



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101932939 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 08

(21) 申请号 200980103934. 5

(22) 申请日 2009. 01. 30

(30) 优先权数据  
2008-021123 2008. 01. 31 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2010. 08. 02

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2009/000358 2009. 01. 30

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02009/096189 JA 2009. 08. 06

(73) 专利权人 学校法人庆应义塾  
地址 日本东京都  
专利权人 株式会社益力多本社

(72) 发明人 谷川原祐介 渡边光博 有田惠理  
西牟田章户 山吉康子 松崎健  
杉本伸二

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322  
代理人 龙淳

G01N 27/447(2006. 01)  
G01N 27/62(2006. 01)  
G01N 33/15(2006. 01)  
G01N 33/50(2006. 01)

(56) 对比文件

US 20070071762 A1, 2007. 03. 29,  
TE Sawyer. The interaction of buthionine sulphoximide (BSO) and the topoisomerase I inhibitor CPT-11. 《british journal of cancer》. 1996, 第 74 卷  
Mary A Hilton. plasma amino acids during high-dose methotrexate-citrovorum "rescue". 《biochemical medicine》. 1976, 第 16 卷

审查员 刘迎鸣

(51) Int. Cl.  
G01N 33/68(2006. 01)  
A61K 31/4745(2006. 01)  
A61K 45/00(2006. 01)  
A61P 35/00(2006. 01)

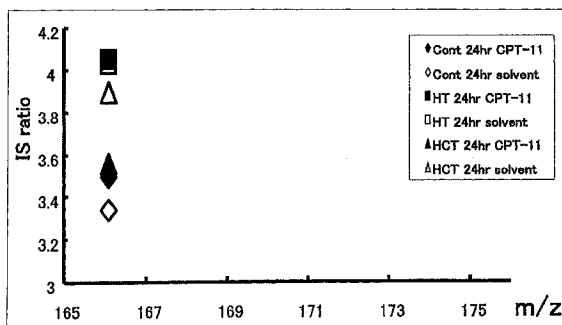
权利要求书1页 说明书9页 附图3页

(54) 发明名称  
抗癌剂感受性判定标记

(57) 摘要

本发明提供一种能够判别各个患者的治疗反应性的抗癌剂感受性判定标记以及利用该抗癌剂感受性判定标记的新的癌治疗手段。一种抗癌剂感受性判定标记,其包括 L- 苯丙氨酸和 / 或 N, N- 二甲基甘氨酸参与的代谢系统中的物质。

CN 101932939 B



1. L- 苯丙氨酸和 / 或 N, N- 二甲基甘氨酸作为抗癌剂感受性判定标记, 在用于判定抗癌剂感受性的试剂盒的制造中的应用, 其特征在于:

所述试剂盒包含用于测定检测体中的 L- 苯丙氨酸和 / 或 N, N- 二甲基甘氨酸的方案, 所述抗癌剂是伊立替康、SN-38 和 / 或它们的盐, 作为感受性判定对象的癌是大肠癌。

2. 如权利要求 1 所述的应用, 其特征在于:

检测体是来自患有癌的被检验者机体的试样。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的应用, 其特征在于:

检测体是来自被投与了抗癌剂的患有癌的被检验者机体的试样。

4. 一种用于判定抗癌剂感受性的试剂盒, 其特征在于:

包含用于测定检测体中的 L- 苯丙氨酸和 / 或 N, N- 二甲基甘氨酸的方案, 所述抗癌剂是伊立替康、SN-38 和 / 或它们的盐, 作为感受性判定对象的癌是大肠癌。

5. 如权利要求 4 所述的试剂盒, 其特征在于:

检测体是来自患有癌的被检验者机体的试样。

6. 如权利要求 4 或 5 所述的试剂盒, 其特征在于:

检测体是来自被投与了抗癌剂的患有癌的被检验者机体的试样。

7. 一种抗癌剂感受性增强剂的筛选方法, 其特征在于:

以 L- 苯丙氨酸和 / 或 N, N- 二甲基甘氨酸的表达抑制作为指标, 所述抗癌剂是伊立替康、SN-38 和 / 或它们的盐, 作为感受性判定对象的癌是大肠癌。

## 抗癌剂感受性判定标记

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于判定作为对象的患者的癌对抗癌剂是否具有治疗反应性而使用的抗癌剂感受性判定标记及其应用。

### 背景技术

[0002] 抗癌剂中包括烷基化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、抗癌性抗生素、抗癌性植物生物碱等种类。这些抗癌剂中,根据癌的种类不同,有时显示效果,有时不显示效果。但是,已知即使是认为有效的种类的癌,也因各个患者而异有时显示效果,有时不显示效果。这种抗癌剂对于各个患者的癌是否显示效果称为抗癌剂感受性。

[0003] 盐酸伊立替康(CPT-11)是由日本开发的具有抑制拓扑异构酶 I 的作用机理的抗癌剂。在日本,CPT-11 作为对非小细胞肺癌、小细胞肺癌、宫颈癌、卵巢癌有效的药剂在 1994 年 1 月得到认可,进而,在 1995 年 7 月确认对胃癌、结肠-直肠癌、乳腺癌、鳞状细胞癌、恶性淋巴瘤适用。特别在大肠癌领域中,CPT-11 作为多种药剂并用疗法的第一线药物或第二线药物而占据世界性标准治疗药物的位置,其有用性得到确认(非专利文献 1~6)。

[0004] 对晚期/转移大肠癌的化学疗法,通过并用在二十世纪 90 年代亮相的 CPT-11、奥沙利铂等关键性药物、和此前作为大肠癌治疗中心药剂的以氟尿嘧啶(5-FU)为中心的氟化嘧啶制剂,以生存率为首的临床成绩得到极大改善。但是,即便如此,所发挥的效率大致为 50%左右,目前的现状是,冒着严重副作用的高风险,被投与抗癌剂的患者有半数不能取得效果,确立一种判别各个治疗反应性(应答/非应答)的抗癌剂感受性预测标记是当务之急。

[0005] 一般而言,癌化学疗法的疗程需要经过长期的时间,在出现副作用的同时反复若干次疗程进行治疗后,才能判断是否获得效果、是否应该继续原来的给药,但事实上,在此之前已经花费了长时间和高额医疗费,而且也产生了副作用。因此,如果存在对于各个患者在治疗早期可以预测是否能够得到效果的手段,就能够减轻患者的负担和副作用的产生,削减医疗费。

