



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 41 39 840 B4** 2005.06.02

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **P 41 39 840.8**
(22) Anmeldetag: **03.12.1991**
(43) Offenlegungstag: **11.06.1992**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **02.06.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C07K 14/195**
A61K 49/00, C12Q 1/04, C12Q 1/28,
G01N 33/53
// C12N 1/20

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(30) Unionspriorität:
621845 04.12.1990 US

(71) Patentinhaber:
Quidel Corp., San Diego, Calif., US

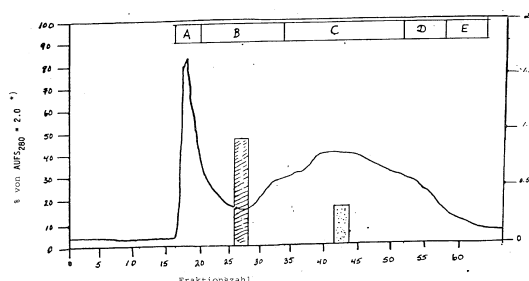
(74) Vertreter:
**Moll, W., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Glawe, U.,
Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., 80538 München; Delfs, K.,
Dipl.-Ing.; Mengdehl, U., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Niebuhr, H., Dipl.-Phys. Dr.phil.habil., 20148
Hamburg; Merkau, B., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte,
80538 München**

(72) Erfinder:
**Pronovost, Allan D., San Diego, Cal., US; Pawlak,
Jan W., Cardiff, Cal., US; Condon, Kristy S., San
Diego, Cal., US**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
WO 89 08 843
FEMS Microbiology Letters 71, S.225-230, 1990;

(54) Bezeichnung: **Antigen-Zubereitung zum Nachweis von H. pylori**

(57) Hauptanspruch: Zusammensetzung, enthaltend von *Helicobacter pylori* abgeleitete Proteine, die zum Detektieren der Gegenwart von *Helicobacter pylori*-Antikörpern verwendbar sind, gekennzeichnet durch folgende Merkmale:
– Die Zusammensetzung hat eine Urease-spezifische Aktivität von weniger als $0,34 \text{ OD}_{550}/\text{A}_{280}$ in einem Ureasekatalysierten Assay,
– die Zusammensetzung kann nach Denaturierung und Reduzierung der darin enthaltenen *Helicobacter pylori*-abgeleiteten Proteine mittels SDS PAGE-Analyse charakterisiert werden als enthaltend *Helicobacter pylori*-spezifische Antigene mit Molekulargewichten von 120 kD, 66 kD, 62 kD, 59 kD, 52 kD und 31 kD; und übliche Antigenen mit Molekulargewichten von 89 kD, 73 kD, 56 kD, 45 kD, 42 kD, 29 kD, 25 kD, 21 kD und 16 kD;
– die Mengen an Antigenen mit Molekulargewichten von 66 kD und 56 kD sind größer als die Mengen irgendeines der übrigen obengenannten einzelnen Antigene.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Antigen-Zubereitung, mit der man die Anwesenheit von Antikörpern nachweisen kann, die spezifisch für *Helicobacter pylori* sind. Die Erfindung betrifft insbesondere ein Gemisch von Antigenen, die durch Ausschußchromatographie von mit Detergentien solubilisierten *H. pylori*-Antigenen isoliert wurden. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren und einen Kit zum Nachweis der Anwesenheit *H. pylori*-spezifischer Antikörper.

Stand der Technik

[0002] *Helicobacter pylori* (früher als *Campylobacter pylori* bekannt), ein in dem menschlichen Magen siedelndes Bakterium, wurde 1983 entdeckt und in B.J. Marshall et al., *Lancet*, (1984), I:1311-1314, beschrieben. Der Zusammenhang zwischen *H. pylori* und gastrischen Störungen wie chronischer, aktiver Gastritis, Magen- und Zwölffingerdarmkrankheiten und nicht-ulzerierenden Dyspepsien hat ein großes Interesse der gastroenterologisch-medizinischen Öffentlichkeit hervorgerufen.

[0003] Die genaue Rolle von *H. pylori* bei peptischen Ulcuserkrankungen ist noch nicht bekannt. Davon abgesehen hat seine Beziehung mit gastrischen Krankheiten zu besonderen Anstrengungen geführt, die auf die Entwicklung von Verfahren für den Nachweis des Organismus im menschlichen Magen gerichtet sind. Der Nachweis kann auf zwei Arten durchgeführt werden: (1) direkt, durch Untersuchung einer Magenbiopsie mittels Histologie oder Zellkulturisoliationsverfahren oder durch beides; (2) indirekt, durch Testen einer Probe von peripherem Blutserum auf zirkulierende Antikörper gegen *H. pylori*. Die Einfachheit und Effizienz (sowohl für den Patienten als auch für den Arzt) des letzteren serologischen Verfahrens macht dieses besonders attraktiv.

[0004] Die Genauigkeit eines serologischen Tests für Antikörper gegen *H. pylori* hängt von der Antigen-Zubereitung ab, die die Antikörper bindet. Die bisher beim Testen verwendeten Zubereitungen reichen von ganzen, intakten Organismen bis zu hochgereinigtem Material, das aus dem Hauptantigenmolekül besteht.

[0005] H. Von Wulffen, in *Campylobacter pylori*, Menge et al., Hrs. Springer-Verlag (1988), S. 157-163, verwendete zum Nachweis von Infektionen bei gastrischen Patienten rohe Zellysate. Die EP-A 0 329 570 (M.J. Blaser) lehrt, daß einfache, ungereinigte Zellysate zum Nachweis von *H. pylori*-Antikörpern verwendet werden können. C.S. Goodwin et al., *J. Infectious Diseases*, (1987), 155:488-494, beschreiben die Verwendung von sauren Glycinextrakten als Antigenzubereitungen in Enzyme-linked Immunosorbent Assays ("ELISAs"). Gemäß F. J. Bolton et al., *J. Clin. Pathol.*, (1989), 42:723-726, werden Oberflächenantigenzubereitungen und Ureasezubereitungen sowie saure Glycinextrakte zum Screenen von gastrischen Patientensera verwendet.

[0006] Diese rohen bzw. ungereinigten Zubereitungen haben viele Nachteile. Die Verwendung von ganzen Organismen oder unbearbeiteten Lysaten führt oft zu Problemen bezüglich der Spezifität eines serologischen Tests. Das Vorliegen von unerwünschtem Material in der Zubereitung kann eine "nicht-spezifische" Bindung von anderen Antikörpern bewirken, so daß Personen, die keine gegen *H. pylori* spezifischen Antikörper aufweisen, ein "falsch-positives" Testergebnis liefern. Ebenso können falsch-positive Ergebnisse auftreten, wenn die Zubereitung gemeinsame Antigene enthält, die auch bei anderen *H. pylori*-ähnlichen Organismen auftreten. Mit diesen Organismen infizierte Personen können Antikörper bilden, die mit der *H. pylori*-Zubereitung kreuzreaktiv sind. Daher ist eine bevorzugte Zubereitung an hochreaktiven artspezifischen Antigenen angereichert und enthält keine signifikant kreuzreaktiven Spiegel von Antigenen, die mit ähnlichen Organismen gemeinsam sind.

