

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502186

(P2004-502186A)

(43) 公表日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/53	P
GO 1 N 33/569	GO 1 N 33/50	G
	GO 1 N 33/569	F

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願2002-508077 (P2002-508077)	(71) 出願人	503009904
(86) (22) 出願日	平成13年7月3日 (2001.7.3)		ヘリラド・プロプライエタリー・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月27日 (2002.12.27)		オーストラリア国ウェスタン・オーストラリア 6000, パース, ジ・エスプラナード 28, ザ・ビージーシー・センター, レヴェル 11
(86) 国際出願番号	PCT/AU2001/000795	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開番号	W02002/003065		弁理士 社本 一夫
(87) 国際公開日	平成14年1月10日 (2002.1.10)	(74) 代理人	100076691
(31) 優先権主張番号	PQ 8541		弁理士 増井 忠式
(32) 優先日	平成12年7月3日 (2000.7.3)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)		弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヘリコバクター (Helicobacter) 感染の治療を監視し、そして根絶に成功する可能性を予測する方法

## (57) 【要約】

本発明は、ヘリコバクター感染の治療を監視する方法、および特に、免疫グロブリン G 2 ( I g G 2 ) を用いてピロリ菌感染の根絶を監視する方法に関する。本発明はまた、感染に関して治療しようとするかまたは治療している被験者において、ヘリコバクター感染の根絶に成功する可能性を予測する方法、並びに特に、治療しようとするかまたは治療している被験者において、インターロイキン - 4、インターフェロン - および I g G レベルを測定することを含む、根絶に成功する可能性を予測する方法にも関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

感染に関して治療する被験者において、ヘリコバクター ( *Helicobacter* ) 感染の根絶を監視する方法であって：

- i) 唾液試料中の I g G 2 抗ピロリ菌 ( *H. pylori* ) 抗体レベルの測定；
- ii) 該 I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルと、あらかじめ決定した対照 I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルとの比較、ここで対照と比較した唾液試料中の I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルの減少が、ヘリコバクター根絶を示すを含む、前記方法。

## 【請求項 2】

感染に関して治療する被験者において、ヘリコバクター感染の治療有効性を監視する方法であって：

- i) 唾液試料中の I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルの測定；
- ii) 該 I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルと、あらかじめ決定した対照 I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルとの比較、ここで対照と比較した唾液試料中の I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルの減少が、ヘリコバクターの効果的な治療を示すを含む、前記方法。

## 【請求項 3】

ヘリコバクターでの感染に関して治療する被験者において、ヘリコバクターの再発または再感染を監視する方法であって：

- i) 唾液試料中の I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルの測定；
- ii) 該 I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルと、あらかじめ決定した対照 I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルとの比較、ここで対照と比較した唾液試料中の I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルの増加が、ヘリコバクターの再発または再感染を示すを含む、前記方法。

## 【請求項 4】

ヘリコバクター感染の治療への被験者の不反応性を検出する方法であって：

- i) 唾液試料中の I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルの測定；
- ii) 該 I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルと、あらかじめ決定した対照 I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルとの比較、ここで対照と比較した唾液試料中の I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルの変化の欠如が、治療への反応欠如を示すを含む、前記方法。

## 【請求項 5】

I g G 2 抗ピロリ菌抗体をイムノアッセイによって検出する、請求項 1 から 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 6】

アッセイが E L I S A である、請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

I g G 2 抗ピロリ菌抗体の対照レベルを、ピロリ菌に感染していない被験者から得た唾液試料において確立する、請求項 1 から 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 8】

I g G 2 抗ピロリ菌抗体の対照レベルを、被験者自身の唾液試料中で測定する、請求項 1 から 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 9】

ヘリコバクター感染の治療を監視するキットであって：

- ( i ) ヘリコバクター抗原
  - ( ii ) I g G 2 サブクラス抗体を測定する試薬
- を含む、前記キット。

## 【請求項 10】

感染に関して治療しようとするかまたは治療している被験者において、ヘリコバクター感

10

20

30

40

50

染の根絶に成功する可能性を予測する方法であって：

- ( i ) 被験者由来の試料中の I L - 4 レベルの測定；
  - ( i i ) 該 I L - 4 レベルと、あらかじめ決定した対照または標準 I L - 4 レベルとの比較、
  - ( i i i ) 被験者由来の試料中の I L - 4 レベルが対照または標準 I L - 4 レベルより高いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I L - 4 レベルが対照または標準 I L - 4 レベルより低いと、根絶に失敗する可能性が予測される
- を含む、前記方法。

【請求項 1 1】

試料が血液試料である、請求項 1 0 記載の方法。

10

【請求項 1 2】

I L - 4 をイムノアッセイによって検出する、請求項 1 0 または請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

アッセイが E L I S A である、請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

I L - 4 の対照または標準レベルを、ピロリ菌に感染していない被験者および/またはピロリ菌根絶に成功した被験者および/またはピロリ菌に感染した被験者から得た試料の解析から確立する、請求項 1 0 から 1 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 1 5】

感染に関して治療しようとするかまたは治療している被験者において、ヘリコバクター感染の根絶に成功する可能性を予測する方法であって：

20

- ( i ) 被験者由来の試料中のインターフェロン - ( I N F - ) レベルの測定；
  - ( i i ) 該 I N F - レベルと、あらかじめ決定した対照または標準 I N F - レベルとの比較、
  - ( i i i ) 被験者由来の試料中の I N F - レベルが対照または標準 I N F - レベルより低いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I F N - レベルが対照または標準レベルより高いと、根絶に失敗する可能性が予測される
- を含む、前記方法。

【請求項 1 6】

試料が血液試料である、請求項 1 5 記載の方法。

30

【請求項 1 7】

I F N - レベルをイムノアッセイによって検出する、請求項 1 5 または請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 1 8】

アッセイが E L I S A である、請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

I F N - の対照または標準レベルを、ピロリ菌に感染していない被験者および/またはピロリ菌根絶に成功した被験者および/またはピロリ菌に感染した被験者から得た試料の解析から確立する、請求項 1 5 から 1 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 2 0】

40

感染に関して治療しようとするかまたは治療している被験者において、ヘリコバクター感染の根絶に成功する可能性を予測する方法であって：

- ( i ) 被験者由来の試料中の免疫グロブリン G ( I g G ) レベルの測定；
  - ( i i ) 該 I g G レベルと、あらかじめ決定した対照または標準 I g G レベルとの比較、
  - ( i i i ) 被験者由来の試料中の I g G レベルが対照または標準レベルより低いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I g G レベルが対照または標準レベルより高いと、根絶に失敗する可能性が予測される
- を含む、前記方法。

【請求項 2 1】

試料が血清試料である、請求項 2 0 記載の方法。

50

## 【請求項 2 2】

試料が唾液試料である、請求項 2 0 記載の方法。

## 【請求項 2 3】

I g G の対照または標準レベルを、ピロリ菌に感染していない被験者および/またはピロリ菌根絶に成功した被験者および/またはピロリ菌に感染した被験者から得た試料の解析から確立する、請求項 2 0 から 2 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

## 【請求項 2 4】

感染に関して治療しようとするかまたは治療している被験者において、ヘリコバクター感染の根絶に成功する可能性を予測する方法であって：

( i ) 被験者由来の試料中の I L - 4 および/または I N F - および/または I g G レベルの組み合わせの測定；

( i i ) 該 I L - 4 および/または I N F - および/または I g G レベルと、それぞれ、あらかじめ決定した対照または標準 I L - 4 および/または I N F - および/または I g G レベルとの比較、

ここで、被験者由来の試料中の I L - 4 レベルが対照または標準レベルより高いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I L - 4 レベルが対照または標準レベルより低いと、根絶に失敗する可能性が予測され、そして

被験者由来の試料中の I N F - レベルが対照または標準レベルより低いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I F N - レベルが対照または標準レベルより高いと、根絶に失敗する可能性が予測され、そして

被験者由来の試料中の I g G レベルが対照または標準レベルより低いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I g G レベルが対照または標準レベルより高いと、根絶に失敗する可能性が予測される

を含む、前記方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

技術分野

本発明は、ヘリコバクター ( H e l i c o b a c t e r ) 感染の治療を監視する方法、および特に、免疫グロブリン G 2 ( I g G 2 ) を用いてピロリ菌 ( H e l i c o b a c t e r p y l o r i ) 感染の根絶を監視する方法に関する。本発明はまた、感染に関して治療しようとするかまたは治療している被験者において、ヘリコバクター感染の根絶に成功する可能性を予測する方法、特に、治療しようとするかまたは治療している被験者において、インターロイキン - 4、インターフェロン - および I g G レベルを測定することを含む、根絶に成功する可能性を予測する方法にも関する。

## 【0002】

背景技術

本明細書全体の先行技術のいかなる議論も、決して、こうした先行技術が広く知られているかまたは該分野の通常の一般的な知識の一部を形成することを是認するとみなしてはならない。

## 【0003】

ピロリ菌感染は、現在、胃癌が発展する、必須の前提条件と認識されている。集団の約 3 0 % がこの細菌に感染し、そして通常、慢性胃炎と共に存在する。これは、胃または十二指腸潰瘍によって悪化する可能性があるか、あるいは非潰瘍消化不良として存在する可能性がある。キャリアーの相当数は無症候性である。しかし、ピロリ菌を有する患者の少数では、段階 ( 上皮細胞化生および形成異常を含む ) を通じて異常が発展し、新形成となる。

## 【0004】

ピロリ菌感染の現在の処置慣例

抗生物質を用いた感染根絶は、消化性潰瘍形成の 8 0 - 9 0 % の治療率を誘導する。広く認められた治療パラダイムは、先に内視鏡診断を伴わない、抗体アッセイを用いた感染検

10

20

30

40

50

出、これに続く、併用抗生物質療法に基づく。根絶療法前の内視鏡検査は、「危険な」症状（例えば激しい痛み、出血）が生じたか、または胃癌の有意なリスクが存在する場合に、一般的に認められる。しかし、内視鏡検査は、それ自体のリスクと関連する処置であり、そして可能な場合、避けるべきものである。

【0005】

ピロリ菌は、唾液と共に血清において、IgG抗体反応を開始する。血清IgG抗体は、非侵襲性診断の基礎である。感染の根絶に続いて、血清抗体レベルの非常に緩慢な低下が生じる。根絶の成功を評価する際、6ヶ月でのIgG抗体レベルに価値がある可能性があるとして示唆する研究がなされてきた。しかし、IgG抗体の唾液レベルは、根絶後、はるかに迅速に低下し、6週でのレベルは、一様に、抗生物質療法前のものの80%未満である。

10

【0006】

唾液IgG抗体レベルが根絶の成功を予測する可能性があるという概念は魅力的であるが、ヘリコバクターの治療進行または根絶を監視するのに実際的な案ではないことが立証された。これは総IgG抗体レベルが不安定であり、臨床環境における実行可能な試験が信頼できないことが立証される程度であったためである。現在、ヘリコバクター感染を根絶するよう設計された治療の監視に成功するであろう、非侵襲性の安定な試験は存在しない。

【0007】

さらに、治療する個体においてピロリ菌の根絶を監視するのに加え、ピロリ菌の根絶に成功する可能性を決定する、治療前に、または治療中に使用可能な試験を有することが望ましいであろう。

