

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年8月6日 (06.08.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/096189 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/68 (2006.01) G01N 27/447 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01) G01N 27/62 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/000358
- (22) 国際出願日: 2009年1月30日 (30.01.2009)
- (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2008-021123 2008年1月31日 (31.01.2008) JP

- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田2丁目15番45号 Tokyo (JP). 株式会社ヤクルト本社 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 谷川原 祐介 (TANIGAWARA, Yusuke) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 渡辺 光博 (WATANABE, Mitsuhiro) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 有田 恵理 (ARITA, Eri) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 西牟田 章戸 (NISHIMUTA, Akito) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番

地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 山吉 康子 (YAMAYOSHI, Yasuko) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 松崎 健 (MATSUZAKI, Takeshi) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 杉本 伸二 (SUGIMOTO, Shinji) [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号共同ビル 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(54) Title: MARKER FOR DETERMINATION OF SENSITIVITY TO ANTI-CANCER AGENT

(54) 発明の名称: 抗がん剤感受性判定マーカー

(57) Abstract: Disclosed is a marker for use in the determination of the sensitivity to an anti-cancer agent, which can determine the therapeutic response in individual patients. Also disclosed is a novel cancer treatment means utilizing the marker. Specifically disclosed is a marker for use in the determination of the sensitivity to an anti-cancer agent, which comprises a substance involved in the metabolic system associated with L-phenylalanine and/or N,N-dimethylglycine.

(57) 要約: 個々の患者の治療反応性を判別できる抗がん剤感受性判定マーカー及びそれを利用する新たながん治療手段を提供する。 L-フェニルアラニン及び/又はN, N-ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質からなる抗がん剤感受性判定マーカー。

WO 2009/096189 A1

明 細 書

抗がん剤感受性判定マーカー

技術分野

[0001] 本発明は、対象となる患者のがんが、抗がん剤に治療反応性を有するか否かを判定するために用いる抗がん剤感受性判定マーカー及びその応用に関する。

背景技術

[0002] 抗がん剤には、アルキル化剤、白金製剤、代謝拮抗剤、抗がん性抗生物質、抗がん性植物アルカロイド等の種類がある。そしてこれらの抗がん剤にはがんの種類によって効果を示す場合と効果を示さない場合がある。しかし、有効であると認められている種類のがんであっても、個々の患者によって効果を示す場合と効果を示さない場合があることが知られている。このような個々の患者のがんに対して抗がん剤が効果を示すか否かを抗がん剤感受性という。

[0003] 塩酸イリノテカン（CPT-11）は日本で開発された *topoisomerase I* 阻害という作用機序を有する抗がん剤である。日本において、CPT-11は、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、子宮頸癌、卵巣癌に有効な薬剤として1994年1月に認可され、さらに1995年7月に胃癌、結腸・直腸癌、乳癌、有棘細胞癌、悪性リンパ腫に対する適応が認められている。CPT-11は特に大腸癌の領域で多剤併用療法の *first line drug* あるいは *second line drug* として世界的な標準治療薬の位置を占め、その有用性が認められている（非特許文献1～6）。

進行性・転移大腸癌に対する化学療法は、1990年代に登場したCPT-11、オキサリプラチンなどの *key drug* と、それまで大腸癌治療の中心的薬剤であったフルオロウラシル（5-FU）を中心とするフッ化ピリミジン製剤とを併用することにより、生存率をはじめとする臨床成績が劇的に改善された。しかしそれでもなお奏効率はおよそ50%程度であり、重

篤な副作用という高リスクを冒して抗がん剤が投与された患者の半分では効果が得られていないのが現状であり、個々の治療反応性（レスポンドー・ノンレスポンドー）を判別する抗がん剤感受性予測マーカーの確立は急務である。

一般的に、がん化学療法の治療スケジュールは長期に渡り、副作用の発現を見ながら何クールか繰り返し治療を行った後で、効果が得られているか、そのまま投与を続けるべきか判断するが、それまでには長い時間と高額な医療費がかかり、副作用の発現も起こっているのが事実である。よって、個々の患者に対し、効果が得られるかどうかを治療早期に予測できる手段があれば、患者の負担や副作用の発現を軽減し、医療費を削減することができる。

[0004] CPT-11はそれ自体抗腫瘍活性を有するものの、体内でCarboxylesteraseにより活性化され、CPT-11に比べおよそ100～数千倍強い抗腫瘍活性を有する7-ethyl-10-hydroxycamptothecin（SN-38）へと変換される。CPT-11とSN-38が同時に体内に存在することで抗腫瘍効果を呈すると考えられている。SN-38は肝細胞内でUDP-グルクロン酸転移酵素（UGT：UDP-glucuronosyltransferase）によりグルクロン酸抱合を受け、細胞毒性のないSN-38グルクロン酸抱合体（SN-38G）となり、おもに胆汁中に排泄され腸管へと移行し、その後は便中に排泄される。腸管に排泄されたSN-38Gの一部は、腸内細菌が有するβ-グルクロニダーゼにより脱抱合され再び活性型のSN-38となり、腸管上皮のトランスポーターを介し再吸収され腸肝循環、腸上皮細胞内でのUGTによるグルクロン酸抱合化などのステップを経ながら代謝・排泄を受ける（非特許文献7）。この際に、SN-38が腸管粘膜を障害し、下痢を誘発すると考えられている。また、細胞分裂の活発な骨髓にも影響をおよぼし、赤血球減少・白血球減少・血小板減少を引き起こすことが認められている。

重篤な下痢や好中球減少症などの副作用は、UGT1A1遺伝多型がもたらすSN-38体内曝露量の変化が一因であることが示されている。しかし

治療効果に関しては、プロドラッグであるCPT-11から活性代謝物SN-38への変換とその解毒、さらに腸管循環の過程におけるSN-38の再生成や、CPT-11自体の代謝と代謝物からのSN-38の生成といった体内動態の複雑性により、薬物動態により治療効果を予測できるとする報告は未だなされていない。末梢血単核球細胞のカルボキシルエステラーゼmRNA発現量がSN-38とSN-38GのAUC比とは相関するものの腫瘍縮小効果とは相関がなかったとする報告もなされている（非特許文献8）。

[0005] また一方で、CPT-11感受性もしくは耐性に関与する因子として、SN-38の標的であるtopoisomerase Iの変異の有無や発現量、CPT-11からSN-38への変換に関与するカルボキシルエステラーゼ活性（非特許文献9）、CPT-11やSN-38の細胞内蓄積量に影響するトランスポーター（multidrug resistance protein（MRP）-1、MRP-2、Breast cancer resistant protein（BCRP）／ABCG2）の関与が報告されており、その他、細胞増殖抗原Ki-67、がん抑制遺伝子p53などもCPT-11を用いた治療への反応性との関連が検討されている。ごく最近、in vitroにおいて抗がん剤感受性データとマイクロアレイのデータを組み合わせることで体系的に抗癌剤感受性を予測しようとする試みがなされており、カンプトテシン類ではトポテカンについて検討されている（非特許文献10）。臨床研究においては、抗アポトーシス作用をもつTissue inhibitor of metalloproteinase-1（TIMP-1）の血漿中レベルが、転移結腸・直腸癌に対するCPT-11+5-FU併用療法の臨床予後と有意に相関することが最近報告されている（非特許文献11）。このようにCPT-11感受性予測バイオマーカーの必要性が認識され多くの研究がなされているが、標的であるtopoisomerase Iについても、5-FU感受性予測因子とされるチミジル酸合成酵素とともに5-FU+CPT-11併用療法の治療反応性との間に明確な関連性を見出せなかったとする報告もあるなど（非特許文献1

2)、治療反応性を予測し得る明確なバイオマーカーは確立されていない。

先行技術文献

[0006] 非特許文献1: J Clin Oncol 1993; 11: 909-913

.

