

(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2004-529350

(P2004-529350A)

(43) 公表日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	N
CO 7 K 14/40	GO 1 N 33/53	Y
GO 1 N 33/48	CO 7 K 14/40	
GO 1 N 33/531	GO 1 N 33/48	B
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/531	B
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 101 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-585990 (P2002-585990)	(71) 出願人	503393191 ロックバイ バイオメド リミテッド オーストラリア国 ウェスタン オースト ラリア州 ベントリー テクノロジー パ ーク サリッチ ウェイ 1 イーアイア ール センター ユニット 7
(86) (22) 出願日	平成14年4月23日 (2002. 4. 23)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成15年10月27日 (2003. 10. 27)	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(86) 国際出願番号	PCT/AU2002/000507	(72) 発明者	ワーミントン ジョン オーストラリア国 ウェスタン オースト ラリア州 ウィレットン ファーレイ ド ライブ 14
(87) 国際公開番号	W02002/088741		
(87) 国際公開日	平成14年11月7日 (2002. 11. 7)		
(31) 優先権主張番号	09/841, 188		
(32) 優先日	平成13年4月25日 (2001. 4. 25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カンジダの検出

(57) 【要約】

本発明は、カンジダ感染を診断する方法および手段に関する。特に本発明は、カンジダ感染のリスクのある被験者、またはカンジダ感染の疑いがある被験者から採取された生物試料中に存在するカンジダの細胞質抗原に対する抗体のレベルを測定することによってカンジダ感染を診断する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、カンジダ感染を診断する方法：

- a) カンジダ感染のリスクのある被験者、またはカンジダ感染の疑いがある被験者から生物試料を得る段階；および、
- b) 生物試料中に存在するカンジダ細胞質抗原に対する抗体のレベルを測定する段階。

【請求項2】

段階bが、酵素結合免疫アッセイ法（ELISAまたはEIA）、バイリガンド結合法（サンドイッチ法）、蛍光定量アッセイ法、化学発光アッセイ法、免疫クロマトグラフィー、放射免疫拡散法、および放射性免疫アッセイ法（RIA）からなる群より選択される手法による、請求項1記載の方法。

10

【請求項3】

段階bが、ELISAまたは化学発光アッセイ法による、請求項1記載の方法。

【請求項4】

カンジダによって発現される抗原を用いる、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

抗原が細胞質抗原である、請求項4記載の方法。

【請求項6】

抗原が、不活性表面に固定されているか、またはゲル中に埋込まれているか、または色、蛍光、もしくは放射能を抗原に加える分子に結合された、請求項4または5記載の方法。

20

【請求項7】

生物試料が、骨髄、血漿、髄液、リンパ液、および呼吸器、腸管、尿生殖路の皮膚の外部切片、涙液、唾液、乳汁、血液（全血と血清の両方）、血液細胞、腫瘍、ならびに器官からなる群より選択される、請求項1～6のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

生物試料が血清である、請求項7記載の方法。

【請求項9】

生物試料中のカンジダ細胞質抗原に対する抗体のレベルを測定する段階を含む、カンジダ感染の予後を評価する方法。

【請求項10】

以下の段階を含む、カンジダ抗体の有無を判定する方法：

- a) カンジダ抗体を含む可能性がある生物試料を、単離された細胞質カンジダ抗原に曝露させる段階；および
- b) 抗体と抗原の反応を検出する段階。

30

【請求項11】

別の抗体と他のカンジダ抗原の反応を検出する段階をさらに含む、請求項10記載の方法。

【請求項12】

別の抗体が、細胞壁抗原または精製された免疫優位な抗原（エノラーゼ）に対する、請求項11記載の方法。

【請求項13】

以下の段階を含む、カンジダ感染を診断する方法：

- a) カンジダ感染のリスクのある被験者、またはカンジダ感染の疑いがある被験者から生物試料を得る段階；および、
- b) 細胞壁抗原、もしくは免疫優位な抗原（エノラーゼ）のいずれか、または両方に対する抗体のレベルを測定する段階と組み合わせた、生物試料中に存在する、カンジダ細胞質抗原に対する抗体のレベルを測定する段階。

40

【請求項14】

以下を含む、生物試料中のカンジダ抗体の有無の判定に使用されるキット：

- a) 生物試料採取装置；
- b) 細胞質カンジダ抗原；および、

50

c) 試料中における抗原と抗体の反応を検出する手段。

【請求項15】

緩衝剤およびイオン塩をさらに含む、請求項14記載のキット。

【請求項16】

リポタンパク質をクロロホルム抽出法で除去する段階を含む、細胞質抗原を調製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、カンジダ感染を診断する方法および手段に関する。特に本発明は、カンジダ感染の高感度かつ迅速な診断法に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

カンジダは、口腔または膣の贅口瘡の最も一般的な原因菌である。しかし、過去数十年間にカンジダは、入院患者の生命を脅かす感染症の主な原因となっている。皮肉なことに、このような「侵襲性」または「全身性」のカンジダ感染の発生率の増加は現代医学においてさらに進んでいる。大きな外傷のある患者、癌患者、外科手術や臓器移植を受けた患者は、生命を脅かすカンジダ感染に脆弱である。米国では現在、カンジダは、病院における血液感染症の一般的な原因の第4位である。

【0003】

全身性カンジダ感染に関する主な問題は、確定的な臨床徴候または症状がほとんどみられないことである。治療は、確定診断に基づくのではなく、手探り状態で進められることが多い。フルコナゾールなどの抗真菌薬が利用できる状況であっても、高い死亡率（30～70%）が全身性カンジダ感染に結びつけられている。死亡率の高さは主に、感染の急激な進行と、速やかに進む致死的な転帰に起因する。正確な診断が得られない場合には、カンジダ感染は有効な治療が施せなくなるまで発見されないことが少なくない。このため医師は、カンジダ感染は通常、剖検時に診断されるものと考えている。したがって、カンジダ感染の早期診断を可能とし、適切な治療を実施することで死亡率を低下させるような迅速な診断アッセイ法が必要とされている。

【0004】

カンジダ感染の診断における主な問題は、カンジダが共生菌であり、体表面または開口部からカンジダが単に単離されただけでは感染の診断が下されないことである。血液または組織深部に由来するカンジダの培養が、未だに全身性カンジダ感染の主流の診断法である。しかし、培養が陽性を示すまでには数日を要し、その時点では感染に対する有効な治療を実施ができない場合がある。また、身体表面部位の汚染が原因で偽陽性の結果が生じる場合がある。全身性カンジダ症であることが剖検で証明される事例の最大50%が、血液培養で陰性を示すこと、そしてこのために診断的価値がないことは、さらに重要である。

【0005】

組織および器官におけるカンジダ感染の検出には、核磁気共鳴法（NMR）、および放射性同位元素を用いるスキャン法が使用されている。しかし、これらの方法は早期診断には有用でない。

【0006】

最近、カンジダの代謝産物であるアラビニトールの分析が診断ツールとして提案されている。しかし、アラビニトールはヒトの身体から産生されるので、詳細な臨床試験での診断価値に疑問が投げかけられている。

【0007】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）も侵襲性カンジダ感染の診断に用いられている。しかしPCRは、カンジダが普遍的に存在する微生物であって、体表面汚染が原因で偽陽性がみられる

10

20

30

40

50

という、上記と同じ理由で、これ自体がカンジダの有用な診断法として確立していない。

【0008】

免疫アッセイ法は、多くの種類の感染症の診断の確立された手法である。免疫アッセイ法には迅速であるという利点があり、またアッセイ法の標準フォーマットが存在する。免疫アッセイ法は、カンジダ抗原、またはカンジダ感染に対して反応する宿主抗体のいずれかを検出するように設計することができる。血清または他の体液中のカンジダ抗原の検出を目的とした、いくつかの免疫アッセイ法のキットが市販されている。しかし、このようなアッセイ法は、感度もしくは特異度のいずれか、または両方が十分でない。

【0009】

免疫アッセイ法は、免疫優位なカンジダ抗原の検出法を元に開発されてきた。カンジダマンナンは免疫原性の高い細胞壁抗原の1つである。しかしカンジダは共生菌なので、大半の人はカンジダマンナンに対する抗体をもち、このため全身性の感染の診断における有用性は制限される。本出願人は今回驚くべきことに、従来のアッセイ法と比べてカンジダ識別力の大きいアッセイ法が、細胞質抗原の検出であることを見出した。この診断アッセイ法の利点は、細胞質抗原に対する抗体が、実際の感染に対する反応によってのみ産生される点にある。本出願人はさらに、細胞質抗原を他の抗原と組み合わせて使用することで、カンジダ感染を強く断定できることを明らかにした。

10

【0010】

したがって本発明は、カンジダ感染の診断に通常ついてまわる問題を克服するか、または少なくとも小さくする。

20

【発明の開示】

【0011】

発明の概要

最も一般的な側面において、本明細書に開示された発明は、カンジダ感染の簡便かつ迅速な診断法となる。カンジダ感染の診断法は、感染が疑われる多数の試料のスクリーニングに使用することができる。

【0012】

したがって1つの局面では、本発明は、以下の段階を含む、カンジダ感染の診断法を提供する：

a) カンジダ感染のリスクのある被験者、またはカンジダ感染が疑われる被験者から生物試料を得る段階；および

30

b) 生物試料中に存在するカンジダ細胞質抗原に対する抗体のレベルを測定する段階。

【0013】

抗体のレベルは、酵素結合免疫アッセイ法（ELISAまたはEIA）、バイリガンド（biligand）結合法（サンドイッチ法）、蛍光定量アッセイ法、化学発光アッセイ法、免疫クロマトグラフィー、放射免疫拡散法、または放射性免疫アッセイ法（RIA）を含む、免疫学領域での既知の手法で測定することができる。ELISA、免疫クロマトグラフィー、または化学発光アッセイ法は、迅速、高感度、および高特異性であり、また大規模使用のために自動化が容易なことから特に好ましい。これらの方法は定量分析法としても用いられる。

【0014】

このような診断法では、カンジダが発現する抗原、特に細胞質抗原を用いる。本明細書に記載された、カンジダから単離された抗原は、本発明の診断法のある態様では、不活性表面上に固定化したり、ゲル中に埋込んだりする場合があるほか、抗体に対する色、蛍光、または放射能を呈する分子に結合させる場合がある。

40

【0015】

第2の局面では、本発明は、生物試料中のカンジダの細胞質抗原に対する抗体のレベルを測定する段階を含む、カンジダ感染の予後を評価する方法を提供する。

【0016】

当業者であれば、本明細書に開示された手法が、任意の種類生物試料に使用できることを理解するであろう。好ましい生物試料は、骨髄、血漿、髄液、リンパ液、および呼吸器

50

、腸管、尿生殖路の皮膚の外部切片、涙液、唾液、乳汁、血液（全血と血清の両方）、血液細胞、腫瘍、ならびに器官からなる群より選択される。最も好ましくは、生物試料は血清である。

【0017】

本発明の方法で解析可能な生物試料は、スワブやシャントなどによっても得られる。このような生物試料は直接解析することができるほか、例えば濃度またはpHを調整して処理してから検討することができる。

【0018】

第3の局面では、本発明は、以下の段階を含む、カンジダ抗体の有無を判定する方法をさらに提供する：

- a) カンジダ抗体を含む可能性がある生物試料を、単離された細胞質カンジダ抗原に曝露させる段階；および、
- b) 抗体と抗原の反応を検出する段階。

【0019】

本発明の特に好ましい態様では、診断アッセイ法は、細胞質抗原と組み合わせて他のカンジダ抗原をさらに用いる。特に細胞壁抗原（マンノースを含む）、および/または精製された免疫優位な抗原（エノラーゼ）を用いる。

【0020】

したがって本発明の第4の局面では、以下の段階を含む、カンジダ感染の診断法を提供する：

- a) カンジダ感染のリスクのある被験者、またはカンジダ感染が疑われる被験者から生物試料を得る段階；および、
- b) 生物試料中に存在する、カンジダの細胞質抗原に対する抗体のレベルを、細胞壁抗原もしくは免疫優位な抗原（エノラーゼ）のいずれか、またはこの両方に対する抗体レベルの測定と組み合わせて測定する段階。

【0021】

本発明の診断に用いる試薬および手法は、診断検査室で使用されるキットとして具体化される場合もあるほか、中心となる受け入れ施設における多数の試料の解析を目的として適合させたり自動化したりすることができる。

【0022】

したがって第5の局面では、本発明は、以下を含む、生物試料中のカンジダ抗体の有無を判定する際に用いられるキットを提供する：

- a) 生物試料採取装置；
- b) 細胞質カンジダ抗原；および、
- c) 試料中における抗原と抗体の反応を検出する手段。

【0023】

適切な緩衝剤およびイオン塩をキットに含めることもできる。

【0024】

第6の局面では、本発明は、リポタンパク質をクロロホルム抽出法で除去する段階を含む、細胞質抗原を調製する方法を提供する。

【0025】

使用する省略形

EDTA：エチレンジアミン四酢酸

EIA：酵素免疫アッセイ法

ELISA：酵素結合免疫吸着アッセイ法

RIA：放射性免疫アッセイ法

BSA：ウシ血清アルブミン

DMSO：ジメチルスルホキシド

-Me： -メルカプトエタノール

TMB：3,3',5,5'-テトラメチル-ベンジジン

10

20

30

40

50

【0026】

好ましい態様の詳細な説明

本発明の実施には、特に明記しない限り、当技術分野に含まれる従来の分子生物学、細胞生物学、および免疫アッセイ法の手法を使用する。このような手法は当業者に周知であり、文献で詳しく説明されている。例えばHarlowおよびLane、「Antibodies: A Laboratory Manual」(1988); Maniatis、FritschおよびSambrook、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(1982); 「Animal Cell Culture」(R.I. Freshney編、1986); 「Immobilised Cells and Enzymes」(IRL Press、1986); B. Perbal、「A Practical Guide to Molecular Cloning」(1984); Sambrookら、「Molecular Cloning: a Laboratory Manual」(1989)、ならびにAusubel, F.ら、1989~1999、「Current Protocols in Molecular Biology」(Green Publishing、New York)を参照されたい。

10

【0027】

本発明を説明する際に、後述する定義にしたがって以下の用語を用いる。

【0028】

本明細書で用いる「生物試料」は、骨髄、血漿、血清、髄液、リンパ液、および皮膚、呼吸器、腸管、尿生殖路の外部切片、涙液、唾液、乳汁、血液(全血と抗凝固全血の両方)、血液細胞、腫瘍、器官を含むがこれらに限定されない、個体から単離される組織または体液の試料を意味し、さらに細胞培地で細胞(カンジダ感染細胞、組換え細胞、および細胞成分と想定)を増殖させて得られる、ならし培地を含むがこれらに限定されない、インビボ細胞培養組成物の試料も含む。

20

【0029】

「ヒト組織」はヒト細胞の集合体で、細胞塊を含む場合がある。この表現は、ヒト細胞(血液細胞など)、またはヒト細胞系列の懸濁物も含む。

【0030】

本明細書の目的上、「~を含む(comprising)」という表現が「~を含むがこれらに限定されない(including but not limited to)」ことを意味し、また「~を含む(comprise)」という表現が、対応する意味をもつことが明瞭に理解される。

【0031】

いくつかの先行技術に関する出版物が本明細書で参照されるが、これは、該当する任意の文書が、オーストラリアや他の任意の国々において、当技術分野における共通の一般的な知識の一部を形成すると認められていることを意味しないと明らかに理解される。

30

【0032】

当業者は、多種多様な免疫アッセイ法が本発明で使用可能なことを理解するであろう。例えば、本明細書で開示されるカンジダ抗原は、抗体捕捉アッセイ法、抗原捕捉アッセイ法(抗体/抗原複合体は「特別な」クラスの抗原を形成する)、または2抗体サンドイッチアッセイ法に使用することができる。

【0033】

抗原の調製に使用される手法

本明細書で用いる「カンジダ抗原」という表現は、本発明で使用される異なる3種類のタイプのカンジダ抗原の任意の1つ、例えば細胞壁抗原(マンノースを含む)、総細胞質抗原(マンノースを含まない)、または精製された免疫優位な抗原(エノラーゼ)を意味する。「カンジダ抗原」という表現は、全3種類の抗原が関与するか、または使用される場合があることを意味する。カンジダ抗原は、生化学的抽出法、カラムクロマトグラフィー、ゲル分画、遺伝子クローニング、ディファレンシャル沈殿法(differential precipitation)、濾過、透析、または遠心法を含むいくつかの手法で調製することができる。しかし、好ましい手法は本明細書に開示された手法である。簡単に説明すると、この手法では、カンジダ細胞を機械的、化学的、または酵素学的溶解を含み、その後不可溶性の細胞壁を可溶性の細胞質画分から、遠心、濾過、および透析によって分離する。細胞壁画分を化学的に処理して細胞壁抗原を解離させた後、遠心および透析、可溶性細胞質細胞抽出物の濾過および有機抽出、ConAアフィニティクロマトグラフィーによるマンノタンパク質の分

40

50

離、陰イオンおよび陽イオンアフィニティクロマトグラフィーによる、可溶性細胞質抽出物から免疫優位なエノラーゼ抗原の精製を行う。他の手法、または上記手法の修正もしくは変更が、本発明の精神に反する影響を及ぼすことなくなされる場合があることは、当業者に理解されるであろう。

【0034】

抗体の調製および標識に使用される手法

本明細書に記載されたカンジダ抗原に対する抗血清は、ウサギまたはヒツジなどの宿主動物を用いて作ることができる。抗体を含む血清画分は、標準的な手法で単離することができる。これらの抗血清は、後述する本発明の複数の態様で使用することができるほか、より感度の高い、また特異度の高い抗体を、血清を電気泳動や高速遠心などでさらに精製することで得られる。最終的に、大量の高特異性のモノクローナル抗体を、当業者に周知の方法によるハイブリッド-ミエローマ法で作製することができる。

10

【0035】

本発明のある態様では、セルロース、アガロース、セファデックス、もしくはガラスビーズ、または後の反応に干渉しない他の類似の不活性表面（金属、プラスチック、またはセラミックなど）上に固定されたカンジダ抗原に対する抗体を用いる。吸着、Br-CN活性化、または当技術分野で周知の他の手法で抗体を固定することができる。

【0036】

本発明の他の態様では、（発色性が高い）発色性分子である、エンゾクロミック（enzochromic）分子（試薬を添加すると発色する酵素）、フルオロクロミック（fluorochromic）（蛍光）分子、またはルミノジェニック（luminogenic）（発光）分子を結合させたカンジダ抗原に対する抗体を用いる。

20

【0037】

このような酵素の抗体との接合体は、当技術分野で周知の手法で作製される（参考文献として、Avrameas, S.およびUriel, J., 「Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences」、第262巻、p.2543、（1966）；Nakane, P.K.およびPierce, G.B., 「Journal of Histochemistry and Cytochemistry」、第14巻、p.929、（1966）；Nakane, P.K., 「Methods in Enzymology」、第37巻、p.133、（1975）を参照されたい）。

【0038】

使用可能な発色性分子には2,3-ジニトロベンゼン（DNB）塩、ジニトロフェノール（DNP）、ならびにメチルオレンジおよびブチルオレンジがある。他の適切な発色剤は当技術分野で周知である。抗体に結合させることが可能なエンゾクロミック分子は、適切な試薬と反応して発色する酵素である。例として、ニトロフェニルリン酸（NPP）と反応して発色するアルカリホスファターゼ（ALP）、グルコースおよびD-ガラクトピラノシドと反応して発色するグルコースオキシダーゼなどがある。以上の例および他の例は当技術分野で周知である。蛍光発生剤の例には、2,4-ジニトロフルオロベンゼン、および「ピプシル（pipsyl）」誘導体がある。ルミノジェニック分子は、Branchiniらの方法（Biochem. Biophys. Res. Commun. 97、334 [1980]）で抗体に結合可能である。以下、本明細書で用いる「発色性（chromophoric）」という表現は、「エンゾクロミック」分子、「フルオロクロミック」分子、および「ルミノジェニック」分子を含むことを意図する。

30

40

【0039】

本発明のある態様では、放射性元素で標識したカンジダ抗体も使用する。クロラミン-T法で結合させるI125が一般的な例であるが、当技術分野で周知の他の方法を用いることもできる。

【0040】

抗原の固定法および標識法

抗原分子は、共有結合カップリング、直接吸着、物理的トラップ（physical entrapment）、およびタンパク質コーティング表面への結合を含む、当技術分野で周知のさまざまな方法で固形担体上に固定化することができる。このような方法を説明した参考文献として

50

、Silman, I.H.およびKatchalski, E.、「Annual Review of Biochemistry」、第35巻、p.873 (1966) ; Melrose, G.J.H.、「Review of Pure and Applied Chemistry」、第21巻、p.83、(1971) ; ならびにCuatrecasas, P.およびAnfinsen, C.B.、「Methods in Enzymology」、第22巻(1971)を参照されたい。

【0041】

Laiら(ドイツ公開広報第2,539,657号、米国特許第4,066,512号)では、タンパク質コーティング表面への結合法について開示されている。この方法では、細孔性膜の内表面および外表面を最初にゼイン、コラーゲン、フィブリノーゲン、ケラチン、グルテリン、ポリイソロイシン、ポリトリプトファン、ポリフェニルアラニン、ポリチロシン、またはロイシンとp-アミノフェニルアラニンの共重合体などの水に不溶性のタンパク質でコーティングする。このようなコーティングを行うことで、膜は、酵素、抗原、および抗体を含む、さまざまな生物学的に活性のあるタンパク質を固定できるようになる。細孔性構造は、総容積の50%を上回る構造が、25ナノメートル~25マイクロメートル、好ましくは25ナノメートル~14マイクロメートルの孔の状態であると定義される。25ナノメートル~5マイクロメートルの範囲の大きさの孔を、本明細書に記載された多くの応用で用いる。コーティングされていない細孔性膜は、体積の70~75%が空隙である。このような孔が存在することで、膜内を液体が流れることが可能となる。例えばゼインでコーティングすると空隙は5~10%減少する。この結果、構造は、空隙として高い割合の体積を有し、孔中を液体が流れることが可能になるという本質的な性質が残る。このような構造では、孔中に含まれる任意の溶液と接触する表面積が大きい。