20

【0008】

先行技術の不都合な点の少なくとも1つを克服するかまたは改良し、あるいは有用な代替法を提供するのが本発明の目的である。

【0009】

発明の概要

第一の側面にしたがって、感染に関して治療する被験者において、ヘリコバクター感染の根絶を監視する方法であって：

30

- a) 唾液試料中のIgG 2抗ピロリ菌抗体レベルの測定；
- b) 該IgG 2抗ピロリ菌抗体レベルと、あらかじめ決定した対照IgG 2抗ピロリ菌抗体レベルとの比較、ここで対照と比較した唾液試料中のIgG 2抗ピロリ菌抗体レベルの減少が、ヘリコバクター根絶を示すを含む、前記方法を提供する。

【0010】

第二の側面にしたがって、感染に関して治療する被験者において、ヘリコバクター感染の治療有効性を監視する方法であって：

40

- a) 唾液試料中のIgG 2抗ピロリ菌抗体レベルの測定；
- b) 該IgG 2抗ピロリ菌抗体レベルと、あらかじめ決定した対照IgG 2抗ピロリ菌抗体レベルとの比較、ここで対照と比較した唾液試料中のIgG 2抗ピロリ菌抗体レベルの減少が、ヘリコバクターの効果的な治療を示すを含む、前記方法を提供する。

【0011】

第三の側面にしたがって、ヘリコバクターでの感染に関して治療する被験者において、ヘリコバクターの再発または再感染を監視する方法であって：

- a) 唾液試料中のIgG 2抗ピロリ菌抗体レベルの測定；
- b) 該IgG 2抗ピロリ菌抗体レベルと、あらかじめ決定した対照IgG 2抗ピロリ菌抗体レベルとの比較、ここで対照と比較した唾液試料中のIgG 2抗ピロリ菌抗体レベルの増加が、ヘリコバクターの再発または再感染を示すを含む、前記方法を提供する。

50

## 【0012】

第四の側面にしたがって、ヘリコバクター感染の治療への被験者の不反応性を検出する方法であって：

- a) 唾液試料中の I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルの測定；
- b) 該 I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルと、あらかじめ決定した対照 I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルとの比較、ここで対照と比較した唾液試料中の I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルの変化の欠如が、治療への反応欠如を示すを含む、前記方法を提供する。

## 【0013】

第六の側面にしたがって、ヘリコバクター感染の治療を監視するキットであって：

- a) ヘリコバクター抗原
  - b) I g G 2 サブクラス抗体を測定する試薬
- を含む、前記キットを提供する。

10

## 【0014】

好ましくは、I g G 2 抗ピロリ菌抗体は、近被験者 ( n e a r - s u b j e c t ) アッセイによって検出する。しかし、アッセイはまた、実験室に基づく試験であることも可能である。好ましくは、アッセイは抗体アッセイであるが、他の既知の測定法もまた、有効に使用可能であることが理解されるであろう。最も好ましくは、アッセイは、E L I S A、R I A または同様のアッセイ形式などのイムノアッセイである。

## 【0015】

I g G 2 抗ピロリ菌抗体の対照レベルは、正常な個体、すなわちピロリ菌感染を確立していない個体から得た唾液試料において確立可能である。しかし、I g G 2 の対照レベルを、感染治療開始前の被験者自身の唾液において測定するか、あるいは再発または再感染を監視する場合、ヘリコバクター根絶成功後の唾液 I g G 2 レベルを測定することが好ましい。

20

## 【0016】

第七の側面にしたがって、本発明は、感染に関して治療しようとするかまたは治療している被験者において、ヘリコバクター感染の根絶に成功する可能性を予測する方法であって：

- ( i ) 被験者由来の試料中の I L - 4 レベルの測定；
  - ( i i ) 該 I L - 4 レベルと、あらかじめ決定した対照または標準 I L - 4 レベルとの比較、
  - ( i i i ) 被験者由来の試料中の I L - 4 レベルが対照または標準 I L - 4 レベルより高いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I L - 4 レベルが対照または標準 I L - 4 レベルより低いと、根絶に失敗する可能性が予測される
- を含む、前記方法を提供する。

30

## 【0017】

好ましくは、試料は血液試料である。

好ましくは、I L - 4 はイムノアッセイによって検出し、そしてより好ましくは、E L I S A によって測定する。

40

## 【0018】

当業者は、適切な対照または標準 I L - 4 レベルを容易に同定可能であろう。例えば、I L - 4 の対照または標準レベルは、ピロリ菌に感染していない被験者および / またはピロリ菌根絶に成功した被験者および / またはピロリ菌に感染した被験者から得た試料の解析から確立可能である。

## 【0019】

第八の側面にしたがって、本発明は、感染に関して治療しようとするかまたは治療している被験者において、ヘリコバクター感染の根絶に成功する可能性を予測する方法であって：

- ( i ) 被験者由来の試料中のインターフェロン - ( I N F - ) レベルの測定；

50

( i i ) 該 I N F - レベルと、あらかじめ決定した対照または標準 I N F - レベルとの比較、

( i i i ) 被験者由来の試料中の I N F - レベルが、対照または標準 I N F - レベルより低いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I F N - レベルが対照または標準レベルより高いと、根絶に失敗する可能性が予測される  
を含む、前記方法を提供する。

【 0 0 2 0 】

好ましくは、 I N F - レベルは、血液試料中で測定する。

好ましくは、 I F N - レベルはイムノアッセイによって検出し、そして好ましくは、アッセイは E L I S A である。

10

【 0 0 2 1 】

当業者は、適切な対照または標準を容易に確立可能であろう。例えば、 I F N - の対照または標準レベルは、ピロリ菌に感染していない被験者および/またはピロリ菌根絶に成功した被験者および/またはピロリ菌に感染した被験者から得た試料の解析から確立可能である。

【 0 0 2 2 】

第九の側面にしたがって、本発明は、感染に関して治療しようとするかまたは治療している被験者において、ヘリコバクター感染の根絶に成功する可能性を予測する方法であって

：

( i ) 被験者由来の試料中の免疫グロブリン G ( I g G ) レベルの測定；

20

( i i ) 該 I g G レベルと、あらかじめ決定した対照または標準 I g G レベルとの比較、

( i i i ) 被験者由来の試料中の I g G レベルが対照または標準レベルより低いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I g G レベルが対照または標準レベルより高いと、根絶に失敗する可能性が予測される

を含む、前記方法を提供する。

【 0 0 2 3 】

好ましくは、 I g G レベルは血清試料中で測定し、そしてより好ましくは、試料は唾液試料である。

当業者は、適切な対照または標準 I g G レベルを容易に確立可能であろう。例えば、 I g G の対照または標準レベルは、ピロリ菌に感染していない被験者および/またはピロリ菌根絶に成功した被験者および/またはピロリ菌に感染した被験者から得た試料の解析から確立可能である。

30

【 0 0 2 4 】

第十の側面にしたがって、本発明は、感染に関して治療しようとするかまたは治療している被験者において、ヘリコバクター感染の根絶に成功する可能性を予測する方法であって

：

( i ) 被験者由来の試料中の I L - 4 および/または I N F - および/または I g G レベルの組み合わせの測定；

( i i ) 該 I L - 4 および/または I N F - および/または I g G レベルと、それぞれ、あらかじめ決定した対照または標準 I L - 4 および/または I N F - および/または I g G レベルとの比較、

40

ここで、被験者由来の試料中の I L - 4 レベルが対照または標準レベルより高いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I L - 4 レベルが対照または標準レベルより低いと、根絶に失敗する可能性が予測され、そして

被験者由来の試料中の I N F - レベルが対照または標準レベルより低いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I F N - レベルが対照または標準レベルより高いと、根絶に失敗する可能性が予測され、そして

被験者由来の試料中の I g G レベルが対照または標準レベルより低いと、根絶に成功する可能性が予測され、そして I g G レベルが対照または標準レベルより高いと、根絶に失敗する可能性が予測される

50

を含む、前記方法を提供する。

【0025】

#### 好ましい態様の説明

驚くべきことに、唾液 I g G 2 抗ピロリ菌抗体が安定であり、そして治療を受けている被験者において、ピロリ菌感染の治療進行および/または根絶を監視するために開発すべき、信頼しうる試験を可能にすることが見出された。

【0026】

血液および胃粘膜中の I g G 抗ピロリ菌抗体レベルをピロリ菌状態の指標として使用可能であることが、先に知られていた。同様の目的のために唾液中の I g G 抗ピロリ菌抗体を使用する試みがなされてきたが、こうした試料において該抗体が不安定であることが立証された。以下の例から、I g G 抗ピロリ菌は、ピロリ菌状態の一般的な指標として使用可能である可能性があるが、開発すべき安定な治療監視試験を可能にするのは、I g G 2 サブクラス抗ピロリ菌抗体の測定であることが理解されるであろう。

10

【0027】

さらに驚くべきことに、ピロリ菌根絶成功の予測因子として、I L - 4 レベルが使用可能であることが見出された。I L - 4 試験は、根絶可能性を予測するため、ピロリ菌感染の治療前、または治療中に、使用可能であることが予見される。

【0028】

ヒト試料中の抗体および I L - 4 の測定技術は、当該技術分野に公知であり、そしてプロトコルおよび試薬は、容易に入手可能である。いくつかの測定がどのように実行可能かの例として、使用する技術のいくつかの例を以下に示す。

20

【0029】

別に示さない限り、標準的な教科書および実験室マニュアルから確かめることが可能な標準的な技術が使用可能である。

ここから本発明は、限定しない実施例に関連して、より詳細に記載される。

【0030】

#### 【実施例】

##### 実施例 1 唾液試料中の抗体レベルの測定

##### 試料収集

唾液試料は、アモキシシリン、オメプラゾールおよびクラリスロマイシンで構成される根絶三重療法で7日間治療した、ピロリ菌に感染した4患者から収集した。試料は、治療前および根絶療法10日後に採取した。

30

【0031】

##### ピロリ菌抗原調製

ピロリ菌 N C T C 1 1 6 3 7 株を、Goodwin (#208) に記載される修飾法にしたがったピロリ菌抗原調製に用いた。抽出物中のタンパク質濃度は、bio-rad キット (Bio-rad laboratories Australia) を用いて測定した。アリコットを - 70 で保存した。

【0032】

##### E L I S A による抗体検出

唾液抗ピロリ菌抗体検出のため、96 ウェル平底マイクロタイター Polysorb プレート (Nunc、デンマーク) のウェルを、7  $\mu$ g / ml のピロリ菌抗原で、4 で一晚コーティングした。プレートを洗浄し、そして P B S - T w e e n 2 0 中の 5 % 脱脂乳 (Diploma、オーストラリア) でブロッキングした後、2 % P E G 6 0 0 0 で 1 : 2 希釈した唾液試料を、三つ組で個々のウェルに添加した。インキュベーション後、ウェルを洗浄し、そして西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲート化したヒツジ抗 I g G または抗 I g G 2 (Silenus、オーストラリア) 1 : 2 0 0 0 希釈を、各ウェルに添加した。さらにインキュベーションした後、プレートを洗浄し、そしてその後、テトラメチルベンジジン (TMB) 基質 (Sigma、米国) を各ウェルに添加した。1 モル / l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いて反応を停止し、そして E L I S A プレート読み取り装置 (Bio-

40

50

R a d 4 5 0、日本) 中、4 5 0 n m で吸光度を読み取った。結果は、既定の唾液試料の平均 O D<sub>4 5 0</sub> を校正試料の平均 O D<sub>4 5 0</sub> で割った、E L I S A 指標として表した。陽性および陰性品質管理試料を各実行に含み、アッセイ内およびアッセイ間変動に関して管理した。