[0007] Ein anderer Nachteil von rohen Zubereitungen ist, daß sie oft beim Nachweis der Anwesenheit von *H. pylori*-spezifischen Antikörpern versagen. Diese "falsch-positiven" Testergebnisse können auftreten, wenn: (1) wegen Wechselwirkungen mit anderen Bestandteilen der Zubereitung *H. pylori*-spezifisches Antigenmaterial nur schwer für die Antikörperbindung zugänglich ist; (2) mit dem Herstellungsverfahren das *H. pylori*-spezifische Antigenmaterial so verändert wird, daß es weniger reaktiv mit den Antikörpern wird; oder (3) *H. pylori*-spezifisches Antigenmaterial durch die Anwesenheit von unerwünschtem Material zu stark verdünnt wird.

[0008] Am anderen Ende des Spektrums der Antigenzubereitungen lehrt die PCT-Anmeldung WO 89/09407 die Diagnose von *H. pylori*-Infektionen unter Verwendung einer Zubereitung von gereinigter *H. pylori*-Urease. *H. pylori* enthält eine artspezifische Urease, die bei der Serodiagnose verwendet werden kann. Andere Zubereitungen unter Verwendung eines Materials, das aus einem einzelnen, klonierten *H. pylori*-Gen hergestellt wird, können ebenfalls verwendet werden, siehe z.B. D. Chevrier et al., *J. Clin. Micro.*, (1989), 27:321-326.

[0009] Die Verwendung von gereinigten Zubereitungen einzelner Antigene oder klonierter Genprodukte beseitigt einige der obigen Ursachen für falsche Ergebnisse. Der Einsatz von Zubereitungen klonierter Gene kann jedoch Moleküle von Nebenprodukten aus dem Expressionssystem einführen, die immer noch zu falsch-positiven Testergebnissen führen. Zusätzlich können hochgereinigte Zubereitungen und solche mit klonierten Genen das relevante Antigen in einer veränderten, nicht in der Natur vorkommenden Struktur liefern, die weniger reaktiv mit Antikörpern ist; dies führt zu falsch-negativen Testergebnissen.

[0010] Weiterhin hat eine Western Blot-Analyse gezeigt, daß infizierte Personen üblicherweise Antikörper gegen *H. pylori* bilden, welche verschiedene Antigene erkennen. Eine Zubereitung mit einem einzigen, gereinigten Antigenmolekül oder Genprodukt begrenzt das Ausmaß der Antikörpererkennung in unnötiger Weise und kann zu falsch-negativen Ergebnissen für infizierte Personen mit keinen oder wenigen Antikörpern gegen das verwendete spezielle Antigen führen.

[0011] Die US-A 4 882 271 (Evans et al.; im folgenden kurz „Evans genannt“) beschreibt ein Verfahren zur Herstellung einer Antigenzubereitung, die zwischen den obigen Extremen liegt: sie enthält nur wenige Haupt-Antigenbestandteile mit Molekulargewichten zwischen 300 000 und 700 000. Die Evans-Zubereitung wird erhalten, indem man Fraktionen einer Ausschlußchromatographie in einem definierten Bereich hoher Molekulargewichte sammelt, die eine signifikante Urease-Enzymaktivität aufweisen. Evans merkt an, daß der Umfang der Reinigung der beschriebenen Zubereitungen zum Erhalt einer angemessenen Empfindlichkeit und Spezifität in Assays erforderlich ist, wenn auch eine weitere Reinigung nicht erforderlich ist.

[0012] 120 kD bedeutet im Folgenden 120 000.

[0013] FEMS microbiological Letters 71, (1991) 225 bis 230 offenbart Antigene der Außenmembran von *Heliumbacter pylori*, die ein durch SDS-PAGE-Analyse bestimmtes Molekulargewicht von 26, 30, 58, 62, 66 und 80 kDalton aufweisen. WO-A-89/08843 offenbart die Reinigung von Antigenen aus zellassozierten Proteinen von *Heliumbacter pylori* mit Molekulargewichten von 300 000 bis 700 000.

[0014] Mit *H. pylori* infizierte Personen reagieren tatsächlich auf viele verschiedene Antigene. Die Untersuchungen der Anmelderin zeigen, daß sensitivere und spezifischere Tests für Antikörper gegen *H. pylori* entwickelt werden können, wobei die hier beschriebenen Extraktions- und Reinigungsverfahren zur Herstellung einer verbesserten *H. pylori*-Antigenzubereitung eingesetzt werden können, die ein breiteres Spektrum von *H. pylori*-spezifischem und reaktiven Antigen aufweist, wie es bisher nicht bekannt war.

[0015] Die **Fig. 1** zeigt das typische Fraktionierungsprofil eines n-Octyl-beta-glucopyranosid(BOG)-Extrakts von *H. pylori*-Antigenen auf einer 6FF-Sepharose-Säule und die Ureaseaktivität gepoolter Fraktionen.

Aufgabenstellung

[0016] Die Erfindung ist auf die Herstellung einer Antigenzubereitung gerichtet, die ein Gemisch von Antigenen aus mit detergens-solubilisierten *H. pylori*-Zellen enthält und zur Bestimmung des Vorliegens oder Fehlens einer *H. pylori*-Infektion in einer biologischen Probe geeignet ist sowie eine höhere Genauigkeit und Zuverlässigkeit als gemäß dem Stand der Technik erreichbar, aufweist.

[0017] Die Erfindung ist weiterhin auf die Herstellung einer Antigenzubereitung zum Nachweis einer *H. pylori*-Infektion gerichtet, wobei diese Zubereitung unter Minimierung des Anteils an falsch-negativen Ergebnissen bei Vorliegen einer Infektion den Anteil an positiven Reaktionen maximiert und dabei die Assay-Sensitivität verbessert. Die Zubereitung maximiert in ähnlicher Weise bei Fehlen einer Infektion den Anteil von negativen Reaktionen unter Minimierung des Anteils von falsch-positiven Ergebnissen und verbessert damit die Assay-Spezifität.

[0018] Die Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zum Nachweis einer *H. pylori*-Infektion in einer biologischen Probe mit einem maximalen Signal-Rausch-Verhältnis unter Verwendung einer Antigenzubereitung, die mit einem breiten Spektrum von hochreaktiven *H. pylori*-spezifischen Antigenen angereichert ist, gerichtet.

[0019] Die Erfindung ist weiterhin auf einen Kit gerichtet, der zum Nachweis einer *H. pylori*-Infektion in einer biologischen Probe mit einem maximalen Signal-Rausch-Verhältnis verwendet wird.

[0020] Weitere bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung und den Beispielen.

[0021] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine Zusammensetzung erhalten, die gereinigte Antigene aus zellassozierten Proteinen von *Helicobacter pylori* enthält, wobei die Antigene ein Molekulargewicht von etwa 16 000 bis 120 000, bestimmt durch reduzierte SDS-PAGE-Analyse und ureasedepletierte Aktivität, aufweisen.