10

20

【0042】

固定された抗原または抗体を有する、このようなコーティングされた膜は、固定された抗原または抗体に対する、緻密で扱いやすい担体となる。このような全体構造をとることで、結合状態の成分を、非結合状態の成分から単純な機械的な手法で除去することが可能となる。

【0043】

非特異的な結合は、免疫化学的に中性のタンパク質をフィルターに固定する第2の固定段階を加えることで最小化することができる。したがって固定は、本発明の好ましい態様では2段階で進む。第1段階では、所望の免疫化学的成分を固定し、第2段階では、第1段階の完了後に、ウシ胎児血清やウシガンマグロブリンなどの免疫化学的に中性のタンパク質を続けて固定する。「免疫化学的に中性」という表現は、アッセイ法の特定の成分に関して定義される。アッセイ法の成分、または試薬の1種と免疫化学的に結合しない任意のタンパク質は、このようなタンパク質が別の系で免疫化学的に反応する場合であっても、免疫化学的に中性であるとみなされる。

30

【0044】

検出対象物質が抗体の場合、接合体の免疫化学的に反応する部分は、検討対象の抗体と免疫化学的に結合する能力を有する抗体でなければならない。このような抗体は、検討対象抗体の由来する動物の血清の抗体すなわち免疫グロブリン画分で動物を免疫化することで得られる。例えば、検討対象の抗体がヒト抗体の場合、ヒト抗体に対するヤギ抗体をヒト免疫グロブリン(抗体)で免疫化したヤギの血清から得る。このような酵素部分は、当業者者に任意の方法で検出可能で、また抗体を結合した後に活性を保持する、反応を触媒する能力を有する任意の酵素の場合がある。広範囲の応用に便利で適していることから、西洋ワサビペルオキシダーゼが好ましい。この酵素が、過酸化水素の存在下で、さまざまな有機化合物の酸化を触媒することはよく知られている。このような多くの有機基質は色を発する(酸化されて色が変化する)。

40

【0045】

本発明では、接合体の形成に使用される酵素調製物の純度が、非特異的な結合の規模に影響することがわかっている。酵素調製物の純度が高くなるほど、非特異的な結合は少なくなる。部分的には、この低下は、必要な接合体タンパク質の総量が、酵素の特異的な結合の増大に伴って減少するために生じる。したがって、非特異的な結合が起こる機会も減少

50

する。好ましい態様では、高度に精製されたペルオキシダーゼ調製物の使用は、対照試料で観察される発色反応量を、既知の陽性試料と比較して有意に減少させることがわかっている。

【0046】

カンジダ抗体の検出法

抗体捕捉法

本明細書に開示された手法で調製したカンジダ抗原を、好ましくはPVC、紙、または類似の水分吸収性マットなどの不活性表面上に固定する。固定したカンジダ抗原を次に、カンジダ抗体を含むことが疑われる試料に接触させる。血液または尿などの水性試料の場合、この溶液に緩衝作用をもたせ、またイオン塩を、カンジダ抗体-カンジダ抗原の相互作用に最適な濃度で存在させることができる。例えばTRISまたはホウ酸緩衝リン酸（pH = 7.5 ~ 9.0、イオン強度 = 約0.010 ~ 0.5）が適切な緩衝剤およびイオン塩である。次に、カンジダ抗原、またはカンジダ抗原-カンジダ抗体複合体が存在する不活性表面を、発色性分子を結合させたカンジダ抗原に対する抗体に接触させる。カンジダ抗原は好ましくは、pHが約7.5 ~ 9.0でイオン濃度が約0.01 M ~ 約0.1 M NaClに相当する緩衝液中に溶解させる。水、またはTween 20などの適切な界面活性剤で慎重に洗浄して過剰な発色性抗体を除去した後、不活性表面を対象に、色、蛍光、または発光を直接、または発色剤の添加後に調べる。不活性表面の発色は、固定されたカンジダ抗原-カンジダ抗体複合体の溶液中での相互作用を示す。色を比較するために、対照を処理するとよい。

10

【0047】

この手法は、放射性元素の標識をつけたカンジダ抗原を用いることで、および溶液中における活性の消失、または固相支持体上における放射能の再取り込みのいずれかを観察することで、臨床使用に応用することができる。この態様は高感度かつ迅速で、多数の試料を扱う際に適している。

20

【0048】

酵素結合免疫アッセイ法 (ELISA)

カンジダ抗原とカンジダ抗体間の反応に適した発色用試薬、ならびに緩衝液、およびイオン塩によって発色する酵素を結合させたカンジダ抗体を含む溶液を、好ましくはPVC、紙片、またはガラスビーズなどの不活性表面上に固定されたカンジダ抗原に接触させることで反応させる。エンゾクロミック接合体であるカンジダ抗原の量は、固定された抗体上の反応部位の約50%を十分飽和させるものとする。抗体-カンジダ抗原酵素複合体が存在する不活性表面を、カンジダを含むことが疑われる、緩衝作用をもつ試料に接触させる（同試料は未知量のカンジダ抗体を含む）。発色用試薬の添加後に、結果として得られた、紙片上に固定された抗体-カンジダ抗原-酵素複合体の色を、カンジダ抗体を含む試料で処理していない対照紙片と比較して観察する。試料で処理した不活性表面の色が褪せていれば、未知試料中にカンジダ抗体が存在することがわかる。

30

【0049】

本発明の方法は、試料および固定された状態の酵素を、好ましくは、遠心して分光光度計で発色を観察可能な試験管内で接触させることで臨床使用に応用することができる。この態様は、極めて高感度かつ迅速である。

40

【0050】

放射免疫拡散法-沈殿反応

カンジダ抗原の1種を、寒天またはアガロースなどの軟化ゼラチン状培地中に、抗原-抗体相互作用を最適なものとするためにpHを約6.0 ~ 9.0、およびイオン強度を約0.01 M ~ 0.5 Mに維持するための緩衝剤および塩類とともに懸濁する。米国特許第4,259,207号に記載された懸濁用培地は適切な例である。この混合物を試験プレート上に広げて固めるか、または好ましくはオクトロニー (Octolony) プレートなどの円盤型容器に注入する。少量の試料を、凝固したゲル上、好ましくは中央のウェルに配し、プレートまたはディスクを、好ましくは密封した状態で数時間静置する。周辺領域への試料の拡散は、この期間に生じる。カンジダ抗体が存在する場合、同抗体は、埋込まれた状態のカンジダ抗原と反応し、不

50

透明な領域が、試料をアブライした点の周辺に放射状に現れる。比較目的で対照を処理することができる。試料中のカンジダ抗体量の検量線は、望ましい場合、温度、時間、および試料の大きさを調節し、結果として得られる放射状領域を既知濃度の1つと比較することで得られる。

【0051】

放射性免疫アッセイ法

本発明のカンジダ抗原を、分離用カラム中でガラスビーズなどの不活性表面上に固定する。カンジダ抗原の一部に、放射性元素（好ましくは¹²⁵I）を結合させて、結合部位の50%を飽和させるために十分な量の、固定された状態のカンジダ抗原と反応させる。固定された状態のカンジダ抗原-酵素複合体を、カンジダ抗体を含むことが疑われる試料に接触させる（同試料は、カンジダ抗原-抗体複合体の形成に最適な反応条件とするためにpH 6~9で、総イオン塩が約0.05~0.5 Mとなるように緩衝されている）。カンジダ抗体を抗原から溶離し、溶離液の放射能を測定する。対照と比較して活性が失われていれば、試料中にカンジダ抗体が存在することがわかる。

10

【0052】

赤血球凝集

カンジダ抗体の存在は、感作剤として使用する抗体に対するカンジダ抗原を用いる標準的な赤血球凝集法で調べることができる。

【0053】

発色用試薬を用いる、カンジダ抗体のアッセイ法に関して既に述べた方法は、具体的には、熟練者がおらず、また高性能の装置が使用できない状況において用いられることが理解される。しかし、このような方法は、多数の試料が発色性結合分子を放射性元素に置換することで調べられる臨床現場で使用する際に応用することができる。

20

【0054】

「色」という表現は、電磁スペクトルの狭い可視領域に制限される表現とは解釈されず、分光光度計などの標準的なスペクトル測定装置、ならびに紫外光および赤外光の両方を対象とする、吸収および放出を測定する比色計によって測定可能な波長を含むことを意味することも理解される。

【0055】

本発明の方法が生物学的流体そのものに適用されることが対象となるが、方法の感度および特異度は、好ましくは、カンジダ選択性培地上で試験前に流体を培養することで改善可能である。

30

【0056】

感度は、等張液などの溶解剤、音波、またはリゾチームなどでカンジダ抗体を細胞外環境に放出し生物試料を事前処理して改善することもできる。例えば米国特許第4,166,765号では、細菌を含む生物試料の適切な溶解手順について開示されている。溶解剤は、後の酵素活性に干渉しない任意のものを用いることができる。

【0057】

キットの状態を実施されるアッセイ法

本発明の診断法および手段は、自宅でカンジダの自己診断を行う場合に使用されるキットとして具体化される場合がある。

40

【0058】

このキットは、試料採取手段、カンジダ抗体に対するカンジダ抗原、および試料とカンジダ抗原の反応を検出する手段を含む。

【0059】

臨床応用に適合する態様では、産物と反応物間における大きさおよび電荷分布の両方の差を利用する、等電点電気泳動またはゾーン電気泳動などの電気泳動による分離法を、反応物から産物を分離するために同様に使用することができる。電気泳動で分離された産物は、標準と比較して特徴的な位置を元に検出することができるほか、色を指標として、または免疫化学的に同定することができる。荷電性表面をもつ樹脂ビーズを用いて産物と反応

50

物を分離することもできる。

【0060】

本発明の好ましい態様において、免疫アッセイ法の反応を検出する手段は、抗体に対するカンジダ抗原を再懸濁するゼラチン状培地である。ゼラチン状培地は、透明なガラス容器またはプラスチック容器内に収納され、カンジダ抗原-抗体複合体の形成に最適な条件とするための緩衝剤およびイオン塩を含む。反応は、試料をアプライした中心から放射状に広がる透明な領域として認められる。

【0061】

免疫アッセイ法を含む、別の好ましい態様で反応を検出する手段は、緩衝剤およびイオン塩を含む密封した無菌状態のパケット内で、発色団を結合させたカンジダ抗体に対するカンジダ抗原である。アッセイ法を行う際には、パケットの内容物を、キットに含まれる、印のついた試験管内において水で希釈する。この態様には、不活性表面に固定されたカンジダ抗体に対する抗原も含まれる。アッセイ法を行う際には、カンジダ抗原が固定された不活性表面に試料を接触させた後に、発色団を結合させたカンジダ抗IgA抗体、タンパク質A、またはタンパク質Gを含む溶液を接触させる。不活性表面について、カンジダの存在を示す色を調べる。

【0062】

特に好ましい態様では、本発明のキットは、免疫クロマトグラフィーによるテストストリップ装置の状態を提供される。免疫クロマトグラフィーによるテストストリップ装置の開発および製造に大きな価値があると考えられる、いくつかの手法、フォーマット、試薬、および材料を対象とする多くの特許が存在する（例えば、米国特許第5,075,078号、国際特許出願第95/16207号、米国特許第5,654,162号、および欧州特許第0810436A1号）。これらの特許で開示された装置で行われるアッセイ法は本質的に変わらない。分析物に特異的なリガンド（通常は抗体 [Ab] であるが、必ずしも抗体である必要はない）をニトロセルロースなどの膜に固定する。検出用試薬、典型的にはラテックスまたはコロイド状金属を結合させた抗体を、接合体パッド内に沈着させる（しかし未結合状態を維持する）。試料（尿、血漿、全血など）を試料パッドに添加する際は、接合体パッドを速やかに湿らせ、検出用試薬を溶解する。検出用試薬は、試料の流れとともに、膜ストリップの先端方向に動き始める。試料中に存在する分析物は、検出用試薬を結合させた抗体に結合することになる。捕捉用試薬が固定されている領域を試料が通り過ぎると、分析物検出用試薬の複合体が捕捉される。色は、試料中に存在する分析物の量に比例して現れる。

【0063】

本発明の場合、上記の原理は変わらないが、分析物そのものを検出するのではなく、免疫クロマトグラフィーによるテストストリップ装置で抗体を検出する。このような状況では、抗体ではなく、本明細書に記載された抗原が、膜上、試料パッド、試薬パッド、および他の多孔質媒体に固定される。このような装置の開発に関しては、抗原-抗体をニトロセルロースなどに結合させる方法や、結合状態の材料を検出する方法などの多くの情報がある。これについては例えば、参照として全体が本明細書に組み入れられる、Towbinら、1979、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350を参照されたい。

【0064】

本発明を、現時点で好ましい態様に関して説明したが、本発明の精神から逸脱することなく、さまざまな修正がなされる場合があると理解すべきである。また以下の実施例は、説明目的でのみ提供され、本発明をいかなる意味においても制限することを意図しない。本明細書に引用されるすべての特許および参考文献は特に組み入れられる。

【0065】

実施例1

カンジダ抗原の調製

以下の3種類のカンジダ抗原を調製した：

- 1) 細胞壁抗原（マンノースを含む）；
- 2) 総細胞質抗原（マンノースを含まない）；および

10

20

30

40

50

3) 精製された免疫優位な抗原 (エノラーゼ)。

【0066】

カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) の臨床分離菌を、脛に鷲口瘡のある患者から得た。カンジダ種の確認は、API 20C Auxonagram ストリップ (API System S.A., France) を用いて行った。カンジダ・アルビカンスの単離菌を KEMH5 と命名した。

【0067】

200 ml の YEPD 培地 (1% 酵母エキス、2% ペプトン、2% D-グルコース) に単離菌をスターター培養として植菌し、24時間30 で空気を送り込みながらインキュベートした。次にスターター培養を、23 L の Bio-Flo Fermenter IV System (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) 中で同様の条件でインキュベートした10 L の YEPD 培地に植菌した。

10

【0068】

カンジダ培養物を Bio-Flo 発酵槽システムから回収し、Pellicon 濾過カセット (Millipore, USA) を用いて培地から分離した。濃縮された細胞を、500 ml の遠心用フラスコ内で4で15分間、1,660 × g で遠心して残存性培地から分離した。上清を捨て、ペレット状の細胞をタンパク質抽出用緩衝液 (20 mM bis-Tris, pH 6.5) に再懸濁した。次に酵母細胞を上記の手順で遠心し、再懸濁し、後の処理用にプールした。

【0069】

カンジダ細胞を、Dynomill (登録商標) (WAB, Switzerland) を用いて機械的に破壊した。摩砕は、99% の細胞が破壊されるまで続けた。溶解したカンジダ細胞抽出物を回収し、50 ml の遠心管に分注した。この抽出物を12時間、8,517 × g、4 で遠心し、不溶性の細胞壁を沈殿させた。可溶性の細胞質抗原画分を含む上清を回収し、0.45 μm のフィルターを通した。

20

【0070】

次に濾液を、等容積の凍結クロロホルムで抽出した。4 で15分間、1,036 × g で遠心した後、上方の水層を吸引し、透析チューブに移した。可溶性細胞質タンパク質画分を、カラム結合用緩衝液 (20 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl₂·4H₂O, 1 mM CaCl₂) 中で12時間かけて透析し、クロマトグラフィーに用いた。

【0071】

可溶性細胞質抗原画分から、混入している可溶性細胞壁マンノタンパク質を Con A-Sepharose クロマトグラフィーで除いた。透析後の細胞質抗原画分を0.45 μm のフィルターで濾過した。50 ml の透析抽出物を、結合用緩衝液で平衡化した Con A-Sepharose カラム (2.6 × 12.5 cm) に流速4 ml/分でアプライした。未結合状態のフロースルー画分 (非グリコシル化タンパク質) を回収した。結合状態のマンノタンパク質を、結合用緩衝液に溶解した0.5 M の α -メチルマンノシドで溶出した。この段階を実施してから次の処理を行い、カラムを清浄化して保存した。

30

【0072】

この可溶性細胞質抗原画分を、20 mM Tris.Cl, pH 7.4 を用いて一晩透析した。溶液中のタンパク質量の推定を Bio-Rad (登録商標) (Bradford) マイクロアッセイ法により、製造業者の指示書通りに行った。細胞質抗原抽出物の一部を SDS-PAGE で解析した。

【0073】

図1に示すように、大きさが約20 kDa ~ 最大約60 kDa の、いくつかの主要タンパク質のバンドが現れた。主要染色バンドは55 kDa に現れ、4本のバンドが35 ~ 45 kDa 領域、30 kDa、および20 kDa に現れた。これは、有機抽出および Con A-Sepharose クロマトグラフィーに先立つ、元の粗溶解物で見られる多数のクーマシーブルー染色バンドと極めて対照的であった。

40

【0074】

エノラーゼ抗原の精製は、可溶性カンジダ細胞質抗原と同様に実施した。ただし Con A-Sepharose クロマトグラフィーは実施しなかった。代わりに、透析、および0.20 μm のシリンジフィルター (セルロースアセテート) を用いた濾過の後に、濾過抽出物を Pharmacia Biotech Source 15Q 四級アンモニウム陰イオン交換体 (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden

50

)を充填したPharmacia Biotech XK 50/20クロマトグラフィーカラムにアプライした。このカラムを、カラム結合用緩衝液「A」(20 mM bis-Tris、pH 6.5)で平衡化してからクロマトグラフィーを行った。粗抽出物を対象とした陰イオン交換クロマトグラフィーは、Bio-Rad(登録商標)Econo(登録商標)システム(Bio-Rad Laboratories、USA)を用いて制御して記録した。結合状態のタンパク質を、緩衝液「B」(緩衝液「A」を溶媒とする1 M NaCl、pH 6.5)の塩勾配を利用してカラムから溶出した。回収した分画後のタンパク質を酵素活性アッセイ法で解析した。

【0075】

活性酵素エノラーゼは、D(+)-2-ホスホグリセリン酸(PGA)をホスホエノールピルビン酸(PEP)に加水分解する。PEPの産生は、分光光度計で240 nmの波長でモニタリングすることができる。20 μ lのタンパク質溶液を、1 mlのエノラーゼ基質溶液(50 mM Tris-HCl pH 7.4、2.7 mM 酢酸マグネシウム、1.0 mM EDTA、1.2 mM D(+)-2-ホスホグリセリン酸)と石英キュベット内で混合し、吸光度の変化を1分間隔で記録した。比活性は、1 mgのタンパク質あたり1 μ molのPGAが、PEPに1分間に変換される割合と定義した。溶液中のタンパク質量の推定は、Bio-Rad(登録商標)(Bradford)マイクロアッセイ法で行った。

【0076】

エノラーゼ活性を含む溶出物画分を選択し、12時間かけて25 $^{\circ}$ CでhpH20中で透析を行った。透析後の画分を回収し、0.20 μ mのシリンジフィルターで濾過した。濾液を、真空下で5時間かけて蒸発させて10倍に濃縮した。濃縮後の試料を、結合用緩衝液「A」(10 mM 酢酸ナトリウム、pH 4.7)で透析した直後に、メチルスルホン酸陽イオン交換体(Pharmacia LKB、Uppsala、Sweden)を充填したPharmacia Biotech Mono S HR10/10クロマトグラフィーカラムにアプライした。陽イオン交換クロマトグラフィーをBio-Rad(登録商標)Biologicシステムで行った。結合状態のタンパク質画分を、緩衝液「B」(緩衝液「A」、pH 4.7を溶媒とする1 M NaCl)の塩勾配を利用してカラムから溶出した。エノラーゼ活性を含む画分を、上記の酵素活性アッセイ法で同定した。

【0077】

図2は、エノラーゼ抗原の推定サイズに相当する、クーマシーブルー染色で得られた48 kDaの1本のバンドを示す。解糖系酵素エノラーゼとして同定された48 kDaの抗原は、エノラーゼ活性アッセイ法で確認した。

【0078】

細胞壁抗原の精製は以下の手順で行った。沈殿した不溶性細胞壁を上述の手順で遠心して回収した。細胞壁をhpH20で洗浄した後に、6,000 rpmで遠心して回収した。この段階を3回、または上清が清澄になるまで繰り返し行った。この操作を行うことで、残存する任意の可溶性細胞質抗原が、細胞壁調製物から除去された。次に、洗浄後の細胞壁ペレットを、1% v/v -Meを含む10 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)に再懸濁し、シェーカー内で37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートして細胞壁抗原を可溶化した。この試料を次に8,000 rpmで5分間遠心し、ペレットを廃棄した。上清を新しいチューブに移して再び遠心した(8,000 rpmで5分間)。次に、可溶化した細胞壁抗原を含む上清を、hpH20中で4 $^{\circ}$ Cで48時間(水を4回交換)、または匂いがなくなるまで透析を行った。透析後に、試料を8,000 rpmで5分間、3回遠心して、残存する粒子状物質を除去した。

【0079】

清澄化した後に、細胞壁抗原調製物をSDS-PAGEで解析した。結果として得られた、クーマシーブルーで染色したゲルを図3に示す。幅広く染色されたスミアが90 kDa~200 kDaの領域にみられる。タンパク質の明瞭なバンドがみられないことはマンノタンパク質に典型的であり、タンパク質ベースに付加されたマンノース基の数に差があることから、さまざまな分子量を示す。

【0080】

実施例2

酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)

血清パネルを1998~2000年にさまざまなカンジダ感染患者から採取した。陰性対照(対照

10

20

30

40

50

）の血清（n=20）は、赤十字血液バンク（Perth、Australia）から、また19～25歳の健康男性集団から得た。再発性の外陰腫カンジダ症（VVC）患者の血清（n=13）は、King Edward Memorial Hospital（Perth、Australia）から得た。口腔カンジダ症患者の血清（n=108）は、Clinipath Ltd、およびUWA Dental School（Perth、Australia）から得た。全身性カンジダ症患者（n=28）の血清（n=39）は、Princess Margaret Hospital（Perth、Australia）、およびPrince of Wales Hospital（Sydney、Australia）から得た。

【0081】

口腔および膣のカンジダ感染症の患者の場合、感染の確認は理学的検査、および関連身体部位に由来するカンジダ菌の培養により行った。全身性感染の患者の場合、感染の確認は、陽性血液培養または生検によって行った。いずれの場合も、患者の免疫状態は不明であった。