[0006] 虽然 CPT-11 自身具有抗肿瘤活性,但在体内被羧酸酯酶活化,转换为抗肿瘤活性比 CPT-11 强约 100~数千倍的 7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38)。据认为 CPT-11 和 SN-38 同时存在于体内而表现抗肿瘤效果。在肝细胞内,SN-38 受到 UDP-葡萄糖醛酸转移酶(UGT:UDP-glucuronosyltransferase)而被葡萄糖醛酸抱合,变为没有细胞毒性的 SN-38 葡萄糖醛酸抱合体(SN-38G),主要向胆汁中排泄而移向肠道,然后由粪便排泄。排泄到肠道中的 SN-38G 的一部分被肠道内细菌具有的  $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶脱抱合,再次变成活性型 SN-38,通过肠道上皮的转运体被重吸收,经过肠肝循环,经过由肠道上皮细胞内的 UGT 进行葡萄糖醛酸抱合化等阶段而被代谢和排泄(非专利文献 7)。据认为此时 SN-38 损伤肠道粘膜而诱发腹泻。另外,据认为其对细胞分裂活跃的骨髓也存在影响,引起红细胞减少、白细胞减少、血小板减少。

[0007] 严重腹泻和中性粒细胞减少症等副作用的原因之一显示为 UGT1A1 遗传多态性引

起的 SN-38 体内暴露量的变化。但是,关于治疗效果,由于从前药即 CPT-11 向活性代谢物 SN-38 转换及其解毒、进而在肠道循环过程中再生成 SN-38、CPT-11 自身代谢和从代谢物生成 SN-38 这种体内动态的复杂性,所以还没有能够根据药物动态预测治疗效果的报告。末梢血单核细胞的羧酸酯酶 mRNA 表达量虽然与 SN-38 和 SN-38G 的 AUC 比相关,但是也没有与肿瘤缩小效果相关的报告(非专利文献 8)。

[0008] 另外,另一方面,作为 CPT-11 感受性或耐性相关的因素,已经报告了作为 SN-38 的标的的拓扑异构酶 I 有无突变和表达量、参与从 CPT-11 向 SN-38 转换的羧酸酯酶活性(非专利文献 9)、影响 CPT-11 和 SN-38 的细胞内积蓄量的转运体(多药耐药蛋白(MRP)-1、MRP-2、乳腺癌耐药蛋白(BCRP)/ABCG2),此外,也研究了细胞增殖抗原 Ki-67、癌抑制基因 p53 等与对使用 CPT-11 治疗的反应性的关连。尤其是最近,尝试在体外通过组合抗癌剂感受性数据和微阵列的数据而系统性地预测抗癌剂感受性,在喜树碱类中,正在对托泊替康进行研究(非专利文献 10)。最近报告,在临床研究中,具有抗凋亡作用的组织金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)的血浆中水平,与针对转移结肠-直肠癌的 CPT-11+5-FU 并用疗法的临床预后显著相关(非专利文献 11)。尽管这种 CPT-11 感受性预测生物标记的必要性得到认识而进行了很多研究,但是也有报告,关于作为标的的拓扑异构酶 I 和称为 5-FU 感受性预测因子的胸腺嘧啶脱氧核苷酸合成酶,与 5-FU+CPT-11 并用疗法的治疗反应性之间未见明确关联性等(非专利文献 12),能够预测治疗反应性的明确的生物标记尚未确立。

[0009] 非专利文献 1 :J Clin Oncol 1993 ;11 :909-913

[0010] 非专利文献 2 :Semin Oncol 1999 ;26(1Suppl 5) :6-12

[0011] 非专利文献 3 :Lancet 1998 ;352 :1407-1412

[0012] 非专利文献 4 :Pro ASCO 2005 :Abstract#3506

[0013] 非专利文献 5 :N Engl J Med 2000 ;343 :905-914

[0014] 非专利文献 6 :Lancet 2000 ;355 :1041-1047

[0015] 非专利文献 7 :Cancer Res 1991 ;51 :4187-4191

[0016] 非专利文献 8 :Clin Cancer Res 2005 ;11 :6901-6907

[0017] 非专利文献 9 :Pharmacogenet Genomics 2007 ;17 :1-10

[0018] 非专利文献 10 :Nat Med 2006 ;12 :1294-1300

[0019] 非专利文献 11 :Clin Cancer Res 2007 ;13 :4117-4122

[0020] 非专利文献 12 :Int J Cancer 2004 ;111 :252-258

## 发明内容

[0021] 本发明的目的在于提供一种能够判别各个患者的治疗反应性的抗癌剂感受性判定标记和利用该抗癌剂感受性判定标记的新的癌治疗手段。

[0022] 因此,本发明的发明人通过使用毛细管电泳-飞行时间质谱仪(CE-TOFMS)全面地分析体内荷癌小鼠中的血清中的代谢组(全部代谢物质的总体),进行抗癌剂感受性判定标记的探索。在裸鼠中分别移植对 SN-38 感受性不同的 2 种来自人的大肠癌细胞株并进行研究,结果发现,在癌移植小鼠组中,特异性上升的代谢物质通过 CPT-11 治疗,只在高感受性组中减少到对照组,进而发现该代谢物质是 L-苯丙氨酸和/或 N,N-二甲基甘氨酸。基于这样的见解进一步研究,结果发现,如果测定来自癌患者机体的试样中的 L-苯丙氨酸和

/或 N,N- 二甲基甘氨酸参与的代谢系统中的物质的浓度,就能够判定该癌患者的癌是否具有抗癌剂感受性,此外,如果以抑制该物质的表达为指标,就能够进行抗癌剂感受性增强剂的筛选,进而,如果并用该抗癌剂感受性增强剂和作为感受性增强对象的抗癌剂,该抗癌剂的治疗效果就能够飞跃性地提高,从而完成了本发明。

