルベッコ改変イーグル培地F-12 (DMEM-F12) (いずれもThermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で維持した。

- [0098] (2) ランダムバーコード配列を有するレトロウイルスベクターの構築

pcx4-bleoベクター (<https://www.addgene.org/vector-database/2309/>) のBamHI制限酵素サイトに60pbの塩基を挿入し、その後6bpのランダム配列を含むPrimerを用いて部位特異的変異導入を行い、バーコード配列を付加したpcx5-bleoを作製した。以下の表1に示す各遺伝子の野生型のcDNAを、pcx5-bleoにライゲーションした。また各変異体をコードするcDNAを、QuickChangeII Site-Direct

edMutagenesisKit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて作製し、pcx5-bello にライゲーションした。

[表1]

ACVR1	CCNE1	EZH2	KLF4	MYCN	PTEN	TSC2
AKT1	CDK4	GNA11	KRAS	MYOD1	RAC1	USP8
AKT2	CSF1R	GNAQ	MAP2K2	NFE2L2	RAF1	WT1
AKT3	CTNNB1	GNAS	MAP2K4	NKX2-1	RET	EGFR
ALK	DDR2	H3F3A	MAPK1	NRAS	RHOA	FGFR1
AR	EPAS1	HRAS	MDM2	NTRK1	SMO	FGFR2
ARAF	ERBB2	IDH1	MDM4	PDGFRA	STAT5B	FGFR3
BMPR1A	ERBB3	IDH2	MET	PIK3CA	TBL1XR1	MAP2K1
BRAF	ERBB4	JUN	MITF	PIK3CB	TERT	
CASP8	ESR1	KIT	MYCC	PLCG1	TP53	

[0099] (3) レトロウイルスの調製及び細胞株への形質導入

上記の通り調製した組換えプラスミドをパッケージングプラスミド (Takara Bio, Shiga, Japan) と共に HEK293 細胞に導入し、組換えレトロウイルス粒子を得た。フォーカス形成アッセイでは、 $4 \mu\text{g/mL}$ のポリブレン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて、3T3 細胞にエクトロピックな組換えレトロウイルスを 24 時間感染させ、5% の仔ウシ血清を補充した DMEM-F12 でさらに最大 2 週間培養した。細胞の形質転換は、位相差顕微鏡又はギムザ溶液による染色によって評価した。

[0100] (4) MANO 法による検出

細胞溶解物由来のゲノム DNA を、5'-TGCAAAGGACCTTACACAGTCCTG-3' 及び 5'-GACTCGTTGAAGGGTAGACTAGTC-3' のプライマーを用いる PCR によって、バーコード

配列を含む領域を増幅した。PCRの条件は以下の通りである。

初期変性：95℃で3分間

変性：95℃で15秒間

アニーリング：60℃で30秒間

伸長：72℃で60秒間

サイクル数：30

最終伸長：72℃で10分間

増幅後のPCR産物をAMPure beads (Beckman Coulter, Brea, CA) を用いて精製した。NEB Next Ultra DNA Library Prep Kit (NEB, Ipswich, MA) を用いて、製造業者の推奨に従ってシーケンシングライブラリを作製した。ライブラリの質をQubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) 及びAgilent 2200 Tape Station systemにより評価した。ライブラリをReagent Kit V2を用いるIllumina Miseq (300サイクル) によって配列決定し、150bpのペアエンドリードを作製した。これらのシーケンスリードは、バーコード配列を含む以下の配列：5'-CTAGACTGCCNNNNNNGGATCACTCT-3'

(ここで、Nは任意のヌクレオチドである) 及びその相補的配列を含んでいた。これらのバーコード配列のリード数を数えることによって各変異体の量を推定した。DMSO処理した細胞混合物を、各細胞クローンのシグナルのスケーリングのために、参照対照として用いた。したがって、各処理細胞株由来のシグナルは、 $100 \times (\text{リード数中央値}) / (\text{DMSO対照のリード数中央値})$ として算出される。リード数中央値は、独立した3回の実験におけるものである。

[0101] (5) 結果

上記リード数中央値に基づくシグナルを各導入した遺伝子ごとにまとめた(図1)。

リード数中央値が比較対照であるGFPまたはKRASG12Dに比べて、化合物AのIC90あるいはIC90値が低下する遺伝子群（IC90）を、それぞれ、以下の表2に示す。

[表2]

IC90	遺伝子	遺伝子変異/遺伝子増幅
	MYCC	WT
	MYCC	Q37del
	MYCC	S146L

[0102] 以上の結果から、化合物Aは上記遺伝子の変異を有する細胞に対して、特に強い増殖抑制効果を示すことが確認された。

[0103] 例2：MYC遺伝子変異における評価

(1) 細胞株

HEK (Human Embryonic Kidney) 293細胞及びマウス3T3線維芽細胞は、ATCC (American Type Culture Collection) から入手し、10%FBSを補充したダルベッコ改変イーグル培地F-12 (DMEM-F12) (いずれもThermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で維持した。

[0104] (2) ランダムバーコード配列を有するレトロウイルスベクターの構築
例1で用いたベクターを用いた。

[0105] (3) レトロウイルスの調製及び細胞株への形質導入

上記の通り調製した組換えプラスミドをパッケージングプラスミド (Takara Bio, Shiga, Japan) と共にHEK293細胞に導入し、組換えレトロウイルス粒子を得た。フォーカス形成アッセイでは、4 μ g/mLのポリブレン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて、3T3細胞にエクトロピックな組換えレトロウ

イルスを24時間感染させ、5%の仔ウシ血清を補充したDMEM-F12でさらに最大2週間培養した。細胞の形質転換は、位相差顕微鏡又はギムザ溶液による染色によって評価した。

[0106] (4) 細胞株樹立

スクリーニングで見出されたMYCC WT、Q37del、P59L、S146L、MYCN WT、P45Rfs*86、E445KまたはEGFR L858R、あるいは比較対象としてKRASG12Dをそれぞれ個別に遺伝子導入して樹立したNIH3T3細胞株を用いて、*in vitro*増殖抑制試験を行った。

[0107] (5) 細胞生存評価

上記4の細胞株(1000個/90 μ L)を96ウェルプレートの各ウェルに播種後、速やかに種々の終濃度になるようにDMSOのみ、または化合物A(0.3nM、1nM、3nM、10nM、30nM、100nM、300nM、1000nMおよび3000nM)を含む培地を10 μ L添加した。添加してから3日間の培養後に、以下の細胞生存率の評価を行った。CellTiter-Gloを使用して細胞内アデノシン三リン酸(ATP)を測定することにより、各処理による細胞生存率の評価を行った。すなわち、1ウェルあたり100 μ LのCellTiter-Glo液を各ウェルに加え、15分間室温でインキュベートしたのち、化学発光を測定した。得られたデータから各組み合わせの平均値を算出し、DMSOのみ処理の細胞における発光強度を100%として、各薬剤単独あるいは併用での細胞生存率の濃度反応曲線を作成した。