10

【0082】

表在性カンジダ症または全身性カンジダ症の患者の血清のスクリーニングを、カンジダ細胞質抗原でコーティングしたトレイを用いたELISAで行った。各抗原調製物のタンパク質の量は、BSAを標準として市販のアッセイ法（BioRad）で決定した。一連のELISAを実施して、各抗原の最適なコーティング濃度を決定した（データ非提示）。最適なコーティング濃度は、陽性と陰性の対照血清を最も良く識別可能とする濃度とした。各抗原の最適コーティング濃度を2 μg/mlと決定した。

【0083】

96ウェルのC8ストリップマイクロタイタープレート（Greiner GmbH、Germany）を、カンジダの細胞壁抗原、細胞質抗原、または精製されたエノラーゼ抗原のいずれかを用いて、実施例1で調製したようにコーティングした。抗原の50 μlの2.0 μg/ml溶液を、コーティング用緩衝液（0.1 M NaHCO₃、pH 9.3）で希釈し、各ウェルに添加した。このプレートを4 で12時間インキュベートした後に、室温になるまで放置した。プレートが室温と同じになったら、コーティング用溶液をデカントで廃棄し、プレートを軽く叩いて乾燥させた。プレートをペーパータオル上に逆さにして水分を除いた。あるいは過剰なコーティング用溶液は、自動プレート洗浄機（Dynatech Laboratories、Chantilly VA、USA）で吸引した。この段階でプレートを洗浄しないことが重要であった。

20

【0084】

300 μlのブロッキング溶液（PBS、pH 7.3、2%（w/v）BSA（ICN、Australia）、0.01%（w/v）Tween 20）を各ウェルにアプライし、25 で90分間インキュベートした。ブロッキング溶液をデカントで廃棄し、プレートを軽く叩いて乾燥させた。プレートをペーパータオル上に逆さにして、軽く少し叩いて乾燥させた。この段階でプレートを直ちに使用するか、または乾燥させて保存した。乾燥させるプレートを、シリカゲル乾燥剤の袋とともに、プラスチック製の食品用容器などの密封可能な容器内に逆さにして48時間静置した。6枚のコーティング済みのELISAマイクロウェルトレイの乾燥には、約20包の小さな乾燥剤の袋の使用が適切であった。乾燥後のプレートを、熱でシールしたパッケージ内に1包みの乾燥剤の袋とともに密封してラベルを貼り付けた。プレートは必要になるまで4 で保存した。プレートを含むパッケージを室温になるまで放置してから開封した。

30

【0085】

ブロッキング溶液で100分の1に希釈したヒト検査用血清を、50 μlのアリコートとなるようにウェル中に分注し、37 で30分間インキュベートした。一次抗体溶液を吸引し、ウェルをPBS-Tween 20で6回洗浄した。このプレートをペーパータオル上に逆さにして、10分間かけて水分を除いた。次にプレートを軽く叩いて乾燥させた。

40

【0086】

ブロッキング溶液で1/10,000に希釈した、100 μlの西洋ワサビペルオキシダーゼ抗ヒトIgG接合体を各ウェルに分注した。二次抗体溶液を37 で30分間インキュベートした。二次抗体溶液を吸引し、ウェルをPBS-Tween 20で6回洗浄した。プレートをペーパータオル上に逆さにして10分間かけて水分を除いた後に、軽く叩いて乾燥させた。プレートをペーパータオル上に少しの間逆さにし、5分間かけて水分を除いた。次にプレートを軽く叩いて

50

乾燥させた。残存する接合体が結果の差を生じる主な因子となるので、微量の二次接合体溶液がすべて確実に除去されるように特に注意を払った (Dynatech Laboratories Inc、USA)。

【0087】

100 μ lのTMB液体基質溶液を各ウェルに分注し、25 で10分間かけて反応させた。反応は、100 μ lの1 M リン酸、または1 M H₂SO₄を添加して終了させた。各ウェルの吸光度を、MRX自動プレートリーダーで450 nmで測定した (参考波長620 nm)。

【0088】

個々の免疫アッセイ法を3回実施して吸光度の平均値を得た。吸光度は図4に散布図で示す。3群のカンジダ感染患者集団を解析した。第1の集団は全身性カンジダ症患者 (全身性) で構成され、第2の集団は口腔カンジダ症患者 (口腔) で構成され、また第3の集団は外陰腔カンジダ症患者 (VVC) で構成される。検出されないカンジダ感染、または無症状性カンジダ感染のリスクが低い19~25歳の男性集団に由来する血液バンクの血清 (対照) を対照として用いた。カットオフ吸光度 (OD₄₅₀=0.22) は、陰性対照血清の平均値とした。これらのデータから、細胞質抗原を対象としたELISAの感度が89%で特異度が95%であることがわかった。これは、他のカンジダ血清学的検査で報告された値よりも高い (Zollerら、1991、J. Clin. Micro. 29: 1860~1867)。

10

【0089】

カンジダを対象としたELISAの感度をさらに高めるために複数の抗原を用いた。具体的には、細胞壁、細胞質、および天然のエノラーゼ (上述) を用いた。

20

【0090】

複数の抗原を使用することで、カンジダを対象としたELISAの感度が上昇した。表在性感染と全身性感染との間の識別もより明瞭になった。6つの陰性対照血清 (19~25歳の健康男性集団から得られた血清) を3種類のカンジダ抗原で個別にコーティングしたマイクロタイタートレイのウェルを使用するELISAに用いた。各血清について、それぞれ3種類の抗原に対する抗体価は、カットオフラインに満たなかった (図5)。このラインは、対照患者の血清とカンジダ症患者の血清の平均抗体価の比較を元に割り当てられたカットオフ値である。グラフのy軸にプロットした値は、検査対象の血清の吸光度をカットオフ吸光度で割った比である。

【0091】

次に、6人の表在性カンジダ症患者から得た血清をELISAで反応させた。この場合も、各血清の吸光度をカットオフ吸光度で割った (図6)。表在性カンジダ症患者の血清の特徴的な抗体反応は、細胞壁抗原調製物に対する高い力価であった (カットオフ値の1.5~2倍)。完全な細胞質抗原調製物に対する抗体反応性は多くの場合に陽性であった (カットオフ値の1~1.5倍)。これに対して、エノラーゼ抗原に対する抗体価は、カットオフ値に満たないか同等であった。内部カンジダ抗原 (細胞質およびエノラーゼ) に対する抗体価と、表在性感染の重症度との間には相関がみられる (データ非提示)。しかし、解析した6人の患者の感染の重症度は不明であった。

30

【0092】

全身性カンジダ症患者 (血液培養陽性で確認) から採取した6つの血清をELISAで解析した。結果を図7に示す。全身性カンジダ症患者の場合、細胞壁抗原調製物に対する抗体反応は陽性であった (カットオフ値の1.5~2倍)。また内部カンジダ抗原 (細胞質およびエノラーゼ) に対する抗体価も陽性であった (カットオフ値の1.5~2.5倍)。

40

【0093】

結論

本明細書で開示した、カンジダマンナンを含まない細胞質抗原調製物を用いて、カンジダ感染患者を同定することができる。同抗原でコーティングしたマイクロタイタートレイを用いるELISAの感度および特異度は、他のカンジダ診断検査で得られる感度および特異度より大きい。また本明細書で開示されたELISAアッセイ法のフォーマットは実施しやすく、他の利用可能なカンジダ診断アッセイ法で用いられるフォーマットより確実かつ迅速で

50

ある。ELISAフォーマットには、定量が可能であるという利点もある。この利点により、記録対象のカンジダ抗原に対する抗体反応の時間および力価の変化に関して患者のモニタリングが可能となる。本発明の試験法が、カンジダ抗原に対する抗体価を時間的にモニタリング可能だという点は、抗真菌薬に対する患者の反応の測定に関して、また患者の総生存率の予測に関して予後予測価値がある。細胞質抗原調製物を用いることの別の利点は、抗原を産生するように開発された方法が、他の利用可能な手順と比べて単純で迅速な点である（例えば、上記のZollerら、1991に記載された手順と比較されたい）。

【0094】

実施例3

フランスにおける臨床評価

実施例1および2に記載された、3種抗原検査キットの臨床評価が、グルノーブル大学医学部寄生虫学科および医科菌類学科（グルノーブル、フランス）において保存血清を用いて実施された。

10

【0095】

血液培養陽性を示した集団と、血液培養陰性を示した集団の2つの患者集団の血清が解析された。可能であれば、血液培養が陽性を示す初日の時点の前に、または後に採取された血清が採取された。血液培養陰性集団は3つの下位集団（カンジダのコロニーを形成して血清学的検査で陽性を示した患者集団、カンジダのコロニーを形成して血清学的検査で陰性を示した患者集団、およびカンジダのコロニーを形成せず血清学的検査で陰性を示した患者集団）に分けられた。血清は、1998～2000年に入院していた患者から得られた。

20

【0096】

3種抗原ELISA検査（「本出願人による抗原検査法」）が、実施例2の手順にしたがって実施された。カットオフ標準血清は、カンジダ感染歴のない19～25歳の男性集団から採取された血清をプールすることで得られた。

【0097】

表1に、本出願人による抗原検査法で、血液培養陽性患者の19人中15人が陽性を示したことを示す。

【0098】

（表1）フランスにおける研究で用いられた本出願人による3種抗原検査

患者集団	患者ID	血清ID	カンジダ種	最初に陽性(+ve)を示した培養の血清採取日	本出願人による3種Ag Ab	本出願人による3種Ag Ab/カットオフ(0.46)比	本出願人による3種のAgのスコア(カットオフ=0.46)	血清学的蛍光抗体IFI	IEP Pasteur	IEP FSK	Ag emie
カンジダ血症	AMI	C1	C.g	-4	1.597	3.5	+++	+++			
	AMI	C2		+3	1.519	3.3	+++	++	+++	+++	
	BRIG	C3	C.a	-2	0.385	0.8	-	-			
	BRIG	C4		+10	0.325	0.7	-	-			
	COE	C5	C.t	-13	0.406	0.9	-	-			
	COE	C6		+1	0.734	1.6	+	+++			
	COE	C7		+29	0.632	1.4	+	-			
	COH	C8	C.g	-14	0.597	1.3	+	-			
	COH	C9		+9	0.661	1.4	+	-			
	COH	C10		+65	0.391	0.9	-	-			
	COM	C11	C.g	+1	1.806	3.9	+++	+	+++	++	
	COM	C12		+19	1.862	4.0	+++	++	++	+++	
	CON	C13	C.g	-27	0.732	1.6	+	-			+
	CON	C14		+1	0.5	1.1	(+)	-			++
	CON	C15		+8	0.367	0.8	-	-			++
	DA SI	C17	C.a	+2	1.805	3.9	+++	+	++++	++	
	DA SI	C18		+70	1.277	2.8	++	++	++	(+)	
	FER	C19	C.a	-35	0.693	1.5	+	-			
	FER	C20		+2	0.368	0.8	-	-			-
	FER	C21		+16	0.229	0.5	-	-			
	FON	C22	C.a	-46	0.51	1.1	(+)	-			
	FON	C23		+3	1.899	4.1	+++	+++			
	FON	C24		+27	1.854	4.0	+++	+++			
	HAM	C25	C.a	+1	1.083	2.4	++	+	+	+	
	HAM	C26		+31	1.168	2.5	++	+	++	(+)	
	HEN	C27	C.t	+2	0.324	0.7	-	-			
	HEN	C28		+7	0.646	1.4	+	-			
	HEN	C29		+40	0.432	0.9	-	-			
	KHA	C30	C.a	-13	0.332	0.7	-	-			
	KHA	C31		+2	1.553	3.4	+++	+			
	KHA	C32		+27	1.393	3.0	+++	+			
	LON	C33	C.a	-2	0.341	0.7	-	-			
	LON	C34		+6	0.447	1.0	(+)	-			
	LON	C35		+61	0.35	0.8	-	-			
	MAN	C36	C.a	-28	0.505	1.1	(+)	-			
	MAN	C37		+5	0.288	0.6	-	-			
	MAN	C38		+72	0.199	0.4	-	-			
	NI	C39	C.t & C.k	+3	0.223	0.5	-	-			
	NI	C40		+9	0.368	0.8	-	++	+	+	

10

20

30

患者集団	患者ID	血清ID	カンジダ種	最初に陽性(+ve)を示した培養の血清採取日	本出願人による3種Ag Ab	本出願人による3種Ag Ab/カットオフ(0.46)比	本出願人による3種Agのスコア(カットオフ=0.46)	血清学的蛍光抗体IFI	IEP Pasteur	IEP FSK	Ag-emie
	PAS	C41	C.a	+5	0.865	1.9	+	+	++	+	
	PASe	C42		+32	1.279	2.8	++	+	++	++	+
	PIL	C43	C.p	-2	0.495	1.1	(+)	-			
	PIL	C44		+51	0.831	1.8	+	+			
	RAM	C45	C.t	+5	1.414	3.1	+++	++			
	RAM	C46		+23	1.114	2.4	++	+			
	NOI	C47	?		0	0.611	1.3	+	+++		
コロニーを形成した カンジダの血清学的検査で陰性を示した入院患者	ABE	D21	情報なし	情報なし	0.748	1.6	+	+			
	FRE	D22	情報なし	情報なし	0.454	1.0	-	-			
	BEN	D23	C.a	尿	0.331	0.7	-	-			
	BER	D24	C.t	口腔 / fae	0.463	1.0	-	-			
	BOM	D25	C.a	broncal/ fae	1.046	2.3	++	++			
	CAP	D26	情報なし	情報なし	0.658	1.4	+	-			
	CAR	D27	C.a	気管	0.933	2.0	++	+			
	CHE	D28	C.t	尿	1.376	3.0	+++	-			
	FER	D29	C.a	尿/糞便	0.363	0.8	-	-			
	GIN	D30	C.g	尿/糞便	0.663	1.4	+	-			
	PER	D31	C.a	胸部ドレーン	0.378	0.8	-	-			
コロニー形成せず カンジダの血清学的検査で陰性を示した入院患者	BEN	D32	C. spp	尿	0.469	1.0	-	-			
	BON	D33	-		0.44	1.0	-	-			
	CIA	D34	C.a	尿	0.92	2.0	++	++			
	DAVID										
	CAR	D35	-		0.651	1.4	+	-			
	PEL	D36	-		0.752	1.6	+	-			
	DI M	D37	-		0.489	1.1	(+)	-			
	FEU	D38	-		0.633	1.4	+	-			
	FOG	D39	C.a	胸部ドレーン	1.095	2.4	++	+			
	MOR	D40			0.38	0.8	-	-			
GO	D41			0.677	1.5	+	-				

10

20

30

患者集団	患者ID	血清ID	カンジダ種	最初に陽性(+ve)を示した培養の血清採取日	本出願人による3種Ag Ab	本出願人による3種Ag Ab/カットオフ(0.46)比	本出願人による3種Agのスコア(カットオフ=0.46)	血清学的蛍光抗体IFI	IEP Pasteur	IEP FSK	Ag-emie
コロニーを形成し カンジダの血清学的検査で陽性を示した入院患者	ALL	D42	C. spp	尿	1.177	2.6	++	+			
	BAR	D43	C.g, C.a, C.t	敗血症ショック	1.375	3.0	+++	+++			
	BOE	D44	C.g	尿/口腔	1.096	2.4	++	++			
	BUI	D45	情報なし	情報なし	1.125	2.4	++	++			
	COL	D46	情報なし	情報なし	1.062	2.3	++	+++			
	DAG	D47	情報なし	情報なし	0.705	1.5	+	-			
	BE	D48	C.a & C.t	口腔/気管	1.123	2.4	++	+++			
	GEN	D49	情報なし	情報なし	1.426	3.1	+++	++++			
	GEN	D50	情報なし	情報なし	1.489	3.2	+++	++++			
	LEC	D51	情報なし	情報なし	1.668	3.6	+++	+++++			
	LECr	D52	情報なし	情報なし	1.62	3.5	+++	+++++			

40

凡例：

50

カンジダ培養種	本人出願によるAb	IFI	IEP Pasteur	IEP FSK	Ag-emie
C.a = C. アルビカンス	<10 = -	<20 = -	1 arc = +	1 arc = +	1/2 dil = + 1/4 dil = +
C.g = C. グラブラータ (C. glabrata)	10-20 = +	20 = +	2 arc = ++	2 arc = ++	++
C.k = C. ケフィール (C. kefir)	20-30 = ++	40 = ++	3 arc = +++	3 arc = +++	4 arc =
C.p = C. パラプシロシス	30-40 = +++	80 = +++	4 arc = ++++	++++	
C.t = C. トロピカリス (C. tropicalis)		160 = ++++			
		320 = +++++			

【0099】

最初に血液培養が陽性を示した当日、またはこれより前に血清が採取された12人の患者のうち、8人が陽性結果（または低い陽性結果）を示した。フランスの集団によって用いられた他の血清学的検査と比較すると、患者19人中12人が免疫蛍光（IFI）血清学的検査で陽性を示した。これらの1人を除く全員が、本出願人による抗原検査法で陽性を示した。1人の患者は本出願人による抗原検査法で陽性を示したがIFIでは陰性を示した。IEP Pasteur、IEP FSK、またはAg-emie血清学的検査で陽性を示した5人の患者の全員も、本出願人による抗原検査法で陽性を示した。

10

【0100】

本出願人による検査とIFI検査法の両方で陰性を示した患者の一部が、中心静脈カテーテルの汚染に起因する一過性のカンジダ血症である可能性がある。

【0101】

コロニーが形成されたことが判明したが、血清学的検査で陰性を示した患者11人中6人は、本出願人による抗原検査法で陽性を示した。陽性を示した患者のうち2人はIFIでも陽性を示した。コロニーを形成せず血清学的検査で陰性を示した入院患者10人中6人が本出願人による抗原検査法で陽性を示し、これらの陽性患者のうち2人はIFIでも陽性であった。コロニーを形成して血清学的検査で陽性を示した全9人の患者は、本出願人による抗原検査法で陽性を示した。以上のデータは、IFIで陽性を示した患者9人中8人と比較した。唯一のIFI陰性試料は、本出願人による抗原検査法で低い陽性を示した。

20

【0102】

以上のデータの統計解析の結果を図8と表2に示す。

【0103】

(表2)

30

分類	平均 (単位)	95%信頼区間
カンジダ症患者	21.79 ^{a,b}	16.25 - 27.33
コロニー形成+血清学的検査陰性	14.55 ^{a,c}	9.67 - 19.42
非コロニー形成+血清学的検査陰性	14.2 ^{b,d}	10.68 - 17.72
コロニー形成+血清学的検査陽性	27.27 ^{c,d}	23.12 - 31.43

a.p = 0.71

b.p. = 0.58

c および d.p < 0.01

40

【0104】

カンジダに対する血液培養が陽性を示したカンジダ血症患者では、本出願人による抗原検査法で検出されたカンジダ抗体レベルの平均は21.79であった（16.25～27.33、95%CI）。独立試料 T検定を用いると、カンジダ血症集団と、コロニーを形成して血清学的検査でカンジダに対して陰性を示した集団間のp値は0.71であった。カンジダ血症集団と、カンジダ血清学的検査で陰性を示した非コロニー形成集団の平均間のp値は0.58であった。

【0105】

血液培養で陰性を示した患者の場合、カンジダ血清学的検査に陰性を示した集団に属する患者は一般に、本出願人による抗原検査法で検出されるカンジダ抗体レベルが低かった。

50

平均抗体レベルは、コロニー形成集団では14.55単位であり(9.67~19.42、95%CI)、また非コロニー形成集団では14.2単位であった(10.68~17.72、95%CI)。これらのレベルは、カンジダコロニー形成培養結果が陽性で、カンジダ血清学的検査で陽性を示した患者集団の平均抗体レベル(平均27.27; 23.12~31.43、95%CI)と比べて有意に低かった($p < 0.01$)。これらは図8のエラーバーで明瞭に認められる。

【0106】

本出願人による抗原検査法と、使用された他の検査法との間には、全体的に良好な相関が認められた。また本出願人による抗原検査法で検出された抗体価と、他の検査法で陽性を示すレベルにも良好な相関が認められた。すなわち、本出願人による抗原検査法で高い陽性結果を示した患者は、使用した他の検査法(例えば、患者のAMI、COM、DA SI、FON、PAS、およびRAM)でも同等の結果を示した。同様に、本出願人による抗原検査法で陰性、または低い陽性を示した患者は、他の検査法(例えば、患者のBRIG、FER、HEN、LON、およびMAN)でも陰性、または低い陽性を示した。血液培養陰性患者の一部が、本出願人による抗原検査法で陽性を示すことがわかっており、これは本出願人による抗原検査法の感度が極めて高いことを意味する。

10

【0107】

実施例4

スペインにおける臨床評価

実施例3で行われた評価と同様の臨床評価が、パイスバスコ(Pais Vasco)大学医学部の免疫学、微生物学、および寄生虫学科(Bilbao, Spain)のキンドス(Guillermo Quindos)教授(MD、PhD)、モラゲス(Maria Dolores Moragues)教授(PhD)、およびポントン(Jose Ponton)教授(PhD)によって実施された。

20

【0108】

この後ろ向き試験では、血液培養の結果が陽性であること、または組織学的検査および組織生検が陽性であることによって判定された侵襲性カンジダ症患者11人から血清が得られた(表3、患者1.1~1.32)。「血液培養陰性」集団は、侵襲性カンジダ症のリスクがあるが血液培養の結果は陰性である患者を元を選択された患者12人の血清からなる(表4、患者2.2~2.53)。患者1人あたり3~5サンプルの血清が検討された。微生物学検査でカンジダ症であることが証明された患者の場合、血清は、血液培養が陽性を示す前、示した時点、および示した後に採取された。血液培養陰性集団の場合、血清は、入院中のさまざまな時点で採取された。入院患者の血清に加えて、3人の健康な血液ドナーの血清も検討された(表5)。また新鮮な血清が採取された集団も、5人の患者を対象に前向き試験が行われ、2人が血液培養でカンジダ陽性を示し、3人が陽性を示さなかった(表5)。

