

(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 - 511697

(P2003 - 511697A)

(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 2 G 0 4 5
C 0 7 K 14/195		C 0 7 K 14/195	4 B 0 6 4
14/205		14/205	4 H 0 4 5
14/35		14/35	
16/12		16/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 (全106数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 530572(P2001 - 530572)

(86)(22)出願日 平成12年10月12日(2000.10.12)

(85)翻訳文提出日 平成14年4月12日(2002.4.12)

(86)国際出願番号 PCT/EP00/10057

(87)国際公開番号 W001/027612

(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)

(71)出願人 コンネクス・ゲゼルシャフト・ツーア・オブティミエリング・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

(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ッセ 8

(74)代理人 弁理士 社本 一夫 (外 5 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 便中の酸耐性微生物を検出するためのイムノクロマトグラフィー迅速試験

(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、以下の工程：(a) 抗原を含む哺乳動物の便試料を適用するための試料適用領域を持つイムノクロマトグラフィー迅速試験の提供および便試料の適用、(b) (i) 酸耐性微生物由来の抗原と受容体との複合体形成を可能にする条件下で、第一の受容体を用いた；または(i i) 酸耐性微生物由来の抗原と少なくとも2つの第一の受容体群との複合体形成を可能にする条件下で、少なくとも2つの異なる第一の受容体群を用いた、便試料のインキュベーション、ここで(i) 記載の第一の受容体または(i i) 記載の第一の受容体群が、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、；および(c) 解析領域に固定された第二の受容体の提供、ここで第二の受容体は、(b) 記載の抗原受容体複合体に結合する、および(d) 解析領域の第二の受容体に抗原受容体複合体を集積させることによる、(b) 記載

【特許請求の範囲】

【請求項1】 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、以下の工程：

(a) 抗原を含む哺乳動物の便試料を適用するための試料適用領域を持つイムノクロマトグラフィー迅速試験の提供および便試料の適用、

(b) (i) 酸耐性微生物由来の抗原と受容体との複合体形成を可能にする条件下で、第一の受容体を用いた；または(ii) 酸耐性微生物由来の抗原と2つの第一の受容体群との複合体形成を可能にする条件下で、少なくとも2つの異なる第一の受容体群を用いた、便試料のインキュベーション、ここで(i)記載の第一の受容体または(ii)記載の第一の受容体群が、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、；および

(c) 解析領域に固定された第二の受容体の提供、ここで第二の受容体は、(b)記載の抗原受容体複合体に結合する、および

(d) 解析領域の第二の受容体に抗原受容体複合体を集積させることによる、(b)記載の少なくとも1つの抗原受容体複合体の輸送および形成の検出を含む、前記方法。

【請求項2】 酸耐性微生物での哺乳動物の感染の検出のためのイムノクロマトグラフィー試験であって、請求項1記載の方法を実行するのに特に適しているかまたはそのために設計されており：

(a) 抗原を含む哺乳動物由来の便試料の適用のための試料適用領域(1、2)、

(b) (i) 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の第一の受容体(5)を用いた；または(ii) 酸耐性微生物由来の抗原と2つの第一の受容体群との複合体形成を可能にする条件下での、少なくとも2つの異なる第一の受容体群を用いた、便のインキュベーションのための装置、ここ

で (i) 記載の第一の受容体または (i i) 記載の第一の受容体群が、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、

(c) 解析領域に固定された第二の受容体 (6)、ここで第二の受容体 (6) は、(b) 記載の抗原受容体複合体に結合する、および

(d) 解析物受容体複合体の集積のため、固定された第二の受容体 (6) を含む解析領域に、(b) 記載の抗原受容体複合体を輸送する、輸送装置 (3) を有する、前記試験。

【請求項 3】 便試料が適用前に懸濁されている、請求項 1 または 2 記載の方法または試験。

【請求項 4】 試験ストリップがセルロースまたはセルロース誘導体で出来た解析領域を備え、そしてキャリアー材料が、キャリアー材料中の毛管力を介して行われる輸送に適している、上述の請求項のいずれか 1 つに記載の方法または試験。

【請求項 5】 試料適用領域が、コンジュゲート・フリース (1) および輸送方向にそれに続く、便または便懸濁物の固体物質部分を本質的にろ過するのに適しているフィルター (2) を有する、上述の請求項のいずれか 1 つに記載の方法または試験。

【請求項 6】 フィルター (2) が 1 ないし 2 μm の排除サイズを示す、請求項 5 記載の方法または試験。

【請求項 7】 フィルターが、ガラス繊維および / またはポリエステルガラス繊維混合物で製造されている、請求項 5 または 6 記載の方法または試験。

【請求項 8】 試験ストリップがポリエステルキャリアー上に固定されている、請求項 4 ないし 6 のいずれか 1 つに記載の方法または試験。

【請求項 9】 抗体または抗体コンジュゲートが、第一および / または第二の受容体 (群) として提供されている、上述の請求項のいずれか 1 つに記載の

方法または試験。

【請求項10】 単数または複数の第一の受容体(群)(5)が、懸濁に可溶性であり、試験ストリップ上に固定されており、そして/または試験ストリップ上に乾燥されており、そして/または単数または複数の第二の受容体(群)(6)が、懸濁に不溶性であり、試験ストリップ上に固定されており、そして/または試験ストリップ上に乾燥されている、請求項4ないし9のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項11】 (i)の場合、第一の受容体(5)が、または(ii)の場合、第一の受容体群の1つが、可視または有色粒子、特定の直接標識、例えば金の使用に関しては、典型的にはその大きさが5 nmないし100 nm、好ましくは40 nmないし60 nm、特に好ましくは40 nmないし60 nm、またはラテックスの使用に関しては、200 nmないし500 nmの範囲のコロイド状金またはポリスチレン(ラテックス)で標識されている、あるいは、(i)の場合、第一の受容体に特異的に結合する、または(ii)の場合、第一の受容体群の1つに特異的に結合する、さらなる受容体によって標識されており、さらなる受容体が、可視または有色粒子、特定の直接標識、例えば金の使用に関しては、典型的にはその大きさが5 nmないし100 nm、好ましくは40 nmないし60 nm、特に好ましくは40 nmないし60 nm、またはラテックスの使用に関しては、200 nmないし500 nmの範囲のコロイド状金またはポリスチレン(ラテックス)で標識されている、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項12】 (ii)の場合、可視または有色粒子で標識されていない、第一の受容体の少なくとも1つが、ビオチンとコンジュゲート化され、そして単数または複数の第一のビオチン化受容体(群)が、ストレプトアビジンによって、試験ラインで固定されるように、第二の受容体(6)がストレプトアビジンであり、そして好ましくはポリストレプトアビジンである、請求項11記載の方法または試験。

【請求項13】 好ましくは対照ラインとしての、対照部分が、試験部分の後の輸送方向で形成される、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または

試験。

【請求項14】 試験ストリップが、本質的に、輸送方向の末端に、吸収領域(4)を示す、請求項4ないし13のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項15】 試験ストリップが、3ないし10mm、好ましくはおおよそ5mmの幅、および50ないし100mm、好ましくは75mmの長さを有する、請求項4ないし14のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項16】 コンジュゲート・フリース(1)の長さが、5ないし30mm、好ましくはおおよそ25mmであり、流方向のコンジュゲート・フリース(1)およびフィルターの重複が、5ないし15mm、好ましくはおおよそ10mmであり；2つのコンジュゲート・フリースを用いた場合、第一のコンジュゲート・フリースの長さが、好ましくは25mmであり、流方向の第一および第二のコンジュゲート・フリースの重複が、好ましくは12.5mmであり、第二のコンジュゲート・フリースの長さが、好ましくはおおよそ12.5mmであり、流方向の第二のコンジュゲート・フリースおよびフィルター(2)の重複が、好ましくは10mmであり、試験または解析領域の長さが、10ないし30mm、好ましくはおおよそ20mmであり、幅がおおよそ5mmであり、そして流方向の試験または解析領域および吸収領域の重複が、好ましくはおおよそ1mmである、請求項4ないし15のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項17】 微生物が酸耐性細菌、好ましくは、ヘリコバクター(*Helicobacter*)、カンピロバクター(*Campylobacter*)またはミコバクテリウム(*Mycobacterium*)属の細菌、そして特に好ましくは、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*)種の細菌であり、抗原が好ましくは、カタラーゼ、ウレアーゼまたはメタロプロテイナーゼであって、好ましくはH.ピロリのものである、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項18】 単数または複数の受容体/受容体群が、抗体(群)、その断片(群)もしくは誘導体(群)またはアプタマー(群)であるか、あるいはさらに好ましくはマウス抗体またはその断片もしくは誘導体、あるいはキメラ、好ましくはヒト化抗体、またはその断片もしくは誘導体、あるいは結合パートナー、好ましくはアビジン、ストレプトアビジン、ポリストレプトアビジンおよびビオチンである、先の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項19】 受容体の混合物が検出に用いられ、受容体が抗原の検出因子として用いられる場合、受容体の混合物が抗原の捕捉因子の機能を有し、そして/または受容体が抗原の捕捉因子として用いられる場合、混合物が抗原の検出因子の機能を有し、そして受容体の混合物が、好ましくはポリクローナル抗血清である、請求項17または18記載の方法または試験。

【請求項20】 受容体の混合物が、検出のために用いられ、受容体の1つの混合物が抗原の捕捉因子の機能を有し、そして別の混合物が抗原の検出因子の機能を有し、そして好ましくは、少なくとも1つの混合物がポリクローナル血清である、請求項17ないし19のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項21】 受容体の混合物が、抗原の捕捉因子および検出因子両方の機能を有し、そして好ましくは、該混合物がポリクローナル血清である、請求項17ないし19のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項22】 ポリクローナル抗血清が、微生物の溶解物に対して産生され、そして好ましくは、溶解物が富化された抗原を含む溶解物であり、そしてさらに好ましくは、溶解物が、免疫ドミナント抗原が枯渇した溶解物であるか、またはポリクローナル抗血清が、精製または(半)合成産生抗原に対して産生され、そして好ましくは、抗原がカタラーゼ、ウレアーゼまたはメタロプロテイナーゼの抗原である、請求項19記載の方法または試験。

【請求項23】 抗原の捕捉因子として作用する、単数または複数の受容体(群)(a)および/または抗原の検出因子として作用する、単数またはまたは複数の受容体(群)(b)の代わりに、各々

(a)の場合、抗原に特異的に結合する少なくとも1つの非標識抗体、および少なくとも1つの非標識抗体に特異的に結合する1つの標識抗体からなる、

(b)の場合、抗原に特異的に結合する少なくとも1つの非固定抗体、およびこの少なくとも1つの非固定抗体に特異的に結合する、試験ラインに固定された1つの抗体からなる

免疫複合体を用いる、請求項17ないし22のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項24】 受容体および/または受容体群の混合物が、コンホメーション・エピトープに結合する、請求項19または23記載の方法または試験。

【請求項25】 カタラーゼ・エピトープに結合する抗体の重鎖が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1： NYWIH

CDR2： YINPATGSTSYNQDFQD

CDR3： EGYDGFDS

を示し、そして抗体の重鎖をコードするDNA配列が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1： AACTACTGGA TTCAC

CDR2： TACATTAATC CTGCCACTGG TTCCACTT
CT TACAATCAGG ACTTTCAGGA C

CDR3： GAGGGGTACG ACGGGTTTGA CTCC

を示し、そしてより好ましくは、カタラーゼ・エピトープに結合する抗体の軽鎖が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1： SASSSVNYMY

CDR2： DTSKLAS

CDR3： QQWSSNPYT

を示し、そしてより好ましくは、抗体の軽鎖をコードするDNA配列が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1 : AGTGCCAGCT CAAGTGTA AA TTACATGT
AC

CDR2 : GACACATCCA AATTGGCTTC T

CDR3 : CAGCAGTGGA GTAGTAATCC GTACACG

を示す、請求項18ないし24のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項26】 カタラーゼ・エピトープに結合する抗体の重鎖が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1 : DTYVH

CDR2 : KIDPANGKTKYDPIFQA

CDR3 : PIYYASSWFAY

を示し、そして抗体の重鎖をコードするDNA配列が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1 : GACACCTATGTGCAC

CDR2 : AAGATTGATCCTGCGAATGGTAAACTAA
TATGACCC GATATTCCAGGCC

CDR3 : CCCATTTATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCT
TAC

を示し、そしてより好ましくは、カタラーゼ・エピトープに結合する抗体の軽鎖が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1 : KASQDVGTSVA

CDR2 : WTSTRHT

CDR3 : QQYSSSPT

を示し、そしてより好ましくは、抗体の軽鎖をコードするDNA配列が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1 : AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTTCTGTT

GCC

CDR2 : TGGACATCCACCCGGCACACT

CDR3 : CAGCAATATAGCAGCTCTCCCACG

を示す、請求項18ないし24のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項27】 - ウレアーゼのエピトープに結合する抗体の重鎖が、
少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3 :

