

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/131066

発行日 平成30年11月22日 (2018.11.22)

(43) 国際公開日 平成29年8月3日 (2017.8.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 1	4 C 0 8 5
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 D	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	
	A 6 1 K 39/395 E	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2017-563804 (P2017-563804)	(71) 出願人 504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/002645	(74) 代理人 100077012 弁理士 岩谷 龍
(22) 国際出願日 平成29年1月26日 (2017.1.26)	(72) 発明者 武藤 学 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内
(31) 優先権主張番号 特願2016-14465 (P2016-14465)	(72) 発明者 吉岡 正博 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内
(32) 優先日 平成28年1月28日 (2016.1.28)	Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 CC23 EE01
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER 2 タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択するためのキットおよび方法

(57) 【要約】

本発明は、HER 2 タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択するためのキットおよび方法を提供する。本発明のキットは、試料が流れる方向の上流から順に、試料を添加するサンプルパッド、第一の抗HER 2 タンパク質抗体が保持されたコンジュゲートパッド、第二の抗HER 2 タンパク質抗体および第一の抗HER 2 タンパク質抗体に結合する抗体が固相化された領域を有するメンブレン、吸収パッドが連結された構成を有し、第一の抗HER 2 タンパク質抗体および第二の抗HER 2 タンパク質抗体のいずれか一方に、HER 2 タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬を用いたラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを含み、本発明の方法は、当該テストストリップを用いたラテラルフローイムノアッセイにより患者のがん組織中のHER 2 タンパク質を検出する工程を含む。

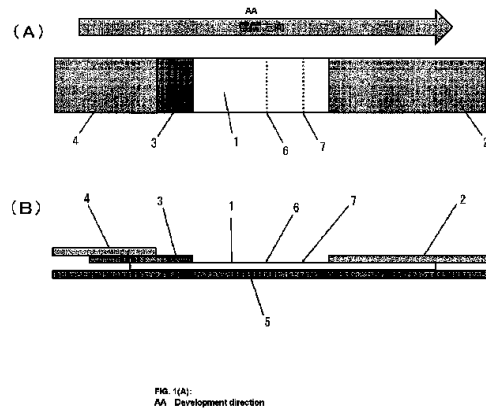


FIG. 1(A): AA Development direction

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択するためのキットであって、がん組織中のHER2タンパク質を検出するためのラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを含み、該テストストリップは、試料が流れる方向の上流から順に、試料を添加するサンプルパッド、第一の抗HER2タンパク質抗体が保持されたコンジュゲートパッド、第二の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域および第一の抗HER2タンパク質抗体に結合する抗体が固相化された領域を有するメンブレン、ならびに吸収パッドが連結された構成を有し、前記第一の抗HER2タンパク質抗体および第二の抗HER2タンパク質抗体のいずれか一方に、前記抗体医薬を用いることを特徴とするキット。

10

**【請求項 2】**

前記抗体医薬が、トラスツズマブ、ペルツズマブおよびトラスツズマブ - エムタンシンからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 に記載のキット。

**【請求項 3】**

前記第一の抗HER2タンパク質抗体がコロイド微粒子で標識されていることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のキット。

**【請求項 4】**

前記第一の抗HER2タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のキット。

20

**【請求項 5】**

前記第二の抗HER2タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のキット。

**【請求項 6】**

前記メンブレンが、第三の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域、または、第三の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域と第四の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域をさらに含み、前記第二の抗HER2タンパク質抗体、前記第三の抗HER2タンパク質抗体および前記第四の抗HER2タンパク質抗体はそれぞれ異なる前記抗体医薬であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のキット。

**【請求項 7】**

被験者から採取されたがん組織から調製したタンパク質抽出液を試料とすることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載のキット。

30

**【請求項 8】**

前記がん組織が生検組織であることを特徴とする請求項 7 に記載のキット。

**【請求項 9】**

前記がん組織が上部消化管のがん組織であることを特徴とする請求項 7 または 8 に記載のキット。

**【請求項 10】**

HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択する方法であって、以下の工程(1)~(3)を含むことを特徴とする方法：

40

- (1) 被験者から採取されたがん組織から試料を調製する工程、
- (2) 前記HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬を用いたラテラルフローイムノアッセイにより前記試料中のHER2タンパク質を検出する工程、および
- (3) 前記ラテラルフローイムノアッセイで陽性を示した被験者を選択する工程。

**【請求項 11】**

前記抗体医薬が、トラスツズマブ、ペルツズマブおよびトラスツズマブ - エムタンシンからなる群より選択されることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記工程(2)において、試料が流れる方向の上流から順に、試料を添加するサンプルパッド、第一の抗HER2タンパク質抗体が保持されたコンジュゲートパッド、第二の抗

50

HER2タンパク質抗体が固相化された領域および第一の抗HER2タンパク質抗体に結合する抗体が固相化された領域を有するメンブレン、ならびに吸収パッドが連結された構成を有するラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを用い、前記第一の抗HER2タンパク質抗体および第二の抗HER2タンパク質抗体のいずれか一方に、前記抗体医薬を用いることを特徴とする請求項10または11に記載の方法。

【請求項13】

前記第一の抗HER2タンパク質抗体がコロイド微粒子で標識されていることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記第一の抗HER2タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする請求項12または13に記載の方法。

10

【請求項15】

前記第二の抗HER2タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする請求項12または13に記載の方法。

【請求項16】

前記メンブレンが、第三の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域、または、第三の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域と第四の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域をさらに含み、前記第二の抗HER2タンパク質抗体、前記第三の抗HER2タンパク質抗体および前記第四の抗HER2タンパク質抗体はそれぞれ異なる抗体医薬であることを特徴とする請求項12または13に記載の方法。

20

【請求項17】

前記がん組織が生検組織であることを特徴とする請求項10～16のいずれかに記載の方法。

【請求項18】

前記がん組織が上部消化管のがん組織であることを特徴とする請求項10～17のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択するためのキットおよび方法に関するものである。

30

【背景技術】

【0002】

HER2タンパク質はヒトがん遺伝子HER2/neu(c-erbB-2)の遺伝子産物で、HERファミリーとして知られる一連の上皮系増殖因子受容体タンパク質(HER1~4)の一つであり、細胞質側にチロシンキナーゼ活性領域を有する分子量約185000の膜貫通型タンパク質である。HER2タンパク質は、細胞表面に発現したHERファミリータンパク質とホモダイマーまたはヘテロダイマーを形成して、上皮系増殖因子の増殖シグナルを核に伝達する役割を担っている。これまでに、乳がん、胃がん、食道がん、大腸がん、胆管がん、胆嚢がん、非小細胞肺がん、頭頸部がん、膀胱がん、卵巣がん、子宮がん、唾液腺がんなどの一定の患者にHER2の過剰発現が確認されており、予後とHER2過剰発現の関連が研究されている。

40

【0003】

HER2タンパク質を標的とする分子標的薬として、抗HER2ヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ(商品名「ハーセプチン(登録商標)」)が薬価収載されており、HER2過剰発現が確認された乳がん、および、HER2過剰発現が確認された治癒切除不能な進行・再発の胃がんについての適用が承認されている。近年、分子標的薬の開発による治癒率の向上がもたらされる一方で、医療経済性も重視され、より適正な対象への使用が求められることから、トラスツズマブについても投与に先立って、その標的分子であるHER2タンパク質の過剰発現を確認する検査およびHER2遺伝子増幅を確認す

50

る検査が不可欠となっている。胃がんの場合、HER2タンパク過剰発現には免疫組織化学(IHC)、HER2遺伝子増幅にはin situ hybridization(ISH)法が使用されている(非特許文献1)。

【0004】

非特許文献2には、胃がん61症例で、手術前の内視鏡下生検により得られた試料と手術により得られた試料とのHER2過剰発現検査結果の一致率が報告されている。これによれば、生検試料で陰性結果が得られた後に、手術により得られた試料で陽性結果が得られた症例が3例(4.9%)あった。この結果は、生検試料で偽陰性が発生することを示しており、これらの患者は本来トラスツズマブによる治療が有効であるにも関わらず、その後手術試料で陽性の結果が得られない限りトラスツズマブによる標準治療が受けられないことを意味する。すなわち、現行の検査法は生検試料で正確な判断を行うには不十分であると言わざるを得ない。

10

【0005】

このように、現行の生検試料を用いるHER2過剰発現検査(IHCおよびISH)では、数%程度の偽陰性が発生するため、トラスツズマブによる治療の恩恵に与るべき症例が見逃される可能性がある。また、IHCおよびISHのどちらも工程数が多く、手技が煩雑で、検査結果に影響を与える因子が複数存在し、施設や病理医師により結果が異なる場合がある。さらに、生検試料採取から検査結果が得られるまで数日から数週間を要し、迅速性に欠けるという問題もある。それゆえ、迅速、簡便かつ確実にHER2過剰発現患者を選択できる検査方法の確立が望まれている。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, et al: Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet 2010 Aug 28;376(9742):687-97.

【非特許文献2】Pirrelli M, Caruso ML, Di Maggio M, Armentano R, Valentini AM. Are biopsy specimens predictive of HER2 status in gastric cancer patients? Digestive diseases and sciences. 2013;58(2):397-404.