30

【0109】

(表3) 血液培養で陽性を示した患者

患者	抽出日	3種Ag	Platelia Ag	Platelia Ab	スペイン抗B	スペイン抗GT	カンジダ種および結果
1.01	-21	+	+	+	++++	+	C. アルビカンス
1.01	-11	+	+	+	++++	++	
1.01	0	+	+	+	++++	++	
1.01	7	+	++	++	+++	+++	
1.01	13	+++	+	++	+++	+++	
1.11	-1	+++	++	+++	++++	++	C. グラブラータ
1.11	8	+++	++	+++	++++	+++	
1.11	21	+++	+	+	+++	+++	
1.11	29	+++	+	+++	++++	++++	
1.17	-11	+++	++	+++	++++	-	C. アルビカンス
1.17	-4	+++	+	+++	+++	+	
1.17	0	+++	+	++	+++	+	
1.17	3	+	+	+	+++	+	
1.17	5	+	+	+	+++	+	
1.18	-6	++	(+)	+	+++	-	C. パラプシローシス
1.18	2	++	+	+	++	-	
1.18	6	+	+++	+++	+++	-	
1.18	13	+	+++	-	+	+	
1.19	-3	-	-	-	+	-	C. アルビカンス
1.19	0	-	+	-	+	-	
1.19	4	-	+	-	+	-	
1.19	7	+	+	-	++	-	
1.22	-11	+	+	+	+	+	C. アルビカンス
1.22	-7	+	+	-	+	+	
1.22	0	+	+	+	++	+	
1.22	2	+	+	+	+	+	
1.22	7	+	+	+	+	+	
1.25	-2	-	+	-	++	-	C. アルビカンス
1.25	1	+	-	+	+++	-	
1.25	4	+	-	-	++	-	
1.25	14	+	(+)	-	++	-	
1.25	26	+	+	-	++	-	
1.26	-9	-	+	(+)	++	-	C. パラプシローシス
1.26	-5	+	+	+	+++	-	
1.26	0	+	+	+	+++	-	
1.26	9	+	++	+	+++	-	
1.26	16	+	+	+	++	-	

患者	抽出日	3種Ag	Platelia Ag	Platelia Ab	スペイン抗B	スペイン抗GT	カンジダ種および結果
1.30	-25	+	(+)	?		+?	C. アルビカンス
1.30	-4	+	+	+++		++++	
1.30	0	+	-	+++		++++	
1.30	3	+	-	?		+?	
1.30	56	+	+	?		-?	
1.31	-4	++	-	++		+?	C. アルビカンス
1.31	-1	+	+	++		++++	
1.31	6	++	(+)	++		++++	
1.31	13	++	-	++		++++	
1.32	-19	-	-	+		-	C. パラプシローシス
1.32	-17	-	+	+		-	
1.32	0	-	-	+		-	
1.32	7	-	+	+		-	
1.32	15	-	+	+		-	

10

20

30

40

50

スコアリング :

本出願人による	Platelia	Platelia		
Ab	Ag	Ab	スペインB-Ab	スペインGT Ab
0-10 = -	<0.5 = -	<1=-	<20=-	<20=-
10-20 = +	0.5-5=+	1-10=+	20-80=+	20-200=+
20-30 = ++	5-10=++	10-20=++	80-600=++	200-600=++
>30 = +++	>10=+++	>20=+++	600-5000=+++	600-1200=+++
			>5000=++++	>1200=++++

【 0 1 1 0 】

(表4) 血液培養で陰性を示した患者

患者	抽出日	本出願人によるAg	Platelia Ag	Platelia Ab	スペイン抗B	スペイン抗GT
2.2	1	++	+			-
2.2	5	++	+			-
2.2	6	++	+			(+)
2.4	1	+	(+)			ND
2.4	15	++	+			ND
2.4	17	+	+			ND
2.7	1	+	-	-	+	-
2.7	4	++	+	+	+++	-
2.7	8	+	+	+	+++	-
2.7	11	+	+	+	+++	-
2.7	15	+	+	+	+++	-
2.10	1	+	-		+++	-
2.10	3	++	-		+++	-
2.10	7	++	-		+++	-
2.10	11	++	-		++++	-
2.10	15	++	-		+++	-
2.14	1	++	(+)	+	+++	-
2.14	3	++	-	+	+++	-
2.14	6	++	-	+	+++	-
2.14	9	++	(+)	+	+++	-
2.14	12	++	+	+	+++	-
2.18	1	-	-			-
2.18	4	+	+			-
2.18	8	+	-			-
2.18	12	+	+			-
2.18	22	+	+			+
2.26	1	+	-			-
2.26	9	+	+			+
2.26	16	+	-			+
2.26	23	+	+			+
2.26	30	+	+			+
2.49	1	-	-			-
2.49	11	+	-			-
2.49	15	-	-			-
2.49	18	-	-			(+)
2.49	27	+	-			+

10

20

30

40

患者	抽出日	本出願人による Ag	Platelia Ag	Platelia Ab	スペイン抗 B	スペイン抗 GT
2.50	1	+	(+)			+
2.50	9	+	+			(+)
2.50	15	+	-			+
2.50	22	+	-			+
2.50	26	+	-			+
2.51	1	-	-			-
2.51	11	-	-			(+)
2.51	18	-	+			-
2.51	22	-	+			-
2.51	29	+	-			-
2.52	1	+	-			(+)
2.52	8	+	-			-
2.52	11	+	-			(+)
2.52	15	+	-			(+)
2.52	18	+	-			(+)
2.53	1	+	-			-
2.53	8	+	-			-
2.53	11	+	+			(+)
2.53	18	+	-			-
2.53	22	+	-			-

10

20

スコアリング：

Rockeby Ab	Platelia Ag	Platelia Ab	スペインB-Ab	スペインGT Ab
0-10 = -	<0.5 = -	<1=-	<20=-	<20=-
10-20 = +	0.5-5=+	1-10=+	20-80=+	20-200=+
20-30 = ++	5-10=++	10-20=++	80-600=++	200-600=++
>30 = +++	>10=+++	>20=+++	600-5000=+++	600-1200=+++
			>5000=++++	>1200=++++

【 0 1 1 1 】

(表5) 新しい患者および血液ドナー対照

30

患者	抽出日	血液培養	本出願人による検査法で得られた結果	Platelia Ag	Platelia Ab	スペイン抗B	スペイン抗GT
血液ドナー 1	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
血液ドナー 2	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
血液ドナー 3	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
新しい患者							
1	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
2	N/A	-	(+)	ND	ND	ND	ND
3	N/A	Asperg	+	ND	ND	ND	ND
4	?	C.g	+	ND	ND	ND	ND
4	?	C.g	+++	ND	ND	ND	ND
5	?	C.a	++	ND	ND	ND	ND
5	?	C.a	+++	ND	ND	ND	ND

40

凡例：

培養種 本出願人によるAb
 C.a=C.アルピカンス 0-10 = -
 C.g=C.グラブラータ 10-20 = +
 20-30 = ++
 >30 = +++

【0112】

表6に、2つの患者集団（血液培養陽性集団と血液培養陰性集団）に分けた、スペインで得られた原データを要約した。血液培養陽性集団のうち、血液培養で陽性であることが判明する前に、本出願人による抗原検査法で11人中8人の患者が陽性と同定された。最終的に11人中10人の患者が、本出願人による抗原検査法で陽性を示した。1人の患者（1.32）のみ陰性のままであった。この患者は、スペインにおけるジャームチューブ（germ tube）抗体検査法でも陰性を示しており、Platelia（BioRad）マンナン抗原検査法では一過的に陽性を示しただけであった。この患者は一過性のカンジダ血症であったと考えられる。

10

20

30

40

【0113】

（表6）スペインで得られたデータの要約

	本出願人による3種Ag	Platelia Ag	Platelia Ab	スペイン抗B	スペイン抗GT
培養陽性患者					
陰性結果	1	0	1	0	4
培養前に陽性	8	11	9	8	6
培養後に陽性	2		1	0	1
検査患者総数	11	11	11	8	11
培養陰性患者					
陰性結果	0	3	0	0	6
陽性結果	12	9	2	3	5
検査患者総数	12	12	2	3	11
患者ID					
1.01	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
1.11	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
1.17	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
1.18	陽性	陽性	陽性	陽性	(陽性)
1.19	(陽性)	陽性	陰性	陽性	陰性
1.22	陽性	陽性	陽性	陽性	陽性
1.25	陽性	陽性	(陽性)	陽性	陰性
1.26	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性
1.30	陽性	陽性	陽性	ND	陽性
1.31	陽性	陽性	陽性	ND	陽性
1.32	陰性	陽性	陽性	ND	陰性
患者ID					
2.02	陽性	陽性			陰性
2.04	陽性	陽性			
2.07	陽性	陽性	陽性	陽性	陰性
2.10	陽性	陰性		陽性	陰性
2.14	陽性	(陽性)	陽性	陽性	陰性
2.18	陽性	陽性			(陽性)
2.26	陽性	陽性			陽性
2.49	陽性	陰性			(陽性)
2.50	陽性	(陽性)			陽性
2.51	(陽性)	陽性			陰性
2.52	陽性	陰性			陰性
2.53	陽性	(陽性)			陰性

【0114】

本出願人による抗原検査法では、全12人の血液培養陰性患者集団が、カンジダ抗体に対し

50

て陽性を示すことがわかった。これに対してPlateliaマンナン抗原検査法では、12人中9人の患者が陽性であることがわかった（スペインにおけるジャームチューブ抗体検査法では11人中5人が陽性であった）。血液培養陰性患者集団にみられる主な問題は、他の診断法で確認されない点であった。

【0115】

全体として、本出願人による抗原検査法で得られた結果と、スペインの研究グループにより用いられた他の血清学的検査法で得られた結果の間には良好な相関がみられた。本出願人による抗原検査法で患者が強い陽性を示した（患者1.11、1.17、1.18、および1.31）場合、他の検査法でも強い陽性を示した。また本出願人による抗原検査法で血清が陰性、または低い陽性を示した場合、他の検査法でも通常、陰性、または弱い陽性を示した（例えば、患者1.19、1.22、1.25、1.26、1.32、2.18、2.26、2.49、2.50、2.51、2.52、および2.53）。

10

【0116】

新鮮な血清を解析した場合（表5）、本出願人による抗原検査法と、血清が血液培養で陽性または陰性の結果のいずれかを示したことの間には完全な相関がみられた。

【0117】

以上のデータの統計解析の結果を図9および表7に示す。図9のエラープロットダイアグラムから、血液培養陽性患者集団で、集団として血液培養陰性患者（平均17.30、95%CI：13.42～21.19）と比較して、Syscan3で高いカンジダ抗体レベルが検出されたことが明らかである（平均25.86、95%CI：16.28～35.44）。独立試料 T検定を用いたときに得られた平均値と比較して、2つの集団間の差は統計学的に有意である（ $p=0.087$ ）。

20

【0118】

（表7）本出願人による抗原検査法で得られた平均スコアの平均および95%信頼区間

分類	平均(単位)	95%信頼区間
血液培養陽性	25.86*	16.28 - 35.44
血液培養陰性	17.30*	13.42 - 21.19

30

* $p = 0.087$

【0119】

実施例5

オーストラリアにおける臨床評価

侵襲性カンジダ症患者から採取された血清が、オーストラリアの病院（1997～1998）から得られた（患者は血液癌の患者であった； $n=24$ ）。対照血清は、カンジダ感染歴のない18～25歳の男性（ $n=20$ ）から採取された。患者の血清は、実施例2に記載されているように、本出願人による抗原検査法で調べられた。各血清は3回試験され、測定値の平均が用いられた。各血清の平均吸光度の測定値を、本出願人による抗原検査法で提供される「カットオフ」キャリブレーター血清の測定値で割り、次に、この値に10を乗じて任意の単位の値が得られた。

40

【0120】

20単位という値（カットオフキャリブレーター血清値の2倍）、またはこれ以上の値を用いて陽性試料であると判定された、本出願人による抗原検査法で得られた結果を表8に示す。

【0121】

（表8）本出願人による抗原検査法で得られた結果（カットオフ値 = 20単位）

	侵襲性カンジダ症	健康な対照	合計
検査結果陽性	20	0	20
検査結果陰性	4	20	24
合計	24	20	44

【0122】

カットオフ値として20単位を用いた本出願人による抗原検査法では、検査法の特異度は100%であり、感度は83.3%であった。陽性適中率は83.3%であり、陰性適中率は100%であった。陽性とみなされた検査値を10単位、またはカットオフ血清吸光度の値の1倍とすると、この検査法の特異度は低下したが感度は上昇した(表9)。特異度は90%であり、感度は87.5%であった。陽性予測因子は91.3%に上昇し、陰性予測因子は85.7%に低下した。

【0123】

(表9) 本出願人による抗原検査法で得られた結果(カットオフ値 = 10単位)

	侵襲性カンジダ症	健康な対照	合計
検査結果陽性	21	2	23
検査結果陰性	3	18	21
合計	24	20	44

【0124】

侵襲性カンジダ症患者の血清を対象に、本出願人による抗原検査法で得られた結果を表10に示す。陰性結果の1例のみが、血液培養で陽性を示した患者に由来するものであった。4つの陰性試料のうち、2つは中心静脈路が汚染された患者に由来するものであった。4つの陰性検査結果のうち3つは、カンジダ・パラプシロシス(*C. parapsilosis*)感染患者に由来するものであり、残りはカンジダ・アルピカンス(*C. albicans*)感染患者に由来するものであった。

【0125】

(表10) 本出願人による抗原検査法による侵襲性カンジダ症患者の血清検査

10

20

30

患者	吸光度(420nm)	単位	結果	単離部位	カンジダ種
A	1.69	61	陽性	血液培養	パラプシローシス
B	0.15	5	陰性	血液培養	パラプシローシス
C	1.16	42	陽性	腹腔	グイレルモンディ (guillermondii)
D	1.85	67	陽性	血液培養	アルビカンス
E	1.16	42	陽性	血液培養	アルビカンス
F	1.49	54	陽性	腹腔	グラブラータ
G	0.56	20	陽性	腹腔	パラプシローシス
I	1.24	45	陽性	カテーテル	アルビカンス
K	0.98	35	陽性	食道	アルビカンス
L	3.46	124	陽性	腹腔	アルビカンス
M	0.19	7	陰性	中心静脈カテーテル	アルビカンス
N	1.44	52	陽性	外傷部	アルビカンス
P	0.55	20	陽性	唾液	グラブラータ
Q	1.12	40	陽性	唾液	トロピカリス
R	1.02	37	陽性	中心静脈カテーテル	アルビカンス
S	0.88	32	陽性	血液培養	アルビカンス
T	1.6	58	陽性	血液培養	グラブラータ
U	0.22	8	陰性	中心静脈カテーテル	パラプシローシス
V	0.55	20	陽性	尿	パラプシローシス
W	0.31	11	陰性	腹腔	パラプシローシス
X	0.59	21	陽性	中心静脈カテーテル	アルビカンス
Y	0.85	31	陽性	血液培養	アルビカンス
Z	1.06	38	陽性	気管支	アルビカンス
ZA	1.05	38	陽性	尿	トロピカリス

10

20

【0126】

30

侵襲性カンジダ症集団および健康な対照を対象として、本出願人による抗原検査法で得られたデータを図10と表11にエラーバーダイアグラムで示した。図10では、侵襲性カンジダ症集団の平均値は、健康血液ドナー集団(7.52単位)より高い(31.45単位)。この差は、統計学的に有意であった($p < 0.01$)。平均値の95%信頼区間の範囲も、健康ドナー集団(6.92~8.12単位)と比較して、侵襲性カンジダ症集団で高かった(23.57~39.33単位)。

【0127】

(表11) 侵襲性カンジダ症患者および健康血液ドナーの平均値の平均および95%信頼区間

集団	平均値(単位)	平均値の95%信頼区間(単位)
侵襲性カンジダ症	31.45	23.57 - 39.33
健康血液ドナー	7.52	6.92 - 8.12

40

【0128】

本研究では、本出願人による抗原検査法を用いて、侵襲性カンジダ症患者、表在性カンジダ症(口腔または腔の贅口瘡)患者、および健康男性対照の血清を調べた。共生者として健康な個人は、カンジダ抗原に対して測定可能な抗体価を示す場合がある。正常な抗体レ

50

ベルと、感染に関連した抗体レベルを区別するためにカットオフキャリブレーター血清を導入した。試験対象の血清の吸光度を、カットオフキャリブレーター血清の吸光度で割り、10を乗じて任意の単位の値を得た。陽性の指標として20単位またはこれ以上の値を検査に用いることで、侵襲性カンジダ症患者集団と健康対照を極めて明瞭に識別することができた（陽性適中率 = 83%、陰性適中率 = 100%）。試料が陽性であるとみなされた値が10単位（カットオフキャリブレーター値）より低い場合、陽性適中率はわずかに上昇して87.5%になったが、陰性適中率は90%に低下した。

【0129】

血液培養が陽性を示した患者のうち1人だけが、本出願人による抗原検査法で陰性を示した。4例の陰性血清のうち2例が、中心静脈カテーテルに汚染のみられた患者に由来するものであった。したがってこれは、抗体反応を引き起さない場合がある、これらの患者における一過性の感染を反映している可能性がある。4例の陰性結果のうち3例がカンジダ・パラプシロシスの感染によるものであったことは注目に値する。この菌は、宿主の免疫応答に対して障壁となる場合があるバイオフィルムに関連することが多い。

10

【0130】

結論として、本出願人による抗原検査法は、迅速で信頼性が高く、また容易に実施可能な検査法である。本出願人による抗原検査法は、侵襲性カンジダ感染および重度の表在性カンジダ感染の診断において、感度および特異度が優れていることがわかった。

【図面の簡単な説明】

【0131】

【図1】クーマシーブルーで染色したSDS-PAGE。カンジダの細胞質抗原画分の主要なタンパク質バンドが55 kDa、35~45 kDa領域、30 kDa、および20 kDaにみられる。

20

【図2】予測される大きさのエノラーゼ抗原に相当する48 kDaの1本のクーマシーブルー染色バンド。

【図3】清澄化した細胞壁抗原調製物のクーマシーブルー染色ゲル。幅広い染色スミアが90 kDa~200 kDaの大きさの領域にみられる。

【図4】カンジダの細胞質抗原調製物のスクリーニング対象の血清の数。

【図5】陰性対照血清を用いた、3種類のカンジダ抗原（細胞質、細胞壁、および免疫優位な抗原）に対する抗体反応性。

【図6】表在性カンジダ症患者の血清を用いた、3種類のカンジダ抗原（細胞質、細胞壁、および免疫優位な抗原）に対する抗体反応性。

30

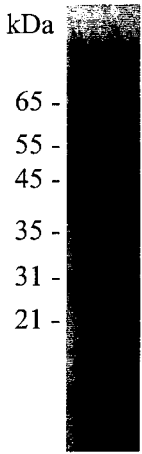
【図7】全身性カンジダ症患者の血清を用いた、3種類のカンジダ抗原（細胞質、細胞壁、および免疫優位な抗原）に対する抗体反応性。

【図8】血液培養を行ったさまざまな患者を対象に、本出願人による抗原検査法で得られた値のエラーバー（95%CI）。

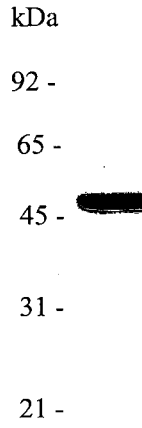
【図9】血液培養が陽性および陰性を示した患者集団の両方を対象に、本出願人による抗原検査法で測定した平均カンジダ抗体価のエラープロット（95%信頼区間）。

【図10】侵襲性カンジダ症患者および健常対照者を対象に、本出願人による抗原検査法で得られたデータのエラーバーのグラフ。

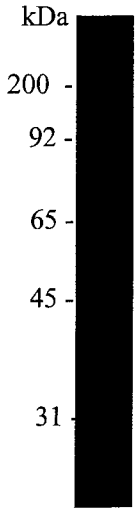
【 図 1 】



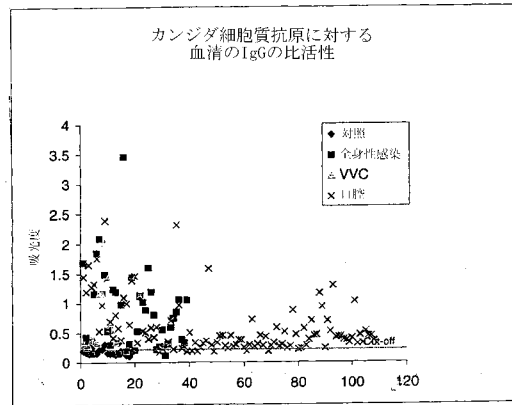
【 図 2 】



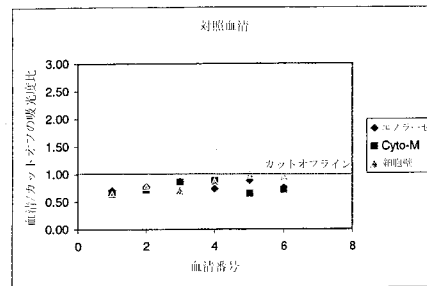
【 図 3 】



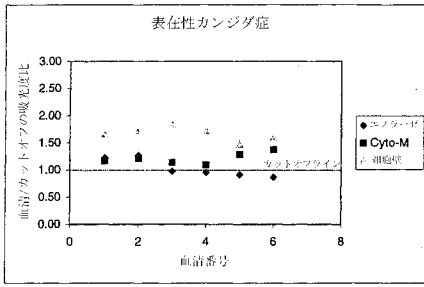
【 図 4 】



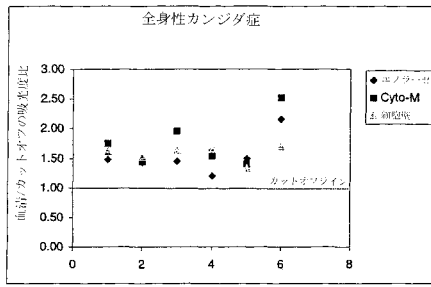
【 図 5 】



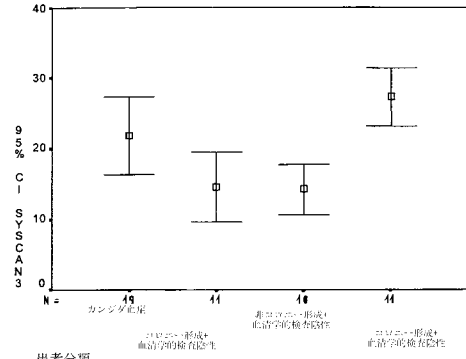
【 図 6 】



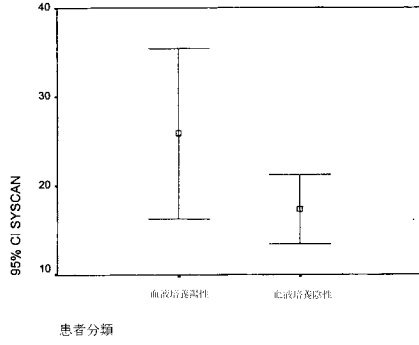
【 図 7 】



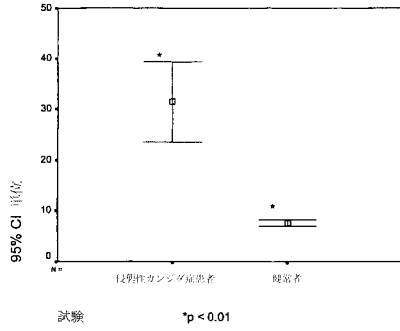
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【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
7 November 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/088741 A1

- (51) International Patent Classification: G01N 33/569, 33/571, C07K 1/36 (74) Agent: GRIFFITH HACK, Level 3, 509 St Kilda Road, Melbourne, Victoria 3004 (AU).
- (21) International Application Number: PCT/AU02/00507 (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, GI, GM, GR, GU, HK, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) International Filing Date: 23 April 2002 (23.04.2002) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CH, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/841,188 25 April 2001 (25.04.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): ROCKEY BIOMED LTD [AU/AU]; Unit 7 EIR Centre, 1 Satch Way, Technology Park, Bentley, Western Australia 6102 (AU).
- (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): WARMINGTON, John [AU/AU]; 14 Farleigh Drive, Willetton, Western Australia 6155 (AU); BALLANTYNE, Dennis [AU/AU]; 4b Compton Place, Kewdale, Western Australia 6105 (AU).
- Published:
— with international search report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide to Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/088741 A1

(54) Title: DETECTION OF CANDIDA

(57) Abstract: The present invention relates to a method and a means of diagnosing Candida infection. In particular the present invention relates to a method of diagnosing Candida infection by measuring the levels of antibody to Candida cytoplasmic antigen present in a biological sample taken from a subject at risk of, or suspected to be suffering from a Candida infection.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 1 -

DETECTION OF CANDIDAFIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a method and a means of diagnosing *Candida* infection. In particular the present invention relates to a method of diagnosing *Candida* infection which is both sensitive and rapid.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Candida is the most commonly identified causative agent of oral or vaginal thrush. However, over the last few decades *Candida* has emerged as a significant cause of life-threatening infections in hospital patients. Ironically the increasing incidence of these "invasive" or "systemic" *Candida* infections has been advances in modern medicine. Patients that are now surviving major injuries, surgery, cancers and organ transplants are vulnerable to life-threatening *Candida* infections. In the United States, *Candida* is now the fourth most common cause of blood infections in hospitals.