CDR1 : GFTFSSHFM S

CDR2 : SISSGGDSFY PDSLKG

CDR3 : DYSWYALDY

または :

CDR1 : GYAFSTSWMN

CDR2 : RIYPGDGDTNYNGKFKG

CDR3 : EDAYYSNPYSLDY

を示す、請求項18ないし24のいずれか1つに記載の方法。

【請求項28】 重鎖をコードする抗体のDNA配列が、少なくとも1つ
の以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つ
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 ATTCACTTTC AGTAGCCATT TCATG
TCT

CDR2 : TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCT
AT CCAGACAGTC TGAAGGGC

CDR3 : GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA C

を示す、請求項27記載の方法。

【請求項29】 - ウレアーゼのエピトープに結合する抗体の軽鎖が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1： RASQSIGTRIH

CDR2： YGSEESIS

CDR3： QQSNTWPLT

または：

CDR1： HASQNINVLWS

CDR2： KASNLHT

CDR3： QQGRSYPLT

を示す、請求項18ないし24のいずれか1つに記載の方法。

【請求項30】 軽鎖をコードする抗体のDNA配列が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

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 GCTTCCA ACT TGCACACA

CDR3： CAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC G

を示す、請求項29記載の方法。

【請求項31】 軽鎖および重鎖の可変領域の抗体が、図1および2または3および4および/または5および6または7および8に例示されるアミノ酸配列を示す、請求項18ないし30のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項32】 軽鎖および重鎖の可変領域のコード領域が、図1および

2または3および4および/または5および6または7および8に例示されるDNA配列を示す、請求項18ないし31のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項33】 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：試料緩衝液中の、便試料の1：3ないし1：25、好ましくは1：5、特に好ましくはおよそ1：15の再懸濁が行われる、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項34】 エピトープの検出に用いられるのと同じ受容体が、固相への結合に用いられる、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項35】 受容体がモノクローナルマウス抗体である、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項36】 哺乳動物がヒトである、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項37】 便試料の代わりに、検出のために、呼気濃縮物、胃ガス、歯垢、唾液、粘膜スミア、生検、全血または血清を用いる、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項38】 自動化法である、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項39】 請求項25ないし32に定義されるCDRの少なくとも1つの適切な組み合わせを含む、V領域を示す、モノクローナル抗体、その断片または誘導体。

【請求項40】 図1および2または3および4および/または5および6または7および8に例示されるV領域の少なくとも1つを示す、請求項39記載のモノクローナル抗体、その断片または誘導体。

【請求項41】 マウス抗体またはその断片もしくは誘導体、あるいはキメラ、好ましくはヒト化抗体またはその断片もしくは誘導体である、請求項39または40記載のモノクローナル抗体、その断片または誘導体。

【請求項42】 請求項39ないし41のいずれか1つに記載のモノクロ

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。

【請求項43】 請求項39ないし41のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体、その断片または誘導体あるいは請求項42記載のアプタマーに特異的に結合される、エピトープ。

【請求項44】 請求項43記載のエピトープに特異的に結合する、抗体、その断片または誘導体。

【請求項45】 請求項2ないし44のいずれか1つに記載の、少なくとも1つの試験を含む、キット。

【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、イムノクロマトグラフィー迅速試験、特に、酸耐性微生物での哺乳動物の感染を検出するための試験ストリップであって、(a)哺乳動物の便試料を、(aa)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(ab)酸耐性微生物の解析物または抗原と少なくとも2つの受容体群の複合体形成を可能にする条件下で、少なくとも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、腸通過後に示す解析物又は抗原に、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 - または解析物 - 受容体複合体の形成を検出する、前記試験に関する。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、ウレアーゼまたはメタロプロテイナ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の方法がある。すべての侵襲性的の方法は、内視鏡検査および生検を前提とする。これらの技術を用いる場合、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。すべての侵襲性的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治療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的の診断法は、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】

検出されたパラメーターによって、診断法は、直接および間接法に分けられる。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。

【0006】

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。

【0007】

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。

【0008】

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（foreign）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ELISA = 酵素連結免疫吸着アッセイ）の可能性であった。

【0009】

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（Kohler & Milstein（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。

【0010】

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 (1994), *FEMS Microbiol. Lett.* 120: 143 - 148)、トロウイルス (*Torovirus*) 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。

【0011】

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。

【0012】

しかし、一方、胃腸管に対する罹患組織（例えば肺、胃、膵臓、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. pylori*）およびヘリコバクター・ヘパティス（*Helicobacter hepaticus*）、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。

【0013】

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。

【0014】

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またはイムノクロマトグラフィー迅速試験に必要な、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、このエピトープがモノマーである場合、前記分子上に2倍存在しなければならない。二量体の場合、エピトープが各サブユニット上に1回存在すれば十分であろう。さらに、個々に異なる可能性がある、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。

【0015】

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。

【0016】

EP 201 194は、湿った条件中で可動性の、解析物に特異的に結合する試薬を含む有孔キャリアー、および同一解析物に特異的に結合する、固定化未標識試薬を含む解析試験装置を記載する。

【0017】

したがって、本発明の根底にある技術的問題は、対応する単純でそして費用効率のよい試験を提供することである。

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。

【0018】

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、(aa)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(ab)酸耐性微生物の解析物または抗原と少なくとも2つの受容体群の複合体形成を可能にする条件下で、少なくとも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。

【0019】

本発明はさらに、上述の感染の1つの検出に適した試験ストリップなどのイムノクロマトグラフィー迅速試験を提供する目的に基づく。

便迅速試験は、好ましくは所望によって異なる有孔材料からなる、いくつかの層または領域を含む。試験ストリップは、試料適用領域、試験キャリアーそれ自体（試験または解析領域）、および吸収因子層（吸収領域）を有する。好ましい態様において、いくつかの層または領域は、ポリエステル・キャリアー上に固定されている。好ましい態様において、検出に必要な特異的免疫学的受容体、または、より好ましくは、抗原に対する特異的抗体が、試料適用領域に、乾燥条件下で存在する。好ましくは、これらは、可視有色粒子、例えばコロイド状金またはポリスチレン（ラテックス）などで標識されている。

【0020】

より好ましくは、試験キャリアーは、特定の試験膜、例えばニトロセルロースからなる。この試験膜上に、特に好ましくは、該抗原に対して向けられる、さらなる特異的受容体を、試験ラインとして固定する。機能の対照として、さらなる捕捉ライン、例えば標識受容体または抗体に対して向けられる受容体を固定してもよい。試験ストリップの末端での吸収因子層は、好適には、接触する有孔材料

の毛管効果に基づく試料流が維持されるようにする。

【0021】

本発明にしたがったサンドイッチイムノアッセイの方法において、1つの態様において、解析物および/または抗原に特異的な第一の標識受容体、例えば標識抗体(抗体コンジュゲート)を、試料適用領域に沈着させ、又は乾燥させる。試験ラインとして、解析物および/または抗原に特異的な第二の受容体を固定する。試験中、第一の特異的受容体、例えば抗体コンジュゲートを分離し、そして試験膜を介して輸送する。特異的解析物または抗原が試料に存在する場合、第一の標識受容体または抗体コンジュゲートおよび抗原または解析物の複合体が、試験中に形成される。この複合体は、捕捉ラインで、第二の特異的受容体に結合し、そしていわゆるサンドイッチ複合体を形成する。試験ラインでの標識受容体または抗体コンジュゲートの集積が生じることによって、可視試験シグナルが生成される。試料中に解析物または抗原がまったく存在しなければ、サンドイッチ複合体はまったく形成されず、そしてシグナルはまったく誘発されない。

【0022】

サンドイッチ法の好ましい態様において、特異的受容体の代わりに、ストレプトアビジンが試験ラインで固定される。単純なサンドイッチ法において、抗原に対する捕捉抗体として用いた特異的受容体を、ビオチンにコンジュゲート化し、そして標識された特異的受容体と共に、試験ストリップの試料適用領域に置く。特に好ましい態様において、標識は、コロイド状金である。標識受容体、抗原およびビオチン標識受容体からなる試験中、試料適用領域および試験膜を通過する間にサンドイッチ複合体が形成され、そしてその部位に固定されたストレプトアビジンによって、ビオチン標識特異的受容体を介して、試験ラインに結合される。

【0023】

別の好ましい態様において、金標識特異的受容体は、試験ストリップの試料適用領域の第一のコンジュゲート領域に位置し、そしてビオチン標識特異的受容体は、試料適用領域の第二のコンジュゲート領域に置かれる。

【0024】

別の好ましい態様において、標識された第一の特異的受容体の代わりに、標識されていない第一の特異的受容体、例えば抗体を用いてもよい。その後、前記の第一の特異的受容体に特異的に結合する別の標識受容体と共に、試験ラインとして固定されている第二の特異的受容体に結合しない他の標識受容体によって、前記の第一の特異的受容体を検出する。

【0025】

さらに好ましい態様において、試験ラインで固定されている第二の特異的受容体の代わりに、固定されていない第二の特異的受容体、例えば抗体を用いてもよい。その後、解析物 - 受容体複合体が、試験ラインで固定された受容体であって、そして前記の固定されていない第二の特異的受容体と結合する該受容体に、第一の標識された特異的受容体と結合しない他の固定受容体と共に、結合される。

【0026】

別の特に好ましい態様において、第二の非固定特異的受容体が、試験ラインで固定された受容体に結合される。

抗体を用いる場合、これは、例えば、第一および第二の特異的抗体が、異なる種に由来するという事実によって、達成してもよい。

【0027】

第一の特異的非標識受容体は、例えばマウス抗体であってもよく、一方、第二の特異的受容体はウサギ抗体であり、そして他の標識受容体は、抗マウス抗体である。

【0028】

特に好ましい態様において、特異的非標識受容体は、試験ストリップの試料適用領域の第一のコンジュゲート領域に位置し、そして特異的非標識受容体に結合する標識受容体は、試験ストリップの試料適用領域の第二のコンジュゲート領域に位置する。

【0029】

別の特に好ましい態様において、第一のコンジュゲート領域は、第二のコンジュゲート領域前のまたは該領域上の流方向に位置する。

イムノクロマトグラフィー迅速試験は、本発明を実施するのに特に適している

。前記試験は、いくつかの有孔材料からなる試験ストリップに、好ましくは乾燥状態で含まれる、解析に必要なすべての特異的試薬を含む乾燥試薬試験である。こうした試験は、解析が液体試料を添加することによって開始し、そして試料液体が毛管力により、いくつかの有孔材料からなる試験ストリップを通じて移動するという原理に基づく。試料液体の移動中、特異的結合試薬が溶解され、そして試料に含まれる解析物および特異的結合試薬の間の複合体形成が行われる。解析物および特異的結合試薬からなる複合体は、好ましくは試験部位に固定された特異的結合試薬による、試験ラインの型を有する、明示ゾーンで捕捉される。捕捉された複合体はその後、結合試薬とカップリングした可視粒子、例えば染色ポリスチレン（ラテックス）、コロイド状金などの凝集により、可視化される。その結果、本発明の試験はまた、当該技術分野で熟練していない個人によって行うことも可能である。さらに、本発明の試験は、単純でそして衛生的な使用の可能性を提供する。該試験を行う場合、特に好ましい態様において、1つの工程、すなわち試料の適用のみが必要とされる。視覚的に解析可能な結果は、非常に迅速に、すなわち数分（2 - 30分）以内に得られる。

【0030】

別の好ましい態様において、本発明のイムノクロマトグラフィー迅速試験は、WO98/58587に記載される試験装置で用いられる。この組み合わせにより、迅速でそして単純な方式で、試料が吸収され、調製され、そして解析されることが可能になる。

【0031】

さらに、本発明にしたがった迅速試験は、現在まで存在していた不都合な点、すなわち、便試料を解析する際、緩衝液中に溶解された試料が、試験ストリップの細かい有孔材料を通じた試料の流れを妨げるかまたは複雑にする、多数の固体物質を有することを回避する。

【0032】

さらに、当該技術分野における不都合な点、すなわち便試料をかなりな度合いに希釈しなければならないという事実を、回避することが可能である。さらに、本発明の方法を実行する際、1：5および1：20の範囲で希釈された便試料は

、試験前に遠心分離し、そしてより大きい固体物質を除く必要がない。さらに、本発明は、実験室独立に用いることが可能な高感度試験を可能にする。

【0033】

抗原（解析物）への捕捉抗体（第二の受容体）の結合のための有意に延長されたインキュベーション時間、および抗体／抗原結合に比較したストレプトアビジン／ビオチン結合のより高い親和性の両方、およびしたがって試験ラインでの改善された結合動力学は、特に、好ましいビオチン化受容体を、試験ラインから適用領域に移動させることにより、達成することが可能であるが、試験ストリップは - その次元に関し - ほぼ変化しないままであってもよい。

【0034】

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。

【0035】

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、RIDASCREEN（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。

