

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/571

G01N 33/92



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00808540.4

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1195986C

[22] 申请日 2000. 6. 8 [21] 申请号 00808540.4

[30] 优先权

[32] 1999. 6. 9 [33] US [31] 60/138,192

[86] 国际申请 PCT/US2000/015828 2000. 6. 8

[87] 国际公布 WO2000/075666 英 2000. 12. 14

[85] 进入国家阶段日期 2001. 12. 6

[71] 专利权人 美国政府健康及人类服务部

地址 美国佐治亚州

[72] 发明人 维多利亚·波普

阿诺德·R·卡斯特罗

威廉·E·莫里尔

审查员 胡玉连

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 3 页 说明书 19 页

[54] 发明名称 使用合成抗原检测梅毒的方法

[57] 摘要

描述了用于检测梅毒密螺旋体抗体和诊断梅毒的抗原组合物和方法。所述抗原组合物含有合成的心磷脂和合成的卵磷脂。所述抗原组合物还可含有胆固醇和醇。所述抗原组合物可在免疫测定中作为免疫试剂用于检测与梅毒密螺旋体感染相关的抗体。所述方法对于梅毒密螺旋体感染具有灵敏性和特异性。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种抗原组合物，含有四肉豆蔻酰心磷脂和 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱。

5

2. 权利要求 1 的抗原组合物，其中所述四肉豆蔻酰心磷脂的浓度按重量体积比计为 0.02-0.04%。

10

3. 权利要求 2 的抗原组合物，其中所述四肉豆蔻酰心磷脂的浓度按重量体积比计为 0.03%。

4. 权利要求 1 的抗原组合物，其中所述 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的浓度按重量体积比计为 0.11-0.16%。

15

5. 权利要求 4 的抗原组合物，其中所述 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的浓度按重量体积比计为 0.14%。

6. 权利要求 1 的抗原组合物，进一步含有胆固醇。

20

7. 权利要求 6 的抗原组合物，其中所述胆固醇的浓度按重量体积比计为 0.9%。

8. 权利要求 1 的抗原组合物，进一步含有醇。

25

9. 权利要求 8 的抗原组合物，其中所述醇是乙醇。

10. 权利要求 1 的抗原组合物，进一步含有胆固醇和乙醇。

30

11. 权利要求 10 的抗原组合物，其中所述四肉豆蔻酰心磷脂的浓度按重量体积比计为 0.02-0.04%，所述 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘

油-3-磷酸胆碱的浓度按重量体积比计为 0.11-0.16%，和所述胆固醇在乙醇中的浓度按重量体积比计为 0.9%。

5 12. 权利要求 11 的抗原组合物，其中所述四肉豆蔻酰心磷脂的浓度按重量体积比计为 0.03%，而所述 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的浓度按重量体积比计为 0.14%。

13. 一种检测人体内梅毒密螺旋体 (*Treponema pallidum*) 存在的方法，包括：

- 10 (a) 从人体中获取生物样品；
(b) 将该生物样品与含有四肉豆蔻酰心磷脂和 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的组合物混合；和
(c) 检测生物样品中的抗体与所述组合物之间所形成的免疫复合物。

15 14. 权利要求 13 的方法，其中所述组合物进一步含有胆固醇和醇。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述醇是乙醇。

20 16. 权利要求 15 的方法，其中所述四肉豆蔻酰心磷脂的浓度按重量体积比计为 0.02-0.04%，所述 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的浓度按重量体积比计为 0.11-0.16%，和所述胆固醇在乙醇中的浓度按重量体积比计为 0.9%。

25 17. 权利要求 14 的方法，其中所述组合物中胆固醇的浓度按重量体积比计为 0.9%。

30 18. 权利要求 13 的方法，其中所述组合物中四肉豆蔻酰心磷脂的浓度按重量体积比计为 0.01-0.05%。

19. 权利要求 13 的方法，其中所述组合物中 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的浓度按重量体积比计为 0.11-0.16%。

5 20. 权利要求 13 的方法，其中所述免疫复合体的检测用于诊断梅毒。

21. 权利要求 13 的方法，其中使用絮凝或凝集试验来检测免疫复合体。

使用合成抗原检测梅毒的方法

5 本发明是由一个美国政府机构即“疾病控制和预防中心”完成的。

发明领域

 本发明涉及微生物学和免疫学领域，更具体而言，涉及检测、诊断和监测梅毒治疗的组合物和方法。特别是，本发明涉及合成的心磷脂和卵磷脂抗原组合物及其在免疫测定中的应用。

10

发明背景

 梅毒是一种由梅毒密螺旋体 (*Treponema pallidum*) 细菌引起的性传播疾病 (STD)。在全世界每年报导有超过 100000 个成人梅毒病例。该病还可经先天传播，每年使 3000 或更多的婴儿受到感染。当在疫病的早期没有进行抗生素治疗时，疾病会蔓延至全身，常常导致器官不可逆转性损伤、精神病、失明或死亡。人免疫缺陷病毒 (HIV) 在全世界的传播大大增加了梅毒作为健康问题的严重性，因为在梅毒感染早期产生的生殖器溃疡将促进 HIV 的性传播。

15

20

 梅毒的进程分为以下阶段：初期、二期、潜伏期、神经梅毒期和三期（晚期）。被感染个体在前两个阶段中可传染其他人。当细菌从被感染个体的溃疡处蔓延到性伴侣的生殖器区域、嘴或者肛门的皮肤或粘膜时，传播就发生了。梅毒密螺旋体生物体还可穿过身体其他部位的破损的皮肤。在三期梅毒和神经梅毒期，细菌感染不是传染性的，但所述生物体向器官、组织和脑中的侵入导致致命的后果，例如严重的心血管异常或神经疾病。