The major problem with systemic *Candida* infections is that there are few definitive clinical signs or symptoms. Treatment is largely based on suspicion rather than a definitive diagnosis. Even with the availability of anti-fungal drugs such as fluconazole a high mortality rate (30 to 70%) is associated with systemic *Candida* infections. The high rate of mortality is largely due to the rapid onset of infection and a rapidly fatal outcome. Without an accurate diagnosis the infection often goes unnoticed until it is too late to effectively treat. This has led to a comment by clinicians that *Candida* infections are usually diagnosed at autopsy. Accordingly, there is a need for a rapid diagnostic assay that is capable of early diagnosis of *Candida* infection so that appropriate treatment may be instituted thereby reducing the mortality rate.

The main difficulty in the diagnosis of *Candida*

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 2 -

infections is that being a commensal, mere isolation of *Candida* from body surfaces, or orifices, is not diagnostic of an infection. Culture of *Candida* from blood or deep tissue is still the main method of diagnosis of systemic *Candida* infections. However, it can take several days for a culture to become positive, by then it may be too late to effectively treat the infection. Also, false positives may occur due to contamination from superficial body sites. Of more importance, is the observation that in up to fifty percent of autopsy proven cases of systemic candidiasis, blood cultures were negative and therefore of no diagnostic value.

Nuclear magnetic resonance (NMR) and radioisotope scanning have been used to detect *Candida* infections in tissues and organs. However, those methods are not useful for early diagnosis.

Recently analysis of the *Candida* metabolite arabinitol was proposed as a diagnostic tool. However, as arabinitol is produced by the human body, further clinical studies have cast doubt on its value.

The polymerase chain reaction (PCR) has also been used in the diagnosis of invasive *Candida* infections. However, PCR has not established itself as a useful diagnostic method for *Candida* for the same reasons as outlined above ie *Candida* is a ubiquitously present microorganism and false positives, due to superficial contamination, are prevalent.

Immunoassays are the established procedures for the diagnosis of many types of infectious diseases. Immunoassays have the advantage that they are rapid and have a standardised assay format. Immunoassays can be designed to either detect *Candida* antigens, or host antibodies reactive against *Candida* antigens. Several immunoassays are commercially available for the detection of *Candida* antigens in sera or other body fluids. However, these assays lack either sensitivity or specificity or both.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 3 -

Immunoassays have been developed based on the detection of immunodominant *Candida* antigens. *Candida* mannan is a highly immunogenic cell wall antigen. However, as *Candida* is a commensal, most individuals have antibody to *Candida* mannan, so its usefulness in the diagnosis of systemic infection is limited. The applicant has now surprisingly found that a more discriminatory assay for *Candida* than previously used is the detection of cytoplasmic antigen. The advantage of this diagnostic assay is that antibody to this cytoplasmic antigen is only produced in response to an actual infection. The applicant has further demonstrated that the use of a combination of cytoplasmic antigen with other antigens is very predicative of *Candida* infection.

Accordingly, the present invention overcomes or at least alleviates the problems normally associated with diagnosing *Candida* infection.

SUMMARY OF THE INVENTION

In its most general aspect, the invention disclosed herein provides a simple and rapid method for diagnosis of *Candida* infection. The method of diagnosis of *Candida* infection may be used to screen large numbers of samples for possible infection.

Accordingly, in one aspect, the invention provides a method of diagnosing *Candida* infection, comprising the steps of:

a). obtaining a biological sample from a subject at risk of, or suspected to be suffering from, *Candida* infection, and

b). measuring the levels of antibody to *Candida* cytoplasmic antigen present in the biological sample.

Antibody levels may be measured using known techniques of immunology including enzyme-linked immunoassay (ELISA or EIA), biligand binding (sandwich technique), fluorometric assay, chemiluminescent assay, immunochromatography, radialimmunodiffusion or

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 4 -

radioimmunoassay (RIA). ELISA, immunochromatography or chemiluminescent assay methods are particularly preferred, since these are quick, sensitive, and specific, and are readily automated for large-scale use. These methods also provide quantitative determinations.

The diagnostic method utilises antigens expressed by *Candida*, especially cytoplasmic antigen. The antigens isolated from *Candida* as disclosed herein may, in certain embodiments of the diagnostic method of the present invention, be immobilised on an inert surface, embedded in a gel, or may be conjugated to a molecule which imparts colour, fluorescence or radioactivity to the antigen.

In a second aspect, the invention provides a method for assessing the prognosis of *Candida* infection, comprising the steps of measuring the levels of antibody to *Candida* cytoplasmic antigen in a biological sample.

Persons skilled in the art will appreciate that the techniques disclosed herein may be used on any type of biological sample. Preferable the biological sample is selected from the group consisting of bone marrow, plasma, spinal fluid, lymph fluid, the external sections of the skin from respiratory, intestinal, and genitourinary tracts, tears, saliva, milk, blood; both whole blood and sera, blood cells, tumours and organs. Most preferably the biological sample is sera.

Biological samples that may be analysed by the method of the present invention can also be obtained via swabs, shunts or the like. The biological samples may be analysed directly, or may be treated prior to testing by, for example, concentration or pH adjustment.

In a third aspect, the present invention further provides a method of detecting the presence or absence of a *Candida* antibody comprising the steps of:

- a). exposing a biological sample, which may include a *Candida* antibody, to an isolated cytoplasmic *Candida* antigen; and
- b). detecting the reaction between antibody and

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 5 -

antigen.

In an especially preferred embodiment of the present invention the diagnostic assay further utilises other *Candida* antigens in combination with the cytoplasmic antigen. In particular the cell wall antigen (including mannose) and/or purified immunodominant antigen (enolase) are utilised.

Accordingly, in a forth aspect of the present invention there is provided a method of diagnosing *Candida* infection, comprising the steps of:

a). obtaining a biological sample from a subject at risk of, or suspected to be suffering from, *Candida* infection, and

b). measuring the levels of antibody present in the biological sample to *Candida* cytoplasmic antigen in combination with measuring the levels of antibody to either cell wall antigen or immunodominant antigen (enolase) or both.

The reagents and means of diagnosis of the present invention may also be embodied in a kit for use in a diagnostics laboratory or may be adapted and automated for analysing large numbers of samples at a central receiving centre.

Accordingly, in a fifth aspect the invention provides a kit when used for detecting the presence or absence of a *Candida* antibody in a biological sample, comprising:

a). a biological sample collection device;
b). a cytoplasmic *Candida* antigen; and
c). means for detecting reaction between the antibody and antigen in the sample.

Suitable buffering agents and ionic salts may also be included in the kit.

In a sixth aspect the invention provides a method of preparing a cytoplasmic antigen comprising the step of removing lipoproteins by chloroform extraction.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 6 -

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows a Coomassie blue stained SDS-PAGE with major protein bands of the *Candida* cytoplasmic antigen fraction observed at 55kDa, 35 to 45kDa region, 30kDa and 20kDa.

Figure 2 shows a single Coomassie blue band of 48kDa corresponding to the expected size of the enolase antigen.

Figure 3 shows a Coomassie blue stained gel of the clarified cell wall antigen preparation. A broad smear of stain can be seen ranging in size from 90kDa to 200kDa.

Figure 4 shows a number of sera screened against the *Candida* cytoplasmic antigen preparation.

Figure 5 shows antibody reactivity to the three *Candida* antigens - cytoplasmic, cell wall and immunodominant antigens, using negative control sera.

Figure 6 shows antibody reactivity to the three *Candida* antigens - cytoplasmic, cell wall and immunodominant antigens, using sera from patients with superficial candidiasis.

Figure 7 shows antibody reactivity to the three *Candida* antigens - cytoplasmic, cell wall and immunodominant antigens, using sera from patients with systemic candidiasis.

Figure 8 shows the error bar of the Applicant antigen test values in the different blood culture patients (95%CI).

Figure 9 shows an error plot of the mean *Candida* antibody values measured by the Applicant antigen test in both the blood culture positive and negative groups of patients (95% confidence interval).

Figure 10 shows an error bar graph of the Applicant antigen test data for invasive candidiasis and healthy controls.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 7 -

ABBREVIATIONS USED

	EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
	EIA	Enzyme immunoassay
5	ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
	RIA	Radioimmunoassay
	BSA	Bovine serum albumin
	DMSO	Dimethyl sulfoxide
	β -Me	β -mercaptoethanol
10	TMB	3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine

DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The practice of the present invention employs, unless otherwise indicated, conventional molecular biology, cellular biology, and immunoassay techniques within the skill of the art. Such techniques are well known to the skilled worker, and are explained fully in the literature. See, e.g., Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual" (1988); Maniatis, Fritsch & Sambrook, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1982); "Animal Cell Culture" (R.I. Freshney, ed., 1986); "Immobilised Cells and Enzymes" (IRL Press, 1986); B. Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984); Sambrook, et al., "Molecular Cloning: a Laboratory Manual" (1989) and Ausubel, F. et al., 1989-1999, "Current Protocols in Molecular Biology" (Green Publishing, New York).

In describing the present invention, the following terminology is used in accordance with the definitions set out below.

As used herein, a "biological sample" refers to a sample of tissue or fluid isolated from a individual, including but not limited to bone marrow, plasma, serum, spinal fluid, lymph fluid, the external sections of the skin, respiratory, intestinal, and genitourinary tracts, tears, saliva, milk, blood; both whole blood and anti-coagulated whole blood, blood cells, tumours, organs, and also includes samples of *in vivo* cell culture

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 8 -

constituents, including but not limited to conditioned medium resulting from the growth of cells in cell culture medium, putatively *Candida* infected cells, recombinant cells, and cell components.

5 "Human tissue" is an aggregate of human cells which may constitute a solid mass. This term also encompasses a suspension of human cells, such as blood cells, or a human cell line.

For the purposes of this specification it will be clearly understood that the word "comprising" means "including but not limited to", and that the word "comprises" has a corresponding meaning.

10 It will be clearly understood that, although a number of prior art publications are referred to herein, this reference does not constitute an admission that any of these documents forms part of the common general knowledge in the art, in Australia or in any other country.

Persons skilled in the art will appreciate that any number of different immunoassays may be used in the present invention. For example, the *Candida* antigens disclosed herein may be used in antibody capture assays, antigen capture assays, wherein the antigen/antibody complex forms a "special" class of antigen or two-antibody sandwich assays.

TECHNIQUES USED FOR ANTIGEN PREPARATION

The term "*Candida* antigen" as used here means any one of the three separate types of *Candida* antigen utilised in the present invention, namely, cell wall antigen (including mannose), total cytoplasmic antigen (mannose depleted) or purified immunodominant antigen (enolase). Use of the term "*Candida* antigens" means that all three antigens were involved or could be utilised. A number of techniques may be used to prepare the *Candida* antigens including biochemical extraction, column chromatography, Gel fractionation, gene cloning,

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 9 -

differential precipitation, filtration, dialysis or centrifugation; however, the preferred techniques are those disclosed herein. Briefly, these techniques involve either mechanical, chemical or enzymatic lysis of *Candida* cells, followed by separation of insoluble cell walls from soluble cytoplasmic fraction by centrifugation, filtration and dialysis. Chemical treatment of cell wall fraction to release cell wall antigens followed by centrifugation and dialysis. Filtration and organic extraction of soluble cytoplasmic cell extract. Separation of mannoproteins by ConA affinity chromatography. Purification of the immunodominant enolase antigen from the soluble cytoplasmic extract by anion and cation affinity chromatography. It will be appreciated by those skilled in the art that other techniques, or modifications or variations of the above techniques, may be adopted without adversely affecting the spirit of the present invention.

TECHNIQUES USED FOR ANTIBODY PREPARATION AND LABELLING

Antiserum to the *Candida* antigens disclosed herein may be produced in a host animal such as rabbit or sheep. The serum fraction containing the antibody may be isolated by standard techniques. This antiserum may be employed in several of the embodiments of the invention hereinafter set forth, or a more sensitive and specific antibody might be obtained by further purification of the serum by electrophoresis, high-speed centrifugation or the like. Ultimately, large quantities of highly specific monoclonal antibody may be produced by means of the hybrid-myeloma techniques by methods known to those skilled in the art.

Certain embodiments of the present invention employ antibody to the *Candida* antigens immobilised on cellulose, agarose, sephadex or glass beads or other similar inert surfaces such as metal, plastic or ceramic which do not interfere with subsequent reaction. Adsorption, Br-CN activation or other techniques known in

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 10 -

the art may be employed to immobilise the antibody.

Other embodiments of the present invention employ the antibody to the *Candida* antigens conjugated to a chromophoric (highly coloured) molecule, an enzo-chromic (an enzyme which produces colour upon addition of reagents) molecule, fluorochromic (fluorescent) molecule or a luminogenic (luminescent) molecule.

The conjugate of antibody with enzyme is made using techniques known in the prior art. (For references, see Avrameas, S. and Uriel, J., in *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*, vol. 262, p. 2543, (1966); Nakane, P.K. and Pierce, G.B., in *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 14, p. 929, (1966); Nakane, P.K., in *Methods in Enzymology*, vol. 37, p. 133, (1975)).

Chromophoric molecules that may be used are 2,3-dinitrobenzene (DNB) salts, dinitrophenol (DNP) and methyl and butyl orange. Other suitable chromophoric agents are well known in the art. Enzo-chromic molecules that may be conjugated with the antibody are enzymes that give colour with appropriate reagents. Examples are alkaline phosphatase (ALP) which develops colour with nitrophenyl phosphate (NPP), glucose oxidase with glucose, and D-galactopyranoside. These and other examples are well known in the art. Examples of fluorogenic agents are 2,4-dinitrofluorobenzene and "pipsyl" derivatives.

Luminogenic molecules may be conjugated to antibodies by the method of Branchini, et al. (*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 334 [1980]). The term "chromophoric" hereinafter is intended to include "enzo-chromic", "fluorochromic" and "luminogenic" molecules as well.

Certain embodiments of the invention also utilise *Candida* antibody tagged with a radioactive element. I¹²⁵ conjugated by means of the chloramine-T procedure is a common example, but other methods known in the art may also be employed.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 11 -

TECHNIQUES USED FOR ANTIGEN IMMOBILISATION AND LABELLING

Antigen molecules may be immobilised on a solid carrier by a variety of methods known in the art, including covalent coupling, direct adsorption, physical entrapment and attachment to a protein-coated surface. For references describing the methodology, see Silman, I. H. and Katchalski, E. in Annual Review of Biochemistry, Vol. 35, p. 873 (1966); Melrose, G. J. H., in Review of Pure and Applied Chemistry, Vol. 21, p. 83, (1971); and Cuatrecasas, P. and Anfinsen, C. B., in Methods in Enzymology, Vol. 22, (1971).

Lai et al. (German OS No. 2,539,657, U.S. Pat. No. 4,066,512) discloses a method of attachment to a protein-coated surface. In this method, the internal and external surfaces of a microporous membrane are first coated with a water-insoluble protein such as zein, collagen, fibrinogen, keratin, glutelin, polyisoleucine, polytryptophan, polyphenylalanine, polytyrosine, or copolymers of leucine with p-amino phenylalanine. Such a coating renders the membrane capable of immobilising a wide variety of biologically active proteins including enzymes, antigens, and antibodies. A microporous structure is defined as one having more than 50% of its total volume in the form of pores ranging in size from 25 nanometres to 25 micrometers, preferably from 25 nanometres to 14 micrometers. A pore size range from 25 nanometres to 5 micrometers is employed in most applications herein. Uncoated microporous membranes have as much as 70 to 75% of their volume as pore space. The pores permit liquid flow through the membrane. After being coated by zein, for example, the pore space is reduced 5 to 10% with the result that the structure retains its essential properties of having a high proportion of its volume as pore space and permitting liquid flow through the pores. The structure has a large surface area in contact with any solution contained within the pores.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 12 -

Such a coated membrane, having immobilised antigen or antibody, provides a compact, easy to manipulate carrier for the immobilised antigen or antibody. Its integral structure permits removal of bound
5 from unbound components by simple mechanical means.

Non-specific binding may be minimised by interposing a second stage immobilisation step, in which an immunochemically neutral protein is immobilised to the filter. Immobilisation therefore occurs in two stages
10 according to a preferred embodiment of the invention: a first stage in which the desired immunochemical component is immobilised, and a second stage, following the completion of the first, in which an immunochemically neutral protein such as fetal calf serum or bovine gamma
15 globulin is next immobilised. The term immunochemically neutral is defined in terms of the specific components of the assay. Any protein, which does not combine immunochemically with a component of the assay or with one of the reagents, is considered immunochemically neutral,
20 even though such protein might be immunochemically reactive in another system.

Where the substance to be detected is an antibody, the immunochemically reactive moiety of the conjugate must be an antibody capable of binding
25 immunochemically with the antibody to be tested. Such antibodies may be obtained by immunising an animal with the antibody or immunoglobulin fraction of serum from the animal in which the antibody to be tested originated. For example, where the antibody to be tested is a human
30 antibody, a goat antibody against human antibody is obtained from the serum of a goat immunised against human immunoglobulin (antibody). The enzyme moiety may be any enzyme capable of catalysing a reaction which can be detected by any method known to those skilled in the art,
35 and which retains its activity after conjugation with antibody. Horseradish peroxidase is preferred because of its convenience and suitability to a wide range of

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 13 -

applications. It is well known that the enzyme catalyses the oxidations of a variety of organic compounds in the presence of hydrogen peroxide. Many such organic substrates are chromogenic, ie. undergo a colour change upon oxidation.

It has been found in the present invention that the purity of the enzyme preparation used in the formation of conjugate has an effect on the degree of non-specific binding. The greater the purity of the enzyme preparation, the less the non-specific binding. In part, the reduction is made possible because, the total amount of conjugate protein required is reduced as the specific activity of the enzyme is increased. The opportunity for non-specific binding is therefore reduced as well. In the preferred embodiment, the use of a highly purified peroxidase preparation has been found to significantly reduce the amount of colour reaction observed in control samples as compared with known positives.

20 TECHNIQUES USED FOR CANDIDA ANTIBODY DETECTION

Antibody Capture Technique

A *Candida* antigen prepared by the techniques disclosed herein is immobilised, preferably on an inert surface such as PVC, paper or a similar bibulous mat. The immobilised *Candida* antigen is then put into contact with a sample suspected of containing *Candida* antibody. In the case of aqueous samples such as blood or urine, the solution is buffered and ionic salts may be present at optimum concentration for *Candida* antibody-*Candida* antigen interaction. TRIS or borate buffered phosphate at pH 7.5 to 9.0 and ionic strength about 0.010 to 0.5, for example, are suitable buffering agents and ionic salts. The inert surface with *Candida* antigen or *Candida* antigen-*Candida* antibody complex thereon is next put into contact with antibody to *Candida* antigen conjugated to a chromophoric molecule. Preferably the *Candida* antigen is in solution

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 14 -

buffered at pH from about 7.5 to 9.0 and ionic concentration equivalent to about 0.01M to about 0.1M NaCl. After careful rinsing under water or with suitable surfactants such as Tween 20 to remove excess coloured antibody, the inert surface is inspected for colour, fluorescence or luminescence directly or after addition of colour-developing agents. Colour on the inert surface indicates interaction between immobilised *Candida* antigen-*Candida* antibody complex in solution. A control may be run for colour comparison.

This technique may be adapted to clinical use by employing *Candida* antigens tagged with radioactive elements and observing either depletion of activity in solution or uptake on solid support of radioactivity. This embodiment is highly sensitive and rapid and suitable for large numbers of samples.