【0036】

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。

【0037】

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。

【0038】

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、本発明にしたがい、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 Harlo

w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。

【0039】

「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。

【0040】

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。

【0041】

用語「免疫複合体」は、本明細書において、モノクローナルおよび/またはポリクローナル抗体を含む複合体を含む。

したがって、本発明の本態様において、調製された便試料は、例えば、捕捉受容体を介して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。

【0042】

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、ホモ二量体またはマルチ二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。

【0043】

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。

【0044】

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。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 -ウレアーゼ、26 kDa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。

【0045】

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るため、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, Serodia

g. 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。

【0046】

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または迅速試験において、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は、好ましくは検出に用いられ、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、迅速試験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。

【0047】

カタラーゼの異なるエピトープに対して向けられる、異なるモノクローナル抗体を組み合わせることによって、または異なる抗原（例えばカタラーゼ/ウレアーゼ）の2つの検出系を組み合わせることによって、感度および特異性の増加を、好ましくは達成す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。

【0048】

本発明の好ましい態様は、図によって以下に例示的に記載される。

図1：カタラーゼに特異的なモノクローナル抗体（HP25.2m/2H10）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。

【0049】

図2：カタラーゼに特異的なモノクローナル抗体（HP25.2m/2H10）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。

図3：カタラーゼに特異的なモノクローナル抗体（HP25.6m/1B5）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。

【0050】

図4：カタラーゼに特異的なモノクローナル抗体（HP25.6m/1B5）の軽鎖をコードするクローニングされたDNA配列。

図5： -ウレアーゼに特異的なモノクローナル抗体の軽鎖のV領域をコードするクローニングされたDNA配列。

【0051】

図6： -ウレアーゼに特異的なモノクローナル抗体の重鎖のV領域をコードするクローニングされたDNA配列。

図7： -ウレアーゼに特異的なさらなるモノクローナル抗体の軽鎖のV領域をコードするクローニングされたDNA配列。

【0052】

図8： -ウレアーゼに特異的なさらなるモノクローナル抗体の重鎖のV領域をコードするクローニングされたDNA配列。

図9：本発明にしたがった好ましい試験ストリップの調製。

【0053】

図10：対照ラインを有する、本発明にしたがった好ましい試験ストリップの調製。

図10記載の本発明の迅速便試験は、試料適用領域（1、2）、試験領域（試験膜）（3）および吸収領域（4）からなる。

【0054】

好ましい態様において、試料適用領域（1）は、2つの重なるコンジュゲート領域からなる。上部コンジュゲート領域またはコンジュゲート・フリースは、好ましくは、例えば金で標識された特異的受容体を含む。下部コンジュゲート領域またはコンジュゲート・フリース（未提示）は、例えばビオチンで標識された特異的受容体を含む。

【0055】

試験中の試料の優れた流れおよび試料懸濁物中の免疫試薬の分布さえも、イムノクロマトグラフィー迅速試験の感度に関し、非常に重要である。両パラメーターは、用いられる有孔成分の特性と共に、測定および互いに関する設定によって

、主に影響を受ける。

【0056】

さらに、便試料を解析するための迅速試験は、試験膜を通過させる前に、試料溶液に含まれる固体物質をろ過することが必要である。

試験の試料適用領域は、コンジュゲート・フリース(1)と、続くフィルター(2)からなる。試料が試験膜上を流れることを妨げるであろう、便懸濁物の固体物質を分離する。高感度を達成することが可能である試験膜は、2ないし20 μm の範囲の孔サイズの分布を有し、好ましくは、サイズは5 μm である。フィルターは、1 - 2 μm の分離サイズを有する。ガラス繊維またはポリエステルガラス繊維混合物で出来ている材料が特に適している。血液分離のために開発された天然および合成繊維の混合物もまた、用いてもよい。

【0057】

例えば、以下のフィルターが適切である： Whatman GF/A、GF/B、GF/C、GF/D、F145、F147、F487、GF/DVA； Ahlstrom 111、141、142、151、164； Pall A/B、A/C、A/D、A/E、A/F。コンジュゲート・フリースに関しては、Whatman F075-14； Schleicher and Schuell GF10、GF53、Accuflo P、Accuflo G、Ahlstrom 8980、2033、2040、8975； Millipore QR01、QR35、QR51； QR61などのガラス繊維、ポリエステルまたはポリプロピレンの開孔材料が適している。

【0058】

コンジュゲート - キャリアー層としての機能は別にして、この設定中のコンジュゲート・フリースは、フィルターに到達する前に、懸濁便試料の粗い固体物質を保持する予備フィルターの機能を有する。この設定において、試料液体および溶解コンジュゲート流が、共に、続くフィルターを通じて流れ、そしてしたがって解析物または抗原およびコンジュゲートのインキュベーション時間が延長されることもまた、好適である。

【0059】

コンジュゲート・フリース、フィルターおよび試験膜の寸法と共に試料適用領域の材料間の変化は、便懸濁物の十分なる過が達成されるような方式で設定される。

【0060】

試料を適用する間、試料液体は、コンジュゲート・フリースにのみ接触し、フィルターと接触しないようにされる。

本発明の設定は、十分に広いフィルター領域が、コンジュゲート・フリースを通じて流れる試料液体と接触することが可能であることを保証する。さらに、本発明の設定は、コンジュゲート・フリースおよび試験膜間の距離を最小にすることを可能にし、十分にろ過されていない試料液体が、試験膜を通過しないことを確実にする。

【0061】

個々の領域または材料の寸法は、以下の値に相当する：

試験ストリップの好ましい幅は、3 mmおよび10 mmの間、好ましくは5 mmである。試験ストリップの好ましい長さは、50ないし100 mmであり、75 mmの長さが特に好ましい。コンジュゲート・フリースの好ましい長さは、5ないし30 mmの間であり、25 mmの長さが特に好ましい。コンジュゲート・フリースおよびフィルターの重複は、5および15 mmの間であることが好ましく、10 mmの重複が特に好ましい。10および20 mmの間のフィルターが好ましく、15 mmのフィルターが特に好ましい。フィルターおよび試験膜の間の重複は、1ないし3 mmの範囲であることが好ましく、1 mmの重複が好ましい。

【0062】

本発明にしたがい、試験ストリップの末端の吸収層(4)は、試験ストリップを通過した試験液体を吸収するのに十分な能力および毛管力を維持するための比較的細かい孔を有する構造両方を有する。Whatman 17 CHR、3 MM、31 ET、WF1-5、D28、CD 427-05、CD 427-07、CD 427-08； Schleicher and Schuell 2992、GB 003、GB 004； Pall 111、11、133

、165、197、Ahlistrom 320、222、238、237などのセルロースガラス繊維材料は、特に適切であることが立証された。5 mmの幅を有する試験ストリップでは、解析領域の10 - 30 mmの寸法が特に好ましい。吸収層上の試験膜の重複は、好ましくは、少なくとも1 mmである。

【0063】

本発明の迅速試験は、WO 98/58587 (PCT/EP98/03764) に記載されるような、試料を採取しそして解析するための装置で用いられることが特に好ましい。この文書の主題は、本明細書に援用される。

【0064】

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。

【0065】

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・ヘパティウム、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。

【0066】

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。

しかし、用語「受容体」は、本明細書において、アビジン、ストレプトアビジンまたはポリストレプトアビジンおよびビオチンなどの、さらなる結合パートナーを含む。

【0067】

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、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。

【0068】

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、その断片または誘導体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。

【0069】

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。

【0070】

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。

【0071】

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、1つの対応する受容体、好ましくはモノクローナル抗体、その断片または誘導體、あるいはアプタマー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という結果が見出された。特に、カタラーゼは四量体抗原性構造を持つため、この診断法は、例えば、ELISA、イムノクロマトグラフィー迅速試験に、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。

【0072】

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であり、H.ピロリのメタロプロテイナーゼが特に好ましい。

【0073】

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。検出のため、単数または複数の、

受容体の異なる混合物（群）および同一の混合物（群）両方を抗原の捕捉因子および検出因子として用いてもよい：同一混合物を、抗原の捕捉因子および検出因子両方として用いる場合、捕捉因子は、好ましくは標識され、そして検出因子は、試験ラインに固定される。

【0074】

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。

【0075】

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。

別の特に好ましい態様において、受容体の混合物は、受容体の1つの混合物が抗原の捕捉因子として働き、そして受容体の1つの混合物が抗原の検出因子として働き、そして好ましくは、少なくとも1つの混合物がポリクローナル血清である検出に用いられる。

【0076】

別の特に好ましい態様において、受容体の混合物は、抗原の捕捉因子および検出因子両方として働き、混合物は、好ましく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、ポリクローナル抗血清は、微生物、好ましくはH.ピロリの溶解物に対して得られた。

【0077】

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。

【0078】

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

アーゼが枯濁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濁法を行う方法は、実施例により詳細に記載される。

【0079】

別の特に好ましい態様において、好ましくはH₂ピロリ由来の、好ましくはカタラーゼ、メタロプロテアーゼまたはウレアーゼ酵素である、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。

【0080】

本発明にしたがい、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。

【0081】

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： NYWIH

CDR2： YINPATGSTSYNQDFQD

CDR3： EGYDGFDS

を有する。

【0082】

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。

【0083】

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 / 2H 10] 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。

【0084】

さらに、別の特に好ましい態様において、抗体 [HP 25 . 2m / 2H 10] 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 CAAGTGTA AA TTACATGT
AC
CDR2 : GACACATCCA AATTGGCTTC T
CDR3 : CAGCAGTGGA GTAGTAATCC GTACACG

を有する。

【0085】

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 / 1B 5] 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。

【0086】

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 [HP25.6m/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。

【0087】

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 [HP25.6m/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。

【0088】

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 [HP25.6m/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: CAGCAATATAGCAGCTCTCCACG

を有する。

【0089】

別の好ましい態様において、 - 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、 - 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。

【0090】

本発明の方法の別の特に好ましい態様において、 - 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： GFTFSSHFM S

CDR2： SISSGGDSFY PDSLKG

CDR3： DYSWYALDY

または：

CDR1： GYAFSTSWMN

CDR2： RIYPGDGDTNYNGKFKG

CDR3： EDAYYSNPYSLDY

を有する。

【0091】

別の特に好ましい態様において、 - 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 ATTCACTTTC AGTAGCCATT TCATG

TCT

CDR2: TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCT

AT CCAGACAGTC TGAAGGGC

CDR3: GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA C

を有する。

【0092】

本発明の方法の別の特に好ましい態様において、 - 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: YGSEESIS

CDR3: QQSNTWPLT

または:

CDR1: HASQNINVWLS

CDR2: KASNLHT

CDR3: QQGRSYPLT

を有する。

【0093】

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

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

または :

CDR1 : C A T G C C A G T C A G A A C A T T A A T G T T T G G
T T A A G C

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

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

を有する。

【0094】

さらに、前記CDRを有する重鎖および軽鎖が、好ましくはH₂L₁由来の、カタラーゼまたは -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。

【0095】

特に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1：15の比で、試料緩衝液に再懸濁する。こうした試料緩衝液は、当該技術分野に知られる。試料緩衝液の例は：150mM PBS、0.1% SDSである。

【0096】

好ましい態様において、試料緩衝液は、150mM PBS、0.5% 血清および2% 界面活性剤からなる。血清は、ウシ、マウス、ラット、ブタまたはヒトから得てもよいし、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）の群より選択しても

よい。

【0097】

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、粘膜スミア、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。歯垢および粘膜スミアは、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。

【0098】

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、イムノクロマトグラフィ法によって検出される。

【0099】

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。非修飾型の捕捉因子受容体を、固相、例えばニトロセルロースに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。

【0100】

別の好ましい態様において、捕捉因子受容体は、ビオチン化型で存在し、そして固相に固定されたストレプトアビジンによって、固相に結合してもよい。

一方、捕捉因子受容体は、ビオチンで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、第三のビオチン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、あるいは種特異的もしくはI gクラス特異的抗体または対応するアプタマーである。前記の第三のビオチン標識受容体は、捕捉因子受容体に特異的に結合し、そして解析物 - 受容体複合体は、第三のビオチン標識受容体を介して、本態様において、固定化ストレプトアビジンからなる試験ラインに結合される。

【0101】

コロイド状金、セレン、有色ポリスチレンまたはラテックス粒子、炭素粒子と共に分散色（当業者は当該技術分野から知る）を、検出に用いる受容体の標識として用いてもよい。

【0102】

一方、前に言及されたように、検出に用いる受容体はまた、標識されていなくてもよく、そしてしたがって、微生物のエピトープは、前記非標識受容体に対して向けられる第三の標識受容体を介して検出してもよく、前記受容体は、好ましくは、種特異的またはI gクラス特異的抗体あるいは対応するアプタマーであってもよい抗体、その断片または誘導体あるいはアプタマーである。

【0103】

特に好ましい態様において、標識はコロイド状金である。

こうした標識は、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なお四量体として存在するカタラーゼの検出に関して特に好適である。もちろん、この態様においても、抗体、断片、誘導体およびアプタマーの組み合わせ、例えば同一抗原の異なるエピトープに結合する抗体の組み合わせを用いてもよい。