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、生検試料を用いても偽陰性が発生せず、迅速、簡便かつ確実にHER2タンパク質過剰発現患者を選択できるキットおよび方法を提供することを課題とする。また本発明は、HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択するためのキットおよび方法を提供することを課題とする。さらに本発明は、患者に適した抗体医薬を選択できるキットおよび方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

40

本発明は、上記の課題を解決するために以下の各発明を包含する。

[1] HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択するためのキットであって、がん組織中のHER2タンパク質を検出するためのラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを含み、該テストストリップは、試料が流れる方向の上流から順に、試料を添加するサンプルパッド、第一の抗HER2タンパク質抗体が保持されたコンジュゲートパッド、第二の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域および第一の抗HER2タンパク質抗体に結合する抗体が固相化された領域を有するメンブレン、ならびに吸収パッドが連結された構成を有し、前記第一の抗HER2タンパク質抗体および第二の抗HER2タンパク質抗体のいずれか一方に、前記抗体医薬を用いることを特徴とするキット。

50

[ 2 ] 前記抗体医薬が、トラスツズマブ、ペルツズマブおよびトラスツズマブ - エムタンシンからなる群より選択されることを特徴とする前記 [ 1 ] に記載のキット。

[ 3 ] 前記第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体がコロイド微粒子で標識されていることを特徴とする前記 [ 1 ] または [ 2 ] に記載のキット。

[ 4 ] 前記第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のキット。

[ 5 ] 前記第二の抗 H E R 2 タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする前記 [ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれかに記載のキット。

[ 6 ] 前記メンブレンが第三の抗 H E R 2 タンパク質抗体が固相化された領域、または、第三の抗 H E R 2 タンパク質抗体が固相化された領域と第四の抗 H E R 2 タンパク質抗体が固相化された領域をさらに含み、前記第二の抗 H E R 2 タンパク質抗体、前記第三の抗 H E R 2 タンパク質抗体および前記第四の抗 H E R 2 タンパク質抗体はそれぞれ異なる前記抗体医薬であることを特徴とする前記 [ 1 ] ~ [ 3 ] のいずれかに記載のキット。

[ 7 ] 被験者から採取されたがん組織から調製したタンパク質抽出液を試料とすることを特徴とする前記 [ 1 ] ~ [ 6 ] のいずれかに記載のキット。

[ 8 ] 前記がん組織が生検組織であることを特徴とする前記 [ 7 ] に記載のキット。

[ 9 ] 前記がん組織が上部消化管のがん組織であることを特徴とする前記 [ 7 ] または [ 8 ] に記載のキット。

[ 10 ] H E R 2 タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択する方法であって、以下の工程 ( 1 ) ~ ( 3 ) を含むことを特徴とする方法：

( 1 ) 被験者から採取されたがん組織から試料を調製する工程、

( 2 ) 前記 H E R 2 タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬を用いたラテラルフローイムノアッセイにより前記試料中の H E R 2 タンパク質を検出する工程、および

( 3 ) 前記ラテラルフローイムノアッセイで陽性を示した被験者を選択する工程。

[ 11 ] 前記抗体医薬が、トラスツズマブ、ペルツズマブおよびトラスツズマブ - エムタンシンからなる群より選択されることを特徴とする前記 [ 10 ] に記載の方法。

[ 12 ] 前記工程 ( 2 ) において、試料が流れる方向の上流から順に、試料を添加するサンプルパッド、第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体が保持されたコンジュゲートパッド、第二の抗 H E R 2 タンパク質抗体が固相化された領域および第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体に結合する抗体が固相化された領域を有するメンブレン、ならびに吸収パッドが連結された構成を有するラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを用い、前記第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体および第二の抗 H E R 2 タンパク質抗体のいずれか一方に、前記抗体医薬を用いることを特徴とする前記 [ 10 ] または [ 11 ] に記載の方法。

[ 13 ] 前記第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体がコロイド微粒子で標識されていることを特徴とする前記 [ 12 ] に記載の方法。

[ 14 ] 前記第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする前記 [ 12 ] または [ 13 ] に記載の方法。

[ 15 ] 前記第二の抗 H E R 2 タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする前記 [ 12 ] または [ 13 ] に記載の方法。

[ 16 ] 前記メンブレンが、第三の抗 H E R 2 タンパク質抗体が固相化された領域、または、第三の抗 H E R 2 タンパク質抗体が固相化された領域と第四の抗 H E R 2 タンパク質抗体が固相化された領域をさらに含み、前記第二の抗 H E R 2 タンパク質抗体、前記第三の抗 H E R 2 タンパク質抗体および前記第四の抗 H E R 2 タンパク質抗体はそれぞれ異なる抗体医薬であることを特徴とする前記 [ 12 ] または [ 13 ] に記載の方法。

[ 17 ] 前記がん組織が生検組織であることを特徴とする前記 [ 10 ] ~ [ 16 ] のいずれかに記載の方法。

[ 18 ] 前記がん組織が上部消化管のがん組織であることを特徴とする前記 [ 10 ] ~ [ 17 ] のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

10

20

30

40

50

本発明によれば、生検試料を用いても偽陰性が発生せず、迅速、簡便かつ確実にHER2タンパク質過剰発現患者を選択できるキットおよび方法を提供することができる。また、本発明は、HER2タンパク質を検出するための抗体にHER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬を用いるので、当該抗体医薬の患者に対する有効性を評価することができる。さらに、現行の生検試料を用いるHER2過剰発現検査（IHCおよびISH）と比較して操作が簡単で熟練を要しないので、精度管理が向上し、施設間や判定医師間での結果のばらつきを改善することができる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】本発明で用いるラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップの一例の構造を示す模式図であり、(A)は平面図、(B)は側面図である。

10

【図2】各種胃がん細胞株から調製したタンパク質抽出液中のHER2タンパク質をウエスタンブロッティング法で確認した結果と、試料中のHER2タンパク質濃度をウエスタンブロッティング画像に基づくデンシトメトリーで定量した結果を示す図である。

【図3】各種胃がん細胞株から調製したタンパク質抽出液中のHER2タンパク質を、実施例1のハーフストリップを用いて検出した結果を示す図である。

【図4】MKN7細胞から調製したタンパク質抽出液中のHER2タンパク質を、トラスツズマブの固相化量が異なる5種類のハーフストリップを用いて検出した結果を示す図である。

【図5】MKN7細胞およびHER2の発現レベルが低い乳がん細胞株MCF7から調製したタンパク質抽出液中のHER2タンパク質を、実施例1のラテラルフローストリップを用いて検出した結果を示す図である。

20

【図6】各種胃がん細胞株から調製したタンパク質抽出液中のHER2タンパク質をウエスタンブロッティング法で確認し、試料中の単位タンパク質当たりのHER2タンパク質量をELISAで定量した結果を示す図である。

【図7】各種胃がん細胞株から調製したタンパク質抽出液に含まれるHER2タンパク質を、実施例5のラテラルフローストリップを用いて検出した結果を示す図である。

【図8】GLM1細胞から調製したタンパク質抽出液を希釈した試料中のHER2タンパク質を、実施例5のラテラルフローストリップを用いて検出した結果を示す図である。

【図9】ヌードマウスの皮下に形成させたGLM1細胞由来の腫瘍およびMKN45細胞由来の腫瘍、ならびにHER2陽性胃がん患者から採取した生検検体から調製したタンパク質抽出液中のHER2タンパク質を、実施例5のラテラルフローストリップを用いて検出した結果を示す図である。

30

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択するためのキットを提供する。また本発明は、HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択する方法を提供する。本発明のキットおよび方法は、どちらもHER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬を用いたラテラルフローイムノアッセイにより、がん組織中のHER2タンパク質を検出することを特徴としている。本発明は、試料中のHER2タンパク質を検出するために構成されたラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを用いて実施することが好ましい。

40

【0012】

本発明に使用することができるラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップの基本構成は特に限定されず、通常のラテラルフローイムノアッセイに使用される公知のテストストリップの構成を採用することができる。例えば、図1に示すようにメンブレン1、吸収パッド2、コンジュゲートパッド3、サンプルパッド4およびバックシート5から構成され、試料が流れる方向の上流から順に(図1の展開方向の矢印の方向に)、サンプルパッド4、コンジュゲートパッド3、メンブレン1および吸収パッド2が連結されたテストストリップを好適に用いることができる。

50

## 【 0 0 1 3 】

## 〔メンブレン〕

メンブレンは、クロマトグラフ媒体として短時間での判定で十分な感度を得られる展開速度を有するものであれば、その素材は限定されない。例えばニトロセルロース膜、セルロース膜、アセチルセルロース膜、ポリスルホン膜、ポリエーテルスルホン膜、ナイロン膜、ガラス繊維、不織布、濾紙などを好ましく用いることができる。メンブレンには、後述するように、抗体が固相化された領域が形成される。

## 【 0 0 1 4 】

## 〔サンプルパッド〕

サンプルパッドの素材としては、例えばセルロース膜、ガラス繊維、ポリウレタン、ボリアセテート、セルロースアセテート、ナイロン、綿布等の均一な特性を有するものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。サンプルパッドは試料を添加する部分であるが、試料中の不溶物粒子等を濾過する機能も有する。