[0023] 即,本发明提供一种抗癌剂感受性判定标记,其特征在于,包括 L- 苯丙氨酸和 / 或 N,N- 二甲基甘氨酸参与的代谢系统中的物质。

[0024] 另外,本发明提供一种抗癌剂感受性的判定方法,其特征在于,测定检测体中的 L- 苯丙氨酸和 / 或 N,N- 二甲基甘氨酸参与的代谢系统中的物质。

[0025] 另外,本发明提供一种用于实施抗癌剂感受性的判定方法的试剂盒,其特征在于,包含用于测定检测体中的 L- 苯丙氨酸和 / 或 N,N- 二甲基甘氨酸参与的代谢系统中的物质的方案。

[0026] 本发明还提供一种抗癌剂感受性增强剂的筛选方法,其特征在于,以 L- 苯丙氨酸和 / 或 N,N- 二甲基甘氨酸参与的代谢系统中的物质的表达抑制作为指标。

[0027] 另外,本发明还提供由上述筛选方法得到的抗癌剂感受性增强剂。

[0028] 本发明还提供一种癌治疗用组合物,其特征在于,含有上述抗癌剂感受性增强剂和作为感受性增强对象的抗癌剂的组合。

[0029] 本发明还提供上述抗癌剂感受性增强剂和作为感受性增强对象的抗癌剂的组合在癌治疗药物制造中的使用。

[0030] 本发明还提供一种癌治疗方法,其特征在于,投与上述抗癌剂感受性增强剂和作为感受性增强对象的抗癌剂。

[0031] 发明的效果

[0032] 如果使用本发明的抗癌剂感受性判定标记,就能够在抗癌剂给药前或抗癌剂给药开始后早期且准确地判定各个患者的抗癌剂治疗反应性,从而能够选择治疗效果更高的抗癌剂,作为其结果,能够防止不能期待治疗效果的抗癌剂的继续给药所导致的癌进展、副作用增大,还能够有助于减轻患者的负担,减少医疗费。而且,如果使用该标记,就能够筛选增强抗癌剂感受性的药剂,如果将作为其对象的抗癌剂与抗癌剂感受性增强剂并用,就能够飞跃性地提高癌治疗效果。

## 附图说明

[0033] 图 1 是表示在各组中的荷癌小鼠肿瘤大小的经时变化的图。

[0034] 图 2 是表示在没有移植癌细胞的对照组 (Cont)、SN-38 低感受性的人培养大肠癌细胞 HT-29 移植组 (HT)、SN-38 高感受性的人培养大肠癌细胞 HCT-116 移植组 (HCT) 中,投与 CPT-1124 小时后的裸鼠血清中的苯丙氨酸浓度 (m/z 166.086) 的图。

[0035] 图 3 是表示在没有移植癌细胞的对照组 (Cont)、SN-38 低感受性的人培养大肠癌细胞 HT-29 移植组 (HT)、SN-38 高感受性的人培养大肠癌细胞 HCT-116 移植组 (HCT) 中,投与 CPT-1112 小时后的裸鼠血清中的 N,N- 二甲基甘氨酸浓度 (m/z 104.070) 的图。

## 具体实施方式

[0036] 本发明中的抗癌剂感受性判定标记之一,是 L- 苯丙氨酸参与的代谢系统中的物

质（也称为 L- 苯丙氨酸代谢系统物质），作为该物质，除 L- 苯丙氨酸以外，包括在代谢系统中使 L- 苯丙氨酸浓度上升的所有物质，可以列举增强向 L- 苯丙氨酸代谢的物质、抑制从 L- 苯丙氨酸代谢的物质。在这里，作为增强向 L- 苯丙氨酸代谢的物质，包括在从蛋白质或肽到 L- 苯丙氨酸的代谢系统中的中间体、参与该代谢的酶、辅酶、使该酶的表达量和活性变化的物质等。另外，作为抑制从 L- 苯丙氨酸代谢的物质，可以列举 L- 苯丙氨酸代谢酶的抑制物质、使 L- 苯丙氨酸代谢酶的表达量和活性下降的物质、L- 苯丙氨酸代谢酶的辅酶等。其中，特别优选 L- 苯丙氨酸。

[0037] 本发明中的另一个抗癌剂感受性判定标记，是 N, N- 二甲基甘氨酸参与的代谢系统中的物质（也称为 N, N- 二甲基甘氨酸代谢系统物质），作为该物质，除 N, N- 二甲基甘氨酸以外，包括在代谢系统中使 N, N- 二甲基甘氨酸浓度上升的所有物质，可以列举增强向 N, N- 二甲基甘氨酸代谢的物质、抑制从 N, N- 二甲基甘氨酸代谢的物质。在这里，作为增强向 N, N- 二甲基甘氨酸代谢的物质，包括在从磷脂到 N, N- 二甲基甘氨酸的代谢系统中的中间体、参与该代谢的酶、辅酶、使该酶的表达量和活性变化的物质等。另外，作为抑制从 N, N- 二甲基甘氨酸代谢的物质，可以列举 N, N- 二甲基甘氨酸代谢酶的抑制物质、使 N, N- 二甲基甘氨酸代谢酶的表达量和活性下降的物质、N, N- 二甲基甘氨酸代谢酶的辅酶等。其中，特别优选 N, N- 二甲基甘氨酸。

[0038] 如后述的实施例中所示，相比于癌细胞非移植组，L- 苯丙氨酸和 / 或 N, N- 二甲基甘氨酸在被移植了癌细胞的小鼠的血清中浓度上升。另外，在被移植了 SN-38 低感受性癌细胞的 HT-29 的组中，即使在投与 CPT-11 后，L- 苯丙氨酸和 / 或 N, N- 二甲基甘氨酸浓度也不下降。与此相对，在被移植了 SN-38 高感受性癌细胞的 HCT-116 的组中，L- 苯丙氨酸和 / 或 N, N- 二甲基甘氨酸浓度因投与 CPT-11 而下降到与对照组同等的程度。因此，L- 苯丙氨酸和 / 或 N, N- 二甲基甘氨酸作为 CPT-11、SN-38 等抗癌剂感受性判定标记是有用的。