Enzyme-Linked Immunoassay-ELISA

A solution comprising *Candida* antibody conjugated to enzyme which forms colour with developing reagents and buffer and ionic salts suitable for reaction between *Candida* antigen and the *Candida* antibody is put into contact and allowed to react with *Candida* antigen immobilised, preferably, on an inert surface such as PVC, paper strip or glass bead. The amount of enzochromic conjugated *Candida* antibody is sufficient to saturate about 50% of the reactive sites on the immobilized antibody. The inert surface with antibody-*Candida* antigen enzyme complex is put into contact with buffered sample suspected of containing *Candida*, said sample having an unknown amount of *Candida* antibody. The colour of the resultant immobilised antibody-*Candida* antigen-enzyme complex on the strip after colour developing reagents are added is observed in comparison to a control strip which has not been treated with sample containing *Candida* antibody. Dilution in colour on inert surface treated with sample means presence of *Candida* antibody in the

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 15 -

unknown sample.

This method may be adapted for clinical use by contacting samples and immobilised enzyme, preferably in tubes which may be centrifuged and watching developing colour spectrophotometrically. This embodiment is very sensitive and rapid.

Radialimmunodiffusion-Precipitin Reaction

One of the *Candida* antigens is suspended in a softened gelatinous medium such as agar or agarose along with buffers and salts to maintain pH between about 6.0 to 9.0 and ionic strength between about 0.01M to 0.5M for optimal antigen-antibody interaction. The suspending medium of U.S. Pat. No. 4,259,207 is a suitable example. The mixture is spread out to harden on a test plate or, preferably, poured into a disc-shaped container such as an Octolony plate. A small amount of sample is placed on the solidified gel, preferably in a centre well and the plate or disc is allowed to stand preferably covered for a period of hours. Diffusion of sample into the surrounding area occurs during this period. If the *Candida* antibody is present, it reacts with the embedded *Candida* antigen and causes an opaque area in a radial pattern about the point of application of sample. A control can be run for comparison. Calibration of an amount of *Candida* antibody in the sample, if desired, can be obtained by controlling temperature, time and size of sample and comparing the resultant size of radial area with one of known concentration.

Radioimmunoassay

A *Candida* antigen of the present invention is immobilised on an inert surface such as glass beads in a separation column. A portion of *Candida* antigen is conjugated to a radioactive element, preferably I^{125} and allowed to react with the immobilised *Candida* antigen in an amount sufficient to, saturate 50% of the binding

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 16 -

sites. The immobilised *Candida* antigen-enzyme complex is put into contact with a sample suspected of containing *Candida* antibody, the sample being buffered between pH 6-9 and containing total ionic salts about 0.05 to 0.5M for optimal reaction conditions for formation of *Candida* antigen-antibody complex. The *Candida* antibody is eluted from the antigen and the eluant is measured for radioactivity. Loss of activity compared to a control indicates *Candida* antibody in the sample.

10

Haemagglutination

Candida antibody may be assayed through standard haemagglutination techniques with *Candida* antigen to antibody used as sensitising agent.

15

It is to be understood that methods described hereinabove for assay of *Candida* antibody employing coloured reagents have been presented most specifically for application where neither trained personnel nor sophisticated instruments are available. These methods, however, may be adapted for use in a clinical setting where large numbers of samples are to be assayed by substituting radioactive elements for chromogenic conjugated molecules.

20

It is also to be understood that the term "colour" is not to be interpreted as being limited to the narrow visible range of the electromagnetic spectrum, but is meant to include wavelengths which may be measured by standard spectrophotographic instruments such as spectrophotometers and absorption and emission colourimeters in both the uv and the ir range.

30

Although it is contemplated that the methods of the present invention are to be applied to biological fluids themselves, the sensitivity and specificity of the method can be improved by culture of the fluids preferably on medium selective for *Candida* prior to testing.

35

Sensitivity may also be improved by preliminary treatment of biological samples with lysing agents such as

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 17 -

isotonic solution, sound, or lysozyme to release *Candida* antibody into the extracellular environment. U.S. Pat. No. 4,166,765, for example, discloses suitable lysing procedures for biological samples containing bacteria.

- 5 Any lysing agent may be employed which does not interfere with subsequent enzyme activity.

ASSAYS EMBODIED IN KIT FORM

- 10 The diagnostic method and means of the present invention may be embodied in the form of a kit for use by individuals for self-diagnosis of *Candida* in the privacy of their homes.

- 15 The kit comprises a means for sample collection, the *Candida* antigen to *Candida* antibody and a means for detecting reaction between sample and *Candida* antigen.

- In embodiments adapted for clinical use, electrophoretic separation techniques such as isoelectric focusing or zone electrophoresis which are based on differences of both size and charge distribution between products and reactants may likewise be used to separate products from reactants. Products separated electrophoretically may be detected by characteristic locations compared to standards or may be identified by colour or immunochemically. Resinous beads of charged surfaces may also be used to separate products and reactants.

- 20 The means for detecting reaction in the case of immunoassay in a preferred embodiment of the invention is a gelatinous medium in which the *Candida* antigen to antibody is suspended. The gelatinous medium is in a transparent glass or plastic container and comprises buffer and ionic salts for optimal conditions for formation of the *Candida* antigen-antibody complex. Reaction is noted as a transparent area radiating from the central point at which the sample is applied.

- 35 The means for detecting reaction in another preferred embodiment comprising immunoassay is the *Candida*

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 18 -

antigen to *Candida* antibody conjugated to a chromophore in a sealed, sterile packet along with buffer and ionic salts. For assay, the contents of the packet are diluted with water in a marked tube supplied in the kit. Included also in this embodiment is the antigen to *Candida* antibody immobilised on an inert surface. For assay, the inert surface with immobilised *Candida* antigen is put into contact with sample and then with the solution of chromophore-conjugated *Candida* anti-IgA antibody, protein A or protein G. The inert surface is inspected for colour, which indicates *Candida*.

In a particularly preferred embodiment, the kit of the present invention is provided in the form of an immunochromatographic test strip device. There are many patents that cover a number of technologies, formats, reagents and materials that may be of great value in the development and production of immunochromatographic test strip devices. For example, US Patent No. 5,075,078, International Patent Application No. WO95/16207, US Patent No. 5,654,162 and European Patent No. 0810436A1. The assay methods used with the devices disclosed in these patents are essentially the same. A ligand specific for the analyte (normally, but not necessarily an antibody [Ab]) is immobilised to a membrane such as nitrocellulose. The detector reagent, typically an antibody coupled to latex or colloidal metal, is deposited (but remains unbound) into the conjugate pad. When sample (urine, plasma, whole blood, etc.) is added to the sample pad, it rapidly wets through to the conjugate pad and the detector reagent is solubilised. The detector reagent begins to move with the sample flow front up the membrane strip. Analyte that is present in the sample will be bound by the antibody that is coupled to the detector reagent. As the sample passes over the zone to which the capture reagent has been immobilised, the analyte detector reagent complex is trapped. Colour develops in proportion to the amount of analyte present in the sample.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 19 -

In the present case, while the above principles are the same, rather than detecting analyte *per se*, the immunochromatographic test strip device would detect antibody. In such situations, it would be the antigen(s) disclosed herein which would immobilised onto membranes, sample pads, reagent pads and other porous media rather than antibody. There are a wealth of information regarding the development of such devices including methods of binding antigen/antibodies to nitrocellulose and the like and detecting such bound material. See for example, Towbin et al. 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350, the entirety of which is included herein by reference.

Although the invention has been described with reference to presently preferred embodiments, it should be understood that various modifications can be made without departing from the spirit of the invention. Moreover, the following examples are offered by way of illustration only and are not intended to limit the invention in any manner. All patent and literature references cited herein are expressly incorporated.

EXAMPLE 1 PREPARATION OF CANDIDA ANTIGEN

The following three types of *Candida* antigen were prepared:

- 1). Cell wall antigen (including mannose);
 - 2). Total cytoplasmic antigen (mannose depleted);
- and

3). Purified immunodominant antigen (enolase).
A clinical isolate of the *Candida albicans*, was obtained from a patient with vaginal thrush. The identity of the *Candida* species was confirmed with the use of an API 20C Auxonogram strip (API System S.A., France). The *C. albicans* isolate was designated KEMH5.

200ml YEPD culture medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% D-glucose) was inoculated with the isolate as a starter culture and incubated for 24h at 30°C with

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 20 -

aeration. The starter culture was then used to inoculate a 10L YEPD culture incubated under similar conditions in a 23L Bio-Flo Fermenter IV System (New Brunswick Scientific, Edison, NJ).

5 The *Candida* culture was harvested from the Bio-Flo fermenter system and separated from culture medium with the use of a Pellicon filtration cassette (Millipore, USA). Concentrated cells were separated from residual medium by centrifugation in 500ml centrifuge flasks for
10 15min at 1,660 x g and 4°C. The supernatant was discarded and the pelleted cells were resuspended in protein extraction buffer (20mM bis-Tris, pH 6.5). The yeast cells were then centrifuged as described previously, resuspended and pooled for further processing.

15 *Candida* cells were ruptured mechanically with the use of a Dynomill® (WAB, Switzerland). Milling was continued until 99% cell disruption was obtained. The soluble *Candida* cell extracts were collected and dispensed into 50ml centrifuge tubes. The extracts were centrifuged
20 for 12h at 8,517 x g and 4°C to precipitate insoluble cell walls. The supernatants containing the soluble cytoplasmic antigen fraction were recovered and passed through a 0.45µm filter membrane.

The filtrates were then extracted with an equal
25 volume of chilled chloroform. Following centrifugation at 4°C for 15min at 1,036 x g the upper aqueous phase was aspirated and transferred to a dialysis tube. The soluble cytoplasmic protein fractions were dialysed in column binding buffer (20mM Tris/HCl, pH 7.4, 0.5M NaCl, 1mM
30 MnCl₂.4H₂O, 1mM CaCl₂) for 12h in preparation for chromatography.

The soluble cytoplasmic antigen fraction was depleted of contaminating soluble cell wall mannoprotein by Con A-Sepharose chromatography. The dialysed
35 cytoplasmic antigen fraction was filtered through a 0.45µm filter. 50ml of the dialysed extract was applied onto a Con A-Sepharose column (2.6 x 12.5 cm) equilibrated in

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 21 -

binding buffer at a flow rate of 4ml/min. The unbound flow-through fraction (non-glycosylated proteins) was collected. Bound mannoproteins were eluted with 0.5M α -methyl mannoside in binding buffer. This step was performed before the next run and to clean the column before storage.

The soluble cytoplasmic antigen fraction was dialysed overnight against 20mM Tris.Cl, pH7.4. An estimate of the quantity of protein in solution was performed using the Bio-Rad[®] (Bradford) microassay procedure in accordance with the manufacturers instructions. A portion of the cytoplasmic antigen extract was analysed by SDS-PAGE.

As shown in Figure 1 there was a number of major protein bands observed which varied in size from approx 20kDa up to approx 60kDa in size. The major staining bands being at 55kDa, four bands in the 35 to 45kDa region, 30kDa and 20kDa. This was in stark contrast to the large number of Coomassie blue staining bands in the original crude lysate prior to organic extraction and Con A-Sepharose chromatography.

Purification of the enolase antigen was conducted in the same fashion as the soluble *Candida* cytoplasmic antigen except that it was not subjected to Con A-Sepharose chromatography. Instead, following dialysis and filtering through a 0.20 μ m syringe filter (cellulose acetate), the filtered extracts were applied to a Pharmacia Biotech XK 50/20 chromatography column packed with Pharmacia Biotech Source 15Q quaternary ammonium anion exchanger (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden). The column was equilibrated prior to chromatography with column binding buffer 'A' (20mM bis-Tris, pH 6.5). Anion exchange chromatography of the crude extracts was controlled and recorded using the Bio-Rad[®] Econo[®] system (Bio-Rad Laboratories, USA). Bound protein was eluted from the column with a salt gradient of buffer 'B' (1M NaCl in buffer 'A', pH 6.5). The recovered fractionated

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 22 -

proteins were analysed by an enzyme activity assay.

The active enzyme enolase hydrolyses D(+)-2-phosphoglyceric acid (PGA) to phosphoenolpyruvate (PEP). The production of PEP can be monitored by

5 spectrophotometry at 240nm. 20µl of protein solution was combined with 1ml of enolase substrate solution (50mM Tris-HCl pH 7.4, 2.7mM magnesium acetate, 1.0mM EDTA, 1.2mM D(+)-2-phosphoglyceric acid) in a quartz cuvette and the change of absorbance recorded at 1min intervals. The
10 specific activity was defined as the conversion of 1µmol of PGA to PEP per min per mg protein. An estimate of the quantity of protein in solution was performed using the Bio-Rad® (Bradford) microassay procedure.

Eluate fractions containing enolase activity were
15 selected and dialysed for 12h at 25°C in hpH_2O . The dialysed fractions were recovered and filtered through a 0.20µm syringe filter. The filtrate was concentrated ten-fold by evaporation under vacuum for 5h. The concentrated samples were dialysed with binding buffer 'A' (10mM sodium
20 acetate, pH 4.7) immediately prior to application to a Pharmacia Biotech Mono S HR10/10 chromatography column packed with methyl sulphonate cation exchanger (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden). Cation exchange chromatography was performed using the Bio-Rad® Biologic system. Bound
25 protein fractions were eluted from the column with a salt gradient of buffer 'B' (1M NaCl in buffer 'A', pH 4.7). Fractions containing enolase activity were identified by the enzyme activity assay described above.

Figure 2 shows a single Coomassie blue band of
30 48kDa corresponding to the expected size of the enolase antigen. The identification of the 48kDa antigen as the glycolytic enzyme enolase was confirmed by an enolase activity assay.

Purification of the cell wall antigen was
35 conducted as follows: the precipitated insoluble cell walls were collected following centrifugation as described above. The cell walls were washed with hpH_2O then

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 23 -

collected by centrifugation at 6,000 rpm. This step was repeated three times or until the supernatant was no longer cloudy. This ensured any residual soluble cytoplasmic antigen was removed from the cell wall preparation. The washed cell wall pellet was then resuspend in 10mM Phosphate buffer pH7.4 containing 1% v/v β -Me and incubated for 30min at 37°C in a shaker to solubilise the cell wall antigens. The sample was then centrifuged for 5min at 8,000 rpm and the pellet was then discarded. The supernatant was transferred into a fresh tube and recentrifuged (5min at 8,000 rpm). The supernatant containing the solubilised cell wall antigen was then dialysed in hpH_2O for 48h at 4°C (four changes of water), or until no odour was detected. Following dialysis the sample was centrifuged three times 5min at 8,000 rpm to remove any residual particular matter.

Following clarification the cell wall antigen preparation was analysed by SDS-PAGE. The resulting Coomassie blue stained gel is presented in Figure 3. A broad smear of stain is seen ranging in size from 90 kDa to 200 kDa. The lack of discrete protein bands is typical of mannoproteins, where differences in the number of mannose groups added to the protein base results in a variety of molecular weights.

25 EXAMPLE 2 ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS (ELISAS)

A serum panel was collected from 1998 to 2000 from various patients with *Candida* infections. Negative control (Control) sera (n=20) were obtained from the Red Cross Blood Bank, Perth, Australia and was obtained from healthy males in the 19 to 25 year age group. Sera (n=13) from patients with recurrent vulvo vaginal candidiasis (VVC) were obtained from King Edward Memorial Hospital, Perth, Australia. Sera (n=108) from patients with oral candidiasis were obtained from Clinipath Ltd and the UWA Dental School, Perth, Australia. Sera (n=39) from patients (n=28) with systemic candidiasis were obtained

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 24 -

from Princess Margaret Hospital, Perth, Australia and Prince of Wales Hospital, Sydney, Australia.

In the case of patients with oral and vaginal *Candida* infection, confirmation of infection was made by physical examination and by culture of *Candida* organisms from the relevant body site. In the case of patients with systemic infection, confirmation of infection was through positive blood culture or biopsy. In all cases the immune status of the patient was unknown.

Sera from patients with either superficial or systemic candidiasis were screened by ELISA using trays coated with the *Candida* cytoplasmic antigen. The protein content of each antigen preparation was determined using a commercial assay (BioRad) with BSA as a standard. A series of ELISAs were performed to determine the optimal coating concentration for each antigen (data not shown). The optimal coating concentration being that which gave the greatest discrimination between a positive and a negative control serum. For each antigen the optimum coating concentration was determined to be 2µg/ml.

A 96 well C8 strip microtitre plate (Greiner GmbH, Germany), was coated with either *Candida* cell wall antigen, cytoplasmic antigen, or purified enolase antigen as prepared in Example 1. 50µl of a 2.0µg/ml solution of the antigen was diluted in coating buffer (0.1M NaHCO₃, pH 9.3) and added to individual wells. The plates were incubated for 12h at 4°C then equilibrated to ambient temperature. After equilibrating the plates to ambient temperature, coating solution was decanted and the plate tapped dried. Plates were inverted on paper towel to drain. Alternatively excess coating solution was aspirated by the automated plate washer (Dynatech Laboratories, Chantilly VA, USA). It was important not to wash the plate at this stage.

A volume of 300µl of blocking solution (PBS pH 7.3, 2% (w/v) BSA (ICN, Australia), 0.01% (w/v) Tween 20), was applied to each well and incubated at 25°C for 90min.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 25 -

Blocking solution was decanted and the plate tapped dried. Plates were inverted on paper towel to drain and tapped dried for a second time. At this stage plates were either used immediately, or dried for storage. Plates to be
5 dried were placed inverted in a sealable container such as a plastic food container with a number of silica gel desiccant sachets for 48h. The inclusion of approximately 20 small desiccant sachets was adequate for the drying of
10 6 coated ELISA micro-well trays. Dried plates were sealed into heat-sealed packets with a single desiccant sachet and labelled. Plates were stored at 4°C until required. Packets containing plates were equilibrated to ambient temperature before opening.

Human test sera diluted 1/100 in blocking
15 solution was dispensed into wells in 50µl aliquot's and incubated at 37°C for 30min. The primary antibody solution was aspirated and wells were washed six times in PBS-Tween 20. The plates were inverted on paper towels and allowed to drain for 10min. The plates were then tapped dried.

20 A volume of 100µl of a horseradish peroxidase anti-human IgG conjugate diluted 1/10,000 in blocking solution was dispensed to each well. Secondary antibody solution was incubated at 37°C for 30min. The secondary antibody solution was aspirated and wells were washed six
25 times in PBS-Tween 20. Plates were inverted on paper towel to drain for 10min and then tapped dried. Plates were inverted on paper towel for a second time and allowed to drain for 5min. Plates were then tapped dried. Particular care was employed to ensure that all traces of
30 secondary conjugate solution was removed as residual conjugate was established as the major factor responsible for disparity of results (Dynatech Laboratories Inc, USA).

A volume of 100µl of TMB liquid substrate
35 solution was dispensed into each well and developed at 25°C for 10min. The reaction was terminated with the addition of 100µl of 1M phosphoric acid or 1M H₂SO₄. The absorbance values for each well were measured at 450nm, reference

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 26 -

620nm with a MRX automated plate reader.

Each immunoassay was performed in triplicate and the mean value of absorbance was used. The absorbances are shown as a Scatter diagram in Figure 4. Three groups of patients with *Candida* infections were analysed. The first group were patients with systemic candidiasis (Systemics), the second group had oral candidiasis (Oral) and the third group had vulvovaginal candidiasis (VVC). Blood bank sera (Control) from males in the 19 to 25 year age group, who were at low risk of having an undetected or subclinical *Candida* infection were used as a control. The cut-off absorbance ($OD_{450} = 0.22$) was the mean value of the negative control sera. From these data the cytoplasmic antigen ELISA had a sensitivity of 89% and a specificity of 95%. This is higher than that reported for other *Candida* serological tests (Zoller et al., 1991. J. Clin. Micro. 29:1860-1867).

To further increase the sensitivity of the *Candida* ELISA multiple antigens were used. These were the cell wall, cytoplasmic and native enolase (described above).

The use of multiple antigens increased the sensitivity of the *Candida* ELISA. It also provided greater discrimination between superficial and systemic infection. Six negative control sera (serum obtained from healthy males in the 19 to 25 year age group) were used in ELISAs with microtitre tray wells individually coated with the three *Candida* antigens. For each serum the antibody titre to each of the three antigens was below that of the cut-off line (Figure 5). This line is the cut off value assigned based on a comparison of the average antibody titres of sera from control patients versus those of candidiasis patients. The value plotted on the y-axis of the graph is the ratio of the cut-off absorbance divided into the absorbance of the test serum.

Serum obtained from 6 patients with superficial candidiasis was then reacted in the ELISA. Again the

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 27 -

absorbance value of each serum was divided by the absorbance of the cut-off (Figure 6). The characteristic antibody response of the sera from patients with superficial candidiasis was a high titre against the cell wall antigen preparation (1.5 to 2 times the cut-off value). The antibody reactivity to the complete cytoplasmic antigen preparation was positive in most cases (1 to 1.5 times the cut-off). In contrast the antibody titre to the enolase antigen was below or equal to that of the cut-off. There is a correlation between the antibody titre to the internal *Candida* antigens (cytoplasmic and enolase) and the severity of the superficial infection (data not shown). However, the severity of the infection in the six patients analysed was not known.

Six sera taken from patients with systemic candidiasis (confirmed by positive blood culture) were analysed by ELISA. The results are presented in Figure 7. In the case of the patients with systemic candidiasis the antibody response to the cell wall antigen preparation was positive (1.5 to 2 times the cut-off value). Also, the antibody titres to the internal *Candida* antigens (cytoplasmic and enolase) were also positive (1.5 to 2.5 times cut-off value).

25 CONCLUSIONS

The *Candida* mannan depleted cytoplasmic antigen preparation disclosed herein can be used to identify patients with *Candida* infections. The sensitivity and specificity using an ELISA with microtitre trays coated with this antigen is greater than that obtained by other *Candida* diagnostic tests. Further, the ELISA assay format disclosed herein is easier to perform, more robust and more rapid than formats used in other available *Candida* diagnostic assays. The ELISA format also has the advantage that it is quantifiable. This enables the patient to be monitored over a period of time and changes in the titre of the antibody response to the *Candida*

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 28 -

antigens recorded. The ability of the test to monitor
overtime the antibody titre to *Candida* antigens has a
prognostic value in terms of measuring the patient's
response to antifungal drugs and in the overall survival
5 prospects of the patient. Another advantage of the
cytoplasmic antigen preparation is that the method
developed to produce the antigen is simpler and more rapid
than other available procedures (eg. compare with that of
Zoller et al., 1991, *supra*).