【0033】

ピロリ菌に感染した5人の被験者から、唾液試料を得た。新鮮な試料または12ヶ月まで保存した後の試料いずれかを、E L I S A アッセイによって、I g G 2 および総 I g G 抗ピロリ菌抗体に関して試験した。結果は、I g G 2 抗体レベルが、I g G 抗体レベルより、より安定であったことを示す(図1)。したがって、保存およびアッセイ中に安定であるため、I g G 2 抗体は、感染状態の信頼しうる、そして高感度な指標である。

10

【0034】

実施例2 根絶療法を受けている患者由来の唾液中の抗ピロリ菌抗体レベル

抗生物質根絶療法を受けている被験者由来の唾液試料を、実施例1に記載したイムノアッセイ法を用いて、抗ピロリ菌抗体に関して試験した。

【0035】

I g G および I g G 2 抗体を、抗生物質での治療前および治療後に測定した。治療10日後、I g G 2 抗体レベルは、総 I g G 抗体レベルより、迅速に低下した(図2Aおよび2B)。

【0036】

別個の研究において、ピロリ菌に感染した被験者由来の唾液は、感染していない被験者(図3B)に比較した際、I g G 2 レベルが顕著に上昇する(図3A)ことが示された。最終的に感染を根絶するのに失敗した被験者は、I g G 2 抗ピロリ菌抗体レベルの有意な低下を示さなかった。

20

【0037】

実施例3 - インターロイキン - 4 / I F N - および I g G 研究

被験者

消化不良の検査のため紹介された52人の被験者、および抗生物質1クール以上の後、持続するピロリ菌感染を持つ11人の被験者を、この研究に採用した。消化不良の被験者は、研究の3ヶ月以内に、抗生物質を投与されていなかった。研究は、消化性疾患センター倫理委員会(E t h i c s C o m m i t t e e o f t h e C e n t r e f o r D i g e s t i v e D i s e a s e s)、オーストラリア・シドニーによって認可された。すべての患者からインフォームドコンセントを得た。組織培養、組織像およびウレアーゼ試験(C L O 試験、オーストラリア・ウェスタンオーストラリア州デルタウエスト)に用いるため、多数の生検標本を、胃の幽門洞および本体から、上部消化管内視鏡検査中に得た。血液試料は、収集2時間以内に37 でインキュベーションした。血清は、ピロリ菌特異的抗体用に - 7 0 で保存した。

30

【0038】

唾液試料収集

唾液試料は、内視鏡処置前に収集した。試料を1000 x g、4 で10分間遠心分離し、そしてアリコットを - 7 0 で保存した。

40

【0039】

生検培養

胃生検組織の重量測定をし、そして該組織をm g 組織(湿重量)あたり、50 μ l 血清不含A I M - V 培地(L i f e T e c h n o l o g y、オーストラリア)の比で、24時間培養した。培養上清を収集し、そして遠心分離した。アッセイまで、アリコットを - 7 0 で保存した。

【0040】

ピロリ菌抗原調製

N C T C 1 1 6 3 7 株由来のピロリ菌抗原を、G o l d w i n ら(J I n f e c t D i s 1 9 8 7 ; 1 5 5 : 4 8 8 - 9 4)によって記載される方法にしたがって、酸 - グ

50

リシン抽出 (AGE) によって調製した。ピロリ菌 AGE は、細胞培養および特異的抗体測定に用いた。

【0041】

全血培養中の IL-4 に関する ELISA 捕捉アッセイ

全血培養中のサイトカインレベルは、先に記載される方法 (Renら, Helicobacter 2000; 5: 135-41) にしたがって測定した。簡潔には、150  $\mu$ l のヘパリン処理全血を、マウスポリクローナル抗ヒト IL-4 抗体 (Endogen、米国マサチューセッツ州) でプレコーティングした 96 ウェルマイクロタイター平底プレートのウェルに三つ組で添加した。0、1 または 10  $\mu$ g/ml いずれかでピロリ菌 AGE を含有する、等量の AIM-V 培地もまた、ウェルに装填した。5% CO<sub>2</sub> と共に、培養を 37 で 24 時間インキュベーションし、その後、インターフェロン- (IFN-) アッセイ用に上清を収集した。「捕捉された」IL-4 の量は、以下のように ELISA によって測定した。簡潔には、プレートを洗浄した後、ビオチン化マウスモノクローナル抗ヒト IL-4 抗体 (Endogen、米国マサチューセッツ州) をウェルに添加し (0.5  $\mu$ g/ml)、そして室温で 90 分間インキュベーションした。その後、プレートを洗浄し、そしてストレプトアビジンをコンジュゲート化した西洋ワサビペルオキシダーゼ (Selinus、オーストラリア) 1:400 希釈と共に、室温でさらに 30 分間インキュベーションした。プレートを洗浄緩衝液で徹底的に洗浄し、そして最後に、3, 3'-5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB、Sigma-Aldrich、米国) 基質と共に、室温で 10 分間インキュベーションした。1 モル/l H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を用いて 20 反応を停止し、そして ELISA プレート読み取り装置 (Bio-Rad 450、日本) 中、450 nm の光学密度 (OD 450 nm) を測定した。各プレートに対して、標準 IL-4 (Endogen、米国マサチューセッツ州) を適用し、プレート間変動を管理した。IL-4 感度限界は 9.4 pg/ml であった。試料中の IL-4 量は、Softmax プログラム (バージョン 2.3 FPU、米国) を用いて決定した。

【0042】

IFN- ELISA アッセイ

96 ウェル平底マイクロタイタープレート (Nunc、デンマーク) のウェルを、2  $\mu$ g/ml のマウス抗ヒト IFN- モノクローナル抗体 (Endogen、米国マサチューセッツ州) で、4 で一晩コーティングした。洗浄し、そしてブロッキングした後、全血 30 培養由来の上清または IFN- 標準 (Endogen、米国マサチューセッツ州) を、二つ組で添加し、そして 90 分間インキュベーションした。プレートを洗浄し、そしてビオチン化マウスモノクローナル抗ヒト IFN- 抗体 (Endogen、米国マサチューセッツ州) を添加した (0.25  $\mu$ g/ml)。90 分間インキュベーションした後、ウェルを洗浄し、そしてストレプトアビジンをコンジュゲート化した西洋ワサビペルオキシダーゼ (Selinus、オーストラリア) を 1:2000 希釈で適用した。プレートを洗浄し、そして TMB 色素原 (Sigma-Aldrich、米国) を各ウェルに添加した。ELISA プレート読み取り装置 (Bio-Rad 450、日本) 中、450 nm で吸光度を読み取った。IFN- 感度限界は 9.4 pg/ml であった。試料中の IFN- 量は、Softmax プログラム (バージョン 2.3 FPU、米国) を用いて決定 40 した。

【0043】

ピロリ菌抗体の検出

96 ウェル平底マイクロタイタープレートのウェルを、5  $\mu$ g/ml のピロリ菌 AGE で、4 で一晩コーティングした。洗浄し、そしてブロッキングした後、1:3000 希釈の血清試料および 1:4 希釈の唾液試料を、三つ組でウェルに添加した。西洋ワサビペルオキシダーゼをコンジュゲート化したヒツジ抗 IgG (Selinus、オーストラリア) を 1:2000 希釈で適用した。発色には、テトラメチルベンジジン (TMB) 基質 (Sigma-Aldrich、米国) を用いた。ELISA プレート読み取り装置 (Bio-Rad 450、日本) 中、450 nm で吸光度を読み取った。結果は、プールの陽 50

性血清の参考標準に対するELISA単位として表した。アッセイ内およびアッセイ間変動は、10%未満であった。

【0044】

#### 統計解析

データは平均±標準誤差(SE)として表した。相関Z検定を用いて、粘膜および血液サイトカイン産生間の相関に関して試験した。患者群間の平均の相違は、ANOVAによって解析した。すべての統計解析は、StatView 4.5ソフトウェアプログラム(Abacus Concepts、米国カリフォルニア州)を用いることによって行った。p値が0.05未満である場合、有意差とみなした。

【0045】

#### 結果

ピロリ菌感染状態および抗生物質治療の結果にしたがって、被験者を4つの群に分けた。23人のピロリ菌陰性被験者；20人のピロリ菌陽性被験者；根絶療法の6-8週間後、組織像または $C^{14}$ 呼吸試験によって、ピロリ菌根絶に成功したことが確認された、9人の被験者；および抗生物質療法後、ピロリ菌耐性であった11人の被験者であった。根絶に失敗した被験者の診断および療法措置の詳細を表1に示す。

【0046】

#### 血液および粘膜IL-4反応の比較

ピロリ菌感染への血液および粘膜サイトカイン反応間の相関があるかどうか決定するため、ピロリ菌抗原刺激または未刺激全血培養中のIL-4産生レベルを、胃粘膜培養中のレベルと比較した(図1)(抗原刺激した培養からのデータは示していない)。ピロリ菌陽性(n=6)および陰性被験者(n=11)、並びに根絶に失敗した被験者(n=8)の結果は、全血培養(刺激または未刺激)中のIL-4産生が胃粘膜中のものと相関することを示した( $r^2 = 0.549$ 、 $p < 0.001$ )。

【0047】

#### 全血培養中のIL-4およびIFN- $\gamma$ 産生

根絶に失敗した被験者由来の、ピロリ菌AGE刺激または未刺激全血培養には、ピロリ菌根絶に成功した被験者( $p < 0.05$ 、0および $1.0 \mu\text{g/ml}$ ピロリ菌AGE； $p < 0.01$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ ピロリ菌AGE)または感染を治療していない被験者( $p < 0.05$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ ピロリ菌AGE)に比較して、有意により低いレベルのIL-4が検出された(図2)。IL-4レベルは、非感染被験者および感染被験者で同様であり、そして根絶に成功した被験者に比較した際、有意に異ならなかった(しかし、根絶後、レベル増加に向かう傾向があった)。異なる群間でIFN- $\gamma$ レベルの統計的に有意な相違はなかったが、ピロリ菌根絶に成功した被験者では、より低いレベルが検出された(図3)。療法クール数と関わりなく、耐性ピロリ菌に現在感染している被験者の大部分で、低レベルのIL-4分泌が見られた(表2)。

【0048】

#### 血清および唾液中の抗ピロリ菌IgGレベル

血清および唾液IgG抗体レベルはどちらも、ピロリ菌に関して陽性である被験者におけるより、非感染被験者( $p < 0.05$ )において、そして根絶療法6-8週間後の被験者( $p < 0.05$ )において、有意により低かった。唾液および血清抗体両方に関して、感染根絶に失敗した被験者において、抗体がより低いレベルに向かう傾向が見られたが、これは、統計的有意性には足りなかった(図4)。

【0049】

【表1】

10

20

30

40

表 1：抗生物質療法に失敗した被験者の臨床的特徴描写

番号	年齢 (歳)	診断	使用した治療措置	抗生物質 クール数	期間 (月)
1	40	H p 誘導胃炎	メトロニダゾール/アモキシシリン/ピスマス/ラニチジンHC I クラリスロマイシン/メトロニダゾール/ランソプラゾール/アモキシシリン	1 2	24
2	58	H p 誘導胃炎	ロゼックHP 7	1	12
3	55	食道炎およびH p 誘導胃炎	クラシッドHP 7 ヘリダック/ラニチジンHC I ランソプラゾール	1 1	>3年
4	47	H p 誘導胃炎	ロゼックHP 7	2	20
5	37	H p 誘導胃炎	メトロニダゾール ロゼックHP 7	1 3	5
6	45	H p 誘導胃炎	ロゼックHP 7/ラニチジンHC I	3	28