非特許文献2: Semin Oncol 1999; 26 (1 Suppl 5): 6-12.

非特許文献3: Lancet 1998; 352: 1407-1412.

非特許文献4: Proc ASCO 2005; Abstract #3506

.

非特許文献5: N Engl J Med 2000; 343: 905-914.

非特許文献6: Lancet 2000; 355: 1041-1047.

非特許文献7: Cancer Res 1991; 51: 4187-4191

.

非特許文献8: Clin Cancer Res 2005; 11: 6901-6907.

非特許文献9: Pharmacogenet Genomics 2007; 17: 1-10.

非特許文献10: Nat Med 2006; 12: 1294-1300.

非特許文献11: Clin Cancer Res 2007; 13: 4117-4122.

非特許文献12: Int J Cancer 2004; 111: 252-258.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の目的は、個々の患者の治療反応性を判別できる抗がん剤感受性判定マーカー及びそれを利用する新たながん治療手段を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] そこで本発明者らは、キャピラリー電気泳動－飛行時間型質量分析計（C E－T O F M S）を用いて、i n v i v o 担癌マウスにおける血清中のメタボローム（全代謝物質の総体）を網羅的に解析することにより、抗がん剤感受性判定マーカーの探索を行った。S N－3 8に対する感受性の異なるヒト由来大腸癌細胞株２種類をそれぞれヌードマウスに移植し、検討した結果、癌移植マウス群で特異的に上昇する代謝物質が、C P T－1 1 治療により、高感受性群でのみコントロール群まで減少することを見出し、さらにその代謝物質はＬ－フェニルアラニン及び／又はN， N－ジメチルグリシンであることを見出した。かかる知見に基づき、さらに検討した結果、がん患者由来の生体試料中のＬ－フェニルアラニン及び／又はN， N－ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質の濃度を測定すれば、当該がん患者のがんが抗がん剤感受性か否かを判定できること、また、この物質の発現抑制を指標とすれば抗がん剤感受性亢進剤のスクリーニングが可能になること、さらに当該抗がん剤感受性亢進剤と感受性亢進の対象となる抗がん剤を併用すれば、当該抗がん剤の治療効果が飛躍的に向上することを見出し、本発明を完成した。

[0009] すなわち、本発明は、Ｌ－フェニルアラニン及び／又はN， N－ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質からなる抗がん剤感受性判定マーカーを提供するものである。

また、本発明は、検体中のＬ－フェニルアラニン及び／又はN， N－ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質を測定することを特徴とする抗がん剤感受性の判定方法を提供するものである。

また、本発明は、検体中のＬ－フェニルアラニン及び／又はN， N－ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質を測定するためのプロトコールを含むことを特徴とする抗がん剤感受性の判定方法を実施するためのキットを提供するものである。

さらに本発明は、Ｌ－フェニルアラニン及び／又はN， N－ジメチルグリ

シンが関与する代謝系上の物質の発現抑制を指標とする抗がん剤感受性亢進剤のスクリーニング方法を提供するものである。

さらにまた本発明は、上記のスクリーニング方法により得られた抗がん剤感受性亢進剤を提供するものである。

さらに本発明は、上記の抗がん剤感受性亢進剤と、感受性亢進の対象となる抗がん剤とを組み合わせるがん治療用組成物を提供するものである。

さらに本発明は、上記の抗がん剤感受性亢進剤と、感受性亢進の対象となる抗がん剤との組み合わせの、がん治療薬製造のための使用を提供するものである。

さらに本発明は、上記の抗がん剤感受性亢進剤と、感受性亢進の対象となる抗がん剤とを投与することを特徴とするがん治療方法を提供するものである。

発明の効果

[0010] 本発明の抗がん剤感受性判定マーカーを用いれば、個々の患者の抗がん剤治療反応性が抗がん剤投与前、或いは抗がん剤投与開始後早期に適確に判定できる結果、より治療効果の高い抗がん剤の選択が可能となり、その結果として治療効果の期待できない抗がん剤の継続投与に伴うがんの進行、副作用の増大を防止でき、さらには患者の負担軽減、医療費の削減も期待できる。また、このマーカーを用いれば、抗がん剤感受性を亢進させる薬剤がスクリーニングでき、その対象となった抗がん剤と抗がん剤感受性亢進剤とを併用すれば、がん治療効果が飛躍的に向上する。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]各群における担癌マウス腫瘍サイズの経時的変化を示す図である。

[図2]がん細胞を移植していないコントロール群（C o n t）、S N－38低感受性であるヒト培養大腸癌細胞H T－29移植群（H T）、S N－38高感受性であるヒト培養大腸癌細胞H C T－116移植群（H C T）におけるC P T－11投与後24時間後のヌードマウス血清中フェニルアラニン濃度（m/z 166.086）を示す図である。

[図3]がん細胞を移植していないコントロール群（C o n t）、S N－3 8 低感受性であるヒト培養大腸癌細胞H T－2 9 移植群（H T）、S N－3 8 高感受性であるヒト培養大腸癌細胞H C T－1 1 6 移植群（H C T）におけるC P T－1 1 投与後1 2 時間後のヌードマウス血清中N， N－ジメチルグリシン濃度（m／z 1 0 4． 0 7 0）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明における抗がん剤感受性判定マーカーの一つは、L－フェニルアラニンが関与する代謝系上の物質（L－フェニルアラニン代謝系物質ともいう）であり、当該物質としてはL－フェニルアラニンの他、代謝系においてL－フェニルアラニンの濃度を上昇させるすべての物質が含まれ、L－フェニルアラニンへの代謝を亢進する物質、L－フェニルアラニンからの代謝を阻害する物質が挙げられる。ここで、L－フェニルアラニンへの代謝を亢進する物質としては、タンパク質やペプチドからL－フェニルアラニンまでの代謝系における中間体、その代謝に関与する酵素、補酵素、その酵素の発現量や活性を変化させる物質等が含まれる。またL－フェニルアラニンからの代謝を阻害する物質としては、L－フェニルアラニン代謝酵素の阻害物質、L－フェニルアラニン代謝酵素の発現量や活性を低下させる物質、L－フェニルアラニン代謝酵素の補酵素等が挙げられる。これらのうち、L－フェニルアラニンが特に好ましい。