[0039] 作为本发明的抗癌剂感受性判定标记对象的抗癌剂，只要影响 L- 苯丙氨酸和 / 或 N, N- 二甲基甘氨酸的代谢系统的抗癌剂，就没有特别限定，例如，可以列举 CPT-11、SN-38、奥沙利铂、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、异磷酰胺 (ifosfamide)、噻替哌 (thiotepa)、美法仑 (melphalan)、白消安 (busulfan)、尼莫司汀 (nimustine)、雷莫司汀 (ranimustine)、达卡巴嗪 (dacarbazine)、丙卡巴肼 (procarbazine)、替莫唑胺 (temozolomide)、顺铂 (cisplatin)、卡铂 (carboplatin)、奈达铂 (nedaplatin)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、培美曲塞 (pemetrexed)、氟尿嘧啶 (fluorouracil)、替加氟 / 尿嘧啶 (tegafur/uracil)、脱氧氟尿苷 (doxifluridine)、替加氟 / 吉美拉西 / 奥替拉西 (tegafur/gimeracil/oteracil)、卡培他滨 (capecitabine)、阿糖胞苷 (cytarabine)、依诺他滨 (enocitabine)、吉西他滨 (gemcitabine)、6- 巯基嘌呤 (6-mercaptopurine)、氟达拉滨 (fludarabine)、喷司他汀 (pentostatin)、克拉屈滨 (cladribine)、羟基脲 (hydroxyurea)、多柔比星 (doxorubicin)、表柔比星 (epirubicin)、佐柔比星 (daunorubicin)、依达比星 (idarubicin)、吡柔比星 (pirarubicin)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、氨柔比星 (amurubicin)、放线菌素 D (actinomycin D)、博来霉素 (bleomycin)、派来霉素 (pepleomycin)、丝裂霉素 C (mytomycin C)、阿柔比星 (aclarubicin)、净司他丁 (zinostatin)、长春新碱 (vincristine)、长春地辛 (vindesine)、长春碱 (vinblastine)、长春瑞滨 (vinorelbine)、紫杉醇 (paclitaxel)、

多西紫杉醇 (docetaxel)、托泊替康 (nogitecan, topotecan)、依托泊苷 (etoposide)、泼尼松龙 (prednisolone)、地塞米松 (dexamethasone)、他莫昔芬 (tamoxifen)、托瑞米芬 (toremifene)、甲羟孕酮 (medroxyprogesterone)、阿那曲唑 (anastrozole)、依西美坦 (exemestane)、来曲唑 (letrozole)、利妥昔 (rituximab)、伊马替尼 (imatinib)、吉非替尼 (gefitinib)、吉姆单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamicin)、硼替佐米 (bortezomib)、厄洛替尼 (erlotinib)、西妥昔单抗 (cetuximab)、贝伐单抗 (bevacizumab)、舒尼替尼 (sunitinib)、索拉非尼 (sorafenib)、达沙替尼 (dasatinib)、帕尼单抗 (panitumumab)、门冬酰胺酶 (asparaginase)、维甲酸 (tretinoin)、三氧化二砷 (arsenic trioxide)、或它们的盐、或它们的活性代谢物等。其中, 优选植物生物碱类抗癌剂, 例如, 优选 CPT-11、SN-38 或它们的盐。

[0040] 在使用本发明的抗癌剂感受性判定标记判定抗癌剂感受性时, 测定检测体中的 L- 苯丙氨酸和 / 或 N,N- 二甲基甘氨酸代谢系统物质即可。在这里, 作为检测体, 可以列举来自患有癌的被检验者 (癌患者) 机体的试样, 例如, 可以列举血液、血清、血浆、尿、肿瘤组织 - 细胞、腹水、胸水、脑脊液、便、痰等, 但特别优选血清。

[0041] 另外, 作为本发明对象的癌, 可以列举以喉癌为代表的唇、口腔和喉癌、以食道癌、胃癌、结肠 - 直肠癌等为代表的消化器官癌、以肺癌为代表的呼吸器官和胸腔内脏器官癌、骨骼及关节软骨癌、皮肤的恶性黑色素瘤、鳞状细胞癌及其它皮肤癌、以间皮瘤为代表的间皮和软组织癌、以乳腺癌、子宫癌, 卵巢癌为代表的女性性器官癌、以前列腺癌为代表的男性性器官癌、以膀胱癌为代表的尿路癌、以脑肿瘤为代表的眼、脑和中枢神经系统癌、甲状腺和其它内分泌腺癌, 以非何杰金氏淋巴瘤和淋巴细胞性白血病为代表的淋巴组织、造血组织和关联组织癌、以及以这些癌为原发病灶的转移组织的癌等, 特别是对非小细胞肺癌、小细胞肺癌、宫颈癌、卵巢癌、胃癌、结肠 - 直肠癌、鳞状细胞癌、恶性淋巴瘤能够适合地利用。

[0042] 对于检测体中的 L- 苯丙氨酸、N,N- 二甲基甘氨酸代谢系统物质的测定方法而言, 根据被测定对象物质适当决定即可, 例如, 可以通过 CE-TOFMS、气相色谱 - 质谱联用分析 (GC-MS)、HPLC、免疫学测定法、生物化学测定法等测定。在测定 L- 苯丙氨酸时, 可以通过 CE-TOFMS、HPLC、生物化学测定法等定量测定, 特别是利用酶法根据荧光强度的定量测定是简便的。在测定 N,N- 二甲基甘氨酸时, 可以通过 CE-TOFMS、HPLC、GC-MS 等定量测定。

[0043] 在判定对作为对象的抗癌剂的感受性时, 测定来自抗癌剂给药前和给药后的癌患者机体的试样中的 L- 苯丙氨酸和 / 或 N,N- 二甲基甘氨酸代谢系统物质浓度, 如果 L- 苯丙氨酸和 / 或 N,N- 二甲基甘氨酸代谢类物质浓度在抗癌剂给药前后没有变化, 就能够判定该癌没有抗癌剂感受性, 如果相比于抗癌剂给药前, 在给药后 L- 苯丙氨酸和 / 或 N,N- 二甲基甘氨酸代谢类物质浓度下降, 就能够判定该癌具有抗癌剂感受性。

[0044] 另外, 如果在抗癌剂给药前或给药后初期的阶段中, L- 苯丙氨酸和 / 或 N,N- 二甲基甘氨酸代谢系统物质浓度判断为比规定的标准浓度高, 就能够判定该癌对于作为对象的抗癌剂没有感受性。在对于作为对象的抗癌剂没有感受性时, 不能期待其药效, 这种不能期待药效的抗癌剂的给药被继续时, 存在癌进展、副作用增大的危险。这样, 本发明中的抗癌剂感受性判定标记不仅在抗癌剂治疗反应性的判定中有大的贡献, 而且在防止不能期待药效的抗癌剂的继续给药带来的副作用增大中有大的贡献。