[0108] (6) 結果

MYCC WT、Q37del、P59L、S146L、MYCN WT、P45Rfs*86、E445Kをそれぞれ個別に遺伝子導入して樹立したNIH3T3細胞株のIC50値は、比較対象としてKRASG12Dを遺伝子導入して樹立したNIH3T3細胞株よりも低い値となった。以上の結果から、化合物AはMYCC WT、Q37del、P59L、S146

L、MYCN WT、P45Rfs*86、E445Kの過剰発現、あるいは遺伝子異常を有する細胞に対して特に強い増殖抑制効果を示すことが確認された（図2）。

一方、EGFR L858R、MYCC S146L、MYCN E445Kをそれぞれ個別に遺伝子導入して樹立したNIH3T3細胞株のIC50値は、比較対象としてKRAS G12Dを遺伝子導入して樹立したNIH3T3細胞株よりも低い値となった。以上の結果から、化合物Aは上記遺伝子変異を有する細胞に対して特に強い増殖抑制効果を示すことが確認された（図3）。

[0109] 例3：MYCC遺伝子増幅における評価

（1）細胞株

NCI-H82細胞株、AU565細胞株、NCI-H3122細胞株、PC-9細胞株をATCC（American Type Culture Collection）から入手し、10%FBSを補充したダルベッコ改変イーグル培地F-12（DMEM-F12）（いずれもThermo Fisher Scientific, Waltham, MA）で維持した。

[0110] （2）各細胞株のMYCC遺伝子増幅

Cancer Cell Line Encyclopediaのデータベースより、NCI-H82細胞株、AU565細胞株におけるMYCC遺伝子増幅はそれぞれ18.9あるいは9.7であった。NCI-H3122細胞株、PC-9細胞株において遺伝子増幅は確認されなかった。

[0111] （3）細胞生存評価

MYCC遺伝子増幅が見られた上記2種の細胞株（1000個/90 μ L）を96ウェルプレートの各ウェルに播種後、速やかに種々の終濃度になるようにDMSOのみ、または化合物A（1nM、3nM、10nM、30nM、100nM、300nM、1000nM、3000nMおよび10000nM）を含む培地を10 μ L添加した。添加してから3日間の培養後に、

以下の細胞生存率の評価を行った。

CellTiter-Gloを使用して細胞内アデノシン三リン酸（ATP）を測定することにより、各処理による細胞生存率の評価を行った。すなわち、1ウェルあたり100 μ LのCellTiter-Glo液を各ウェルに加え、15分間室温でインキュベートしたのち、化学発光を測定した。得られたデータから各組み合わせの平均値を算出し、DMSOのみ処理の細胞における発光強度を100%として、各薬剤単独あるいは併用での細胞生存率の濃度反応曲線を作成した。

[0112] （4）結果

MYCCの遺伝子増幅を有するNCI-H82細胞株、AU565細胞株におけるIC50値は、遺伝子増幅を有さないNCI-H3122細胞株、PC-9細胞株よりも低い値となった。この結果から、化合物AはMYCCの過剰発現を有する細胞に対して、特に強い増殖抑制効果を示すことが確認された（図4）。

[0113] 例4：MYCN遺伝子増幅における評価

（1）細胞の培養

神経芽腫細胞株CHP-212、SK-N-BE（2）、SK-N-DZ、LN-18、U-87MG、SW1088はATCC（American Type Culture Collection）から入手し、10%FBSを補充したダルベッコ改変イーグル培地F-12（DMEM-F12）（いずれもThermo Fisher Scientific, Waltham, MA）を用いて5%CO₂、37℃の条件下で培養したものを使用した。

[0114] （2）細胞生存評価

上述の細胞株6種（いずれも4000個/90 μ L）を96ウェルプレートの各ウェルに播種後、速やかに種々の終濃度になるようにDMSOのみ、または化合物A（1nM、3nM、10nM、30nM、100nM、300nM、1000nM、3000nMおよび10000nM）を含む培地を

10 μ L 添加した。添加してから4日間の培養後に、以下の細胞生存率の評価を行った。

CellTiter-Gloを使用して細胞内アデノシン三リン酸 (ATP) を測定することにより、各処理による細胞生存率の評価を行った。すなわち、1ウェルあたり100 μ LのCellTiter-Glo液を各ウェルに加え、15分間室温でインキュベートしたのち、化学発光を測定した。得られたデータから各組み合わせの平均値を算出し、DMSOのみ処理の細胞における発光強度を100%として、各薬剤単独あるいは併用での細胞生存率の濃度反応曲線を作成した。

[0115] (3) データ解析

Graph Pad Prism software version 7.0 (GRAPH PAD software). を使用して、化合物Aについての半数阻害濃度 (IC50) を決定した。

[0116] (4) 結果

各細胞株における化合物A処置によるIC50の評価結果を表3に示す。化合物A処置した場合のIC50はMYCN遺伝子増幅が認められない細胞株に比べて、MYCN遺伝子増幅が認められる細胞株の方がいずれも低い値を示した。以上の結果から、化合物AはMYCN遺伝子増幅を有する細胞株においてより強い増殖抑制効果を発揮することが確認された。

[0117]

[表3]

各神経芽腫細胞株におけるMYCN遺伝子増幅、及び半数阻害濃度(IC50)

細胞株	MYCN遺伝子増幅	IC50値(nmol/L)
CHP-212	有	65.9
SK-N-BE(2)	有	86.6
SK-N-DZ	有	25.4
LN-18	無	106.3
U-87MG	無	101.1
SW1088	無	152.1

1.1. 種々の遺伝子変異のマウス皮下移植モデルに対する化合物Aの抗腫瘍効果の評価 (in vivo法)

例5：ヒト癌患者由来腫瘍のマウス皮下移植モデルにおけるMYCC遺伝子増幅および化合物Aの抗腫瘍効果の評価

(1) マウス皮下移植モデル

国立がん研究センター研究所により樹立された各種ヒト癌患者由来腫瘍のマウス皮下移植モデルの中から、本試験では卵巣がん、肺がん、胃がん、乳がんおよび大腸がんの5がん種合計7モデルを用いて検討した。これらのモデルはMYCC遺伝子増幅の測定結果がこれまでに国立がん研究センターにおいて取得されている。