10

## 【 0 0 1 5 】

## 〔コンジュゲートパッド〕

コンジュゲートパッドの素材としては、例えばセルロース膜、ガラス繊維、不織布などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。コンジュゲートパッドは、標識された抗HER2タンパク質抗体を上記パッドの素材に均一に染み込ませて乾燥させることにより作製される。コンジュゲートパッドの作製方法については後述する。

## 【 0 0 1 6 】

## 〔吸収パッド〕

吸収パッドは、添加された試料が毛細管現象により物理的に吸収されると共に、メンブレンの固相化抗体に結合しなかった試料中のHER2タンパク質と抗HER2タンパク質抗体との複合体を吸収除去する部位である。素材としては、セルロース膜、不織布、布、セルロースアセテート膜などの吸水性材料を好ましく用いることができる。吸収パッドの材質、大きさにより、添加した試料の展開速度を所望の速度に設定することができる。

20

## 【 0 0 1 7 】

## 〔抗HER2タンパク質抗体〕

本発明は、少なくとも第一の抗HER2タンパク質抗体と第二の抗HER2タンパク質抗体を使用するラテラルフローイムノアッセイにおいて、第一の抗HER2タンパク質抗体および第二の抗HER2タンパク質抗体のいずれか一方にHER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬を用いることを特徴とする。HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬としては、トラスツズマブ（商品名：ハーセプチン、中外製薬）、ペルツズマブ（商品名：パージェタ、中外製薬）、トラスツズマブ-エムタンシン（商品名：カドサイラ、中外製薬）などが挙げられる。これらの抗体医薬は薬価収載されており、購入して使用することができる。

30

## 【 0 0 1 8 】

HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬以外の抗HER2タンパク質抗体は、ヒトHER2タンパク質と特異的に結合できる抗体であれば特に限定されない。市販の抗ヒトHER2タンパク質抗体や、ヒトHER2タンパク質と交差性を有する抗HER2タンパク質抗体などを好適に用いることができる。また、抗ヒトHER2タンパク質抗体を自作して使用することができる。抗HER2タンパク質抗体はポリクローナル抗体でもよく、モノクローナル抗体でもよく、抗体フラグメントでもよい。好ましくは、抗ヒトHER2タンパク質モノクローナル抗体、またはHER2タンパク質との結合能を有するそのフラグメントである。第一の抗HER2タンパク質抗体と第二の抗HER2タンパク質抗体は異なる抗体であることが好ましい。第一の抗HER2タンパク質抗体が抗体医薬である場合は、第二の抗HER2タンパク質抗体は抗体医薬以外の抗ヒトHER2タンパク質抗体であることが好ましく、第一の抗HER2タンパク質抗体が抗体医薬以外の抗ヒトHER2タンパク質抗体である場合は、第二の抗HER2タンパク質抗体は抗体医薬であることが好ましい。

40

50

## 【 0 0 1 9 】

## 〔 抗 H E R 2 タンパク質抗体の標識 〕

コンジュゲートパッドに保持される第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体は標識されていることが好ましい。標識物質は、抗体の標識に用いられる公知の標識物質であれば特に限定されないが、免疫凝集反応に使用可能な公知のコロイド微粒子を用いることが好ましい。具体的には、例えば金コロイド、銀コロイド、白金コロイド、鉄コロイド、水酸化アルミニウムコロイド、ラテックス粒子、これらの複合コロイドなどが挙げられる。好ましくは、金コロイド、銀コロイド、白金コロイドなどの着色金属コロイド、またはこれらの複合コロイドである。より好ましくは、赤色を示す金コロイド、黄色を示す銀コロイドであり、さらに好ましくは金コロイドである。コロイド微粒子の平均粒径は、約 1 n m ~ 約 5 0 0 n m が好ましく、約 1 0 n m ~ 約 1 5 0 n m がより好ましく、約 2 0 n m ~ 約 1 0 0 n m がさらに好ましい。コロイド微粒子として金コロイドを用いる場合、市販の金コロイド粒子や金コロイド標識キットを好適に用いることができる。または公知の方法により金コロイド粒子を調製してもよい。公知の金コロイド粒子の調製方法としては、例えば塩化金酸をクエン酸ナトリウムで還元する方法などが挙げられる。

10

## 【 0 0 2 0 】

## 〔 コントロール抗体 〕

本明細書では、第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体に結合する抗体をコントロール抗体と称する。したがって、コントロール抗体には、第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体、すなわち標識された抗 H E R 2 タンパク質抗体と結合できる抗体が使用される。コントロール抗体は、使用する標識抗 H E R 2 タンパク質抗体と結合できる抗体であれば特に限定されず、標識抗 H E R 2 タンパク質抗体の動物種および抗体のクラスに応じて、市販の抗体から適宜選択して使用することができる。また、コントロール抗体を自作して使用することができる。コントロール抗体はポリクローナル抗体でもよく、モノクローナル抗体でもよく、第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体に結合能を有する抗体フラグメントでもよい。

20

## 【 0 0 2 1 】

## 〔 コンジュゲートパッドの作製 〕

標識された抗 H E R 2 タンパク質抗体をパッド素材（セルロース膜、ガラス繊維、不織布など）に保持させる方法は特に限定されない。例えば、標識された抗 H E R 2 タンパク質抗体を適当な溶媒に懸濁してコロイド溶液とし、当該コロイド溶液を塗布、スプレー、浸漬等によりパッド素材に均一に染み込ませて、その後乾燥させる方法を用いることができる。乾燥方法は特に限定されず、例えば自然乾燥、減圧乾燥、凍結乾燥、熱乾燥等の乾燥手段を用いることができる。コンジュゲートパッドに保持された抗 H E R 2 タンパク質抗体は、試料により容易に溶出され、試料と共に移動しながら試料中の H E R 2 タンパク質に結合する必要がある。そのため、抗 H E R 2 タンパク質抗体を懸濁する溶媒に、スクロース、マルトース、ラクトース等の糖類、マンニトール等の糖アルコールを添加することが好ましい。あるいは、これらの物質を予めパッド素材にコーティングしておいてもよい。

30

## 【 0 0 2 2 】

## 〔 メンブレンへの抗体の固相化 〕

メンブレンには、第二の抗 H E R 2 タンパク質抗体が固相化された領域およびコントロール抗体が固相化された領域が形成される。メンブレンは、さらに第三の抗 H E R 2 タンパク質抗体が固相化された領域を有していてもよい。抗体をメンブレンに固相化する方法は特に限定されず、公知の物理的手段または化学的手段により固相化することができる。例えば、抗体溶液をメンブレン表面に滴下して乾燥させることにより、抗体をメンブレンに物理的に吸着させる方法などが挙げられる。抗体固相化領域の形状は、局所的に抗体が固相化されて、着色が目視で確認できる形状であれば特に限定されない。例えば円状、帯状、線状などが挙げられる。固相化する抗体量は、検出感度を考慮して適宜設定することができる。例えば、1領域の抗体量が約 0 . 0 1  $\mu$  g ~ 約 5  $\mu$  g の範囲で固相化することが好ましい。

40

50



## 【 0 0 2 3 】

## 〔 サンプルパッドの非特異的吸着防止処理 〕

試料中の分析対象物がサンプルパッドの材質に非特異的に吸着することを防止するために、サンプルパッドに対して非特異的吸着防止処理を行うことが好ましい。非特異的吸着防止処理としては、例えば B S A (ウシ血清アルブミン)、スキムミルク、カゼイン等の公知のブロッキング剤をサンプルパッドに均一に染み込ませて乾燥させる方法などが挙げられる。具体的には、例えば濃度が約 1 質量% ~ 約 5 質量% になるように適当な溶媒を用いてブロッキング剤溶液を調製し、この溶液をテストストリップ 1 枚当たり約 60  $\mu$ L 染み込ませて、その後乾燥することにより、非特異的吸着防止処理を行うことができる。非特異的吸着防止処理はメンブレンに行ってもよく、サンプルパッドとメンブレンの両方に行ってもよい。メンブレンの非特異的吸着防止処理は、上記サンプルパッドの非特異的吸着防止処理と同様に行うことができる。

10

## 【 0 0 2 4 】

## 〔 ラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップの作製 〕

ラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップは、試料が流れる方向 ( 図 1 の矢印の方向 ) の上流から下流に向かって、サンプルパッド 4、コンジュゲートパッド 3、メンブレン 1 および吸収パッド 2 を連結することにより作製することができる。各部材間で毛细管現象を生じさせ易くするために、隣接する部材を 1 mm ~ 7 mm 程度重ね合わせることが好ましい。また、これらの部材を粘着剤付きのバックングシート上に貼付することが好ましい。バックングシートとしては、市販のイムノクロマト用バックングシートを好適に用いることができる。

20

## 【 0 0 2 5 】

## 〔 試料の調製 〕

試料はがん患者から採取されたがん組織から調製される。対象のがん患者は、HER2 が過剰発現しているがんを患っていることが疑われるがん患者である。HER2 の過剰発現が確認されているがんとしては、乳がん、胃がん、食道がん、大腸がん、胆管がん、胆嚢がん、非小細胞肺癌、頭頸部がん、膀胱がん、卵巣がん、子宮がん、唾液腺がんなどが挙げられる。したがって、対象のがん患者は、これらのがんを患っているがん患者であることが好ましい。より好ましくは、乳がん患者、胃がん患者、食道がん患者、大腸がん患者、胆管がん患者、頭頸部がん患者であり、さらに好ましくは乳がん患者、胃がん患者であり、特に好ましくは胃がん患者である。