10

20

30

40

【 0 0 5 0 】

【 冊 2 】

【 0 0 5 1 】  
【 表 3 】

番号	年齢 (歳)	診断	使用した治療措置	抗生物質 クール数	期間 (月)
7	27	H p 誘導胃炎	ロゼックHP7	3	6
8	33	H p 誘導胃炎および 十二指腸潰瘍疾患	クラリスロマイシン/テトラサイクリン/メトロニダゾール/ランソプラゾール ヘリダック	1 2	>3年
9	26	H p 誘導胃炎	ロゼックHP7	2	10
10	47	H p 誘導胃炎	ロゼックHP7	3	>3年
11	73	食道炎、H p 誘導胃炎および 十二指腸潰瘍疾患	ロゼックHP7	3	>3年

H p =ピロリ菌；ヘリダック=ベスマス/メトロニダゾール/テトラサイクリン；クラシットHP7=オメプラゾール/アモキシシリン/クラリスロマイシン；  
ロゼックHP7=オメプラゾール/アモキシシリン/クラリスロマイシン

表2：根絶に失敗した被験者におけるIL-4およびピロリ菌抗体IgG

失敗回数	被験者数	IL-4レベル				ピロリ菌抗体IgG*		
		ピロリ菌抗原 (0 µg/mL)	ピロリ菌抗原 (1 µg/mL)	ピロリ菌抗原 (10 µg/mL)	血清 (ELISA単位)	唾液 (ELISA単位)		
1回	1	20.76	28.21	44.20	214	116.3		
2回	3	40.49 ± 29.36	54.07 ± 43.14	65.22 ± 45.86	224 ± 101.58	1000.2 ± 866.5		
3回	5	45.16 ± 36.16	53.34 ± 44.34	55.63 ± 44.19	410.95 ± 167.29	418.9 ± 151.96		
4回	2	18.82 ± 9.82	22.56 ± 13.58	12.60 ± 3.6	1453.6 ± 1244.4	523.7 ± 235.3		

\* 平均の標準誤差 (SEM).

10

20

30

【0052】

当業者は、上記を考慮して、IL-4、INF- およびIgGを用いて、感染の治療前にまたは治療中に、ヘリコバクター感染の根絶に成功する可能性を予測可能であることを理解するであろう。必然的に、該方法を用いて、ヘリコバクター感染の治療に反応する可能性がない被験者も同定可能であることが明らかであろう。

40

【0053】

本発明は、特定の実施例に関連して記載されてきているが、本発明は、本発明の概念の精神または目的から逸脱することなく、多くの他の形で実行可能であることが、当業者には認識されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】唾液IgG2抗ピロリ菌抗体の安定性

【図2】ピロリ菌根絶前および後の唾液IgG(パネルA)およびIgG2(パネルB)抗ピロリ菌抗体

50

【図3】ピロリ菌に感染した、および感染していない被験者における、唾液 I g G (パネル A) および I g G 2 (パネル B) 抗ピロリ菌抗体

【図4】全血および胃組織培養における I L - 4 産生間の相関。全血培養または胃幽門洞生検培養を、37 で 24 時間インキュベーションし、その後、I L - 4 レベルを E L I S A 捕捉アッセイによって測定した。粘膜および全血 I L - 4 間の相関を示す結果 ( p < 0 . 0 0 1 ) 。

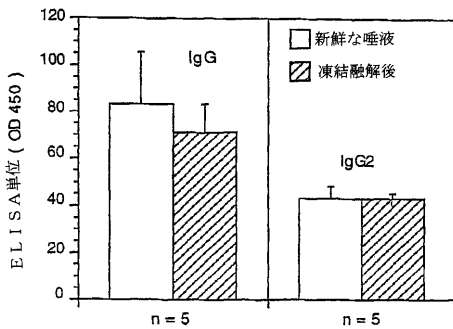
【図5】ピロリ菌 A G E 抗原で刺激した全血培養中の I L - 4 レベル。ピロリ菌に感染した、または感染していない、あるいは根絶に失敗した被験者から得た末梢血を、示したように段階的な濃度でピロリ菌 A G E 抗原を含有する、等量の A I M - V 培地に添加した。培養 24 時間後、I L - 4 レベルを E L I S A 捕捉アッセイによって測定した。示した結果は、平均 ± 平均の標準誤差である。\* : p < 0 . 0 5 : ピロリ菌根絶被験者と比較 ; ¶ : p < 0 . 0 1 および p < 0 . 0 5 : それぞれ、ピロリ菌根絶およびピロリ菌陽性の被験者からの値と比較。

【図6】全血における、ピロリ菌、酸 - グリシン抽出物刺激に反応した I F N - 産生。個々の被験者から末梢血を収集し、そして段階的な濃度のピロリ菌 A G E 抗原の存在下で 24 時間培養した。培養上清を収集し、そして E L I S A によって I F N - に関してアッセイした。示した結果は、平均 ± 平均の標準誤差であった。N S : 有意でない。

【図7】血清および唾液中の特異的ピロリ菌 I g G 抗体レベル。個々の被験者から血清および唾液試料を収集した。特異的ピロリ菌 I g G レベルを E L I S A によって測定した。示した結果は、平均 ± 平均の標準誤差であった。\* : p < 0 . 0 5 : ピロリ菌陽性群の平均と比較 ; N S : 有意でない。

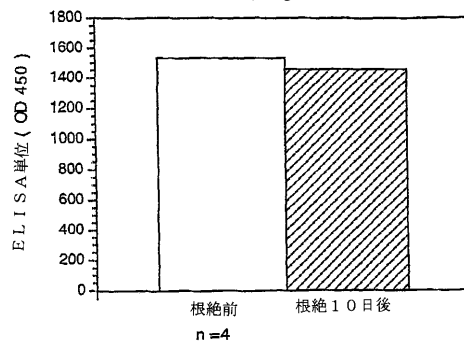
【図1】

唾液 I g G 2 抗体の安定性

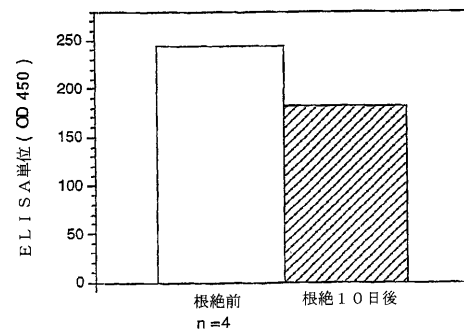


【図2】

A 唾液 I g G 抗体



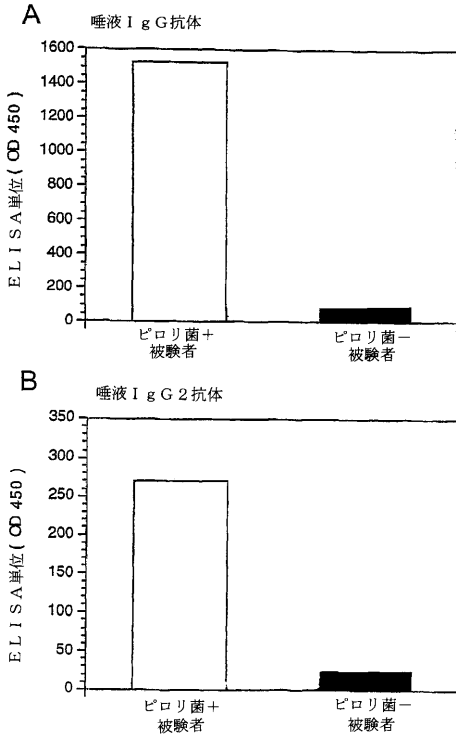
B 唾液 I g G 2 抗体



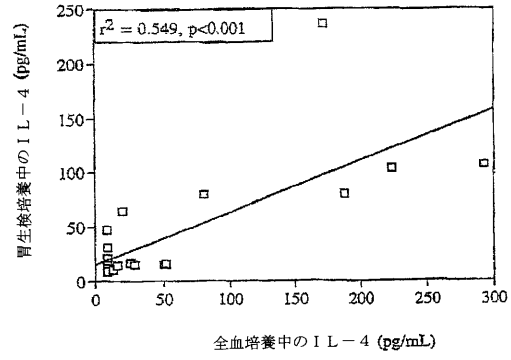
10

20

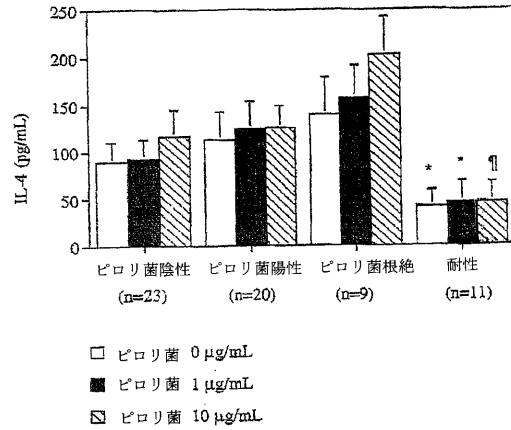
【 図 3 】



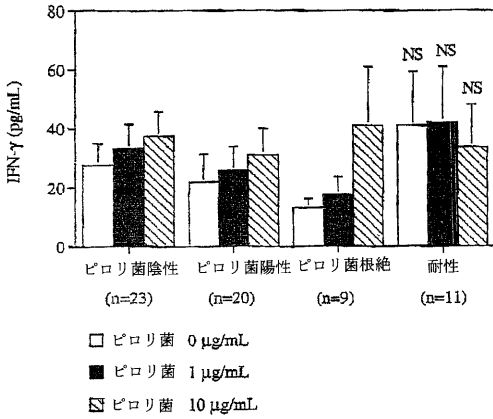
【 図 4 】



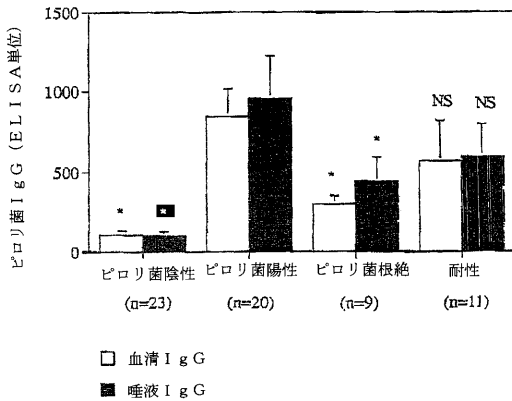
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/03065 A1

(51) International Patent Classification: G01N 33/53, (74) Agent: BALDWIN SHELSTON WATERS, 60 Margaret Street, Sydney, NSW 2000 (AU).

(21) International Application Number: PCT/AU01/00795

(22) International Filing Date: 3 July 2001 (03.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 3 July 2000 (03.07.2000) AU PQ 8541

(71) Applicant (for all designated States except US): HELLRAD PTY LTD [AU/AU]; Charters Pty Ltd, 8th Floor, 19 Pier Street, Perth, WA 6000 (AU).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): CLANCY, Robert, Llewellyn [AU/AU]; 11 High Street, Newcastle, NSW 2300 (AU). BORODY, Thomas, Julius [AU/AU]; 144 Great North Road, Five Dock, NSW 2046 (AU). PANG, Gerald [AU/AU]; 4255 Billiard Avenue, Elizabeth Bay, NSW 2011 (AU). REN, Zhigang [CN/AU]; 12B Vitre Street, Lambton, NSW 2299 (AU).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:  
— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/03065 A1

(54) Title: METHODS FOR MONITORING TREATMENT OF HELICOBACTER INFECTION AND FOR PREDICTING THE LIKELIHOOD OF SUCCESSFUL ERADICATION

(57) Abstract: The present invention relates to methods for monitoring treatment of Helicobacter infection and in particular to methods for monitoring eradication of *Helicobacter pylori* infection using immunoglobulin G2 (IgG2). The invention also relates to methods for predicting the likelihood of successful eradication of Helicobacter infection in a subject to be treated or being treated for the infection and in particular, to methods for predicting the likelihood of successful eradication including determining the levels of interleukin-4, interferon- $\gamma$  and IgG in the subject to be, or being treated.