[0118] (2) 抗腫瘍作用の評価

6～11週齢の雌NOGマウスの腹部皮下に2～3mm角の腫瘍片を皮下移植した。腫瘍体積の測定にはノギスを用い、腫瘍体積＝(腫瘍長径×腫瘍短径×腫瘍短径)／2の計算式で算出した。腫瘍体積が約140～230mm³に到達した時点で、1群あたり2～4匹、2群に群分けを実施した。化合物Aは25mg/kgの用量で1日2回、週2回のスケジュールで14あるいは28日間、間欠的に経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロー

ス溶液を経口投与した。群分け後、腫瘍体積の測定は週2回実施した。抗腫瘍効果の指標には14あるいは28日目のT/C(%)を用いた。

$T/C(\%) = (\text{薬物投与群の腫瘍体積の変化量}) / (\text{対照群の腫瘍体積の変化量}) \times 100$

(3) 結果

5がん種（卵巣がん、肺がん、胃がん、乳がんおよび大腸がん）のヒト癌患者由来腫瘍のマウス皮下移植モデルにおける化合物Aの抗腫瘍作用の評価結果を、以下の表4に示す。

[表4]

NO	がん種	PDXモデル名	MYCC CNV	T/C(%)
1	卵巣がん	NCC_J-PDX_0569TG5	8	-71.1
2	胃がん	NCC_J-PDX_0009TG4	3	-44.3
3	卵巣がん	NCC_J-PDX_0735TG5	3	-32.8
4	非小細胞肺がん	NCC_J-PDX_0189TG4	4	-28.0
5	乳がん	NCC_J-PDX_0047TG4	2	-27.8
6	大腸がん	NCC_J-PDX_0293TG5	2	-26.1
7	非小細胞肺がん	NCC_J-PDX_0034TG4	2	-9.9

(表中、「MYCC CNV」は、MYCC遺伝子増幅の測定値を示す。)

[0119] 化合物Aは本試験で用いたMYCC遺伝子が増幅したモデル(MYCC CNV>2)においては、T/Cが-71.1%、-44.3%、-32.8%および-28.0%(平均-44.1%)の抗腫瘍作用を示したのに対し、c-Myc遺伝子増幅を有しないモデル(MYCC CNV=2)においてはT/Cが-27.8%、-26.1%および-9.9%(平均-21.3%)の抗腫瘍作用を示した。

[0120] 上記結果から、化合物AはMYCC遺伝子が増幅した腫瘍において、より強い抗腫瘍効果を発揮することが確認された。

[0121] 以上のことから、MYCC遺伝子の増幅は、化合物Aの治療応答を予測するためのバイオマーカーとして有用であることが示された。

[0122] 例6：MMTV-MYCCあるいはMMTV-HRASを有するマウス由来腫瘍のマウス皮下移植モデルに対する化合物Aの抗腫瘍効果の評価

(1) マウス皮下移植モデルでの抗腫瘍作用の評価

MMTV-MYCCを有するマウス由来腫瘍BTG-M605あるいはMMTV-HRASを有するマウス由来腫瘍BTG-R502（どちらもShanghai Medicilon Inc.）の腫瘍片を雌ヌードマウスの腹部皮下に皮下移植した。腫瘍体積の測定にはノギスを用い、腫瘍体積＝（腫瘍長径×腫瘍短径×腫瘍短径）／2の計算式で算出した。腫瘍体積が約180mm³に到達した時点で、1群あたり8匹、4群に群分けを実施した。化合物Aは12.5、25および50mg/kgの用量で1日2回、週2回（0、4、7および11日目）のスケジュールで14日間、間欠的に経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース溶液を経口投与した。群分け後、腫瘍体積の測定は週2回実施した。抗腫瘍効果の指標には14日目のT/C（%）を用いた。

$$T/C(\%) = (\text{薬物投与群の腫瘍体積の変化量}) / (\text{対照群の腫瘍体積の変化量}) \times 100$$

(2) 結果

MMTV-MYCCを有するマウス由来腫瘍BTG-M605およびMMTV-HRASを有するマウス由来腫瘍BTG-R502のマウス皮下移植モデルにおける化合物Aの抗腫瘍作用の評価結果をそれぞれ、以下の表5、6に示す。

[表5]

MMTV-MYCCモデルでの抗腫瘍効果

群	化合物名	T/C(%)
1	対照群	-
2	化合物A 12.5mg/kg	29.1
3	化合物A 25mg/kg	19.6
4	化合物A 50mg/kg	9.1

[表6]

MMTV-HRASモデルでの抗腫瘍効果

群	化合物名	T/C(%)
1	対照群	-
2	化合物A 12.5mg/kg	71.1
3	化合物A 25mg/kg	54.4
4	化合物A 50mg/kg	14.4

化合物Aを12.5、25および50mg/kgの用量で経口投与した群の14日目のT/Cは、BTG-M605においてはそれぞれ29.1%、19.6%および9.1%であり、BTG-R502においてはそれぞれ71.1%、54.4%および14.4%であったことから、両モデルにおいて用量依存的な抗腫瘍活性が認められた。

さらに上記2モデルでの結果を比較すると、化合物AはMyc遺伝子増幅を有する腫瘍においてより強い抗腫瘍効果を発揮することが確認された。

以上のことから、MYCC遺伝子増幅は化合物Aの治療応答を予測するためのバイオマーカーとして有用である。

[0123] 例7：U2AF1変異を有するヒト非小細胞肺癌患者腫瘍のマウス皮下移植モデルに対する化合物Aの抗腫瘍効果の評価

(1) マウス皮下移植モデルでの抗腫瘍作用の評価

U2AF1遺伝子にS34F変異を有するヒト非小細胞肺癌患者腫瘍LU5231(Crown Biosciences)をPBS:Cultrex ECM=1:1に懸濁し、6~8週齢の雌NODSCIDマウスの腹部皮下に 1.5×10^5 細胞/匹で皮下移植した。腫瘍体積の測定にはノギスを用い、腫瘍体積=(腫瘍長径×腫瘍短径×腫瘍短径)/2の計算式で算出した。腫瘍体積が約160mm³に到達した時点で、1群あたり9匹、3群に群分けを実施した。化合物Aは6.25および12.5mg/kgの用量で1日2回、週2回(1、4、8、11、15および18日目)のスケジュールで2