[0045] 在实施本发明的抗癌剂感受性的判定方法时,优选使用包含用于测定检测体中的L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢类物质的方案的试剂盒。在该试剂盒中,包含L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质测定试剂、测定试剂的使用方法和用于判定抗癌剂感受性有无的基准等。在该基准中包含L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质的标准浓度、判断为高的浓度、判断为低的浓度、对测定结果有影响的主要因素及其影响程度等,这些浓度能够根据作为对象的每个抗癌剂设定。使用该基准,能够如上所述进行判定。

[0046] 如果以L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质的表达抑制为指标,就能够筛选抗癌剂感受性增强剂。即,在体外或在体内,抑制L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质表达的物质增强抗癌剂感受性。例如,在荷癌动物中,在抗癌剂投与前后,使L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质的浓度下降增强的物质,就是增强该抗癌剂感受性的物质(抗癌剂感受性增强剂)。另外,在体外,在各种癌细胞株中,在抗癌剂的存在下,使L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质浓度下降的物质,就是增强该抗癌剂感受性的物质(抗癌剂感受性增强剂)。

[0047] 进而,如果以L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质为指标,就能够筛选抗癌剂,即,在体外或在体内,如果某种物质使得L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质浓度下降,则该物质就是抗癌剂。例如,在荷癌动物中投与某种物质后,如果L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质的浓度下降,则该物质就是抗癌剂。另外,在体外,如果某种物质暴露于各种癌细胞株中后,相比于暴露前,L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质的浓度下降,则该物质就是抗癌剂。如果是能够期待药效的抗癌剂,则由于L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质的浓度下降比肿瘤缩小或杀细胞效果更早出现,所以,通过以L-苯丙氨酸和/或N,N-二甲基甘氨酸代谢系统物质为指标进行的筛选,就能够以更短时间的研究判定该物质作为抗癌剂是否有效。从抗癌剂开发伴随的劳力和费用削减方面出发,也能够期待大的效果。

[0048] 如果并用这样得到的抗癌剂感受性增强剂和作为感受性增强对象的抗癌剂,则该抗癌剂的治疗效果就能够飞跃性地提高。作为组合抗癌剂感受性增强剂和作为感受性增强对象的抗癌剂的方式,既可以是包含这两种成分的一个组合物,也可以是各自制剂的组合。另外,这些成分也可以分别采用各自的给药途径。作为在这里使用的作为使用对象的抗癌剂,和上述同样,可以列举CPT-11、SN-38、奥沙利铂、环磷酰胺(cyclophosphamide)、异磷酰胺(ifosfamide)、噻替派(thiotepa)、美法仑(melphalan)、白消安(busulfan)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、丙卡巴肼(procarbazine)、替莫唑胺(temozolomide)、顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奈达铂(nedaplatin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、培美曲塞(pemetrexed)、氟尿嘧啶(flourouracil)、替加氟/尿嘧啶(tegaful/uracil)、脱氧氟尿苷(doxifluridine)、替加氟/吉美拉西/奥替拉西(tegaful/gimeracil/oteracil)、卡培他滨(capecitabine)、阿糖胞苷(cytarabine)、依诺他滨(enocitabine)、吉西他滨(gemcitabine)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、氟达拉滨(fludarabin)、喷司他汀(pentostatin)、克拉屈滨(cladribine)、羟基脲(hydroxyurea)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、佐柔比星(daunorubicin)、依达比星(idarubicin)、吡柔比星(pirarubicin)、米

托蒽醌 (mitoxantrone)、氨柔比星 (amurubicin)、放线菌素 D (actinomycin D)、博来霉素 (bleomycine)、派来霉素 (pepleomycin)、丝裂霉素 C (mytomycin C)、阿柔比星 (acliarubicin)、净司他丁 (zinostatin)、长春新碱 (vincristine)、长春地辛 (vindesine)、长春碱 (vinblastine)、长春瑞滨 (vinorelbine)、紫杉醇 (paclitaxel)、多西紫杉醇 (docetaxel)、托泊替康 (nogitecan, topotecan)、依托泊苷 (etoposide)、泼尼松龙 (prednisolone)、地塞米松 (dexamethasone)、他莫昔芬 (tamoxifen)、托瑞米芬 (toremifene)、甲羟孕酮 (medroxyprogesterone)、阿那曲唑 (anastrozole)、依西美坦 (exemestane)、来曲唑 (letrozole)、利妥昔 (rituximab)、伊马替尼 (imatinib)、吉非替尼 (gefitinib)、吉姆单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamicin)、硼替佐米 (bortezomib)、厄洛替尼 (erlotinib)、西妥昔单抗 (cetuximab)、贝伐单抗 (bevacizumab)、舒尼替尼 (sunitinib)、索拉非尼 (sorafenib)、达沙替尼 (dasatinib)、帕尼单抗 (panitumumab)、门冬酰胺酶 (asparaginase)、维甲酸 (tretinoin)、三氧化二砷 (arsenic trioxide)、或它们的盐、或它们的活性代谢物等。其中, 优选植物生物碱类抗癌剂, 例如, 优选 CPT-11、SN-38 或它们的盐。

[0049] 实施例

[0050] 以下, 列举实施例更详细地说明本发明。

[0051] 实施例 1

[0052] (1) 方法

[0053] (a) 动物

[0054] 使用从日本 CLEA 公司购入的裸鼠 (BALB/cAJcl-nu/nu), 6 周龄的雄性小鼠, 在恒温室中以能够自由摄食的状态给予通常的饲料和饮水。本研究申请按照庆应义塾大学医学部动物实验准则的实验方案并得到承认, 爱护地进行。