[0013] 本発明におけるもう一つの抗がん剤感受性判定マーカーは、N， N－ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質（N， N－ジメチルグリシン代謝系物質ともいう）であり、当該物質としてはN， N－ジメチルグリシンの他、代謝系においてN， N－ジメチルグリシンの濃度を上昇させるすべての物質が含まれ、N， N－ジメチルグリシンへの代謝を亢進する物質、N， N－ジメチルグリシンからの代謝を阻害する物質が挙げられる。ここで、N， N－ジメチルグリシンへの代謝を亢進する物質としては、リン脂質からN， N－ジメチルグリシンまでの代謝系における中間体、その代謝に関与する酵素、補酵素、その酵素の発現量や活性を変化させる物質等が含まれる。またN，

N-ジメチルグリシンからの代謝を阻害する物質としては、N, N-ジメチルグリシン代謝酵素の阻害物質、N, N-ジメチルグリシン代謝酵素の発現量や活性を低下させる物質、N, N-ジメチルグリシン代謝酵素の補酵素等が挙げられる。これらのうち、N, N-ジメチルグリシンが特に好ましい。

[0014] L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシンは、後記実施例に示すように、がん細胞を移植されたマウスの血清中濃度が、がん細胞非移植群に比べて上昇していた。また、SN-38低感受性がん細胞であるHT-29を移植された群では、CPT-11投与後もL-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン濃度は低下しなかった。これに対し、SN-38高感受性がん細胞であるHCT-116を移植された群では、CPT-11投与によりL-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン濃度はコントロール群と同程度まで低下した。従ってL-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシンは、CPT-11、SN-38等の抗がん剤感受性判定マーカーとして有用である。

[0015] 本発明の抗がん剤感受性判定マーカーの対象となる抗がん剤としては、L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシンの代謝系に影響を与えるがんであれば特に限定されないが、例えばCPT-11、SN-38、オキサリプラチン、シクロフォスファミド (cyclophosphamide)、イフォスファミド (ifosfamide)、チオテパ (thiotepa)、メルファラン (melphalan)、ブスルファン (busulfan)、ニムスチン (nimustine)、ラニムスチン (ranimustine)、ダカルバジン (dacarbazine)、プロカルバジン (procarbazine)、テモゾロミド (temozolomide)、シスプラチン (cisplatin)、カルボプラチン (carboplatin)、ネダプラチン (nedaplatin)、メトトレキサート (methotrexate)、ペメトレキセド (pemetrexed)、フルオロウラシル (fluorouracil)、テガフル／ウラシル (tegafur・uracil)、ドキシフルリジン (doxi

fluridine)、テガフル／ギメラシル／オテラシル (tegafur・gimeracil・oteracil)、カペシタビン (capecitabine)、シタラビン (cytarabine)、エノシタビン (enocitabine)、ゲムシタビン (gemcitabine)、6-メルカプトプリン (6-mercaptopurine)、フルダラビン (fludarabine)、ペントスタチン (pentostatin)、クラドリビン (cladribine)、ヒドロキシウレア (hydroxyurea)、ドキシソルビシン (doxorubicin)、エピルビシン (epirubicin)、ダウノルビシン (daunorubicin)、イダルビシン (idarubicin)、ピラルビシン (pirarubicin)、ミトキサントロン (mitoxantrone)、アムルビシン (amurubicin)、アクチノマイシンD (actinomycin D)、ブレオマイシン (bleomycin)、ペブレオマイシン (pepleomycin)、マイトマイシンC (mytomicin C)、アクラルビシン (acliarubicin)、ジノスタチン (zinostatin)、ビンクリスチン (vincristine)、ビンデシン (vindesine)、ビンブラスチン (vinblastine)、ビノレルビン (vinorelbine)、パクリタキセル (paclitaxel)、ドセタキセル (docetaxel)、ノギテカン (nogitecan、topotecan)、エトポシド (etoposide)、プレドニゾロン (prednisolone)、デキサメタゾン (dexamethasone)、タモキシフェン (tamoxifen)、トレミフェン (toremifene)、メドロキシプロゲステロン (medroxyprogesterone)、アナストロゾール (anastrozole)、エキセメスタン (exemestane)、レトロゾール (letrozole)、リツキシマブ (rituximab)、イマチニブ (imatinib)、ゲフィチニブ (gefitinib)、ゲムツズマブ・オゾガマイシン (gemtuzumab ozogamicin)、ボルテゾミ

ブ (bortezomib)、エルロチニブ (erlotinib)、セツキシマブ (cetuximab)、ベバシズマブ (bevacizumab)、スニチニブ (sunitinib)、ソラフェニブ (sorafenib)、ダサチニブ (dasatinib)、パニツムマブ (panitumumab)、アスパラギナーゼ (asparaginase)、トレチノイン (tretinoin)、三酸化ヒ素 (arsenic trioxide)、又はそれらの塩、又はそれらの活性代謝物等が挙げられ、このうち植物アルカロイド系抗がん剤、例えばCPT-11、SN-38又はそれらの塩が好ましい。

[0016] 本発明の抗がん剤感受性判定マーカーを用いて抗がん剤感受性を判定するには、検体中のL-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン代謝系物質を測定すればよい。ここで、検体としては、がんを有する被験者（がん患者）由来の生体試料、例えば血液、血清、血漿、尿、腫瘍組織・細胞、腹水、胸水、脳脊髄液、便、喀痰等が挙げられるが、血清が特に好ましい。

[0017] また、本発明の対象となるがんとしては、咽頭がんを代表とする口唇、口腔及び咽頭がん、食道がん、胃がん、結腸・直腸がんなどを代表とする消化器がん、肺がんを代表とする呼吸器及び胸腔内臓器がん、骨及び関節軟骨がん、皮膚の悪性黒色腫、有棘細胞がん及びその他の皮膚のがん、中皮腫を代表とする中皮及び軟部組織がん、乳房がん、子宮がん、卵巣がんを代表とする女性性器がん、前立腺がんを代表とする男性性器がん、膀胱がんを代表とする尿路がん、脳腫瘍を代表とする眼、脳及び中枢神経系がん、甲状腺及びその他の内分泌腺がん、非ホジキンリンパ腫やリンパ性白血病を代表とするリンパ組織、造血組織及び関連組織がん、及びこれらを原発巣とする転移組織のがん等が挙げられるが、特に非小細胞肺がん、小細胞肺がん、子宮頸がん、卵巣がん、胃がん、結腸・直腸がん、有棘細胞がん、悪性リンパ腫に対して好適に利用できる。