1日間、間欠的に経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース溶液を経口投与した。群分け後、腫瘍体積の測定は週2回実施した。抗腫瘍効果の指標には21日目のT/C(%)を用いた。

また、U2AF1遺伝子に変異を有しないヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H1048(ATCC)をHBSS:Matrigel=1:1に懸濁し、6週齢の雌ヌードマウスの腹部皮下に 4×10^6 細胞/匹で皮下移植した。腫瘍体積が約150mm³に到達した時点で、1群あたり5匹、3群に群分けを実施した。化合物Aは25および50mg/kgの用量で1日2回、週2回(0、3、7および10日目)のスケジュールで14日間、間欠的に経口投与した。対照群には0.5%メチルセルロース溶液を経口投与した。群分け後、腫瘍体積の測定は週2回実施した。抗腫瘍効果の指標には14日目のT/C(%)を用いた。

$T/C(\%) = (\text{薬物投与群の腫瘍体積の変化量}) / (\text{対照群の腫瘍体積の変化量}) \times 100$

(2) 結果

U2AF1遺伝子にS34F変異を有するヒト非小細胞肺癌患者腫瘍移植モデルLU5231、およびU2AF1遺伝子にS34F変異を有しないヒト小細胞肺癌細胞株NCI-H1048のマウス皮下移植モデルにおける化合物Aの抗腫瘍作用の評価結果をそれぞれ、以下の表7、8に示す。

[表7]

LU5231モデルでの抗腫瘍効果

群	化合物名	T/C(%)
1	対照群	-
2	化合物A 6.25mg/kg	7.0
3	化合物A 12.5mg/kg	-24.2

[表8]

NCI-H1048モデルでの抗腫瘍効果

群	化合物名	T/C(%)
1	対照群	-
2	化合物A 25mg/kg	35.0
3	化合物A 50mg/kg	6.2

[0124] LU5231モデルで化合物Aを6.25および12.5mg/kgの用量で経口投与した群の21日目のT/Cはそれぞれ7.0%および-24.2%であり、腫瘍退縮を伴う用量依存的な強い抗腫瘍活性が認められた。一方で、NCI-H1048モデルで化合物Aを25および50mg/kgの用量で経口投与した群の14日目のT/Cはそれぞれ35.0%および6.2%であった。

以上の結果から、化合物AはU2AF1遺伝子にS34F変異を有する腫瘍において、当該変異を有しない腫瘍の場合と比較してより強い抗腫瘍効果を発揮することが確認された。

以上のことから、U2AF1遺伝子へのS34F変異は、化合物Aの治療応答を予測するためのバイオマーカーとして有用であることが示された。

[0125] 1.1.1. がん関連遺伝子の変異解析

例8: OncoPrint Comprehensive Assay v3によるがん関連遺伝子の変異解析

本解析は、進行・再発又は難治性悪性腫瘍に対する化合物Aの第I相臨床試験において、国立がん研究センター治験審査委員会によって承認されたプロトコルに従って、インフォームドコンセントが得られた症例の腫瘍組織検体を取得し、OncoPrint Comprehensive Assay v3によるがん関連遺伝子の変異解析を以下の手順で実施した。

[0126] (1) シーケンス解析

測定検体からRecoverAll (商標) Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ther

mo Fisher Scientific) を用いて核酸抽出を行った。DNAはQubit (商標) 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) による蛍光定量法及びStep One Plus (商標) Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) によるqPCR定量法で測定し、RNAはQubit (商標) 4 Fluorometerによる蛍光定量法のみで測定し、核酸濃度と核酸量を定量した。抽出されたDNA及びRNAを使用し、Oncomine (商標) Comprehensive Assay v3M (Thermo Fisher Scientific) を使用してシーケンスライブラリーの作成を行った。RNA用のライブラリ調製にあたっての逆転写には、Ion Torrent (商標) NGS Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用した。シーケンスは、Ion Gene Studio (商標) S5 Plus Sequencer (Thermo Fisher Scientific) にて行った。シーケンスにより取得されたデータからIon Reporter (商標) Server System (Thermo Fisher Scientific) によりコピー数変異 (CNV)、一塩基変異 (SNV)、複数塩基変異 (MNV)、挿入／欠失 (Indel)、エキソンスキップ変化などの変異が同定された。

[0127] (2) 化合物Aによる抗腫瘍効果

解析を行った各症例の最良総合効果は、部分奏効 (Partial Response; PR) が卵巣がんで2例あり、その他は安定 (Stable Disease; SD) 7例、進行 (Progressive Disease; PD) 5例であった。

これら14症例のうち投与初日から最終投与日までの日数 (Treatment period) が168日 (28日／サイクル×6サイクル) を超えた症例は3例であった。3例のうち2例は卵巣がんのPR例であり、もう

1例は同じく卵巣がんのSD例であった。これらの3例（症例A：最良総合効果はSD、Treatment periodは186日、症例B：最良総合効果はPR、Treatment periodは193日、症例C：最良総合効果はPR、Treatment periodは387日）においては強い治療効果が認められたと考え、各変異との相関を解析した。

[0128] (3) MYCC、POLE、CDK12のCNVとの相関解析

(i) MYCCのCNV

強い治療効果が認められた卵巣がん3例のMYCCのCNVは、症例Aで6.49、症例Bで6.24、症例Cで4.99となり、3例とも閾値である3以上であるのでCNVの増幅があると考えられた。それ以外では、横行結腸がんの1例（最良総合効果はSD、Treatment periodは144日）にて4.02となりCNVの増幅が認められた。一方、強い治療効果が認められなかった卵巣がんの症例は1例（最良総合効果はPD、Treatment periodは11日）あり、そのMYCCのCNVは、2.58となり閾値である3以上とはならなかった。同様に強い治療効果が認められなかったその他の症例において閾値である3以上となった症例はなく、MYCCのCNV増幅が化合物Aの有効性を予測しうる可能性が示唆された。なお、これらのCNVは、いずれもデータ解析時のFilterがPASSまたはGAINであり、確度の高いデータと考えられる。

[0129] (ii) POLEのCNV

強い治療効果が認められた卵巣がん3例のPOLEのCNVの90%信頼区間の上限（95%点）は、症例Cで0.84、症例Aで1.47、症例Bで1.94となり、3例とも閾値となる2未満であるので、CNVの減少があると考えられた。一方、強い治療効果が認められなかった卵巣がん1例においては、その90%信頼区間の上限（95%点）は3.01（最良総合効果はPD、Treatment periodは11日）であり、閾値である2未満とはならなかった。同様に強い治療効果が認められなかったその他の10症例において閾値である2未満となる症例はなく、POLEのCNV