WO 02/03065

PCT/AU01/00795

1

METHODS FOR MONITORING TREATMENT OF HELICOBACTER INFECTION AND  
FOR PREDICTING THE LIKELIHOOD OF SUCCESSFUL ERADICATION

**TECHNICAL FIELD**

The present invention relates to methods for monitoring treatment of *Helicobacter* infection and in particular to methods for monitoring eradication of *Helicobacter pylori* infection using immunoglobulin G2 (IgG2). The invention also relates to methods for predicting the likelihood of successful eradication of *Helicobacter* infection in a subject to be treated or being treated for the infection and in particular, to methods for predicting the likelihood of successful eradication including determining the levels of interleukin-4, interferon- $\gamma$  and IgG in the subject to be, or being treated.

**BACKGROUND ART**

Any discussion of the prior art throughout the specification should in no way be considered as an admission that such prior art is widely known or forms part of common general knowledge in the field.

*Helicobacter pylori* infection is now recognised as an essential pre-requisite for the development of gastric cancer. About 30% of the population become infected with this bacterium and commonly present with chronic gastritis. This may be complicated by gastric or duodenal ulceration, or may present as non-ulcer dyspepsia. A sizeable number of carriers are asymptomatic. However, in a small number of patients with *H. pylori*, their condition evolves through stages (including epithelial cell metaplasia and dysplasia) into neoplasia.

Current Management Practice of *H. pylori* Infection

Eradication of infection with antibiotics induces an 80-90% cure rate of peptic ulceration. A widely accepted treatment paradigm is based on detection of infection using antibody assays, followed by combination antibiotic therapy without prior endoscopic diagnosis. Endoscopy, before eradication therapy is generally accepted when 'danger' symptoms (eg, severe pain, bleeding) occur, or a significant risk of gastric cancer is present. However, endoscopy is a procedure which is associated with its own risks and is to be avoided if possible.

*H. pylori* initiates an IgG antibody response in saliva as well as serum. The serum IgG antibody is the basis of non-invasive diagnosis. Eradication of infection is followed by a very slow fall in serum antibody levels. There has been a study which suggests that IgG antibody levels at 6 months may be of value in assessing successful eradication. Saliva levels of IgG antibody however fall much quicker following eradication, with levels at 6 weeks regularly less than 80% of those prior to antibiotic therapy.

The concept that saliva IgG antibody levels may predict successful eradication, while attractive, proved not to be a practical proposition for monitoring of progress of treatment or eradication of *Helicobacter* because total IgG antibody levels were unstable to the extent that a viable test in clinical circumstances proved unreliable. At present, no non-invasive stable test exists which would allow successful monitoring of treatment designed to eradicate *Helicobacter* infection.

Further, in addition to monitoring eradication of *H. pylori* in individuals treated, it would be desirable to have a test which could be used prior to, or during treatment to determine the likelihood of successful eradication of *H. pylori*.

It is an object of the present invention to overcome or ameliorate at least one of the disadvantages of the prior art, or to provide a useful alternative.

**SUMMARY OF THE INVENTION**

According to a first aspect there is provided a method of monitoring eradication of *Helicobacter* infection in a subject treated for the infection, including:

- a) determination of IgG2 anti-*H. pylori* antibody level in a saliva sample;
- b) comparison of the IgG2 anti-*H. pylori* antibody level with a predetermined control IgG2 anti-*H. pylori* antibody level, wherein a reduction in the level of IgG2 anti-*H. pylori* antibody in the saliva sample compared to the control indicates eradication of *Helicobacter*.

According to a second aspect there is provided a method of monitoring efficacy of treatment of *Helicobacter* infection in a subject treated for the infection, including:

- a) determination of IgG2 anti-*H. pylori* antibody level in a saliva sample;
- b) comparison of the IgG2 anti-*H. pylori* antibody level with a predetermined control IgG2 anti-*H. pylori* antibody level, wherein a reduction in the level of IgG2 anti-*H. pylori* antibody in the saliva sample compared to the control indicates efficacious treatment of *Helicobacter*.

According to a third aspect there is provided a method of monitoring relapse or reinfection with *Helicobacter* in a subject treated for infection with *Helicobacter*, including:

- a) determination of IgG2 anti-*H. pylori* antibody level in a saliva sample;
- b) comparison of the IgG2 anti-*H. pylori* antibody level with a predetermined control IgG2 anti-*H. pylori* antibody level, wherein an increase in the level of IgG2 anti-*H. pylori* antibody in the saliva sample compared to the control indicates relapse or reinfection with *Helicobacter*.

According to a fourth aspect there is provided a method of detecting unresponsiveness of a subject to treatment of *Helicobacter* infection, including:

- a) determination of IgG2 anti-*H. pylori* antibody level in a saliva sample;

WO 02/03065

4

PCT/AU01/00795

b) comparison of the IgG2 anti-*H. pylori* antibody level with a predetermined control IgG2 anti-*H. pylori* antibody level, wherein lack of change in the level of IgG2 anti-*H. pylori* antibody in the saliva sample compared to the control indicates lack of response to treatment.

According to a sixth aspect there is provided a kit for monitoring treatment of *Helicobacter* infection, including,

- a) *Helicobacter* antigen
- b) reagent for determining IgG2 subclass antibody.

Preferably, the IgG2 anti-*H. pylori* antibody is detected by a near-subject assay. The assay may, however, also be a laboratory-based test. Preferably, the assay is an antibody assay although it will be understood that other known methods of measurement can also be effectively used. Most preferably, the assay is an immunoassay such as ELISA, RIA or a similar assay format.

Control levels of IgG2 anti-*H. pylori* antibody can be established in samples of saliva obtained from normal individuals, ie. those not having an established *H. pylori* infection. It is preferred however that control levels of IgG2 be determined in subject's own saliva prior to commencement of treatment for infection or, if monitoring relapse or reinfection, the levels of salivary IgG2 following successful eradication of *Helicobacter*.

According to a seventh aspect, the present invention provides a method of predicting the likelihood of successful eradication of *Helicobacter* infection in a subject to be treated or being treated for the infection, including:

- (i) determination of IL-4 level in a sample from the subject;
- (ii) comparison of the IL-4 level with a predetermined control or standard IL-4 level,
- (iii) wherein a level of IL-4 in the sample from the subject above the control or standard IL-4 level is predictive of the likelihood of successful eradication and a level of IL-4 below the control or standard IL-4 level is predictive of the likelihood of eradication failure.

WO 02/03065

5

PCT/AU01/00795

Preferably, the sample is a blood sample.

Preferably, the IL-4 is detected by an immunoassay and more preferably, it is determined by ELISA.

The skilled addressee will readily be able to identify a suitable control or standard IL-4 level. For example, the control or standard level of IL-4 may be established from analysis of samples obtained from subjects not infected by *H. pylori* and/or subjects having successfully eradicated *H. pylori* and/or subjects infected by *H. pylori*.

According to an eighth aspect, the present invention provides a method of predicting the likelihood of successful eradication of Helicobacter infection in a subject to be treated or being treated for the infection, including:

- (i) determination of interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) level in a sample from the subject;
- (ii) comparison of the INF- $\gamma$  level with a predetermined control or standard INF- $\gamma$  level,
- (iii) wherein a level of INF- $\gamma$  in the sample from the subject below the control or standard INF- $\gamma$  level is predictive of the likelihood of successful eradication and a level of INF- $\gamma$  above the control or standard level is predictive of the likelihood of eradication failure.

Preferably, the INF- $\gamma$  level is determined in a blood sample.

Preferably, the INF- $\gamma$  level is detected by an immunoassay and preferably the assay is ELISA.

The skilled addressee will readily be able to establish a suitable control or standard. For example, the control or standard level of INF- $\gamma$  may be established from analysis of samples obtained from subjects not infected by *H. pylori* and/or subjects having successfully eradicated *H. pylori* and/or subjects infected by *H. pylori*.

According to a ninth aspect, the present invention provides a method of predicting the likelihood of successful eradication of Helicobacter infection in a subject to be treated or being treated for the infection, including:

WO 02/03065

6

PCT/AU01/00795

- (i) determination of immunoglobulin G (IgG) level in a sample from the subject;
- (ii) comparison of the IgG level with a predetermined control or standard IgG level,
- (iii) wherein a level of IgG in the sample from the subject below the control or standard level is predictive of the likelihood of successful eradication and a level of IgG above the control or standard level is predictive of the likelihood of eradication failure.

Preferably, the IgG level is determined in a serum sample and, more preferably, the sample is a saliva sample.

The skilled addressee will readily be able to establish a suitable control or standard level of IgG. For example, the control or standard level of IgG may be established from analysis of samples obtained from subjects not infected by *H. pylori* and/or subjects having successfully eradicated *H. pylori* and/or subjects infected by *H. pylori*.

According to a tenth aspect, the present invention provides a method of predicting the likelihood of successful eradication of Helicobacter infection in a subject to be treated or being treated for the infection, including:

- (i) determination a combination of IL-4 and/or INF- $\gamma$  and/or IgG levels in a sample from the subject;
- (ii) comparison of the IL-4 and/or INF- $\gamma$  and/or IgG levels with a predetermined control or standard IL-4 and/or INF- $\gamma$  and/or IgG level respectively,

wherein a level of IL-4 in the sample from the subject above the control or standard level is predictive of the likelihood of successful eradication and a level of IL-4 below the control or standard level is predictive of the likelihood of eradication failure, and

wherein a level of INF- $\gamma$  in the sample from the subject below the control or standard level is predictive of the likelihood of successful eradication and a level of INF- $\gamma$  above the control or standard level is predictive of the likelihood of eradication failure, and

wherein a level of IgG in the sample from the subject below the control or standard level is

WO 02/03065

7

PCT/AU01/00795

predictive of the likelihood of successful eradication and a level of IgG above the control or standard level is predictive of the likelihood of eradication failure.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 Stability of salivary IgG2 anti-*Helicobacter pylori* antibody.

Figure 2 Salivary IgG (panel A) and IgG2 (panel B) anti-*H. pylori* antibody before and after eradication of *H. pylori*.

Figure 3 Salivary IgG (panel A) and IgG2 (panel B) anti- *H. pylori* antibody in subject with and without *H. pylori* infection.

Figure 4 Correlation between IL-4 production in whole blood and gastric tissue cultures.

Whole blood cultures or gastric antrum biopsy cultures were incubated for 24 hours at 37°C, after which time the levels of IL-4 were measured by ELISA capture assay. The results shown a correlation between mucosal and whole blood IL-4 ( $p < 0.001$ ).

Figure 5 Levels of IL-4 in whole blood culture stimulated with *H. pylori* AGE antigen.

Peripheral blood obtained from subjects with or without *H. pylori* infection, or with eradication failure was added to equal volume of AIM-V culture medium containing graded concentrations of *H. pylori* AGE antigen as indicated. After 24 hours of culture, levels of IL-4 were measured by ELISA capture assay. Results shown are the mean  $\pm$  standard error of the mean. \*:  $p < 0.05$ ; compared with *H. pylori*-eradicated subjects; †:  $p < 0.01$  and  $p < 0.05$  compared with the values from subjects with *H. pylori*-eradicated and *H. pylori*-positive, respectively.

