

(19)日本国特許庁（J P）

(12) 公表特許公報

(A) (11)特許出願公表番号

特表2003－511698
(P2003－511698A)

(43)公表日 平成15年3月25日(2003.3.25)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/569		G 0 1 N 33/569	B 4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/12		C 0 7 K 16/12	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/09	ZNA	G 0 1 N 33/497	A 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/497		33/50	F
33/50			Z
審査請求 未請求 予備審査請求（全112数） 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001－530573(P2001－530573)	(71)出願人	コンネクス・ゲゼルシャフト・ツーア・オプティミエリング・フォン・フォルシュング・ウント・エントヴィックルング・エムペーハー ドイツ連邦共和国 82152 マルティーンズリート,アム・クロプフェルシュピッツ 19
(86)(22)出願日	平成12年10月12日(2000.10.12)	(72)発明者	ライター, クリスティアン ドイツ連邦共和国 85757 カルルスフェルト,ラートハオスシュトラーセ 8
(85)翻訳文提出日	平成14年4月12日(2002.4.12)	(74)代理人	弁理士 社本 一夫 (外5名)
(86)国際出願番号	PCT/EP00/10058		
(87)国際公開番号	W001/027613		
(87)国際公開日	平成13年4月19日(2001.4.19)		
(31)優先権主張番号	99120351.4		
(32)優先日	平成11年10月12日(1999.10.12)		
(33)優先権主張国	欧州特許庁(EP)		
(31)優先権主張番号	00105592.0		
(32)優先日	平成12年3月16日(2000.3.16)		
(33)優先権主張国	欧州特許庁(EP)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 便中の酸耐性微生物の改良された検出方法

(57)【要約】

本発明は、酸耐性微生物での哺乳動物の感染を検出するための方法であって、（a）哺乳動物の便試料を、（a a）1種類の受容体と、酸耐性微生物由来の抗原と当該受容体との複合体形成を可能にするような条件下でインキュベートする、又は（b）2種類の異なる受容体群と、酸耐性微生物由来の抗原と当該2種類の受容体との複合体形成を可能にするような条件下でインキュベートする、そして、ここにおいて、（a a）の受容体又は（a b）の受容体群は、抗原と特異的に結合し、当該抗原は少なくともいくつかの哺乳動物において、天然の構造、又は酸耐性微生物で感染されたもしくは免疫化された後に哺乳動物が抗体を産生するような構造、又は、酸耐性微生物の抽出物若しくは溶解物、又はそれ由来のタンパク質若しくはその断片若しくは合成ペプチドが抗体を産生するような構造、に相当する構造を、腸を通過後に示す；そして（b）（a）による少なくとも1種類の抗原－受容体複合体の形成を検出することを含む、前記方法に関する。好ましくは、酸耐性微生物は細菌であり、特に、ヘリコバクター・ピロリ、ヘリコバクター・ヘパティクス、カンピロバクター・ジェジュニまたはヒト型結核菌（Mycobacterium tuberculosis）である。さらに、単数または複数の受容体（

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

哺乳動物の酸耐性微生物による感染を検出するための方法であって、

(a) 哺乳動物の便試料を、(a a) 1種類の受容体と、酸耐性微生物由来の抗原と当該受容体との複合体形成を可能にするような条件下でインキュベートする、又は(b) 2種類の異なる受容体群と、酸耐性微生物由来の抗原と当該2種類の受容体との複合体形成を可能にするような条件下でインキュベートする、そして、

ここにおいて、(a a) の受容体又は(a b) の受容体群は、抗原と特異的に結合し、当該抗原は少なくともいくつかの哺乳動物において、天然の構造、又は酸耐性微生物で感染されたもしくは免疫化された後に哺乳動物が抗体を産生するような構造、又は、酸耐性微生物の抽出物若しくは溶解物、又はそれ由来のタンパク質若しくはその断片若しくは合成ペプチドが抗体を産生するような構造、に相当する構造を、腸を通過後に示す；そして

(b) (a) による少なくとも1種類の抗原－受容体複合体の形成を検出することを含む、前記方法。

【請求項2】

微生物が酸耐性細菌である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

酸耐性細菌が、ヘリコバクター (*Helicobacter*) 属、カンピロバクター (*Campylobacter*) 属、又はミコバクテリウム (*Mycobacterium*) 属に属する細菌である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

細菌が、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、ヘリコバクター・ヘパティカス (*Helicobacter hepaticus*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) 又はミコバクテリウム・チューバキュロシス (*Mycobacterium tuberculosis*) 種の細菌である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

抗原が、好ましくはヘリコバクター・ピロリ (H. pylori) の、カタラーゼ、ウレアーゼ又はメタロプロテナーゼの抗原である、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

受容体／受容体群が、抗体（単数若しくは複数）、その断片（単数若しくは複数）若しくは誘導体（単数若しくは複数）、又はアプタマー（単数又は複数）である、請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

検出のために、さらに受容体群の混合物が使用される、ここにおいて、受容体を抗原の検出因子として使用する場合、受容体の混合物は抗原を捕捉する機能を有し、そして、受容体を抗原の捕捉因子として使用する場合、受容体の混合物は抗原を検出する機能を有する、請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

受容体群の混合物がポリクローナル抗血清である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

ポリクローナル抗血清が、微生物の溶解物に対して得られたものである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

溶解物が、富化された抗原を含む溶解物である、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

溶解物が、枯渇化された免疫ドミナント抗原を含む溶解物である、請求項9又は10に記載の方法。

【請求項12】

ポリクローナル抗血清が、精製された又は（半）合成により産生された抗原に対して得られたものである、請求項8に記載の方法。

【請求項13】

抗原が、カタラーゼ、ウレアーゼ又はメタロプロテナーゼの抗原である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

受容体、及び／又は受容体群の混合物が、コンフォメーションエピトープ（単数又は複数）に結合する、請求項1ないし13のいずれか1項に記載の方法。

【請求項15】

カタラーゼエピトープに結合する抗体の重鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を有する請求項5ないし14のいずれか1項に記載の方法。

CDR1： NYW I H

CDR2： Y I N P A T G S T S Y N Q D F Q D

CDR3： E G Y D G F D S

【請求項16】

抗体の重鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を有する請求項15に記載の方法。

CDR1： A A C T A C T G G A T T C A C

CDR2： T A C A T T A A T C C T G C C A C T G G

T T C C A C T T C T T A C A A T C A G G

A C T T T C A G G A C

CDR3： G A G G G G T A C G A C G G G T T T G A

C T C C

【請求項17】

カタラーゼエピトープに結合する抗体の軽鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を有する請求項5ないし14のいずれか1項に記載の方法。

CDR1： S A S S S V N Y M Y

CDR2： D T S K L A S

CDR3： Q Q W S S N P Y T

【請求項18】

抗体の軽鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を有する

請求項17に記載の方法。

CDR1: AGTGCCAGCT CAAGTGTA
TTACATGTAC

CDR2: GACACATCCA AATTGGCTTC
T

CDR3: CAGCAGTGGA GTAGTAATCC
GTACACG

【請求項19】

カタラーゼエピトープに結合する抗体の重鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項5ないし14のいずれか1項に記載の方法。

CDR1: DTYVH

CDR2: KIDPANGKTKYDPIFQA

CDR3: PIYYASSWFAY

【請求項20】

抗体の重鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項19に記載の方法。

CDR1: GACACCTATG TGCAC

CDR2: AAGATTGATC CTGCGAATGG
TAAAACTAAA TATGACCCGA
TATTCCAGGC C

CDR3: CCCATTTATT ACGCTAGTTC
CTGGTTTGCT TAC

【請求項21】

カタラーゼエピトープに結合する抗体の軽鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項5ないし14のいずれか1項に記載の方法。

CDR1: KASQDVGTSVA

CDR2: WTSTRHT

CDR3: QYSSSPT

【請求項22】

抗体の軽鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項21に記載の方法。

CDR1: AAGGCCAGTC AGGATGTGGG

TACTTCTGTT GCC

CDR2: TGGACATCCA CCCGGGCACAC

T

CDR3: CAGCAATATA GCAGCTCTCC

CACG

【請求項23】

β-ウレアーゼエピトープに結合する抗体の重鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3を示す請求項5ないし14のいずれか1項に記載の方法。

CDR1: GFTFSSHFMS

CDR2: SISSGGDSFYPSLKG

CDR3: DYSWYALDY

又は:

CDR1: GYAFSTSWMN

CDR2: RIYPGDGDTNYNGKFKG

CDR3: EDAYYSNPYSLDY

【請求項24】

抗体の重鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDR全て、を示す請求項23に記載の方法。

CDR1: GG CTACGCATTC AGTACCTCCT GGAT
GAAC

CDR2: CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACT
AAC TACAATGGGA AGTTCAAGGG C

CDR3: GAG GATGCCTATT ATAGTAACCC CTA
TAGTTTG GACTAC

又は:

CDR1: GG ATTCACTTTC AGTAGCCATT TCAT
GTCT

CDR2: TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTC
TAT CCAGACAGTC TGAAGGGC

CDR3: GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA
C

【請求項25】

β-ウレアーゼエピトープに結合する抗体の軽鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項5ないし14のいずれか1項に記載の方法。

CDR1: RASQSIGTRIH

CDR2: YGSEESIS

CDR3: QQSNTWPLT

又は:

CDR1: HASQNINVWLS

CDR2: KASNLHT

CDR3: QQGRSYPLT

【請求項26】

抗体の軽鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項25に記載の方法。

CDR1: A GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAG
AATAC AC

CDR2: TAT GGTTCTGAGT CTATCTCT

CDR3 : CAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC G

又は :

CDR1 : C ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTTG
GTTAA GC

CDR2 : AAG GCTTCCAAC TGCACACA

CDR3 : CAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC
G

【請求項27】

抗体が、軽鎖及び重鎖の可変領域において、図1及び2、図3及び4、図5及び6、又は図7及び8に示されたアミノ酸配列を有する、請求項5ないし26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

軽鎖及び重鎖の可変領域のコード領域が、図1及び2、図3及び4、図5及び6、又は図7及び8に示されたDNA配列を有する、請求項5ないし27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

抗体でのインキュベーションの前に、便試料に以下の工程：

(a) 便試料を、1：3ないし1：25の割合で、好ましくは約1：5ないし1：10の割合で、特に好ましくは1：5の割合で、再懸濁緩衝液中に再懸濁し、そして

(b) 攪拌混合器 (vortex mixer) で混合する
を施す、請求項1ないし28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

工程(b)における、抗原-受容体複合体/抗原-受容体/受容体混合物 複合体の少なくとも一つの形成の検出が、免疫学的方法の手段によって行われる、請求項1ないし29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】

工程(b)における、抗原-受容体複合体/抗原-受容体/受容体混合物 複合体の少なくとも一つの形成の検出が、ELISA、RIA、ウェスタンブロッ

ト又はイムノクロマトグラフィー法の手段によって行われる、請求項1ないし30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

R I A又はE L I S Aにおいて、固相への結合とエピトープの検出と双方に同じ受容体が使用される、請求項30又は31に記載の方法。

【請求項33】

受容体が支持体に固定されている、請求項1ないし32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項34】

受容体がマウスのモノクローナル抗体である、請求項1ないし33のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

方法が、一工程E L I S Aである、請求項1ないし34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項36】

方法が、三工程E L I S Aである、請求項1ないし34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項37】

支持体の材料が、有孔性の材料である、請求項33に記載の方法。

【請求項38】

支持体の材料が試験ストリップである、請求項33及び37に記載の方法。

【請求項39】

支持体の材料が、セルロース又はセルロースの誘導体からなる、請求項33、37又は38に記載の方法。

【請求項40】

便試料のかわりに、呼気濃縮物、胃ガス、歯垢、唾液、粘膜スメア、生検、全血液又は血清を使用する、請求項1ないし39のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】

方法が、自動化された方法である請求項1ないし40のいずれか1項に記載の

方法。

【請求項42】

哺乳動物がヒトである、請求項1ないし41のいずれか1項に記載の方法。

【請求項43】

請求項15ないし26のいずれか1項に記載のCDRの組合せを示すV領域を有する、モノクローナル抗体、又はその断片若しくは誘導体。

【請求項44】

図1及び2、図3及び4、図5及び6、又は図7及び8に示されたV領域の少なくとも一つを有する、請求項43に記載のモノクローナル抗体、又はその断片若しくは誘導体。

【請求項45】

マウスの抗体、又はその断片若しくは誘導体、又はキメラの好ましくはヒト化抗体、又はその断片若しくは誘導体である、請求項43及び44に記載のモノクローナル抗体、又はその断片若しくは誘導体。

【請求項46】

請求項43ないし45のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体、又はその断片若しくは誘導体と同じエピトープと特異的に結合する、アプタマー。

【請求項47】

請求項43ないし45のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体、又はその断片若しくは誘導体、あるいは請求項46に記載のアプタマーによって特異的に結合されるアプタマー。

【請求項48】

請求項47のエピトープによって特異的に結合される、抗体、又はその断片若しくは誘導体。

【請求項49】

所望により支持体材料に固定された、上記いずれかの1項に定義された少なくとも一つの受容体を含む診断用組成物であって、所望により支持体材料に固定された、上記いずれかの1項に定義された受容体の混合物を、所望によりさらに含んでもよい、前記診断用組成物。

【請求項50】

上記いずれかの1項に定義されたエピトープの少なくともいずれか1つの検出のための試験装置であって、

(a) 指示材料に固定化された、上記いずれかの1項に定義された少なくとも一つの受容体

(b) 便試料を調製し、分析するための装置；及び所望により

(c) 上記いずれかの1項に定義された受容体の混合物を含む、試験装置。

【請求項51】

上記いずれかの1項に定義された少なくとも一つのエピトープの検出のための試験装置であって、

(a) コロイド状金、ラテックス粒子又はその他のカラー粒子と結合した、上記いずれかの1項に定義された少なくとも一つの受容体、ここにおいて、前記コロイド状金、ラテックス粒子又はその他のカラー粒子のサイズは、典型的には5 nmと100 nmの間の範囲、好ましくは20 nmと60 nmの間、特に好ましくは40 nmと60 nmの間（金）、そして、200 nmと500 nmの間（ラテックス）である；

(b) 便試料を調製し、分析するための装置；及び所望により

(c) 上記いずれかの1項に定義された受容体の混合物を含む、試験装置。

【請求項52】

以下の

(a) 所望により支持体材料に固定された、上記いずれかの1項に定義された少なくとも一つの受容体；所望によりさらに、

(b) 便試料を調製し、分析するための装置；及び所望により

(c) 上記いずれかの1項に定義された受容体の混合物を含むキット。

【請求項53】

上記に記載された受容体の少なくとも一つを、所望により医薬的に受容可能な

支持体及び／又は希釈剤と組合せて含む、組成物、好ましくは医薬組成物。

【請求項54】

請求項49に記載の診断用組成物、請求項50、51に記載の試験装置、又は請求項52に記載のキットを含む、パッケージ。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明の記載は、いくつかの公表された文献に言及する。これらの文書の主題は、本明細書に援用される。

【0002】

本発明は、酸耐性微生物での哺乳動物の感染を検出するための方法であって、
(a) 哺乳動物の便試料を、(aa) 酸耐性微生物由来の抗原と受容体の複合体形成を可能にする条件下で、受容体と；または(ab) 酸耐性微生物の抗原と2つの受容体群の複合体形成を可能にする条件下で、2つの異なる受容体群とインキュベーションし、ここで(aa) 記載の受容体または(ab) 記載の受容体群は、少なくともいくつかの哺乳動物で、天然構造、あるいは該酸耐性微生物に感染したまたは該微生物で免疫感作された後、それに対して哺乳動物が抗体を産生する構造、あるいは該酸耐性微生物の抽出物もしくは溶解物、またはそれに由来するタンパク質もしくはその断片、または合成ペプチドが抗体を産生するような構造に相当する構造を、腸通過後に示す抗原に、特異的に結合する；そして(b) (a) 記載の少なくとも1つの抗原受容体複合体の形成を検出する、前記方法に関する。好ましくは、酸耐性微生物は、細菌、特にヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、ヘリコバクター・ヘパティクス (*Helicobacter hepaticus*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) またはヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) である。さらに、単数または複数の受容体(群)は、好ましくは、カタラーゼ、メタロプロテイナーゼ又はウレアーゼの単数または複数のエピトープに結合する。さらに、本発明は、前記成分を含む、診断および医薬組成物、並びに前記成分を含む試験装置および該成分を含むパッケージングに関する。

【0003】

今日、微生物病原体または寄生虫での哺乳動物生物の感染を検出するための多様な侵襲性、半侵襲性または非侵襲性的方法がある。すべての侵襲性的方法は、内視鏡検査および生検を前提とする。侵襲性的技術を用いる場合、例えば生検で

は、検査される被験者の物理的完全性が侵される。生検によって標本を得るのは、時間がかかり、費用がかかり、そして一般に患者に緊張を強いる。特定の微生物、例えばH. ピロリでの感染は、胃粘膜全体に渡って分布する必要はないため、非感染部位での生検によって標本を得ると、偽陰性結果を伝える可能性がある。すべての侵襲性の方法の別の不都合な点は、すべての検査結果が、プロトンポンプ阻害剤、ビスマスまたは抗生物質での先の処置によって影響を受けることである。

【0004】

半侵襲性または非侵襲性の診断法は、生物において、干渉することなく測定することが可能なパラメーターにおける変化に注目する。この目的のため、好ましくは体液および分泌物、例えば血清、呼吸、尿、唾液、汗または便の試料を採取し、そして解析する。

【0005】

直接法では、病原体または寄生虫、その成分または分解産物の存在を、電子顕微鏡、光学特性、質量分析、放射能壊変産物または特定の酵素反応の測定によって検出する。しかし、これらの方法は、しばしば、高価でそして洗練された装置を必要とする（例えば呼吸試験）。対照的に、間接法は、病原体または寄生虫に対する宿主生物の反応、例えば宿主の血清または唾液中の病原体の抗原に対する抗体の存在を検出するのに用いられる。侵襲性技術を用いて生物に干渉するのは、ほとんどの場合、生物に緊張を強い、そしてまた高価でそして洗練された装置を必要とし、そして健康上の危険を伴うため、上述の体液および分泌物の試料を採取するのが比較的単純であるので、非侵襲性技術が選択される方法である。さらに、必ずしもすべての宿主が、特定の病原体または寄生虫に、同一の方式で反応するわけではなく、そして宿主の反応が遅延し、そして該生物から病原体または寄生虫が除去された後であっても持続する可能性があるため、直接法が常に好まれるべきである。したがって、理想的には、診断は、体液または分泌物における病原体または寄生虫の非侵襲性直接検出によって行われる。間接的方法と対照的に、これは現在の感染状態を決定することを可能にする。

【0006】

さらに、診断法はまた、他の側面に関しても最適化されるべきであり：高再現性、感度および特異性、保証される入手可能性および用いられる材料の一定の品質、方法を作成しそして実行するための低コスト、および高価でそして洗練された装置と独立の単純な適用が考慮すべきパラメーターである。

【0007】

上述の理由のため、医学的診断法において、解析しようとする対応する物質に関して、非常に特異的であるように、選択することが可能である、分子構造に対する特定の種類の物質（例えば抗体、受容体、レクチン、アプタマー）の高い選択性および結合親和性に基づく方法の使用が増加している。これは、体に天然に存在する、または体に対して異質の（f o r e i g n）物質を検出するための、安価で、単純でそしてより時間がかからない方法の開発につながる、主に、これらの物質の固体表面上の固定、並びに、放射性核種カップリング、適切な基質との発色反応を誘発する酵素のカップリング、または非常に特異的な結合親和性を持つ有色粒子のカップリング（例えば、E L I S A＝酵素連結免疫吸着アッセイにおける）の可能性であった。

【0008】

これらの検出法の開発の最初の段階において、もっぱらポリクローナル抗体が用いられた。しかしこれらは、当業者に公知のいくつかの不都合な点を有し、これらの主なものは、限定された入手可能性およびしばしば交差反応性である。モノクローナル抗体を調製するための方法の開発（K o h l e r & M i l s t e i n（1975））、受容体の単離および細胞宿主系におけるその指示された発現における進歩、特定の炭水化物に高い親和性を持つレクチンの開発、および一本鎖核酸分子（アプタマー）が分子構造に特異的に結合することが可能であるという発見によって、これらの不都合な点の大部分を排除することが可能になった。今日、検出法の特異性および感度は、比較的単純な方法で最適化することが可能である。

【0009】

高い特異性のため、こうした方法は、認識されている構造要素が、調べようとする標本集団内で一定であり、そして検出しようとする物質に特異的である限り

、ハプテン、ペプチドまたはタンパク質などの、個々の定義される物質に特に適している。さらに、これらは、体液における測定によく適しており、そしてしたがって標本マトリックスの病原体の直接検出の明らかなオプションである。したがって、先行技術は、便由来の、例えば赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) (Hague (1993), J. Infect. Dis. 167: 247-9)、腸管出血性大腸菌 (*Escherichia coli*) (EHEC, Park (1996), J. Clin. Microbiol. 34: 988-990)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*) (Hasan (1954), FEMS Microbiol. Lett. 120: 143-148)、トロウイルス (Toro virus) 様粒子 (Koopmans (1993) J. Clin. Microbiol. 31: 2738-2744) または無鉤条虫 (*Taenia saginata*) (Machnicka (1996), Appl. Parasitol. 37: 106-110) を診断するための方法を記載する。

【0010】

上述の病原体が共通に有する特徴は、これらが、すべての場合、ヒトにおいて、宿主の腸中で生存可能であり、そして繁殖可能であることである。したがって、これらは、腸において活性である分解および消化系の存在下で、生き残り、そして増殖することを可能にする機構を有する。したがって、多数の損なわれていない (*intact*) またはほぼ損なわれていない病原体または寄生虫が、便と共に排出される可能性がある。概して、検出試薬、例えば損なわれていない病原体または寄生虫を認識する抗体によって、便または調製された便試料において、これらを検出するのは容易である。