の減少が化合物Aの有効性を予測しうる可能性が示唆された。なおこれらのCNVは、いずれもデータ解析時のFilterがPASSであり、確度の高いデータと考えられる。

[0130] (iii) CDK12のCNV

強い治療効果が認められた卵巣がん3例のCDK12のCNVの90%信頼区間の上限(95%点)は、症例Aで1.93、症例Cで1.94、症例Bで1.98となり、3例とも閾値である2未満であるので、CNVの減少があると考えられた。一方、強い治療効果が認められなかった卵巣がん1例においては、その90%信頼区間の上限(95%点)は4.22(最良総合効果はPD、Treatment periodは11日)であり、閾値である2未満とはならなかった。同様に強い治療効果が認められなかったその他の10症例において閾値である2未満となる症例はなく、CDK12のCNVの減少が化合物Aの有効性を予測しうる可能性が示唆された。なおこれらのCNVは、いずれもデータ解析時のFilterがPASSであり、確度の高いデータと考えられる。

[0131] (iv) 臨床的意義

これらの結果から、MYCCのCNV増幅、POLEのCNV減少、CDK12のCNV減少を確認することにより、CLK阻害薬である化合物Aの薬効を予測することが可能になると考えられた。

[0132] (4) ATRX、ATR、GNAQ、HIST1H3BのSNVとの相関解析

(i) ATRX、ATR、GNAQ、HIST1H3BのSNV

全症例のSNV、MNV、Indelから、一定のクオリティがあり(Coverageや%頻度(Frequency)、その他のクオリティを表す指標で選抜するとともに、検体によってはFFPEの脱アミノ化の影響も考慮し選抜した)、アミノ酸配列において変化を引き起こし、東アジア人におけるマイナーアレル頻度が低い、と考えられる変異を選抜した。それらの変異のうち強い治療効果が認められた卵巣がんのみ存在する変異は、

症例CにATR Xのp. Val936Leu、症例AにはATRのp. Thr2487AlaとGNAQのp. Ala171ValとHIST1H3Bのp. Arg84Serであった。これらの結果から、ATR X、ATR、GNAQおよび／またはHIST1H3Bは化合物Aの有効性と関連する機能を保持している可能性が示唆された。

[0133] (ii) 臨床的意義

これらの結果から、ATR X、ATR、GNAQおよび／またはHIST1H3BがSNVの変異などで正常な機能が損なわれることにより、CLK阻害薬である化合物Aの薬効を強める可能性があることが示唆された。

[0134] (5) MDM4 エキソンスキップ変化との相関解析

(i) MDM4 エキソンスキップ変化

MDM4のmRNAにおいて、Exon6がスキップしExon5とExon7の接続を検出するシーケンスリード数の、Exon1とExon2の接続を検出するシーケンスリード数に対する比率が、強い治療効果が認められた卵巣がん3例中2例のPR例において高かった。それぞれの比率は、症例Cで0.163、症例Bで0.127であり検討した14症例中で1番目、2番目に大きな値であった。

[0135] (ii) 臨床的意義

これらの結果から、MDM4のExon6がスキップしているバリエント(Variant)を確認することにより、CLK阻害薬である化合物Aの薬効を予測することが可能になると考えられた。

[0136] 例9: OncoPrint Comprehensive Assay v3によるCNVの再解析

例8のCNVの解析では、検体に混入している非腫瘍細胞の影響を取り除くために、腫瘍率で補正を行い、検体中の腫瘍細胞部分のCNVを推定している。したがって、精度の高い腫瘍率を求めることは、臨床腫瘍検体のCNVの解析にとって重要である。本再解析では、例8で腫瘍率を取得するために用いた病理切片と同じ切片から、改善された方法により各検体の腫瘍率を

取得した。さらにこれらの腫瘍率を用いて、例8で取得したシーケンスデータを解析し直すことで、新たに望ましいCNVを得た。以下に本再解析で得られたCNVと抗腫瘍効果の相関を示す。なお、症例A、B、Cはそれぞれ例8の症例A、B、Cと同一の症例である。

[0137] (1) MYCCのCNV

強い治療効果が認められた卵巣がん3例のMYCCのCNVは、症例Aで6.49、症例Bで7.65、症例Cで5.41となり、3例とも閾値である3以上であるのでCNVの増幅があると考えられた。それ以外では、横行結腸がんの1例（最良総合効果はSD、投与初日から最終投与日までの日数（Treatment period）は144日）にて4.02、胸腺腫の1例（最良総合効果はSD、Treatment periodは99日）にて4.25となり、これらの症例では強い治療効果が認められなかったものの、閾値である3以上であるのでCNVの増幅があると考えられた。一方、強い治療効果が認められなかった卵巣がんの症例は1例（最良総合効果はPD、Treatment periodは11日）あり、そのMYCCのCNVは2.58となり、閾値である3以上とはならなかった。同様に強い治療効果が認められなかったその他の8例において閾値である3以上となった症例はなかった。以上の結果から、強い治療効果が認められた症例では、例8と同様またはそれ以上にMYCCのCNVが増幅する傾向が認められ、MYCCのCNV増幅が化合物Aの有効性を予測しうる可能性が示唆された。なお、これらのCNVは、いずれもデータ解析時のFilterがPASSまたはGAINであり、確度の高いデータと考えられる。

[0138] (2) POLEのCNV

強い治療効果が認められた卵巣がん3例のPOLEのCNVの90%信頼区間の上限（95%点）は、症例Cで0.67、症例Aで1.47、症例Bで1.91となり、3例とも閾値となる2未満であるので、CNVの減少があると考えられた。一方、強い治療効果が認められなかった卵巣がん1例においては、その90%信頼区間の上限（95%点）は3.01（最良総合効

果はPD、Treatment periodは11日)であり、閾値である2未満とはならなかった。同様に強い治療効果が認められなかったその他の10例において閾値である2未満となる症例はなく、POLEのCNVの減少が化合物Aの有効性を予測しうる可能性が示唆された。なおこれらのCNVは、いずれもデータ解析時のFilterがPASSであり、確度の高いデータと考えられる。

[0139] (3) CDK12のCNV

強い治療効果が認められた卵巣がん3例のCDK12のCNVの90%信頼区間の上限(95%点)は、症例Aで1.93、症例Cで1.93、症例Bで1.97となり、3例とも閾値である2未満であるので、CNVの減少があると考えられた。一方、強い治療効果が認められなかった卵巣がん1例においては、その90%信頼区間の上限(95%点)は4.22(最良総合効果はPD、Treatment periodは11日)であり、閾値である2未満とはならなかった。同様に強い治療効果が認められなかったその他の10例において閾値である2未満となる症例はなく、CDK12のCNVの減少が化合物Aの有効性を予測しうる可能性が示唆された。なおこれらのCNVは、いずれもデータ解析時のFilterがPASSであり、確度の高いデータと考えられる。