【0104】

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。

【0105】

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

体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 - 支持体 / アプタマー - 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。

【0106】

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。

【0107】

便、胃ガス、呼気濃縮物、唾液、歯垢、粘膜スミア、生検、全血または血清を、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。

【0108】

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。

【0109】

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。

【0110】

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群、その断片群または誘導体群が好ましい。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に示されるDNA配列にコードされることが好ましい。

【0111】

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、金、セレン、ラテックス、有色ポリスチレン、当業者に知られる分散色の炭素粒子からなる標識で、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。

【0112】

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Vaughanら、1998；Orlandiら、1989、HarlowおよびLane、上記）。

【0113】

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。

【0114】

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。

【0115】

さらに、本発明は、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。

【0116】

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。

【0117】

先に言及されたように、本発明はさらに、WO 98/58587に記載されるような、便試料を調製し、そして解析するための装置に関する。前記装置は、試料の吸収および調製のためのユニットおよび試験ユニット(試験ストリップ)を1つの装置に含む。

【0118】

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、ポリスチレン(ラテックス)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)WO 98/58587に記載されるような、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。

【0119】

便試料を調製し、そして解析するための装置の代わりに、組成物およびキットはまた、胃ガス、呼気濃縮物、唾液、歯垢、粘膜スミア、生検、全血または血清を調製し(必要な場合)そして解析するための装置も有する可能性がある。

【0120】

さらに、本発明は、(a)好ましくは、上に定義され、そして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)例えばWO 98/58587に記載されるような、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。

【0121】

実施例は本発明を例示する。

【0122】

【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(Aerocult 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、1lビン(Schott)中の、上述のように抗生物質を添加した350ml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10lビンに入れ、そして4.7l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、5,000g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。

【0123】

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、10×60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2×20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。

【0124】

H. ピロリ・カタラーゼの調製

破壊緩衝液 (20 mM Tris HCl、pH 7.0、1 mM EDTA、1 mM 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。

【0125】

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Source Qカラム (16/10) (Pharmacia) 上に移した。Source Q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。

【0126】

カタラーゼを単離するため、Source Q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。

【0127】

より高い純度のカタラーゼは、Source Q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Source S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。

【0128】

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。

【0129】

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。

【0130】

実施例4：ポリクローナルおよびモノクローナル抗体(pAk;mAk)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。

【0131】

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。

【0132】

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。

【0133】

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。

【0134】

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、50µgの抗原を、フロイントの完全アジュバント（Difco）で乳化し、そして腹腔内注射した（200µl/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25µg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。

【0135】

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(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 2×10^4 細胞/プレートの細胞密度で、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℃、5% CO₂および95%相対湿度で培養した。

【0136】

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。

【0137】

ELISA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($100 \mu\text{l}$ /プレート、一晚、5℃)。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($200 \mu\text{l}$ /プレート、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($100 \mu\text{l}$ /プレート)、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)。プレートを4回洗浄し、そしてたたいた後、基質溶液(TMB + H₂O₂を含むK-Blue、Neogenまたはクエン酸緩衝液、pH 4.5)を添加した。ペルオキシダーゼは、無色基質テトラメチルベンジ

ジン (T M B、 S i g m a) を、有色複合体に変える。10分後、1 N 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。

【0138】

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 (C o l l e r & C o l l e r、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 (S i g m a) 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 % I g G 減少 F C S を含む R P M I 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。

【0139】

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 E L I S A 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。

【0140】

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 I s o S t r i p (R o c h e D i a g n o s t i c s) を用いて、樹立クローンで行った。結果は：8種類の I g G 1 クローンおよび1種類の I g G 2 a クローンであった (表2を参照されたい) 。

【0141】

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 (L a e m m l i、1970) 中で煮沸し、そして 12 % S D S 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、半乾燥プロット技術によって、ニトロセルロース上に固定した。

【0142】

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Accutrancrossプ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 µlのTBS/Tween 20および試験しようとする250 µl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。

【0143】

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-抗マウスIg-POD、DAKO)で、膜を1時間インキュベーションした。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。

【0144】

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つがウェスタンプ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。

【0145】

実施例6：患者試料中のmAk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を介した融合スクリーニングにおいて、陽性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EL

I S Aで培養上清として解析した。

【0146】

感染状態(群0および4)が組織学的解析および/または ^{13}C -尿素呼吸試験によって決定されている便試料を、内部発生試料として用いた。群0の患者では、H.ピロリの感染は、確実に排除することが可能であり、群4の患者では、感染は、確実に検出することが可能であった。

【0147】

E L I S Aプレート(M a x i S o r b ; N u n c)の被覆は、 $100\mu\text{l}$ 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(p A k ; およそ $20\mu\text{g}$ I g G / m l 0.1M 炭酸緩衝液、p H 9.5)を用いて、5で一晚、行った。なお未結合である結合部位の飽和のため、プレート当たり、0.2%の魚ゼラチン(w / v)を含む $200\mu\text{l}$ の 150mM P B S、p H 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% T w e e n - 20(洗浄緩衝液1)を添加しながら、 $250\mu\text{l}$ P B SでE L I S Aプレートを2回洗浄した。ヒト便は、2%脱脂粉乳および 1mM E D T Aを添加しながら、 150mM P B Sで、1:10(w / v)の比に懸濁した。

【0148】

抗原検出限界の決定のため、 $50\text{ng}/\text{ml}$ のカタラーゼ(実施例2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 $100\mu\text{l}$ 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)。プレートを洗浄緩衝液2(0.2% T w e e n - 20を含むP B S)で4回洗浄した。その後、ハイブリドーマ由来の $100\mu\text{l}$ 培養上清(P B S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、コンジュゲート化二次抗体(ウサギ抗マウスI g G - P O D、D A K P、デンマーク・コペンハーゲン)を添加することによって、行った。ペルオキシダーゼ(P O D)は、無色基質テトラメチルベンジジン(T M B、S i g m a)を青い産物に変えた。5ないし10分後、または陰性対照もまたわずかに青い発色を見せたら直ちに、 1N 硫

酸の添加によって、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620 nmに対して450 nmで行った。ELISAプレートは、検出抗体または基質溶液を添加する前に、各々、洗浄緩衝液で、3 - 4回、洗浄した。

【0149】

対照 (抗原を添加しない、H.ピロリ陰性便懸濁物) の2倍より大きいかまたはそれに等しい消光が検出された最低濃度を、検出限界とした。

【0150】

表1：HP25.2m/2H10：患者試料を用いたサンドイッチELISAにおける感度および特異性

【0151】

【表1】

便試料	患者の 感染状態	捕捉抗体：HPに対する p a b 検出-AK：HP 25. 2 m/ 2 H 1 0 (培養上清) OD ₄₅₀₋₆₂₀	解析カットオ フ:0.1: OD ₄₅₀₋₆₂₀ = 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
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

【 0 1 5 2 】

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

a b : 抗体 ; HP : H. ピロリ ; p a b : ポリクローナル抗体

【0153】

サンドイッチELISAにおいて、患者試料を用いると、モノクローナル抗体HP25.2m/2Hallin(K10)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(17のうち14の試料が正しく認識された)を示した。

【0154】

表2：カタラーゼに対するモノクローナル抗体の性質決定

【0155】

【表2】

融合/クローン	アイソタイプ	WB (Ag)	NWG (ng/ml)	正しく認識された便試料	
				陽性試料	陰性試料
HP25.2m/2H10	IgG2a, κ	+	1.5	25 中 17	17 中 14
HP25.6m/1G4	IgG1, κ	+	1.5	5 中 4	2 中 2
HP25.6m/1B5	IgG1, κ	+	3-6	5 中 3	2 中 2
HP25.6m/1H4	IgG1, κ	+	3-6	5 中 2	2 中 2
HP25.6m/4E3	IgG1, κ	+	6	5 中 2	2 中 2
HP25.6m/1A5	IgG1, κ	+	6	5 中 2	2 中 2
HP25.6m/5E4	IgG1, κ	-	1.5	5 中 1	2 中 2
HP25.6m/4A12	IgG1, κ	-	1.5	5 中 1	2 中 2
HP25.6m/5F4	IgG1, κ	-	1.5	5 中 1	2 中 2

Ag : 抗原 ; WB : ウェスタンブロット ; NWG : 検出限界

【0156】

結果

表2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カタラーゼに対する培養上清中のモノクローナル抗体に関する患者認識を要約する。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/2Hallin(K10)は、68%の感度および8

2%の特異性を示した。感度および特異性の改善は、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mabを用いた際に示された。

【0157】

この目的のため、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8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。

【0158】

実施例7：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)。

【0159】

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、280nmの光学密度を測定することを介して行った。150mM PBS、pH7.2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、0.1M グリシン/HCl、pH3.3で溶出を行った。タンパク質マトリックスは、0.1M グリシン/HCl、pH2.7で再生した。

【0160】

実施例8：精製モノクローナル抗体の性質決定および試験のための抗体の選択

培養上清からの測定中の便試料認識のための最適検出特性を示す抗体を、精製状態でさらに性質決定した。まず、表面プラズモン共鳴によって、親和性定数を決定した。さらに、抗体の結合領域をマッピングした(エピトープマッピング)。最後に、サンドイッチ便ELISAおよび迅速試験において、便試料によって、抗体の適切な対形成を選択した。

【0161】

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

S P R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、E L I S A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。

【0162】

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 (B I A c o r e M e t h o d s M a n u a l) にしたがって、Pharmacia Biacore Processing Unit CA 186で行った。

【0163】

カタラーゼは、B I A c o r e C M 5 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 (N H S) 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 (E D C) 溶液の1 : 1混合物45 μ l を、流速5 μ l / 分で、センサーチップ上に導いた。その後、カタラーゼ (35 μ l ; 10 mM 酢酸ナトリウム、pH 5.0中の50 μ g / m l) 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 μ l) 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、H C l (10 mM ; 15 μ l) でセンサーチップを再生することによって、除去した。

【0164】

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。

【0165】

抗体の吸着 (K_{on}) および脱離 (K_{off}) の速度定数値を計算することが可能であった (B I A e v a l u a t i o n ソフトウェア3.0) 。試験した6つのうち4つのモノクローナル抗体が、非常に優れた親和性 $K_D > 5 E - 10$ を示し

た(表3)。

【0166】

表3: カタラーゼに対するモノクローナル抗体の親和性測定の結果

【0167】

【表3】

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/1H4	7.12E+04	4.12E-05	5.79E-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

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

【0168】

カタラーゼに対するモノクローナル抗体のエピトープマッピング

Pepscan Systems (オランダ) によって、エピトープマッピングを行った。カタラーゼのペプチドバンク(27アミノ酸の重複を持つ30量体)をプラスチックマップ上に産生し、そして抗体と共にインキュベーションした。決定されたエピトープ(抗体が結合したペプチド)を表4に列挙する。HP25.2m/2H10(K10)は、非特異的ペプチド認識を示し、すなわちこの抗体は、中断された構造エピトープに結合する可能性が非常に高い。主要認識領域(表4を参照されたい)以外に、HP25.6m/1B5はまた、さらなる非特異的ペプチド結合も示し、これは、構造成分が関与しているという予想に理由を与える。検出されたエピトープを、大腸菌カタラーゼ(Bravoら、1999)の構造に移すと、抗体HP25.6m/1B5、1A5、4E3、1G4および1H4が、触媒ドメインの近くの領域である、酵素中心(アミノ酸190-360)に結合することが明らかになる。

【0169】

表4: カタラーゼ - mabのエピトープマッピングの結果

【0170】

【表4】

mab	認識されるエピトープ
HP25.2m/2H10	中断
HP25.6m/1B5	EGNWDLVGNNTPVFFIRDIAIKFPDFIHTQKRDPQTN
HP25.6m/4E3	IARGDYPKWLSTQVMPEEDAKKYRFHFPDVTK
HP25.6m/1A5	IARGDYPKWLSTQVMPEEDAKKYRFHFPDVTK
HP25.6m/1H4	SRGDYMQNGYYGSLQNYTPSSLPGYKEDKS
HP25.6m/1G4	1. EEAAEIRKHDPSNQRDLFDALARGDYPKW 2. DDSDYTQPGDYRSLPADEKERLHDT ERLHDTIGESLAHYTHKAEIVDKQLEHFKKA

【0171】

抗体の重複認識領域を下線で示す。

患者便による、適切な抗体対形成の決定

第一に、カタラーゼに対する抗体を、互いに対して力価測定 (t i t t e r) した。その後、前記方式で最適化された E L I S A 系によって、患者便試料を試験し、そしてヒトゼロ便において、カタラーゼの検出限界を決定した (表 5) 。