[0022] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine Zusammensetzung zur Verfügung gestellt, die gereinigte Antigene aus zellassozierten Proteinen von *Helicobacter pylori* enthält und folgendermaßen erhältlich ist: Züchten von *Helicobacter pylori*-Zellen in einem Nährmedium, dem 10 % fötales Rinderserum zugesetzt ist, und Ernten der Zellen, wenn das Wachstum in der logarithmischen Phase abzunehmen beginnt; Solubilisieren der Zellen in einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung, die etwa 1 % n-Octyl-beta-D-glucopyranosid enthält, über mindestens etwa 30 Minuten zum Erhalt einer Zellproteinlösung; Dialysieren der Zellproteinlösung gegen PBS über Nacht und anschließendes Zentrifugieren der Lösung bei mittlerer Geschwindigkeit zum Erhalt eines Überstands; Laden des Überstands auf eine 6 FF-Pharmacia-Ausschlußsäule; Eluieren der Säule mit 50 mM Tris-Puffer, der 0,025 % Natriumazid enthält und Sammeln der eluierten Fraktionen; Ausschluß des Proteinpeaks mit hohem Molekulargewicht, der den Großteil der Ureaseaktivität enthält; und Zusammengeben der zurückbleibenden urease-depletierten Proteinfraktionen mit geringem Molekulargewicht zu einem Pool.

[0023] Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zum Nachweis einer *Helicobacter pylori*-Infektion in einer biologischen Probe mit den folgenden Schritten zur Verfügung gestellt: Vereinigen einer Zusammensetzung, die gereinigte, nach den oben genannten Verfahren erhaltene Antigene aus zellassozierten Proteinen von *Helicobacter pylori* enthält, mit der Probe zur Bildung eines Inkubationskomplexes; und Testen des Inkubationskomplexes auf die Anwesenheit von Antigen-Antikörper-Komplexen, die das Vorliegen einer *Helicobacter pylori*-Infektion anzeigen.

[0024] Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Kit zur Verwendung beim Nachweis einer *Helicobacter pylori*-Infektion in einer biologischen Probe zur Verfügung gestellt, der gereinigte, nach den oben genannten Verfahren hergestellte Antigene aus zu Zellen gehörigen Proteinen von *Helicobacter pylori* umfaßt.

[0025] Im folgenden werden einige in der Beschreibung auftretende Begriffe definiert.

[0026] Die "Antigene" der Erfindung sind zellassozierte Proteine, die aus *Helicobacter pylori*-Zellen extrahiert wurden. "zellassozierte Proteine" umfassen zur äußeren Membran gehörende Proteine und Oberflächenproteine. Zellassozierte Proteine können unter Verwendung von nicht-ionischen Detergentien wie n-Octyl-beta-D-glucopyranosid (BOG) und anderen, die gleiche Funktion ausübenden Detergentien ohne Aufbrechen der Zellen aus *H. pylori*-Zellen extrahiert werden. Diese zellassozierten Proteine sind zur Initiierung einer Immunreaktion in Form von Antikörpern befähigt, die antigene Determinanten an diesen Proteinen erkennen.

[0027] "Biologische Probe" bedeutet hier eine Probe von Blut, Blutserum und Plasma sowie lymphatischen oder anderen Extrakten, die einem menschlichen Patienten entnommen wurden, der auf das Vorliegen einer *H. pylori*-Infektion untersucht werden soll.

[0028] "Proteinfraktionen hohen Molekulargewichts mit Ureaseaktivität" bezeichnen hier chromatographische Fraktionen mit einer signifikanten Extinktion bei 280 nm, die Proteine mit Molekulargewichten enthalten, die im allgemeinen größer als 300 000 sind (bestimmt durch molekulargewichtsabhängige Säulenchromatographie), und die eine signifikante Ureaseaktivität zeigen. "Ureasedepletierte Proteinfraktionen mit niedrigem Molekulargewicht" bedeuten hier Fraktionen mit niedrigem Molekulargewicht, die eine signifikante Extinktion bei 280 nm und eine ureasedepletierte Aktivität aufweisen.

[0029] "Ureasedepletierte Aktivität" bedeutet hier eine spezifische Aktivität von weniger als 0,34 OD₅₅₀/A₂₈₀-Einheiten, bestimmt mit dem in Beispiel 2 beschriebenen Urease-katalysierten Harnstoffhydrolyse-Assay.

Antigenzubereitungen:

[0030] Die Antigenzubereitungen der Erfindung sind von *H. pylori*-Zellen abgeleitete zellassozierte Proteine. Die Zellen werden mit Hilfe eines nichtionischen Detergens solubilisiert; der resultierende Überstand wird einer Ausschlußchromatographie unterworfen, gefolgt von einem Poolen ausgewählter Säulenfraktionen. Die gepoolten Fraktionen der Erfindung umfassen nicht die Fraktionen mit dem Hauptanteil der signifikanten Urease-Enzymaktivität. Statt dessen wird eine Anzahl von Fraktionen, die an Ureaseaktivität depletierte Antigene

mit niedrigem Molekulargewicht enthalten, zum Erhalt der Endzubereitung zu einem Pool vereinigt. Die Antigene der Erfindung können auf einer Vielzahl von Wegen hergestellt werden. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden die Antigene durch Züchten von *H. pylori*-Organismen in einem Nährmedium, z.B. Brucella-Brühe, hergestellt. Die Brühe enthält Nährstoffzusätze. Ein bevorzugter Zusatz ist das fötale Rinder Serum. Die Zellen werden in Kolben unter Rotation in einer gemischten CO₂, O₂ und N₂-Atmosphäre inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugieren bei mittlerer Geschwindigkeit geerntet, nachdem das Wachstum in der logarithmischen Phase nachzulassen beginnt. *H. pylori*-Zellen können ebenso durch Plattieren, z.B. auf Blut-Agplatten, gezüchtet werden, anschließend erfolgt das Ernten.

[0031] Nach dem Ernten der *H. pylori*-Zellen können diese gewaschen und zur Solubilisierung in einem Puffer suspendiert werden. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Solubilisierungspuffer phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), die ein nichtionisches Detergens enthält. Nichtionische Detergentien umfassen Reaktionsprodukte von Ethylen- oder Propylenoxid mit: (1) C₆-C₂₂-Alkylphenolen oder (2) aliphatischen, primären oder sekundären, linearen oder verzweigten Alkohole. Andere nichtionische Detergentien umfassen langkettige tertiäre Aminoxide, langkettige tertiäre Phosphinoxide und Dialkylsulfoxide. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das nichtionische Detergens n-Octyl-beta-D-glucopyranosid, das in einer Konzentration von 0,1-3,0 %, vorzugsweise 1 %, (Gewicht/Volumen; w/v) enthalten ist.