10

EXAMPLE 3 CLINICAL EVALUATION IN FRANCE

Clinical evaluation of the triple antigen test
kit as described in Examples 1 and 2 was undertaken in the
Department of Parasitology and Medical Mycology at the
15 University of Grenoble Faculty of Medicine, Grenoble,
France using stored sera.

Sera from two groups of patients were analysed:
those that were blood culture positive and those that were
blood culture negative. When possible, sera were taken
20 before, at the time of and after the first day of positive
blood culture to be tested. The blood culture negative
group was divided into 3 subgroups: Patients that were
colonised with *Candida* and were serology positive,
patients that were colonised with *Candida* and were
25 serology negative, and patients that were not colonised
with *Candida* and serology negative. The sera were
obtained from patients hospitalised between 1998 and 2000.

The triple antigen ELIZA test ("the Applicant
antigen test") was performed according to Example 2. The
30 cut-off calibrator sera was obtained by pooling sera taken
from males in 19 to 25 age group who had no history of
Candida infections.

Table 1 shows that the Applicant antigen test was
positive in 15 out of 19 patients who had a positive blood
35 culture.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 29 -

TABLE 1

APPLICANT TRIPLE ANTIGEN TEST AS USED IN THE FRENCH STUDY

Patient Group	Patient ID	Serum ID	Candida species	Date of serum relative to first +ve culture	Applicant Triple Ag Abs	Applicant Triple Ag Abs/ Cut off (0.46) ratio	Applicant Triple Ag Score (0.46 cut-off)	Serology- immunofluorescence IFI	IEP Pasteur	IEP FSK	Ag emie
Candidemia	AMI	C1	C.g	-4	1.597	3.5	+++	+++			
	AMI	C2		+3	1.519	3.3	+++	++	+++	+++	
	BRIG	C3	C.a	-2	0.385	0.8	-	-			
	BRIG	C4		+10	0.325	0.7	-	-			
	COE	C5	C.t	-13	0.406	0.9	-	-			
	COE	C6		+1	0.734	1.6	+	+++			
	COE	C7		+29	0.632	1.4	+	-			
	COH	C8	C.g	-14	0.597	1.3	+	-			
	COH	C9		+9	0.661	1.4	+	-			
	COH	C10		+65	0.391	0.9	-	-			
	COM	C11	C.g	+1	1.806	3.9	+++	+	+++	++	
	COM	C12		+19	1.862	4.0	+++	++	++	+++	
	CON	C13	C.g	-27	0.732	1.6	+	-			+
	CON	C14		+1	0.5	1.1	(+)	-			++
	CON	C15		+8	0.367	0.8	-	-			++
	DA SI	C17	C.a	+2	1.805	3.9	+++	+	++++	++	
	DA SI	C18		+70	1.277	2.8	++	++	++	{+}	
	FER	C19	C.a	-35	0.693	1.5	+	-			
	FER	C20		+2	0.368	0.8	-	-			-
	FER	C21		+16	0.229	0.5	-	-			
	FOU	C22	C.a	-46	0.51	1.1	(+)	-			
	FOU	C23		+3	1.899	4.1	+++	+++			
	FOU	C24		+27	1.854	4.0	+++	+++			
	HAM	C25	C.a	+1	1.083	2.4	++	-	+	+	
	HAM	C26		+31	1.168	2.5	++	+	++	{+}	
	HEN	C27	C.t	+2	0.324	0.7	-	-			
	HEN	C28		+7	0.645	1.4	+	-			
	HEN	C29		+40	0.432	0.9	-	-			
	KHA	C30	C.a	-13	0.332	0.7	-	-			
	KHA	C31		-2	1.553	3.4	+++	+			
	KHA	C32		+27	1.393	3.0	+++	+			
	LON	C33	C.a	-2	0.341	0.7	-	-			
	LON	C34		+5	0.447	1.0	(+)	-			
	LON	C35		+61	0.35	0.8	-	-			
	MAN	C36	C.a	-28	0.505	1.1	(+)	-			
	MAN	C37		+5	0.288	0.6	-	-			
	MAN	C38		+72	0.193	0.4	-	-			
	NI	C39	C.t & C.k	+3	0.223	0.5	-	-			
	NI	C40		+9	0.368	0.8	-	++	+	+	

5

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 30 -

Patient Group	Patient ID	Serum ID	Candida species	Date of serum relative to first +ve culture	Applicant Triple Ag Abs	Applicant Triple Ag Abs/ Cut off (0.46) ratio	Applicant Triple Ag Score (0.46 cut-off)	Serology- immunofluorescence IPI	IEP Pasteur	IEP FSX	Ag- emie
	PAS	C41	C.a	+5	0.865	1.9	+	+	++	+	
	PASe	C42		+32	1.279	2.8	++	+	++	++	+
	PIL	C43	C.p	-2	0.495	1.1	(+)	-			
	PIL	C44		+51	0.831	1.8	+	+			
	RAM	C45	C.t	+5	1.414	3.1	+++	++			
	RAM	C46		+23	1.114	2.4	++	+			
	NOI	C47	?	0	0.611	1.3	+	+++			
Hospital patients that are colonised but have negative Candida serology	ABE	D21	No info.	No info.	0.748	1.6	+	+			
	PRE	D22	No info.	No info.	0.454	1.0	-	-			
	BEN	D23	C.a	urine	0.331	0.7	-	-			
	BER	D24	C.t	mouth/Ear	0.463	1.0	-	-			
	BOM	D25	C.a	broncal/fae	1.046	2.3	++	++			
	CAP	D26	No info.	No info.	0.658	1.4	+	-			
	CAR	D27	C.a	trachea	0.933	2.0	++	+			
	CHE	D28	C.t	urine	1.376	3.0	+++	-			
	FER	D29	C.a	urine/faeces	0.363	0.8	-	-			
	GIN	D30	C.g	urine/faeces	0.663	1.4	+	-			
	PER	D31	C.a	Thorax Drain	0.378	0.8	-	-			
Hospital patients that are non-colonised and have negative Candida serology	BRN	D32	C. spp	urine	0.469	1.0	-	-			
	BON	D33	-		0.44	1.0	-	-			
	CIA	D34	C.a	urine	0.92	2.0	++	++			
	DAVID	D35	-		0.651	1.4	+	-			
	PEL	D36	-		0.752	1.6	+	-			
	DI M	D37	-		0.489	1.1	(+)	-			
	FEU	D38	-		0.633	1.4	+	-			
	FOG	D39	C.a	Thorax Drain	1.095	2.4	++	+			
MOR	D40			0.38	0.8	-	-				
GO	D41			0.677	1.5	+	-				

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 31 -

Patient Group	Patient ID	Serum ID	Candida species	Date of serum relative to first +ve culture	Applicant Triple Ag Abs	Applicant Triple Ag Abs/ Cut off (0.46) ratio	Applicant Triple Ag Score (0.46 cut-off)	Serology Immunofluorescence IFI	IEP Pasteur	IEP FSK	Ag-emie
Hospital patients that are colonised and have positive Candida serology	ALL	D42	C. spp	urine	1.177	2.6	++	+			
	BAR	D43	C.g. C.a. C.t	septic shock	1.375	3.0	+++	+++			
	BOE	D44	C.g	urine/mouth	1.096	2.4	++	++			
	BUI	D45	No info.	No info.	1.125	2.4	++	++			
	COL	D46	No info.	No info.	1.062	2.3	++	+++			
	DAG	D47	No info.	No info.	0.705	1.5	+	-			
	BE	D48	C.a & C.t	mouth/thrush	1.123	2.4	++	+++			
	GEN	D49	No info.	No info.	1.426	3.1	+++	++++			
	GEN	D50	No info.	No info.	1.489	3.2	+++	++++			
	LEC	D51	No info.	No info.	1.668	3.6	+++	++++			
LECr	D52	No info.	No info.	1.62	3.5	+++	++++				

Legend:

5

Candida Culture Sp.	Applicant Ab	IFI	IEP Pasteur	IEP FSK	Ag-emie
C.a = C. albicans	<10 = -	<20 = -	1 arc = +	1 arc = +	1/2 dil = + 1/4 dil =
C.g = C. glabrata	10-20 = +	20 = +	2 arc = ++	2 arc = ++	++
C.k = C. kefyr	20-30 = ++	40 = ++	3 arc = +++	3 arc = +++	+++
C.p = C. parapsilosis	30-40 = +++	80 = +++	4 arc = ++++	4 arc = ++++	++++
C.t = C. tropicalis		160 = ++++			++++
		320 = +++++			+++++

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 32 -

Of the 12 patients who had sera taken before or on the day of the first positive blood culture, 8 gave a positive (or low positive) result. When compared with other serology tests used by the French group 12 out of 19 patients were
5 positive by the immunofluorescence (IFI) serology test. All but one of these was positive using the Applicant antigen test. One patient was also positive by the Applicant antigen test, but negative by IFI. All of the 5
10 patients that tested positive by IEP Pasteur, IEP FSK or Ag-emie serology tests were also positive by the Applicant antigen test.

It is possible that some of the patients that were negative by both the Applicant and the IFI test may have had a transient candidemia due to central line
15 contaminations.

Six of 11 patients that were known to be colonised, but had negative serology were positive by the Applicant antigen test. Two of the positive patients were also positive by IFI. Of the 10 non-colonised hospital
20 patients with negative serology six were positive by the Applicant antigen test, two of these positive patients were also positive by IFI. All nine patients that were colonised patients with positive serology were positive by the Applicant antigen test. These data compared to 8 out
25 of 9 patients that were positive by IFI. The only IFI negative sample was a low positive by the Applicant antigen test.

The statistical analysis of these data is presented in Figure 8 and Table 2.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 33 -

TABLE 2

5

Category	Mean (Units)	95% Confidence Interval
Candidemia Patients	21.79 ^{a,b}	16.25 - 27.33
Colonised + negative Serology	14.55 ^{a,c}	9.67 - 19.42
Non-colonised + negative serology	14.2 ^{b,d}	10.68 - 17.72
Colonised + positive serology	27.27 ^{c,d}	23.12 - 31.43

a. p = 0.71

b. p = 0.58

c & d. p <0.01

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 34 -

In the candidemia patients with positive blood culture to *Candida*, the mean of their *Candida* antibody levels detected by Applicant antigen test was 21.79 (16.25 - 27.33 95% CI). Using the Independent Samples T-test, the *p* value was 0.71 between the candidemia group and the colonised group with negative serology to *Candida*. The *p* value was 0.58 between the means of the candidemia group and the non-colonised group that was negative for *Candida* serology.

10 For the negative blood culture patients, the patients in the groups that were negative for *Candida* serology had generally lower *Candida* antibody levels detected by the Applicant antigen test. The mean antibody levels were 14.55 units in the colonised group (9.67 - 15 19.42, 95% CI) and 14.2 units in the non-colonised group (10.68-17.72, 95% CI). These levels were significantly lowered ($p < 0.01$) from the mean antibody levels in the group of patients that had positive *Candida* colonisation culture results and positive *Candida* serology, mean 27.27 20 (23.12-31.43, 95% CI). These are clearly seen in the error bars in Figure 8.

Overall, there was a good correlation with the Applicant antigen test and other tests used. There was also a good correlation with the titre of antibody 25 detected by the Applicant antigen test and the level of positiveness of the other tests ie., a patient that had a high positive result with the Applicant antigen test also had a similar result with the other tests used (eg, patients AMI, COM, DA SI, FON, PAS and RAM). Similarly 30 patients that were negative or low positive with the Applicant antigen test were also negative or weak positive by the other tests (eg, patients BRIG, FER, HEN, LON and MAN). It was noted that some of the blood culture negative patients were positive by the Applicant antigen 35 test, which demonstrated the great sensitivity of the Applicant antigen test.

EXAMPLE 4 CLINICAL EVALUATION IN SPAIN

A similar clinical evaluation to that undertaken in Example 3 was conducted by Professors Guillermo Quindós, MD, PhD, María Dolores Moragues, PhD, and José Pontón, PhD, Department of Immunology, Microbiology and Parasitology at the Faculty of Medicine, University of País Vasco, Bilbao, Spain.

The retrospective study sera were obtained from 11 patients (Table 3 - Patients 1.1 to 1.32) with invasive candidiasis as defined by positive blood culture or by histology and positive tissue biopsy. The "blood culture negative" group consisted of sera from 12 patients (Table 4 - Patients 2.2 to 2.53) selected on the basis of the patients have a risk of invasive candidiasis but having negative blood cultures. Between 3 and 5 sera were tested per patient. For patients with microbiologically proven candidiasis the sera were taken before, at the time of and after the positive blood culture. For the blood culture negative group the sera were taken at various times during hospitalisation. As well as sera from hospital patients, sera from three healthy blood donors were also tested (Table 5). Also a group of fresh sera were prospectively tested from 5 patients, two with positive *Candida* blood cultures and 3 without (Table 5).

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 36 -

Table 3

Patients With Positive Blood Culture

patient	Day extraction	Triple Ag	Platelia Ag	Platelia Ab	Spanish Anti-B	Spanish Anti-GT	Candida species & Outcome
1.01	-21	+	+	+	++++	+	C. albicans
1.01	-11	+	+	+	++++	++	
1.01	0	+	+	+	++++	++	
1.01	7	+	++	++	+++	+++	
1.01	13	+++	+	++	+++	+++	
1.11	-1	+++	++	+++	++++	++	C. glabrata
1.11	8	+++	++	+++	++++	+++	
1.11	21	+++	+	+	+++	+++	
1.11	29	+++	+	+++	++++	++++	
1.17	-11	+++	++	+++	++++	-	C. albicans
1.17	-4	+++	+	+++	+++	+	
1.17	0	+++	+	++	+++	+	
1.17	3	+	+	+	+++	+	
1.17	5	+	+	+	+++	+	
1.18	-6	++	(+)	+	+++	-	C. parapsilosis
1.18	2	++	+	+	++	-	
1.18	6	+	+++	+++	+++	-	
1.18	13	+	+++	-	+	-	
1.19	-3	-	-	-	+	-	C. albicans
1.19	0	-	+	-	+	-	
1.19	4	-	+	-	+	-	
1.19	7	+	+	-	++	-	
1.22	-11	+	+	+	+	+	C. albicans
1.22	-7	+	+	-	+	+	
1.22	0	+	+	+	++	+	
1.22	2	+	+	+	+	+	
1.22	7	+	+	+	+	+	
1.25	-2	-	+	-	++	-	C. albicans
1.25	1	+	-	+	+++	-	
1.25	4	+	-	-	++	-	
1.25	14	+	(+)	-	++	-	
1.25	26	+	+	-	++	-	
1.26	-9	-	+	(+)	++	-	C. parapsilosis
1.26	-5	+	+	+	+++	-	
1.26	0	+	+	+	+++	-	
1.26	9	+	++	+	+++	-	
1.26	16	+	+	+	++	-	

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 37 -

Patient	Day	Triple	Platelia	Platelia	Spanish	Spanish	Candida species
Ab	extraction	Ag	Ag	Ab	Anti-B	Anti-GT	& Outcome
1.30	-25	+	(+)	?		+?	<i>C. albicans</i>
1.30	-4	+	+	+++		++++	
1.30	0	+	-	+++		++++	
1.30	3	+	-	?		+?	
1.30	56	+	+	?		-?	Exitus d70
1.31	-4	++	-	++		+?	<i>C. albicans</i>
1.31	-1	+	+	++		++++	
1.31	6	++	(+)	++		++++	
1.31	13	++	-	++		++++	Exitus d32
1.32	-19	-	-	+		-	<i>C. parapsilosis</i>
1.32	-17	-	+	+		-	
1.32	0	-	-	+		-	
1.32	7	-	+	+		-	
1.32	15	-	+	+		-	Discharge d33

Scoring:

Applicant	Platelia	Platelia	Spanish B-Ab	Spanish GT Ab
Ab	Ag	Ab		
0-10 = -	<0.5 = -	<1=-	<20=-	<20=-
10-20 = +	0.5-5=+	1-10=+	20-80=+	20-200=+
20-30 = ++	5-10=++	10-20=++	80-600=++	200-600=++
>30 = +++	>10=+++	>20=+++	600-5000=+++	600-1200=+++
			>5000=++++	>1200=++++

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 38 -

Table 4

Patients With Negative Blood Culture

5

	Patient ID	Applicant Triple Ag	Platelia Ag	Platelia Ab	Spanish Anti-B	Spanish Anti-GT
2.2	1	++	+			-
2.2	5	++	+			-
2.2	6	++	+			(+)
2.4	1	+	(+)			ND
2.4	15	++	+			ND
2.4	17	+	+			ND
2.7	1	+	-	-	+	-
2.7	4	++	+		+++	-
2.7	8	+	+	+	+++	-
2.7	11	+	+	+	+++	-
2.7	15	+	+	+	+++	-
2.10	1	+	-		+++	-
2.10	3	++	-		+++	-
2.10	7	++	-		+++	-
2.10	11	++	-		++++	-
2.10	15	++	-		+++	-
2.14	1	++	(+)	+	+++	-
2.14	3	++	-	+	+++	-
2.14	6	++	-	+	+++	-
2.14	9	++	(+)	+	+++	-
2.14	12	++	+	+	+++	-
2.18	1	-	-			-
2.18	4	+	+			-
2.18	8	+	-			-
2.18	12	+	+			-
2.18	22	+	+			+
2.26	1	+	-			-
2.26	9	+	+			+
2.26	16	+	-			+
2.26	23	+	+			+
2.26	30	+	+			+
2.49	1	-	-			-
2.49	11	+	-			-
2.49	15	-	-			-
2.49	18	-	-			(+)
2.49	27	+	-			+

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 39 -

	Patent No.	Extraction	Applicant Triple Ag	Platelia Ag	Platelia Ab	Spanish Anti-B	Spanish Anti-GT
2.50	1		+	(+)			+
2.50	9		+	+			(+)
2.50	15		+	-			+
2.50	22		+	-			+
2.50	26		+	-			+
2.51	1		-	-			-
2.51	11		-	-			(+)
2.51	18		-	+			-
2.51	22		-	+			-
2.51	29		+	-			-
2.52	1		+	-			(+)
2.52	8		+	-			-
2.52	11		+	-			(+)
2.52	15		+	-			(+)
2.52	18		+	-			(+)
2.53	1		+	-			-
2.53	8		+	-			-
2.53	11		+	+			(+)
2.53	18		+	-			-
2.53	22		+	-			-

Scoring:

Rockby Ab	Platelia Ag	Platelia Ab	Spanish B-Ab	Spanish GT Ab
0-10 = -	<0.5 = -	<1 = -	<20 = -	<20 = -
10-20 = +	0.5-5 = +	1-10 = ++	20-80 = ++	20-200 = ++
20-30 = ++	5-10 = +++	10-20 = +++	80-600 = +++	200-600 = +++
>30 = +++	>10 = +++	>20 = +++	600-5000 = +++	600-1200 = +++
			>5000 = +++	>1200 = +++

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 40 -

Table 5

New Patients and Blood Donor Controls

	Patient Day extraction	Blood Culture	Applicant RESULT	Platelia Ag	Platelia Ab	Spanish Anti-B	Spanish Anti-GT
B. Donor 1	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
B. Donor 2	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
B. Donor 3	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
New Patients							
1	N/A	-	-	ND	ND	ND	ND
2	N/A	-	(+)	ND	ND	ND	ND
3	N/A	Asperg	+	ND	ND	ND	ND
4	?	C.g	+	ND	ND	ND	ND
4	?	C.g	+++	ND	ND	ND	ND
5	?	C.a	++	ND	ND	ND	ND
5	?	C.a	+++	ND	ND	ND	ND

5

Legend:

Culture Species Applicant Ab
 C.a=C. albicans 0-10 = -
 C.g=C. glabrata 10-20 = +
 20-30 = ++
 >30 = +++

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 41 -

Table 6 summarises the original Spanish data split into the two groups of patients, one blood culture positive and the other blood culture negative. Of the blood culture positive group, the Applicant antigen test identified 8/11 patients as positive before they became blood culture positive. Ultimately 10/11 patients were positive with the Applicant antigen test. Only one patient (1.32) remained negative. This patient was also negative by the Spanish germ tube antibody test and was only transiently positive by the Platelia (BioRad) mannan antigen test. It may be possible that this patient had a transient candidemia.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 42 -

Table 6

Summary of Spanish Data

	Applicant Triple Ag	Platelia Ag	Platelia Ab	Spanish Anti-B	Spanish Anti-GT
Culture Positive Patients					
Negative result	1	0	1	0	4
Positive before culture	8	11	9	8	6
Positive after culture	2		1	0	1
Total Patients tested	11	11	11	8	11
Culture Negative Patients					
Negative result	0	3	0	0	6
Positive result	12	9	2	3	5
Total Patients tested	12	12	2	3	11
Patient ID					
1.01	pos	pos	pos	pos	pos
1.11	pos	pos	pos	pos	pos
1.17	pos	pos	pos	pos	pos
1.18	pos	pos	pos	pos	(pos)
1.19	(pos)	pos	neg	pos	neg
1.22	pos	pos	pos	pos	pos
1.25	pos	pos	(pos)	pos	neg
1.26	pos	pos	pos	pos	neg
1.30	pos	pos	pos	ND	pos
1.31	pos	pos	pos	ND	pos
1.32	neg	pos	pos	ND	neg
Patient ID					
2.02	pos	pos			neg
2.04	pos	pos			
2.07	pos	pos	pos	pos	neg
2.10	pos	neg		pos	neg
2.14	pos	(pos)	pos	pos	neg
2.18	pos	pos			(pos)
2.26	pos	pos			pos
2.49	pos	neg			(pos)
2.50	pos	(pos)			pos
2.51	(pos)	pos			neg
2.52	pos	neg			neg
2.53	pos	(pos)			neg

5

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 43 -

The Applicant antigen test identified all 12 of the blood culture negative patient group as being positive for *Candida* antibody. In comparison, the Platelia Mannan antigen test identified 9/12 patients as being positive compared to 5/11 by the Spanish Germ tube antibody test. The main problem with the blood culture negative patient group was that there was no other confirmation of diagnosis.

Overall, there was good correlation with the results of the Applicant antigen test and that of the other serology tests used by the Spanish group. Where a patient was strongly positive by the Applicant antigen test (ie.: patient's 1.11, 1.17, 1.18 and 1.31), they were also strongly positive by the other tests. Also, where sera were negative or low positive by the Applicant antigen test, they are also usually negative or weakly positive by the other tests. For example, patients 1.19, 1.22, 1.25, 1.26, 1.32, 2.18, 2.26, 2.49, 2.50, 2.51, 2.52 and 2.53.