Figure 6 IFN- $\gamma$  production in response to *H. pylori* acid-glycine extract stimulation in whole blood. Peripheral blood was collected from individual subject and cultured in the presence of graded concentration of *H. pylori* AGE antigen for 24 hours. Culture supernatants were collected and assayed for IFN- $\gamma$  by ELISA. Results shown were mean  $\pm$  standard error of the mean. NS: Not Significant.

WO 02/03065

8

PCT/AU01/00795

Figure 7 Levels of specific *H. pylori* IgG antibody in serum and saliva. Serum and saliva samples were collected from individual subjects. Levels of specific *H. pylori* IgG were measured by ELISA. Results shown were mean  $\pm$  standard error of the mean. \*:  $p < 0.05$  compared with mean from *H. pylori*-positive group; NS: Not Significant.

#### DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

It has surprisingly been found that salivary IgG2 anti-*H. pylori* antibody is stable and allows a reliable test to be developed for monitoring progress of treatment and/or eradication of *Helicobacter pylori* infection in a subject undergoing treatment.

It was previously known that IgG anti-*H. pylori* antibody levels in blood and gastric mucosa can be used as an indicator of *H. pylori* status. There has been an attempt to use IgG anti-*H. pylori* antibody in saliva for a similar purpose but it proved to be unstable in such a sample. From the following examples it will be understood that while IgG anti-*H. pylori* may be useful as a general indicator of *H. pylori* status, it is the measurement of the IgG2 subclass anti-*H. pylori* antibody which allows a stable treatment monitoring test to be developed.

It has further surprisingly been found that IL-4 levels can be used as a predictor of successful eradication of *H. pylori*. It is envisaged that an IL-4 test could be used prior to, or during the treatment of *H. pylori* infection in order to predict the likelihood of eradication.

Techniques for measurement of antibodies and IL-4 in human samples are well-known in the art and protocols and reagents are readily available. Examples of some of the techniques used are indicated below as an illustration of how some measurements may be performed.

Unless indicated otherwise, standard techniques which can be ascertained from standard texts and laboratory manuals may be employed.

WO 02/03065

9

PCT/AU01/00795

The invention will now be described in more detail with reference to non-limiting examples.

#### EXAMPLES

##### Example 1 Determination of antibody levels in saliva samples

###### Sample Collection

Saliva samples were collected from 4 patients infected with *H. pylori* who were treated with eradication triple therapy comprised of amoxicillin, omeprazole and clarithromycin for seven days. Samples were taken before treatment and after 10 days of eradication therapy.

###### H. pylori antigen preparation

*H. pylori* NCTC 11637 strain was used for *H. pylori* antigen preparation according to modified methods described by Goodwin (#208). Protein concentration in the extract was measured using a bio-rad kit (Bio-rad laboratories Australia). Aliquots were stored at -70°C.

###### Antibody detection by ELISA

For saliva anti-*H. pylori* antibody detection, wells of a 96-well flat-bottomed microtiter Polysorb plate (Nunc, Denmark) were coated with 7 µg/mL of *H. pylori* antigen at 4°C overnight. After washing and blocking the plates with 5% skim milk (Diploma, Australia) in PBS-Tween 20, saliva samples at 1:2 dilution with 2% PEG 6000 were added to individual wells in triplicate. After incubation, the wells were washed and horseradish peroxidase conjugated-sheep anti-IgG or anti-IgG2 (Silenus, Australia) at 1:2000 dilution was added to each well. Following a further incubation, the plates were washed and then tetramethyl benzidine (TMB) substrate (Sigma, USA) was added to each well. The reaction was stopped using 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the absorbance was read at 450 nm in an ELISA plate reader (Bio-Rad 450, Japan). The results were expressed as ELISA INDEX being the mean OD<sub>450</sub> of a given saliva sample divided by the mean OD<sub>450</sub> of the calibrating sample. Positive and

WO 02/03065

10

PCT/AU01/00795

negative quality control samples were included in each run to control for intra- and inter-assay variation.

Saliva samples were obtained from 5 subjects infected with *H. pylori*. The samples were tested for IgG2 and total IgG anti-*H. pylori* antibody by the ELISA assay either fresh or after storage for up to 12 months. The results show that IgG2 antibody levels were more stable than IgG antibody levels (Figure 1). Hence, IgG2 antibody is a reliable and a sensitive indicator of infection status due to its stability during storage and assay.

**Example 2 Anti-*H. pylori* antibody levels in saliva from patients undergoing eradication therapy.**

Saliva samples from subjects undergoing antibiotic eradication therapy were tested for anti-*H. pylori* antibody using the immunoassay method described in Example 1.

IgG and IgG2 antibody was measured before and after treatment with antibiotics. Ten days after treatment IgG2 antibody levels fell quicker than total IgG antibody levels (Figure 2A and 2B).

In a separate study it was shown that saliva from subjects with *H. pylori* infection have markedly elevated levels of IgG2 (Figure 3A) when compared to subjects without infection (Figure 3B). Subjects who failed to ultimately eradicate the infection did not demonstrate a significant drop in the level of IgG2 anti-*H. pylori* antibody.

**Example 3 - Interleukin-4/IFN- $\gamma$  and IgG Studies**

Subjects

Fifty-two subjects referred for investigation of dyspepsia, and 11 subjects with persistent *H. pylori* infection following one or more courses of antibiotics, were recruited for this study. Subjects with dyspepsia had not taken antibiotics within three months of the study. The study was approved by the Ethics Committee of the Centre for Digestive Diseases, Sydney,

WO 02/03065

11

PCT/AU01/00795

Australia. Informed consent was obtained from all patients. Multiple biopsy specimens were obtained during upper gastrointestinal endoscopy from the antrum and the body of the stomach to be used for tissue culture, histology and a urease test (CLO test, Delta West, WA, Australia). Blood samples were incubated at 37°C within 2 hours of collection. Serum was stored at -70°C for *H. pylori* specific antibody.

#### Saliva sample collection

Saliva samples were collected before the endoscopy procedure. Samples were centrifuged at 1000 x g for 10 minutes at 4°C, and aliquots were stored at -70°C.

#### Biopsy culture

Gastric biopsy tissues were weighted and cultured at a ratio of 50 µL serum-free AIM-V medium (Life Technology, Australia) per mg tissue (wet weight) for 24 hours. The culture supernatants were collected and centrifuged. Aliquots were stored at -70°C until assay.

#### *H. pylori* antigen preparation

*H. pylori* antigens from the NCTC 11637 strain were prepared by acid-glycine extraction (AGE) according to the method described by Goldwin et al (*J Infect Dis* 1987; 155:488-94).

*H. pylori* AGE was used for cell culture and specific antibody measurement.

#### ELISA capture assay for IL-4 in whole blood culture

Cytokine levels in whole blood culture were measured following the method described previously (Ren et al, *Helicobacter* 2000; 5:135-41). Briefly, 150 µL of heparinized whole blood was added in triplicate to wells of a 96-well microtitre flat-bottomed plate pre-coated with mouse polyclonal anti-human IL-4 antibody (Endogen, MA, USA). An equal volume of AIM-V medium containing *H. pylori* AGE at either 0, 1 or 10 µg/mL was also loaded to wells. The cultures were incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours, after which time supernatants were collected for interferon-γ (IFN-γ) assay. The amount of 'captured' IL-4 was measured by ELISA as following. Briefly, after washing the plates, biotinylated mouse

WO 02/03065

12

PCT/AU01/00795

monoclonal anti-human IL-4 antibody (Endogen, MA, USA) was added (0.5 µg/mL) to wells and incubated for 90 minutes at room temperature. The plates were then washed and incubated for a further 30 minutes at room temperature with streptavidin-conjugated horse-radish peroxidase (Selinus, Australia) at a 1:400 dilution. The plates were thoroughly washed with washing buffer and finally incubated for 10 minutes at room temperature with 3,3'-5,5'-tetramethyl benzidine (TMB, Sigma-Aldrich, USA) substrate. The reaction was stopped using 1 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and optical density at 450 nm (OD 450nm) was measured in an ELISA plate reader (Bio-Rad 450, Japan). Standard IL-4 (Endogen, MA, USA) was applied for each plate to control plate to plate variation. The limits of sensitivity for IL-4 was 9.4 pg/mL. The amount of IL-4 in samples was determined using a Softmax program (Version 2.3 FPU, USA).

#### IFN-γ ELISA assay

Wells of a 96-well flat-bottomed microtitre plate (Nunc, Denmark) were coated with mouse anti-human IFN-γ monoclonal antibody (Endogen, MA, USA) at 2 µg/mL overnight at 4°C. After washing and blocking, supernatants from whole blood culture or IFN-γ standards (Endogen, MA, USA) were added in duplicate, and incubated for 90 minutes. The plates were washed and biotinylated mouse monoclonal anti-human IFN-γ antibody (Endogen, MA, USA) was added (0.25 µg/mL). After 90 minutes incubation, the wells were washed and streptavidin-conjugated horse-radish peroxidase (Selinus, Australia) was applied at a 1:2000 dilution. The plates were washed and TMB chromagen (Sigma-Aldrich, USA) was added to each well. The absorbance was read at 450 nm in an ELISA plate reader (Bio-Rad 450, Japan). The limits of sensitivity for IFN-γ was 9.4 pg/mL. The amount of IFN-γ in samples was determined using a Softmax program (Version 2.3 FPU, USA).

#### Detection of *H. pylori* antibody

Wells of a 96-well flat-bottomed microtitre plate were coated with *H. pylori* AGE at 5

WO 02/03065

13

PCT/AU01/00795

$\mu\text{g/mL}$  at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight. After washing and blocking, serum samples at 1:3000 dilution and saliva sample at 1:4 dilution were added to wells in triplicate. Horse-radish peroxidase conjugated-sheep anti-IgG (Sclinus, Australia) was applied at 1:2000 dilution. Tetramethyl Benzidine (TMB) substrate (Sigma-Aldrich, USA) was used for colour development. The absorbance was read at 450 nm in an ELISA plate reader (Bio-Rad, 450, Japan). The results were expressed as ELISA Units against a reference standard of pooled positive sera. Intra- and inter-assay variation was less than 10%.

#### Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard error (SE). Correlation Z test was used to test for a correlation between mucosal and blood cytokine production. Differences of means among patient groups were analysed by ANOVA. All statistical analysis were performed by using a StatView 4.5 software program (Abacus Concepts, California, USA). Significant difference was considered when p value was less than 0.05.

#### RESULTS

Subjects were divided into four groups according to *H. pylori* infection status and results of antibiotic treatment. There were 23 *H. pylori*-negative subjects; 20 *H. pylori*-positive subjects; 9 subjects with successful *H. pylori* eradication confirmed by histology or  $\text{C}^{14}$  breath test at 6-8 weeks after eradication therapy; and 11 subjects with *H. pylori* resistance following antibiotic therapy. Details of diagnosis and therapeutic regimens in subjects with eradication failure are shown in Table 1.

#### Comparison of blood and mucosal IL-4 response

To determine whether there is a correlation between blood and mucosal cytokine responses to *H. pylori* infection, levels of IL-4 production in whole blood cultures stimulated or unstimulated with *H. pylori* antigens, were compared with levels in gastric mucosa cultures (Fig. 1) (data from antigen stimulated cultures not shown). The results from *H. pylori* positive

WO 02/03065

14

PCT/AU01/00795

(n=6) and negative subjects (n=11) and subjects with failed eradication (n=8) showed that IL-4 production in whole blood cultures (stimulated or unstimulated) correlated with that in gastric mucosa ( $r^2=0.549$ ,  $p<0.001$ ).