【0011】

しかし、一方、胃腸管に対する罹患組織 (例えば肺、胃、脾臓、十二指腸、肝臓) の関連のため、便に存在する可能性があり、そして一方、腸自体において、生存可能でなくそして／または繁殖可能でない、いくつかの病原体または寄生虫がある。これらの病原体および寄生虫には、例えばヘリコバクター・ピロリ (*H.ピロリ*) およびヘリコバクター・ヘパティス (*Helicobacter h*

apatis)、ヒト型結核菌および他のミコバクテリウム、肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*)、ニューモシスティス・カリニ (*Pneumocystis carinii*) および他のものが含まれる。これらの病原体は、例えば、痰中において検出されうる。しかしながら、痰におけるヒト型結核菌の検出が可能なのは、短い期間のみ、即ち、病原体を含む洞が開かれてからである。さらに、調べたい態様の痰試料は常に得られるものではないという事実により、検出はより困難となる。このことは、例えば、乳児、混乱状態の (*confused*) 患者、又は動物に当てはまる。他の病原体、例えばレジオネラ・ニューモフィラは、腎臓を介して尿に入る抗原によって、特異的に検出することが可能である。それでも、これは、尿に存在する量が、検出に十分である場合にのみ可能である。便中の検出は、優れた代替法であるだろう。しかし、これらの生物では、腸通過は、腸フロラの消化および分解機構による強い攻撃と組み合わされる。この場合、観察される病原体に特異的な分子構造が破壊される可能性があるか、またはその濃度が非常に減少する可能性がある。

【0012】

他の酸耐性細菌でもまた、腸における病原体の分解が、便試料中の信頼できる検出のため問題となることがわかった。感染患者の胃における微生物の数は、腸における他の細菌定着の数に比較して小さい。さらに、微生物および微生物断片は、胃を離れた後、プロテアーゼが豊富な腸を、長い間、通過しなければならない。これらの状況のため、損なわれていないタンパク質は、少量しか便に見出すことができない。しかし、常に特定のタンパク質の同一断片が、腸管を損なわれずに通過すると仮定することは不可能である。この別の結果は、ELISAに必要な、1つの抗原上の2つのエピトープの組み合わせが、もはや必ずしも天然タンパク質に存在するものと同様ではなく、そして互いに近接して位置するエピトープが、同一分子上の2つのエピトープを必要とする検出法において、陽性の結果を示す可能性が最も高いことである。理想的には、同一分子上の1つのエピトープのみが検出に必要とされる。さらに、感染患者の便中に検出される抗原の分布は、腸通過中の抗原のプロセッシングにおける個々の特徴を示唆する。この問題

を減少させる第一のアプローチは、EP-A 0 806 667の開示に提供されている。この出願において、特定のH. ピロリ株の溶解物で、ポリクローナル抗体を誘導することが可能であることが示された。これらの抗体は、異なる地理的領域由来のより広い多様性の株を認識する。しかし、この出願は、血清によって、どの抗原が認識されるかを示さない。免疫血清が、すべての標準化のための努力にも関わらず多様であるという事実を考慮し、上述の出願で開発された方法は、広い適用には最適以下であると認識しなくてはならない。さらに、ポリクローナル血清を提供するため、新たな動物を免疫しつづける必要がある。対応する方法は、時間がかかり、そして費用もかかる。

【0013】

理想的には、この病原性生物／寄生虫に特異的な、単一のまたは限定された数の試薬（群）が、上に広げられたような酸耐性病原性生物／寄生虫の感染の信頼できる検出を可能にするべきである。そのような可能性は、最終的には、対応する検出方法の費用をかなり削減するであろう。したがって、本発明の根底にある技術的問題は、対応する検出方法又は対応する試薬を提供することであった。

【0014】

この技術的問題は、請求項に特徴付けられる態様を提供することによって、解決された。

したがって、本発明は、酸耐性微生物での哺乳動物の感染を検出するための方法であって、（a）哺乳動物の便試料を、（a a）酸耐性微生物由来の解析物または抗原と受容体の複合体形成を可能にする条件下で、受容体と；または（a b）酸耐性微生物の解析物または抗原と2つの受容体群の複合体形成を可能にする条件下で、2つの異なる受容体群とインキュベーションし、ここで（a a）記載の受容体または（a b）記載の受容体群は、少なくともいくつかの哺乳動物で、天然構造、あるいは該酸耐性微生物に感染したまたは該微生物で免疫感作された後、それに対して哺乳動物が抗体を産生する構造、あるいは該酸耐性微生物の抽出物もしくは溶解物、またはそれに由来するタンパク質もしくはその断片、または合成ペプチドが抗体を産生するような構造に相当する構造を、腸通過後に示す抗原に、特異的に結合する；そして（b）（a）記載の少なくとも1つの抗原—

受容体複合体の形成を検出する、前記方法に関する。

【0015】

本発明の意味内で、用語「酸耐性微生物」は、宿主に適応する特性／機構のため、好ましくは免疫学的試験によって、またはアプタマーの使用によって、検出することが可能な効果を持ち、消化管の物理的および化学的影響に抵抗するいかなる微生物も含む。こうした酸耐性微生物の例は、ヘリコバクター・ピロリ、ヘリコバクター・ヘパティウム (*Helicobacter hepaticum*)、ヒト型結核菌、偽結核菌 (*Mycobacterium pseudotuberculosis*) およびミコバクテリウム・カンサシ (*Mycobacterium cansassii*) である。

【0016】

本発明において、用語「哺乳動物の便試料」は、本発明の検出法に用いることが可能ないかなる便試料も意味する。特に、該用語は、基本的に既知の方法にしたがった診断試験のため調製されている便試料を含む。調製は、例えば、RID ASCREEN (登録商標) エントアメーバ属酵素免疫アッセイ (R-Biopharm GmbH、ダルムシュタット) にしたがって行ってもよい。

【0017】

当業者は、容易に「複合体形成を可能にする条件」を調整することが可能であり、またHarlowおよびLane、同書も参照されたい。これらの条件は、例えば、生理学的条件である。

【0018】

本発明において、用語「天然構造 (・・・) に対応する構造を、腸通過後に示す」は、抗原のエピトープが、腸を通過しない同一抗原／エピトープに対して得られるか、またはそれに結合する受容体、例えばモノクローナル抗体、その誘導体もしくは断片あるいはアプタマーによって、腸通過後、認識されることを意味する。言い換えると、上述の受容体に特異的に結合されるエピトープ／抗原は、構造に関して、損なわれないかまたは本質的に損なわれずに通過し、そして分解されていない。エピトープ／抗原の天然構造の供給源は、例えばフレンチプレスによって破壊され、そしてさらに標準法にしたがって精製された細菌抽出物 (例え

ばSambrookら, “Molecular Cloning, A Laboratory Manual”, 第2版, 1989, CSH Press, 米国コールドスプリングハーバーを参照されたい)、または標準法にしたがってさらに精製された細菌溶解物(例えばSambrookら、同書)であってもよい。

【0019】

本発明において、用語「(…) 該酸耐性微生物に感染したまたは該微生物で免疫感作された後、それに対して哺乳動物が抗体を産生する構造、あるいはその抽出物もしくは溶解物、またはそれに由来するタンパク質もしくはその断片、または合成ペプチドが抗体を産生するような構造に相当する構造を、腸通過後に示す」は、受容体に認識されるエピトープが、哺乳動物、好ましくはヒトの免疫系によって提示されるエピトープに対応することを意味する。抗原提示の機構と共に、抗原のプロセッシングおよびそこから生じる多様な抗体を導く機構は、先行技術に知られ、そして例えばJanewayおよびTravers, Immunologie, 第2版 1997, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, ハイデルベルグに記載されている。これらのエピトープは天然エピトープと異なる可能性がある。哺乳動物と微生物またはタンパク質または断片または合成ペプチドとの接触は、天然感染(合成ペプチドを除く)によって、または免疫感作によって、達成されてもよい。免疫感作に関しては、微生物/タンパク質の抽出物、溶解物、合成ペプチドなどもまた、用いてもよい。適切な免疫感作法は、先行技術に知られ、そして例えばHarlowおよびLane、同書に記載されている。適切な抗体はまた、例えば、免疫感作および/または合成ペプチド、組換え産生タンパク質、抽出物、溶解物または部分的消化タンパク質などの代理(surrogate)に関するスクリーニングによって、得ることも可能である。

【0020】

「合成ペプチド」は、天然抗原または腸を通過した抗原の少なくとも1つのエピトープを有するペプチドを含む。ペプチドは、抗原またはその断片と同一の一次構造を有してもよい。しかし、これらはまた、異なる一次構造(一次アミノ酸

配列、例えば保存的交換)を有してもよい。

【0021】

用語「特異的に結合する」は、本明細書において、受容体が、非感染哺乳動物の試料中の他のエピトープとまったくまたは本質的にまったく反応性を示さないことを意味する。通常、受容体は、便試料に存在する抗原のエピトープのみに結合する。

【0022】

本発明の本態様において、調製された便試料は、例えば、固相に結合させることが可能であり、そして感染病原体は標識受容体で検出することが可能である。腸通過後に存在する抗原が、(なお)(ホモ)二量体または多量体型で存在する場合、同一受容体を、捕捉因子および検出因子両方として用いてもよい。

【0023】

さらに、本発明の方法には、検出の成功が、本質的に一定の方式で、腸通過後に、抗原性タンパク質の1つのエピトープのみが検出されることを必要とすることが重要である。このエピトープは、ホモ二量体または多量体上に何度も存在してもよい。しかし、このエピトープが検出可能型で見出される可能性は、1つ以上のエピトープが検出されることに頼らなければならない検出試験の場合より、有意により高い。

【0024】

最後に、1つの受容体のみを必要とする本発明の方法は、費用および標準化に関して、利点を伴う。

前記微生物由来の特定の抗原が、検出のため、本質的に一定である、腸通過後のエピトープ構造を有するという、本発明にしたがった、驚くべき知見に基づき、第二の態様もまた、本発明に本質的であるとみなさなければならない。本態様は、異なる受容体が、同一抗原の異なるエピトープに結合するという事実に基づく。ここで、用語「本質的に」は、単数または複数のエピトープおよびしたがって微生物での対応する感染が、70%以上、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは85%以上、特に好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上、そして最も好ましくは98%以上の感染個体で検出することが可能であ

ることを意味する。理想的には、感染は、感染個体の100%で検出される。

【0025】

本発明にしたがい、驚くべきことに、酸耐性微生物の抗原のエピトープに特異的に結合するただ1つの単一の受容体、または同一抗原の2つのエピトープに特異的に結合する2つの受容体群によって、これらの細菌／病原体での感染は、比較的信頼できる方式で診断することが可能である、ということが発見された。本発明は、前記の特性を有する他のエピトープが、他の受容体によって、例えばモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体あるいはアプタマーによって、認識される態様を含む。後者の態様は、診断の信頼性をさらに増加させるのに適している。好適には、これらの他の受容体は、すべて好ましくはH. ピロリ由来である、ウレアーゼ、好ましくはβ-ウレアーゼ、26kDaタンパク質またはHsp 60を特異的に認識する抗体、断片または誘導体であってもよい。これらのタンパク質／タンパク質断片の1つまたはそれ以上の検出は、同一の試験または同一試料の異なる部分での別個の試験で行ってもよい。

【0026】

本発明の結果は、主に、当該技術分野が異なって教授していたため、驚くべきことである。例えばH. ピロリの場合、主要抗原がELISAで望ましい特異性および感度を示さないことが見出された； Newellら, Serodiag. Immunother. Infect. Dis. 3 (1989), 1-6を参照されたい。さらに、EP-A-0 806 667は、H. ピロリ株の遺伝的多様性のため、モノクローナル抗体などの受容体で、H. ピロリ感染を信頼可能に検出するのは不可能であると解説する。

【0027】

上述の当該技術分野に比較し、本発明の方法は、主に、ただ1つの受容体で比較的信頼できる診断を可能にするため、好適である。ELISAにおいて、例えば抗体、その断片、誘導体またはアプタマーなどの受容体の対が検出に用いられ、対の2つの受容体群が同一抗原上の同一のまたは異なるエピトープに結合する。例えばH. ピロリ・カタラーゼは、いくつかの同一サブユニットの多量体構造を形成する。したがって、ELISAまたは他のアッセイにおいて、同一受容体

を捕捉受容体および検出受容体両方として用いることが可能である。本発明の方法の別の利点は、該方法が、直接的で、そして非侵襲性的の方法であり、患者に対する上述の利点および決定されるべき疾患の段階に関する信頼性を増加させるという事実である。

【0028】

好ましい態様において、酸耐性微生物は酸耐性細菌である。

いくつかの酸耐性細菌が、当該技術分野において知られている。特に好ましい態様において、酸耐性細菌は、ヘリコバクター、カンピロバクター属、またはミコバクテリウム属に属する。

【0029】

別の特に好ましい態様において、細菌は、ヘリコバクター・ピロリ、ヘリコバクター・ヘパティクム、カンピロバクター・ジェジュニ種に属する細菌またはヒト型結核菌種に属する細菌である。

【0030】

別の特に好ましい態様において、単数または複数の受容体（群）は、抗体（群）、その断片（群）または誘導体（群）、あるいはアプタマー（群）である。

本発明の意味内で、モノクローナル抗体の「断片（群）」または「誘導体（群）」は、モノクローナル抗体と同一の結合特異性を有する。こうした断片または誘導体は、標準法にしたがって産生することが可能である；例えばHarlowおよびLane, “Antibodies, A Laboratory Manual”, CSH Press, 米国コールドスプリングハーバー, 1988を参照されたい。断片の例には、Fab、F(ab')₂、またはFv断片が含まれる。scFv断片は誘導体の例である。誘導体はまた、抗体と同一の結合特性、または改善された結合特性を有する、化学的に産生された物質であってもよい。こうした物質は、例えば、ペプチド擬似体(peptidomimetics)によって、または異なる周期のファージディスプレイおよび改善された結合特性に関する続く選択によって、生成してもよい。本発明にしたがい、アプタマーは、高い特異性および親和性を持って、多数の標的配列に結合する、RNA；ssDNA（ss＝一本鎖）、修飾RNAまたは修飾ssDNAなどの

核酸である。用語「アプタマー」は、先行技術に知られ、そして例えばOsborneら, Curr. Opin. Chem. Biol. 1 (1997), 5-9に、またはStullおよびSzoka, Pharm. Res. 12 (1995), 465-483に定義されている。

【0031】

用語「抗原-抗体複合体」は、本発明の意味内で、抗原が天然抗体と形成する複合体のみでなく、その断片群または誘導体群と形成するものも含む。

本発明は、モノクローナル抗体（群）またはその断片（群）もしくは誘導体（群）のみが、あるいはアプタマーのみが用いられる態様と共に、1つの試験中に異なる種類の検出試薬が用いられる態様を含む。したがって、2例のみを挙げると、第一のモノクローナル抗体を第二の抗体誘導体と共に用いるか、または第一のアプタマーを第二の抗体断片と用いることが可能である。この観点で、用語「第一」および「第二」は、第一および第二の検出試薬を指す。しかし、これは、2つの抗体群、その誘導体群または断片群あるいは2つのアプタマー群が常に用いられることを意味しない。

【0032】

モノクローナル抗体群、その断片群または誘導体群の、あるいはアプタマー群の使用は、診断法の信頼性において、規格の容易な維持を確実にし、これは、これまでに知られており、そしてこの目的で導入されている診断法に比較した、大きな利点を意味する。さらに、例えばEP-A 0 806 667にしたがった方法で必要とされるように、新規の試験動物を免疫感作し、そして続いて試験しつづける必要はもはやない。

【0033】

別の好ましい態様において、抗原は、好ましくはH. ピロリ由来の、カタラーゼである。カタラーゼは、これまでに知られる酸耐性細菌のすべてで検出することが可能であるという特別の利点を有する。本発明にしたがい、別の利点として、カタラーゼが腸管における消化に非常に耐性であることが見出され、このことは、検出をかなり単純にする。結局、カタラーゼまたはその断片群は、腸通過後も、なお上位の構造、例えば四量体型で存在し、これは1つの受容体型のみでの

検出を容易にする。

【0034】

本発明にしたがい、驚くべきことに、便を酸耐性細菌での感染に関して試験した、哺乳動物集団において、特にヒト患者で、この集団の本質的にすべてのメンバーが、便中に一貫して頻発するカタラーゼ・エピトープを示しことが見出されたので、1つの対応する受容体、好ましくはモノクローナル抗体群、その断片群または誘導体群、あるいはアプタマー群での比較的信頼できる診断法を作成する可能性が非常に高い。特に、カタラーゼは四量体抗原性構造を有するため、この診断法は、例えば、ELISAまたは同様に配置された固体系に、好適に作成することが可能である。

【0035】

カタラーゼは、H. ピロリのカタラーゼであることが特に好ましい。

別の好ましい態様において、抗原はメタロプロテイナーゼ、特に好ましくはH. ピロリのメタロプロテイナーゼである。

【0036】

別の好ましい態様において、抗原は、好ましくはH. ピロリ由来の、ウレアーゼである。

別の好ましい態様において、さらなる使用は、検出のための受容体の混合物と、受容体が抗原の検出因子として用いられる場合、抗原の捕捉因子の機能を有する受容体の混合物、および受容体が抗原の捕捉因子として用いられる場合、抗原の検出因子の機能を有する混合物で行われる。本発明の本態様は、特に信頼可能な診断を可能にし、抗原が腸通過後、二量体または多量体コンホメーションで存在しない場合、特にそうである。本態様は、標準化免疫学的検出法の大部分で用いられている2つの受容体種のうち、1つのみをモノクローナル抗体とすることを可能にし、一方、例えば第二の受容体種は、ポリクローナル血清であってもよい。

【0037】

特に好ましい態様において、受容体混合物は、ポリクローナル抗血清である。

さらに特に好ましい態様において、微生物、好ましくはH. ピロリの溶解物に

対するポリクローナル抗血清が得られた。

【0038】

別の特に好ましい態様において、溶解物は、富化された抗原を含む溶解物である。

別の好ましい態様において、溶解物は、免疫ドミナント抗原が枯渇した溶解物である。

【0039】

2つの上述の態様はまた、溶解物が富化された抗原、好ましくは富化されたカタラーゼを含む溶解物、および免疫ドミナント抗原、好ましくは主に抗原性ウレアーゼが枯渇した溶解物であるという事実も含む。特に、前記の組み合わせは、高免疫感作収量を得る可能性を提供し、これは本発明の方法に特に適切である。対応する富化されたおよび枯渇法を行う方法は、実施例により詳細に記載される。

【0040】

別の特に好ましい態様において、好ましくはH. ピロリ由来の精製または（半）合成産生抗原に対するポリクローナル抗血清が得られた。

本発明において、受容体、好ましくはモノクローナル抗体、その断片または誘導体あるいはアプタマーは、直鎖またはコンホメーション・エピトープを認識し、そして特異的に結合することが可能である。別の好ましい態様において、少なくとも1つの受容体は、コンホメーション・エピトープに結合する。

【0041】

特に好ましい態様において、すべての受容体は、コンホメーション・エピトープに結合する。

特に好ましい態様において、カタラーゼ・エピトープに結合する抗体 [HP 25. 2m/2H10] の重鎖は、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてさらにより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1： NYW I H

CDR2： Y I N P A T G S T S Y N Q D F Y D

CDR3： E G Y D G F D S

を有する。

【0042】

別の特に好ましい態様において、カタラーゼ・エピトープに結合する抗体 [HP 25. 2m/2H10] の重鎖をコードするDNA配列は、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてさらにより好ましくは以下のCDRのすべて：

CDR1： AACTACTGGA TTCAC

CDR2： TACATTAATC CTGCCACTGG TTCCACTT
CT TACAATCAGG ACTTTCAGGA C

CDR3： GAGGGGTACG ACGGGTTTGA CTCC

を有する。

【0043】

別の特に好ましい態様において、カタラーゼ・エピトープに結合する抗体 [HP 25. 2m/2H10] の軽鎖は、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてさらにより好ましくは以下のCDRのすべて：

CDR1： SASSSVNYMY

CDR2： DTSKLAS

CDR3： QQWSSNPYT

を有する。

【0044】

さらに、別の特に好ましい態様において、抗体 [HP 25. 2m/2H10] の軽鎖をコードするDNA配列は、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてさらにより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1： AGTGCCAGCT CAAGTGTAAG TTACATGT
AC

CDR2： GACACATCCA AATTGGCTTC T

CDR3： CAGCAGTGGA GTAGTAATCC GTACACG

を有する。

【0045】

特に好ましい態様において、カタラーゼ・エピトープに結合する抗体 [HP 25. 6m/1B5] の重鎖は、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてさらにより好ましくは以下のCDRのすべて：

CDR1： DTYVH

CDR2： KIDPANGKTKYDPIFQA

CDR3： PIYYASSWFAY

を有する。

【0046】

別の特に好ましい態様において、カタラーゼ・エピトープに結合する抗体 [HP 25. 6m/1B5] の重鎖をコードするDNA配列は、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてさらにより好ましくは以下のCDRのすべて：

CDR1： GACACCTATGTGCAC

CDR2： AAGATTGATCCTGCGAATGGTAAACTAAATATGACCCGATATTC CAGGCC

CDR3： CCCATTTATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCTTAC

を有する。

【0047】

別の特に好ましい態様において、カタラーゼ・エピトープに結合する抗体 [HP 25. 6m/1B5] の軽鎖は、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてさらにより好ましくは以下のCDRのすべて：

CDR1： KASQDVGTSVA

CDR2： WTSTRHT

CDR3： QQYSSSPT

を有する。

【0048】

さらに、特に好ましい態様において、カタラーゼ・エピトープに結合する抗体 [HP 25. 6m/1B5] の軽鎖をコードするDNA配列は、少なくとも1つ

の以下のCDR、好ましくはCDR3そしてさらにより好ましくは以下のCDRのすべて：

CDR1： AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTTCTGTTGCC

CDR2： TGGACATCCACCCGGCACACT

CDR3： CAGCAATATAGCAGCTCTCCCACG

を有する。

【0049】

別の好ましい態様において、 β -ウレアーゼに特異的な抗体は、ブダペスト条約制定法にしたがって、1998年6月23日に、ドイツ微生物および細胞培養コレクション (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ) に、寄託番号DSM ACC2360またはDSM ACC2362下で寄託された、ハイブリドーマHP8m/4H5-D4-C9またはHP9.1m/3C2-F8-E2によって生成された抗体である。図に記載される、 β ウレアーゼに特異的な抗体 [HP8m/1H5-G2-B4] は、寄託ハイブリドーマHP8m/4H5-D4-C9の娘クローンによって産生される。親および娘クローンによって産生される抗体はどちらも、同一のDNA配列にコードされ、そして同一の特性を有する。