Where fresh sera was analysed (Table 5), there was a perfect correlation with the Applicant antigen test and whether the sera was blood culture positive or negative.

The statistical analysis of these data is presented in Figure 9 and Table 7. From the error plot diagram in Figure 9, it is evident that the group of patients with positive blood culture have a higher *Candida* antibody levels detected by Syscan3 (mean 25.86, 95% CI: 16.28 - 35.44) as compared to the patients with negative blood culture as a group (mean 17.30, 95% CI: 13.42 - 21.19). Comparing the means using the Independent Samples T-Test, the difference between the two groups is statistically significant at $p = 0.087$.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 44 -

Table 7

Mean and 95% Confidence Interval of Mean of Applicant
Antigen Test Scores

5

Category	Mean (Units)	95% Confidence Interval
Positive Blood Culture	25.86*	16.28 - 35.44
Negative Blood Culture	17.30*	13.42 - 21.19

* p = 0.087

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 45 -

EXAMPLE 5 CLINICAL EVALUATION IN AUSTRALIA

Sera collected from patients with invasive candidiasis was obtained from an Australian hospital (1997 to 1998), the patients had haematological malignancies (n=24). Control sera were collected from males 18 to 25 years of age (n=20) with no history of *Candida* infection. The patient sera were tested with the Applicant antigen test as described in Example 2. Each sera was tested in triplicate and the average reading used. The average absorbance reading for each serum was divided by that of the "cut-off" calibrator serum supplied with the Applicant antigen test. This value was then multiplied by 10 to give a value in arbitrary units.

The results of the Applicant antigen test using a value of 20 units (two times the cut-off calibrator serum value) or above as defining a positive sample is presented in Table 8.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 46 -

Table 8

5 Results of the Applicant antigen test using 20 units as a
cut-off

	Invasive Candidiasis	Healthy Controls	Total
Test Positive	20	0	20
Test Negative	4	20	24
Total	24	20	44

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 47 -

With the Applicant antigen test using 20 units as cut-off, the specificity of the test was 100% and sensitivity was 83.3%. -Positive predictive value was 83.3% and negative predictive value was 100%. When the value of the test considered positive was set at 10 units or 1 times the value of the cut-off sera absorbance, the specificity of the test decreased, but the sensitivity increased (Table 9). The specificity was 90%, sensitivity 87.5%. Positive predictive factor increased to 91.3%, while negative predictive factor decreased to 85.7%.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 48 -

Table 9

5 Results of the Applicant antigen test using 10 units as a
cut-off

	Invasive Candidiasis	Healthy Controls	Total
Test Positive	21	2	23
Test Negative	3	18	21
Total	24	20	44

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 49 -

The results of the Applicant antigen test using sera from patients with invasive candidiasis are presented in Table 10. Only one of the negative results came from a patient who was blood culture positive. Two of the four
5 negative samples were from patients with central line contaminations. Three of the four negative test results came from patients with *Candida parapsilosis* infections, the other being *C. albicans*.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 50 -

Table 10

Sera from Patients with Invasive Candidiasis Test with
Applicant Antigen Test

5

Patient	Abs (420 nm)	Units	Result	Site of isolation	Candida spp.
A	1.69	61	Positive	blood culture	parapsilosis
B	0.15	5	Negative	blood culture	parapsilosis
C	1.16	42	Positive	peritoneal cavity	guilliermondii
D	1.85	67	Positive	blood culture	albicans
E	1.16	42	Positive	blood culture	albicans
F	1.49	54	Positive	peritoneal cavity	glabrata
G	0.56	20	Positive	peritoneal cavity	parapsilosis
I	1.24	45	Positive	cathater	albicans
K	0.98	35	Positive	oesophagus	albicans
L	3.46	124	Positive	peritoneal cavity	albicans
M	0.19	7	Negative	central line	albicans
N	1.44	52	Positive	wound	albicans
P	0.55	20	Positive	sputum	glabrata
Q	1.12	40	Positive	sputum	tropicalis
R	1.02	37	Positive	central line	albicans
S	0.88	32	Positive	blood culture	albicans
T	1.6	58	Positive	blood culture	glabrata
U	0.22	8	Negative	central line	parapsilosis
V	0.55	20	Positive	urine	parapsilosis
W	0.31	11	Negative	peritoneal cavity	parapsilosis
X	0.59	21	Positive	central line	albicans
Y	0.85	31	Positive	blood culture	albicans
Z	1.06	38	Positive	bronch	albicans
ZA	1.05	38	Positive	urine	tropicalis

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 51 -

The Applicant antigen test data for the invasive candidiasis group and healthy controls are presented in the error bar diagram as seen in Figure 10 and Table 11. In Figure 10, the group with invasive candidiasis has a higher mean (31.45 units) as compared to the healthy blood donor group (7.52 units). This difference was statistically significant ($p < 0.01$). The 95% confidence interval range of the means was higher as well in the invasive candidiasis group (23.57 - 39.33 units), as compared to the healthy donor group (6.92 - 8.12 units).

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 52 -

Table 11

Mean and 95% Confidence Interval of the Mean of Patients
with Invasive Candidiasis and healthy blood donors

5

Group	Mean (Units)	95% CI of mean(Units)
Invasive Candidiasis	31.45	23.57 - 39.33
Healthy blood donors	7.52	6.92 - 8.12

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 53 -

In this study the Applicant antigen test was used to test sera from patients with invasive candidiasis, superficial candidiasis (oral or vaginal thrush) and healthy male controls. As a commensal organism, healthy individuals can have a measurable antibody titre to *Candida* antigens. In order to differentiate between normal and infection associated antibody levels a cut-off calibrator serum was supplied. The absorbance of the serum being tested was divided by the cut-off calibrator serum absorbance and multiplied by 10 to give an arbitrary unit value. Using a value of 20 units or above as an indicator of a positive test gave the greatest discrimination between the patient group with invasive candidiasis and the healthy controls (positive predictive value of 83%, negative predictive value 100%). If the value at which a sample was considered positive was lowered to 10 units (ie. the cut-off calibrator value), the positive predictive value increased slightly to 87.5% but the negative predictive value decreased to 90%.

Only one patient with a positive blood culture returned a negative test result with the Applicant antigen test. Two out of the four negative sera were from patients with a central line contamination. This could therefore reflect a transient infection in these patients, which may not provoke an antibody response. It is of interest that 3 of the 4 negative tests were due to *C. parapsilosis* infections. This organism is frequently associated with biofilms, which may shield it from the host immune response.

In conclusion, the Applicant antigen test is a rapid, reliable and easy test to perform. It showed good sensitivity and specificity in the diagnosis of invasive and severe superficial *Candida* infections.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 54 -

CLAIMS:

1. A method of diagnosing *Candida* infection, comprising the steps of:
 - 5 a). obtaining a biological sample from a subject at risk of, or suspected to be suffering from, *Candida* infection, and
 - b). measuring the levels of antibody to *Candida* cytoplasmic antigen present in the biological sample.
- 10 2. A method according to claim 1, wherein step b) is by a technique selected from the group consisting of enzyme-linked immunoassay (ELISA or EIA), biligand binding (sandwich technique), fluorometric assay, chemiluminescent assay, immunochromatography, radialimmunodiffusion and
- 15 radioimmunoassay (RIA).
3. A method according to claim 1, wherein step b) is by ELISA or chemiluminescent assay.
4. A method according to any one of claims 1 to 3, which utilises antigens expressed by *Candida*.
- 20 5. A method according to claim 4, wherein the antigen is the cytoplasmic antigen.
6. A method according to claim 4 or claim 5, wherein the antigen is immobilised on an inert surface, embedded in a gel, or conjugated to a molecule which imparts
- 25 colour, fluorescence or radioactivity to the antigen.
7. A method according to any one of claims 1 to 6, wherein the biological sample is selected from the group consisting of bone marrow, plasma, spinal fluid, lymph fluid, the external sections of the skin from respiratory,
- 30 intestinal, and genitourinary tracts, tears, saliva, milk, blood; both whole blood and sera, blood cells, tumours and organs.
8. A method according to claim 7, wherein the biological sample is sera.
- 35 9. A method for assessing the prognosis of *Candida* infection, comprising the steps of measuring the levels of

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

- 55 -

antibody to *Candida* cytoplasmic antigen in a biological sample.

10. A method of detecting the presence or absence of a *Candida* antibody comprising the steps of:

5 a). exposing a biological sample, which may include a *Candida* antibody, to an isolated cytoplasmic *Candida* antigen; and

b). detecting the reaction between antibody and antigen.

11. A method according to claim 10, further comprising the step of detecting the reaction between further antibody(ies) and other *Candida* antigens.

12. A method according to claim 11, wherein the further antibody(ies) are to the cell wall antigen or purified immunodominant antigen (enolase).

15 13. A method of diagnosing *Candida* infection, comprising the steps of:

a). obtaining a biological sample from a subject at risk of, or suspected to be suffering from, *Candida* infection, and

20 b). measuring the levels of antibody present in the biological sample to *Candida* cytoplasmic antigen in combination with measuring the levels of antibody to either cell wall antigen or immunodominant antigen (enolase) or both.

25 14. A kit when used for detecting the presence or absence of a *Candida* antibody in a biological sample, comprising:

a). a biological sample collection device;

b). a cytoplasmic *Candida* antigen; and

30 c). means for detecting reaction between the antibody and antigen in the sample.

15. A kit according to claim 14, further comprising buffering agents and ionic salts.

16. A method of preparing a cytoplasmic antigen

35 comprising the step of removing lipoproteins by chloroform extraction.

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

1/10

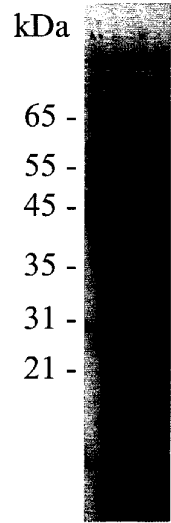


FIGURE 1

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

2/10

kDa

92 -

65 -

45 -

31 -

21 -



FIGURE 2

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

3/10

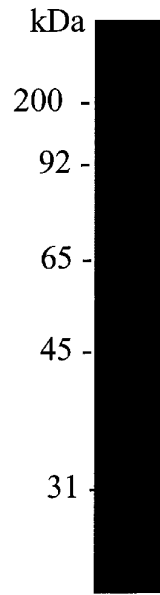
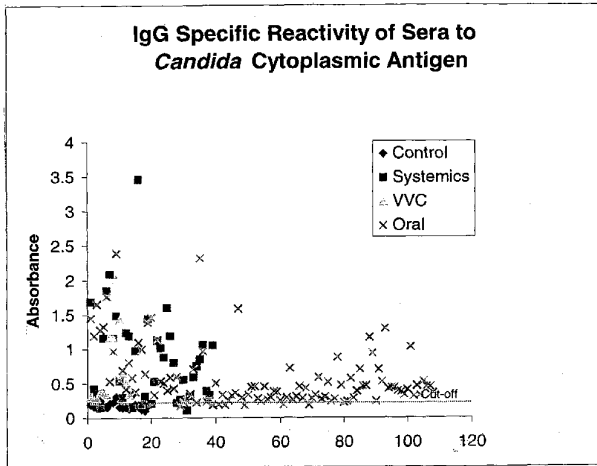


FIGURE 3

4/10



5/10

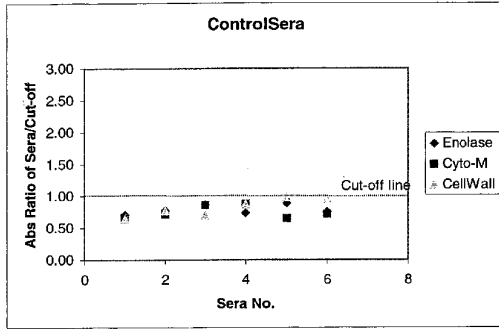


FIGURE 5

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

6/10

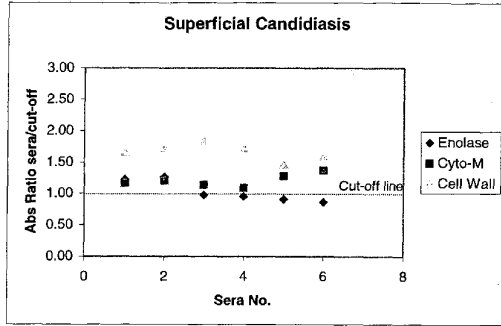


FIGURE 6

7/10

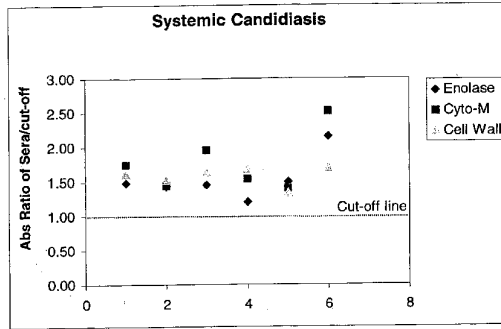


FIGURE 7

8/10

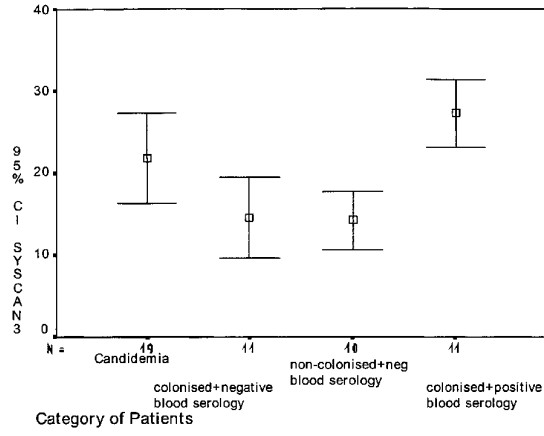


FIGURE 8

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

9/10

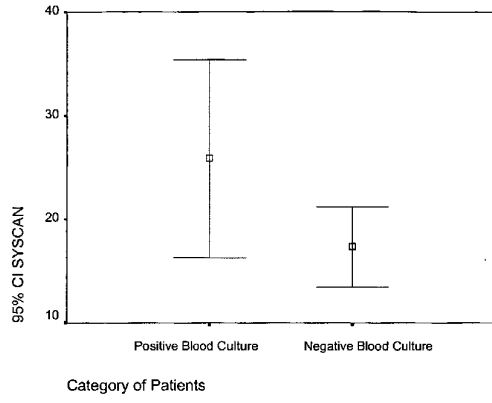


FIGURE 9

WO 02/088741

PCT/AU02/00507

10/10

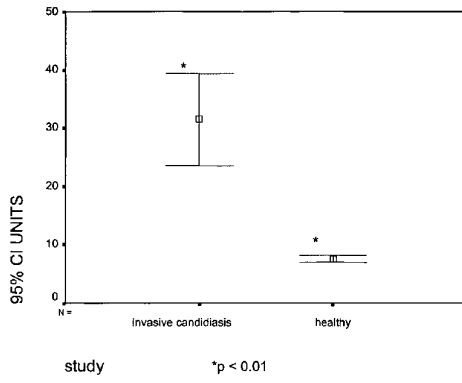


FIGURE 10

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00507
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl. ⁷ : G01N 33/569, 33/571, C07K 1/36		
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)		
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) Derwent WPAT, Japio; STN CAPLUS, Medline; Sample Keywords - Candida, antigen, cytoplasm(ic), soluble.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	US 4670382 A (Buckley et al.) 2 June 1987; see the examples in particular.	1-16
X, Y	US 4806465 A (Buckley et al.) 21 February 1989; see the examples in particular.	1-16
X	EP 1026245 A1 (Takara Shuzo Co Ltd) 9 August 2000; see the examples in particular.	1-15
<input checked="" 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:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" 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" 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)	"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	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 13 June 2002	Date of mailing of the international search report 19 JUN 2002	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA E-mail address: pci@ipaustralia.gov.au Facsimile No. (02) 6285 3929	Authorized officer: DAVID HENNESSY Telephone No : (02) 6283 2255	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00507
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^a	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0145333 B1 (Temple University of the Commonwealth System of Higher Education) 19 June 1985; see the examples in particular.	1-15
X	Richardson, M.D. et al. (1983) Further evaluation of factors affecting a rapid ELISA procedure for detection of IgG antibodies to <i>Candida albicans</i> , <i>Mycopathologia</i> , vol. 82, 167-173; see the abstract in particular.	1-16
X,Y	Karwowska, W. et al. (1984) Antibody Levels To Major Cytoplasmic Antigens isolated From Standard And Patient Strains, <i>Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)</i> , 135 D, 145-159; see the Discussion in particular.	1-16
Y	Benbouzid, A. and Guinet, R. (1984) Purification of soluble specific antigens of systemic candidiasis by antibody affinity chromatography, <i>Journal of Chromatography</i> , vol. 306, 117-124; see the Summary in particular.	1-16
X,Y	Morhart, M. et al. (1994) Evaluation of Enzyme Immunoassay for <i>Candida</i> Cytoplasmic Antigens in Neutropenic Cancer Patients, <i>Journal of Clinical Microbiology</i> , vol. 32 no.3, 766-776; see the Discussion in particular.	1-16
X,Y	Araj, G.F. et al. (1982) Diagnostic Value of the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of <i>Candida albicans</i> Cytoplasmic Antigen in Sera of Cancer Patients, <i>Journal of Clinical Microbiology</i> , vol.16 no.1, 46-52; see the Discussion in particular.	1-16
X,Y	Ashley, C. et al. (1997) Release of <i>Candida albicans</i> yeast antigens upon interaction with human neutrophils in vitro, <i>J. Med. Microbiol.</i> , vol. 46, 747-755; see the Introduction, Discussion in particular.	1-16
X,Y	Hopwood, V. et al. (1985) A Comparison of Methods for the Detection of <i>Candida</i> Antigens. Evaluation of a New Latex Reagent; <i>Journal of Immunological Methods</i> , vol. 80, 199-210; See materials and methods, results and discussion in particular	1-16
X,Y	Mauch, H. and Brombach, J. (1981) Analysis of a Solid-Phase Radioimmunoassay For Antibodies to Cytoplasmic Antigen Fractions of <i>Candida Albicans</i> , <i>Journal of Immunological Methods</i> , vol. 43, 181-192; see abstract and materials and methods in particular.	1-16
Y	Odds, F.C. and Evans, E.G.V. (1980) Distribution of pathogenic yeasts and humoral antibodies to candida among hospital inpatients, <i>J.Clin.Pathol.</i> , vol. 33, 750-756; see page 755, first column, third paragraph.	1-16
Y	Holliday, M.G. (1981) <i>Candida albicans</i> cytoplasmic antigens for use in serodiagnosis of systemic candidiasis, <i>Medical laboratory Sciences</i> , vol 38, 285-288; see whole document.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/AU02/00507
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Greenfield, R.A. and Jones, M.J. (1981) Purification and Characterization of a Major Cytoplasmic Antigen of <i>Candida albicans</i> , <i>Infection and Immunity</i> , vol. 34 no. 2, 469-477; see the abstract in particular.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/AU02/00507

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					
US	4670382	CA	1251747	CA	1266233	DE	3485054
		EP	145333	JP	60155135	JP	2276572
		JP	5306300	US	4806465		
US	4806465	US	4670382		SEE ABOVE		
EP	145333	US	4670382		SEE ABOVE		
EP	1026245	CN	1280620	JP	11103862		
							END OF ANNEX

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/543	5 4 5 A
G 0 1 N 33/573	G 0 1 N 33/569	F
	G 0 1 N 33/573	A

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,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,GQ,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,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 バランタイン デニス

オーストラリア国 ウェスタン オーストラリア州 ケウダル コンプトン プレイス 4 ビー
Fターム(参考) 4H045 AA11 CA15 DA86 EA52 GA01 GA15 GA26

專利名称(译)	检测念珠菌		
公开(公告)号	JP2004529350A	公开(公告)日	2004-09-24
申请号	JP2002585990	申请日	2002-04-23
[标]申请(专利权)人(译)	罗克比生物医学有限公司		
申请(专利权)人(译)	Rokubai生物医学有限公司		
[标]发明人	ワーミントンジョン バラントインデニス		
发明人	ワーミントン ジョン バラントイン デニス		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/40 G01N33/48 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/573		
CPC分类号	A61P31/10 C07K14/40 G01N33/56961 G01N33/571 G01N2333/40		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/53.Y C07K14/40 G01N33/48.B G01N33/531.B G01N33/543.545.A G01N33/569.F G01N33/573.A		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/CA15 4H045/DA86 4H045/EA52 4H045/GA01 4H045/GA15 4H045/GA26		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	09/841188 2001-04-25 US		
其他公开文献	JP2004529350A5 JP3969722B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

诊断念珠菌感染的方法和领域本发明涉及诊断念珠菌感染的方法和领域。特别地，本发明涉及一种通过测量从存在于或被怀疑患有念珠菌感染的受试者的生物样品中存在的针对念珠菌胞质抗原的抗体水平来诊断念珠菌感染的方法。

		特許庁 (P2004-529350A)
		(43) 公表日 平成16年9月24日(2004.9.24)
(51) Int. Cl. ⁷	FI	テーマコード(参考) 4H045
G01N 33/53	G01N 33/53	N
C07K 14/40	G01N 33/53	Y
G01N 33/48	C07K 14/40	
G01N 33/531	G01N 33/48	B
G01N 33/543	G01N 33/531	B
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全101頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2002-585990(P2002-585990)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成14年4月23日(2002.4.23)	ロックバイ バイオメド リミテッド
(85) 前記文提出日	平成15年10月27日(2003.10.27)	オーストラリア国 ウェスタン オーストラリア州 ベントリー テクノロジー パーク サリッチ ウェイ 1 イーアイアール センター ユニット 7
(86) 国際出願番号	PCT/AU2002/000507	(74) 代理人
(87) 国際公開番号	W02002/088741	100102978
(87) 国際公開日	平成14年11月7日(2002.11.7)	弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	09/841,188	(74) 代理人
(32) 優先日	平成13年4月25日(2001.4.25)	100108774
(33) 優先権主張国	米国(US)	弁理士 橋本 一憲
		(72) 発明者
		ワーミントン ジョン
		オーストラリア国 ウェスタン オーストラリア州 ウィレットン ファーレイ ドライブ 14
		最終頁に続く