[0055] (b) 人培养大肠癌细胞

[0056] SN-38 高感受性的人培养大肠癌 HCT-116 和 SN-38 低感受性的人培养大肠癌 HT-29, 从株式会社益力多总部获得。

[0057] (c) 药剂

[0058] 作为 CPT-11 制剂的 campto™ 和 campto 溶解剂, 从株式会社益力多总部获得。

[0059] (d) 荷瘤小鼠的制作和样品采取

[0060] 在 6 周龄裸鼠的后背部以 200 万个 /100  $\mu$  L/ 小鼠皮下移植 SN-38 低感受性的人培养大肠癌 HT-29 和 SN-38 高感受性的人培养大肠癌 HCT-116。移植后, 使用长径  $\times$  短径<sup>2</sup>/2 的式子测定肿瘤大小, 在肿瘤大小达到为 300 ~ 400mm<sup>3</sup> 的时刻, 随机分为 CPT-11 给药组和溶解剂给药组, 作为 0 日, 在 CPT-11 给药组中, 从尾静脉慢慢投与 4.5mL/kg (作为 CPT-11 量是 90mg/kg) 作为 CPT-11 制剂的 campto™, 作为 CPT-11 非给药组, 从尾静脉慢慢投与 campto™ 的溶解剂 (D- 山梨糖醇、乳酸、pH 调节剂)。在 0 日、投与 12 小时后、24 小时后、72 小时后、7 日后测定肿瘤大小, 解剖后进行采血。采取的血液以 10,000rpm 离心分离 10 分钟后, 将血清组分在液氮中冷冻, 在 -80℃ 中保存, 直至用于代谢组用样品的制备。作为对照组, 也制作癌细胞非移植组, 施加同样的处置。

[0061] (e) 代谢组样品的制备

[0062] 在小鼠解剖后以 -80℃ 保存的血清中加入添加了内部标准物质 (IS) 的甲醇溶液,

使蛋白质变性后,加入氯仿和超纯水 (MilliQ 水),进行液-液萃取,除去夹杂成分。采取包含代谢物的水-甲醇层,使用截断分子量 5000kDa 的离心超滤过滤器进行除蛋白后,将滤液减压干燥,在  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。在临测定前,使之在超纯水中溶解,以供代谢组测定。

#### [0063] (f) 代谢组测定

[0064] 血清中代谢物的全面性测定由 Agilent Technologies 公司的毛细管电泳-飞行时间质谱仪 (CE-TOFMS) 进行。在本研究中,以使毛细管出口成为阴极的方式施加电压,全面地测定阳离子性的代谢物。

#### [0065] (g) 分析方法

[0066] 所得到的峰使用峰自动抽出软件即 Molecular Feature Extrator (Agilent Technologies, Inc.), 以  $m/z$  50 ~ 1000、RT 0 ~ 50 分钟、S/N 比 2 以上的条件使峰自动抽出,在 Microsoft excel™ 上,以  $m/z$  为横轴,以峰强度的 IS ratio 为纵轴进行标绘。作为分析方法,在 Microsoft excel™ 上,将横轴  $m/z$  细致地标绘,进行每一个峰的表达式之差的确认。

#### [0067] (2) 结果

[0068] 在裸鼠后背部移植 SN-38 高感受性的人培养大肠癌 HCT-116 和 SN-38 低感受性的人培养大肠癌 HT-29 后,使用长径  $\times$  短径<sup>2</sup>/2 的式子测定肿瘤大小。在肿瘤大小达到 300 ~ 400mm<sup>3</sup> 的时刻,随机分为 CPT-11 给药组和溶解剂给药组,测定 0 日和投与 12 小时后、24 小时后、72 小时后和 7 日后的肿瘤大小,在图 1 中表示该结果。在投与 7 日后,移植 SN-38 高感受性的人培养大肠癌 HCT-116,在 CPT-11 给药组和溶解剂给药组中可以确认有显著差异 ( $p = 0.01319$ )。另外,在移植 SN-38 高感受性的人培养大肠癌 HCT-116 并投与了 CPT-11 的组、和移植作为 CPT-11 低感受性的人培养大肠癌 HT-29 并投与了 CPT-11 的组中,也可以确认有显著差异 ( $p = 0.04979$ )。因此可以确认,本研究中使用的人培养大肠癌 HCT-116 与人培养大肠癌 HT-29 相比,对 CPT-11 的感受性高,反之,人培养大肠癌 HT-29 与人培养大肠癌 HCT-116 相比,对 CPT-11 的感受性低。

[0069] 每 1 个样品所检出的峰的数量平均为 263 个。个别地进行以目测分析各峰变化的图形后,可以得到能够作为显示 CPT-11 药剂反应性的生物标记的候补峰。该候补峰是测定 CPT-11 或溶解剂投与 24 小时后的血清中代谢物得到的  $m/z$  166.086 峰 (图 2),和测定 CPT-11 或溶解剂投与 12 小时后的血清中代谢物得到的  $m/z$  104.070 峰 (图 3)。

[0070] 对于  $m/z$  166.086 的峰而言,在移植了 SN-38 低感受性的人培养大肠癌 HT-29 的荷癌小鼠中,在药剂投与 24 小时后,在 CPT-11 给药组和溶解剂给药组中,血清中的表达量是同等程度的。但是,在移植了 SN-38 高感受性的人培养大肠癌 HCT-116 的荷癌小鼠中,在药剂投与 24 小时后,在 CPT-11 给药组中,血清中的峰表达量下降到与没有移植癌细胞的对照组同等程度。因此,可以分为 CPT-11 无效组和 CPT-11 有效组,可以认为其为显示药剂反应性的标记。关于该峰,使用分析软件 Analyst™QS (Applied Biosystems, Inc.) 进行分子式的推定。根据相对于母峰的同位素比例、精密质量等信息鉴定分子式,结果,作为候补峰的  $m/z$  166.086 的分子式为  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}_2$ 。使用京都大学制作的 KEGG:生命系统信息综合数据库 (<http://www.kegg.jp/>) 的代谢数据库,检索从该分子式推定的物质,判明该峰是 L-苯丙氨酸。