【0050】

本発明の方法の別の特に好ましい態様において、 β -ウレアーゼのエピトープに結合する抗体の重鎖は、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてさらにより好ましくは以下のCDRのすべて：

CDR1： GFTFSSHFMS

CDR2： SISSGGDSFYPSLKG

CDR3： DYSWYALDY

または：

CDR1： GYAFSTSWMN

CDR2： RIYPGDGDTNYNGKFKG

CDR3: EDAYYSNPYSLDY

を有する。

【0051】

別の特に好ましい態様において、 β -ウレアーゼのエピトープに結合する抗体の重鎖をコードするDNA配列は、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてさらにより好ましくは以下のCDRのすべて:

CDR1: GG CTACGCATTC AGTACCTCCT GGATG
AAC

CDR2: CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACTA
AC TACAATGGGA AGTTCAAGGG C

CDR3: GAG GATGCCTATT ATAGTAACCC CTAT
AGTTTG GACTAC

または:

CDR1: GG ATTCAC TTTC AGTAGCCATT TCATG
TCT

CDR2: TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCT
AT CCAGACAGTC TGAAGGGC

CDR3: GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA C
を有する。

【0052】

本発明の方法の別の特に好ましい態様において、 β -ウレアーゼのエピトープに結合する抗体の軽鎖は、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてさらにより好ましくは以下のCDRのすべて:

CDR1: RASQSIGTRIH

CDR2: YGSESI S

CDR3: QQSNTWPLT

または:

CDR1: HASQNINWLS

CDR2: KASNLHT

CDR3: QQGRSYPLT

を有する。

【0053】

さらに、前記抗体の軽鎖をコードするDNA配列は、好ましくは以下のCDR:

CDR1: A GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAGA
ATAC AC

CDR2: TAT GGTTCTGAGT CTATCTCT

CDR3: CAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC G

または:

CDR1: C ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTTGG
TTAA GC

CDR2: AAG GCTTCCAAC TGCACACA

CDR3: CAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC G

を有する。

【0054】

さらに、前記CDRを有する重鎖および軽鎖が、好ましくはH₂ピロリ由来の、カタラーゼまたはβ-ウレアーゼあるいはその断片に特異的に結合する、1つの抗体、その断片または誘導体と共に発生することが好ましい。さらに、本発明はまた、これらの重鎖または軽鎖が、他の軽鎖または重鎖と組み合わせられ、これらの結合特性が、本質的に維持されていてもまたは改善されていてもよい態様も含む。対応する方法は、先行技術に知られる。特に好ましい抗体は、軽鎖および重鎖の可変領域に、図1および2、3および4、5および6または7および8に示されるアミノ酸配列を有するか、または該領域は、そこに示されるDNA配列にコードされる。当該技術分野に知られる方法にしたがい、CDRを多様なFR（フレームワーク領域）に組み込んでもよい。

【0055】

好ましい態様において、抗体とのインキュベーション前に、便試料を用いて、以下の工程を行う: 便試料を1:3ないし1:25、好ましくは1:10、特に

好ましくは1：5の比で、再懸濁緩衝液に再懸濁し、ボルテックス混合器上で混合する。試料緩衝液の例は：150mM PBS、0.1% SDSである。好ましい態様において、再懸濁緩衝液は、150mM PBS、0.5% 動物血清および0.1% 界面活性剤からなる。動物血清は、ウシ、マウス、ラット又はブタから選択してよく、そして界面活性剤は、イオン性（好ましくはTween 20）および非イオン性界面活性剤（好ましくはSDS）又は両性イオン界面活性剤（特に好ましくはChaps）の群より選択してもよい。

【0056】

別の態様において、本発明にしたがった検出はまた、胃ガス、呼気濃縮物、唾液、歯垢、粘膜スメア、生検、全血または血清中のH. ピロリの検出のために用いてもよい。呼吸ガスは、患者に冷たいCO₂含有飲料を与え、「げっぷ」の形での胃ガスの放出を引き起こすことによって得てもよい。前記ガスは、適切な容器に収集してもよいし、または呼気濃縮物を、当業者に知られる方式で、例えばDE 19718925にしたがった装置またはDE 19505504にしたがった装置によって、回収してもよい。こうした方式で得られた濃縮物は、その後、ここに記載される試料を便試料の代わりに用いることを除き、先に記載されたような本発明の方法のすべての工程を用いて、本発明の試験に、液体型で導入してもよい。歯垢および粘膜スメアは、当該技術分野に知られる方法にしたがって得てもよく、そして唾液同様、全血および血清を、適切な濃度で、それと共に再懸濁緩衝液の修飾を伴い、本発明にしたがった検出に用いてもよい。

【0057】

別の好ましい態様において、工程（b）における、少なくとも1つの抗原－受容体複合体／抗原－受容体－受容体混合物複合体の形成は、免疫学的法によって検出される。

【0058】

別の好ましい態様において、工程（b）における、少なくとも1つの抗原－受容体複合体／抗原－受容体－受容体混合物複合体の形成は、ELISA、RIA、ウエスタンブロット又はイムノクロマトグラフィー法によって検出される。このような方法は、当該技術分野において基本的に公知である；cf. Harlo

w and Lane, loc. cit.

【0059】

本発明の方法の特に好ましい態様において、免疫学的方法、特にRIA又はELISAで、固相への結合およびエピトープの検出両方に、同一の受容体を用いる。捕捉因子受容体を、固相、例えばマイクロタイタープレートに非修飾型で結合させてもよい一方、検出に用いた受容体を、所望により標識してもよい。一方、前記受容体は、標識されていなくてもよく、そして微生物のエピトープ、好ましくは細菌エピトープは、第三の標識受容体を介して検出してもよく、この受容体は、好ましくは抗体、その断片もしくは誘導體、またはアプタマー、あるいは、種特異的またはIgクラス特異的抗体あるいは対応するアプタマーである。抗体の標識、例えば、放射活性マーカー又は蛍光マーカーによる標識は、当該技術分野に知られる；HarlowおよびLane、上記引用文中を参照されたい。同じことがアプタマー群にもあてはまる。先に記載される態様は、場合により腸通過後も四量体として存在する可能性があるカタラーゼの検出に特に好適である。この態様において、もちろん、抗体群、断片群、誘導體群およびアプタマー群の組み合わせ、例えば同一抗原の異なるエピトープに結合する抗体等の組み合わせも使用することが可能である。

【0060】

三工程ELISAは、ELISAプレートの捕捉抗体でのコーティング、試料及びコンジュゲート（例えば、標識された検出抗体群）の添加、そして間の洗浄工程、の工程を含む方法である。一工程ELISAは、一工程において、捕捉抗体で予めコートされているELISAプレート上に、試料及びコンジュゲートが添加され適用される点で、三工程ELISAと相違する。

【0061】

本発明の方法の別の好ましい態様において、モノクローナル抗体はネズミ抗体である。

さらに、別の好ましい態様において、受容体は、支持体に固定されている。日常的なチェックを行う場合、受容体、好ましくは抗体、その断片または誘導體あるいはアプタマーを支持体に固定することが特に好適である。さらに、抗体一支

持体／アダプター支持体の組み合わせは、ツールセットまたはキットの形でパッケージングしてもよい。

【0062】

別の特に好ましい態様において、支持体材料は、有孔支持材料である。別の特に好ましい態様において、支持体材料は、試験ストリップである。

さらに、好ましい態様において、支持体材料は、セルロースまたはセルロース誘導体からなる。

【0063】

便、胃ガス、呼気濃縮物を本発明の方法によって解析してもよい哺乳動物は、動物、例えば飼われている動物、例えばネコまたはイヌ、有用動物、例えばブタ、あるいは別の種類の動物、例えばマウス、トラ (tiger)、アレチネズミ (gerbil)、またはフェレット (ferret) であってもよい。

【0064】

別の好ましい態様において、哺乳動物はヒトである。

別の好ましい態様において、本発明の方法は自動化法である。自動化法は、例えば、ロボットによって行ってもよく、ロボットが方法のいくつかまたはすべての工程を行う。相当するロボットは、当該技術分野に知られる。

【0065】

さらに、本発明は、前述のCDRの組み合わせを有するV領域を有する、または前述のハイブリドーマの1つによって産生されるモノクローナル抗体、その断片または誘導体に関する。

【0066】

この場合、図1および2、3および4、5および6または7および8に示されるV領域の少なくとも1つを有する、モノクローナル抗体、その断片または誘導体が好ましい。好ましくは、この抗体は、図1および2、3および4、5および6または7および8に示されるV領域の2つを有する。さらに、これらのV領域が、図1および2、3および4、5および6または7および8に示されるDNA配列にコードされることが好ましい。

【0067】

本発明の特に好ましい態様において、モノクローナル抗体、その断片または誘導体は、ネズミ抗体またはその断片または誘導体、あるいはキメラ、好ましくはヒト化抗体またはその断片または誘導体である。誘導体はまた、融合タンパク質であってもよい。さらに、抗体は、例えばコロイドで、放射能、蛍光、燐光または化学発光標識で、標識されていることが好ましい。キメラヒト化およびヒト抗体の、並びに他の誘導体の産生は、当該技術分野に公知である（例えばV a u g h a nら、1998； O r l a n d iら、1989、H a r l o wおよびL a n e、loc. cit）。

【0068】

本発明はまた、モノクローナル抗体、その断片または誘導体と同一のエピトープに特異的に結合するアプタマーにも関する。こうしたアプタマーは、当該技術分野に知られる方法にしたがって、産生してもよい。

【0069】

さらに、本発明は、上述の抗体、その断片または誘導体、あるいはアプタマーの1つによって特異的に結合されるエピトープに関する。

さらに、本発明は、本発明のエピトープに特異的に結合する、さらなる抗体群、その誘導体群または断片群に関する。これらの抗体は、例えば、ハプテン／抗原の成分としてエピトープを用いる標準法にしたがって産生してもよい、モノクローナル抗体であってもよい。

【0070】

さらに、本発明は、所望により支持体材料に固定された、少なくとも1つの受容体、好ましくは、上に定義されるような、少なくとも1つのモノクローナル抗体、その断片または誘導体、あるいはアプタマーを含む、診断組成物に関する。

【0071】

さらに、本発明は、（a）支持体材料に固定された、上に定義されるような、少なくとも1つのモノクローナル抗体、その断片または誘導体、あるいはアプタマーであることが好ましい、少なくとも1つの受容体；（b）便試料を調整し、そして解析するための装置、および所望により上に定義されるような受容体の混合物を含む、少なくとも1つの上述のエピトープを検出するための試験装置に関

する。

【0072】

本発明のさらなる主題は、(a) 少なくとも1つの受容体、好ましくは、上に定義されるような、モノクローナル抗体、その断片または誘導体、あるいはアプタマーであって、サイズが典型的には5 nmないし100 nm、好ましくは40 nmないし60 nmの範囲である（金に関しては40 nmないし60 nmの粒子サイズ、そしてラテックスに関しては200 nmないし500 nmが特に好ましい）、コロイド状金、ラテックス粒子または他の有色粒子とコンジュゲート化されている、前記受容体；(b) 便試料を調製し、そして解析するための装置；および所望により(c) 上に定義されるような受容体の混合物を含む試験装置である。

【0073】

さらに、本発明は、(a) 好ましくは、上に定義され、そして所望により支持体材料に固定されているような、少なくとも1つのモノクローナル抗体、その断片または誘導体、あるいはアプタマーであり、そして支持体材料に固定されている、少なくとも1つの受容体；所望によりまた、(b) 便試料を調製し、そして解析するための装置；および所望により(c) 上に定義されるような受容体の混合物を含むキットに関する。

【0074】

便試料を調製し分析するための装置の代わりに、組成物及び試験装置及びキットは、胃ガス、呼気濃縮物、唾液等を調製し（必要であれば）分析するための装置を有していてもよい。

【0075】

本発明はまた、上述した受容体の少なくとも一つを、所望により医薬的に受容可能な支持体及び／又は希釈剤と組み合わせて含む組成物に関する。組成物は、医薬用の調製物であることが好ましい。

【0076】

当業者は、適当な医薬的に受容可能な支持体の例を知っている。これは、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、油／水エマルジョン等のエマルジョン、種々の界面

活性剤、無菌溶液などを含む。このような支持体を含む医薬調製物は、既知の慣用された手段によって処方することが可能である。これらの医薬調製物は、適当な服用量範囲、例えば、1日患者一人当たり1 μ gないし100mgにおいて、個体に投与することが可能である。いろいろな型の投与方法、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所又は皮内がある。担当の医師は、臨床因子に応じて用量を選択するであろう。当業者は、用量は、患者のサイズ、体表面、年齢、性別又は一般的状態等の種々の因子に依存するが、しかしながら、投与された特定の医薬調製物、適用の継続期間及び種類、並びにおそらく同時に投与される他の医薬調製物にも依存する、ことを知っている。

【0077】

最後に、本発明は、本発明の診断用組成物、本発明の試験装置又は本発明のキットを含むパッケージに関する。本発明の診断用組成物の成分、本発明の試験装置、及び／又は本発明のキットは、バイアル又は細管等の容器に、所望により緩衝液及び／又は溶液中に、パッケージングされうる。あるいは、一つまたはそれより多くの成分を一つの容器にパッケージングしてもよい。

【0078】

実施例は本発明を例示する。

【0079】

【実施例】

実施例1：H. ピロリ抗原の単離

H. ピロリの培養

H. ピロリ（株NCTC 11637）は、ペトリ皿中、10% ウマ血液およびアンホテリシンB、バンコマイシンおよびセフソルジン（Cefsulodin）（Sigma Chemicals）を添加したWilkins Chalkers寒天上にプレーティングし、そして微好気性大気中で（Anaerocult GasPak、Merck）、37℃で3または4日間インキュベーションした。2つのペトリ皿の内容物を、11ビン（Schott）中の、上述のように抗生物質を添加した350 mlのBHIB培地に懸濁し、培地を10% CO₂、5% O₂、85% N₂のガス混合物で、10分間、燻蒸し、そし

てビンを密封した。培養を、回転震盪装置上で、37℃で2日間、震盪した。その後、ビンの内容物を、無菌的に10 lビンに入れ、そして4.7 lのBHIB培地で満たした。これを回転震盪装置上で、37℃でさらに2日間、インキュベーションした。続いて、全体積を、5,000 gで15分間、遠心分離し、上清をデカントし、そして細菌ペレットの重量を測定した。ペレットを保存するため、2:1 (w/v) の比で15%グリセリンを添加した生理食塩水に再懸濁し、そして-80℃で凍結した。培養した細菌の同一性をチェックするため、細菌の顕微鏡検査と共に、ウレアーゼ、酸化酵素およびカタラーゼに関する試験を行った。

【0080】

実施例2：H. ピロリ抗原の調製

H. ピロリ溶解物の調製

PBS、pH 7.5を1:10の比でH. ピロリ細菌ペレット（実施例1）に添加し、そして氷上で再懸濁した。細菌細胞を、氷上で、各60秒の中断をはさみ、25-30%の強度で、10x60秒、小さい超音波検出装置（Sonifer、Branson）を用いて、超音波処理した。破壊された細菌細胞を、4℃で2x20分間、そして10,000 rpm（Sorvall、SS34）で遠心分離した。上清を、ポリクローナル抗血清の産生のための抗原調製として用いた。

【0081】

H. ピロリ・カタラーゼの調製

破壊緩衝液（20mM Tris HCl、pH 7.0、1mM EDTA、1mM フェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）、0.05% アジ化ナトリウムおよび10% (v/v) イソブタノール）を、1:2 (w/v) の比で凍結細菌ペレットに添加し、そして完全に融解するまで、室温（RT）で、オーバーヘッド震盪装置中で震盪し、そしてさらにおよそ15分間、続いて震盪した。20,000 rpm（Sorvall、SS-34）、4℃で20分間の遠心分離後、上清をデカントし、そして0.45 μmフィルターを通じてろ過した。

【0082】

清澄な上清を、1：3の比で、緩衝液A（20 mM Tris HCl、pH 7.0、1 mM EDTA、1 mM PMSF、0.05% アジ化ナトリウム）で希釈し、そして緩衝液Aで平衡化したSourceQカラム（16／10）（Pharmacia）上に移した。SourceQカラムを通じる流れは、酵素カタラーゼを含み、そしてウレアーゼ、Hsp60およびアルキルヒドロペルオキシドレダクターゼなどのH. ピロリ主要抗原を含まなかった。

【0083】

カタラーゼを単離するため、SourceQカラムを通じる流れを、分子ふるいクロマトグラフィー（Superdex 200）（16／60）に供した。カタラーゼは、およそ150 kDaの大きさの別のタンパク質（好中球活性化タンパク質、NAP）と共に、ほぼ同程度の割で、単離された。

【0084】

より高い純度のカタラーゼは、SourceQカラムを通じる流れを、40 mM 酢酸ナトリウム上の2 M 酢酸ナトリウム溶液、pH 4.9に入れ、そしてSourceSカラム（8／28）に移した際に得られた。緩衝液Aで洗浄し、結合していないタンパク質を除いた後、直線NaCl勾配（緩衝液Aに加えた0%から100%の緩衝液B）を用い、緩衝液B（40 mM 酢酸ナトリウム、1 M NaCl、pH 4.9）でカタラーゼを溶出した。カタラーゼは、およそ370 mM NaClで溶出する。

【0085】

実施例3：カタラーゼの性質決定

SDS PAGE中の還元条件下では、精製タンパク質は、およそ58 kDaの分子量および90%以上の純度を有した。

【0086】

単離タンパク質を同定するため、微量配列決定を行った。タンパク質を、SDS PAGEゲル中で、LysCプロテアーゼで切断した。抽出タンパク質混合物は、RP-HPLCを介して分離した。LysCペプチドの配列解析は、以下のアミノ酸配列を生じた：

ERLHDTIGESLAHVTHK

この配列は、H. ピロリ・カタラーゼ由来の対応するLysCペプチド (Manos J. ら (1998) *Helicobacter* 3 (1), 28-38; Genbank 寄託番号 AAC16068. 1) に同一である。

【0087】

実施例4：ポリクローナルおよびモノクローナル抗体 (pab;mab) の産生

ポリクローナル抗血清の産生

H. ピロリ溶解物、ウレアーゼ、Hsp60およびアルキルヒドロペルオキシドレダクターゼなどの主要抗原が枯渇したH. ピロリ溶解物 (実施例2：単離および精製を参照されたい)、富化されたカタラーゼを含むH. ピロリ溶解物 (例えば溶解物にカタラーゼを添加することによるもの) に対するポリクローナル抗血清と共に、精製カタラーゼに対するポリクローナル抗血清は、選択された哺乳動物 (例えばマウス、ウサギ、ヤギなど) を、カタラーゼ・エピトープを含む、対応する免疫原性調製で免疫感作することによって、得ることが可能である。

【0088】

抗体は、血清のプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製してもよく、そして患者の便における抗原検出にモノクローナル抗体が適しているかどうか評価するため、サンドイッチELISA (実施例9を参照されたい) における捕捉抗体として用いてもよい。

【0089】

ポリクローナルウサギ抗血清は、H. ピロリ溶解物からのpab産生 (Herbertshausen) によって精製した。プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって、これらの抗血清から、ポリクローナル抗体を精製し、そして患者の便における抗原検出にモノクローナル抗体が適しているかどうか評価するため、サンドイッチELISA (実施例9を参照されたい) における捕捉抗体として用いた。

【0090】

モノクローナル抗体の産生

モノクローナル抗体は、当業者に知られる方法にしたがい (Harlow & Lane、1989; Peters & Baumgarten、1990)、生成した。

【0091】

免疫感作

H. ピロリ溶解物から産生された抗原調製 (実施例2を参照されたい) を、ネズミ (BALB/c x C57/Black、F1世代、8-12週齢) を免疫感作するのに用いた。基本的免疫感作では、50 μ gの抗原を、フロイントの完全アジュバント (Difco) で1:1の割合で乳化し、そして腹腔内注射した (200 μ l/マウス)。4ヶ月ごとの追加免疫注射では、マウスに、フロイント不完全アジュバントと共に、各々25 μ gの抗原を投与した。ELISA (例えば融合スクリーニング) の陽性対照としての抗血清は、マウス後眼窩から採取した血液から得た。

【0092】

融合

最後の免疫感作の2日後、マウス脾臓を除去し、そしてポリエチレングリコール4000を用いて、5:1の比で、脾臓細胞を骨髓腫細胞P3x63Ag8.653 (ATCC CRL-1580; Kearneyら、1979) と融合させた。融合細胞を、HAT培地 (ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン補足剤 (100 $\times$ 濃縮物; Sigma) を含むクローニング培地 (=RPMI 1640培地、20% FCS、200 U/ml rhIL-6)) に懸濁し、そして2-6 $\times 10^4$ 細胞/ウェルの細胞密度で、96ウェルマイクロタイタープレートに蒔いた。ハイブリドーマは、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂および95%相対湿度で培養した。

【0093】

直接ELISAによる融合スクリーニング

コロニー化プレート (融合およそ10日後) 由来の抗体含有培養上清のスクリーニングは、96ウェルマイクロタイタープレート (MaxiSorb、Nunc) 上の直接ELISAで行った。

【0094】

E L I S A プレート を炭酸緩衝液、pH 9.6 中の $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の免疫感作抗原で被覆した ($100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 、一晚、 5°C)。被覆溶液を吸い取り、そしてなお未結合である結合部位を、PBS 中の 2% (w/v) 脱脂粉乳でブロッキングした ($200\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 、1 時間、室温)。プレートを、0.025%

Tween 20 (v/v) を含む PBS、pH 7.3 で 2 回洗浄した後、一次クローンの培養上清を、プレート中で希釈せずにピペティングし ($100\mu\text{l}/\text{ウェル}$)、そしてプレートを室温で 1-2 時間インキュベーションした。抗血清を陽性対照として用い、培地を陰性対照として用いた。再び洗浄した後、結合抗体の検出は、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて行った (0.1% ウシ血清アルブミンを含む PBS 中のウサギ抗マウス Ig-POD (DAKO)、20 分間、室温)。ペルオキシダーゼは、無色基質テトラメチルベンジジン (TMB、Sigma) を、有色複合体に変える。プレートを 4 回洗浄し、そしてたたいた後、基質溶液 (TMB + H_2O_2 を含む K-Blue、Neogen またはクエン酸緩衝液、pH 4.5) を添加した。10 分後、1N 硫酸を添加することによって、反応を停止した。抗原特異的抗体を産生するクローンの培養上清は、無色陰性培養上清に比較して、かなり色がついていた。