#### IL-4 and IFN- $\gamma$ production in whole blood culture

Significantly lower levels of IL-4 were detected in whole blood stimulated or unstimulated with *H. pylori* AGE from subjects with eradication failure compared with subjects in whom *H. pylori* was successfully eradicated ( $p<0.05$ , 0 and 1.0  $\mu\text{g/mL}$  *H. pylori* AGE;  $p<0.01$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  *H. pylori* AGE) or in subjects with untreated infection ( $p<0.05$ , 10  $\mu\text{g/mL}$  *H. pylori* AGE) (Fig 2). IL-4 levels were similar in non-infected and infected subjects, and were not significantly different when compared to subjects with successful eradication (though there was a trend towards increased levels following eradication). Although there was no statistically significant difference in the levels of IFN- $\gamma$  between the different groups, lower levels were detected in subjects with successful *H. pylori* eradication (Fig. 3). Low levels of IL-4 secretion were seen in most subjects with ongoing infection with resistant *H. pylori*, irrespective of the number of courses of therapy (Table 2).

#### Anti-*H. pylori* IgG levels in serum and saliva

Both serum and saliva IgG antibody levels were significantly lower in non-infected subjects ( $p<0.05$ ) and in subjects at 6-8 weeks after eradication therapy ( $p<0.05$ ) than in subjects who were positive for *H. pylori*. For both saliva and serum antibody, a trend towards lower levels of antibody in those failing to eradicate infection was seen, but this was short of statistical significance (Fig. 4).

Table 1: Clinical Characterisation of Subjects with Failed Antibiotic Therapy

No.	Age (years)	Diagnosis	Treatment Regimens Used	Number of Antibiotic Courses	Duration (months)
1	40	Hp-induced gastritis	metronidazole/amoxicillin/bismuth/ranitidine HCl	1	24
2	58	Hp-induced gastritis	clarithromycin/metronidazole/lausoprazole/amoxicillin Losec HP7	2	12
3	55	Oesophagitis and Hp-induced gastritis	Klacid HP7 Helidac/ranitidine HCl lausoprazole	1	>3yrs
4	47	Hp-induced gastritis	Losec HP7	2	20
5	37	Hp-induced gastritis	metronidazole Losec HP7	1	5
6	45	Hp-induced gastritis	Losec HP7/ranitidine HCl	3	28

PCT/AU01/00795

No.	Age (years)	Diagnosis	Treatment Regimens Used	Number of Antibiotic Courses	Duration (months)
7	27	Hp-induced gastritis	Losac HP7	3	6
8	33	Hp-induced gastritis and duodenal ulcer disease	clarithromycin/tetracycline/metronidazole/lansoprazole Helidac	1 2	>3yrs
9	26	Hp-induced gastritis	Losac HP7	2	10
10	47	Hp-induced gastritis	Losac HP7	3	>3yrs
11	73	Oesophagitis, Hp-induced gastritis and duodenal ulcer disease	Losac HP7	3	>3yrs

Hp= *Helicobacter pylori*; Helidac= bismuth/metronidazole/tetracycline; Klacid HP7= omeprazole/amoxicillin/clarithromycin;  
Losac HP7= omeprazole/amoxicillin/clarithromycin

WO 02/03065

PCT/AU01/00795

Table 2: IL-4 and *H. pylori* Antibody IgG in Subjects with Failure Eradication

Times of failure	No. Subjects	IL-4 levels (pg/mL)*			H. pylori Antibody IgG*	
		<i>H. pylori</i> antigen (0 µg/mL)	<i>H. pylori</i> antigen (1 µg/mL)	<i>H. pylori</i> antigen (10 µg/mL)	Serum (ELISA Unit)	Saliva (ELISA Unit)
One	1	20.76	28.21	44.20	214	116.3
Two	3	40.49 ± 29.36	54.07 ± 43.14	65.22 ± 45.86	224 ± 101.58	1000.2 ± 866.5
Three	5	45.16 ± 36.16	53.34 ± 44.34	55.63 ± 44.19	410.95 ± 167.29	418.9 ± 151.96
Four	2	18.82 ± 9.82	22.56 ± 13.58	12.60 ± 3.6	1453.6 ± 1244.4	523.7 ± 235.3

\* Standard error of mean (SEM).

The skilled addressee will understand that, in light of the above, IL-4, INF- $\gamma$  and IgG can be used to predict the likelihood of successful eradication of *Helicobacter* infection before or during treatment of the infection. As a corollary, it will be clear that the method can also be used to identify subjects unlikely to respond to treatment for

5 *Helicobacter* infection.

Although the invention has been described with reference to specific examples, it will be appreciated by those skilled in the art that the invention may be embodied in many other forms without departing from the spirit or intent of the inventive concept.

## THE CLAIMS DEFINING THE INVENTION ARE AS FOLLOWS:

1. A method of monitoring eradication of *Helicobacter* infection in a subject treated for the infection, including:
  - 5 i) determination of IgG2 anti-*H. pylori* antibody level in a saliva sample;
  - ii) comparison of the IgG2 anti-*H. pylori* antibody level with a predetermined control IgG2 anti-*H. pylori* antibody level, wherein a reduction in the level of IgG2 anti-*H. pylori* antibody in the saliva sample compared to the control indicates eradication of *Helicobacter*.
- 10 2. A method of monitoring efficacy of treatment of *Helicobacter* infection in a subject treated for the infection, including:
  - 15 i) determination of IgG2 anti-*H. pylori* antibody level in a saliva sample;
  - ii) comparison of the IgG2 anti-*H. pylori* antibody level with a predetermined control IgG2 anti-*H. pylori* antibody level, wherein a reduction in the level of IgG2 anti-*H. pylori* antibody in the saliva sample compared to the control indicates efficacious treatment of *Helicobacter*.
- 20 3. A method of monitoring relapse or reinfection with *Helicobacter* in a subject treated for infection with *Helicobacter*, including:
  - i) determination of IgG2 anti-*H. pylori* antibody level in a saliva sample;

- ii) comparison of the IgG2 anti-*H. pylori* antibody level with a predetermined control IgG2 anti-*H. pylori* antibody level, wherein an increase in the level of IgG2 anti-*H. pylori* antibody in the saliva sample compared to the control indicates relapse or reinfection with Helicobacter.
- 5
4. A method of detecting unresponsiveness of a subject to treatment of Helicobacter infection, including:
- (i) determination of IgG2 anti-*H. pylori* antibody level in a saliva sample;
- (ii) comparison of the IgG2 anti-*H. pylori* antibody level with a predetermined control IgG2 anti-*H. pylori* antibody level, wherein lack of change in the level of IgG2 anti-*H. pylori* antibody in the saliva sample compared to the control indicates lack of response to treatment.
- 10
5. A method according to any one of claims 1 to 4, wherein the IgG2 anti-*H. pylori* antibody is detected by an immunoassay.
- 15
6. A method according to claim 5, wherein the assay is ELISA.
7. A method according to any one of claims 1 to 6, wherein the control levels of IgG2 anti-*H. pylori* antibody is established in samples of saliva obtained from subjects not infected by *H. pylori*.
8. A method according to any one of claims 1 to 6, wherein the control levels of IgG2 anti-*H. pylori* antibody are determined in subject's own saliva sample.
- 20
9. A kit for monitoring treatment of Helicobacter infection, including,
- (i) Helicobacter antigen
- (ii) reagent for determining IgG2 subclass antibody.

10. A method of predicting the likelihood of successful eradication of *Helicobacter* infection in a subject to be treated or being treated for the infection, including:
- (i) determination of IL-4 level in a sample from the subject;
  - (ii) comparison of the IL-4 level with a predetermined control or standard IL-4 level,
  - (iii) wherein a level of IL-4 in the sample from the subject above the control or standard IL-4 level is predictive of the likelihood of successful eradication and a level of IL-4 below the control or standard IL-4 level is predictive of the likelihood of eradication failure.
- 10 11. A method according to claim 10 wherein the sample is a blood sample.
12. A method according to claim 10 or claim 11, wherein the IL-4 is detected by an immunoassay.
13. A method according to claim 12, wherein the assay is ELISA.
14. A method according to any one of claims 10 to 13, wherein the control or standard level of IL-4 is established from analysis of samples obtained from subjects not infected by *H. pylori* and/or subjects having successfully eradicated *H. pylori* and/or subjects infected by *H. pylori*.
15. A method of predicting the likelihood of successful eradication of *Helicobacter* infection in a subject to be treated or being treated for the infection, including:
- (i) determination of interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) level in a sample from the subject;
  - (ii) comparison of the INF- $\gamma$  level with a predetermined control or standard INF- $\gamma$  level,

- (iii) wherein a level of INF- $\gamma$  in the sample from the subject below the control or standard INF- $\gamma$  level is predictive of the likelihood of successful eradication and a level of INF- $\gamma$  above the control or standard level is predictive of the likelihood of eradication failure.
- 5 16. A method according to claim 15 wherein the sample is a blood sample.
17. A method according to claim 15 or claim 16, wherein the INF- $\gamma$  level is detected by an immunoassay.
18. A method according to claim 17, wherein the assay is ELISA.
19. A method according to any one of claims 15 to 18, wherein the control or standard
- 10 level of INF- $\gamma$  is established from analysis of samples obtained from subjects not infected by *H. pylori* and/or subjects having successfully eradicated *H. pylori* and/or subjects infected by *H. pylori*.
20. A method of predicting the likelihood of successful eradication of Helicobacter infection in a subject to be treated or being treated for the infection, including:
- 15 (i) determination of immunoglobulin G (IgG) level in a sample from the subject;
- (ii) comparison of the IgG level with a predetermined control or standard IgG level,
- (iii) wherein a level of IgG in the sample from the subject below the control or
- 20 standard level is predictive of the likelihood of successful eradication and a level of IgG above the control or standard level is predictive of the likelihood of eradication failure.
21. A method according to claim 20 wherein the sample is a serum sample.

22. A method according to claim 20 wherein the sample is a saliva sample.
23. A method according to any one of claims 20 to 22, wherein the control or standard level of IgG is established from analysis of samples obtained from subjects not infected by *H. pylori* and/or subjects having successfully eradicated *H. pylori*  
5 and/or subjects infected by *H. pylori*.
24. A method of predicting the likelihood of successful eradication of Helicobacter infection in a subject to be treated or being treated for the infection, including:
- (i) determination a combination of IL-4 and/or INF- $\gamma$  and/or IgG levels in a sample from the subject;
- 10 (ii) comparison of the IL-4 and/or INF- $\gamma$  and/or IgG levels with a predetermined control or standard IL-4 and/or INF- $\gamma$  and/or IgG level respectively, wherein a level of IL-4 in the sample from the subject above the control or standard level is predictive of the likelihood of successful eradication and a level of IL-4 below the control or standard level is predictive of the likelihood of  
15 eradication failure, and wherein a level of INF- $\gamma$  in the sample from the subject below the control or standard level is predictive of the likelihood of successful eradication and a level of IFN- $\gamma$  above the control or standard level is predictive of the likelihood of eradication failure, and  
20 wherein a level of IgG in the sample from the subject below the control or standard level is predictive of the likelihood of successful eradication and a level of IgG above the control or standard level is predictive of the likelihood of eradication failure.