【0172】

サンドイッチ E L I S A の設定

E L I S A プレート (M a x i S o r b ; N u n c) の被覆は、炭酸緩衝液、0.1 M、pH 9.5 中の m a b 溶液 100 μ l で、37 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 μ l の 150 mM P B S を、0.2% 魚ゼラチン (w / v) と共に、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 μ l の洗浄緩衝液 1 (0.025% T w e e n を含む P B S) で 2 回洗浄した。ヒト便は、2% 脱脂粉乳および 1 mM E D T A を添加した 150 mM P B S 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 (ゼロ便) に添加した。便試料懸濁物を 7000 g で 5 分間遠心分離した。プレート当たり、各々 100 μ l の上清を、1 時間インキュベーションした。試料は、二重値として適用した。続いて、洗浄緩衝液 2 (0.2% T w e e n を添加した 250 μ l P B S) で、プレートを 4 回洗浄した。その後、P B S、0.1% B S A 中のビオチン - カップリング抗体の溶液 100 μ l を添加し、そして室温

で60分間インキュベーションした。結合抗原/抗体複合体の検出は、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。その後、PODは、続く工程で、無色基質TMB (Sigma) を青い産物に変えた。5ないし10分後、または陰性対照がわずかに青い発色をしめしたら直ちに、1 N 硫酸 (100 μ l / プレート) 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 Spectral) で測定した。測定は、620 nmの参照波長に対して、455 nmで行った。

【0173】

HP25.2m/2H10 (表5) は、試験したすべての他の抗体との組み合わせに適した検出因子抗体であることが証明された。親和性データにより、HP25.6m/1B5、1G4および1H4は、迅速試験における捕捉抗体として試験した。HP25.2m/1B5が最も優れた捕捉抗体であることが証明された。

【0174】

表5：カタラーゼに対するモノクローナル抗体対形成の発見の結果

【0175】

【表5】

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G4および4つのG0患者の試料の検出）

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

【0176】

実施例9：イムノクロマトグラフィー迅速試験で用いるためのコンジュゲートの産生

ビオチンとmabのカップリング

精製後、モノクローナル抗体群をビオチンとカップリングする。カップリングは既知の方法 (Harlow & Lane, 1988) にしたがって行った。

【0177】

モノクローナル抗体群は、およそ1-2 mg/mlの濃度でコンジュゲート化した。カップリング前に、抗体は、0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液、pH 8.3、および0.1 M 炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH 8.3中での透析によって、再緩衝した。抗体各1 mgに、50 µgのN-ヒドロキシスクシンイミドビオチン (NHS-d-ビオチン; Sigma) を添加し、そしてDMSO中で混合した。混合物を室温で1時間インキュベーションした。その後、ビオチン化抗体を、0.15 M PBS、0.05% NaN₃、pH 7.5に対する徹底的な透析によって、未カップリングNHS-d-ビオチンから遊離させた。

【0178】

コロイド状金へのm a bのカップリング

モノクローナル抗体 (m a b) を標準法 (F r e n s 、 1 9 7 3 ; G e o g h e g a n および A c k e r m a n 、 1 9 7 7 ; S l o t ら 、 1 9 8 5) にしたが、コロイド状金にカップリングした。粒子サイズ 4 0 n m 、 反対除法 (O p p o s i t i o n D i v i s i o n) (5 2 0) n m = 1 の金コロイド (B r i t i s h B i o C e l l 、 英国カーディフ) を、 0 . 1 M K_2CO_3 で p H 9 に調整した。精製 m a b は 2 m M ホウ酸緩衝液、 p H 9 . 2 に対して透析し、そして 0 . 1 m g / m l の濃度に希釈した。カップリングのため、 m a b 溶液 2 m l を、一滴ずつ、迅速に攪拌しながら金溶液 2 0 m l に添加し、そして室温で 3 0 分間インキュベーションした。カップリングのための最適 I g G 濃度および適切な p H 値は、個々に各 m a b に関して決定した。金 I g G コンジュゲートの安定化のため、 2 m l ウシ血清アルブミンを、 1 0 % の濃度で添加し、そしてさらに 5 分間インキュベーションした。続いて、 I g G にカップリングしていない金コロイドおよび未結合 I g G を、遠心分離によって分離した。この目的のため、カップリング調製を、 1 5 0 0 0 r p m (S o r v a l l 、 S S - 3 4) で 3 0 分間遠心分離し、そして清澄な上清を、真空によって吸い取った。遠心管の底に、濃い赤に染まったゆるい沈降物として堆積した金 I g G コンジュゲートを、 1 % ウシ血清アルブミンおよび 0 . 0 5 % NaN_3 を添加した 2 m l の 2 0 m M T r i s 、 p H 8 . 2 に吸収させた。

【0179】

実施例 1 0 : イムノクロマトグラフィー迅速試験

サンドイッチ原理にしたがったイムノクロマトグラフィー試験は、抗体対、 H P 2 5 . 2 m / 2 H 1 0 および H P 2 5 . 6 m / 1 B 5 を用いて設定した。図 9 および 1 0 に図式的に例示されるように、この試験は、試料適用領域 (1) 、フィルター (2) 、試験または解析領域 (3) および吸収領域 (4) からなる。

【0180】

精製 m a b H P 2 5 . 2 m / 2 H 1 0 は、シグナル形成免疫試薬として金 (B r i t i s h B i o C e l l 、 英国カーディフ) にカップリングさせた。 m

a b金コンジュゲートは、3からのOD (520 nm) に5% スクロース (Sigma、ダイゼンホフエン) を添加することによって、脱イオン水で希釈し、そしてガラス繊維 (Pall、ドライアイヒ) で出来たコンジュゲート・フリースに適用した。続いて、コンジュゲート・フリースを真空乾燥させた。

【0181】

試験領域 (図10、3) として、流速95 - 175秒 / 4 cmのニトロセルロース (Millipore、米国マサチューセッツ州ベッドフォード) を、試験および対照ラインを形成する免疫試薬で被覆した。この目的のため、試験ストリップのための特定の適用器具 (Imagee、米国ニューハンプシャー州ハノーバー) を用いた。試験ライン (図10、6) として、精製mab、HP25.6m / 1B5を、リン酸緩衝液、pH7.4中、1-2 µg / cmの濃度で適用した。対照ライン (図10、7) として、ポリクローナル抗マウス抗体 (Dianova、ハンブルグ) を、0.1 - 0.3 µg / cmの濃度で適用した。

【0182】

続いて、被覆ニトロセルロースおよび被覆コンジュゲート・フリースを、試験ストリップの他の成分を含むポリエステルキャリアー (G & L、米国カリフォルニア州サンタクララ) に固着させ、そして5 mmの幅の単一の片に切断した。フィルター (図10、2) として、1 - 2 cmの幅で、ガラス繊維材料 (Ahlstrom、米国ペンシルバニア州マウントホーリースプリングス; Pall、ドライアイヒ; Whatman、英国メードストーン) を用いた。吸収領域 (図10、4) には、幅2 - 3 cmで、吸収性セルロースまたはセルロースガラス繊維材料を用いた (Pall、ドライアイヒ; Schleicher & Schuell、ダッセル; Whatman、英国メードストーン)。

【0183】

実施例11：試験ラインとしてストレプトアビジンを用いた、イムノクロマトグラフィー迅速試験

実施例10に記載された迅速試験と異なり、試験ラインとして用いられるmab HP25.6m / 1B5を、ビオチンにカップリングさせ、そして試料適用領域の第二のコンジュゲート・フリース上に乾燥させた。試験ラインとして、組

換えストレプトアビジン (Roche、マンハイム) は、リン酸緩衝液、pH 7.4中、10 - 20 mg/mlの濃度で被覆した。

【0184】

このサンドイッチ設定で、両抗体コンジュゲートは、試験中、可動性であり、そして試験中、試験ストリップを横切って移動する。抗原の存在下で、ストレプトアビジンへのビオチンの結合のため、試験ラインで停止する、完全サンドイッチ複合体は、移動中に形成される。

【0185】

実施例12：イムノクロマトグラフィー迅速試験による、ヒト便中のH.ピロリ
リの検出

患者試料

イムノクロマトグラフィー迅速試験の評価のため、10の異なる病院または胃腸手術室の患者由来の200の便試料が自由に使用可能であった。試料は、胃腸管のいかなる問題または疾患も持たない患者および胃腸管の問題または疾患のための治療を受けている患者、両方に由来した。陰性患者の感染状態は、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。金標準 (gold standard) として認められたこれらの2つの方法で、矛盾する結果を示した患者は、評価に含まなかった。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。

【0186】

試験実行

迅速試験のため、便試料を、試料緩衝液中で1 : 15の比に溶解し、そして500 µlの試料溶液を、試験ストリップの適用領域 (試料適用領域) に適用した。15分後、視覚的に試験を解析した。試験ラインでの試験シグナルは、存在 (試験結果陽性) または非存在 (試験結果陰性) と評価した。試験結果の読み取りは、実験室人員として資格をもたない3人によって、各々独立に行った。さらに、試験は、実験室人員によって、0 (陰性)、1 (わずかに陽性) および2 (強く陽性) として、半定量的に評価した。

【0187】

表6は、総数200の患者試料を評価した後の、便迅速試験によって達成した結果を、2つの参照法と比較して示す。該試験において、総計100のうち95のH・ピロリ陽性試料が真の陽性であることが見出され、5試料は偽陰性結果を示した。総計100のうち94試料のH・ピロリ陰性試料が真の陰性であることが見出され、6試料は偽陽性結果を示した。比較すると、迅速試験の感度および特異性は、95%および94%であった。

【0188】

表6：総計200の便試料の評価の金標準法および迅速試験（半定量的）の試験結果

【0189】

【表6】

試料番号	呼吸試験	胃生検	迅速試験
1001	n.d.	陰性	0
1002	n.d.	陰性	0
1007	n.d.	陰性	0
1008	n.d.	陰性	0
1010	n.d.	陰性	0
1012	n.d.	陰性	0
1017	n.d.	陰性	0
1021	n.d.	陰性	0
1022	n.d.	陰性	0
1024	n.d.	陰性	0
1025	n.d.	陰性	0
1027	n.d.	陰性	0
1030	n.d.	陰性	0
1031	n.d.	陰性	0
1032	n.d.	陰性	0
1034	n.d.	陰性	0
1035	n.d.	陰性	0
1040	n.d.	陰性	0
1046	n.d.	陰性	0
2002	n.d.	陰性	0
2006	n.d.	陰性	0
2007	陰性	n.d.	0
2010	n.d.	陰性	0
2012	陰性	n.d.	0
2013	陰性	n.d.	0
2014	陰性	n.d.	0
2015	n.d.	陰性	1
2017	陰性	陰性	0
2018	陰性	陰性	0
2023	n.d.	陰性	0
2024	陰性	n.d.	0
2028	n.d.	陰性	0
2033	陰性	陰性	0
2034	陰性	陰性	0
2043	n.d.	陰性	0
3123	陰性	n.d.	0
3213	n.d.	陰性	0
3224	陰性	n.d.	0

【0190】

3225	n.d.	陰性	0
4004	n.d.	陰性	0
5004	n.d.	陰性	0
5007	n.d.	陰性	0
5008	n.d.	陰性	0
5009	n.d.	陰性	0
5010	n.d.	陰性	0
5012	n.d.	陰性	0
5013	n.d.	陰性	0
5017	n.d.	陰性	0
5018	n.d.	陰性	0
5019	n.d.	陰性	0
5020	n.d.	陰性	0
5021	n.d.	陰性	0
5022	n.d.	陰性	0
5024	n.d.	陰性	0
5025	n.d.	陰性	0
5027	n.d.	陰性	0
5028	n.d.	陰性	0
5030	n.d.	陰性	0
5031	n.d.	陰性	2
5033	n.d.	陰性	0
5035	n.d.	陰性	0
5036	n.d.	陰性	0
5040	n.d.	陰性	0
5042	n.d.	陰性	0
5046	n.d.	陰性	0
5052	n.d.	陰性	0
5056	n.d.	陰性	1
5057	n.d.	陰性	0
5060	n.d.	陰性	1
5063	n.d.	陰性	0
5064	n.d.	陰性	0
5066	n.d.	陰性	0
5067	n.d.	陰性	0
5068	n.d.	陰性	0
6002	n.d.	陰性	0
6005	n.d.	陰性	0
6008	n.d.	陰性	0
6009	n.d.	陰性	0

6017	n.d.	陰性	0
6019	n.d.	陰性	0
6024	n.d.	陰性	0
6026	n.d.	陰性	0
6029	n.d.	陰性	0
6033	n.d.	陰性	0
6038	n.d.	陰性	0
6039	n.d.	陰性	0
7005	n.d.	陰性	0
7006	n.d.	陰性	2
7009	n.d.	陰性	0
7013	n.d.	陰性	0
8004	n.d.	陰性	0
8047	n.d.	陰性	0
9004	n.d.	陰性	0
9005	n.d.	陰性	0
9010	n.d.	陰性	0
9011	n.d.	陰性	0
9012	n.d.	陰性	0
9013	n.d.	陰性	0
9015	n.d.	陰性	1
9019	n.d.	陰性	0
213	n.d.	陽性	1
444	n.d.	陽性	1
1003	n.d.	陽性	1
1013	n.d.	陽性	2
1014	n.d.	陽性	1
1015	n.d.	陽性	2
1028	n.d.	陽性	1
1029	n.d.	陽性	2
1037	n.d.	陽性	1
2005	陽性	n.d.	2
2008	n.d.	陽性	2
2009	陽性	n.d.	2
2016	n.d.	陽性	2
2029	陽性	陽性	2
2032	陽性	陽性	2
2035	n.d.	陽性	2
2039	陽性	陽性	2
2040	n.d.	陽性	2