30

## 【 0 0 2 6 】

がん組織は、検査対象のがん患者から採取されたものであればよい。生検組織でもよく、手術により摘出されたがん組織でもよい。好ましくは内視鏡検査により採取された生検組織であり、より好ましくは、上部消化管内視鏡検査により採取された生検組織である。

上記のがん組織からタンパク質抽出液を調製し、これをラテラルフローイムノアッセイの試料に用いることが好ましい。タンパク質抽出液は、公知の方法を用いて調製することができる。具体的には、例えば、がん組織に市販の組織溶解液 ( 例えば、R I P A (Radio-Immunoprecipitation Assay) バッファーなど ) を添加してホモジネートし、得られた組織溶解液を遠心分離し、その上清をタンパク質抽出液として使用することができる。得られたタンパク質抽出液は、- 80 で凍結保存することができる。タンパク質抽出液は、ラテラルフローイムノアッセイに供する際に、試料中の総タンパク質量が一定の範囲に収まるように、適宜希釈して使用することが好ましい。試料中の総タンパク質量は、検出感度を考慮して適宜設定することができる。タンパク質濃度は、公知の方法 ( 例えば、市販のタンパク質量定量キット ) を用いて測定することができる。サンプルパッドへの試料の添加量は、テストストリップの大きさや形状に応じて適宜設定することができる。

40

## 【 0 0 2 7 】

## 〔 判定方法 〕

判定は、通常、メンブレンに形成された抗 HER2 タンパク質抗体固相化領域の着色を目視で観察することにより行われる。また、市販のイムノクロマトリーダーを使用するこ

50

ともできる。なお、コントロール抗体固相化領域の着色が観察されない場合は、検査は無効と判定する。

【0028】

〔第1の実施形態〕

本発明の第1の実施形態は、第一の抗HER2タンパク質抗体として、HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬を用いたラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを使用して実施される。ここでは抗体医薬としてトラスツズマブを用いる場合について説明するが、トラスツズマブ以外の抗体医薬を用いる場合も同様に実施することができる。

【0029】

トラスツズマブは金コロイド標識され、コンジュゲートパッドに保持される。第二の抗HER2タンパク質抗体には、ヒトHER2タンパク質と特異的に結合できる市販の抗HER2タンパク質抗体を用いる。コントロール抗体には金コロイド標識されたトラスツズマブと結合できる抗体（例えば、抗ヒトIgG抗体など）を用いる。第二の抗HER2タンパク質抗体とコントロール抗体は、メンブレン上の異なる領域にそれぞれ固相化されている。

【0030】

試料（タンパク質抽出液）をサンプルパッドに添加すると、コンジュゲートパッドの方向に展開する。コンジュゲートパッドに到達した試料は保持されている金コロイド標識トラスツズマブを溶出しながらさらに下流に展開する。試料中にHER2タンパク質が存在する場合は、金コロイド標識トラスツズマブがHER2タンパク質と結合し、複合体を形成する。この複合体は、メンブレンに固相化された第二の抗HER2タンパク質抗体およびコントロール抗体に捕捉され、各固相化領域は赤色に着色される。コントロール抗体には複合体を形成していない金コロイド標識トラスツズマブも捕捉される。試料中にHER2が存在しない場合は、金コロイド標識トラスツズマブはHER2タンパク質と複合体を形成しないので、コントロール抗体固相化領域は金コロイド標識トラスツズマブを捕捉して赤色に着色するが、第二の抗HER2タンパク質抗体固相化領域は着色しない。したがって、コントロール抗体固相化領域が着色することを前提として、第二の抗HER2タンパク質抗体固相化領域が着色した場合に陽性と判定し、第二の抗HER2タンパク質抗体固相化領域が着色しなかった場合に陰性と判定する。陽性と判定された患者は、トラスツズマブによる治療が有効な患者と判断することができる。

【0031】

本実施形態において、トラスツズマブに代えてペルツズマブを用いた場合、陽性と判定された患者は、ペルツズマブによる治療が有効な患者と判断することができる。また、本実施形態において、トラスツズマブに代えてトラスツズマブ-エムタンシンを用いた場合、陽性と判定された患者は、トラスツズマブ-エムタンシンによる治療が有効な患者と判断することができる。

【0032】

〔第2の実施形態〕

本発明の第2の実施形態は、第二の抗HER2タンパク質抗体として、HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬を用いたラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを使用して実施される。ここでは抗体医薬としてトラスツズマブを用いる場合について説明するが、トラスツズマブ以外の抗体医薬を用いる場合も同様に実施することができる。

【0033】

第一の抗HER2タンパク質抗体には、ヒトHER2タンパク質と特異的に結合できる市販の抗HER2タンパク質抗体を用いる。第一の抗HER2タンパク質抗体は金コロイド標識され、コンジュゲートパッドに保持される。コントロール抗体には、金コロイド標識された第一の抗HER2タンパク質抗体と結合できる抗体を用いる。トラスツズマブとコントロール抗体は、メンブレン上の異なる領域にそれぞれ固相化されている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 4 】

試料添加後は上記第 1 の実施形態と同様に試料が展開する。試料中に H E R 2 タンパク質が存在する場合は、トラスツズマブ固相化領域とコントロール抗体固相化領域の両方が赤色に着色し、試料中に H E R 2 タンパク質が存在しない場合は、コントロール抗体固相化領域のみが赤色に着色する。したがって、コントロール抗体固相化領域が着色することを前提として、トラスツズマブ固相化領域が着色した場合に陽性と判定し、トラスツズマブ固相化領域が着色しなかった場合に陰性と判定する。陽性と判定された患者は、トラスツズマブによる治療が有効な患者と判断することができる。

## 【 0 0 3 5 】

本実施形態において、トラスツズマブに代えてペルツズマブを用いた場合、陽性と判定された患者は、ペルツズマブによる治療が有効な患者と判断することができる。また、本実施形態において、トラスツズマブに代えてトラスツズマブ - エムタンシンを用いた場合、陽性と判定された患者は、トラスツズマブ - エムタンシンによる治療が有効な患者と判断することができる。

10

## 【 0 0 3 6 】

## 〔 第 3 の実施形態 〕

本発明の第 3 の実施形態は、上記第 2 の実施形態において、第二の抗 H E R 2 タンパク質抗体とは異なる、H E R 2 タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬を、さらにメンブレンに固相化したラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを使用して実施される。第二の抗 H E R 2 タンパク質抗体とは異なる、H E R 2 タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬は 1 種類でもよく、2 種類以上でもよい。2 種類の抗体医薬をそれぞれ第二および第三の抗 H E R 2 タンパク質抗体として用いる場合、例えば、トラスツズマブとペルツズマブの組み合わせ、ペルツズマブとトラスツズマブ - エムタンシンの組み合わせ、トラスツズマブとトラスツズマブ - エムタンシンの組み合わせなどを選択することができる。3 種類の抗体医薬をそれぞれ第二、第三および第四の抗 H E R 2 タンパク質抗体として用いる場合、例えば、トラスツズマブとペルツズマブとトラスツズマブ - エムタンシンの組み合わせなどを選択することができる。

20

## 【 0 0 3 7 】

第 3 の実施形態では、コントロール抗体固相化領域が着色することを前提として、複数設けた抗体医薬固相化領域の少なくとも 1 つが着色した場合に陽性と判定し、複数設けた抗体医薬固相化領域の全てが着色しなかった場合に陰性と判定する。例えば 3 種類の抗体医薬固相化領域を有するラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを使用した場合、三か所の抗体医薬固相化領域の全てが着色した患者のがん組織は、固相化されたいずれの抗体医薬とも結合性の高い H E R 2 タンパク質を過剰発現していると考えられるため、固相化された抗体医薬の全てが有効な患者と判断することができる。着色した抗体医薬固相化領域と着色しなかった抗体医薬固相化領域が混在した患者のがん組織は、着色した領域に固相化された抗体医薬との結合性が高く、着色しなかった領域に固相化された抗体医薬との結合性が低い H E R 2 タンパク質を過剰発現していると考えられるため、着色した領域に固相化された抗体医薬による治療は有効であるが、着色しなかった領域に固相化された抗体医薬による治療は有効でないと判断することができる。2 種類の抗体医薬を用いた場合、および 4 種類以上の抗体医薬を用いた場合も同様に判断することができる。

30

40

## 【 0 0 3 8 】

このように、第 3 の実施形態は、個々のがん患者の治療に使用する抗体医薬の選択に利用することができる点で非常に有用性が高いと考えられる。さらに新たな抗体医薬が開発された場合には、抗 H E R 2 タンパク質抗体固相化領域の数を増やすことにより、使用可能な複数の抗体医薬の中から患者に適した抗体医薬を選択することができると考えられる。

## 【 0 0 3 9 】

本発明のキットは、がん組織中の H E R 2 タンパク質を検出するためのラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを含むものであればよい。当該ラテラルフローイムノ

50

アッセイ用テストストリップについては、既に説明した通りである。これら以外の具体的なキットの構成については特に限定されるものではなく、他に必要な試薬、器具、使用説明書等を適宜選択してキットの構成とすればよい。本発明のキットを用いることにより、HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を迅速、簡便かつ確実に選択することができる。