【0095】

ハイブリドーマの樹立および培養

陽性クローンは、モノクローンを得るため、限界希釈解析の原理にしたがい、2 回再クローニングした (Coller & Coller, 1983)。第一の再クローニングは、ヒポキサンチン・チミジン補足剤 ($100\times$ 濃縮物; Sigma) を含むクローニング培地中で行い、第二の再クローニングは、クローニング培地中で行った。再クローンは、直接 E L I S A によって、抗原特異性に関して調べた。最終的に、最終クローンを、平底ビン中の産生培地 (5% IgG 減少 FCS を含む RPMI 1640 培地) に適応させた。該細胞を凍結保存し、そして抗体精製のため、培養上清を産生した。

【0096】

実施例 5：培養上清由来の抗体の性質決定

10のクローンを、サンドイッチELISAにおける、H.ピロリに感染した患者の便試料の優れた反応性によって、30の特異的（免疫感作抗原に対する抗体を産生する）クローンのレパートリーから選択した。

【0097】

アイソタイプ決定

培養上清において、モノクローナル抗体のアイソタイプ決定は、アイソタイプ決定キットIsoStrip (Roche Diagnostics) を用いて、樹立クローンで行った。結果は：8種類のIgG1クローンおよび1種類のIgG2aクローンであった（表2を参照されたい）。

【0098】

ウェスタンブロット

ウェスタンブロットにおいて、免疫感作抗原を特異的に認識する能力に関して、培養上清を調べた。ゲル当たり15 μ gの精製抗原を、還元試料緩衝液 (Laemmli, 1970) 中で煮沸し、そして12% SDSポリアクリルアミドミニゲル (8.6 cm x 7.7 cm x 0.1 cm, Biometra) に適用した。25-30 mAでの電気泳動分離後、タンパク質（抗原）を、半乾燥ブロット技術によって、ニトロセルロース上に固定した。

【0099】

膜を、PBS中の2%脱脂粉乳でブロッキングし（30分間、室温）、そしてTBS/Tween 20（0.2%）で5分間、3回洗浄した。以下のインキュベーション工程では、34のクロスチャンネルを備えたグリッドプレートを用いて、膜をAccutranクロスブロットスクリーニングユニット (Schleicher and Schull) 内にクランプで締めた。形成されるトレース各々において、250 μ lのTBS/Tween 20および試験しようとする250 μ lのハイブリドーマ培養上清を添加する。震盪しながら、室温で2時間、インキュベーションを行った。

【0100】

TBS/Tween 20で3回洗浄した後、POD-コンジュゲート化二次抗体（ウサギー抗マウスIg-POD、DAKO）で、膜を1時間インキュベ-

ジョンした。膜を3回洗浄し、そして3, 3-ジアミノベンジジン基質溶液(DAB、Sigma)を添加することによって、免疫複合体を視覚化した。続いて、不溶性ペルオキシダーゼ基質によって、抗体に結合しているタンパク質バンドを視覚化した。

【0101】

6つのハイブリドーマ培養上清が、カタラーゼに対応するバンド(58 kDa)を示し、3つがウェスタンブロットで陰性であったが、ELISAにおいて、天然抗原と陽性反応を示した。これらは、コンホメーション・エピトープを認識する可能性がある。表2は、結果の要約を示す。

【0102】

実施例6：ハイブリドーマ培養上清からのモノクローナル抗体の精製

血清不含ハイブリドーマ培養上清からのmabの精製は、修飾プロテインGアフィニティークロマトグラフィーによって行った(Pharmacia Biotech、1994)。

【0103】

ろ過した(0.45 µm)培養上清を、プロテインGマトリックス上に直接導いた。フロースルー中または溶出物中のタンパク質の検出は、280 nmの光学密度を測定することを介して行った。150 mM PBS、pH 7.2で洗浄した後、検出装置のバックグラウンド値になるまで、0.1 M グリシン/HCl、pH 3.3で溶出を行った。タンパク質マトリックスは、0.1 M グリシン/HCl、pH 2.7で再生した。

【0104】

実施例7：コンジュゲートの産生

ELISAでの使用のためのmabのペルオキシダーゼ(POD)への連結(coupling)

mabを(POD)に外部から連結した。Poly-PODコンジュゲートはMicroCoat(ベルンリード、ドイツ)から入手し、HPR(西洋ワサビペルオキシダーゼ)-デキストランコンジュゲートは、DAKO(コペンハーゲン、デンマーク)より入手した

ELISAでの使用のためのmabのビオチンへの連結

精製後、モノクローナル抗体をビオチニル化して、ELISAでの抗体の検出に使用できるようにする。モノクローナル抗体のビオチン及びPODへの連結は、公知の方法に従って行った(Harlow&Lane、1988)。

【0105】

モノクローナル抗体は、約1-2mg/mlの濃度で結合させた。連結の前に、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液、pH8.3及び0.1M炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH8.3中での透析によって、抗体を再緩衝した。抗体の各1mgに、50µgのN-ヒドロキシスクシンイミドビオチン(NHS-d-ビオチン; シグマ)をピペットしDMSO中で混合した。混合物を室温中で1時間インキュベートした。次いで、0.15M PBS、0.05% NaN₃、pH7.5に対する大量の透析によって、ビオチン化抗体を非連結NHS-d-ビオチンから遊離した。

【0106】

免疫学的迅速試験での使用のためのmabのコロイド状金への連結

免疫学的迅速実験に使用するために、モノクローナル抗体(mab)をコロイド状金にコンジュゲートした。これは、標準的な方法(Frens, 1973; Geoghegan and Ackerman, 1977; Slot et al., 1985)に従って行う。コロイド状金の産生のために、200mlの0.01%金亜塩素酸- (HAuCl₄)-溶液を沸騰するまで熱し、そして、さらに沸騰を行っている間に、2mlの1%クエン酸ナトリウムを加えることによって還元した。

【0107】

mabのコロイド状金への連結のために、安定化に必要な量のIgGを金溶液と混合し、そして、室温で15分間インキュベートする。連結のために最適なIgG濃度及び適当なpH値は各mabに個別に決定した。金IgGコンジュゲートを安定化させるために、ポリマー又はタンパク質、例えばウシ血清アルブミン(BSA)を1%の濃度で連結調製物に加えた。次いで、IgGに連結しなかった金コロイド及び遊離のIgGを、遠心によって、連結調製物から、金IgGコ

ンジュゲートから除去した。好ましくは4℃における保存のために、0.05%のNaN₃を、金IgGコンジュゲートの溶液緩衝液に加えた。

【0108】

実施例8：精製モノクローナル抗体の性質決定

表面プラズモン共鳴分光（SPR分光）による、抗体－抗原相互作用の性質決定

SPR分光によって、モノクローナル抗体の親和性定数を決定することが可能である。したがって、ELISAおよび迅速試験の発展に適した抗体を見出すことが可能である。

【0109】

Pharmacia BIAcoreでの表面プラズモン共鳴分光の伝導

すべての工程は、製造者の指示（BIAcore Methods Manual）にしたがい、Pharmacia Biacore Processing Unit CA 186で行った。

【0110】

カタラーゼは、BIAcore CM5センサーチップのデキストランマトリックス上へのアミンカップリングを通じて固定した。デキストランマトリックスの活性化のため、0.05 M N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）および0.2 M 1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）溶液の1：1混合物45 µlを、流速5 µl／分で、センサーチップ上に導いた。その後、カタラーゼ（35 µl； 10 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0中の50 µg／ml）を、デキストランマトリックスに結合させた。残ったNHSエステルを、1 M エタノールアミン（35 µl）で不活性化した。デキストランマトリックスに共有結合していないカタラーゼは、HCl（10mM； 15 µl）でセンサーチップを再生することによって、除去した。

【0111】

カタラーゼ特異的モノクローナル抗体を添加することによって、これらを固定化カタラーゼと反応させ、そして検出因子への質量付着を測定した。20ないし

670 nMの範囲の異なる濃度の抗体溶液を用いた。これらは、各々、流速25 μ l/分で、センサーチップ上に固定されたカタラーゼを介して注入された。

【0112】

結果

抗体の吸着 (K_{on}) および脱離 (K_{off}) の速度定数値は、共鳴シグナルの時間経過の手段によって、を計算することが可能であった (BIAevaluationソフトウェア3.0)。カタラーゼに対する6つのモノクローナル抗体をその親和性について試験した。

【0113】

【表1】

表 1: カタラーゼmabの親和性決定の結果

mab	k_{on} [$M^{-1} s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]	K_D [M]
HP25.2m/2H10	1.44E+05	3.90E-05	2.71E-10
HP25.6m/1G4	1.41E+05	2.52E-05	1.79E-10
HP25.6m/1B5	5.67E+04	3.86E-05	6.81E-10
HP25.6m/4E3	4.92E+04	5.96E-05	1.21E-09
HP25.6m/1A5	3.91E+04	4.77E-05	1.22E-09
HP25.6m/1H4	7.12E+04	4.12E-05	5.79E-10

$$K_D = k_{off} : k_{on}$$

【0114】

ヒト便のELISAにおいて使用するための抗体対の選択

培養上清を測定した場合に、最も低い検出限界を示す抗体群を、表面プラズマ共鳴エピトープ重複の手段によって決定し、そして、親和訂正を測定した。有望と思われる組合せ (エピトープ重複なし、吸着の高い速度定数、脱離の低い速度定数) を、サンドイッチ便ELISAにおけるその抗原検出限界について試験した。

【0115】

実施例9：患者試料中のmab培養上清のスクリーニング (混合ポリクローナ

ル／モノクローナル系)

直接ELISA（実施例4）の手段により特異的な抗原認識を示すモノクローナル抗体を、患者認識および抗原検出限界に関して、サンドイッチELISAで培養上清として解析した。

【0116】

内部発生試料として、組織学的解析および／または¹³C－尿素呼吸試験によって感染状態が決定されている（群0および4）便試料を用いた。群0の患者では、H. ピロリ陰性結果を示し、対照試験では、群4の患者はH. ピロリ陽性結果を示した。

【0117】

ELISAプレート（マイクロタイタープレート MaxiSorb；Nunc）の被覆は、100 μ l のポリクローナルウサギ抗カタラーゼ抗体またはポリクローナルウサギ抗H. ピロリ抗体溶液（pab；およそ20 μ g IgG／ml 0.1M 炭酸緩衝液、pH 9.5）を用いて、5℃で一晩、行った。なお未結合である結合部位のブロックのため、ウェル当たり、0.2%の魚ゼラチン（w／v）を含む200 μ l の150 mM PBS、pH 7.2を添加し、そして室温で30分間インキュベーションした。その後、0.025% Tween-20を添加した250 μ l PBS（洗浄緩衝液1）でELISAプレートを2回洗浄した。ヒト便は、2%脱脂粉乳および1 mM EDTAを添加しながら、150 mM PBSで、1：10（w／v）の比に懸濁した。

【0118】

抗原検出限界の決定のため、50 ng／ml のカタラーゼ（実施例3を参照されたい）を、H. ピロリ陰性便懸濁物に添加し、そしてH. ピロリ陰性便懸濁物で、1：2段階で希釈した。プレート当たり各々100 μ l の便懸濁物を、1時間インキュベーションした（患者試料で二重測定）。ELISAプレートをノックアウトし、洗浄緩衝液2（0.2% Tween-20を含むPBS）でリンスし、そして、洗浄緩衝液2で4回洗浄した。その後、ハイブリドーマ由来の100 μ l 培養上清（PBS中1：5希釈）を添加し、そして室温で60分間インキュベーションした。結合抗体の検出は、ペルオキシダーゼーコンジュゲート化

二次抗体（ウサギ抗マウスIgG-POD、DAKO）を添加することによって、行った。次の工程では、ペルオキシダーゼは、加えられた無色POD基質テトラメチルベンジジン（TMB、Sigma）を青い産物に変える。5ないし10分後、好ましくは10分後、1N 硫酸の添加（100 μ l／ウェル）によって、反応を停止した。発色反応の強度は、ELISA読取装置（MWG Spectral）で測定した。測定は、参照波長620nm、好ましくは630nmに対して450nmで行った。検出抗体または基質溶液を添加する前に、ELISAプレートは、洗浄緩衝液1で、3－4回洗浄した。

【0119】

ゼロ値（抗原を添加しない、H.ピロリ陰性便試料）がまだ検出されうる2倍より大きいかまたはそれに等しい、消光値を検出限界とするために決定した。

H. pylori溶解物に対して作成されたポリクローナル捕捉抗体を用いて、サンドイッチELISAにおいて、モノクローナル抗体HP25.2m／2H10は、68%の感度（25のうち17の陽性試料が正しく認識された）および82%の特異性（17HP陰性試料のうち、3が擬陽性となった）を示した。さらなるモノクローナル抗体群（培養上清）の患者認識は、表3からみることができる。

【0120】

【表2】

表2: HP25.2m/2H10: サンドイッチELISAにおける感度と特異性
(H. pyloriに対する捕捉抗体 pab)

便試料	患者の感染 状態	捕捉抗体: HP検出abに対するpa b: HP25.2m/2H10 (培養上清) OD ₄₅₀₋₆₃₀	評価: カットオフ: 0.1: OD ₄₅₀₋₆₃₀ = 0.1
CX0010	陽性	0.25	陽性
CX1014	陽性	0.75	陽性
CX1029	陽性	0.18	陽性
CX1038	陽性	0.09	陰性
CX1052	陽性	0.11	陽性
CX2008	陽性	0.63	陽性
CX2009	陽性	0.32	陽性
CX2016	陽性	0.07	陰性
CX2019	陽性	0.59	陽性
CX2029	陽性	0.52	陽性
CX0213	陽性	0.04	陰性
CX294-1	陽性	0.14	陽性
CX3098	陽性	0.13	陽性
CX3146	陽性	0.05	陰性
CX3148	陽性	0.08	陰性
CX3234	陽性	0.18	陽性
CX4003	陽性	0.17	陽性
CX4006	陽性	0.25	陽性
CXT001	陽性	0.23	陽性
CXT002	陽性	0.53	陽性
CXT003	陽性	0.12	陽性
CXT004	陽性	0.03	陰性

【0121】

CXT005	陽性	0.03	陰性
CXT006	陽性	0.31	陽性
CXT007	陽性	0.08	陰性
CX1008	陰性	0.29	陽性
CX1031	陰性	0.08	陰性
CX1049	陰性	0.7	陽性
CX1051	陰性	0.09	陰性
CX0142	陰性	0.03	陰性
CX0185	陰性	0.03	陰性
CX0189	陰性	0.08	陰性
CX0193	陰性	0.03	陰性
CX2010	陰性	0.08	陰性
CX2018	陰性	0.09	陰性
CX0220	陰性	0.03	陰性
CX0231	陰性	0.03	陰性
CX0258	陰性	0.02	陰性
CX3008	陰性	0.09	陽性
CX3011	陰性	0.08	陰性
CX3033	陰性	0.07	陰性
CX3035	陰性	0.09	陰性

略語: pab:ポリクローナル抗体: HP:H. pylori

【0122】

【表3】

表3: カタラーゼに対するモノクローナル抗体の特性化

融合ノクローン	イソタイプ	WB (ag)	NWG (ng/ml)	正しく検出された便試料	
				陽性試料	陰性試料
HP25.2m/2H10	IgG2a, κ	+	1.5	17 out of 25	14 out of 17
HP25.6m/1G4	IgG1, κ	+	1.5	4 out of 5	2 out of 2
HP25.6m/1B5	IgG1, κ	+	3-6	3 out of 5	2 out of 2
HP25.6m/1H4	IgG1, κ	+	3-6	2 out of 5	2 out of 2
HP25.6m/4E3	IgG1, κ	+	6	2 out of 5	2 out of 2
HP25.6m/1A5	IgG1, κ	+	6	2 out of 5	2 out of 2
HP25.6m/5E4	IgG1, κ	-	1.5	1 out of 5	2 out of 2
HP25.6m/4A12	IgG1, κ	-	1.5	1 out of 5	2 out of 2
HP25.6m/5F4	IgG1, κ	-	1.5	1 out of 5	2 out of 2

略語: ag:抗体; WB:ウエスタンブロット;

NWG: 検出限界

【0123】

結果

表3は、アイソタイプ決定、ウェスタンブロット解析、検出限界の決定および患者におけるカタラーゼに対するモノクローナル抗体 (m a b) 認識を要約する。データは、m a bによる天然カタラーゼの良好な検出は、患者における良好な検出とは関連しないことを示す。

【0124】

混合ポリクローナルモノクローナルサンドイッチELISA系において、m a b HP25.2m/2H10は、68%の感度および82%の特異性を示した。感度および特異性は、純粋なモノクローナルELISA系において、(培養上清の代わりに) 精製m a bを用いることによって改善されると期待される。この場合において、同一のエピトープに対して向けられるモノクローナル抗体 (実施例10を参照されたい) または同一抗原の異なるエピトープに対して向けられる2つの異なるモノクローナル抗体 (実施例12を参照されたい) を、捕捉および検出抗体として用いてもよい。

【0125】

実施例10：ELISA（純粋なモノクローナル系）の手段によるヒト便中の
H. pyloriの検出

試験のために、10の異なる病院または胃腸手術室の患者由来の便試料が自由に使用可能であった。H. pyloriの状態は、 ^{13}C -尿素呼吸試験および／または胃生検の組織学的解析によって決定した。試験しようとする便試料は、実験室スタッフが感染状態に関して知ることがないように、分類した。

【0126】

H. pylori便サンドイッチELISA（三工程ELISA）

ELISAプレート（MaxiSorb；Nunc）の被覆は、 $100\mu\text{l}$ のmab溶液（ $2.0\mu\text{g}$ HP25.2m/2H10/ml、 0.1M 炭酸緩衝液、 $\text{pH } 9.5$ ）で、 37°C で1時間行った。なお未結合である結合部位のブロッキングのため、プレート当たり $200\mu\text{l}$ の、 0.2% 魚ゼラチン（w/v）を伴う 150mM PBS、ピペティングし、そして室温で30分間インキュベーションした。続いて、 $250\mu\text{l}$ の洗浄緩衝液1（ 0.025%

Tweenを含むPBS）で2回洗浄した。ヒト便は、 2% 脱脂粉乳および 1mM EDTAを添加した 150mM PBSに $1:10$ （w/v）の比で懸濁した。抗原検出限界の決定のため、精製H. ピロリ・カタラーゼを、既知の濃度で、H. ピロリ陰性患者の便懸濁物に添加した。便試料懸濁物を 7000g で5分間遠心分離した。ウェル当たり $100\mu\text{l}$ の上清を、1時間インキュベーションした。プレートをノックし、洗浄緩衝液2（ 0.2% Tweenを添加した $250\mu\text{l}$ PBS）で、リンスし、そして4回洗浄した。次いで、 $100\mu\text{l}$ のビオチン連結mabの溶液（PBS； 0.1% BSA中の $1\mu\text{g}/\text{ml}$ HP25.2m/2H10-Bio）を添加し、そして室温で60分間インキュベーションした。結合抗体の検出は、POD（Dianova）とストレプトアビジンのコンジュゲートを添加することによって、行った。続く工程で、PODは、無色基質TMB（Sigma）を青い産物に変える。5ないし10分後、好ましくは10分後、 1N 硫酸（ $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ ）を添加することによって、反応を停止した。発色反応の強度は、ELISA読取装置（MWG Spek

t r a l) で測定した。測定は、620 nm又は630 nmの参照波長に対して、455 nmで行った。

【0127】

【表4】

表4: モノクローナル抗体 HP25.2m/2H10 を捕捉用及び検出用の抗体として用いたELISA手段による便中のH. pyloriカタラーゼの検出

患者	臨床状態	HP 便 ELISA OD(455-630)
1001	陰性	0.069
1002	陰性	0.104
1007	陰性	0.053
1008	陰性	0.042
1010	陰性	0.043
1012	陰性	0.055
1017	陰性	0.052
1021	陰性	0.045
1022	陰性	0.068
1024	陰性	0.036
1025	陰性	0.046
1027	陰性	0.057
1030	陰性	0.061
1031	陰性	0.037
1032	陰性	0.056
1034	陰性	0.048
1035	陰性	0.033
1040	陰性	0.037
1046	陰性	0.046
2002	陰性	0.056
2006	陰性	0.032
2007	陰性	0.027
2010	陰性	0.039
2012	陰性	0.041
2013	陰性	0.049
2014	陰性	0.046
2015	陰性	0.048
2017	陰性	0.050
2018	陰性	0.061
2023	陰性	0.056
2024	陰性	0.051
2028	陰性	0.102
2033	陰性	0.050
2034	陰性	0.077
2043	陰性	0.045
3123	陰性	0.055

3213	陰性	0.119
3214	陰性	0.062
3224	陰性	0.048
3225	陰性	0.065
3236	陰性	0.043
4004	陰性	0.089
5004	陰性	0.079
5007	陰性	0.055
5008	陰性	0.156
5009	陰性	0.076
5010	陰性	0.073
5012	陰性	0.051
5013	陰性	0.057
5017	陰性	0.064
5018	陰性	0.033
5019	陰性	0.017
5020	陰性	0.017
5021	陰性	0.019
5022	陰性	0.020
5024	陰性	0.015
5025	陰性	0.017
5027	陰性	0.022
5028	陰性	0.021
5030	陰性	0.019
5031	陰性	0.014
5033	陰性	0.018
5034	陰性	0.013
5035	陰性	0.018
5036	陰性	0.031
5040	陰性	0.024
5042	陰性	0.026
5046	陰性	0.021
5052	陰性	0.020
5056	陰性	0.523
5057	陰性	0.023
5060	陰性	0.055
5063	陰性	0.022
5064	陰性	0.017
5065	陰性	0.035