[0018] 検体中のL-フェニルアラニン、N, N-ジメチルグリシン代謝系物質の

測定手段は、被測定対象物質により適宜決定すればよく、例えばC E - T O F M S、G a s c h r o m a t o g r a p h y - m a s s s p e c t r o m e t r y (G C - M S)、H P L C、免疫学的測定法、生化学的測定法等により測定可能である。L - フェニルアラニンの場合には、C E - T O F M S、H P L C、生化学的測定法等により定量的に測定可能であり、特に酵素法を利用した蛍光強度による定量測定が簡便である。N, N - ジメチルグリシンの場合には、C E - T O F M S、H P L C、G C - M S等により定量的に測定可能である。

[0019] 対象とする抗がん剤に対する感受性を判定するには、抗がん剤投与前及び投与後のがん患者由来の生体試料中のL - フェニルアラニン及び／又はN, N - ジメチルグリシン代謝系物質濃度を測定し、抗がん剤投与前後におけるL - フェニルアラニン及び／又はN, N - ジメチルグリシン代謝系物質の濃度が変化しなければそのがんは抗がん剤感受性ではなく、抗がん剤投与前に比べて投与後におけるL - フェニルアラニン及び／又はN, N - ジメチルグリシン代謝系物質の濃度が低下した場合には、そのがんは抗がん剤感受性であると判定できる。

また、抗がん剤投与前あるいは投与後初期の段階において、L - フェニルアラニン及び／又はN, N - ジメチルグリシン代謝系物質の濃度が所定の標準濃度より高いと判断される濃度を有する場合は、そのがんは対象とする抗がん剤に対して感受性ではないと判定できる。対象とする抗がん剤に対して感受性を有さない場合は、その薬効を期待することができず、このような薬効の期待できない抗がん剤の投与が続けられた場合、がんの進行、副作用の増大が危惧される。このように、本発明における抗がん剤感受性判定マーカーは、抗がん剤治療反応性の判定のみならず、薬効の期待できない抗がん剤の継続投与に伴う副作用の増大を防ぐことにも大きく貢献する。

[0020] 本発明の抗がん剤感受性の判定方法を実施するには、検体中のL - フェニルアラニン及び／又はN, N - ジメチルグリシン代謝系物質を測定するためのプロトコールを含むキットを用いるのが好ましい。当該キットには、L -

フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン代謝系物質測定試薬、測定試薬の使用方法、及び抗がん剤感受性の有無を判定するための基準等が含まれる。当該基準には、L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン代謝系物質の標準濃度、高いと判断される濃度、低いと判断される濃度、測定結果に影響を与える要因とその影響の程度等が含まれ、これらの濃度は対象とする抗がん剤ごとに設定することが可能である。当該基準を用いて、前記のように判定することができる。

[0021] L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン代謝系物質の発現抑制を指標とすれば、抗がん剤感受性亢進剤がスクリーニングできる。すなわち、*in vitro*又は*in vivo*においてL-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン代謝系物質の発現を抑制する物質は、抗がん剤感受性を亢進する。例えば、担癌動物における抗がん剤投与前後において、L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン代謝系物質の濃度の低下を亢進させる物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。また、*in vitro*では、各種がん細胞株において抗がん剤の存在下でL-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン代謝系物質の濃度を低下させる物質は、当該抗がん剤の感受性を亢進する物質（抗がん剤感受性亢進剤）である。

[0022] さらに、L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン代謝系物質を指標とすれば、抗がん剤がスクリーニングできる。すなわち、*in vitro*又は*in vivo*において、ある物質によりL-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン代謝系物質の濃度が低下すれば、その物質は抗がん剤である。例えば、担癌動物にある物質を投与した後、L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン代謝系物質の濃度が低下すれば、その物質は抗がん剤である。また、*in vitro*では、ある物質を各種がん細胞株に曝露後、曝露前に比べてL-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシン代謝系物質の濃度が低下すれば、その物質は抗がん剤である。薬効が期待できる抗がん剤であれば、L-フェニ

ルアラニン及び／又はN，N－ジメチルグリシン代謝系物質の濃度低下は腫瘍の縮小あるいは殺細胞効果よりも早く現れるため、L－フェニルアラニン及び／又はN，N－ジメチルグリシン代謝系物質を指標としたスクリーニングにより、より短時間の検討で当該物質が抗がん剤として有用であるかどうかを判定することができる。抗がん剤開発に伴う労力や費用の削減という面からも大きな効果が期待できる。

[0023] かくして得られた抗がん剤感受性亢進剤と感受性亢進の対象となる抗がん剤とを併用すれば、当該抗がん剤の治療効果が飛躍的に向上する。抗がん剤感受性亢進剤と感受性亢進の対象となる抗がん剤とを組み合わせた形態としては、それらの成分の両方を含む一の組成物であってもよく、それぞれ別個の製剤の組み合わせであってもよい。また、それらの成分はそれぞれ別の投与経路であってもよい。ここで用いられる対象となる抗がん剤としては、前記と同様であり、CPT－11、SN－38、オキサリプラチン、シクロホスファミド (cyclophosphamide)、イフォスファミド (ifosfamide)、チオテパ (thiotepa)、メルファラン (melphalan)、ブスルファン (busulfan)、ニムスチン (nimustine)、ラニムスチン (ranimustine)、ダカルバジン (dacarbazine)、プロカルバジン (procarbazine)、テモゾロミド (temozolomide)、シスプラチン (cisplatin)、カルボプラチン (carboplatin)、ネダプラチン (nedaplatin)、メトトレキサート (methotrexate)、ペメトレキセド (pemetrexed)、フルオロウラシル (fluorouracil)、テガフル／ウラシル (tegafur・uracil)、ドキシフルリジン (doxifluridine)、テガフル／ギメラシル／オテラシル (tegafur・gimeracil・oteracil)、カペシタビン (capecitabine)、シタラビン (cytarabine)、エノシタビン (enocitabine)、ゲムシタビン (gemcitabine)、6－メルカプトプリン (6－mer

captopurine)、フルダラビン (fludarabin)、ペン
トスタチン (pentostatin)、クラドリビン (cladribi
ne)、ヒドロキシウレア (hydroxyurea)、ドキソルビシン (doxorubicin)、エピルビシン (epirubicin)、ダウ
ノルビシン (daunorubicin)、イダルビシン (idarubi
cine)、ピラルビシン (pirarubicin)、ミトキサントロン
(mitoxantrone)、アムルビシン (amurubicin)、
アクチノマイシンD (actinomycin D)、ブレオマイシン (b
leomycine)、ペブレオマイシン (pepleomycin)、マ
イトマイシンC (mytomycin C)、アクラルビシン (acla
rubicin)、ジノスタチン (zinostatin)、ビンクリスチン
(vincristine)、ビンデシン (vindesine)、ビンブ
ラスチン (vinblastine)、ビノレルビン (vinorelbi
ne)、パクリタキセル (paclitaxel)、ドセタキセル (doc
etaxel)、ノギテカン (nogitecan、topotecan)
、エトポシド (etoposide)、プレドニゾロン (predniso
lone)、デキサメタゾン (dexamethasone)、タモキシフ
エン (tamoxifen)、トレミフエン (toremifene)、メ
ドロキシプロゲステロン (medroxyprogesterone)、ア
ナストロゾール (anastrozole)、エキセメスタン (exeme
stane)、レトロゾール (letrozole)、リツキシマブ (ri
tuximab)、イマチニブ (imatinib)、ゲフィチニブ (ge
fitinib)、ゲムツズマブ・オゾガマイシン (gemtuzumab
ozogamicin)、ボルテゾミブ (bortezomib)、エル
ロチニブ (erlotinib)、セツキシマブ (cetuximab)、
ベバシズマブ (bevacizumab)、スニチニブ (sunitini
b)、ソラフェニブ (sorafenib)、ダサチニブ (dasatin
ib)、パニツムマブ (panitumumab)、アスパラギナーゼ (a