#### 【実施例】

##### 【0040】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、以下において特に断りのない場合、%は質量%を示す。

##### 【0041】

〔参考例1：ウエスタンブロッティング法による胃がん細胞株のHER2発現の検討〕

#### 1. 実験材料および方法

##### (1) 使用細胞

ヒト胃がん細胞株として、MKN1 (理化学研究所バイオリソースセンター番号：RCB1003)、MKN7 (理化学研究所バイオリソースセンター番号：RCB0999)、MKN45 (理化学研究所バイオリソースセンター番号：RCB1001)、MKN74 (理化学研究所バイオリソースセンター番号：RCB1002)、GLM1 (Nakanishi, H., K. Yasui, Y. Ikehara, H. Yokoyama, S. Munesue, Y. Koderu and M. Tatematsu. "Establishment and Characterization of Three Novel Human Gastric Cancer Cell Lines with Differentiated Intestinal Phenotype Derived from Liver Metastasis." *Clin Exp Metastasis* 22, no. 2 (2005): 137-47.)、GLM2 (同上)、GLM4 (Yokoyama, H., Y. Ikehara, Y. Koderu, S. Ikehara, Y. Yatabe, Y. Mochizuki, M. Koike, M. Fujiwara, A. Nakao, M. Tatematsu and H. Nakanishi. "Molecular Basis for Sensitivity and Acquired Resistance to Gefitinib in Her2-Overexpressing Human Gastric Cancer Cell Lines Derived from Liver Metastasis." *Br J Cancer* 95, no. 11 (2006): 1504-13.)、AGS (ATCC番号：CRL-1739)、KATOIII (理化学研究所バイオリソースセンター番号：RCB2088)、HGC27 (理化学研究所バイオリソースセンター番号：RCB0500)を用いた。GLM1、GLM2およびGLM4は、愛知県がんセンター研究所から供与を受けた。

対照として、乳がん細胞株MCF7 (理化学研究所バイオリソースセンター番号：RCB1904)を用いた。MCF7はHER2の発現レベルが低いことが知られている。

細胞は100mm細胞培養用ディッシュで培養した。培地には、各細胞に適した公知の培地を選択して使用した。

##### 【0042】

##### (2) タンパク質抽出液の調製

細胞を培養しているディッシュの培地を廃棄し、PBSで2回洗浄した。プロテアーゼインヒビター (Roche社、Complete Mini) を加えたRIPAバッファー (10mM Tris-HCl、pH7.4 150mM NaCl、1% NP40、0.1% SDS、0.1% sodium deoxycholate (DOC)、1mM EDTA、1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、2mM PMSF) をディッシュに加え細胞を溶解し、スクレイパーで細胞溶解液を掻き取り、回収した。得られた細胞溶解液を遠心分離し (14,000rpm, 4℃, 30min)、上清をタンパク質抽出液として -80℃ で保存した。使用時に融解して試験に供した。

##### 【0043】

##### (3) ウエスタンブロッティング

上記(2)で調製した各細胞のタンパク質抽出液のタンパク質濃度をPIERCE BCA Protein Assay Kit (ThermoFischer Scientific社) を用いて定量した。タンパク質濃度が15µg/レーンになるようにサンプルバッファー (ナカライテスク社、Sample Buffer Solution with Reducing Reagent(6x) for SDS-PAGE) で希釈し、SDS-PAGEに供した。トランスブロットTurbo転写システム (BIO-RAD社) を用いて、PVD膜に転写した。抗HER2抗体 (CST社 HER2/ErbB2 Antibody)、2次抗体 (GE healthcare社 ECL Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab from donkey)、抗

10

20

30

40

50

- A c t i n 抗体 (CST社 -Actin (13E5) Rabbit mAb HRP Conjugate) の各抗体を用いて免疫プロットを行った。発色剤には I m m o b i l i o n W e s t e r n (Merck Millipore社) を使用した。撮影は、C h e m i d o c X R S + (BIO-RAD社) で行った。

【 0 0 4 4 】

( 4 ) デンシトメトリーによる定量

撮影した画像を I m a g e L a b ソフトウェア (BIO-RAD社) で解析し、各バンドのシグナル強度を得た。リコンビナント H E R 2 タンパク (SignalChem社, HER2, Active, E27-11G, 分子量131) を用いて検量線を作成し、この検量線に基づいて各タンパク質抽出液の H E R 2 濃度を求めた。

【 0 0 4 5 】

10

2 . 結果

結果を図 2 に示した。上段がウエスタンブロッティングで H E R 2 タンパク質を検出した結果、中段がウエスタンブロッティングで  $\alpha$ -アクチンを検出した結果、下段が H E R 2 タンパク質のウエスタンブロッティング画像に基づいて、デンシトメトリーにより H E R 2 タンパク質を定量した結果である。これらの結果から、M K N 7、G L M 1、G L M 2 および G L M 4 の H E R 2 発現レベルが高いことが明らかになった。

【 0 0 4 6 】

[ 実施例 1 : テストストリップの作製 ( 1 ) ]

1 - 1 ストリップ材料

メンブレンには、ニトロセルロースメンブレンカード (Merck Millipore社、HF120MC100、60mm x 301mm) を使用した。コンジュゲートパッドには、グラスファイバーパッド (Merck Millipore社、GFCP103000) を使用した。サンプルパッドおよび吸収パッドには、セルロースパッド (Merck Millipore社、CFSP173000) を使用した。

20

【 0 0 4 7 】

1 - 2 使用抗体

第一の抗 H E R 2 タンパク質抗体 (以下、「第一抗体」と記す) には、抗 H E R 2 マウスモノクローナル抗体 (HER-2/ErbB2 Monoclonal Antibody (N24)、Thermo Scientific社、MA1-12691) を使用した。第二の抗 H E R 2 タンパク質抗体 (以下、「第二抗体」と記す) には、トラスツズマブ (ハーセプチン (登録商標) 注射用 60、中外製薬製) を使用した。コントロール抗体には、抗マウス I g G 抗体 (Goat anti-Mouse IgG Secondary Antibody、Thermo Scientific社、PA1-28555) を使用した。抗体の希釈には、A n t i b o d y S t a b i l i z e r B a s e d o n P B S (CANDOR Bioscience社、131050、以下「抗体希釈液」と記す) を使用した。

30

【 0 0 4 8 】

1 - 3 第二抗体の固相化

ハーセプチン (登録商標) 注射用 60 を添付文書のとおり溶解し、21 mg / mL のトラスツズマブ溶液を調製した。これを抗体希釈液で希釈し、所望の濃度のトラスツズマブ溶液を調製した。抗マウス I g G 抗体を抗体希釈液で希釈して 0 . 5 mg / mL のコントロール抗体溶液を調製した。各抗体溶液 1  $\mu$  L をマイクロピペットを用いてメンブレンに添着させ、37  $^{\circ}$ C で 120 分間乾燥させた。

40

【 0 0 4 9 】

1 - 4 コンジュゲートパッドの作製

1 - 4 - 1 第一抗体の金コロイド標識

抗 H E R 2 マウスモノクローナル抗体の金コロイド標識には、金コロイド標識キット (BBI GoldLink Kits、BBI International社、GLK 10.40) を用いた。キットのプロトコールに従って金コロイド標識を行い、溶液 50  $\mu$  L 中に抗体 1  $\mu$  g を含む金コロイド標識第一抗体の溶液を得た。

1 - 4 - 2 コンジュゲートパッドの作製

得られた金コロイド標識第一抗体の溶液 1 容に対して、塗布バッファー (5%スクロース、2mMホウ酸溶液) 25 容を添加して希釈し、これをコンジュゲートパッド (G l a s s

50

Fiber Conjugate Pad) に均一に染み込ませた。テストストリップ1枚あたりのコンジュゲートパッド(5mm×10mm)に含まれる、上記手法により得られた金コロイド標識第一抗体の溶液量が1μLになるように、コンジュゲートパッドの面積と染み込ませる抗体溶液量を適宜調整した。その後、コンジュゲートパッドを水平に保った状態で、室温で一夜乾燥させた。

#### 【0050】

##### 1-5 サンプルパッドの作製

B S A (和光純薬、015-21274) を P B S (PBSタブレット(タカラバイオ)を超純水で溶解したもので溶解し、5% B S A / P B S を調製した。これをサンプルパッド(Cel lulose Fiber Sample Pad) に均一に染み込ませた。テストストリップ1枚あたりのサンプルパッド(5mm×17mm)に、60μLの5% B S A / P B S が含まれるように、サンプルパッドの面積と染み込ませる液量を適宜調整した。その後、サンプルパッドを水平に保った状態で、室温で一夜以上かけて完全に乾燥させた。

10

#### 【0051】

##### 1-6 ハーフストリップの作製

ハーフストリップは、トラスツズマブとコントロール抗体(抗マウスI g G抗体)が固相化されたメンブレンおよび吸収パッドの2つで構成された予備検討用のストリップである。試料と金コロイド標識第一抗体を含む溶液にメンブレンの一端(吸収パッドが連結されていない方)を浸漬し、溶液を吸収パッドの方向に展開させて使用する。

20

ハーフストリップは以下の手順で作製した。

- (1) メンブレンカードのサンプルパッドおよびコンジュゲートパッド貼付部を切り離す
- (2) 吸収パッドをメンブレンカードに貼付
- (3) 5mm幅に切断
- (4) メンブレンにトラスツズマブを固相化(上記1-3参照)
- (5) メンブレンに抗マウスI g G抗体を固相化(上記1-3参照)