5066	陰性	0.024
5067	陰性	0.088
5068	陰性	0.021
6002	陰性	0.078
6005	陰性	0.019
6008	陰性	0.013
6019	陰性	0.034
7005	陰性	0.025
7006	陰性	4.556
7009	陰性	0.030
7013	陰性	0.024
8004	陰性	0.023
8047	陰性	0.021
213	陽性	0.879
294	陽性	4.097
444-1	陽性	0.201
1003	陽性	0.475
1013	陽性	4.087
1014	陽性	0.105
1015	陽性	2.469
1028	陽性	0.096
1029	陽性	4.466
1037	陽性	2.485
2001	陽性	0.083
2003	陽性	0.817
2005	陽性	1.508
2008	陽性	4.247
2009	陽性	1.597
2016	陽性	2.651
2022	陽性	0.135
2029	陽性	3.953
2032	陽性	3.400
2035	陽性	3.384
2039	陽性	0.053
2040	陽性	4.602
2041	陽性	0.200
2042	陽性	4.592
3146	陽性	1.742
6014	陽性	2.572
3149	陽性	0.989
3153	陽性	4.590
3570	陽性	4.567
3577	陽性	4.566

3215	陽性	4.540
3219	陽性	4.486
3220	陽性	4.518
3231	陽性	4.706
3234	陽性	4.567
3235	陽性	4.616
3241	陽性	3.671
3243	陽性	4.582
4003	陽性	4.700
4005	陽性	0.401
4006	陽性	4.694
4018	陽性	4.142
4019	陽性	2.366
4020	陽性	1.468
5001	陽性	4.490
5002	陽性	3.917
5003	陽性	4.321
5006	陽性	4.826
77	陽性	0.067
5011	陽性	0.071
53	陽性	4.773
70	陽性	1.084
5016	陽性	0.101
68	陽性	4.611
5069	陽性	1.079
CXT 5	陽性	0.602
5072	陽性	4.151
5075	陽性	4.307
5076	陽性	4.516
CXT 4	陽性	0.268
5078	陽性	1.022
6001	陽性	4.441
6004	陽性	4.296
CXT 3	陽性	2.126
6018	陽性	4.656
6020	陽性	0.427
7001	陽性	2.717
CXT 2	陽性	4.479
7002	陽性	4.143
7003	陽性	0.149
7004	陽性	4.543
CXT 1	陽性	0.953
8026	陽性	0.025

8033	陽性	0.784
67	陽性	0.589
5029	陽性	0.675
64	陽性	1.785
58	陽性	0.304
5039	陽性	3.391
CXT 13	陽性	3.785
6013	陽性	1.972
CXT 12	陽性	0.157
5048	陽性	1.695
5050	陽性	0.490
CXT 10	陽性	0.247
5053	陽性	4.232
5055	陽性	4.364
CXT 9	陽性	2.455
5058	陽性	3.886
5059	陽性	4.450
CXT 8	陽性	4.374
5061	陽性	4.032
CXT 7	陽性	0.647
CXT 6	陽性	4.592

H. pylori ELISA (n = 1821)

		H. pylori 感染状態	
		陽性	陰性
H. pylori 便サンドイッチ ELISA	陽性	89	6
cut off OD ₄₅₀₋₆₂₀ : 0.09	陰性	5	82

感度: 94.7%

特異性: 93.2%

【0130】

表4は、H. pylori 陰性及びH. pylori 陽性便試料の、便サンドイッチELISAの手段による結果を示す。ここにおいて、便試料からのH. pylori 抗原カタラーゼの検出のために、モノクローナル抗体、好ましくはHP25.2m/2H10は捕捉用抗体及び検出用抗体（POD-標識された）の双方として使用される。カタラーゼは、消化管をほとんど変化さずに通過する非常に安定な抗原であり、よって、便試料において検出することが可能である。一つのカタラーゼ特異的抗体のみに基づく、純粋なモノクローナルELISA系

における182便試料の解析は、94.7%の感度および93.2%の特異性を示した。この感度及び特異性は、このように高い陽性及び陰性予測値を導くので、根治処置を決定するのに、単に簡便、安価そして非侵襲性の便試料解析によって、十分な信頼性をもってH. pyloriの感染の検出が可能になる。あるいは、カタラーゼの異なるエピトープに対して作成された異なるmabの組合せによって、又は、異なる抗原（例えば、カタラーゼ／ウレアーゼ）に対する2種の検出系の組合せによって、感度及び特異性を向上させることが可能である。

【0131】

後述するように（実施例11及び12）一工程ELISAの開発によって、三工程ELISA試験と比較して向上された応用が達成された。

【0132】

実施例11：三工程ELISAにおける適当な抗体対の発見

試験は実施例10に従って行われた。

【0133】

適当な抗体対を発見するために、精製されており、そしていくつかはビオチニル化されている（実施例7参照）、カタラーゼに対するモノクローナル抗体群（表3参照）が使用可能である。まず、捕捉用及び検出用抗体として使用するための最適濃度を見出すために、抗体群を互いに力価測定した。次いで、そのように最適化されたELISA系を用いて患者の便試料を試験し、ヒトH. pylori陰性便（ゼロ便）におけるカタラーゼの検出限界を決定した（表5）。

【0134】

患者の認識及び抗原検出の限界に関する適当なmabの組合せを表5に示す。

【0135】

【表5】

表5: カタラーゼに対するモノクローナル抗体の対合の発見の結果(三工程ELISA)

ビオチン化検出抗体	捕捉抗体				
	25.2m/ 2H10	25.6m/ 1B5	25.6m/ 1G4	25.6m/ 1A5	25.6m/ 1H4
25.2m/2H10	N: 0.03 G4: 7-8 G0: 2	0.1 7 2	0.03 8 2	0.1 7 2	0.03 8 2
25.6m/1B5	N: 0.1 G4: 8 G0: 2	0.1 7 1	0.1 5 2	0.03 7 2	0.3 8 2
25.6m/1G4	N: 0.3 G4: 6-8 G0: 1-2	0.1 7 2	0.1 8 4	0.01 8 2	0.1 8 2
25.6m/1A5	N: 0.3 G4: 6-7 G0: 2	0.1 7 2	0.3 5 2	0.1 7 2	0.3 8 2
25.6m/1H4	N: 0.1 G4: 8 G0: 3	0.3	0.1 4-7 2	0.3 7 2	0.1 8 2

患者認識(8つの臨界陽性G4および4つの臨床陰性G0試料の検出)

N=ゼロ便中のカタラーゼの検出限界[ng/ml]

臨界陽性=検出に特に問題があると示された試料

【0136】

一工程ELISAにおける適当な抗体対の発見

適当な抗体対を発見するために、精製されており、そしていくつかはペルオキシダーゼで標識されている(実施例7参照)、カタラーゼに対するモノクローナル抗体群(表9参照)が使用可能である。27のH. pylori陽性試料及び17のH. pylori陰性試料を用いた一工程ELISAにおいて、捕捉用抗体と検出用抗体(表6参照)の種々の組合せを試験した。

【0137】

一工程サンドイッチELISA

ELISAプレート(MaxiSorb Lockwell; Nunc)の被覆は、100µlのmab溶液(2.0µg 捕捉用抗体/ml、0.1M炭酸緩衝液、pH 9.5)で、2-8℃で一晩行った。このように被覆したELISAプレートをPBSで2回洗浄し、そして、1ウェル当たり200µlのブロック用緩衝液(0.3%BSA; PBS中の20%ソルビトール)を添加し、そして、2-8℃で一晩インキュベーションすることにより、なお未結合であ

る結合部位をブロッキングした。ELISAプレートを吸引し(suck off)、28℃の循環乾燥オーブン中で一晩乾燥させ、そして、次いで、乾燥バックとともに2-8℃で保存した。

【0138】

患者の便を、試料緩衝液(150mM PBS+0.5% 動物血清+ 1mM EDTA+0.1%界面活性剤)中に、1:5の割合で(0.1g便試料+500μl 試料緩衝液)、約30秒(Vortex)懸濁し、次いで、3000gで5分間遠心した。1ウェル当たり50μlの上清をプレートに加えた。続いて、試料緩衝液中に希釈してあるPOD標識抗体(0.5nM ab-デキストラン-POD又は0.2μg/ml HP25.2m/2H10-POD-P)の50μlを試料懸濁液に直接加えた。プレートを振盪器で1時間インキュベートした。洗浄緩衝液(75mM PBS、0.25% Tween)で5回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質TMB(テトラミチルベンチジン)を、一成分基質(Neogen)(100μl/ウェル)に加えた。10分後、1N 塩酸(100μl/ウェル)を添加することによって、酵素反応を停止した。ついで、発色反応の強度を、630nmの参照波長に対して、450nmで測定した。

【0139】

【表6】

表6: カタラーゼに対するモノクローナル抗体の対合の発見の結果(一工程ELISA)

	捕捉抗体								
POD-標識された検出抗体	25.2m/ 2H10	25.6m/ 1B5	25.6m/ 1A5	25.6m/ 4A12	25.6m/ 1G4	25.6m/ 1H4	25.6m/ 3D6	25.6m/ 2E12	25.6m/ 5E4
25.2m/2H10	-	24 14	24 11	22 13	23 14	24 12	19 14	24 12	22 15
25.6m/1B5	G4: 23 G0: 12	-	23 13	20 14	23 12	23 12	18 12	23 10	22 12
25.6m/1H4	G4: 21 G0: 9	24 13	24 14	-	24 11	-	20 15	25 12	24 20
25.6m/4A12	G4: 20 G0: 13	20 12	20 17	-	20 13	25 3	19 13	20 13	20 15
25.6m/3D6	G4: 17 G0: 15	24 9	24 12	21 13	23 8	23 13	-	22 9	22 14

患者認識(27の臨界陽性G4および17の臨床陰性G0試料の検出):

カットオフOD_{450-630nm}: 0.15

【0140】

HP 25.6m/1B5 (捕捉用抗体) 及びHP 25.2m/2H10-POD (検出用抗体) の抗体組合せは、良好な患者認識 (27のH. pylori 陽性試料のうち24及び17のH. pylori 陰性試料のうち14)、並びに、ヒト便におけるH. pylori 抗原 (カタラーゼ) の検出のための良好なシグナル強度のために、最も有利であることが証明された

【0141】

実施例12: 一工程ELISAの手段によるヒト便におけるH. pylori の検出

試験のために、10の異なる病院または胃腸手術室の患者由来の便試料が自由に使用可能であった。H. pylori 陰性又はH. pylori 陽性の状態は、¹³C-尿素呼吸試験および/または胃生検の組織学的解析によって決定した。

【0142】

H. pylori 便サンドイッチELISA (一工程試験)

ELISAプレート (MaxiSorb Lockwell; Nunc) の

被覆は、 $100\mu\text{l}$ のHP25.6m/1B5/ml、 0.1M 炭酸緩衝液、 $\text{pH} 9.5$ で、 $2-8^{\circ}\text{C}$ で一晩行った。このように被覆したELISAプレートをPBSで2回洗浄した。1ウェル当たり $200\mu\text{l}$ のブロック用緩衝液($0.3\% \text{BSA}$; PBS中の $20\% \text{ソルビトール}$)を添加し、そして、 $2-8^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベーションすることにより、なお未結合である結合部位をブロッキングした。ELISAプレートを吸引し(suck off)、 28°C の循環乾燥オーブン中で一晩乾燥させ、そして、次いで、乾燥バックとともに $2-8^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【0143】

患者の便を、試料緩衝液(150mM PBS + 0.5% 動物血清 + 1mM EDTA + 0.1% 界面活性剤)中に、 $1:5$ の割合で(0.1g 便試料 + $500\mu\text{l}$ 試料緩衝液)、約30秒(Vortex)懸濁し、次いで、 3000g で5分間遠心した。1ウェル当たり $50\mu\text{l}$ の上清(決定限界の2倍)をプレートに加えた。続いて、試料緩衝液中に希釈してあるPOD標識抗体、即ち、HP25.2m/2H10-デキストラン PODの $50\mu\text{l}$ を試料懸濁液に直接加えた。プレートを振盪器で1時間インキュベートした。

【0144】

洗浄緩衝液(75mM PBS、 0.25% Tween)で5回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質TMB(テトラミチルベンチジン)を、一成分基質(Neogen)($100\mu\text{l}$ /ウェル)に加えた。10分後、 1N 塩酸($100\mu\text{l}$ /ウェル)を添加することによって、酵素反応を停止した。ついで、発色反応の強度を、 630nm の参照波長に対して、 450nm で測定した。

【0145】

【表7】

表7: 199の便試料を全ての分析における金標準を伴う一工程ELISA試験の試験結果の比較

試料番号	C13息試験の結果	胃生検の結果	一工程ELISAの結果
1001	n.d.	陰性	0.033
1002	n.d.	陰性	0.022
1007	n.d.	陰性	0.015
1008	n.d.	陰性	0.032
1010	n.d.	陰性	0.016
1012	n.d.	陰性	0.026
1017	n.d.	陰性	0.026
1021	n.d.	陰性	0.014
1022	n.d.	陰性	0.018
1024	n.d.	陰性	0.018
1025	n.d.	陰性	0.022
1027	n.d.	陰性	0.044
1030	n.d.	陰性	0.021
1031	n.d.	陰性	0.014
1032	n.d.	陰性	0.014
1034	n.d.	陰性	0.023
1035	n.d.	陰性	0.068
1040	n.d.	陰性	0.058
1046	n.d.	陰性	0.023
2002	n.d.	陰性	0.019
2006	n.d.	陰性	0.017
2007	陰性	n.d.	0.019

2010	n.d.	陰性	0.070
2012	陰性	n.d.	0.040
2013	陰性	n.d.	0.040
2014	陰性	n.d.	0.016
2015	n.d.	陰性	0.027
2017	陰性	陰性	0.034
2018	陰性	陰性	0.030
2023	n.d.	陰性	0.031
2024	陰性	n.d.	0.023
2028	n.d.	陰性	0.049
2033	陰性	陰性	0.040
2034	陰性	陰性	0.083
2043	n.d.	陰性	0.083
3123	陰性	n.d.	0.013
3213	n.d.	陰性	0.035
3224	陰性	n.d.	0.014
3225	n.d.	陰性	0.025
4004	n.d.	陰性	0.044
5004	n.d.	陰性	0.045
5007	n.d.	陰性	0.014
5008	n.d.	陰性	0.015
5009	n.d.	陰性	0.028
5010	n.d.	陰性	0.058
5012	n.d.	陰性	0.030
5013	n.d.	陰性	0.031

【0146】

5017	n.d.	陰性	0.027
5018	n.d.	陰性	0.033
5019	n.d.	陰性	0.010
5020	n.d.	陰性	0.192
5021	n.d.	陰性	0.023
5022	n.d.	陰性	0.017
5024	n.d.	陰性	0.011
5025	n.d.	陰性	0.015
5027	n.d.	陰性	0.026
5028	n.d.	陰性	0.020
5030	n.d.	陰性	0.033
5031	n.d.	陰性	0.013
5033	n.d.	陰性	0.014
5035	n.d.	陰性	0.028
5036	n.d.	陰性	0.022
5040	n.d.	陰性	0.024
5042	n.d.	陰性	0.053
5046	n.d.	陰性	0.018
5052	n.d.	陰性	0.015
5056	n.d.	陰性	1.919
5057	n.d.	陰性	0.015
5060	n.d.	陰性	0.027
5063	n.d.	陰性	0.010
5064	n.d.	陰性	0.010
5066	n.d.	陰性	0.020
5067	n.d.	陰性	0.041
5068	n.d.	陰性	0.017
6002	n.d.	陰性	0.024

6005	n.d.	陰性	0.023
6008	n.d.	陰性	0.054
6009	n.d.	陰性	0.065
6017	n.d.	陰性	0.024
6024	n.d.	陰性	0.050
6026	n.d.	陰性	0.017
6029	n.d.	陰性	0.014
6033	n.d.	陰性	0.013
6038	n.d.	陰性	0.019
6039	n.d.	陰性	0.015
7005	n.d.	陰性	0.031
7009	n.d.	陰性	0.039
7013	n.d.	陰性	0.026
8004	n.d.	陰性	0.015
8047	n.d.	陰性	0.042
9004	n.d.	陰性	0.012
9005	n.d.	陰性	0.105
9010	n.d.	陰性	0.054
9011	n.d.	陰性	0.647
9012	n.d.	陰性	0.026
9013	n.d.	陰性	0.022
9015	n.d.	陰性	0.032
9019	n.d.	陰性	0.040
9022	n.d.	陰性	0.029
213	n.d.	陽性	0.752
444	n.d.	陽性	0.241
1003	n.d.	陽性	0.446
1013	n.d.	陽性	3.809

【0147】

1014	n.d.	陽性	0.316
1015	n.d.	陽性	2.693
1028	n.d.	陽性	0.959
1029	n.d.	陽性	4.336
1037	n.d.	陽性	2.152
2005	陽性	n.d.	1.289
2008	n.d.	陽性	3.814
2009	陽性	n.d.	1.050
2016	n.d.	陽性	1.564
2029	陽性	陽性	4.347
2032	陽性	陽性	2.661
2035	n.d.	陽性	3.632
2039	陽性	陽性	0.694
2040	n.d.	陽性	3.189
2041	陽性	陽性	1.195
2042	陽性	陽性	4.350
3146	陽性	n.d.	4.189
3219	陽性	陽性	4.267
3220	陽性	陽性	4.138
3231	陽性	陽性	4.332
3234	陽性	陽性	3.989
3241	陽性	陽性	1.580
3570	陽性	n.d.	4.147
4003	n.d.	陽性	4.140
4005	陽性	陽性	0.298
4006	n.d.	陽性	4.228
4018	n.d.	陽性	3.319
4019	n.d.	陽性	2.892

4020	n.d.	陽性	1.167
5001	n.d.	陽性	4.438
5006	n.d.	陽性	4.343
5029	n.d.	陽性	1.354
5039	n.d.	陽性	4.401
5048	n.d.	陽性	2.805
5050	n.d.	陽性	0.744
5053	n.d.	陽性	3.896
5055	n.d.	陽性	3.825
5058	n.d.	陽性	4.153
5061	n.d.	陽性	4.050
5069	n.d.	陽性	1.411
5072	n.d.	陽性	4.322
5075	n.d.	陽性	4.285
5076	n.d.	陽性	4.402
5078	n.d.	陽性	1.319
5090	n.d.	陽性	4.268
5092	n.d.	陽性	1.975
5100	n.d.	陽性	2.406
5150	n.d.	陽性	0.132
6001	n.d.	陽性	4.325
6004	n.d.	陽性	4.035
6013	n.d.	陽性	2.684
6014	n.d.	陽性	4.209
6015	n.d.	陽性	4.164
6018	n.d.	陽性	4.551
6020	n.d.	陽性	0.376
6022	n.d.	陽性	1.915

【0148】

6027	n.d.	陽性	4.244
6040	n.d.	陽性	3.105
6050	n.d.	陽性	3.806
6052	n.d.	陽性	4.221
6064	n.d.	陽性	4.225
6065	n.d.	陽性	4.210
7001	n.d.	陽性	2.584
7002	n.d.	陽性	4.245
7003	n.d.	陽性	2.236
7020	n.d.	陽性	0.038
8026	n.d.	陽性	0.013
8033	n.d.	陽性	1.269
9001	n.d.	陽性	3.765
9002	n.d.	陽性	4.049
9003	n.d.	陽性	3.674
9006	n.d.	陽性	0.992
9007	n.d.	陽性	0.052
9008	n.d.	陽性	4.165
9009	n.d.	陽性	0.033
9014	n.d.	陽性	4.042
9017	n.d.	陽性	4.276

9018	n.d.	陽性	0,44
9022	n.d.	陽性	1.961
T 01	陽性	n.d.	2.083
T 02	陽性	n.d.	1.722
T 03	陽性	陽性	3.871
T 04	陽性	陽性	4.463
T 05	陽性	陽性	2.368
T 07	陽性	陽性	0.785
T 09	陽性	n.d.	1.480
T 10	陽性	n.d.	0.768
T 13	n.d.	陽性	2.211
T 53	陽性	n.d.	4.500
T 58	陽性	n.d.	1.540
T 64	陽性	n.d.	1.879
T 67	陽性	n.d.	1.608
T 68	陽性	n.d.	4.377
T 70	陽性	n.d.	0.675
T 77	陽性	n.d.	0.038
T 88	陽性	n.d.	1.377

n.d.: 決定せず

カットフ: (OD 450-630nm):陽性 $\geq$ 0.18; 陰性 $\leq$ 0.13

(n=199)

方法

金標準

陽性	陰性
----	----

【0149】

一工程試験

陽性	94	3
陰性	6	96

感度: 94%

特異性: 97%

【0150】

結果:

表7は、一工程便サンドイッチELISAを用いたH. pylori陰性及びH. pylori陽性便試料の試験の結果を示す。モノクローナル抗体群（HP25.6m/1B5；HP25.2m/2H10）を用いて、便試料由来のH. pylori抗原カタラーゼを検出した。上述したカタラーゼ特異的mabに基づく、純粋なモノクローナルELISA系における199の便試料の試験は、94%の感度及び97%の特異性を有する。

【0151】

実施例13：最適化された一工程ELISAの手段によるヒト便におけるH. pyloriの検出

試験のために、10の異なる病院または胃腸手術室の患者由来の357の便試料が自由に使用可能であった。H. pyloriの状態は胃生検の組織学的解析によって決定した。試験は、実験室スタッフが試料の感染状態に関して知ることがないように、外部GLP研究室において、コードされた試験試料を用いて行われた。

【0152】

最適化された一工程サンドイッチELISA

ELISAプレート（MaxiSorb Lockwell；Nunc）の被覆は、100μlのmab溶液（2.0μg HP25.6m/1B5/ml、0.1M炭酸緩衝液、pH 9.5）で、2-8℃で一晩行った。このように被覆したELISAプレートをPBSで2回洗浄した。1ウェル当たり200μlのブロック用緩衝液（0.3%BSA；PBS中の5%ソルビトール）を添加し、そして、2-8℃で一晩インキュベーションすることにより、なお未結合

である結合部位をブロッキングした。ELISAプレートを吸引し（suck off）、28℃の循環乾燥オーブン中で一晚乾燥させ、そして、次いで、乾燥バックとともに2-8℃で保存した。