2041	陽性	陽性	2
2042	陽性	陽性	2
3146	陽性	n.d.	2
3219	陽性	陽性	2
3220	陽性	陽性	2
3231	陽性	陽性	2
3234	陽性	陽性	2
3241	陽性	陽性	1
3570	陽性	n.d.	2
4003	n.d.	陽性	2
4005	陽性	陽性	1
4006	n.d.	陽性	2
4018	n.d.	陽性	2
4019	n.d.	陽性	2
4020	n.d.	陽性	2
5001	n.d.	陽性	2
5006	n.d.	陽性	2
5029	n.d.	陽性	2
5039	n.d.	陽性	2
5048	n.d.	陽性	2
5050	n.d.	陽性	1
5053	n.d.	陽性	2
5055	n.d.	陽性	2
5058	n.d.	陽性	2
5061	n.d.	陽性	2
5069	n.d.	陽性	1
5072	n.d.	陽性	2
5075	n.d.	陽性	2
5076	n.d.	陽性	2
5078	n.d.	陽性	2
5090	n.d.	陽性	2
5092	n.d.	陽性	2
5100	n.d.	陽性	2
5150	n.d.	陽性	0
6001	n.d.	陽性	2
6004	n.d.	陽性	2
6013	n.d.	陽性	1
6014	n.d.	陽性	2
6015	n.d.	陽性	2
6018	n.d.	陽性	2

6020	n.d.	陽性	1
6022	n.d.	陽性	2
6027	n.d.	陽性	2
6040	n.d.	陽性	2
6050	n.d.	陽性	2
6052	n.d.	陽性	2
6064	n.d.	陽性	2
6065	n.d.	陽性	2
7001	n.d.	陽性	1
7002	n.d.	陽性	2
7003	n.d.	陽性	1
7020	n.d.	陽性	0
8026	n.d.	陽性	0
8033	n.d.	陽性	2
9001	n.d.	陽性	2
9002	n.d.	陽性	2
9003	n.d.	陽性	2
9006	n.d.	陽性	2
9007	n.d.	陽性	1
9008	n.d.	陽性	2
9009	n.d.	陽性	0
9014	n.d.	陽性	2
9017	n.d.	陽性	2
9018	n.d.	陽性	2
9022	n.d.	陽性	2
T 01	陽性	n.d.	2
T 02	陽性	n.d.	2
T 03	陽性	陽性	2
T 04	陽性	陽性	1
T 05	陽性	陽性	1
T 07	陽性	陽性	1
T 09	陽性	n.d.	2
T 10	陽性	n.d.	1
T 13	n.d.	陽性	2
T 53	陽性	n.d.	2
T 58	陽性	n.d.	1
T 64	陽性	n.d.	2
T 67	陽性	n.d.	1
T 68	陽性	n.d.	2
T 70	陽性	n.d.	1

T 77	陽性	n.d.	0
T 88	陽性	n.d.	2

n.d.:未測定; 0:陰性; 1:わずかに陽性; 2:強く陽性

(n=200)

方法

		金標準	
		陽性	陰性
H. ピロリ迅速試験	陽性	95	6
	陰性	5	94

感受性: 95%

特異性: 94%

【0195】

実施例13: 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) にしたがって、抗体産生ハイブリドーマ細胞株から単離した。

【0196】

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7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。

【0197】

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。

【0198】

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。

【0199】

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XhoIおよびSpeI(重鎖)またはSacIおよびXbaI(
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XhoIおよびSpeIまたはSacIおよびXbaIで切断した後、得ら
れた断片を、プラスミドベクターBluescript KS(Stratag
ene)にクローニングした。

【0200】

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、19
89)。

【0201】

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XhoIおよびSpeI(重鎖)並びにSacIおよびX
baI(軽鎖)を用いた制限消化に供した。酵素XhoIおよびSpeIおよび
/またはSacIおよびXbaIによって、プラスミドベクターpBSIIIH

i s E x (C o n n e x) を分割した後、得られた断片をこのベクターにクローニングし、そして再び配列決定した。

【0202】

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(Sambrookら、1989)。

【0203】

表7：重鎖および軽鎖免疫グロブリン鎖の機能する可変領域のPCR増幅に用いられるプライマーのリスト(5' - 3'方向)

【0204】

【表7】

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
 MIgG1 TAT GCA ACT AGT ACA ACC ACA ATC CCT GGG
 MIgG2a 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

【0205】

参考文献

【0206】

【表8】

- Coller & Coller, 1983: Coller, H.A., Coller, 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
- Bravo et al., 1999: *Proteins* 34 (2), 155-156

【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 [HP25.2m/2H10] 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。Kabat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 [HP25.2m/2H10] 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。Kabat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 [HP25.6m/1B5] 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4】 カタラーゼに特異的なモノクローナル抗体 [HP25.6m/1B5] 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。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5】 ウレアーゼに特異的な第一のモノクローナル抗体 (DSM ACC2360) 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。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6】 ウレアーゼに特異的な第一のモノクローナル抗体 (DSM ACC2360) 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。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7】 ウレアーゼに特異的な第二のモノクローナル抗体 (DSM ACC2362) 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。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8】 ウレアーゼに特異的な第二のモノクローナル抗体 (DSM ACC2362) 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。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9】 迅速試験ストリップの一般的な設定：試料適用領域(1)；試験または解析領域(3)、吸収領域(4)。試料適用領域は、例えばコロイド状金またはポリスチレン(ラテックス)または他の結合パートナーで標識されている、検出に必要な受容体(乾燥状態)、例えば解析物または抗原の特異的抗体がある。ほとんどの場合、試験キャリアーは、特別の試験膜、例えばニトロセルロー

スからなる。前記試験膜上で、解析物または抗原に対して向けられる、さらなる特異的受容体が、試験ラインとして固定される。試料適用領域および試験領域の間にフィルター（2）がある。

【図10】 対照ラインを有する、迅速試験ストリップの設定：試料適用領域（1）；試験または解析領域（3）、および吸収領域（4）。試料適用領域には、可視有色粒子、例えばコロイド状金またはポリスチレンで標識されている、抗原に必要な受容体（乾燥状態）がある。好ましい態様において、試料適用領域は、一方の領域に、例えば金標識受容体を、他方の領域に、ビオチン標識受容体を含む、2つの重複するコンジュゲート領域からなってもよい。試験キャリアーは、ほとんどの場合、特別の試験膜、例えばニトロセルロースからなる。この試験膜上で、解析物（抗原）に対して向けられる、さらなる特異的受容体が、試験ライン（6）として固定される。好ましい態様において、ストレプトアビジンが試験ラインとして固定されてもよい。機能対照として、別の対照または捕捉ライン（7）、例えば標識受容体に対して向けられる受容体を、試験膜上に固定してもよい。試料適用領域および試験キャリアーの間にフィルター（2）がある。

【図1】

Fig. 1

```

+1  E V Q L L E Q P G A
    GAGGTGCAGCTGCTCGAGCAGCCTGGGGCT 30

+1  E L A K P G A S V K
    GAACTGGCAAAACCTGGGGCCTCAGTGAAG 60

+1  M S C K A S G Y T F
    ATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTT 90

+1  T N Y W I H W V K Q
    ACTAACTACTGGATTCACTGGGTGAAACAG 120

+1  R P G Q G L K W I G
    AGGCCTGGACAGGGTCTGAAATGGATTGGA 150

+1  Y I N P A T G S T S
    TACATTAATCCTGCCACTGGTTCCACTTCT 180

+1  Y N Q D F Q D R A T
    TACAATCAGGACTTTCAGGACAGGGCCACT 210

+1  L T A D K S S T T A
    TTGACCGCAGACAAGTCCTCCACCACAGCC 240

+1  Y M Q L T S L T S E
    TACATGCAGCTGACCAGCCTGACATCTGAG 270

+1  D S S V Y Y C A R E
    GACTCTTCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAG 300

+1  G Y D G F D S W G Q
    GGGTACGACGGGTTTGACTCCTGGGGCCAA 330

+1  G T T L T V S S
    GGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA 360

```

【図2】

Fig. 2

```

+1  E L V L T Q S P A I
    GAGCTCGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATC 30
+1  M S A S P G E K V T
    ATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACC 60
+1  M T C S A S S S V N
    ATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAT 90
+1  Y M Y W Y Q Q K S G
    TACATGTACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGC 120
+1  T S P K R W I Y D T
    ACCTCCCCCAAAGATGGATTTATGACACA 150
+1  S K L A S G V P A R
    TCCAAATTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGC 180
+1  F S G S G S G T S Y
    TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTAC 210
+1  S L T L S S M E A E
    TCTCTCACACTCAGCAGCATGGAGGCTGAA 240
+1  D A A T Y Y C Q Q W
    GATGCCGCCACTTATTACTGCCCAGCAGTGG 270
+1  S S N P Y T F G G G
    AGTAGTAATCCGTACACGTTTCGGAGGGGGG 300
+1  T K L E I K
    ACCAAGCTGGAGATAAAA 330

```

【図3】

Fig. 3

```

+1  E  V  Q  L  Q  Q  S  G  A  E
    GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAG 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
    TCCTGCACATCTTCTGGCTTCAACATTA 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
    CCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAAG 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
    ACTGCCGTCTATTACTGTGCTCTCCCCATT 300
+1  Y  Y  A  S  S  W  F  A  Y  W
    TATTACGCTAGTTCCTGGITTTGCTTACTGG 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
    ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGGT 90
+1  T  S  V  A  W  Y  Q  Q  K  P
    ACTTCTGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCT 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
    ACATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGAT 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
    TTCATTCTCACCAATTAGCAATGTGCAGTCT 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
    TATAGCAGCTCTCCACGTTTCGGAGGGGG 300
+1  A  K  V  E  I  K
    GCCAAGGTGGAAATAAAA 330

```

【図5】

Fig. 5

```

*1  D I L L T Q S F 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 GAGCATTGGC ACAAGAATAC 100
*1  W Y Q Q R T N G S P R L L I K Y
    ACTGGTATCA ACAAGAACA AATGGTTCTC CAAGGCTTCT CATAAAGTAT 150
*1  G S E S I S G I P S R F S G S G S
    GGTTCGAGT CTATCTCTGG GATCCCTTCC AGGTTTAGTG GCAGTGGATC 200
*1  G T D F S L S I N S V E S E D I A
    AGGGACAGAT TTTAGTCTTA GCATCAACAG TGTCGAGTCT GAAGATATTG 250
*1  D Y Y C Q Q S N T W P L T F G A
    CAGATTATTA CTGTCAACA AGTAATACCT GGCCGCTCAC GTTCGGTGCT 300
*1  G T K L E L K
    GGGACCAAGC TGGGCTGAA A 350

```

【図6】

Fig. 6

```

*1 E V Q L L E Q S G A E L V K F G A
GAGGTGCAGC TGCTCGAGCA GTCTGGAGCT GAGCTGGTGA AGCCTGGGCC 50
*1 S V K I S C K A S G Y A F S T S W
CTCAGTGAGC ATTTCTGCA AGGCTTCTGG CTACGCATC AGTACCTCCT 100
*1 M N W V K Q R P G K G L E W I G
GGATGAAC TG GGTGAAACAG AGGCCTGGAA AGGCTCTGA GTGGATTGCA 150
*1 R I Y P G D G D T N Y N G X F X G
CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA AGTTCAGGG 200
*1 K A T L T A Q K S S S T A Y M Q L
CAGGCCACA CTGACTGCAG ACAAATCCTC CAGCACAGCC TACATGCAAC 250
*1 N S L T S E D S A V Y F C V R E
TCACAGCCT GACATCTGAG GACTCTGCGG TCTACTTCTG TGTAAGCAG 300
*1 D A Y Y S N P Y S L D Y W G Q G T
GATGCCTATT ATAGTAACCC CTATAGTTTG GACTAGTGGG GTCAGGAAC 350
*1 S V T V S S
CTCAGTCACC GTCTCTCA 400