[0071] 对于  $m/z$  104.070 的峰而言,在移植了 SN-38 低感受性的人培养大肠癌 HT-29 的

荷癌小鼠中,在药剂投与 12 小时后,在 CPT-11 给药组和溶解剂给药组中,血清中的表达量是同等程度的。但是,在移植了 SN-38 高感受性的人培养大肠癌 HCT-116 的荷癌小鼠中,在药剂投与 12 小时后,在 CPT-11 给药组中,血清中的峰表达量下降到与没有移植癌细胞的对照组同等程度。因此,可以分为 CPT-11 无效组和 CPT-11 有效组,可以认为其为显示药剂反应性的标记。关于该峰,使用分析软件 Analyst<sup>TM</sup>QS(Applied Biosystems, Inc.) 进行分子式的推定。根据相对于母峰的同位素比例、精密质量等信息鉴定分子式,结果,作为候补峰的 m/z 104.070 的分子式为 C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>。使用京都大学制作的 KEGG :生命系统情报综合数据库 (<http://www.kegg.jp/>) 的代谢数据库,检索从该分子式推定的物质,得到 4 种候补化合物。通过使用标准品的添加试验,判明该峰是 N, N- 二甲基甘氨酸。

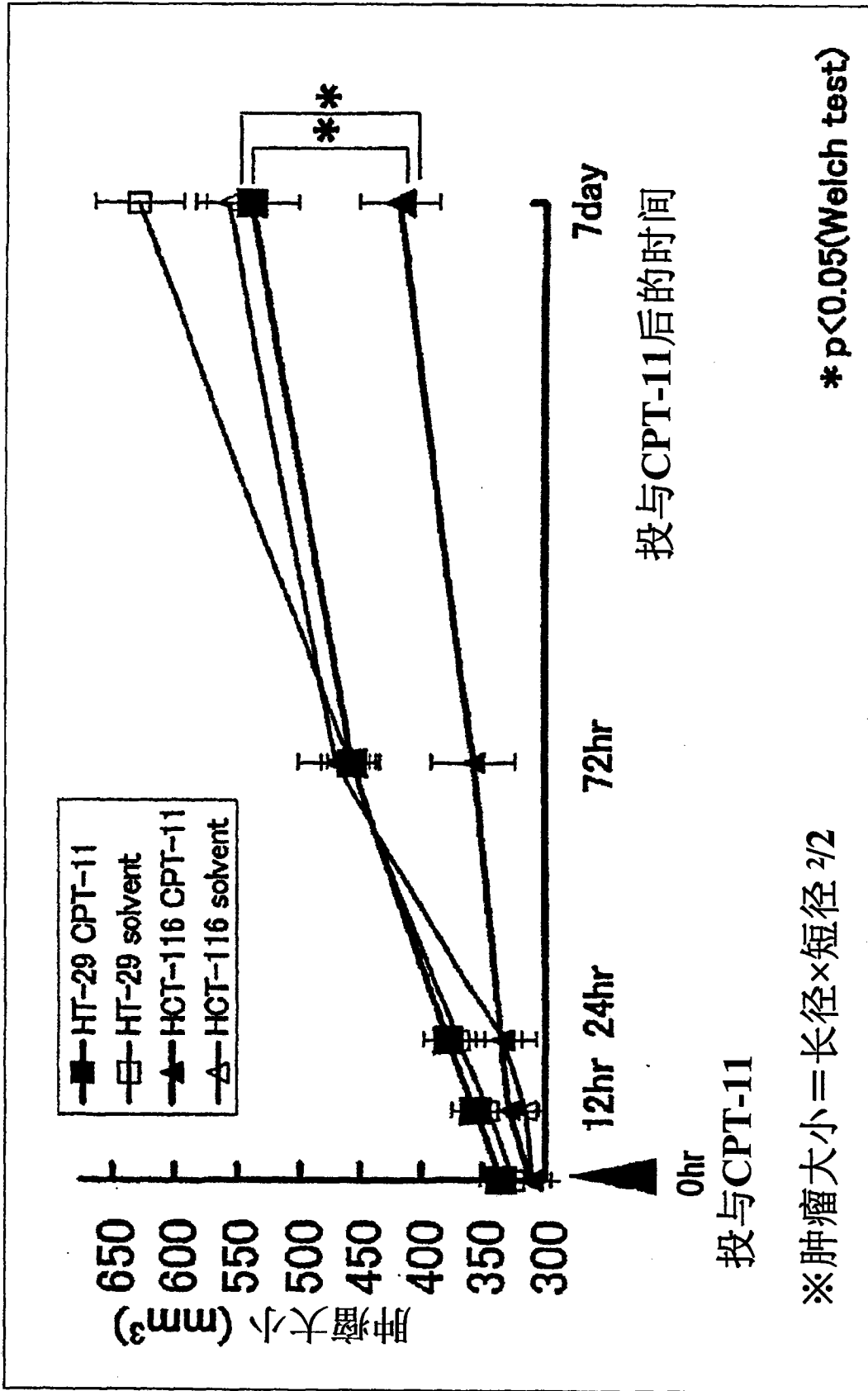


图 1

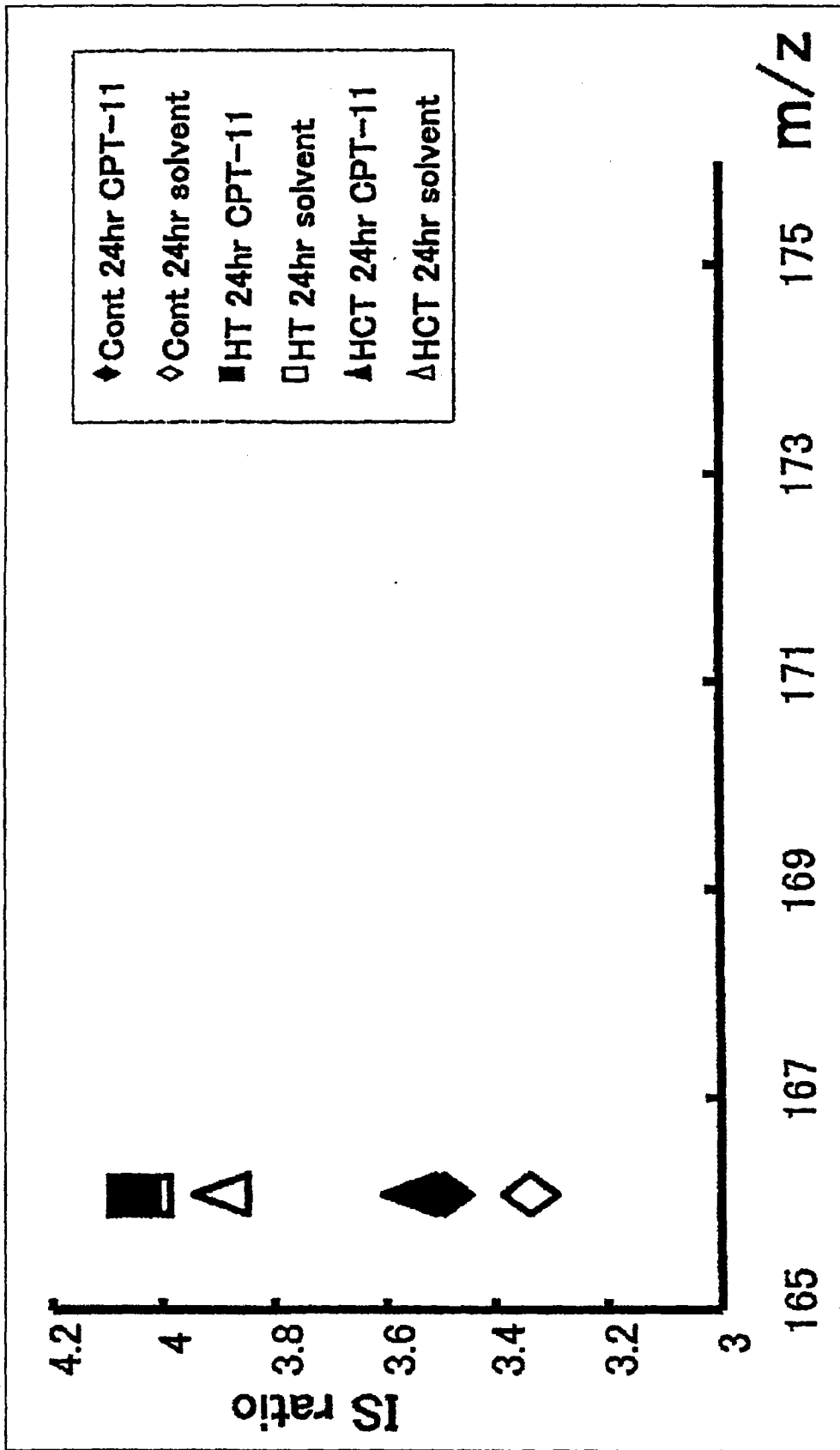


图 2

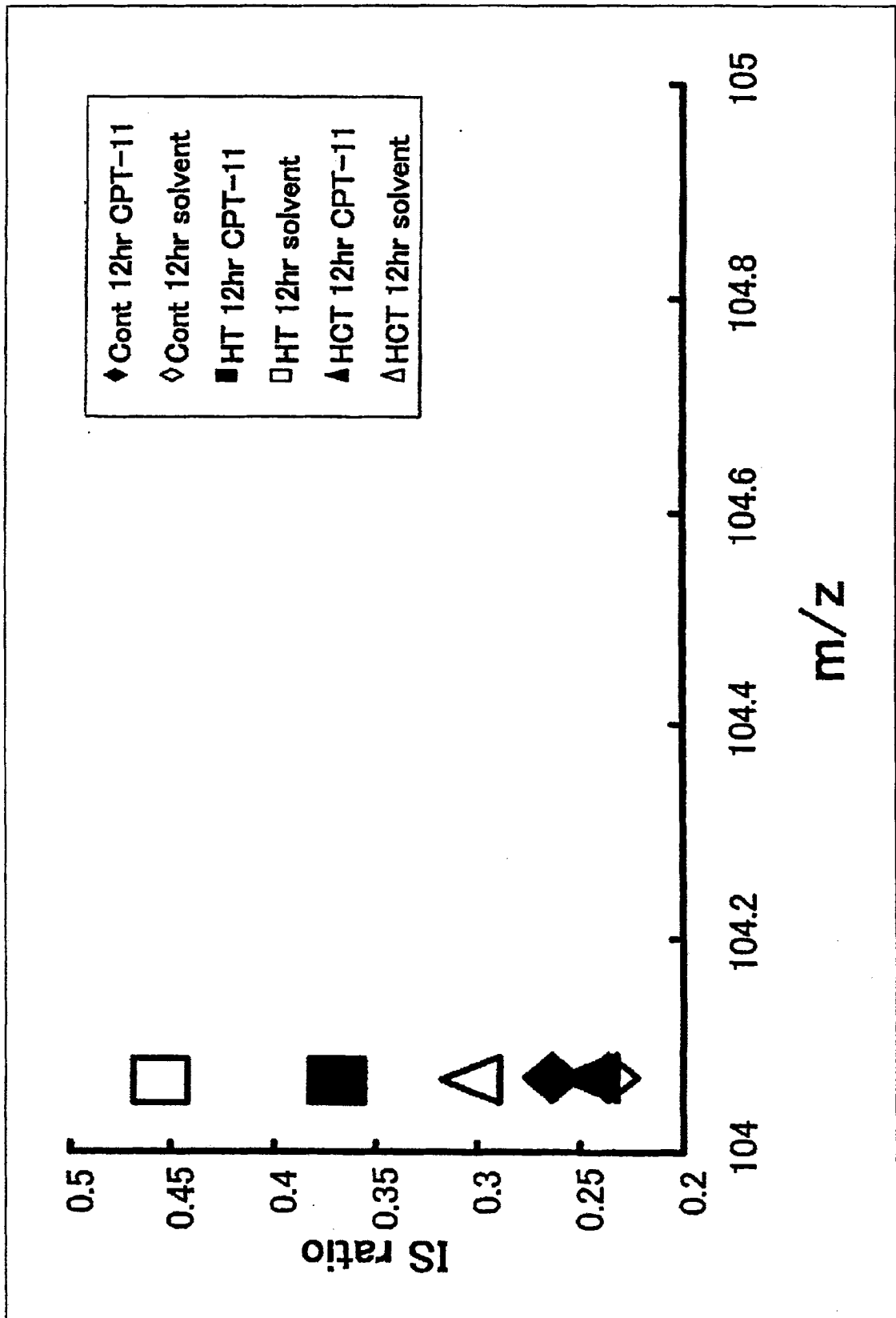


图 3