[0032] Die gewaschenen *H. pylori*-Zellen werden in etwa 0,1 bis 10 ml des Solubilisierungspuffers pro 100 mg Naßgewicht der Zellen, insbesondere ungefähr 1 ml Puffer pro 100 mg Naßgewicht der Zellen, suspendiert. Diese Suspension wird inkubiert und mindestens etwa 30 min bei Raumtemperatur gemischt. Die erhaltene solubilisierter Zellsuspension wird, üblicherweise über Nacht, gegen PBS dialysiert und durch Zentrifugieren bei mittlerer Geschwindigkeit ein Überstand gesammelt.

[0033] Im Folgenden steht "M" für "mg/ml".

[0034] Der resultierende Überstand wird anschließend einer Trennung nach der Größe, üblicherweise durch Ausschußchromatographie, unterworfen. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der Überstand auf eine 6 FF-Pharmacia-Größenausschuß-Säule geladen und dann mit 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0), der ungefähr 0,025 % Natriumazid enthält, eluiert. Die Fraktionen werden anschließend gesammelt, und zur Bestimmung von Fraktionierungsprofilen die Extinktion bei 280 nm sowie die Ureaseaktivität bestimmt.

[0035] Die Ureaseaktivität mit hohem Molekulargewicht, die Proteinfractionen mit dem überwiegenden Teil der Ureaseaktivität enthält, wird verworfen, und die verbleibenden ureasedepletierten Fraktionen mit niedrigem Molekulargewicht werden zu einem Pool vereinigt. Dieser Pool stellt den Antigenextrakt der Erfindung dar. Der Extrakt besteht aus Antigenen mit Molekulargewichten von weniger als 200 000, insbesondere von etwa 16 000 bis etwa 120 000, bestimmt durch reduzierte SDS-PAGE-Analyse. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird dieser Extrakt durch Vereinigen der Fraktionen 34 bis 52, die in [Fig. 1](#) gezeigt sind, zu einem Pool hergestellt.

Verfahren:

[0036] Für die Erfindung kann eine Vielzahl von serologischen Assays zum Nachweis von Antikörpern gegen *H. pylori* in biologischen Proben verwendet werden. Gut charakterisierte Assays wie Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs), Assays mit schnellem Durchfluß, Latex-Agglutinations-Assays, Immunoblot-Assays und Lateralfuß-Immunoassays sind sämtlich für die Erfindung verwendbar.

[0037] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird der serologische Assay nach dem EIA-Mikrotiter-Verfahren durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die Vertiefungen von Mikrotiterplatten mit den oben beschriebenen Zubereitungen der Erfindung beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Herstellungslösung wird anschließend verworfen und die Vertiefungen 2 Stunden bei 37°C getrocknet. Anschließend werden zu untersuchende biologische Proben bei verschiedenen Verdünnungen in PBS mit Rinder Serumalbumin (BSA) hergestellt und in die Vertiefungen gegeben. Nach 30 Minuten Inkubieren bei 25°C wird die biologische Probe entfernt und die Vertiefungen mit dem Detergens Tween 20 enthaltendem PBS gewaschen. Anschließend wird eine Enzym-konjugierte Kaninchen-Antikörper-Zubereitung (Anti-human-IgG) zugegeben, die Humanimmunoglobulin G erkennt; die Vertiefungen werden weiter inkubiert. Die Lösung wird wiederum verworfen und eine weitere PBS-Tween 20-Wäsche durchgeführt. Schließlich wird eine Lösung zugegeben, die ein Substrat für das konjugierte Enzym enthält.

[0038] Wenn in der biologischen Probe Human-Antikörper gegen *H. pylori* vorliegen, binden die Kanin-

chen-anti-human-IgG-Antikörper an die Vertiefungen; das konjugiert Enzym reagiert mit dem Substrat und verursacht eine Farbänderung, die die Quantität der vorliegenden Antikörper wiedergibt. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase und das Substrat 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-sulfonsäure) (ABTS).

[0039] Ein anderer Immunoassay ist der EIA-Assay mit schnellem Durchfluß, der dem EIA-Mikrotiter-Assay ähnlich ist, aber eine Antigenzubereitung verwendet, die an einer porösen Nylonmembran haftet. Die Nylonmembran wird auf ein Absorbenspad gelegt und in eine Kunststoffhalterung gebracht, wobei die Membran freigelegt bleibt. Man verdünnt die biologische Probe und läßt dieselbe durch die Membran fließen. Anschließend läßt man Enzym-konjugierte Kaninchen-anti-human-IgG-Antikörper, gefolgt von einer Waschlösung, durchfließen. Schließlich wird die Lösung zugegeben, die das Substrat für das konjugierte Enzym enthält; die Farbänderung erfolgt wie in dem ELISA-Verfahren.

[0040] Bei dem Latex-Agglutinations-Assay wird die Antigenzubereitung auf Latexkugeln fixiert. Anschließend wird die biologische Probe direkt auf einem Objektträger mit den Latexpartikeln inkubiert. Nach kurzer Zeit wird das Reaktionsgemisch auf die Anwesenheit von vernetzten oder agglutinierten Latexpartikeln untersucht, die die Anwesenheit von Antikörpern gegen *H. pylori*-Antigene anzeigt.

Kit:

[0041] Die Erfindung betrifft weiterhin einen Kit, der eine oben beschriebene Antigenzubereitung enthält. Der Kit kann zur Durchführung der oben beschriebenen Verfahren der Erfindung verwendet werden.

[0042] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthält der Kit eine Antigenzubereitung, die wie oben beschrieben hergestellt und anschließend zur Verwendung in einem serologischen Assay auf einem festen Träger fixiert wird.

[0043] Die folgenden Beispiele dienen zur Veranschaulichung der Erfindung, ohne diese zu beschränken.

Ausführungsbeispiel

Beispiel 1

Züchtungs- und Extraktions-Verfahren

Züchtung von *H. pylori*

[0044] Es wurde eine Brucella-Brühe (Difco Laboratories), der fötales Kälberserum zugesetzt wird, als Nährmedium für *H. pylori* bei 35°C unter einer gemischten Atmosphäre von CO₂, O₂ und N₂ verwendet. Eine 20 ml-Probe des Nährmediums wurde mit 1 ml eines gefrorenen *H. pylori*-Vorrats inokuliert, inkubiert und während der nächsten 48 bis 72 Stunden auf 1 l zu einer Zelldichte von 8 bis 10 × 10⁷ CFU (kolonienbildenden Einheiten) pro ml expandiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei mittlerer Geschwindigkeit geerntet, mit deionisiertem Wasser gewaschen und durch Zentrifugieren bei mittlerer Geschwindigkeit kompaktiert; man erhielt 1 × 10⁶ Zellen pro 1 mg des nassen Zellpellets.