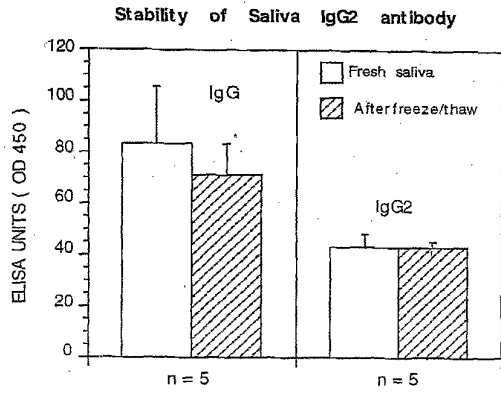


Figure 1

WO 02/03065

PCT/AU01/00795

2/7

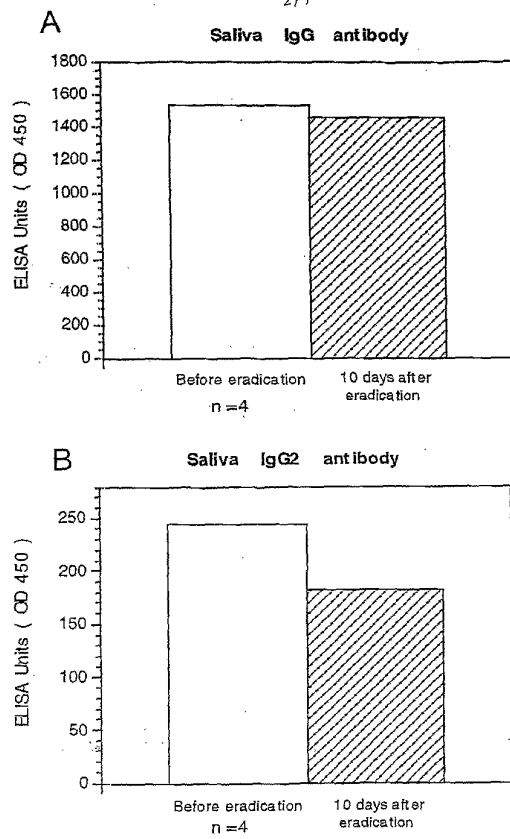


Figure 2

WO 02/03065

PCT/AU01/00795

3/7

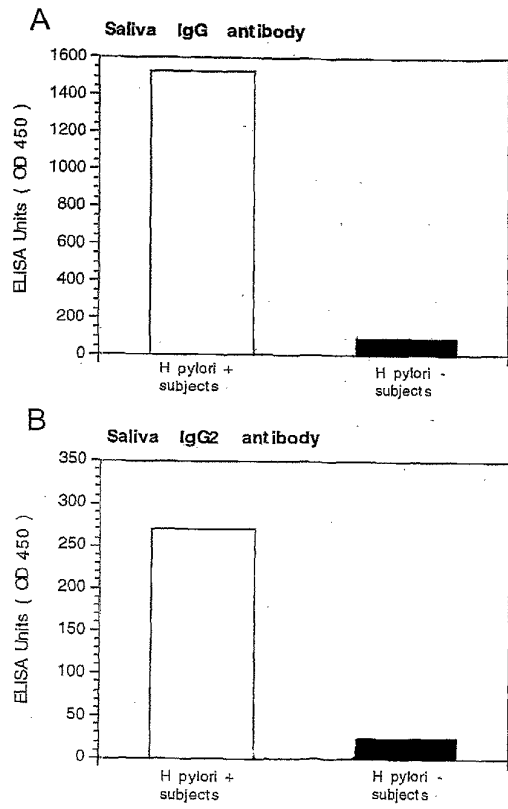


Figure 3

WO 02/03065

PCT/AU01/00795

4/7

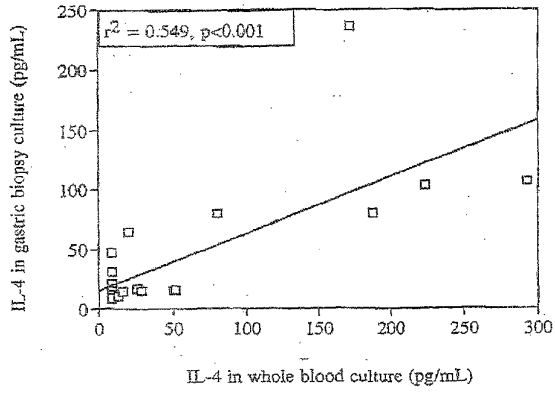


FIGURE 4

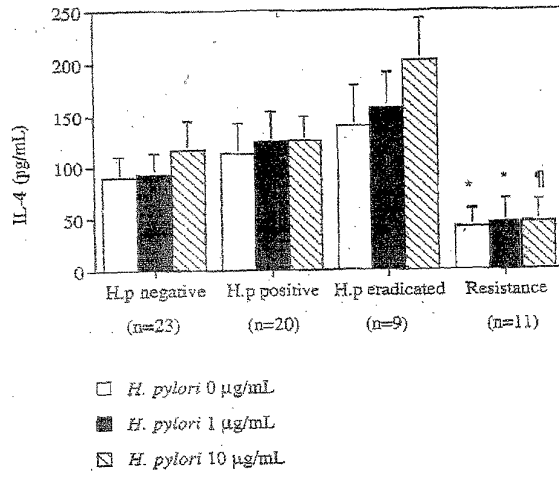


FIGURE 5

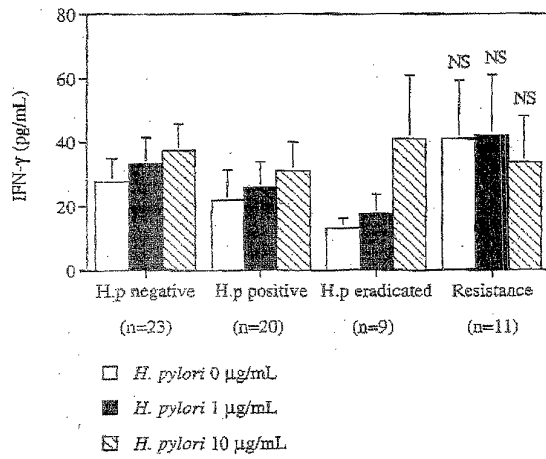


FIGURE 6

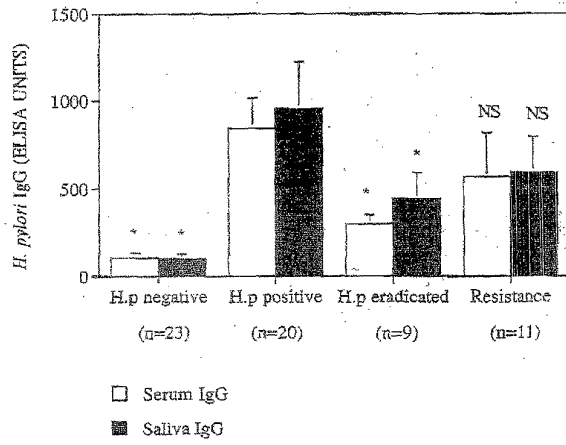


FIGURE 7

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU01/00795
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int. Cl. <sup>7</sup> : G01N 33/53, G01N 33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. Cl. <sup>7</sup> : G01N 33/53, G01N 33/569		
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 practicable, search terms used)		
STN, WPAT, JAPIO, csp@cc, PubMed, Delphion		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Australian patent 714222 by Cortecs Ltd open to public inspection in Australia 4 September 1996 (WO 96/25430 published 22 August 1996), which relates to a method of diagnosing H. pylori by detecting antibodies in saliva using antigens, see especially claims 8, 9 - 11, and related kit for use in diagnosis. See pages 1, 2, 4 - 6, and examples.	1-9
X	WO 98/32768 by Cortecs Ltd published 30 July 1998, which also relates to a method of diagnosing H. pylori by detecting antibodies in saliva using antigens, see especially claims 11 - 13, 15, 21 and related kit for use in diagnosis in the examples and claim 16. See pages 1, 2, 4, 5, 12, 17 and examples.	1-9
X	WO 00/29432 by Cortecs Ltd published 11 November 1999 also relates to a method of diagnosing H. pylori by detecting antibodies in saliva using antigens, see especially claims 11, 12, 14, 15, 19 and related kit for use in diagnosis in the examples and claim 20 - 22. See page 10 and examples.	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex		
* Special categories of cited documents	"P" 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	
"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"L" documents which may throw doubts on priority claim(s) or which are cited to establish the publication date of another citation or other special reason (or specified)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means; documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"G" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 20 August 2001	Date of mailing of the international search report 31 AUGUST 2001	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pct@ipaaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929	Authorized officer <i>Anthea Harvie</i> ANTHEA HARVIE Telephone No.: (02) 6283 2552	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family membersInternational application No.  
**PCT/AU01/00795**

This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
WO	9832768	AU	58715/98	EP	975663
END OF ANNEX					

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100091638

弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 クランシー, ロバート・ルレウェリン

オーストラリア国ニュー・サウス・ウェイルズ 2300, ニューキャッスル, ハイ・ストリート  
11

(72)発明者 ボロディ, トーマス・ジュリアス

オーストラリア国ニュー・サウス・ウェイルズ 2046, ファイブ・ドック, グレイト・ノース  
・ロード 144

(72)発明者 パン, ジェラルド

オーストラリア国ニュー・サウス・ウェイルズ 2011, エリザベス・ベイ, ビリアード・アヴ  
ェニュー 4/25

(72)発明者 レン, ジギャン

オーストラリア国ニュー・サウス・ウェイルズ 2299, ニューキャッスル, ラムトン, ヴィト  
レ・ストリート 12ビー

专利名称(译)	监测幽门螺杆菌感染治疗方法并预测根除成功的可能性		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004502186A</a>	公开(公告)日	2004-01-22
申请号	JP2002508077	申请日	2001-07-03
申请(专利权)人(译)	Herirado专有有限公司		
[标]发明人	クランシーロバートルレウエリン ボロディトーマスジュリアス パンジェラルド レンジギャン		
发明人	クランシー,ロバートルレウエリン ボロディ,トーマス・ジュリアス パン,ジェラルド レン,ジギャン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56922 G01N2333/205 G01N2333/5406 G01N2333/57 G01N2469/20 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.P G01N33/50.G G01N33/569.F		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	2000PQ8541 2000-07-03 AU		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及监测幽门螺杆菌感染治疗的方法，尤其涉及使用免疫球蛋白G2 ( IgG2 ) 监测根除幽门螺杆菌感染的方法。 本发明还涉及预测在待治疗或正接受治疗的对象中成功根除幽门螺杆菌感染的可能性的方法，尤其涉及预测成功根除可能性的方法，包括确定白介素，干扰素，待治疗或正在治疗的受试者体内的γ和IgG。

表1: 注: 表1は、本発明に係る治療法のフローチャートを示す。

ステップ	処理	判断	適用されるフロー	注
1	患者の血液サンプルを採取する	陽性	ステップ2へ進む	ステップ1は、患者の血液サンプルを採取する。
2	患者の血液サンプルを分析する	陽性	ステップ3へ進む	ステップ2は、患者の血液サンプルを分析する。
3	患者の血液サンプルを分析する	陽性	ステップ4へ進む	ステップ3は、患者の血液サンプルを分析する。
4	患者の血液サンプルを分析する	陽性	ステップ5へ進む	ステップ4は、患者の血液サンプルを分析する。
5	患者の血液サンプルを分析する	陽性	ステップ6へ進む	ステップ5は、患者の血液サンプルを分析する。
6	患者の血液サンプルを分析する	陽性	ステップ7へ進む	ステップ6は、患者の血液サンプルを分析する。