sparaginase)、トレチノイン(tretinoin)、三酸化ヒ素(arsenic trioxide)、又はそれらの塩、又はそれらの活性代謝物等が挙げられる。このうち、植物アルカロイド系抗がん剤、例えばCPT-11、SN-38又はそれらの塩が特に好ましい。

実施例

[0024] 次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明する。

[0025] 実施例 1

(1) 方法

(a) 動物

日本クレア社から購入したヌードマウス(BALB/cAJcl-nu/nu)、6週齢の雄性マウスを使用し、恒温室で自由に摂食可能な状態で通常の餌と飲水を与えた。本検討は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに沿ったプロトコルを申請し、承認を得て愛護的に行った。

(b) ヒト培養大腸癌細胞

SN-38高感受性であるヒト培養大腸癌細胞HCT-116とSN-38低感受性であるヒト培養大腸癌細胞HT-29は、株式会社ヤクルト本社より入手した。

(c) 薬剤

CPT-11の製剤であるカンプト™とカンプト溶解剤は、株式会社ヤクルト本社より入手した。

[0026] (d) 担癌マウスの作製とサンプル採取

6週齢のヌードマウスの後背部に、SN-38低感受性であるヒト培養大腸癌細胞HT-29とSN-38高感受性であるヒト培養大腸癌細胞HCT-116を200万個/100μL/マウスで皮下移植した。移植後、腫瘍サイズを長径×短径²/2の式を用いて測定し、腫瘍サイズが300-400mm³となった時点でCPT-11投与群と溶解剤投与群に無作為に割り付け、day 0とし、CPT-11投与群には、CPT-11の製剤であるカンプト™を4.5mL/kg(CPT-11量として90mg/kg)、CP

T-11 非投与群としては、カンプト™の溶解剤（D-ソルビトール、乳酸、pH調節剤）を尾静脈より、緩徐に投与した。day 0、投与12時間後、24時間後、72時間後、7日後に腫瘍サイズを測定し、解剖後採血を行った。採取した血液は、10,000 rpmにて10分間遠心分離後、血清画分を液体窒素にて凍結し、メタボローム用サンプルの調製に使用するまで-80℃で保存した。コントロール群として癌細胞非移植群も作製し、同様の処置を施した。

[0027] (e) メタボロームサンプルの調製

マウス解剖後-80℃で保存してある血清に、内部標準物質（IS）を添加したメタノール溶液を加え、タンパク質を変性させた後、クロロホルムとミリQ水を加え液—液抽出を行い、夾雑成分を除去した。代謝物を含む水—メタノール層を採取し、分画分子量5000 kDaの遠心限外ろ過フィルターを用いて除タンパクを行った後、ろ液を減圧乾燥し、-80℃に保存した。測定直前にミリQ水に溶解させ、メタボローム測定に供した。

[0028] (f) メタボローム測定

血清中代謝物の網羅的測定はAgilent Technologies社のキャピラリー電気泳動—飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS）にて行った。本検討では、キャピラリーの出口が陰極となるように電圧を印加し、陽イオン性の代謝物を網羅的に測定した。

[0029] (g) 解析方法

得られたピークは、ピーク自動抽出ソフトであるMolecular Feature Extractor (Agilent technologies, Inc.) を用いて、 m/z 50-1000、RT 0-50分、S/N比2以上の条件でピークを自動抽出させ、Microsoft Excel™上にて横軸に m/z 、縦軸にピーク強度のIS ratioをプロットさせた。解析方法としては、Microsoft Excel™上に横軸 m/z を細かくプロットし、一つずつピークの発現量の差を確認して行った。

[0030] (2) 結果

ヌードマウスの後背部に、SN-38高感受性であるヒト培養大腸癌細胞HCT-116とSN-38低感受性であるヒト培養大腸癌細胞HT-29を移植した後、腫瘍サイズを、長径×短径²/2の式を用いて測定を行った。腫瘍サイズが300-400mm³となった時点でCPT-11投与群と溶解剤投与群に無作為に割り付け、day 0と投与12時間後、24時間後、72時間後、及び7日後の腫瘍サイズを測定し、その結果を図1に示した。投与後7日後において、SN-38高感受性であるヒト培養大腸癌細胞HCT-116を移植し、CPT-11を投与した群と、溶解剤を投与した群において有意な差が認められた(p=0.01319)。また、SN-38高感受性であるヒト培養大腸癌細胞HCT-116を移植し、CPT-11を投与した群と、CPT-11低感受性であるヒト培養大腸癌細胞HT-29を移植し、CPT-11を投与した群においても有意な差が認められた(p=0.04979)。よって、本検討で使用したヒト培養大腸癌細胞HCT-116はヒト培養大腸癌細胞HT-29と比較して、CPT-11に対する感受性が高く、逆に、ヒト培養大腸癌細胞HT-29はヒト培養大腸癌細胞HCT-116と比較して、CPT-11に対する感受性が低いことを確認することができた。

[0031] 1サンプルあたり検出されたピーク数は平均263個であった。各ピークの変化パターンの解析を目視で個別に進めたところ、CPT-11薬剤反応性を示すバイオマーカーとなりうる候補ピークが得られた。その候補ピークは、CPT-11又は溶解剤投与24時間後の血清中代謝物を測定したm/z 166.086のピーク(図2)と、CPT-11又は溶解剤投与後12時間後の血清中代謝物を測定したm/z 104.070のピーク(図3)であった。

[0032] m/z 166.086のピークについては、SN-38低感受性であるヒト培養大腸癌細胞HT-29を移植した担癌マウスにおいて、薬剤投与24時間後ではCPT-11投与群と溶解剤投与群で血清中の発現量が同程度