Beschallter Extrakt von *H. pylori*-Zellen

[0045] Die Herstellung eines beschallten Antigenextrakts von *H. pylori* war der in Perez-Perez et al., Ann. Int. Med., 109:11 (1988), beschriebenen ähnlich. Nach der ersten Zellernte durch Zentrifugieren bei mittlerer Geschwindigkeit wurden die Zellen dreimal mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung gewaschen. Das End-Zellpellet wurde in einer Konzentration von 10 mg (Naßgewicht) Zellen pro ml deionisiertem Wasser suspendiert. Eine Suspension mit 10 bis 15 ml wurde auf übliche Weise unter Eisbadkühlung und Verwendung eines Model 300 Sonic Dismembrators (Fischer Scientific Co., Pittsburgh, PA) mit 2-Minuten-Eruptionen bei maximalen Mikrospritzen der Leistungsabgabe. Die resultierende Beschallungslösung wurde bei -70°C eingefroren, anschließend aufgetaut und wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und der Proteingehalt durch Aufzeichnung der Extinktion bei 280 nm bestimmt.

Glycinextrakt von *H. pylori*-Zellen

[0046] Die Herstellung eines sauren Glycinextrakts von Antigenen erfolgte ähnlich der für *C. jejuni* in Blaser

und Duncan, Infect. Immun. 44:292 (1984), beschriebenen. Nach einer ersten Ernte durch Zentrifugieren bei mittlerer Geschwindigkeit wurden die Zellen dreimal mit steriler isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und bei 25°C in einem 0,2 M Glycin-Hydrochlorid-Puffer (pH 2,2) in einer Konzentration von 10 mg (Naßgewicht) Zellen in einem 1ml-Puffer suspendiert. Nach 15 Minuten wurde die Zellsuspension nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und über Nacht in einem Dialysator mit einem Molekulargewichts-Cutoff von 12 bis 14 Kilodalton gegen kaltes Wasser dialysiert. Das Retentat wurde gesammelt und der Proteingehalt durch Aufzeichnung der Extinktion bei 280 nm bestimmt.

n-Octyl-beta-glucopyranosid(BOG)-Extraktion von H. pylori-Zellen

[0047] Bei einem typischen Experiment wurde eine H. pylori-Kultur durch Zentrifugieren bei mittlerer Geschwindigkeit geerntet und die Zellen zweimal durch Suspendieren in sterilem, deionisiertem Wasser, gefolgt von Zentrifugieren, gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS), die Natriumazid und 1 % (w/v) n-Octyl-beta-glucopyranosid (BOG) enthält, suspendiert und 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Die Suspension wurde in einem Dialysator mit einem Molekulargewichts-Cutoff von 12 bis 14 Kilodalton über Nacht bei 4°C gegen Natriumazid enthaltendes PBS dialysiert und anschließend bei mittlerer Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und der Proteingehalt in dem Extrakt mittels der Extinktion bei 280nm bestimmt.

Beispiel 2

Herstellung und Analyse des BOG-H. pylori-Antigen-Extrakts

[0048] Der oben beschriebene BOG-Extrakt wurde auf ein 6FF-Sepharose-Harz (Pharmacia) gegeben, das in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) mit 0,025 % (w/v) Natriumazid äquilibriert war. Es wurden 70 Fraktionen (jede gleich 2 % des Säulenvolumens) gesammelt und mittels der Extinktion bei 280 nm untersucht. Ein typisches Fraktionierungsprofil eines BOG-Extrakts ist in [Fig. 1](#) gezeigt.

[0049] Das Fraktionierungsprofil in [Fig. 1](#) zeigt fünf erkennbare Bestandteile: (1) Pool A (Fraktionen 17-19 einschließlich), der den ersten Peak mit hohem Molekulargewicht darstellt und vernachlässigbare H. pylori-Ureaseaktivität aufweist; (2) Pool B (Fraktionen 20-33), der mit einem "Peak-Tal" verbunden ist und den Großteil der Ureaseaktivität aufweist; (3) Pool C (Fraktionen 34-52), der ureasedepletierte Proteine mit niedrigem Molekulargewicht enthält; (4) Pool D (Fraktionen 53-58), der den abfallenden Bereich des zweiten Proteinpeaks darstellt; und schließlich (5) Pool E (Fraktionen 59-63), der den auslaufenden Teil des zweiten Peaks mit niedrigem Molekulargewicht darstellt.

[0050] Die Fraktionen wurden durch Laufenlassen von reduziertem SDS-PAGE auf 0,15 × 12 × 15 cm-Gelen (12 % w/v Acrylamid, 0,32 % (w/v) N, N-Methylenbisacrylamid) in Anwesenheit von 0,1 % (w/v) SDS analysiert. Proteinstandards mit hohem und niedrigem Molekulargewicht (BioRad Labs) wurden zusammen mit den Proben der Fraktionierung verwendet. Man führte bei 25 mA/Platte (Stapelgel) oder 40 mA/Platte (Laufgel) eine Elektrophorese durch, bis der spuranzeigende Farbstoff Bromphenolblau an das untere Ende des Gels gewandert war (2,5-3 h). Die Gele wurden dann 60 Minuten in 0,2%-igem (w/v) Coomassie-Brilliantblau R250, gelöst in 50 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure, angefärbt und schließlich in 50 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

[0051] Die SDS-PAGE-Analyse der zu einem Pool vereinigten Fraktionen A-E (oben beschrieben), die nach der 6FF-Sepharose-Fraktionierung des BOG-Extrakts von H. pylori-Zellen erhalten wurden, zeigt einen Bereich der Anreicherung bezüglich H. pylori-spezifischer und üblicher Antigene, siehe Tabelle 1. Die Antigene mit hohem Molekulargewicht (MG > 200 000) von Pool A und B erscheinen auf reduzierten PAGE-Gelen als Banden mit niedrigem Molekulargewicht (MG < 120 000), als Ergebnis der für die SDS-PAGE-Analyse erforderlichen Verdauung und Reduktion.

Tabelle 1

Antigen-MG (kd)	Pool				
	A	B	C	D	E
H. pylori-spezifisch					
120	-	-	2 [*]	-	-
66	1	2	4	-	-
62,59	-	-	3	0,5	-
52	-	-	2	1	-
31	0,5	2	3	1	-
üblich					
89,73	-	-	2	-	-
56	2	2	4	3	2
45,42	-	0,5	2	0,5	0,5
29,25	-	0,5	3	0	1
21,16	-	2	2	2	1

* Relative Intensität auf einer 1-4 (Maximum)-Skala

[0052] Tabelle 1 zeigt, daß der Pool C relativ reich an H. pylorispezifischen Antigenen ist.

[0053] Die Ureaseaktivität in jeder Fraktion wurde unter Verwendung einer Modifikation des Verfahrens von Mobley et al., Infect. Immun. (1986) 54:161-169, bestimmt; dieses Verfahren umfaßt die Messung der pH-Änderung durch Ammoniak, der durch Ureasekatalysierte Harnstoffhydrolyse erzeugt wird. Ein 50 µl-Aliquot jeder Fraktion wurde zu 780 µl Ureasesubstrat-Puffer (10 mM Harnstoff, 4,5 mM Natriumphosphat-Puffer (pH 6,8) und 70 µg/ml Phenolrot) gegeben und das Gemisch 30 Minuten bei Umgebungstemperatur inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte von 100 µl-Aliquoten bei 550 nm unter Verwendung eines MR 700-Model-Mikrotiterplattenlesers (Dynatech Laboratories) gemessen. Die spezifische Ureaseaktivität wurde als OD₅₅₀/A₂₈₀-Verhältnis ausgedrückt. [Fig. 1](#) zeigt das 280 nm-Profil einer 6FF-Sepharose-Fraktionierung des BOG-Extrakts und die spezifische Ureaseaktivität von Pool B und C.