```

【図7】

Fig. 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
      CACARTTACC ATCACTTGC ATGCCAGTCA GAACATTAAT GTTTGGTTAA 100
+1  W Y Q Q K P G D I P K L L I Y K
      GCTGGTATCA GCAGAAACCA GGAGATATCC CTAACCTATT GATCTATAAG 150
+1  A S N L H T G V P S R F S G S G S
      GCTTCCAACT TGACACAGG 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 GGTCCGAGTT ATCCTCTCAC GPTCGGTGCT 300
+1  G T K L E L K
      GGGACCAAGC TGGAGCTGAR A 350

```

【図8】

Fig. 8

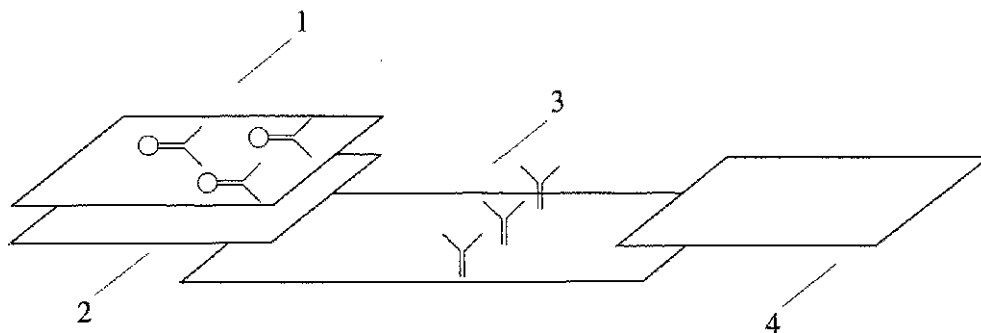
```