#### 【0052】

##### 1-7 ラテラルフローストリップの作製

ラテラルフローストリップは以下方法の手順で作製した。

- (1) 吸収パッドをメンブレンカードに貼付
- (2) 金コロイド標識第一抗体を保持させたコンジュゲートパッドを、メンブレンカードに貼付
- (3) B S A を保持させたサンプルパッドをコンジュゲートパッドに貼付
- (4) 5mm幅に切断
- (5) メンブレンにトラスツズマブを固相化(上記1-3参照)
- (6) メンブレンに抗マウスI g G抗体を固相化(上記1-3参照)

30

以下の実施例において、第二抗体を固相化した領域を「テストライン」と称し、コントロール抗体を固相化した領域を「コントロールライン」と称する。

#### 【0053】

[実施例2: ハーフストリップによるHER2タンパク質の検出]

##### 1. 実験材料および方法

40

##### (1) 試料

参考例1で調製したタンパク質抽出液を使用した。使用した細胞は、MKN1、MKN7、MKN45、MKN74、AGS、KATOIII、HGC27、MCF7(ネガティブコントロール)である。

##### (2) ストリップ

実施例1で作製したハーフストリップを使用した。テストラインの抗体(トラスツズマブ)量は5μgとした。

##### (3) 検出方法

96ウェルプレートを使用した。タンパク質抽出液からのタンパク質量が60μg/ウェル、B S A濃度が3%/ウェル、実施例1の1-4-1で調製した金コロイド標識第一

50

抗体の溶液量が1 $\mu$ L/ウェル、ウェルあたりの液量が100 $\mu$ Lになるように試料を調製した。ハーフストリップのメンブレンの一端を試料溶液中に浸漬して展開させ、テストラインおよびコントロールラインの着色を観察した。テストラインの着色が目視で確認できるものを陽性と判断した。

【0054】

## 2. 結果

結果を図3に示した。図3の上段の数値は、上記参考例1においてデンシトメトリーで定量した各細胞株のタンパク質抽出液におけるHER2タンパク質濃度を示している。図3から明らかのように、HER2発現レベルが高いMKN7で明瞭なシグナルを検出した。また、MKN74、KATOIIIおよびHGC27でも弱いシグナルを検出した。この結果から、ラテラルフローアッセイにより、HER2陽性胃がんの検出が可能であることが示された。

10

【0055】

〔実施例3：テストライン抗体量の検討〕

## 1. 実験材料および方法

### (1) 試料

参考例1で調製したMKN7のタンパク質抽出液を使用した。

### (2) ストリップ

実施例1で作製したハーフストリップを使用した。テストラインの抗体(トラスツマブ)量が1、3、5、10または20 $\mu$ gである5種類を使用した。

20

### (3) 検出方法

実施例2と同じ方法で行った。

【0056】

## 2. 結果

結果を図4に示した。図4から明らかのように、シグナル強度はテストラインの抗体量に依存して増強された。この結果は、テストラインの抗体量を増減させることにより検出感度を調節できることを示すものである。

【0057】

〔実施例4：ラテラルフローストリップによるHER2タンパク質の検出〕

## 1. 実験材料および方法

30

### (1) 試料

参考例1で調製したMKN7およびMCF7(コントロール)のタンパク質抽出液を使用した。

### (2) ストリップ

実施例1で作製したラテラルフローストリップを使用した。テストラインの抗体(トラスツマブ)量は5 $\mu$ gとした。

### (3) 検出方法

タンパク質抽出液からのタンパク質量が200 $\mu$ g、液量が100 $\mu$ Lとなるように試料を調製し、試料の全量をサンプルパッド部分に添加して展開させた。コントロールラインおよびテストラインの着色を目視で観察した。

40

【0058】

## 2. 結果

結果を図5に示した。図5から明らかのように、MKN7ではコントロールラインおよびテストラインのシグナルが認められたが、MCF7ではテストラインのシグナルが認められなかった。

【0059】

〔参考例2：ウエスタンブロッティング法による胃がん細胞株のHER2発現の検討〕

## 1. 実験材料および方法

### (1) 使用細胞(参考例1参照)

ヒト胃がん細胞株として、MKN1、MKN7、MKN45、MKN74、GLM1、

50

G L M 2、G L M 4、A G S、H G C 2 7を用いた。対照として、乳がん細胞株 M C F 7を用いた。

( 2 ) タンパク質抽出液の調製

参考例 1 と同じ方法で、各細胞からそれぞれタンパク質抽出液を調製した。

( 3 ) ウエスタンブロッティング

参考例 1 と同じ方法で、ウエスタンブロッティングを行った。

( 4 ) E L I S A による定量

E r b B 2 / H e r 2 E L I S A K i t (Novus Biologicals社、NBP1-84823) を用いて、各細胞から調製したタンパク質抽出液中の H E R 2 タンパク質濃度を定量した。定量値は、溶液中の H E R 2 タンパク質濃度ではなく、溶液中の単位タンパク質量あたりの H E R 2 タンパク質量で表した。

10

【 0 0 6 0 】

2 . 結果

結果を図 6 に示した。上段がウエスタンブロッティングで H E R 2 タンパク質を検出した結果、中段がウエスタンブロッティングで  $\alpha$ -アクチンを検出した結果、下段が E L I S A により H E R 2 タンパク質を定量した結果である。これらの結果から、G L M 1 および G L M 4 の H E R 2 発現レベルが非常に高く、次いで M K N 7 および G L M 2 の H E R 2 発現レベルが高いことが明らかになった。

【 0 0 6 1 】

〔実施例 5 : テストストリップの作製 ( 2 ) 〕

20

5 - 1 ストリップ材料

メンブレンには、ニトロセルロース膜 (Merck Millipore社、HF13504) を使用した。サンプルパッドおよびコンジュゲートパッドには、グラスファイバーパッド (Merck Millipore社、GFDX203000) を使用した。吸収パッドには、セルロースパッド (Merck Millipore社、CFSP223000) を使用した。

【 0 0 6 2 】

5 - 2 使用抗体

実施例 1 で作製したテストストリップの第一抗体と第二抗体を逆にして、テストストリップを作製した。すなわち、第一抗体には、トラスツズマブ (ハーセプチン (登録商標) 注射用 6 0、中外製薬製) を使用した。第二抗体には、抗 H E R 2 マウスモノクローナル抗体 (HER-2/ErbB2 Monoclonal Antibody (N24)、Thermo Scientific社、MA1-12691) を使用した。コントロール抗体には、抗マウス I g G 抗体 (Goat anti-Mouse IgG 's、日本製粉) を使用した。抗体の希釈には、実施例 1 と同じ抗体希釈液を使用した。

30

【 0 0 6 3 】

5 - 3 第二抗体の固相化

抗 H E R 2 マウスモノクローナル抗体および抗マウス I g G をそれぞれ抗体希釈液で希釈して、 $0.1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$  の抗体溶液を調製し、スポット当たり  $1 \mu\text{L}$  の抗体溶液をマイクロピペットを用いてメンブレンに添着させた (抗体  $0.1 \mu\text{g} / \text{スポット}$ )。抗 H E R 2 マウスモノクローナル抗体は 1 箇所、抗マウス I g G は 2 箇所にスポットした。メンブレンを 5 0 で 3 0 分乾燥させた。続いて、メンブレンを、ブロッキングバッファー (0.5% カゼイン、50mM ホウ酸、pH 8.5) に浸漬し、室温で 3 0 分間静置した。メンブレンを洗浄・安定化バッファー (0.5% スクロース、0.05% コール酸ナトリウム、50mM Tris-HCl、pH 7.5) に移して浸漬し、室温で 3 0 分以上静置した。メンブレンを引き上げ、ペーパータオル上に置き、室温で一晩乾燥させた。このようにして得られたメンブレンは、乾燥剤と共にアルミパウチに入れて保存することができる。

40

【 0 0 6 4 】

5 - 4 コンジュゲートパッドの作製

5 - 4 - 1 第一抗体の金コロイド標識

トラスツズマブの金コロイド標識は、以下の手順で行った。

( 1 ) ハーセプチン (登録商標) 注射用 6 0 を添付文書のとおり溶解し、蒸留水で希釈

50



して70 µg/mLのトラスツズマブ溶液を調製した。

(2) 2 mLの50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH8.0)に金コロイド液 (Gold Colloid 40nm、BI solution社) 1.8 mLを加え、攪拌しながら2 mLの上記トラスツズマブ溶液を添加した。

(3) さらに、1% PEG 20000を1.1 mL加え、攪拌した。

(4) 8,000 × gで15分間遠心分離し、上清が1 mL程度残るように余分な上清を除去した。

(5) 超音波洗浄機を用いて、残した上清に沈殿を分散させた。

(6) 金コロイド保存バッファー (20mM Tris-HCl (pH8.2), 0.05% PEG 20,000, 150mM NaCl, 1%BSA, 0.1% NaN<sub>3</sub>) 2.0 mLを加え、攪拌した。