【0153】

患者の便を、試料緩衝液（150mM PBS+0.5% 動物血清+ 1mM EDTA+0.1%界面活性剤）中に、1：5の割合で（0.1g便試料+500μl 試料緩衝液）、約30秒（Vortex）懸濁し、次いで、3000gで5分間遠心した。1ウェル当たり50μlの上清をプレートに加えた。続いて、試料緩衝液中に希釈してあるPOD標識抗体、（200fmol/mlのHP25.2m/2H10-デキストラン POD標識）の50μlを試料懸濁液に直接加えた。プレートを振盪器で1時間インキュベートした。洗浄緩衝液（75mM PBS、0.25% Tween）で5回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質TMB（テトラミチルベンチジン）を、一成分基質（Sramun）（100μl/ウェル）に加えた。10分後、1N 硫酸（100μl/ウェル）を添加することによって、酵素反応を停止した。ついで、発色反応の強度を、630nmの参照波長に対して、450nmで測定した。

【0154】

【表8】

表8: H. pylori便サンドイッチELISA(最適化された一工程試験)

モノクローナル抗体 HP25.6m/1B5; HP25.2m/2H10 を用いた最適化された一工程ELISAの手段による便におけるH. pyloriカタラーゼの検出

患者番号	組織学的結果	HP 便 ELISA
CX 7042	陰性	0.022
CX 12070	陰性	0.018
CX 9138	陰性	0.013
CX 12080	陰性	0.015
CX 12076	陰性	0.071
CX 7028	陰性	0.019
CX 9046	陰性	0.013
CX 12077	陰性	0.025
CX 9109	陰性	0.012
CX 9120	陰性	0.018
CX 9144	陰性	0.014
CX 12032	陰性	0.017
CX 2067	陰性	0.037
CX 8010	陰性	0.017
CX 12027	陰性	0.043
CX 12085	陰性	0.012
CX 2105	陰性	0.016
CX 9029	陰性	0.028
CX 9101	陰性	0.013
CX 9119	陰性	0.073
CX 9129	陰性	0.022

CX 9174	陰性	0.029
CX 12079	陰性	0.016
CX 12092	陰性	0.031
CX 2066	陰性	0.043
CX 5115	陰性	0.022
CX 7035	陰性	0.076
CX 9024	陰性	0.018
CX 9136	陰性	0.014
CX 12065	陰性	0.017
CX 12084	陰性	0.014
CX 2044	陰性	0.028
CX 7032	陰性	0.048
CX 8011	陰性	0.014
CX 8050	陰性	0.015
CX 9056	陰性	0.014
CX 6067	陰性	0.016
CX 9041	陰性	0.036
CX 9157	陰性	0.021
CX 12042	陰性	0.014
CX 9134	陰性	0.016
CX 9160	陰性	0.015
CX 9171	陰性	0.042
CX 9025	陰性	0.017

【0155】

CX 9150	陰性	0.014
CX 2050	陰性	0.013
CX 2057	陰性	0.021
CX 9184	陰性	0.018
CX 11021	陰性	0.009
CX 7043	陰性	0.024
CX 7036	陰性	0.016
CX 7047	陰性	0.015
CX 9064	陰性	0.06
CX 8002	陰性	0.015
CX 9115	陰性	0.016
CX 9189	陰性	0.063
CX 9195	陰性	0.015
CX 12059	陰性	0.028
CX 8015	陰性	0.015
CX 9137	陰性	0.052
CX 9187	陰性	0.015
CX 9047	陰性	0.017
CX 9166	陰性	0.019
CX 12064	陰性	0.031
CX 2070	陰性	0.018
CX 6081	陰性	0.05
CX 9104	陰性	0.013
CX 9167	陰性	0.017
CX 9196	陰性	0.027
CX 9066	陰性	0.016
CX 10010	陰性	0.012
CX 9061	陰性	0.014

CX 9170	陰性	0.013
CX 11012	陰性	0.03
CX 2064	陰性	0.024
CX 5101	陰性	0.025
CX 7021	陰性	0.045
CX 9105	陰性	0.013
CX 12016	陰性	0.019
CX 6070	陰性	0.013
CX 2101	陰性	0.021
CX 8014	陰性	0.016
CX 9169	陰性	0.014
CX 12088	陰性	0.017
CX 9121	陰性	0.033
CX 9023	陰性	0.055
CX 12071	陰性	0.022
CX 10003	陰性	0.028
CX 12047	陰性	0.02
CX 9089	陰性	0.017
CX 9107	陰性	0.032
CX 2061	陰性	0.03
CX 11013	陰性	0.014
CX 9092	陰性	0.017
CX 12021	陰性	0.049
CX 12024	陰性	0.023
CX 9125	陰性	0.019
CX 2107	陰性	0.025
CX 9039	陰性	0.032
CX 12046	陰性	0.013

【0156】

CX 11024	陰性	0.053
CX 12012	陰性	0.015
CX 12040	陰性	0.028
CX 2087	陰性	0.027
CX 9028	陰性	0.018
CX 9176	陰性	0.014
CX 10007	陰性	0.019
CX 12089	陰性	0.012
CX 7048	陰性	0.041
CX 9114	陰性	0.019
CX 12019	陰性	0.028
CX 7033	陰性	0.081
CX 9067	陰性	0.016
Cx 9108	陰性	0.165
CX 9197	陰性	0.016
CX 5133	陰性	0.219
CX 9094	陰性	0.041
CX 10021	陰性	0.019
CX 12090	陰性	0.012
CX 9116	陰性	0.018
CX 10037	陰性	0.019
CX 12049	陰性	0.016
CX 12093	陰性	0.026
CX 9097	陰性	0.02
CX 9183	陰性	0.025
CX 11023	陰性	0.068
CX 5114	陰性	0.061
CX 9161	陰性	0.017

CX 2068	陰性	0.027
CX 8005	陰性	0.025
CX 9179	陰性	0.015
CX 12001	陰性	0.028
CX 9062	陰性	0.022
CX 9118	陰性	0.013
CX 6071	陰性	0.027
CX 9035	陰性	0.016
CX 10006	陰性	0.017
CX 9095	陰性	0.018
CX 9199	陰性	0.016
CX 10018	陰性	0.019
CX 12008	陰性	0.018
CX 9052	陰性	0.015
CX 9181	陰性	0.014
CX 12058	陰性	0.055
CX 9030	陰性	0.023
CX 9059	陰性	0.015
CX 10005	陰性	0.028
CX 10039	陰性	0.018
CX 9190	陰性	0.015
CX 9164	陰性	0.016
CX 10044	陰性	0.023
CX 9110	陰性	0.027
CX 9127	陰性	0.018
CX 12013	陰性	0.022
CX 5105	陰性	0.017
CX 9178	陰性	0.037

【0157】

CX 10024	陰性	0.015
CX 2098	陰性	0.038
CX 10008	陰性	0.015
CX 10034	陰性	0.016
CX 9162	陰性	0.513
CX 12023	陰性	0.023
CX 2091	陰性	0.225
CX 12034	陰性	0.022
CX 12039	陰性	0.019
CX 9085	陰性	0.022
CX 10029	陰性	0.03
CX 11022	陰性	0.031
CX 2073	陰性	0.035
CX 12017	陰性	0.017
CX 9141	陰性	0.024
CX 10026	陰性	0.014
CX 12003	陰性	0.038
CX 7049	陰性	0.028
CX 9026	陰性	0.026
CX 10011	陰性	0.012
CX 9124	陰性	0.02
CX 12015	陰性	0.029
CX 10022	陰性	0.021
CX 10001	陰性	0.017
CX 7040	陰性	0.014
CX 9048	陰性	0.017
CX 6075	陰性	0.024
CX 10016	陰性	0.024

CX 9073	陰性	0.015
CX 9081	陰性	0.036
CX 12007	陰性	0.034
CX 9122	陰性	0.078
CX 9069	陰性	0.025
CX 9091	陰性	0.029
CX 10012	陰性	0.034
CX 10027	陰性	0.07
CX 10009	陰性	0.023
CX 10014	陰性	0.021
CX 9040	陰性	0.038
CX 9090	陰性	0.027
CX 12006	陰性	0.026
CX 9060	陰性	0.013
CX 10031	陰性	0.023
CX 9075	陰性	0.019
CX 5131	陰性	0.032
CX 9054	陰性	0.016
CX 9070	陰性	0.022
CX 12099	陰性	0.014
CX 9050	陰性	0.038
CX 9086	陰性	0.017
CX 10013	陰性	0.036
CX 12062	陰性	4
CX 6063	陰性	3.537
CX 9133	陽性	0.023
CX 9188	陽性	0.017
CX 9192	陽性	0.014

【0158】

CX 2048	陽性	0.548
CX 2078	陽性	0.296
CX 8009	陽性	0.695
CX 9145	陽性	1.778
CX 9076	陽性	0.09
CX 9072	陽性	0.024
CX 5148	陽性	0.213
CX 11004	陽性	0.477
CX 2093	陽性	0.271
CX 12060	陽性	1.205
CX 7053	陽性	2.436
CX 11006	陽性	0.13
CX 8001	陽性	4
CX 2100	陽性	1.539
CX 5113	陽性	0.583
CX 7029	陽性	0.155
CX 10020	陽性	1.335
CX 2099	陽性	3.403
CX 12018	陽性	0.927
CX 7037	陽性	4
CX 2083	陽性	3.896
CX 4001	陽性	0.678
CX 5125	陽性	4
CX 9049	陽性	0.588
CX 5112	陽性	1.797
CX 9142	陽性	3.122
CX 7044	陽性	2.155
CX 2109	陽性	3.786

CX 8012	陽性	4
CX 4011	陽性	3.376
CX 10049	陽性	2.98
CX 5128	陽性	3.348
CX 10038	陽性	3.652
CX 12067	陽性	2.928
CX 4029	陽性	3.087
CX 2104	陽性	2.855
CX 11003	陽性	0.786
CX 9065	陽性	1.324
CX 12048	陽性	2.409
CX 12051	陽性	4
CX 10015	陽性	4
CX 7024	陽性	4
CX 12091	陽性	4
CX 5126	陽性	3.834
CX 7057	陽性	4
CX 5120	陽性	1.935
CX 11002	陽性	0.378
CX 11011	陽性	4
CX 2102	陽性	2.452
CX 2103	陽性	3.091
CX 11010	陽性	1.905
CX 5108	陽性	3.58
CX 9130	陽性	2.499
CX 11008	陽性	3.367
CX 9194	陽性	4
CX 12028	陽性	3.671

【0159】

CX 4016	陽性	2.545
CX 4013	陽性	4
CX 9135	陽性	4
CX 11001	陽性	4
CX 2106	陽性	2.71
CX 2094	陽性	4
CX 9082	陽性	1.769
CX 5123	陽性	3.773
CX 6076	陽性	4
CX 9155	陽性	4
CX 7030	陽性	3.661
CX 9128	陽性	4
CX 12035	陽性	4
CX 10023	陽性	3.426
CX 2060	陽性	4
CX 12041	陽性	4
CX 9045	陽性	1.382
CX 9096	陽性	1.653
CX 2056	陽性	4
CX 12002	陽性	2.441
CX 6061	陽性	0.018
CX 11020	陽性	4
CX 9147	陽性	3.758
CX 9078	陽性	3.686
CX 5147	陽性	4
CX 7023	陽性	4
CX 9131	陽性	4
CX 9156	陽性	4

CX 10019	陽性	3.438
CX 12026	陽性	3.941
CX 9079	陽性	3.628
CX 4023	陽性	4
CX 9031	陽性	3.273
CX 5116	陽性	4
CX 9077	陽性	3.929
CX 4012	陽性	4
CX 5106	陽性	3.648
CX 12095	陽性	4
CX 10002	陽性	3.698
CX 11005	陽性	4
CX 9093	陽性	4
CX 11014	陽性	3.465
CX 9051	陽性	4
CX 10028	陽性	3.799
CX 4017	陽性	4
CX 9182	陽性	4
CX 9099	陽性	4
CX 12022	陽性	4
CX 2079	陽性	3.884
CX 9102	陽性	3.524
CX 2076	陽性	3.593
Cx 9177	陽性	4
CX 9088	陽性	2.14
CX 6072	陽性	4
CX 7038	陽性	4
CX 9123	陽性	4

【0160】

CX 12074	陽性	4
CX 9055	陽性	4
CX 9036	陽性	4
CX 6078	陽性	4
CX 2069	陽性	3.778
CX 9043	陽性	3.727
CX 12050	陽性	3.516
CX 5119	陽性	4
CX 9113	陽性	4
CX 9068	陽性	3.857
CX 2092	陽性	4
CX 10050	陽性	4
CX 9053	陽性	3.874
CX 4015	陽性	3.784
CX 12075	陽性	3.717
CX 9027	陽性	3.718

CX 9080	陽性	4
CX 9098	陽性	4
CX 9112	陽性	4
CX 9175	陽性	4
CX 9063	陽性	4
CX 12020	陽性	4
CX 9158	陽性	4
CX 9198	陽性	3.874
CX 9165	陽性	4
CX 9034	陽性	3.874
CX 12055	陽性	3.754
CX 6074	陽性	4
CX 6082	陽性	4
CX 6069	陽性	4
CX 9193	陽性	4
CX 9149	陽性	4
CX 9106	陽性	4

カットオフ: OD_{450-640nm} : 0.15

n = 357

組織学

HP 便 ELISA	組織学	
	陽性	陰性
陽性	141	6
陰性	7	203

感度: 95 %

信頼区間 (95%): 90.5 – 98.1 %

特異性: 97 %

信頼区間 (95%): 93.9 – 98.0 %

【0161】

結果:

表8は、便サンドイッチELISAの手段による、H. pylori陰性及びH. pylori陽性便試料（第一診断）の試験の結果を示す。モノクローナル抗体群（捕捉用抗体：HP25.6m/1B5；検出用抗体HP25.2m/2

H10-POD)を用いて、便試料由来のH. pylori 抗原カタラーゼを検出した。カタラーゼ特異的mabに基づく、純粋なモノクローナルELISA系における便試料の試験は、95%の感度及び97%の特異性を有する。

【0162】

実施例14：根治／根治制御の経過

根治制御は、H. pylori 抗原群の直接的検出のみを介して行うことができ、血清中の抗原の検出によっては行うことができない。なぜなら、感染後、H. pylori 抗体は何ヶ月もさらに血中に存在するからである。よって、血清学的なH. pylori 試験と対照的に、記載されたサンドイッチ便ELISAは根治の成功の評価の可能性を提供する。図9は、H. pylori 陽性患者へのオメプラゾール、メトロニダゾール及びクラリトロマイシン適用後の根治処置の経過を示す。処置の開始から6日後、便中に、H. pylori 抗原はもう検出されなくなった。

【0163】

表9は、根治研究におけるHP便ELISAの結果を示す。根治処置から4ないし6週間後、便試料を採取した。¹³C-息試験を対照試験として行った。

試験は、実施例12に従って行った（一工程ELISA）。

【0164】

【表9】

表9: 根絶対照 — H. pyloriの検出 — 一工程ELISAの手段による便からのカタラーゼ。根絶処置から4-6週間後の試料から得ている

患者番号	¹³ C-息試験	HP 便 ELISA OD _{450-630nm}
131	陰性	0.024
132	陰性	0.012
138	陰性	0.024
147	陰性	0.016
148	陰性	0.014
149	陰性	0.019
151	陰性	0.018
154	陰性	0.012
155	陰性	0.011
158	陰性	0.013
159	陰性	0.023
161	陰性	0.025
165	陰性	0.013
166	陰性	0.014
167	陰性	0.183
168	陰性	0.016
172	陰性	0.015
177	陰性	0.015
180	陰性	0.146
182	陰性	0.026
187	陰性	0.014

188	陰性	0.017
194	陰性	0.020
195	陰性	0.015
199	陰性	0.013
205	陰性	0.035
206	陰性	0.020
213	陰性	0.018
215	陰性	0.014
216	陰性	0.034
217	陰性	0.014
219	陰性	0.014
223	陰性	0.086
224	陰性	0.020
227	陰性	0.139
245	陰性	0.094
246	陰性	0.120
250	陰性	0.019
251	陰性	0.042
253	陰性	0.034
255	陰性	0.033
256	陰性	0.041
270	陰性	0.053
271	陰性	0.033
275	陰性	0.040
283	陰性	0.036

284	陰性	0.018
296	陰性	0.170
303	陰性	0.064
308	陰性	0.029
310	陰性	0.025
311	陰性	0.013
312	陰性	0.049
315	陰性	0.021
318	陰性	0.037
319	陰性	0.044
320	陰性	0.057
322	陰性	0.019
324	陰性	0.017
326	陰性	0.154
327	陰性	0.016
328	陰性	0.015
329	陰性	0.266
330	陰性	0.035
331	陰性	0.013
337	陰性	0.015
338	陰性	0.051
339	陰性	0.021
350	陰性	0.037
353	陰性	0.019
356	陰性	0.023
357	陰性	0.025
358	陰性	0.057
359	陰性	0.023

360	陰性	0.073
366	陰性	0.018
367	陰性	0.018
368	陰性	0.029
369	陰性	0.028
152	陽性	0.365
156	陽性	0.264
160	陽性	3.851
162	陽性	2.021
169	陽性	0.112
179	陽性	0.573
181	陽性	2.886
186	陽性	2.084
196	陽性	0.282
220	陽性	0.905
240	陽性	2.837
252	陽性	1.606
278	陽性	3.173
300	陽性	0.840
325	陽性	3.898
334	陽性	2.946
361	陽性	0.269
161/ 1799	陽性	0.263

【0166】

対照試験と比較して、研究（97患者）は、94%の感度及び95%の特異性を示す（カットオフ： $OD_{450-630}$ ：0.15）。

実施例14は、HP便ELISAはH. pyloriの第一診断のみでなく、

根治の制御及び根治の経過の詳細のためにも使用できることを示す。

【0167】

実施例15：ハイブリドーマ細胞株由来の免疫グロブリンの機能する可変領域のクローニングおよび配列決定

総RNAは、Chomczynski (Chomczynski、1987)にしたがい、抗体産生ハイブリドーマ細胞株から単離した。

【0168】

その後、対応するcDNAを、標準法 (Sambrookら、1989)にしたがって合成した。

それぞれの抗体群のカッパ軽鎖と共に重鎖Fd部分 (VHまたはCH1) をコードするDNA領域は、PCRによって増幅した。表10に示されるオリゴヌクレオチドプライマーセットを用い、単一ハイブリドーマ細胞株から単離したcDNAがテンプレートとして働いた。

【0169】

用いたプライマーセットは、重鎖Fd断片中の5'-XhoIおよび3'-SpeI切断部位と共に、カッパ軽鎖中の5'-SacIおよび3'-XbaI切断部位を導いた。重鎖Fd11をコードするDNA断片のPCR増幅のため、異なる5'-VHプライマー (MVH 1-8およびMULH 1-3) を各々、3'-VHプライマーMIgG2a (HP25. 2m/2H10) または3'-VHプライマーMIgG1 (HP25. 6m/1B5) と組み合わせた。カッパ軽鎖をコードするDNA断片の増幅のため、11の異なる5'-VKプライマー (MUVK 1-7およびMULK 1-4) を、各々、3'-VKプライマー3'MUCKと組み合わせた。

【0170】

以下の温度プログラムをすべてのPCR増幅で用いた：94℃30秒の変性、52℃60秒のプライマー付着、72℃90秒の重合。このプログラムを40周期の間、維持し、その後、72℃10分間で断片を最終的に完了させた。

【0171】

PCR増幅の結果は、アガロースゲル電気泳動によって分離し、そして期待さ

れる分子量のDNAバンドを単離した。抗体25. 2m/2H10に関しては、その後、酵素Xho IおよびSpe I（重鎖）またはSac IおよびXba I（軽鎖）を用いて、単離されたバンドを制限消化に供した。ベクターをまず、制限酵素Xho IおよびSpe IまたはSac IおよびXba Iで切断した後、上記得られた断片を、プラスミドベクターBluescript KS (Stratagene) にクローニングした。

【0172】

続いて、クローニングされた重鎖および軽鎖断片のプラスミド調製を配列決定した。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の機能する可変領域（VHまたはVL）をコードする配列を選択した。この方式で、各ハイブリドーマ細胞株に関して、1つの機能するVHおよび1つの機能するVL領域を正確に同定することが可能であった。図1および図2は、機能するVHおよびVL配列を示す。VH領域の最初の4アミノ酸は、再クローニングすることによって、完了させた。クローニングおよび配列決定は、標準法にしたがって行った（Sambrookら、1989）。

【0173】

抗体25. 6m/1B5に関しては、単離されたバンドをその後、直接配列決定し、そして機能する軽鎖および機能する重鎖を同定した。その後、重鎖Fd断片および軽鎖を、酵素Xho IおよびSpe I（重鎖）並びにSac IおよびXba I（軽鎖）を用いた制限消化に供した。上記得られた断片を、酵素Xho IおよびSpe Iおよび／またはSac IおよびXba Iによって各々切断されている、プラスミドベクターpBSIIHisEx (Connex) にクローニングした。そして再び配列決定した。

【0174】

この方式で、このハイブリドーマ細胞株に関し、正確に1つの機能するVHおよび1つの機能するVL領域を同定することが可能であった。機能するVHおよびVL配列は、図3／図4に提供される。VHおよびVL配列において、成熟N末端は、リーダープライマーによる配列決定によって決定されたように示される。クローニングおよび配列決定は、標準法にしたがって行った（Sambroo

kら、1989)。

【0175】

【表10】

表10: 免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の機能的な可変領域のPCR増幅のために使用されたプライマーのリスト(方向5' - 3')