Beispiel 3

Vergleich von Pool B, Pool C und anderen Antigenen

[0054] In diesem Beispiel werden der Pool B, der den Großteil der Ureaseaktivität (Fraktionen 20-33) enthält, und der Ureaseverarmte Pool C (Fraktionen 34-52) bezüglich ihrer Eignung zum Nachweis von Anti-H. pylori-IgG-Antikörpern in Humansera verglichen, wie weiter unten erläutert wird.

Proben von Patientensera

[0055] Serum- und Plasmaproben wurden in gastroenterologischen Kliniken bei Personen entnommen, die entweder als H. pylori-positiv oder -negativ definiert worden waren, abhängig von Kultur- und Histologie-Ergebnissen gastrischer Biopsien: Die Proben wurden weiterhin durch klinisch diagnostizierte gastrointestinale Symptome kategorisiert.

H. pylori-Durchfluß-EIA-Assay

[0056] Die Festphasen-Untereinheit bestand aus einem Absorbenskissen, das in ein geformtes Unterteil eingesetzt wird, gefolgt von einem Quadrat Zoll 8S-Rayon und einer 1,2 µ-Biodyne-A-Nylonmembran. Die Nylonmembran wurde mit einem H. pylori-Extrakt getüpfelt, der mit einer Antigen-Tüpfellösung verdünnt war, gefolgt von Human-IgG, verdünnt in Natriumazid enthaltendem PBS. Die Membrane wurden 30 Minuten bei Umgebungstemperatur mit einer Lösung von alkyliertem BSA blockiert und anschließend bei 45°C 10 bis 20 Minuten getrocknet. Auf die behandelte Nylonmembran wurde ein geformtes Oberteil aufgesetzt, wobei sich die betüpfelte Region in der Mitte des sichtbaren Bereichs befand, und mit Schall verschweißt. Es wurde eine Vorfiltervorrichtung in die verschweißten Einheiten eingesetzt, diese in einen Folienbeutel mit Trockenmitteln gebracht und der Folienbeutel durch Hitze verschlossen.

Testverfahren für den EIA-Assay mit schnellem Durchflug

[0057] Eine Patientenprobe (entweder Serum oder Plasma) wurde unter Verwendung einer 30 µl-Kapillar-Abfüllvorrichtung in einen Kunststoffbecher mit 150 µl des Verdünnungsmittels für die Proben gebracht. Man gab die verdünnte Probe zu der oben beschriebenen Assay-Vorrichtung und ließ sie vollständig durch den Filter laufen. Dann gab man mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Kaninchenanti-Human-IgG dazu und ließ diese wiederum vollständig durchlaufen. Der Filter wurde mit 0,5 ml der Waschlösung gewaschen und 210 µl einer 3-Indoxyl-Phosphat-Lösung (ein chromogenes Substrat) zu der Patrone gegeben. Nach einer Inkubation von 5 Minuten wurde die Membran zur Beendigung des Tests vollständig gewaschen. Die Ergebnisse des Immunoassays wurden anschließend unter Verwendung der folgenden Kriterien innerhalb der nächsten 15 Minuten interpretiert:

Ein negatives Ergebnis wurde durch das Auftreten eines blauen, negativen Strichs durch die Mitte der Membran angezeigt. Ein positives Resultat wurde durch das Auftreten eines blauen Kreises angezeigt, der den negativen Kontrollstrich auf der Membran überlagerte. Das Fehlen sowohl des blauen Strichs als auch des festen blauen Kreises zeigte, daß der Test nicht interpretierbar war; in diesem Falle sollte der Test wiederholt werden.

Eignung des Pools C des H. pylori-Antigen-Extrakts zum Nachweis von Antikörpern gegen H. pylori in Humansera

[0058] Ein schneller EIA wurde bei verschiedenen Antigenzubereitungen zur Bestimmung der Häufigkeit falsch-positiver Signale bei Humanserumproben verwendet. Die eingesetzten Antigenextrakte waren: Pool A und C des BOG-Antigen-Extrakts sowie Beschallungs- und Glycin-Extrakte, die wie oben beschrieben hergestellt wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2

H. pylori-negative Serumproben (Kultur- und Histologie-bestätigt)

Probe	Kultur/ Histol.	Pool C	Pool A	Glycin	Beschal- lung
4	-	-	+	+	+
6	-	-	+	-	+
7	-	-	-	+	+/-
8	-	+/-	+	+	+/-
10	-	+/-	+	+	+/-
13	-	-	+/-	-	+/-
14	-	-	+	-	-
15	-	-	+	-	-
16	-	-	+/-	-	+
22	-	+/-	+/-	-	+/-
32	-	-	+	+/-	+/-
% Falsch- positive	0%	14%	77%	41%	59%

H. pylori-positive Serumproben (Kultur- und Histologie-bestätigt)

Probe	Kultur/ Histol.	Pool C	Pool A	Glycin	Beschal- lung
3	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+

[0059] Richtige Signale: 100 % für alle getesteten Extrakte.**[0060]** Man erkennt, daß der Pool C des BOG-Antigen-Extrakts die geringste Häufigkeit von falschen positiven Ergebnissen aufweist (14 % gegen 41 bis 77 % für die anderen Antigen-Extrakte).

Korrelationsuntersuchung der Genauigkeit bei Humansera für Antikörper gegen H. pylori unter Verwendung des Pools C des BOG-Antigen-Extrakts

[0061] Es wurden bei drei gastroenterologischen Kliniken 183 Serum- und Plasmaproben gesammelt. In dem schnellen EIA-Assay wurde der Pool C des BOG-Antigen-Extrakts eingesetzt. Die Testergebnisse wurden sofort nach der Beendigung des Assays visuell beurteilt. Diskordante Proben wurden mit dem Biometra-Mikroti-ter-ELISA-Test untersucht, der IgG-Antikörper gegen H. pylori nachweist.**[0062]** Die Korrelation des Assays mit Kultur- und Histologieergebnissen ist in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3

Schneller EIA-Pool-C-Assay gegen Kultur/Histologie

	Kultur/Histologie Positiv	Kultur/Histologie Negativ
Schneller EIA Positiv	63	15
Schneller EIA negativ	3	102
Gesamt:	66	117

Pool C-Sensitivität (% real positive richtig identifiziert) = 95 %

Pool C-Spezifität (% real negative richtig identifiziert) = 87 %

Pool C-Genauigkeit (% richtige Ergebnisse) = 90 %

Pool C-PV (+) (Zuverlässigkeit von positiven Ergebnissen) = 81 %

Pool C-PV (-) (Zuverlässigkeit von negativen Ergebnissen) = 97 %

[0063] Diskordante Ergebnisse von Proben wurden unter Verwendung des Biometra-ELISA-Tests als Infektions-positiv oder -negativ bestätigt (Tabelle 4).