であった。しかし、SN-38高感受性であるヒト培養大腸癌細胞HCT-116を移植した担癌マウスにおいて、薬剤投与24時間後ではCPT-11投与群で、癌細胞を移植していないcontrol群と同程度まで血清中のピーク発現量が低下した。よって、CPT-11無効群とCPT-11有効群に分けることができ、薬剤反応性を示すマーカーと考えられた。このピークに関して、解析ソフトAnalyst™ QS (Applied Biosystems, Inc.)を用いて、分子式の推定を進めた。親ピークに対するアイソトープの割合、精密質量等の情報から分子式を特定した結果、候補ピークとした m/z 166.086の分子式は $C_9H_{12}NO_2$ であった。京都大学が作製したKEGG:生命システム情報統合データベース (<http://www.kegg.jp/>)の代謝データベースを用いて、この分子式から推定される物質を検索したところ、このピークがL-フェニルアラニンであることが判明した。

[0033] m/z 104.070のピークについては、SN-38低感受性であるヒト培養大腸癌細胞HT-29を移植した担癌マウスにおいて、薬剤投与12時間後ではCPT-11投与群と溶解剤投与群では血清中の発現量が同程度であった。しかし、SN-38高感受性であるヒト培養大腸癌細胞HCT-116を移植した担癌マウスにおいて、薬剤投与12時間後ではCPT-11投与群で、癌細胞を移植していないcontrol群と同程度まで血清中のピーク発現量が低下した。よって、CPT-11無効群とCPT-11有効群に分けることができ、薬剤反応性を示すマーカーと考えられた。このピークに関して、解析ソフトAnalyst™ QS (Applied Biosystems, Inc.)を用いて、分子式の推定を進めた。親ピークに対するアイソトープの割合、精密質量等の情報から分子式を特定した結果、候補ピークとした m/z 104.070の分子式は $C_4H_9NO_2$ であった。京都大学が作製したKEGG:生命システム情報統合データベース (<http://www.kegg.jp/>)の代謝データベースを用いて、この分子式から推定される物質を検索したところ、4種類の候補化合物が得ら

れた。標品を用いた添加試験により、このピークがN，N－ジメチルグリシンであることが判明した。

請求の範囲

- [1] L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質からなる抗がん剤感受性判定マーカー。
- [2] L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質が、L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシンである請求項1記載の抗がん剤感受性判定マーカー。
- [3] 抗がん剤が、植物アルカロイド系抗がん剤である請求項1又は2記載の抗がん剤感受性判定マーカー。
- [4] 抗がん剤が、イリノテカン、SN-38及び／又はそれらの塩である請求項1又は2記載の抗がん剤感受性判定マーカー。
- [5] 検体中のL-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質を測定することを特徴とする抗がん剤感受性の判定方法。
- [6] L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質が、L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシンである請求項5記載の判定方法。
- [7] 検体が、がんを有する被験者由来の生体試料である請求項5又は6記載の判定方法。
- [8] 検体が、抗がん剤を投与された、がんを有する被験者由来の生体試料である請求項5～7のいずれか1項記載の判定方法。
- [9] 抗がん剤が、植物アルカロイド系抗がん剤である請求項5～8のいずれか1項記載の判定方法。
- [10] 抗がん剤が、イリノテカン、SN-38及び／又はそれらの塩である請求項5～8のいずれか1項記載の判定方法。
- [11] 検体中のL-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質を測定するためのプロトコールを含むことを特徴とする請求項5～10のいずれか1項記載の判定方法を実施するためのキット。
- [12] L-フェニルアラニン及び／又はN, N-ジメチルグリシンが関与する代

謝系上の物質が、Ｌ－フェニルアラニン及び／又はN，N－ジメチルグリシンである請求項１１記載のキット。

[13] 検体が、がんを有する被験者由来の生体試料である請求項１１又は１２記載のキット。

[14] 検体が、抗がん剤を投与された、がんを有する被験者由来の生体試料である請求項１１～１３のいずれか１項記載のキット。

[15] 抗がん剤が、植物アルカロイド系抗がん剤である請求項１１～１４のいずれか１項記載のキット。

[16] 抗がん剤が、イリノテカン、SN－３８及び／又はそれらの塩である請求項１１～１４のいずれか１項記載のキット。

[17] L－フェニルアラニン及び／又はN，N－ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質の発現抑制を指標とする抗がん剤感受性亢進剤のスクリーニング方法。

[18] L－フェニルアラニン及び／又はN，N－ジメチルグリシンが関与する代謝系上の物質が、L－フェニルアラニン及び／又はN，N－ジメチルグリシンである請求項１７記載のスクリーニング方法。

[19] 抗がん剤が、植物アルカロイド系抗がん剤である請求項１７又は１８記載のスクリーニング方法。

[20] 抗がん剤が、イリノテカン、SN－３８及び／又はそれらの塩である請求項１７又は１８記載のスクリーニング方法。

[21] 請求項１７～２０のいずれか１項記載の方法により得られた抗がん剤感受性亢進剤。

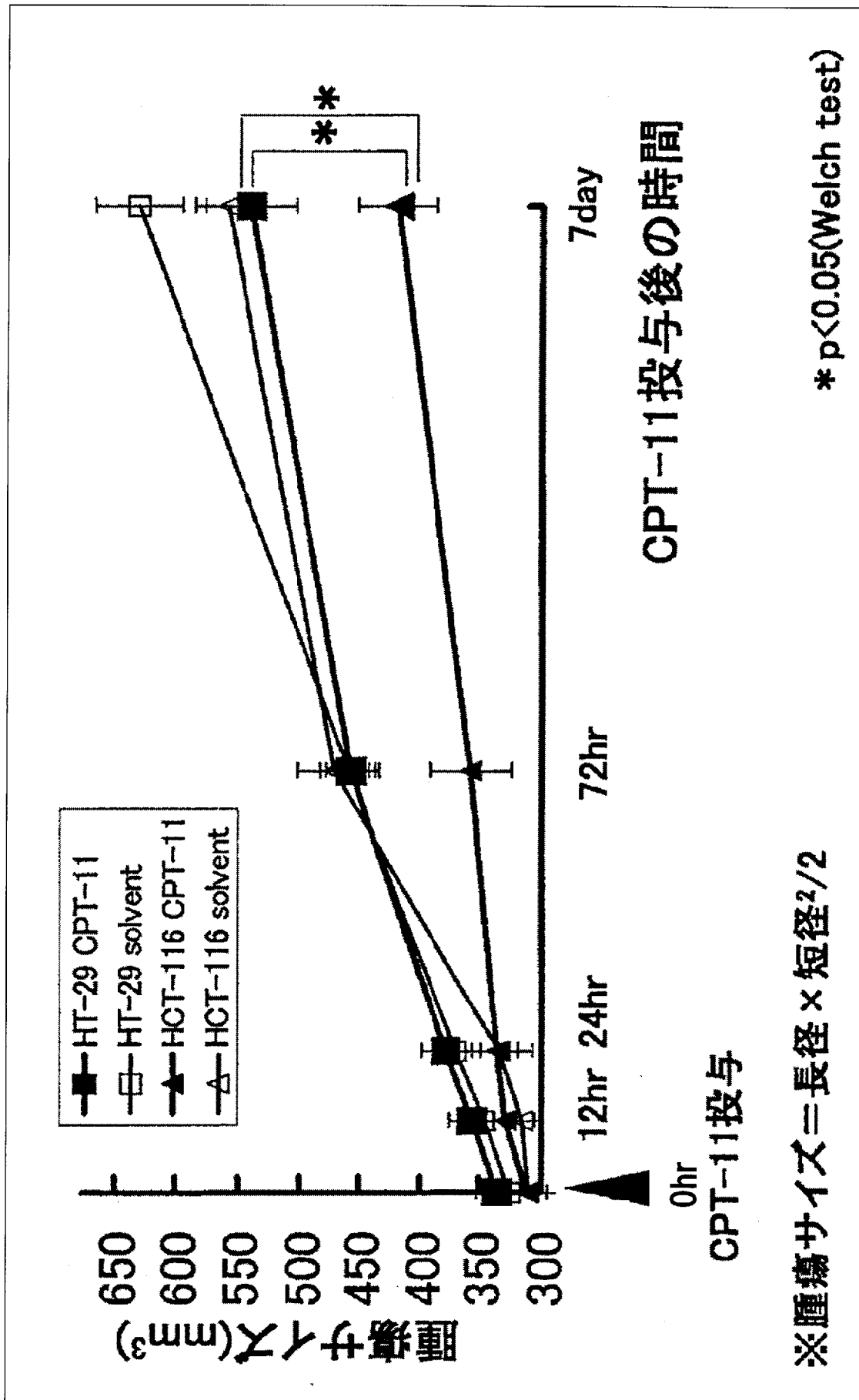
[22] 請求項２１記載の抗がん剤感受性亢進剤と、感受性亢進の対象となる抗がん剤とを組み合わせるがん治療用組成物。