MVH1	(GC)AG GTG CAG CTC GAG GAG TCA GGA CCT
MVH2	GAG GTC CAG CTC GAG CAG TCT GGA CCT
MVH3	CAG GTC CAA CTC GAG CAG CCT GGG GCT
MVH4	GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGG GCA
MVH5	GA(AG) GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGA GGA
MVH6	GAG GTG AAG CTT CTC GAG TCT GGA GGT
MVH7	GAA GTG AAG CTC GAG GAG TCT GGG GGA
MVH8	GAG GTT CAG CTC GAG CAG TCT GGA GCT
MULK1	GGG GAG CTC CAC CAT GGA GAC AGA CAC ACT CCT GCT AT
MULK2	GGG GAG CTC CAC CAT GGA TTT TCA AGT GCA GAT TTT CAG
MULK3	GGG GAG CTC CAC CAT GGA GWC ACA KWC TCA GGT CTT TRT A
MULK4	GGG GAG CTC CAC CAT GKC CCC WRC TCA GYT YCT KGT
MlgG1	TAT GCA ACT AGT ACA ACC ACA ATC CCT GGG
MlgG2a	GAG AGA GGG GTT CTG ACT AGT GGG CAC TCT GGG CTC
MUVK1	CCA GTT CCG AGC TCG TTG TGA CTC AGG AAT CT
MUVK2	CCA GTT CCG AGC TCG TGT TGA CGC AGC CGC CC
MUVK3	CCA GTT CCG AGC TCG TGC TCA CCC AGT CTC CA
MUVK4	CCA GTT CCG AGC TCC AGA TGA CCC AGT CTC CA
MUVK5	CCA GAT GTG AGC TCG TGA TGA CCC AGA CTC CA
MUVK6	CCA GAT GTG AGC TCG TCA TGA CCC AGT CTC CA
MUVK7	CCA GTT CCG AGC TCG TGA TGA CAC AGT CTC CA
MULH1	GGG CTC GAG CAC CAT GGR ATG SAG CTG KGT MAT SCT CTT
MULH2	GGG CTC GAG CAC CAT GRA CTT CGG GYT GAG CTK GGT TTT
MULH3	GGG CTC GAG CAC CAT GGC TGT CTT GGG GCT GCT CTT CT
3'MUCK	GCG CCG TCT AGA ATT AAC ACT CAT TCC TGT TGA A

【0176】

【表11】

表11:

参考文献

- Collier & Collier, 1983: Collier, H.A., Collier, B.S., Meth. Enzymol. 121:412-417
 Harlow & Lane, 1988: Harlow, E., Lane, D., Antibodies: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
 Kearney et al., 1979: Kearney, J. Immunol. 123: 1548-1550
 Laemmli, 1970: Laemmli, E.K., Nature 227: 680-685
 Peters & Baumgarten, 1990: Peters, J.H., Baumgarten, H. (editors), Monoklonale Antikörper, Springer Verlag, Berlin
 Fägerstam et al., 1990: Fägerstam, L.G. et al., J. Mol. Recognit. 3: 208-214
 Malmqvist, 1996: Methods 9: 525-532
 Eschweiler et al., 1993: Eschweiler, B., et al., Zentralbl. F. Bakt. 280: 73-85
 Pharmacia Biotech, 1994: Monoclonal Antibody Purification Handbook
 Chomczynski, 1987: Anal. Biochem. 162: 156-159
 Sambrook et al., 1989: Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition
 Vaughan et al., 1998: Nature Biotechnology 16: 535-539
 Orlandi et al., 1989: Proc. Natl. Acad. Sci USA 86: 3833-3837
 Janeway & Travers, 1997: Immunologie, 2nd edition, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg
 Osborne et al., 1997: Curr. Opin. Chem. Biol. 1: 5-9
 Stull und Szoka, 1995: Pharm. Res. 12: 465-483
 Frens, 1973: Nat. Phys. Sci. 241, 20-23
 Geoghegan and Ackerman, 1977: J. of Histochemistry and Cytochemistry, 25(11), 1187-1200
 Slot, 1985: Eur. J. Cell Biol. 38, 87-93
 Manos et al., 1998: Helicobacter 3 (1), 28-38
 Haque, 1993: J. Infect. Dis. 167: 247-9
 Park, 1996: J. Clin. Microbiol. 34: 988-990
 Hasan, 1994: FEMS Microbiol. Lett. 120: 143-148
 Koopmans, 1993: J. Clin. Microbiol. 31: 2738-2744
 Machnicka, 1996: Appl. Parasitol. 37: 106-110

【図面の簡単な説明】

【図1】 カタラーゼに特異的なモノクローナル抗体 [HP 25. 2m/2 H10] の重鎖のV領域をコードするクローニングされたDNA配列。コードされるアミノ酸配列は、一文字暗号で示される。K a b a t らにしたがって決定さ

れたCDR領域1-3は下線で示す。

【図2】 カタラーゼに特異的なモノクローナル抗体 [HP 25. 2m/2 H10] の軽鎖のV領域をコードするクローニングされたDNA配列。コードされるアミノ酸配列は、一文字暗号で示される。Kabataらにしたがって決定されたCDR領域1-3は下線で示す。

【図3】 カタラーゼに特異的なモノクローナル抗体 [HP 25. 6m/1 B5] の重鎖のV領域をコードするクローニングされたDNA配列。コードされるアミノ酸配列は、一文字暗号で示される。Kabataらにしたがって決定されたCDR領域1-3は下線で示す。

【図4】 カタラーゼに特異的なモノクローナル抗体 [HP 25. 6m/1 B5] の軽鎖のV領域をコードするクローニングされたDNA配列。コードされるアミノ酸配列は、一文字暗号で示される。Kabataらにしたがって決定されたCDR領域1-3は下線で示す。

【図5】 ウレアーゼに特異的な第一のモノクローナル抗体 (DSM ACC 2360) の軽鎖をコードするDNA配列。コードされるアミノ酸配列は、一文字暗号で示される。Kabataらにしたがって決定されたCDR領域1-3は下線で示す。

【図6】 ウレアーゼに特異的な第一のモノクローナル抗体 (DSM ACC 2360) の重鎖をコードするDNA配列。コードされるアミノ酸配列は、一文字暗号で示される。Kabataらにしたがって決定されたCDR領域1-3は下線で示す。

【図7】 ウレアーゼに特異的な第二のモノクローナル抗体 (DSM ACC 2362) の軽鎖をコードするDNA配列。コードされるアミノ酸配列は、一文字暗号で示される。Kabataらにしたがって決定されたCDR領域1-3は下線で示す。

【図8】 ウレアーゼに特異的な第二のモノクローナル抗体 (DSM ACC 2362) の重鎖をコードするDNA配列。コードされるアミノ酸配列は、一文字暗号で示される。Kabataらにしたがって決定されたCDR領域1-3は下線で示す。

【図9】 オメプラゾール、メトロニダゾール及びクラリトロマイシンを投与した後のH. pylori 陽性患者の根治処置の経過。

【図1】

Fig. 1

```

E  V  Q  L  L  E  Q  P  G  A
GAGGTGCAGCTGCTCGAGCAGCCTGGGGCT  30

E  L  A  K  P  G  A  S  V  K
GAACTGGCAAAACCTGGGGCCTCAGTGAAG  60

M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F
ATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTT  90

T  N  Y  W  I  H  W  V  K  Q
ACTAACTACTGGATTCACTGGGTGAAACAG  120

R  P  G  Q  G  L  K  W  I  G
AGGCCTGGACAGGGTCTGAAATGGATTGGA  150

Y  I  N  P  A  T  G  S  T  S
TACATTAAATCCTGCCACTGGTTCCACTTCT  180

Y  N  Q  D  F  Q  D  R  A  T
TACAATCAGGACTTTCAGGACAGGGCCACT  210

L  T  A  D  K  S  S  T  T  A
TTGACCGCAGACAAGTCCTCCACCACAGCC  240

Y  M  Q  L  T  S  L  T  S  E
TACATGCAGCTGACCAGCCTGACATCTGAG  270

D  S  S  V  Y  Y  C  A  R  E
GACTCTTCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAG  300

G  Y  D  G  F  D  S  W  G  Q
GGGTACGACGGGTTTGACTCCTGGGGCCAA  330

G  T  T  L  T  V  S  S
GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA  360

```

【図2】

Fig. 2

```

E  L  V  L  T  Q  S  P  A  I
GAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATC 30

M  S  A  S  P  G  E  K  V  T
ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACC 60

M  T  C  S  A  S  S  S  V  N
ATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAT 90

Y  M  Y  W  Y  Q  Q  K  S  G
TACATGTACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGC 120

T  S  P  K  R  W  I  Y  D  T
ACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACA 150

S  K  L  A  S  G  V  P  A  R
TCCAAATTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGC 180

F  S  G  S  G  S  G  T  S  Y
TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTAC 210

S  L  T  L  S  S  M  E  A  E
TCTCTCACACTCAGCAGCATGGAGGCTGAA 240

D  A  A  T  Y  Y  C  Q  Q  W
GATGCCGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGG 270

S  S  N  P  Y  T  F  G  G  G
AGTAGTAATCCGTACACGTTCGGAGGGGGG 300

T  K  L  E  I  K
ACCAAGCTGGAGATAAAA 330

```

【図3】

Fig. 3

```

+1  E  V  Q  L  Q  Q  S  G  A  E
    GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGGCAGAG 30

+1  L  V  K  P  G  A  S  V  K  L
    CTTGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTCAAGTTG 60

+1  S  C  T  S  S  G  F  N  I  K
    TCCTGCACATCTTCTGGCTTCAACATTAAA 90

+1  D  T  Y  V  H  W  M  K  Q  R
    GACACCTATGTGCACTGGATGAAACAGAGG 120

+1  P  E  Q  G  L  E  W  I  G  K
    CCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAAAG 150

+1  I  D  P  A  N  G  K  T  K  Y
    ATTGATCCTGCGAATGGTAAACTAAATAT 180

+1  D  P  I  F  Q  A  K  A  T  M
    GACCCGATATTCCAGGCCAAGGCCACTATG 210

+1  T  A  D  A  S  S  N  T  A  Y
    ACAGCAGACGCATCCTCCAATACAGCCTAC 240

+1  L  Q  L  S  S  L  T  S  E  D
    CTGCAACTCAGCAGCCTGACTTCTGAGGAC 270

+1  T  A  V  Y  Y  C  A  L  P  I
    ACTGCCGTCTATTACTGTGCTCTCCCCATI 300

+1  Y  Y  A  S  S  W  F  A  Y  W
    TATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCTTACTGG 330

+1  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  A
    GGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA 360

```

【図4】

Fig. 4

```

+1   D   I   V   M   T   Q   S   H   K   F
      GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTC 30

+1   M   S   T   S   V   G   D   R   V   S
      ATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGC 60

+1   I   T   C   K   A   S   Q   D   V   G
      ATCACCTGCAAAGGCCAGTCAGGATGTGGGT 90

+1   T   S   V   A   W   Y   Q   Q   K   P
      ACTTCTGTTGCCTTGGTATCAACAGAAACCT 120

+1   G   H   S   P   K   L   L   I   Y   W
      GGGCACTCTCCTAAATTACTGATTTACTGG 150

+1   T   S   T   R   H   T   G   V   P   D
      ACATCCACCCGGCACACTTGGAGTCCCTGAT 180

+1   R   F   T   G   S   G   S   G   T   D
      CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT 210

+1   F   I   L   T   I   S   N   V   Q   S
      TTCATTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCT 240

+1   E   D   L   A   D   Y   F   C   Q   Q
      GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTCAGCAA 270

+1   Y   S   S   S   P   T   F   G   G   G
      TATAGCAGCTCTCCCACGTTCGGAGGGGGG 300

+1   A   K   V   E   I   K
      GCCAAGGTGGAAATAAAA 330

```

【図5】

```

+1 D I L L T Q S P A I L S V S P G E
      GACATCTTGC TGA CT CAGTC TCCAGCCATC CTGTCTGTGA GTCCAGGAGA 50
+1 R V S F S C R A S Q S I G T R I H
      AAGAGTCAGT TTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGCATTTGGC ACAAGAATAC 100
+1 W Y Q Q R T N G S P R L L I K Y
      AC TGGTATCA ACAAGAACA AATGGTTCTC CAAGGCTTCT CATAAG TAT 150
+1 G S E S I S G I P S R F S G S G S
      GGTTC TGAGT CTATCTCT GG GATCCCTTCC AGGTTTAGTG GCAGTGGATC 200
+1 G T D F S L S I N S V E S E D I A
      AGGGACAGAT TTAGTCTTA GCATCAACAG TGTCGAGTCT GAAGATATTG 250
+1 D Y Y C Q Q S N T W P L T F G A
      CAGATTATTA CTGT CAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC GTTCGGTGCT 300
+1 G T K L E L K
      GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A 350

```

Fig. 5

【図6】

```

+1  E V Q L L E Q S G A E L V K P G A
GAGGTGCAGC TGCTCGAGCA GTCTGGAGCT GAGCTGGTGA AGCCTGGGGC 50
+1  S V K I S C K A S G Y A F S T S W
CTCAGTGAAG ATTTCCTGCA AGGCTTCTGG CTACGCATTC AGTACCTCCT 100
+1  M N W V K Q R P G K G L E W I G
GGATGAAC TG GGTGAAACAG AGGCCCTGGAA AGGGTCTTGA GTGGATTGGA 150
+1  R I Y P G D G D T N Y N G K F K G
CGGATTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA AGTTCAAGGG 200
+1  K A T L T A D K S S S T A Y M Q L
CAAGGCCACA CTGACTGCAG ACAAAATCCTC CAGCACAGCC TACATGCCAAC 250
+1  N S L T S E D S A V Y F C V R E
TCAACAGCCT GACATCTGAG GACTCTGCGG TCTACTTCTG TGTAAGA GAG 300
+1  D A Y Y S N P Y S L D Y W G Q G T
GATGCCCTATT ATAGTAACCC CTATAGTTTG GACTACTGGG GTCAAGGAAC 350
+1  S V T V S S
CTCAGTCACC GTCTCCTCA
400

```

Fig. 6

【図7】

+1 E L Q M T Q S P S S L S A S L G D
GAGCTCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCAGT CTGTCTGCAT CCCTTGGAGA 50
+1 T I T I T C H A S Q N I N V W L S
CACAATTACC ATCACTTGCC ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTGGTTAA 100
+1 W Y Q Q K P G D I P K L L I Y K
GTGGTATCA GCAGAAACCA GGAGATATCC CTAAACTATT GATCTATAAG 150
+1 A S N L H T G V P S R F S G S S
GCTTCCAACT TGCACACAGG CGTCCCATCA AGGTTTAGTG GCAGTGGATC 200
+1 G T G F T L V I S S L Q P E D I A
TGGAACAGGT TTCACATTAG TCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGACATTG 250
+1 T Y Y C Q Q G R S Y P L T F G A
CCACTTACTA CTGT CAACAG GGTCCGAAGTT ATCCTCTCAC GTTCGGTGCT 300
+1 G T K L E L K
GGGACCAAGC TGGAGCTGAA A 350

Fig. 7

【☒ 8】

```

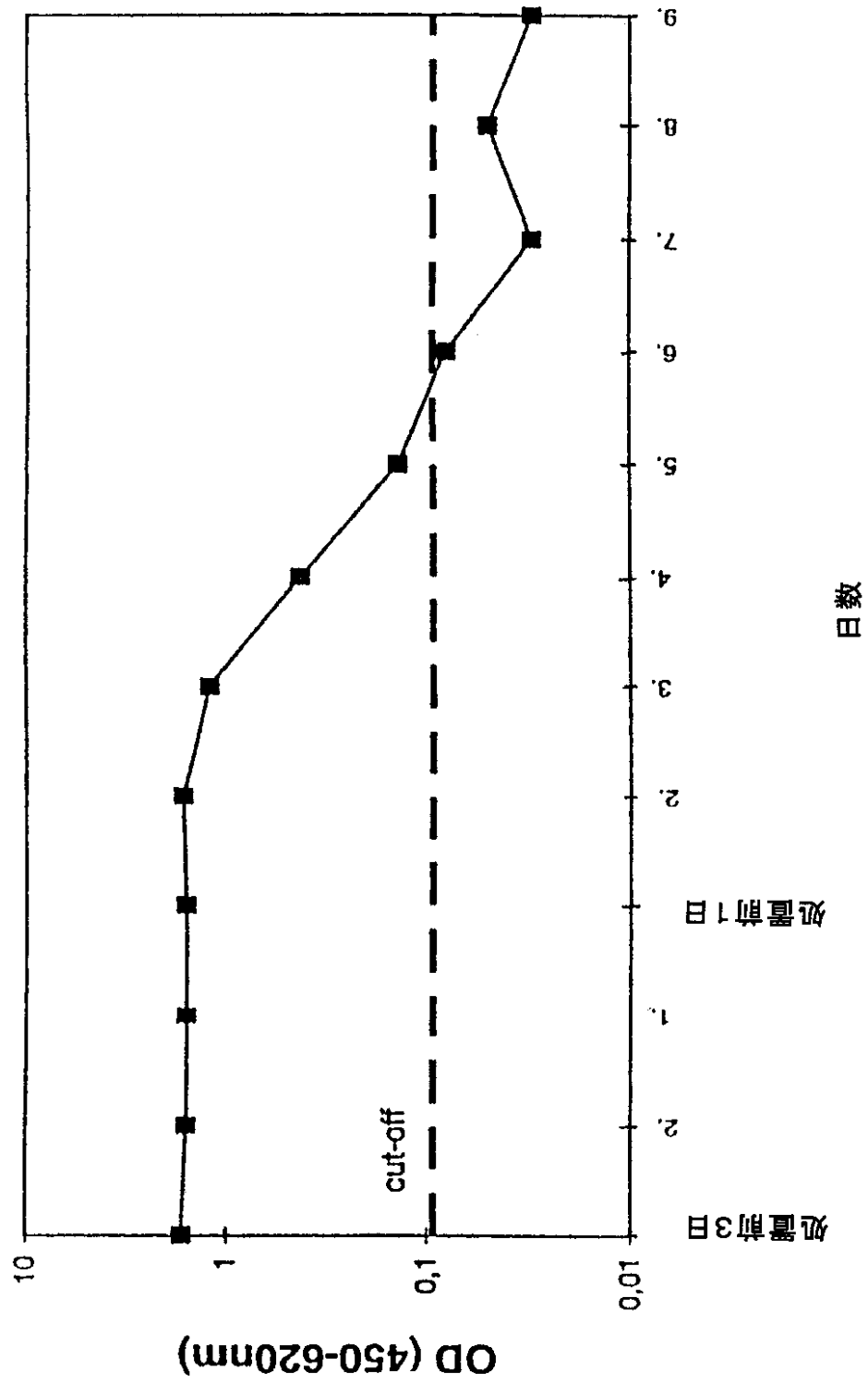
+1  E V Q L L E E S G G L V K P G G
GAGGTGCAGC TGCTCGAGGA GTCTGGGGGA GGCTTAGTGA AGCCTGGAGG 50
+1  S L Q L S C S A S G F T F S S H F
GTCCCTGCCAA CTCTCCTGTT CAGCCTCTGG ATTCACTTTC AGTAGCCATT 100
+1  M S W V R Q T P E K R L E W V A
TCATGTCT TG GGTTCGCCAA ACTCCAGAGA AGAGGCTGGA GTGGGTCGCA 150
+1  S I S S G G D S F Y P D S L K G R
TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCTAT CCAGACAGTC TGAAGGGCCG 200
+1  F A I S R D N A R N I L F L Q M S
ATTCGCCATC TCCAGAGATA ATGCCAGGAA CATCCTGTTC CTGCAAATGA 250
+1  S L R S E D S A M Y F C T R D Y
GCAGTCTGAG GTCTGAGGAC TCGGCCATGT ATTTCTGTAC AAGAGACTAC 300
+1  S W Y A L D Y W G Q G T S V T V S
TCTTGGTATG CTTTGGACTA CTGGGGTCAA GGAACCTCAG TCACCGTCTC 350
+1  S
CTCA
400

```

Fig. 8

【図9】

患者CXT0002の根治の経過



【手続補正書】

【提出日】平成14年9月12日(2002. 9. 12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヘリコバクター(Helicobacter)属又はカンピロバクター(Campylobacter)属に属する酸耐性細菌による哺乳動物の感染を検出するための方法であって、

(a) 哺乳動物の便試料を、(aa) 1種類の受容体と、酸耐性細菌由来の抗原と当該受容体との複合体形成を可能にするような条件下でインキュベートする、又は(ab) 2種類の異なる受容体群と、酸耐性細菌由来の抗原と当該2種類の受容体との複合体形成を可能にするような条件下でインキュベートする、そして、

ここにおいて、(aa)の受容体又は(ab)の受容体群は、抗原と特異的に結合し、当該抗原は少なくともいくつかの哺乳動物において、天然の構造、あるいは、酸耐性細菌、又は、酸耐性細菌の抽出物若しくは溶解物、又はそれ由来のタンパク質若しくはその断片若しくは合成ペプチドで感染されたもしくは免疫化された後に哺乳動物が抗体を産生するような構造、に相当する構造を、腸を通過後に示す；そして

(b) (a)による少なくとも1種類の抗原-受容体複合体の形成を検出することを含む、前記方法。

【請求項2】

細菌が、ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)、ヘリコバクター・ヘパティカス(Helicobacter hepaticus)又はカンピロバクター・ジェジュニ(Campylobacter j)

e j u n i) 種に属する細菌である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

抗原が、カタラーゼ、ウレアーゼ又はメタロプロテナーゼの抗原である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

抗原が、ヘリコバクター・ピロリ (H. p y l o r i) の抗原である、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

受容体／受容体群が、抗体（単数若しくは複数）、その断片（単数若しくは複数）若しくは誘導体（単数若しくは複数）、又はアプタマー（単数又は複数）である、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

検出のために、さらに受容体群の混合物が使用される、ここにおいて、受容体を抗原の検出因子として使用する場合、受容体の混合物は抗原を捕捉する機能を有し、そして、受容体を抗原の捕捉因子として使用する場合、受容体の混合物は抗原を検出する機能を有する、請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

受容体群の混合物がポリクローナル抗血清である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

ポリクローナル抗血清が、細菌の溶解物に対して得られたものである、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

溶解物が、富化された抗原を含む溶解物である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

溶解物が、枯渇化された免疫ドミナント抗原を含む溶解物である、請求項8又は9に記載の方法。

【請求項11】

ポリクローナル抗血清が、精製された又は（半）合成により産生された抗原に対して得られたものである、請求項7に記載の方法。

【請求項12】

抗原が、カタラーゼ、ウレアーゼ又はメタロプロテナーゼの抗原である、請求項1ないし11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

受容体、及び／又は受容体群の混合物が、コンフォメーションエピトープ（単数又は複数）に結合する、請求項1ないし12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

カタラーゼエピトープに結合する抗体の重鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、を有する請求項5ないし13のいずれか1項に記載の方法。