+1  E V Q L L E E S G 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
      GTCCCTGCAA CTCTCCTGTT CAGCCTCTGG ATTCACTTTC AGTAGCCATT 100
+1  M S W V R Q T P E K R L E W V A
      TCATGTCTTG GGTTCGCCAA ACTCCAGAGA AGAGGCTGGA GTGGGTCCGA 150
+1  S I S S G G D S F Y P D S L K G R
      FCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCTAT CCAGACAGTC TGAAGGGCCG 200
+1  F A I S R D N A R N I L F L Q M S
      AFTGCCATC TCCAGAGATA ATGCCAGGAA CATCCTGTTT CTGCAATGA 250
+1  S L R S E D S A M Y F C T R D Y
      GCAGTCTGAG GTCTGAGGAC TCGGCCATGT AATTCTGTAC ARGACTAC 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

```

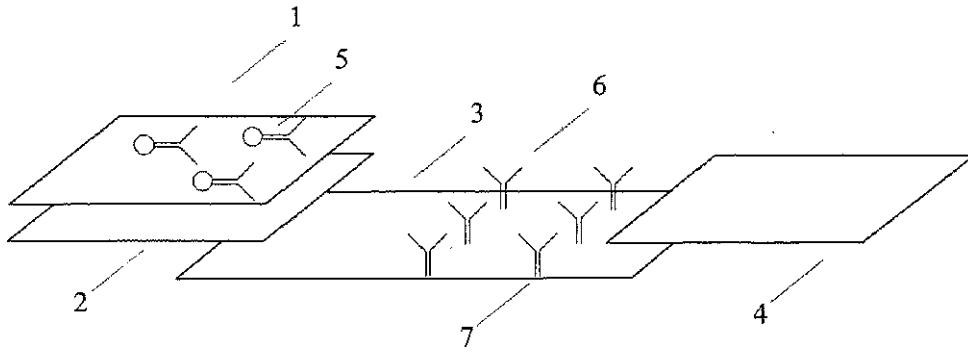
【図9】

Fig. 9



【図10】

Fig. 10



【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】 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、以下の工程：

(a) 抗原を含む哺乳動物の便試料を適用するための試料適用領域を持つイムノクロマトグラフィー迅速試験の提供および便試料の適用、

(b) (i) 酸耐性微生物由来の抗原と受容体との複合体形成を可能にする条件下で、第一の受容体を用いた；または(ii) 酸耐性微生物由来の抗原と2つの第一の受容体群との複合体形成を可能にする条件下で、少なくとも2つの異なる第一の受容体群を用いた、便試料のインキュベーション、ここで(i)記載の第一の受容体または(ii)記載の第一の受容体群が、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、；および

(c) 解析領域に固定された第二の受容体の提供、ここで第二の受容体は、(b)記載の抗原受容体複合体に結合する、および

(d) 解析領域の第二の受容体に抗原受容体複合体を集積させることによる、(b)記載の少なくとも1つの抗原受容体複合体の輸送および形成の検出を含む、前記方法。

【請求項2】 酸耐性微生物での哺乳動物の感染の検出のためのイムノクロマトグラフィー試験手段であって、請求項1記載の方法を実行するのに特に適

しているかまたはそのために設計されており：

(a) 抗原を含む哺乳動物由来の便試料の適用のための試料適用領域 (1、2)、

(b) (i) 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の第一の受容体 (5) を用いた；または (i i) 酸耐性微生物由来の抗原と2つの第一の受容体群との複合体形成を可能にする条件下での、2つの異なる第一の受容体群を用いた、便のインキュベーションのための装置、ここで (i) 記載の第一の受容体または (i i) 記載の第一の受容体群が、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、

(c) 解析領域に固定された第二の受容体 (6)、ここで第二の受容体 (6) は、(b) 記載の抗原受容体複合体に結合する、および

(d) 解析物受容体複合体の集積のため、固定された第二の受容体 (6) を含む解析領域に、(b) 記載の抗原受容体複合体を輸送する、輸送装置 (3) を有する、前記試験。

【請求項3】 便試料が適用前に懸濁されている、請求項1または2記載の方法または試験手段。

【請求項4】 試験ストリップがセルロースまたはセルロース誘導体で出来た解析領域を備え、そしてキャリアー材料が、キャリアー材料中の毛管力を介して行われる輸送に適している、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項5】 試料適用領域が、コンジュゲート・フリース (1) および輸送方向にそれに続く、便または便懸濁物の固体物質部分を本質的にろ過するのに適しているフィルター (2) を有する、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項6】 フィルター (2) が1ないし2 μm の排除サイズを示す、

請求項5記載の方法または試験手段。

【請求項7】 フィルターが、ガラス繊維および/またはポリエステルガラス繊維混合物で製造されている、請求項5または6記載の方法または試験手段。

【請求項8】 試験ストリップがポリエステルキャリアー上に固定されている、請求項4ないし6のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項9】 抗体または抗体コンジュゲートが、第一および/または第二の受容体(群)として提供されている、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項10】 単数または複数の第一の受容体(群)(5)が、懸濁に可溶性であり、試験ストリップ上に固定されており、そして/または試験ストリップ上に乾燥されており、そして/または単数または複数の第二の受容体(群)(6)が、懸濁に不溶性であり、試験ストリップ上に固定されており、そして/または試験ストリップ上に乾燥されている、請求項4ないし9のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項11】 (i)の場合、第一の受容体(5)が、または(ii)の場合、第一の受容体群の1つが、可視または有色粒子、特定の直接標識、例えば、典型的にはその大きさが5nmないし100nm、好ましくは40nmないし60nmの範囲のコロイド状金またはポリスチレン(ラテックス)で標識されている、あるいは、(i)の場合、第一の受容体に特異的に結合する、または(ii)の場合、第一の受容体群の1つに特異的に結合する、さらなる受容体によって標識されており、さらなる受容体が、可視または有色粒子、特定の直接標識、例えば、典型的にはその大きさが5nmないし100nm、好ましくは40nmないし60nmの範囲のコロイド状金またはポリスチレン(ラテックス)で標識されている、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験。

【請求項12】 (ii)の場合、可視または有色粒子で標識されていない、第一の受容体の少なくとも1つが、ビオチンとコンジュゲート化され、そして単数または複数の第一のビオチン化受容体(群)が、ストレプトアビジンによって、試験手段ラインで固定されるように、第二の受容体(6)がストレプトア

ビジンであり、そして好ましくはポリストレプトアビジンである、請求項11記載の方法または試験手段。

【請求項13】 好ましくは対照ラインとしての、対照部分が、試験部分の後の輸送方向で形成される、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項14】 試験ストリップが、本質的に、輸送方向の末端に、吸収領域(4)を示す、請求項4ないし13のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項15】 試験ストリップが、3ないし10mm、好ましくはおよそ5mmの幅、および50ないし100mm、好ましくは75mmの長さを有する、請求項4ないし14のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項16】 コンジュゲート・フリース(1)の長さが、5ないし30mm、好ましくはおよそ25mmであり、流方向のコンジュゲート・フリース(1)およびフィルターの重複が、5ないし15mm、好ましくはおよそ10mmであり；2つのコンジュゲート・フリースを用いた場合、第一のコンジュゲート・フリースの長さが、好ましくは25mmであり、流方向の第一および第二のコンジュゲート・フリースの重複が、好ましくはおよそ12.5mmであり、第二のコンジュゲート・フリースの長さが、好ましくはおよそ12.5mmであり、流方向の第二のコンジュゲート・フリースおよびフィルター(2)の重複が、好ましくはおよそ10mmであり、試験手段または解析領域の長さが、10ないし30mm、好ましくはおよそ20mmであり、幅がおよそ5mmであり、そして流方向の試験手段または解析領域および吸収領域の重複が、好ましくはおよそ1mmである、請求項4ないし15のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項17】 微生物が酸耐性細菌、好ましくは、ヘリコバクター(Helicobacter)、カンピロバクター(Campylobacter)またはミコバクテリウム(Mycobacterium)属の細菌、そして特に好ましくは、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 hepat

icus)、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)種の細菌であり、抗原が好ましくは、カタラーゼの抗原であって、好ましくはH.ピロリのものである、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項18】 単数または複数の受容体/受容体群が、抗体(群)、その断片(群)もしくは誘導体(群)またはアプタマー(群)であるか、あるいはさらに好ましくはマウス抗体またはその断片もしくは誘導体、あるいはキメラ、好ましくはヒト化抗体、またはその断片もしくは誘導体、あるいは結合パートナー、好ましくはアビジン、ストレプトアビジン、ポリストレプトアビジンおよびビオチンである、先の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項19】 受容体の混合物が検出に用いられ、受容体が抗原の検出因子として用いられる場合、受容体の混合物が抗原の捕捉因子の機能を有し、そして/または受容体が抗原の捕捉因子として用いられる場合、混合物が抗原の検出因子の機能を有し、そして受容体の混合物が、好ましくはポリクローナル抗血清である、請求項17または18記載の方法または試験手段。

【請求項20】 受容体の混合物が、検出のために用いられ、受容体の1つの混合物が抗原の捕捉因子の機能を有し、そして別の混合物が抗原の検出因子の機能を有し、そして好ましくは、少なくとも1つの混合物がポリクローナル抗血清である、請求項17ないし19のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

。【請求項21】 受容体の混合物が、抗原の捕捉因子および検出因子両方の機能を有し、そして好ましくは、該混合物がポリクローナル抗血清である、請求項17ないし19のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項22】 ポリクローナル抗血清が、微生物の溶解物に対して産生され、そして好ましくは、溶解物が富化された抗原を含む溶解物であり、そしてさらに好ましくは、溶解物が、免疫ドミナント抗原が枯渇した溶解物であるか、またはポリクローナル抗血清が、精製または(半)合成産生抗原に対して産生され、そして好ましくは、抗原がカタラーゼの抗原である、請求項19記載の方法

または試験手段。

【請求項23】 抗原の捕捉因子として作用する、単数または複数の受容体(群)(a)および/または抗原の検出因子として作用する、単数またはまたは複数の受容体(群)(b)の代わりに、各々

(a)の場合、抗原に特異的に結合する少なくとも1つの非標識抗体、および少なくとも1つの非標識抗体に特異的に結合する1つの標識抗体からなる、

(b)の場合、抗原に特異的に結合する少なくとも1つの非固定抗体、およびこの少なくとも1つの非固定抗体に特異的に結合する、試験ラインに固定された1つの抗体からなる

免疫複合体を用いる、請求項17ないし22のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項24】 受容体および/または受容体群の混合物が、コンホメーション・エピトープに結合する、請求項19または23記載の方法または試験手段。

【請求項25】 カタラーゼ・エピトープに結合する抗体の重鎖が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて:

CDR1: NYWIH

CDR2: YINPATGSTSYNQDFQD

CDR3: EGYDGFDS

を示し、そして、好ましくは、抗体の重鎖をコードするDNA配列が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて:

CDR1: AACTACTGGA TTCAC

CDR2: TACATTAATC CTGCCACTGG TTCCACTTCT TACAATCAGG ACTTTCAGGA C

CDR3: GAGGGGTACG ACGGGTTTGA CTCC

を示し、そしてより好ましくは、カタラーゼ・エピトープに結合する抗体の軽鎖が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは

以下のCDRの3つのすべて：

CDR1： SASSSVNYMY

CDR2： DTSKLAS

CDR3： QQWSSNPYT

を示し、そしてより好ましくは、抗体の軽鎖をコードするDNA配列が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1： AGTGCCAGCT CAAGTGTA AA TTACATGT
AC

CDR2： GACACATCCA AATTGGCTTC T

CDR3： CAGCAGTGGA GTAGTAATCC GTACACG

を示す、請求項18ないし24のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項26】 カタラーゼ・エピトープに結合する抗体の重鎖が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1： DTYVH

CDR2： KIDPANGKTKYDPIFQA

CDR3： PIYYASSWFAY

を示し、そして抗体の重鎖をコードするDNA配列が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1： GACACCTATGTGCAC

CDR2： AAGATTGATCCTGCGAATGGTAAACTAA
TATGACCC GATATTCCAGGCC

CDR3： CCCATTTATTACGCTAGTTCCTGGTTTGCT
TAC

を示し、そしてより好ましくは、カタラーゼ・エピトープに結合する抗体の軽鎖が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1 : KASQDVGT SVA

CDR2 : WTSTRHT

CDR3 : QQYSSSPT

を示し、そしてより好ましくは、抗体の軽鎖をコードするDNA配列が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1 : AAGGCCAGTCAGGATGTGGGTACTTCTGTTGCC

CDR2 : TGGACATCCACCCGGCACACT

CDR3 : CAGCAATATAGCAGCTCTCCCACG

を示す、請求項18ないし25のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項27】 - ウレアーゼのエピトープに結合する抗体の重鎖が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1 : GFTFSSHFM S

CDR2 : SISSGGDSFY PDSLKG

CDR3 : DYSWYALDY

または：

CDR1 : GYAFSTSWMN

CDR2 : RIYPGDGDTNYNGKFKG

CDR3 : EDAYYSNPYSLDY

を示す、請求項18ないし24のいずれか1つに記載の方法。

【請求項28】 重鎖をコードする抗体のDNA配列が、少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つのすべて：

CDR1 : GG CTACGCATTC AGTACCTCCT GGATG AAC

CDR2 : CGGATTTATC CTGGAGATGG AGATACTAAC TACAATGGGA AGTTCAAGGG C

CDR3: GAG GATGCCTATT ATAGTAACCC CTAT
AGTTTG GACTAC

または:

CDR1: GG ATTCACTTTC AGTAGCCATT TCATG
TCT

CDR2: TCCATTAGTA GTGGTGGTGA CAGTTTCT
AT CCAGACAGTC TGAAGGGC

CDR3: GACTAC TCTTGGTATG CTTTGGACTA C

を示す、請求項27記載の方法。

【請求項29】 - ウレアーゼのエピトープに結合する抗体の軽鎖が、
少なくとも1つの以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下
のCDRの3つのすべて:

CDR1: RASQSIGTRIH

CDR2: YGSEESIS

CDR3: QQSNTWPLT

または:

CDR1: HASQNINWLS

CDR2: KASNLHT

CDR3: QQGRSYPLT

を示す、請求項18ないし24のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項30】 軽鎖をコードする抗体のDNA配列が、少なくとも1つ
の以下のCDR、好ましくはCDR3そしてより好ましくは以下のCDRの3つ
のすべて:

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 GCTTCCA ACT TGCACACA

CDR3: CAACAG GGTCGAAGTT ATCCTCTCAC G

を示す、請求項29記載の方法。

【請求項31】 軽鎖および重鎖の可変領域の抗体が、図1および2または3および4および/または5および6または7および8に例示されるアミノ酸配列を示す、請求項18ないし30のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項32】 軽鎖および重鎖の可変領域のコード領域が、図1および2または3および4および/または5および6または7および8に例示されるDNA配列を示す、請求項18ないし31のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項33】 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：試料緩衝液中の、便試料の1:3ないし1:25、好ましくは1:5、特に好ましくはおよそ1:15の再懸濁が行われる、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項34】 エピトープの検出に用いられるのと同じ受容体が、固相への結合に用いられる、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項35】 受容体がモノクローナルマウス抗体である、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項36】 哺乳動物がヒトである、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法または試験手段。

【請求項37】 便試料の代わりに、検出のために、呼気濃縮物、胃ガス、歯垢、唾液、粘膜スミア、生検、全血または血清を用いる、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項38】 自動化法である、上述の請求項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項39】 請求項25および26に定義されるCDRの少なくとも

1つの適切な組み合わせを含む、V領域を示す、モノクローナル抗体、その断片または誘導体。

【請求項40】 図1および2または3および4に例示されるV領域の少なくとも1つを示す、請求項39記載のモノクローナル抗体、その断片または誘導体。

【請求項41】 マウス抗体またはその断片もしくは誘導体、あるいはキメラ、好ましくはヒト化抗体またはその断片もしくは誘導体である、請求項39または40記載のモノクローナル抗体、その断片または誘導体。

【請求項42】 請求項39ないし41のいずれか1つに記載の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。

【請求項43】 請求項39ないし41のいずれか1つに記載のモノクローナル抗体、その断片または誘導体あるいは請求項42記載のアプタマーに特異的に結合される、エピトープ。

【請求項44】 請求項43記載のエピトープに特異的に結合する、抗体、その断片または誘導体。

【請求項45】 請求項2ないし36のいずれか1つに記載の、少なくとも1つの試験手段を含む、キット。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/EP 00/10057
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/569 C07K16/12 C07K16/40 G01N33/558		
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	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, 2, 4, 7-11, 13, 14, 17-23, 34, 36, 37, 45
Y	---	27-32
	---	-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 23 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

3

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 00/10057

G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	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	1-5, 9-11,13, 14, 17-23, 33-37,45
Y	EP 0 291 194 A (UNILEVER NV) 17 November 1988 (1988-11-17) cited in the application the whole document	1-5, 9-11,13, 14, 18-21, 23, 33-37,45
Y	US 5 712 170 A (KOUVONEN ILKKA SAKARI ET AL) 27 January 1998 (1998-01-27) abstract column 3, line 58 -column 4, line 4 column 8, line 21 - line 37 claims 5,7,10-13; example 3	1-5, 9-11,13, 14, 17-23, 27-37,45
A	LAHEIJ R J F ET AL: "Evaluation of commercially available Helicobacter pylori serology kits: A review." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 36, no. 10, October 1998 (1998-10), pages 2803-2809, XP002160659 ISSN: 0095-1137 the whole document	
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 43,49-51,53 figures 5-8	40,45
P,Y		27-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/EP 00/10057
--

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.: 39 41 42 43 44
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 00/10057

Continuation of box I.2

Claims Nos. 39, 41, 42, 43, 44

In view of the large number as well as in view of the wording of the present patent claims 39 and 41, which make it difficult, if not impossible, to assess the scope of protection sought by said claims, the present patent application fails to meet the requirements of Article 6 PCT (cf. also Rule 6.1(a) PCT) to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search. For this reason, the search was restricted to those parts of the claims that seemed to be supported and disclosed according to the above mentioned terms, i.e. to the subject matter of claim 40.

Present patent claims 42-44 relate to products that are each characterized by a desirable peculiarity or property, namely to aptamers, epitopes and antibodies that depend on the features of the antibodies of claims 39-41.

The patent claims therefore comprise all products etc. that have this peculiarity or property, while only a limited portion of such products etc. are supported in the description according to the terms of Article 5 PCT. In the present case, the patent claims lack the appropriate support and the patent application lacks the required disclosure to such an extent (i.e. only those epitopes are dealt with that a recognized by some antibodies against katalase, see Table 4) that a meaningful search encompassing the entire scope of protection sought seems impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 00/10057

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9944066 A	02-09-1999	AU 3242399 A	15-09-1999
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
EP 0291194 A	17-11-1988	AT 101721 T	15-03-1994
		AT 195022 T	15-08-2000
		AU 626207 B	23-07-1992
		AU 1622888 A	02-12-1988
		AU 4438697 A	19-03-1998
		AU 682071 B	18-09-1997
		AU 8048994 A	09-03-1995
		AU 679279 B	26-06-1997
		AU 8049094 A	09-03-1995
		DE 3856421 D	31-08-2000
		DE 3856421 T	14-12-2000
		DE 3887771 D	24-03-1994
		DE 8805565 U	18-08-1988
		DE 291194 T	19-03-1992
		EP 0560410 A	15-09-1993
		EP 0560411 A	15-09-1993
		ES 2050704 T	01-06-1994
		ES 2150428 T	01-12-2000
		FR 2614423 A	28-10-1988
		WO 8808534 A	03-11-1988
		GB 2204398 A, B	09-11-1988
		HK 140995 A	15-09-1995
		IT 214285 Z	24-04-1990
		JP 2705767 B	28-01-1998
		JP 6180320 A	28-06-1994
		JP 2705768 B	28-01-1998
		JP 6160388 A	07-06-1994
		JP 2919392 B	12-07-1999
		JP 9178748 A	11-07-1997
		JP 7046107 B	17-05-1995
		JP 1503174 T	26-10-1989
		US 5622871 A	22-04-1997
		US 5602040 A	11-02-1997
		US 5656503 A	12-08-1997
		AU 656966 B	23-02-1995
		AU 1704992 A	27-08-1992
		AU 656967 B	23-02-1995
		AU 1705092 A	27-08-1992
US 5712170 A	27-01-1998	FI 925922 A	30-06-1994
		AU 5701594 A	19-07-1994
		DE 69328120 D	20-04-2000
		DE 69328120 T	21-09-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. l. Application No PCT/EP 00/10057

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5712170 A		EP 0677170 A WO 9415215 A JP 8505224 T PL 304890 A US 5965458 A	18-10-1995 07-07-1994 04-06-1996 09-01-1995 12-10-1999
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-マ-コ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	G
33/53		33/53	Z
33/543	5 2 1	33/543	U
33/573		33/573	5 2 1
33/577		33/577	A
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 P 21/08	B

(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 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
 M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
 E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G
 , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,
 R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T ,
 A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C
 A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M
 , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H ,
 G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K
 E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S
 , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N ,
 M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R
 U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M
 , T R , T T , T Z , U A , U G , U S , U Z , V N ,
 Y U , Z A , Z W

(72)発明者 カルマン , ゲ-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-セ 28

(72)発明者 ラクナー , メレット
 ドイツ連邦共和国 80689 ミュンヘン ,
 ヴィリバルトシュトラ-セ 34

(72)発明者 トリュ-エ , アンドレアス
 ドイツ連邦共和国 81241 パズィング ,
 ランツベルガー・シュトラ-セ 497

(72)発明者 デ-ネルト , ゾンヤ
 ドイツ連邦共和国 81373 ミュンヘン ,
 バ-ト・ガシュタイナー・シュトラ-セ

(72)発明者 シュヴァルツ, ゲオルク
ドイツ連邦共和国 80809 ミュンヘン,
グラフ - コンラート シュトラーセ 25

F ターム(参考) 2G045 AA28 AA34 AA35 BB10 BB20
BB46 BB51 CA25 CB04 CB07
CB21 FA11 FA16 FB01 FB03
FB15 FB17
4B064 AG27 CA20 CC24 CE12 DA01
DA13
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA11
DA76 DA86 EA29 EA52 FA74
GA26

专利名称(译)	用于检测粪便中耐酸微生物的免疫色谱快速检测方法		
公开(公告)号	JP2003511697A	公开(公告)日	2003-03-25
申请号	JP2001530572	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 ラクナーメレット トリユーエアンドレアス デーネルトゾンヤ シュヴァルツゲオルク		
发明人	ライター,クリスティアン カルマン,ゲーアハルト ラクナー,メレット トリユーエ,アンドレアス デーネルト,ゾンヤ シュヴァルツ,ゲオルク		
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 C07K14/195 C07K14/205 C07K14/35 C07K16/12 G01N33/50.G G01N33/50.Z G01N33 /53.U G01N33/543.521 G01N33/573.A G01N33/577.B C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA28 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB46 2G045/BB51 2G045 /CA25 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB21 2G045/FA11 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB15 2G045/FB17 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064 /DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA52 4H045/FA74 4H045/GA26		
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)

本发明是一种用于检测哺乳动物被耐酸性微生物感染的方法，其包括以下步骤：(a) 具有用于施加含有抗原的哺乳动物粪便样品的样品施加区域的免疫色谱法。提供粪便样品的快速测试和应用，(b) (i) 在允许来自耐酸微生物的抗原与受体复合的条件下使用第一受体；或(ii) 在允许至少一个带有至少两个第一受体基团的耐酸微生物复杂形成抗原的条件下，将带有至少两个不同第一受体基团的粪便样品孵育在(i)中或在(ii)中的第一组受体中，至少一些哺乳动物具有天然结构，或被抗酸微生物感染或免疫。一旦产生，哺乳动物就产生针对它的抗体。或抗酸微生物的提取物或裂解物，或其衍生的蛋白质或片段，或对应于其中合成肽产生抗体的结构的结构，其特异性结合抗原，所述抗原通过肠后显示。并且(c) 提供固定在分析区域中的第二受体，其中所述第二受体与(b)和(d)所述分析区域中描述的抗原-受体复合物结合。通过在(b)的第二受体上积累抗原受体复合物，检测至少一种根

据 (b) 的抗原受体复合物的转运和形成。本发明进一步涉及特别适合于并且被设计用于实施本发明方法的免疫层析测试。

便試料	患者の 感染状態	捕捉抗体：HPに対する p a b 検出：AK：HP 2 5 . 2 m / 2 H 1 O (培養上清) OD _{490.620}	解析カットオフ ブ.0.1 OD _{490.620} = 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
CXT005	陽性	0.08	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