[23] 抗がん剤が、植物アルカロイド系抗がん剤である請求項２２記載のがん治療用組成物。

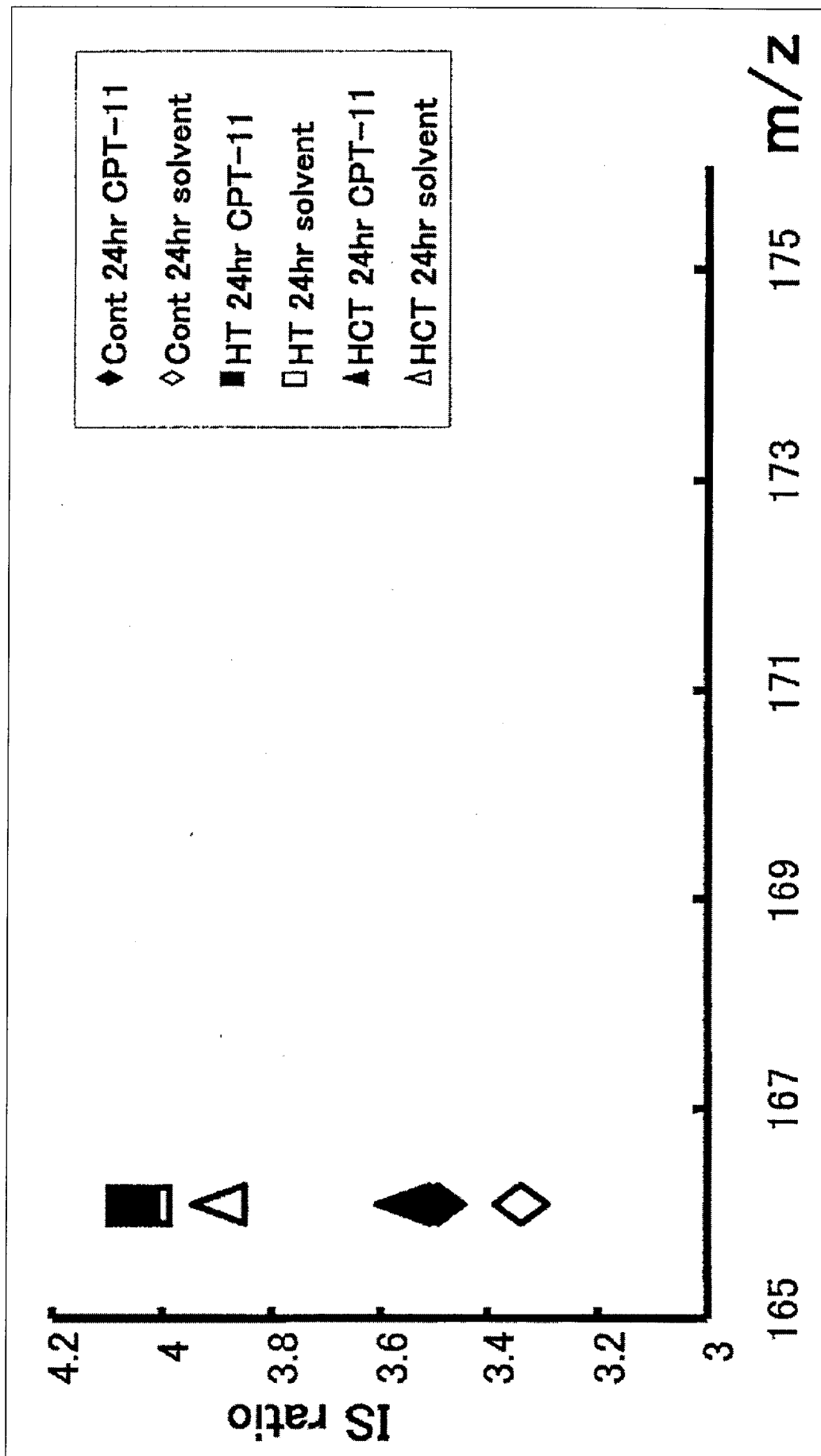
[24] 抗がん剤が、イリノテカン、SN－３８及び／又はそれらの塩である請求項２２記載のがん治療用組成物。

- [25] 請求項 2 1 記載の抗がん剤感受性亢進剤と、感受性亢進の対象となる抗がん剤との組み合わせの、がん治療薬製造のための使用。
- [26] 抗がん剤が、植物アルカロイド系抗がん剤である請求項 2 5 記載の使用。
- [27] 抗がん剤が、イリノテカン、S N - 3 8 及び／又はそれらの塩である請求項 2 5 記載の使用。
- [28] 請求項 2 1 記載の抗がん剤感受性亢進剤と、感受性亢進の対象となる抗がん剤とを投与することを特徴とするがん治療方法。
- [29] 抗がん剤が、植物アルカロイド系抗がん剤である請求項 2 8 記載の方法。
- [30] 抗がん剤が、イリノテカン、S N - 3 8 及び／又はそれらの塩である請求項 2 8 記載の方法。