10

(7) (4)および(5)を再度行った。

(8) 2回目の(5)で得られた分散液50 µLを分取し、金コロイド保存バッファー950 µLを加えてOD 520を測定した。

(9) 金コロイド保存バッファーでOD 520 = 6.0になるように調製し、金コロイド標識第一抗体の溶液を得た。

#### 【0065】

##### 5-4-2 コンジュゲートパッドの作製

上記調製した金コロイド標識第一抗体の溶液500 µLに、蒸留水500 µLと金コロイド塗布バッファー (20mM Tris-HCl (pH8.0), 0.05% PEG 20,000, 5% スクロース) 1 mLとを混合し、軽く攪拌した。グラスファイバーパッド (300mm) 1枚あたり、上記混合液1.6 mLを均等に塗布した。パッドをデシケーターに入れ室温で一夜以上かけて減圧乾燥を行った。乾燥後のコンジュゲートパッドは、シリカゲルを同封したビニール袋内で遮光保存することができる。

20

#### 【0066】

##### 5-5 ラテラルフローストリップの作製

縦60 mm × 横300 mmのイムノクロマト用バックグシートの上端から15 mmのところ、縦25 mm × 横300 mmのメンブレンの上端が来るように貼り付けた。メンブレンの下端はバックグシートの下端から20mmとなる。次に、縦20 mm × 横300 mmの吸収パッドの上端をバックグシートの上端に合わせて貼り付けた。この際、吸収パッドはメンブレンと5 mmほど重なる。次いで、縦8 mm × 横300 mmのコンジュゲートパッドを、その下端がバックシートの下端から14 mmの位置となるように貼り付けた。この際、コンジュゲートパッドの上端側2 mmほどが、メンブレンシートの上に重なる。さらに、縦18 mm × 横300 mmのサンプルパッドの下端をバックシートの下端に合わせて貼り付けた。この際、サンプルパッドの上端側は4 mmが、コンジュゲートパッドの上に重なる。貼り合わせたシートを5 mm幅に切断してラテラルフローストリップを作製した。作製したラテラルフローストリップは、シリカゲルと共にアルミパウチに入れ、室温で保存することができる。

30

#### 【0067】

〔実施例6：胃がん細胞株由来タンパク質抽出液中のHER2タンパク質の検出〕

##### 1. 実験材料および方法

40

###### (1) 試料

参考例2で調製した9種類のヒト胃がん細胞株由来のタンパク質抽出液を使用した。コントロールとして、参考例2で調製した乳がん細胞株MCF7由来のタンパク質抽出液を使用した。

###### (2) ストリップ

実施例5で作製したラテラルフローストリップを使用した。

###### (3) 検出方法

タンパク質抽出液からのタンパク質量が2 µg、液量が100 µL (タンパク質濃度0.02 mg/mL)となるように試料を調製し、試料の全量をサンプルパッド部分に添加して展開させた。コントロールラインおよびテストラインの着色を目視で観察した。

50

## 【 0 0 6 8 】

## 2 . 結 果

結果を図7に示した。図7の上段の数値は、上記参考例2においてELISAで定量した単位タンパク質量あたりのHER2タンパク質量を示し、図7の中段の数値は、上段の数値に基づいて算出したストリップ当たりのHER2タンパク質量を示している。ストリップ当たりのHER2タンパク質量が10ngを超えると実施例5で作製したラテラルフローストリップで検出できる可能性が図7より考えられた。

## 【 0 0 6 9 】

〔実施例7：試料中のHER2タンパク質濃度の検討〕

## 1 . 実 験 材 料 お よ び 方 法

## ( 1 ) 試 料

参考例1で調製したGLM1のタンパク質抽出液を使用した。試料中の総タンパク質濃度(μg/mL)が0.2、0.02、0.002、0.0002および0.00002の5種類の試料を調製した。

## ( 2 ) ス ト リ ッ プ

実施例5で作製したラテラルフローストリップを使用した。

## ( 3 ) 検 出 方 法

各試料を100μLずつサンプルパッド部分に添加して展開させ、コントロールラインおよびテストラインの着色を目視で観察した。

## 【 0 0 7 0 】

## 2 . 結 果

結果を図8に示した。図8の上段の数値は試料中の総タンパク質濃度を示し、図8の中段の数値はストリップ当たりのHER2タンパク質量を示している。ストリップ当たりのHER2タンパク質量が10ngを超えると実施例5で作製したラテラルフローストリップで検出できる可能性が図8からも考えられた。

## 【 0 0 7 1 】

〔実施例8：異種移植片(Xenograft)由来試料およびヒト生検試料中のHER2タンパク質濃度の検討〕

## 1 . 実 験 材 料 お よ び 方 法

## ( 1 ) 異 種 移 植 片 ( Xenograft ) 由 来 試 料 の 調 製

GLM1およびMKN45をそれぞれヌードマウスの皮下に接種し、腫瘍を形成させた。上部消化管内視鏡検査時に使用する生検鉗子を用いて腫瘍組織からサンプルを採取し、重量を測定した後、液体窒素中で保存した。採取した組織にT-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific社)を加え、ホモジナイザー(ニッピ社, BioMasher II)でホモジナイズした。得られた組織溶解液を遠心分離し(10,000×g、4、5分間)、その上清をタンパク質抽出液として-80で保存した。使用時に融解して試験に供した。

## ( 2 ) ヒ ト 検 体 由 来 試 料 の 調 製

胃がん患者から採取した生検検体を使用した。HER2の免疫染色でHER2陽性であることを確認した症例の検体を使用した。対照として、同一患者の健常部の胃生検検体を使用した。上記(1)と同じ方法で、T-PER Tissue Protein Extraction Reagentを加えてホモジナイズ、遠心分離してタンパク質抽出液を調製し、-80で保存した。使用時に融解して試験に供した。

## ( 3 ) ス ト リ ッ プ

実施例5で作製したラテラルフローストリップを使用した。

## ( 4 ) 検 出 方 法

上記(1)、(2)で調製した各タンパク質抽出液のHER2濃度をErbB2/Her2 ELISA Kit (Novus Biologicals社, NBP1-84823)を用いて算出した。上記4サンプルを、超純水を用いてすべて200倍に希釈し、その100μLをサンプルパッド部分に添加して展開させた。コントロールラインおよびテストラインの着色を目視で観

10

20

30

40

50

察した。

【 0 0 7 2 】

結果を図9に示した。図9の上段の数値はストリップ当たりのHER2タンパク質量を示している。図9から明らかなように、GLM1由来の異種移植片(Xenograft)およびヒト腫瘍部の生検検体において、HER2を検出することができた。この結果から、作製したストリップを用いて、腫瘍組織からのタンパク抽出液でもHER2タンパク質を検出できることが示された。

【 0 0 7 3 】

なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせ得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

10

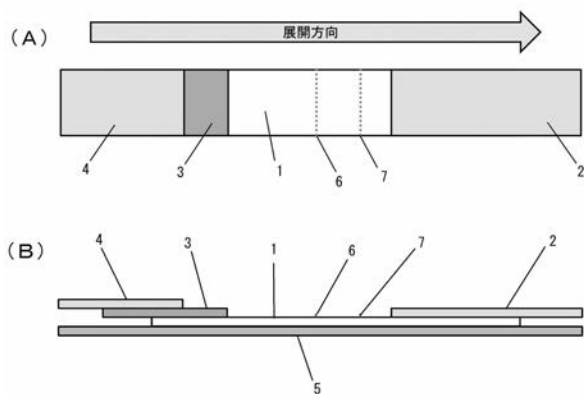
【 符号の説明 】

【 0 0 7 4 】

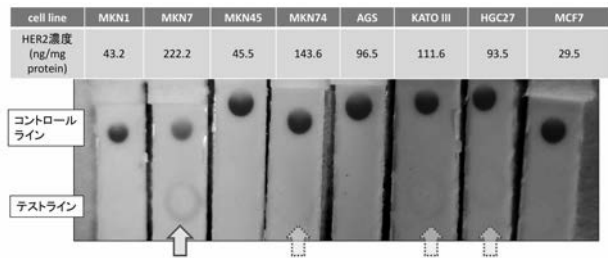
- 1           メンブレン
- 2           吸収パッド
- 3           コンジュゲートパッド
- 4           サンプルパッド
- 5           バックシート
- 6           抗HER2タンパク質抗体固相化領域
- 7           コントロール抗体固相化領域