CDR1： NYW I H

CDR2： Y I N P A T G S T S Y N Q D F Q D

CDR3： E G Y D G F D S

【請求項15】

重鎖が上述した3つのCDRを全て有する、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

抗体の重鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を有する請求項14または15に記載の方法。

CDR1： A A C T A C T G G A T T C A C

CDR2： T A C A T T A A T C C T G C C A C T G G

T T C C A C T T C T T A C A A T C A G G

A C T T T C A G G A C

CDR3： G A G G G G T A C G A C G G G T T T G A

C T C C

【請求項17】

カタラーゼエピトープに結合する抗体の軽鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を有する請求項5ないし13のいずれか1項に記載の方法。

CDR1: SASSSVNYMY

CDR2: DTSKLAS

CDR3: QQWSSNPYT

【請求項18】

抗体の軽鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を有する請求項17に記載の方法。

CDR1: AGTGCCAGCT CAAGTGTA
TTACATGTAC

CDR2: GACACATCCA AATTGGCTTC
T

CDR3: CAGCAGTGGA GTAGTAATCC
GTACACG

【請求項19】

カタラーゼエпитープに結合する抗体の重鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項5ないし13のいずれか1項に記載の方法。

CDR1: DTYVH

CDR2: KIDPANGKTKYDPIFQA

CDR3: PIYYASSWFAY

【請求項20】

抗体の重鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項19に記載の方法。

CDR1: GACACCTATG TGCAC

CDR2: AAGATTGATC CTGCGAATGG
TAAAACTAAA TATGACCCGA
TATTCCAGGC C

CDR3: CCCATTTATT ACGCTAGTTC

CTGGTTTGCT TAC

【請求項21】

カタラーゼエピトープに結合する抗体の軽鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項5ないし13のいずれか1項に記載の方法。

CDR1: KASQDVGT SVA

CDR2: WTSTRHT

CDR3: QYSSSPT

【請求項22】

抗体の軽鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項21に記載の方法。

CDR1: AAGGCCAGTC AGGATGTGGG

TACTTCTGTT GCC

CDR2: TGGACATCCA CCCGGGCACAC

T

CDR3: CAGCAATATA GCAGCTCTCC

CACG

【請求項23】

β-ウレアーゼエピトープに結合する抗体の重鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3 そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項5ないし13のいずれか1項に記載の方法。

CDR1: GFTFSSHFMS

CDR2: SISSGGDSFYPSLKG

CDR3: DYSWYALDY

又は:

CDR1: GYAFSTSWMN

CDR2: RIYPGDGDTNYNGKFKG

CDR3: EDAYYSNPYSLDY

【請求項24】

抗体の重鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDR全て、を示す請求項23に記載の方法。

CDR1: GG CTACGCATTC AGTACCTCCT GGAT
GAAC

CDR2: CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACT
AAC TACAATGGGA AGTTCAAGGG C

CDR3: GAG GATGCCTATT ATAGTAACCC CTA
TAGTTTG GACTAC

又は:

CDR1: GG ATTCACTTTC AGTAGCCATT TCAT
GTCT

CDR2: TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTC
TAT CCAGACAGTC TGAAGGGC

CDR3: GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA
C

【請求項25】

β-ウレアーゼエピトープに結合する抗体の軽鎖が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項5ないし13のいずれか1項に記載の方法。

CDR1: RASQSIGTRIH

CDR2: YGSEESIS

CDR3: QQSNTWPLT

又は:

CDR1: HASQNINVWLS

CDR2: KASNLHT

CDR3: QQGRSYPLT

【請求項26】

抗体の軽鎖をコードするDNA配列が、以下のCDRの少なくとも1つ、好ましくはCDR3、そしてより好ましくは、以下の3つのCDRの全て、を示す請求項25に記載の方法。

CDR1: A GGGCCAGTCA GAGCATTGGC ACAAG
AATAC AC

CDR2: TAT GGTTCCTGAGT CTATCTCT

CDR3: CAACAA AGTAATACCT GGCCGCTCAC G

又は:

CDR1: C ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTTG
GTTAA GC

CDR2: AAG GCTTCCAAC TGCACACA

CDR3: CAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC
G

【請求項27】

抗体が、軽鎖及び重鎖の可変領域において、図1及び2、図3及び4、図5及び6、又は図7及び8に示されたアミノ酸配列を有する、請求項5ないし26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項28】

軽鎖及び重鎖の可変領域のコード領域が、図1及び2、図3及び4、図5及び6、又は図7及び8に示されたDNA配列を有する、請求項5ないし27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

抗体でのインキュベーションの前に、便試料に以下の工程:

(a) 便試料を、1:3ないし1:25の割合で、好ましくは約1:5ないし1:10の割合で、特に好ましくは1:5の割合で、再懸濁緩衝液中に再懸濁し、そして

(b) 攪拌混合器(vortex mixer)で混合する
を施す、請求項1ないし28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

工程（b）における、抗原－受容体複合体／抗原－受容体／受容体混合物 複合体の少なくとも一つの形成の検出が、免疫学的方法の手段によって行われる、請求項1ないし29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項31】

工程（b）における、抗原－受容体複合体／抗原－受容体／受容体混合物 複合体の少なくとも一つの形成の検出が、ELISA、RIA、ウェスタンブロット又はイムノクロマトグラフィー法の手段によって行われる、請求項1ないし30のいずれか1項に記載の方法。

【請求項32】

RIA又はELISAにおいて、固相への結合とエピトープの検出と双方に同じ受容体が使用される、請求項30又は31に記載の方法。

【請求項33】

受容体が支持体に固定されている、請求項1ないし32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項34】

受容体がマウスのモノクローナル抗体である、請求項1ないし33のいずれか1項に記載の方法。

【請求項35】

方法が、一工程ELISAである、請求項1ないし34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項36】

方法が、三工程ELISAである、請求項1ないし34のいずれか1項に記載の方法。

【請求項37】

支持体の材料が、有孔性の材料である、請求項33に記載の方法。

【請求項38】

支持体の材料が試験ストリップである、請求項33及び37に記載の方法。

【請求項39】

支持体の材料が、セルロース又はセルロースの誘導体からなる、請求項33、

37又は38に記載の方法。

【請求項40】

便試料のかわりに、呼気濃縮物、胃ガス、歯垢、唾液、粘膜スミア、生検、全血液又は血清を使用する、請求項1ないし39のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】

方法が、自動化された方法である請求項1ないし40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】

哺乳動物がヒトである、請求項1ないし41のいずれか1項に記載の方法。

【請求項43】

請求項14ないし26のいずれか1項に記載のCDRの組合せを示すV領域を有する、モノクローナル抗体、又はその断片若しくは誘導体。

【請求項44】

図1及び2、図3及び4、図5及び6、又は図7及び8に示されたV領域の少なくとも一つを有する、請求項43に記載のモノクローナル抗体、又はその断片若しくは誘導体。

【請求項45】

マウスの抗体、又はその断片若しくは誘導体、又はキメラの好ましくはヒト化抗体、又はその断片若しくは誘導体である、請求項43及び44に記載のモノクローナル抗体、又はその断片若しくは誘導体。

【請求項46】

請求項43ないし45のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体、又はその断片若しくは誘導体と同じエピトープと特異的に結合する、アプタマー。

【請求項47】

請求項43ないし45のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体、又はその断片若しくは誘導体、あるいは請求項46に記載のアプタマーによって特異的に結合されるアプタマー。

【請求項48】

請求項47のエピトープによって特異的に結合される、抗体、又はその断片若

しくは誘導体。

【請求項49】

所望により支持体材料に固定された、上記いずれかの1項に定義された少なくとも一つの受容体を含む診断用組成物であって、所望により支持体材料に固定された、上記いずれかの1項に定義された受容体の混合物を、所望によりさらに含んでもよい、前記診断用組成物。

【請求項50】

上記いずれかの1項に定義されたエピトープの少なくともいずれか1つの検出のための試験装置であって、

(a) 指示材料に固定化された、上記いずれかの1項に定義された少なくとも一つの受容体

(b) 便試料を調製し、分析するための装置；及び所望により

(c) 上記いずれかの1項に定義された受容体の混合物を含む、試験装置。

【請求項51】

上記いずれかの1項に定義された少なくとも一つのエピトープの検出のための試験装置であって、

(a) コロイド状金、ラテックス粒子又はその他のカラー粒子と結合した、上記いずれかの1項に定義された少なくとも一つの受容体、ここにおいて、前記コロイド状金、ラテックス粒子又はその他のカラー粒子のサイズは、典型的には5 nmと100 nmの間の範囲、好ましくは20 nmと60 nmの間、特に好ましくは40 nmと60 nmの間（金）、そして、200 nmと500 nmの間（ラテックス）である；

(b) 便試料を調製し、分析するための装置；及び所望により

(c) 上記いずれかの1項に定義された受容体の混合物を含む、試験装置。

【請求項52】

以下の

(a) 所望により支持体材料に固定された、上記いずれかの1項に定義された

少なくとも一つの受容体；所望によりさらに、

(b) 便試料を調製し、分析するための装置；及び所望により

(c) 上記いずれかの1項に定義された受容体の混合物

を含むキット。

【請求項53】

上記に記載された受容体の少なくとも一つを、所望により医薬的に受容可能な支持体及び／又は希釈剤と組合せて含む、組成物、好ましくは医薬組成物。

【請求項54】

請求項49に記載の診断用組成物、請求項50、51に記載の試験装置、又は請求項52に記載のキットを含む、パッケージ。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/EP 00/10058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/569 C07K16/12 C07K16/40

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)

IPC 7 G01N C07K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, BIOSIS, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 932 430 A (KOZAK KENNETH JAMES ET AL) 3 August 1999 (1999-08-03) abstract column 2, line 47 - line 61 figure 2	1-4, 7-9, 30-33, 35-37, 42, 49, 50, 52-54
Y	---	5

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

☒ Patent family members are listed in 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 document 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.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 February 2001

Date of mailing of the international search report

20.03.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stricker, J-E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No.

PCT/EP 00/10058

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 49889 A (US AGRICULTURE) 7 October 1999 (1999-10-07) abstract page 13, line 14 - line 21 page 15, line 9 - line 19 claims 11,12 ----	1-4,6,7, 30,31, 33-35, 42,49, 53,54
X	WO 98 24885 A (SANITARIA SCALIGERA SPA ;ZUCCATO ALESSANDRO (IT)) 11 June 1998 (1998-06-11) page 4, line 2 - line 6 page 7, line 12 - line 15 page 13 -page 15 claims 7-11 ----	1-4,6, 12, 30-40, 42,49, 53,54
Y	----	5,13
X	WO 97 34149 A (SVENSON STEFAN) 18 September 1997 (1997-09-18) page 2, line 31 -page 3, line 22 claims 1-8 ----	1-4,6, 14, 30-33, 35-37, 39,42, 49,53,54
X	US 5 200 344 A (ELLISON III RICHARD T ET AL) 6 April 1993 (1993-04-06) abstract column 3, line 37 - line 40 examples 2,3,8 claims 7,13 ----	1-4, 6-12,30, 31,33, 35,42, 49,53,54
Y	----	5,13
X	WO 99 44066 A (HELITECH BIOMEDICAL INC ;CHANG ALEX (CA)) 2 September 1999 (1999-09-02) abstract page 2, line 8 - line 10 page 6, line 7 - line 11 page 13, line 21 example 2 claims 1,9,11,14,15 ----	1-4,6-9, 30,31, 33,35, 37-39, 42,49-54
Y	----	5
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/10058

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 607 863 A (CHANDLER HOWARD M) 4 March 1997 (1997-03-04) abstract column 2, line 15 - line 55 column 14, line 46-48; figure 18 column 15, line 20 - line 38 column 24, line 20-28 column 36, line 60 -column 37, line 20 examples 1,2 column 56, line 55 -column 57, line 50	1,7,8, 30-33, 35-39, 49-54
Y	KRISHNAMURTHY P. ET AL.: "Helicobacter pylori containing only cytoplasmic urease is susceptible to acid." INFECTION AND IMMUNITY, vol. 66, no. 11, November 1998 (1998-11), pages 5060-5066, XP002160658 abstract Absatz "Discussion"	5,13
P,X	WO 00 26671 A (FRIEDRICHS ULRIKE ;CONNEX GMBH (DE); HEPPNER PETRA (DE); RINGEIS A) 11 May 2000 (2000-05-11) abstract page 19, paragraph 4 claims 1-6,9-14,17,26-53 figures 5-8	1-6, 23-39, 42,44, 49-54
P,X	MAKRISTATHIS A ET AL.: "Two enzyme immunoassays and PCR for detection of Helicobacter pylori in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 38, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 3710-3714, XP000983473 abstract page 3710, column 2, paragraph 2 page 3711, column 1, paragraph 5	1-4,6, 30,31, 33,35, 42,49, 53,54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/10058

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **Claims Nos. 43, 45, 46, 47, 48**
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:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210

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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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 additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 00/10058

Continuation of Field I.2

Claims Nos. 43, 45, 46, 47, 48

In view of the large number as well as the wording of relevant Patent Claim Nos. 43 and 45, which make it difficult if not impossible to determine for the scope for which protection is sought, the patent application does not comply with the requirements of PCT Article 6 (cf. PCT Rule 6.1(a)) to such an extent that a meaningful search cannot be conducted. For this reason, the search was directed at the portions of the patent claims which can be regarded as supported and disclosed in the above-mentioned sense, namely at the subject matter of Claim No. 44.

Relevant Patent Claim Nos. 46-48 relate to products respectively characterized by a desired peculiarity or quality, namely aptamers, epitopes and antibodies that are dependent on the characteristics of the antibodies from Claims Nos. 43-45.

The patent claims thus comprise all products, etc. which exhibit this peculiarity or quality, whereas only a limited number of such products, etc. are supported by the description as per the patent application under the terms of PCT Article 5. In the case in question, the patent claims lack the corresponding support or the patent application lacks the necessary disclosure to such a degree (i.e. no epitopes are explained that are identified by the antibodies) that a meaningful search appears to be impossible to conduct with respect to the entire scope for which protection is sought.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). Similar to the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/10058

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5932430	A	03-08-1999	US 5871942 A	16-02-1999
			US 5716791 A	10-02-1998
			AU 698513 B	29-10-1998
			AU 1502997 A	13-11-1997
			CA 2198336 A	10-11-1997
			CN 1165299 A	19-11-1997
			DE 806667 T	07-10-1999
			EP 0806667 A	12-11-1997
			ES 2132044 T	16-08-1999
			GR 99300022 T	30-07-1999
			JP 3043999 B	22-05-2000
			JP 10010128 A	16-01-1998
WO 9949889	A	07-10-1999	AU 3458299 A	18-10-1999
WO 9824885	A	11-06-1998	IT VR960109 A	08-06-1998
WO 9734149	A	18-09-1997	AU 2094297 A	01-10-1997
US 5200344	A	06-04-1993	AU 681043 B	14-08-1997
			AU 3042995 A	14-12-1995
			AU 663858 B	26-10-1995
			AU 9071791 A	11-06-1992
			CA 2096016 A	14-05-1992
			EP 0557467 A	01-09-1993
			JP 6505024 T	09-06-1994
			WO 9208485 A	29-05-1992
			US 5470958 A	28-11-1995
WO 9944066	A	02-09-1999	AU 3242399 A	15-09-1999
US 5607863	A	04-03-1997	US 5877028 A	02-03-1999
			AU 692205 B	04-06-1998
			AU 1265995 A	27-06-1995
			CA 2175689 A	15-06-1995
			CN 1142868 A	12-02-1997
			EP 0733210 A	25-09-1996
			JP 9506434 T	24-06-1997
			WO 9516207 A	15-06-1995
			AT 177206 T	15-03-1999
			AU 678461 B	29-05-1997
			AU 6497094 A	24-10-1994
			BG 100104 A	31-05-1996
			BR 9406755 A	02-04-1996
			CA 2158570 A	13-10-1994
			CN 1124524 A	12-06-1996
			DE 69416828 D	08-04-1999
			DE 69416828 T	08-07-1999
			DK 692097 T	04-10-1999
			EP 0692097 A	17-01-1996
			ES 2131191 T	16-07-1999
			FI 954591 A	27-11-1995
			HU 73379 A	29-07-1996
			JP 8508569 T	10-09-1996
			NO 953872 A	06-11-1995
			NZ 263754 A	24-03-1997
			PL 310953 A	08-01-1996
			RU 2124729 C	10-01-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/10058

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5607863 A		SK 122795 A	05-06-1996
		WO 9423300 A	13-10-1994
		US 5468648 A	21-11-1995
		US 5869345 A	09-02-1999
		US 5648274 A	15-07-1997
		US 5846838 A	08-12-1998
		US 5998220 A	07-12-1999
		US 6017767 A	25-01-2000
		AT 174432 T	15-12-1998
		AU 665956 B	25-01-1996
		AU 2185292 A	08-01-1993
		CA 2103052 A	30-11-1992
		DE 69227834 D	21-01-1999
		DE 69227834 T	29-04-1999
		DK 586595 T	16-08-1999
		EP 0586595 A	16-03-1994
		EP 0874241 A	28-10-1998
		ES 2127754 T	01-05-1999
		FI 935244 A	25-11-1993
		JP 6508215 T	14-09-1994
		WO 9221977 A	10-12-1992
WO 0026671 A	11-05-2000	AU 1157100 A	22-05-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/543	5 2 1
33/543	5 2 1	33/545	A
33/545		33/553	
33/553		33/573	A
33/573		33/577	B
33/577		C 1 2 P 21/08	
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(31)優先権主張番号	0 0 1 0 7 0 2 8. 3		
(32)優先日	平成12年3月31日(2000. 3. 31)		
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (E P)		
(31)優先権主張番号	0 0 1 1 0 1 1 0. 4		
(32)優先日	平成12年5月10日(2000. 5. 10)		
(33)優先権主張国	欧州特許庁 (E P)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	カルマン, ゲーアハルト ドイツ連邦共和国 81371 ミュンヘン, アルラムシュトラッセ 28		
(72)発明者	ヘプナー, ペトラ ドイツ連邦共和国 82049 プラハ, シラ ーシュトラッセ 9		
(72)発明者	リンガイス, アヒム ドイツ連邦共和国 82166 グレーフェル フィング, ヴァッツマンシュトラッセ 2		
(72)発明者	ミュラー, ハイデマリエ ドイツ連邦共和国 81475 ミュンヘン, イエーガーフーバーシュトラッセ 9		
(72)発明者	ハインドル, エヴァ ドイツ連邦共和国 82349 ペンテンリー ト, レーシュタイク 3		

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA13 BA50 GA03 HA04
HA15
4B064 AG27 CC24 DA15
4H045 AA11 AA30 AA40 BA10 CA42
DA76 EA34

专利名称(译)	改进粪便中耐酸微生物的检测方法		
公开(公告)号	JP2003511698A	公开(公告)日	2003-03-25
申请号	JP2001530573	申请日	2000-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	刀豆下GESELLSCHAFT UND加斯托夫苏乐观米尔包装冯文件夹格哈德包装UND进入维克Rungu EM为主硬		
申请(专利权)人(译)	Kon'nekusu-GESELLSCHAFT UND加斯托夫苏乐观米尔ING冯Forushungu UND入门维克Rungu , Emubeha		
[标]发明人	ライタークリスティアン カルマンゲーアハルト ヘプナーペトラ リンガイスアヒム ミューラーハイデマリエ ハインドルエヴァ		
发明人	ライター,クリスティアン カルマン,ゲーアハルト ヘプナー,ペトラ リンガイス,アヒム ミューラー,ハイデマリエ ハインドル,エヴァ		
IPC分类号	C07K14/195 C07K14/205 C07K14/35 C07K16/12 C07K16/40 C12N15/09 C12P21/08 G01N33/497 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/553 G01N33/558 G01N33/569 G01N33/573 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/121 C07K16/40 C07K2317/565 G01N33/558 G01N33/56911 G01N33/56922 G01N33/5695 G01N33/573 G01N2333/908 G01N2333/96486 G01N2333/98 Y10S435/975		
FI分类号	G01N33/569.B C07K16/12 G01N33/497.A G01N33/50.F G01N33/50.Z G01N33/543.521 G01N33/545.A G01N33/553 G01N33/573.A G01N33/577.B C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/BA50 4B024/GA03 4B024/HA04 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CC24 4B064/DA15 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/BA10 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA34		
优先权	1999120351 1999-10-12 EP 2000105592 2000-03-16 EP 2000107028 2000-03-31 EP 2000110110 2000-05-10 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是用于检测哺乳动物对耐酸性微生物的感染的方法，其中 (a) 哺乳动物的粪便样品， (aa) 一种类型的受体，和源自耐酸性微生物的抗原。在允许与受体形成复合物的条件下孵育，或 (b) 两种不同类型的受体，抗酸微生物的抗原和两种类型的受体的复合物在允许形成的条件下进行孵育，并且其中 (aa) 受体基团或 (ab) 受体基团特异性结合抗原，该抗原是至少一些哺乳动物。在动物中，是一种天然结构，或一种结构，在该结构中，哺乳动物在被抗酸微生物或抗酸微生物的提取物或裂解物感染或免疫后，会产生抗体，或由此衍生的蛋白质或蛋白质片段或合成肽结构，以产生一个时，相应的结构在穿过肠后示出;和 (b) 的 (a) 根据至少一种抗原 - 并检测复合物的受体的形成，它涉及上述方法。优选地，所述耐酸微生物是细菌，特别是幽门螺杆菌，肝杆菌，空肠弯曲杆菌或结核分枝杆菌。此外，所述受体优选与过氧化氢酶的表位结合。此外，本发明涉及包含所述组分的诊断和药物组合物和测试装置，以及包含所述组分的包装。

mab	$k_{on} [M^{-1} s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$
HP25.2m/2H10	1.44E+05	3.90E-05	2.71E-10
HP25.6m/1G4	1.41E+05	2.52E-05	1.79E-10
HP25.6m/1B5	5.67E+04	3.86E-05	6.81E-10
HP25.6m/4E3	4.92E+04	5.96E-05	1.21E-09
HP25.6m/1A5	3.91E+04	4.77E-05	1.22E-09
HP25.6m/1H4	7.12E+04	4.12E-05	5.79E-10

$$K_D = k_{off} : k_{on}$$