Tabelle 4

Diskordante Ergebnisse des Tests mit den Proben

Probe	Schnelle EIA Ergebnis	Kultur/Histologie Ergebnis	Biometra-ELISA Ergebnis
52	-	+	+
56	-	+	+
59	-	+	+
3	+	-	+
5	+	-	+
32	+	-	+
46	+	-	+
50	+	-	+
62	+	-	+
73	+	-	+
91	+	-	+
105	+	-	+
117	+	-	+
119	+	-	+
140	+	-	+
167	+	-	+
173	+	-	+
174	+	-	+

[0064] 14 von 15 Kultur-Histopathologie-negativen und in einem schnellen EIA-positiven Sera wurden in dem Biometra-ELISA als positiv bestätigt. Mit diesen Vergleichen wurde gezeigt, daß der schnelle EIA eine Sensitivität bzw. Spezifität von 96 % bzw. 99 % aufweist (Tabelle 5).

Tabelle 5

Schneller EIA mit Pool C gegen Kultur/Histologie angepaßt an ELISA-Ergebnisse

	Kultur/Histologie Positiv	Kultur/Histologie Negativ
Schneller EIA Positiv	77	1
Schneller EIA negativ	3	102
Gesamt :	80	103

korrigierte Pool C-Sensitivität = 96 %

korrigierte Pool C-Spezifität = 99 %
 korrigierte Pool C-Genauigkeit = 98 %
 korrigierte Pool C-PV (+) = 99 %
 korrigierte Pool C-PV (-) = 97 %

Vergleich eines Urease-angereicherten Antigenextrakts mit dem Pool C auf ihre Eignung beim Nachweis von Antikörpern gegen *H. pylori* in Humansera

[0065] Eine Urease-angereicherte Antigenzubereitung (Pool B) wurde wie in der US-A 4 882 271 von Evans et al. beschrieben hergestellt und mit dem Urease-verarmten Pool C-Antigen bezüglich ihrer Fähigkeit zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *H. pylori* in Humansera bei dem schnellen EIA-Test verglichen. Tabelle 6 zeigt die mit Humanserumproben erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 6

Vergleich von Pool B (Urease-Antigen) mit Pool C unter Verwendung des schnellen EIA

H. pylori-negative Sera

Probe	Pool B (Urease)	Pool C
4	+	-
6	-	-
7	-	-
8	+	-
9	-	-
10	+	-
11	+	+
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
19	-	-
21	-	-
25	-	-
63	-	-
64	-	-
% falsch-positiv	25 %	6 %

H. pylori-positive Sera

Probe	Urease	Pool C
3	+	+
17	+	+
18	+	+
23	+	+
26	+	+
28	+	+
29	+	+
30	+	+
% richtige Signale	100 %	100 %

[0066] Tabelle 6 zeigt, daß das Urease-verarmte Pool C-Antigen eine geringere Häufigkeit von falsch-positiven Ergebnissen als die Urease-angereicherte Zubereitung von Evans aufweist (6 % gegen 25 %).

Beispiel 4

[0067] Vier verschiedene H. pylori-Antigen-Extrakte (Pool A, Pool C (ureasedepletiert), Beschallungs- und Glycinextrakte) wurden in einer Mikrotiter-ELISA-Anordnung mit Kultur- und Histologiedaten von Humanserumproben verglichen.

H. pylori-EIA-Mikrotiter-Assay

[0068] Zusammengesetzte Mikrotiterplatten mit 69 Vertiefungen, die einen glatten Boden aufweisen, wurden über Nacht bei 4°C mit optimierten Konzentrationen der 4 Antigene beschichtet. Nach der Entfernung der Antigenlösung wurden die Platten an der Luft getrocknet und in Beutel gesteckt. Zur Durchführung von Immunoassays wurden die Vertiefungen bei Umgebungstemperatur mit 300 µl einer Mikrotiterwaschlösung (PBS, das 0,05 % (w/v) Tween 20 und 0,01 % (w/v) Thimerosal enthielt) gewässert. Anschließend wurde die Flüssigkeit entfernt und die folgenden Schritte bei 25°C durchgeführt. Serumproben, die 100-fach mit BSA enthaltendem PBS verdünnt waren, wurden in die Vertiefungen gebracht (100 µl/Vertiefung) und 30 Minuten inkubiert. Die Platten wurden fünfmal mit jeweils 300 µl der Waschlösung gewaschen und 30 Minuten mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-Anti-Human-IgG inkubiert. Die Platten wurden wieder fünfmal mit jeweils 300 µl der Waschlösung gewaschen und 15 Minuten mit einer frisch hergestellten Substratlösung inkubiert, die das Diammoniumsalz der 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-sulfonsäure) (ABTS) und Wasserstoffperoxid enthielt. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 50 µl von 0,25 M Oxalsäure gestoppt und mit einem MR 700 Plate Reader (Dynatech Laboratories) die Extinktion bei 410 nm aufgezeichnet.

[0069] Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 wiedergegeben. Sie zeigen, daß der Pool C im Vergleich zu den anderen getesteten Antigenzubereitungen bezüglich seiner Spezifität und Sensitivität bei der Identifizierung von H. pylori-negativen und H. pylori-positiven Humansera überlegen ist.

Tabelle 7

Vergleich der Spezifität und Sensitivität eines Mikrotiter-ELISA für IgG-Antikörper in Humansera unter Verwendung verschiedener H. pylori-Antigenzubereitungen

	Pool C (n = 29)	Pool A (n = 29)	Glycin (n = 48)	Beschallung (n = 33)
Spezifizität	93 %	72 %	73 %	64 %
Sensitivität	100 %	100 %	100 %	100 %

Bemerkungen:

1. n bedeutet die Anzahl der getesteten, histocytologisch untersuchten H. pylori-negativen Sera.
2. Die Spezifität ist die Fähigkeit zum richtigen Nachweis von H. pylori-negativen Sera durch Histocytologie.
3. Sensitivität ist die Fähigkeit zum richtigen Nachweis von H. pylori-positiven Sera durch Histocytologie.

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, enthaltend von Helicobacter pylori abgeleitete Proteine, die zum Detektieren der Gegenwart von Helicobacter pylori-Antikörpern verwendbar sind, gekennzeichnet durch folgende Merkmale:

- Die Zusammensetzung hat eine Urease-spezifische Aktivität von weniger als 0,34 OD₅₅₀/A₂₈₀ in einem Ureasekatalysierten Assay,

- die Zusammensetzung kann nach Denaturierung und Reduzierung der darin enthaltenen Helicobacter pylori-abgeleiteten Proteine mittels SDS PAGE-Analyse charakterisiert werden als enthaltend Helicobacter pylori-spezifische Antigene mit Molekulargewichten von 120 kD, 66 kD, 62 kD, 59 kD, 52 kD und 31 kD; und übliche Antigenen mit Molekulargewichten von 89 kD, 73 kD, 56 kD, 45 kD, 42 kD, 29 kD, 25 kD, 21 kD und 16 kD;
- die Mengen an Antigenen mit Molekulargewichten von 66 kD und 56 kD sind größer als die Mengen irgendeines der übrigen obengenannten einzelnen Antigene.

2. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

- Extrahieren intakter Helicobacter pylori-Zellen mit n-Octyl-β-D-glycopyranosid (BOG) unter Erhalt eines Extraktes;
- Unterwerfen dieses Extraktes einer Größenausschlußsäulenchromatografie zum Erhalt von Fraktionen;
- Gewinnen von Urease-depletierten Fraktionen mit einem durch Größenausschlußchromatografie bestimmten Molekulargewicht von weniger als 200 kD.

3. Verfahren zum Nachweis der Gegenwart von aus einer Helicobacter pylori-Infektion resultierenden Antikörpern in einer biologischen Probe, mit den Schritten:

- a) In Berührung bringen der Probe mit einer Zusammensetzung nach Anspruch 1;
- b) Reagierenlassen der Probe und der Zusammensetzung zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes bezüglich irgendeines in der Probe enthaltenen Antikörpers;
- c) Nachweis der Gegenwart irgendeines Antigen-Antikörper-Komplexes, der das Vorhandensein einer Helicobacter pylori-Infektion anzeigt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) der Nachweis des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt durch ein Verfahren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Enzym-linked Immunosorbent Assay, Radioimmunoassay, Komplementfixierung, indirekte Hemagglutininierung, Latexagglutininierung, Assay mit schnellem Durchfluß (rapid flow-through assay) und Lateralflußassay.

5. Verfahren zum Nachweis von aus einer Infektion resultierenden Helicobacter pylori-Antikörpern in einer biologischen Probe, mit den Schritten:

- a) Immobilisieren und Trocknen einer Zusammensetzung nach Anspruch 1;
- b) Inkubieren des getrockneten Antigenkomplexes mit der Probe zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes;
- c) Zugabe von Enzym-konjugierten Anti-Human-IgG-Antikörper zu dem Antigen-Antikörper-Komplex und Inkubieren zur Bildung eines markierten Komplexes;
- d) Zufügen eines Substrates für das konjugierte Enzym zu dem markierten Komplex zur Bildung eines Entwicklungskomplexes und
- e) Beobachten des Entwicklungskomplexes auf eine Änderung in dem Substrat zur Bestimmung der Menge der Antikörper gegen Helicobacter pylori, die in der Probe vorliegen.

6. Verfahren nach Anspruch 5, bei dem in Schritt c) die Anti-Human-IgG-Antikörper mit Meerrettichperoxydase konjugiert sind.

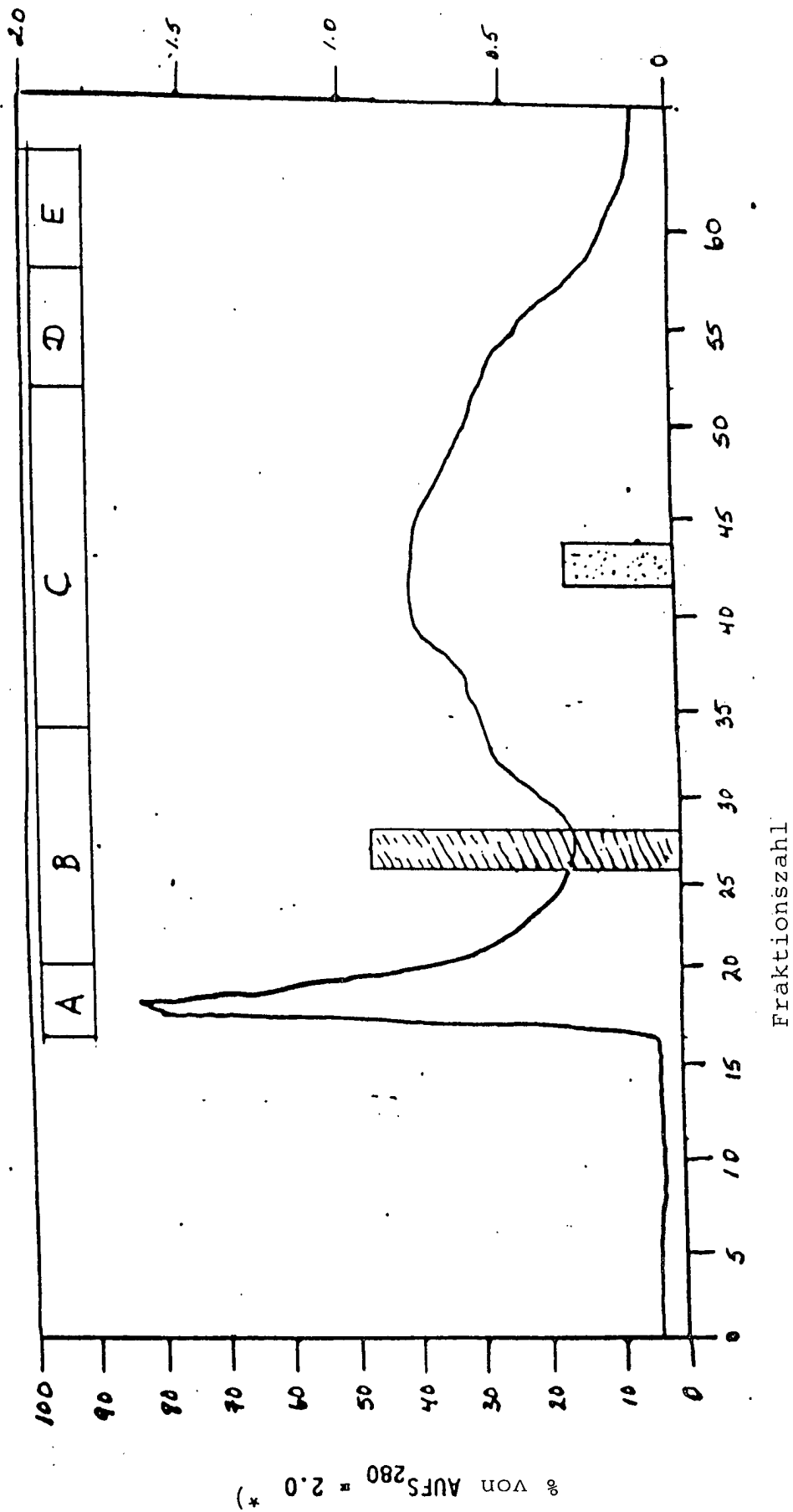
7. Kit zum Nachweis von als Antwort auf eine Helicobacter pylori-Infektion gebildeten Antikörpern in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Zusammensetzung nach Anspruch 1 enthält.

8. Kit nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigenzusammensetzung auf einem festen Träger

ger immobilisiert ist.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



FIGUR 1

- #) Balken bezeichnen die spezifische Urease-Aktivität, die auf die angezeigten Poole bezogen ist
- *) Gesamtskala der Extinktionseinheiten (Absorbance units full scale; AUFS)