[0140] (4) 臨床的意義

これらの結果から、本再解析においても例8でのCNVの解析と同様に、MYCCのCNV増幅、POLEのCNV減少、CDK12のCNV減少を確認することにより、CLK阻害薬である化合物Aの薬効を予測することが可能になると考えられた。

[0141] 例10: Oncomine Comprehensive Assay v3によるがん関連遺伝子の変異の追加解析

例8において解析を行った14症例とは別の4症例において、Oncomine Comprehensive Assay v3によるがん関連遺伝子の変異解析を実施した。本4症例も、進行・再発又は難治性悪性腫瘍に

対する化合物Aの第Ⅰ相臨床試験において、国立がん研究センター治験審査委員会によって承認されたプロトコルに従って、インフォームドコンセントが得られた症例の腫瘍組織検体を取得している。シーケンス解析は、例8と同じ方法で実施した。ただし、CNVの解析で使用する腫瘍率の算出法は例9の方法を使用した。

[0142] (1) 化合物Aによる抗腫瘍効果

追加で解析を行った4症例のうち2例に関しては投与回数が1回のみであり化合物Aの抗腫瘍効果との相関を解析するには不十分と考えられたため、残りの2例に関して化合物Aの抗腫瘍効果との相関の解析を行った。

この2例の最良総合効果は、SDが1例、PDが1例であった。このうちSDの1例は投与初日から最終投与日までの日数(Treatment period)が168日(28日/サイクル×6サイクル)を超えていた。明細胞肉腫であったこのSDの1例(症例D:最良総合効果はSD、Treatment periodは386日)は、強い治療効果が認められたと考え、各変異との相関を解析した。

[0143] (2) MYCC、POLE、CDK12のCNVとの相関解析

(i) MYCCのCNV

強い治療効果が認められた症例DのMYCCのCNVは、9.97となり閾値である3以上であり、CNVの大きい増幅があると考えられた。強い治療効果が認められなかったその他の1例では、閾値である3以上にはなかった。以上の結果から、本追加解析においても、MYCCのCNV増幅が化合物Aの有効性を予測しうる可能性が示唆された。なおこれらのCNVは、2症例のいずれにおいてもデータ解析時のFilterがPASSまたはGAINであり、確度の高いデータと考えられる。

(ii) POLEのCNV

強い治療効果が認められた症例D及び強い治療効果が認められなかったその他1例のPOLEのCNVの90%信頼区間の上限(95%点)は閾値である2未満とはなかった。これは、POLEのCNV減少が起こらなく

ても化合物Aが薬効を示す可能性があることを示しているが、P O L EのC N V減少が起こった場合にC L K阻害薬である化合物Aが薬効を示す可能性を否定する結果ではないと考えられた。なおこれらのC N Vは、いずれもデータ解析時のF i l t e rがP A S Sであり、確度の高いデータと考えられる。

(i i i) C D K 1 2 の C N V

強い治療効果が認められた症例D及び強い治療効果が認められなかったその他1例のC D K 1 2のC N Vの90%信頼区間の上限(95%点)は閾値である2未満とはならなかった。これは、C D K 1 2のC N V減少が起こらなくても化合物Aが薬効を示す可能性があることを示しているが、C D K 1 2のC N V減少が起こった場合にC L K阻害薬である化合物Aが薬効を示す可能性を否定する結果ではないと考えられた。なおこれらのC N Vは、いずれもデータ解析時のF i l t e rがP A S Sであり、確度の高いデータと考えられる。

(i v) 臨床的意義

例9と本追加解析の結果から、M Y C CのC N V増幅、P O L EのC N V減少、C D K 1 2のC N V減少を確認することにより、C L K阻害薬である化合物Aの薬効を予測することが可能になると考えられた。

[0144] (3) MDM4エキソンスkip変化との相関解析

(i) MDM4エキソンスkip変化

MDM4のmRNAにおいて、E x o n 6がスキップしE x o n 5とE x o n 7の接続を検出するシーケンスリード数の、E x o n 1とE x o n 2の接続を検出するシーケンスリード数に対する比率が、強い治療効果が認められた症例D及び強い治療効果が認められなかったその他の1例において、例8で示した強い治療効果の認められた2例のように大きな値にはならなかった。これは、大きな値にならずに化合物Aが薬効を示す可能性があることを示しているが、大きな値になった場合に化合物Aが薬効を示す可能性を否定する結果ではないと考えられた。

(i i) 臨床的意義

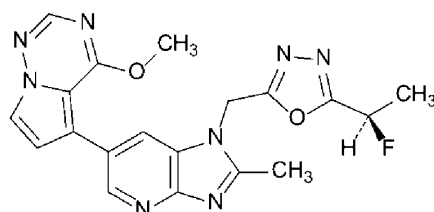
例 8 と本追加解析の結果から、MDM4 の E x o n 6 がスキップしているバリエント (V a r i a n t) を確認することにより、CLK 阻害薬である化合物 A の薬効を予測することが可能になると考えられた。

[0145] 本発明のバイオマーカーは、化合物 A などのCLK 阻害剤による肉腫を含む固形癌の治療における治療有効性を予測するためのバイオマーカーとして有用である。

請求の範囲

[請求項1] 固形癌対象における、下記式（I）：

[化1]



で示される、1-（（5-（1R）-1-フルオロエチル）-1,3,4-オキサジアゾール-5-イル）メチル-6-（4-メトキシピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル）-2-メチル-1H-イミダゾ[4,5-b]ピリジンまたはその誘導体に対する治療応答を予測するための方法であって、（1）前記対象からの癌組織由来試料中の、CLK阻害に対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴を検出すること、および（2）前記遺伝子の特徴に基づいて、前記対象の、前記式（I）で示される化合物またはその誘導体に対する応答の見込みを判断することを含む、方法。

[請求項2] 請求項1に記載の方法であって、

前記遺伝子の特徴が、以下；

- （a）MYC遺伝子増幅、
- （b）MYC遺伝子変異、
- （c）MYC遺伝子染色体位置転位、
- （d）MYC mRNA量増加、
- （e）MYCタンパク質量増加、
- （f）EGFR遺伝子変異、
- （g）U2AF1遺伝子変異、
- （h）POLE遺伝子減少、