20

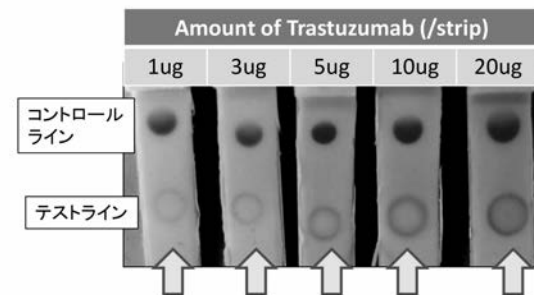
【 図 1 】



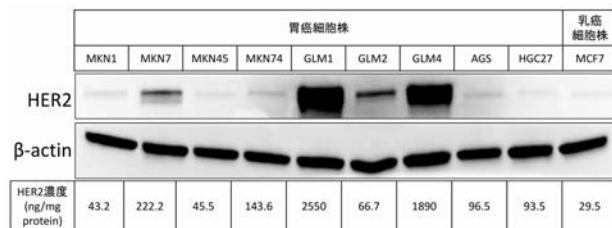
【 図 3 】



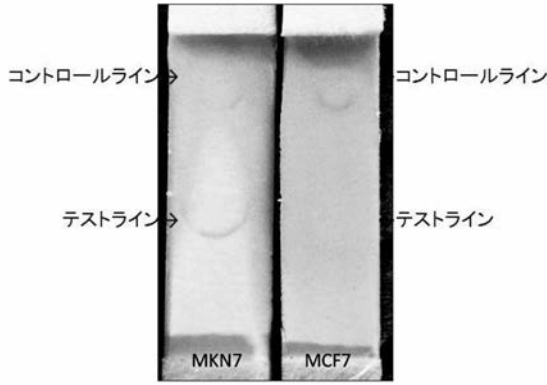
【 図 4 】



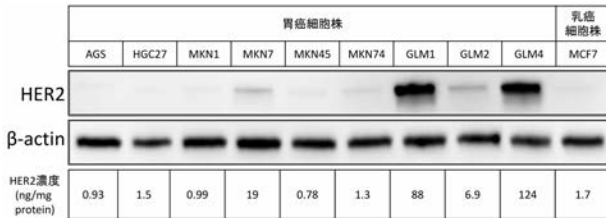
【 図 2 】



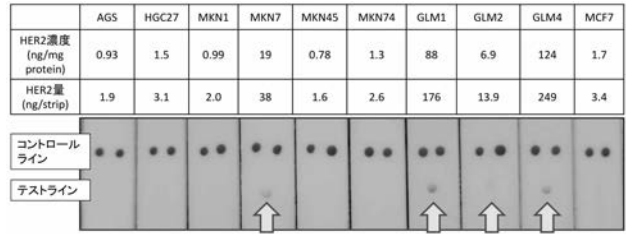
【 図 5 】



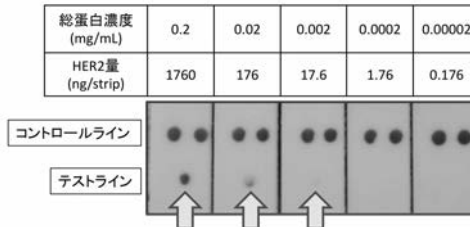
【 図 6 】



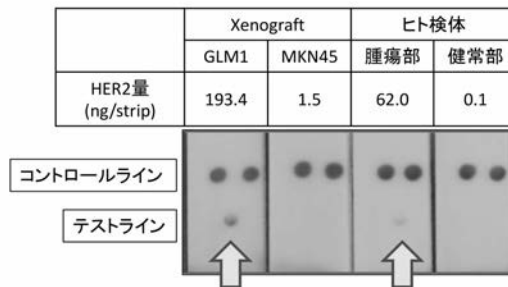
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】平成29年7月7日 (2017.7.7)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択するためのキットであって、がん組織中のHER2タンパク質を検出するためのラテラルフロー免疫アッセイ用テストストリップを含み、該テストストリップは、試料が流れる方向の上流から順に、試料を添加するサンプルパッド、第一の抗HER2タンパク質抗体が保持されたコンジュゲートパッド、第二の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域および第一の抗HER2タンパク質抗体に結合する抗体が固相化された領域をそれぞれ異なる領域にて有するメンブレン、ならびに吸収パッドが連結された構成を有し、前記第一の抗HER2タンパク質抗体および第二の抗HER2タンパク質抗体のいずれか一方に、前記抗体医薬を用いることを特徴とするキット。

【 請求項 2 】

前記抗体医薬が、トラスツズマブ、ペルツズマブおよびトラスツズマブ - エムタンシンからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 に記載のキット。

【 請求項 3 】

前記第一の抗HER2タンパク質抗体がコロイド微粒子で標識されていることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のキット。

【 請求項 4 】

前記第一の抗HER2タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載のキット。

【請求項5】

前記第二の抗HER2タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載のキット。

【請求項6】

前記メンブレンが、第三の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域、または、第三の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域と第四の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域を、それぞれ異なる領域であり、かつ、第二の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域および第一の抗HER2タンパク質抗体に結合する抗体が固相化された領域のいずれとも異なる領域にてさらに含み、前記第二の抗HER2タンパク質抗体、前記第三の抗HER2タンパク質抗体および前記第四の抗HER2タンパク質抗体はそれぞれ異なる前記抗体医薬であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載のキット。

【請求項7】

被験者から採取されたがん組織から調製したタンパク質抽出液を試料とすることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載のキット。

【請求項8】

前記がん組織が生検組織であることを特徴とする請求項7に記載のキット。

【請求項9】

前記がん組織が上部消化管のがん組織であることを特徴とする請求項7または8に記載のキット。

【請求項10】

HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬の投与が有効ながん患者を選択する方法であって、以下の工程(1)～(3)を含むことを特徴とする方法：

- (1) 被験者から採取されたがん組織から試料を調製する工程、
- (2) 前記HER2タンパク質を治療標的分子とする抗体医薬を用いたラテラルフローイムノアッセイにより前記試料中のHER2タンパク質を検出する工程、および
- (3) 前記ラテラルフローイムノアッセイで陽性を示した被験者を選択する工程。

【請求項11】

前記抗体医薬が、トラスツズマブ、ペルツズマブおよびトラスツズマブ-エムタンシンからなる群より選択されることを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記工程(2)において、試料が流れる方向の上流から順に、試料を添加するサンプルパッド、第一の抗HER2タンパク質抗体が保持されたコンジュゲートパッド、第二の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域および第一の抗HER2タンパク質抗体に結合する抗体が固相化された領域をそれぞれ異なる領域にて有するメンブレン、ならびに吸収パッドが連結された構成を有するラテラルフローイムノアッセイ用テストストリップを用い、前記第一の抗HER2タンパク質抗体および第二の抗HER2タンパク質抗体のいずれか一方に、前記抗体医薬を用いることを特徴とする請求項10または11に記載の方法。

【請求項13】

前記第一の抗HER2タンパク質抗体がコロイド微粒子で標識されていることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記第一の抗HER2タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする請求項12または13に記載の方法。

【請求項15】

前記第二の抗HER2タンパク質抗体に前記抗体医薬を用いることを特徴とする請求項12または13に記載の方法。

**【請求項 16】**

前記メンブレンが、第三の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域、または、第三の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域と第四の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域を、それぞれ異なる領域であり、かつ、第二の抗HER2タンパク質抗体が固相化された領域および第一の抗HER2タンパク質抗体に結合する抗体が固相化された領域のいずれとも異なる領域にてさらに含み、前記第二の抗HER2タンパク質抗体、前記第三の抗HER2タンパク質抗体および前記第四の抗HER2タンパク質抗体はそれぞれ異なる抗体医薬であることを特徴とする請求項12または13に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記がん組織が生検組織であることを特徴とする請求項10～16のいずれかに記載の方法。

**【請求項 18】**

前記がん組織が上部消化管のがん組織であることを特徴とする請求項10～17のいずれかに記載の方法。

## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2017/002645
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/574(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/574, A61K39/395, A61P35/00, G01N33/543  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 103499691 A (Suzhou Merike Biological Science & Technology Co., Ltd.), 08 January 2014 (08.01.2014), claims (Family: none)	1-18
Y	WO 2012/035705 A1 (Tohoku University), 22 March 2012 (22.03.2012), claims; paragraphs [0008] to [0009], [0012]; example 2 & US 2013/0230866 A1 claims; paragraphs [0009] to [0010], [0013]; example 2 & EP 2618154 A1	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 April 2017 (07.04.17)		Date of mailing of the international search report 18 April 2017 (18.04.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2017/002645

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VENKATARAMASUBRAMANI M et al., Development of Gold Nanorod Lateral Flow Test for Quantitative Multi-analyte Detection, IFMBE Proceedings, 2009, 24, 199-202	3,13
A	WO 2013/151066 A1 (Konica Minolta, Inc.), 10 October 2013 (10.10.2013), claims; paragraph [0022] & US 2015/0079608 A1 claims; paragraph [0045] & EP 2835643 A1	1-18



国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 2 6 4 5													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/574, A61K39/395, A61P35/00, G01N33/543															
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2017年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2017年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2017年														
日本国実用新案登録公報	1996-2017年														
日本国登録実用新案公報	1994-2017年														
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)															
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													
Y	CN 103499691 A (苏州默锐克生物科技有限责任公司) 2014.01.08, 請求の範囲 (ファミリーなし)	1-18													
Y	WO 2012/035705 A1 (国立大学法人東北大学) 2012.03.22, 請求の範囲、段落 0008-0009、0012、実施例 2 & US 2013/0230866 A1 (請求の範囲、段落 0009-0010、0013、実施例 2) & EP 2618154 A1	1-18													
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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														
「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	「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														
「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)	「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														
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献														
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 07.04.2017		国際調査報告の発送日 18.04.2017													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 赤坂 祐樹	2 J 3316												
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252													

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 2 6 4 5
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	VENKATARAMASUBRAMANI M et al., Development of Gold Nanorod Lateral Flow Test for Quantitative Multi-analyte Detection, IFMBE Proceedings, 2009, 24, 199-202	3, 13
A	WO 2013/151066 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2013.10.10, 請求の範囲、段落 0022 & US 2015/0079608 A1 (請求の範囲、段落 0045) & EP 2835643 A1	1-18

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
	A 6 1 K 39/395	T
	A 6 1 P 35/00	

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

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。