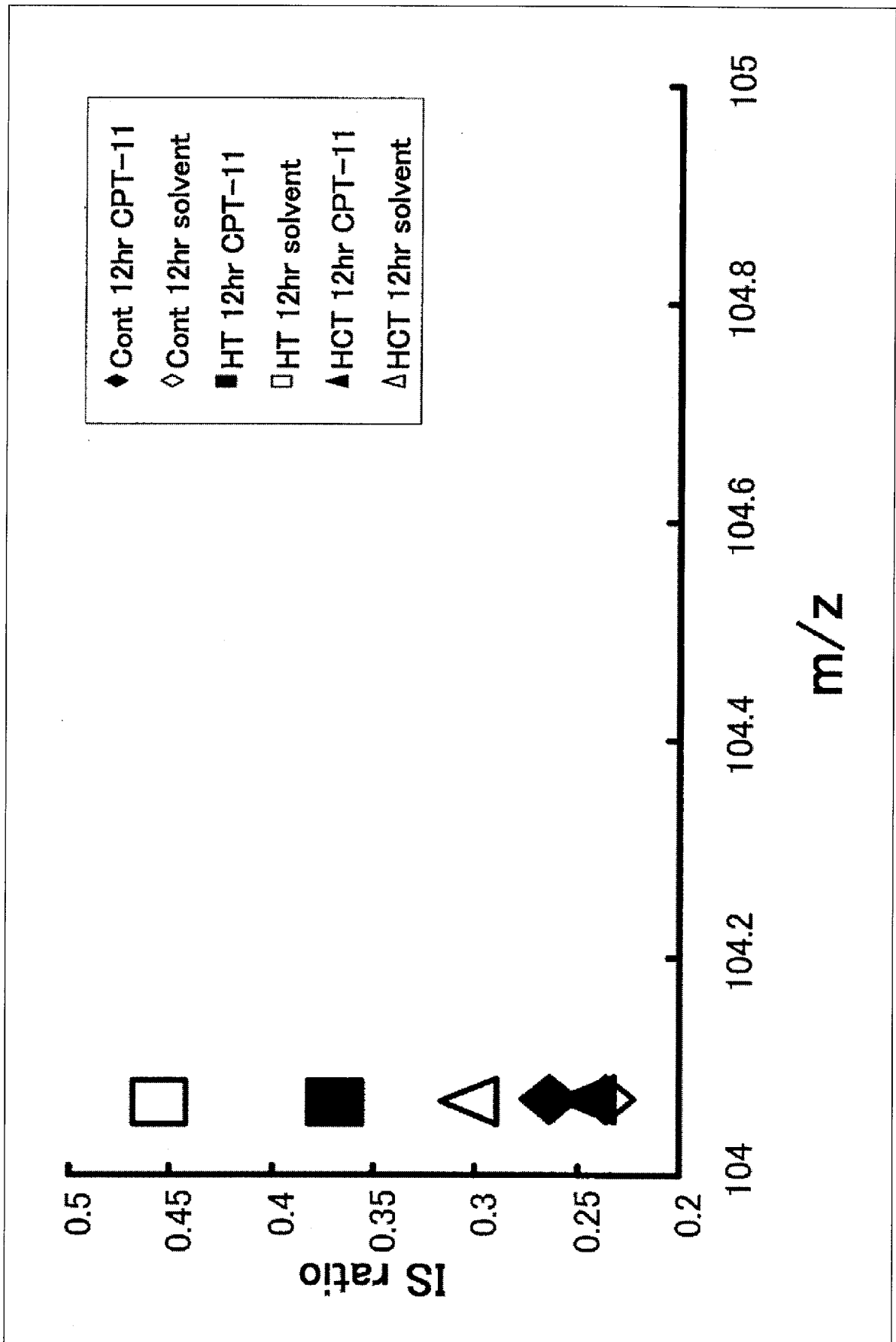
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/000358

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/68(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, G01N27/447(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N33/15
(2006.01)i, G01N33/50(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)

G01N33/68, A61K31/4745, A61K45/00, A61P35/00, G01N27/447, G01N27/62,
G01N33/15, G01N33/50

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	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

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

JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII),

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hironobu MINAMI, "Ko Akuseishuyoyaku Chiryo o Saitekika suru Tameno Rinsho Yakurigakuteki Kenkyu", Ministry of Health, Labour and Welfare Gan Kenkyu Joseikin ni yoru Kenkyu Hokokushu, 2007, Vol.2006, pages 616 to 618	1-20
A	K.Steenkeste, Camptothecins-guanine interactions:mechanism of charge transfer reaction upon photoactivation., Chem.Phys., 2002, Vol.275, No.1-3, P.93-108	1-20

☐ 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, 2009 (30.03.09)

Date of mailing of the international search report
07 April, 2009 (07.04.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/000358

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/SCISEARCH/TOXCENTER (STN)
(IRINOTECAN+CPT (W) 1+SN (W) 38) * (PHENYLALANINE+DIMETHYLGLYCINE)

aINTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/000358

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.: 28-30
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 28 to 30 pertain to methods for treatment of a human.
2. ☒ Claims Nos.: 21-27
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:
Claims 21-27 relate to an enhancer of sensitivity to an anti-cancer agent and a composition for the treatment of cancer which comprises a combination of the enhancer and an anti-cancer agent. However, no specific compound for
(continued to extra sheet)
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:

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 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.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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 SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/000358

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

the enhancer of sensitivity to an anti-cancer agent is mentioned in the description, and it is impossible to conceive as to what types of compounds can be used as the enhancer. Therefore, a meaningful international search cannot be made.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/68(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, G01N27/447(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(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 (I P C))

Int.Cl. G01N33/68, A61K31/4745, A61K45/00, A61P35/00, G01N27/447, G01N27/62, G01N33/15, G01N33/50

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 0 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 0 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 0 9 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(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII),
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/SCISEARCH/TOXCENTER(STN)
(IRINOTECAN+CPT(W)1+SN(W)38)*(PHENYLALANINE+DIMETHYLGLYCINE)

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	南博信, 抗悪性腫瘍薬治療を最適化するための臨床薬理学的研究, 厚生労働省がん研究助成金による研究報告集, 2007, VOL. 2006, P. 616-618	1-20
A	K. Steenkeste, Camptothecins-guanine interactions: mechanism of charge transfer reaction upon photoactivation., Chem. Phys., 2002, Vol. 275, No. 1-3, P. 93-108	1-20

☐ 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

3 0 . 0 3 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

0 7 . 0 4 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

吉田 佳代子

2 J

9 5 1 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 28-30 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 28-30に係る発明は、人間の治療方法である。
2. ☒ 請求項 21-27 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求項 21-27は、抗がん剤感受性亢進剤及び該亢進剤と抗がん剤とを組み合わせるがん治療用組成物であるが、明細書には、抗がん剤感受性亢進剤について、具体的な化合物が全く記載されておらず、どのようなものが抗がん剤感受性亢進剤となり得るのか想定することができないため、有意義な国際調査を行うことができない。
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。