(i) CDK12 遺伝子減少、
(j) ATRX、ATR、GNAQ および HIST1H3B の 1 つ以上から選択される遺伝子変異および
(k) MDM4 エキソンスキップ変化
からなる群から選択される 1 つ以上である、方法。

[請求項3]

請求項2に記載の方法であって、
(1) 前記対象からの癌組織由来試料中の、MYC 遺伝子増幅、MYC 遺伝子変異、MYC 遺伝子染色体位置転位、MYC mRNA 量増加および／またはMYC タンパク質量増加を検出すること、および
(2) MYC 遺伝子コピー数がMYC 遺伝子コピー数参照と比較して増加している場合、MYC 遺伝子配列がMYC 遺伝子配列参照と比較して変化している場合、MYC 遺伝子染色体位置部位がMYC 遺伝子染色体位置部位参照と比較して転座している場合、MYC mRNA 量がMYC mRNA 量参照と比較して増加している場合、および／またはMYC タンパク質量がMYC タンパク質量参照と比較して増加している場合に、前記対象が、前記式(1)で示される化合物またはその誘導体に対して特に高い応答性を示すものであると判断することを含む、方法。

[請求項4]

請求項3に記載の方法であって、前記MYC 遺伝子がMYCC、MYCN、およびMYCL から選択される、方法。

[請求項5]

請求項3に記載の方法であって、前記MYC 遺伝子コピー数が前記MYC 遺伝子コピー数参照と比較して約1.5倍以上の増加を示すか、あるいは前記MYC 遺伝子配列が参照と比較してMYCC Q37 del、P59L、S146L、MYCN R45R fs*86 および／またはE445Kであることを示す、方法。

[請求項6]

請求項3に記載の方法であって、前記MYC 遺伝子増幅またはMYC 遺伝子変異を、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (aCGH)、一塩基多型 (SNP) アレイ、コピー数多型 (CNV) シーケ

ンシング、次世代シーケンシング（NGS）またはマルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅（MLPA）によって検出することを含む、方法。

[請求項7] 請求項3に記載の方法であって、前記MYC遺伝子染色体位置部位の転位を、*in situ* ハイブリダイゼーション（ISH）、蛍光*in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）、次世代シーケンシング（NGS）または比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）によって検出することを含む、方法。

[請求項8] 請求項3に記載の方法であって、前記MYC mRNA量増加を、*in situ* ハイブリダイゼーション（ISH）、蛍光*in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）、次世代シーケンシング（NGS）、またはリアルタイムPCRあるいはデジタルPCR解析によって検出することを含む、方法。

[請求項9] 請求項3に記載の方法であって、前記MYCタンパク質量増加を、免疫組織化学染色（IHC）、フローサイトメトリー（FACS）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、*protein array*（Proximity Extension Assay, PEA法）、ウェスタンブロットティング（WB）によって検出することを含む、方法。

[請求項10] 請求項2に記載の方法であって、
（1）前記対象からの癌組織由来試料中の、EGFR遺伝子変異、U2AF1遺伝子変異、POLE遺伝子減少、CDK12遺伝子減少、ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および／またはMDM4エキソンスキップ変化を検出すること、
（2）EGFR遺伝子、U2AF1遺伝子、ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子配列が各遺伝子の遺伝子配列参照と比較して変化している場合、および／ま

たはMDM4 mRNA配列がMDM4 mRNAの配列参照と比較して変化している場合、および／またはP O L E遺伝子コピー数またはC D K 1 2遺伝子コピー数が、各遺伝子のコピー数参照と比較して減少している場合に、前記対象が、前記式（I）で示される化合物またはその誘導体に対して特に高い応答性を示すものであると判断することを含む、方法。

[請求項11] 請求項10に記載の方法であって、前記U 2 A F 1遺伝子変異がS 3 4 F変異またはS 3 4 Y変異である、方法。

[請求項12] 請求項10または11に記載の方法であって、前記E G F R遺伝子変異、前記U 2 A F 1遺伝子変異、前記P O L E遺伝子減少、前記C D K 1 2遺伝子減少、A T R X、A T R、G N A QおよびH I S T 1 H 3 Bの1つ以上から選択される前記遺伝子変異および／または前記MDM4エキソンスキップ変化を、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション（a C G H）、一塩基多型（S N P）アレイ、コピー数多型（C N V）シーケンシングまたはマルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅（M L P A）、RNAシーケンシングによって検出することを含む、方法。

[請求項13] 請求項1から12までのいずれか1項に記載の方法であって、前記癌組織由来試料が、前記対象から得られた外科的試料、生検試料、胸水試料、または腹水試料であり、例えば、肺、血液、乳房、消化管（胃、結腸、直腸）、卵巣、脾臓、肝臓、膀胱、子宮頸部、神経、子宮、唾液腺、腎臓、前立腺、甲状腺、または筋肉の組織のうちの1つ以上から採取されたものである、方法。

[請求項14] 請求項1から12までのいずれか1項に記載の方法であって、前記対象がヒト対象である、方法。

[請求項15] 請求項1から12までのいずれか1項に記載の方法であって、前記癌が、癌腫、横紋筋肉腫、例えば、胞巣状横紋筋肉腫（骨、腱、軟骨、筋肉、脂肪（f a t）、線維、血管、脂肪（a d i p o s e）、お

よび／または結合組織に由来する肉腫を含む）などの肉腫、明細胞肉腫、神経芽腫、髄芽腫、星状細胞腫、多形膠芽腫、網膜芽細胞腫、腺扁平上皮癌、癌肉腫、混合性中胚葉腫瘍、奇形癌、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腺癌、および肺扁平上皮癌を含む）、乳癌（転移性乳癌を含む）、消化器癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、卵巣癌、膵臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、膠芽腫、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌（例えば、ウィルム腫瘍）、前立腺癌、甲状腺癌、ならびに頭頸部癌のうちの1つ以上から選択される、方法。

[請求項16] 請求項3から9までのいずれか1項に記載の方法であって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌および／または前立腺癌から選択される、方法。

[請求項17] 請求項16に記載の方法であって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌である、方法。

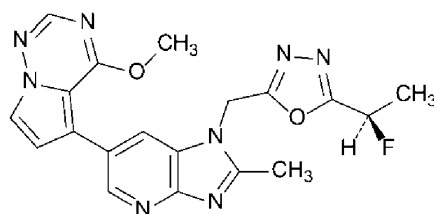
[請求項18] 請求項3から9までのいずれか1項に記載の方法であって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、神経芽腫、小細胞肺癌、胞巣状横紋筋肉腫、髄芽腫、多形膠芽腫および／または網膜芽細胞腫から選択される、方法。

[請求項19] 請求項18に記載の方法であって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が神経芽腫である、方法。

[請求項20] 請求項3から9までのいずれか1項に記載の方法であって、前記MYC遺伝子がMYCLであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌および／または前立腺癌から選択される、方法。

[請求項21] 固形癌対象における、下記式（I）：

[化2]



で示される、1-((5-(1R)-1-フルオロエチル)-1,3,4-オキサジアゾール-5-イル)メチル)-6-(4-メトキシピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)-2-メチル-1H-イミダゾ[4,5-b]ピリジンまたはその誘導体の療法に対する治療応答を予測するための、

以下(a)～(k)の1つ以上から選択されるバイオマーカー；

- (a) MYC遺伝子増幅、
- (b) MYC遺伝子変異、
- (c) MYC遺伝子染色体位置転位、
- (d) MYC mRNA量増加、
- (e) MYCタンパク質量増加、
- (f) EGFR遺伝子変異、
- (g) U2AF1遺伝子変異、
- (h) POLE遺伝子減少、
- (i) CDK12遺伝子減少、
- (j) ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および
- (k) MDM4エキソンスキップ変化。

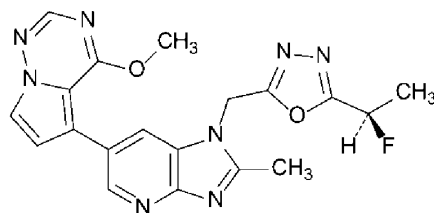
[請求項22] 請求項21に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺伝子がMYCC、MYCN、およびMYCLから選択される、バイオマーカー。

- [請求項23] 請求項21に記載のバイオマーカーであって、前記U2AF1遺伝子の変異がS34F変異またはS34Y変異である、バイオマーカー。
- [請求項24] 請求項21から23までのいずれか1項に記載のバイオマーカーであって、前記癌が、癌腫、横紋筋肉腫、例えば、胞巣状横紋筋肉腫（骨、腱、軟骨、筋肉、脂肪（fat）、線維、血管、脂肪（adipose）、および／または結合組織に由来する肉腫を含む）などの肉腫、明細胞肉腫、神経芽腫、髄芽腫、星状細胞腫、多形膠芽腫、網膜芽細胞腫、腺扁平上皮癌、癌肉腫、混合性中胚葉腫瘍、奇形癌、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腺癌、および肺扁平上皮癌を含む）、乳癌（転移性乳癌を含む）、消化器癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、卵巣癌、膵臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、膠芽腫、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌（例えば、ウィルム腫瘍）、前立腺癌、甲状腺癌、ならびに頭頸部癌のうちの1つ以上から選択される、バイオマーカー。
- [請求項25] 請求項21に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌から選択される、バイオマーカー。
- [請求項26] 請求項25に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌である、バイオマーカー。
- [請求項27] 請求項21に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、前立腺癌、神経芽腫、小細胞肺癌、胞巣状横紋筋肉腫、髄芽腫、多形膠芽腫、および網膜芽細胞腫から選択される、バイオマーカー。
- [請求項28] 請求項27に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が神経芽腫である、バイオマーカー。
- [請求項29] 請求項21に記載のバイオマーカーであって、前記MYC遺伝子がMYCLであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌

、および前立腺癌から選択される、バイオマーカー。

[請求項30] CLK阻害に対する感受性を付与すると予測される遺伝子の特徴を有する固形癌を治療するための、下記式(1)：

[化3]



で示される、1-((5-(1R)-1-フルオロエチル)-1,3,4-オキサジアゾール-5-イル)メチル)-6-(4-メトキシピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-5-イル)-2-メチル-1H-イミダゾ[4,5-b]ピリジンまたはその誘導体を有効成分として含む、医薬組成物であって、

前記遺伝子の特徴が、

以下(a)～(k)から選択される1つ以上である医薬組成物；

- (a) MYC遺伝子増幅、
- (b) MYC遺伝子変異、
- (c) MYC遺伝子染色体位置転位、
- (d) MYC mRNA量増加、
- (e) MYCタンパク質量増加、
- (f) EGFR遺伝子変異、
- (g) U2AF1遺伝子変異、
- (h) POLE遺伝子減少、
- (i) CDK12遺伝子減少、
- (j) ATRX、ATR、GNAQおよびHIST1H3Bの1つ以上から選択される遺伝子変異および

(k) MDM4 エキソンスキップ変化。

- [請求項31] 請求項30に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCC、MYCN、およびMYCLから選択される、医薬組成物。
- [請求項32] 請求項30に記載の医薬組成物であって、前記U2AF1遺伝子変異がS34F変異またはS34Y変異である、医薬組成物。
- [請求項33] 請求項30から32までのいずれか1項に記載の医薬組成物であって、前記癌が、癌腫、横紋筋肉腫、例えば、胞巣状横紋筋肉腫（骨、腱、軟骨、筋肉、脂肪（fat）、線維、血管、脂肪（adipose）、および／または結合組織に由来する肉腫を含む）などの肉腫、明細胞肉腫、神経芽腫、髓芽腫、星状細胞腫、多形膠芽腫、網膜芽細胞腫、腺扁平上皮癌、癌肉腫、混合性中胚葉腫瘍、奇形癌、肺癌（非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腺癌、および肺扁平上皮癌を含む）、乳癌（転移性乳癌を含む）、消化器癌、胃癌、結腸直腸癌、結腸癌、直腸癌、卵巣癌、膵臓癌、肝臓癌、膀胱癌、子宮頸癌、膠芽腫、子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌（例えば、ウィルム腫瘍）、前立腺癌、甲状腺癌、ならびに頭頸部癌のうちの1つ以上から選択される、医薬組成物。
- [請求項34] 請求項30に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌から選択される、医薬組成物。
- [請求項35] 請求項34に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCCであり、かつ、前記癌が卵巣癌である、医薬組成物。
- [請求項36] 請求項30に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、神経芽腫、小細胞肺癌、胞巣状横紋筋肉腫、髓芽腫、多形膠芽腫、および網膜芽細胞腫から選択される、医薬組成物。
- [請求項37] 請求項36に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCNであり、かつ、前記癌が神経芽腫である、医薬組成物。

[請求項38] 請求項30に記載の医薬組成物であって、前記MYC遺伝子がMYCLであり、かつ、卵巣癌、乳癌、胃癌、肺癌、大腸癌、および前立腺癌から選択される、医薬組成物。