25

 在孕妇受到感染且未接受治疗的前四年中，可发生垂直的或经胎盘的梅毒感染。尽管对母亲进行充分治疗通常将预防先天性梅毒，但

30

是据报道在子宫中接触过梅毒密螺旋体的人类胎儿中仍有约 25%死产。一些患有先天性梅毒的婴儿在出生时表现出症状，但大多数在分娩（partum）后 2-3 个月时发展出症状。这些症状包括皮肤疮、皮疹、发热、肝脾肿大、黄疸、贫血和各种畸形。当被感染婴儿成年时，他们可能发展出晚期梅毒症状，包括对骨、牙、眼、耳和脑的不可逆性损伤。

初期梅毒的最初症状是溃疡或下疳。在接触后 10 天至 3 个月内出现下疳，常常在与被感染性伴侣的溃疡相接触的身体部位上发现下疳，这些部位例如为阴茎、外阴、阴道、子宫颈、直肠、舌或唇。由于下疳持续仅数周且可能是无痛的或发生在体内，因此它可能不被注意。在接受或不接受治疗的情况下，下疳消失。在未接受治疗的个体中，在初期损害出现后约 9 周时将出现二期症状。

二期梅毒常常以皮疹为标志，其特征在于约美分大小的褐色疮。由于在这些疮中存在活性细菌，因此在这一阶段任何与被感染个体破损皮肤间性或非性的直接接触可能使感染蔓延。其他症状包括轻微的发热、疲劳、头痛、喉痛、片状脱发和淋巴腺肿大。这些症状可能是轻微的，并且象初期梅毒的下疳一样将在接受或未接受治疗的情况下消失。如果未接受治疗，被感染个体随后进入潜伏期。

潜伏梅毒的特征在于没有临床病征或脑脊液（CSF）的异常表现，但血清学试验结果为阳性。早期潜伏梅毒在感染 1 年内出现，其可以潜在地传播并可能复发，而晚期潜伏梅毒与对抗复发的免疫力和对再次感染的抗性相关。

在梅毒感染的早期，细菌可侵入神经系统。如果不接受治疗，就可能发展成神经梅毒。所述疾病进展到神经梅毒可能需要 20 年，并且一些患有神经梅毒的个体没有发展出可识别的症状，这导致很难进行诊断。那些存在症状的个体可能抱怨伴有头痛、颈强直或发热，这

些都是由脑内层（lining）的炎症引起的。神经梅毒患者还可能受到中风的侵袭，伴有中风的症状如麻木、虚弱或视觉问题。

5 尽管在未能接受治疗的被梅毒密螺旋体感染的个体中约有三分之二将不会遭受更进一步的疾病后果，但约三分之一的未受治潜伏梅毒患者发展出晚期或者说三期梅毒的并发症。在梅毒三期，细菌损伤心脏、眼、脑、神经系统、骨、关节或者身体的任何其他部分。梅毒的三期可持续数年或甚至数十年。晚期梅毒一般导致心血管疾病、精神病、失明或甚至死亡。

10

鉴于梅毒感染有时产生严重的和致命的后果，以及存在传播和感染 HIV 的危险，因此所述感染的特异性的早期诊断是十分必要的。但是，由于其早期症状与其他许多疾病相似，梅毒有时被称作“大模仿者”。因此，医生通常不仅仅依赖于梅毒病征和症状的识别，还要依赖包括对梅毒细菌显微镜鉴别的临床试验的结果以及针对生物样品中梅毒感染现象的分析试验的结果。

15

通过显微镜鉴别细菌来诊断梅毒通常如下进行。从溃疡或下疳表面剥离样品，在特殊的“暗视野”显微镜下观察，以检测生物体。暗视野显微镜检术需要相当多的技巧且容易判断错误。

20

基于这些原因，大多数梅毒病例首先使用非密螺旋体测定进行血清学诊断。非密螺旋体试验检测在梅毒密螺旋体感染发生后产生的物质，例如抗体。目前可得的通常用于检测梅毒感染证据的非密螺旋体测定是性病研究实验室（VDRL）试验和快速血浆反应素（RPR）试验。VDRL 试验使用由天然来源获得的脂质，来检测抗类脂质（lipoidal）的抗体，这些抗体是在梅毒密螺旋体感染后产生的。产生的这些抗体通过被梅毒密螺旋体感染的个体的免疫系统来对抗梅毒密螺旋体生物体的心磷脂，可在所述个体的血清或脑脊液中发现这些抗体。

25

30

5 目前可得非密螺旋体试验的一个缺点是特异性差。在目前可得
的用于梅毒的试验中，包括支原体感染、肺炎、疟疾、急性细菌和病
毒感染和自身免疫病在内的许多病症可引起假阳性试验结果。例如，
静脉使用药物或自身免疫病引起组织损伤，其导致心磷脂的释放和抗
心磷脂抗体的产生。因此，在非密螺旋体试验中检测这些抗心磷脂抗
体将产生假阳性结果。对于神经梅毒的检测，成功的诊断是非常成问
题的。

10 由于在使用这些现有试验时出现假阳性和假阴性结果，因此通常
需要使用其他分析方法例如显微镜检术或密螺旋体基血清学试验来证
实。标准的密螺旋体基试验包括荧光密螺旋体抗体-吸附（FTA-ABS）
试验和 FTA-ABS 双染色试验（FTA-ABS DS）。尽管可使用密螺旋体
基试验来证实阳性试验结果，但是这些试验常常是昂贵、复杂且费时
的，并且可能需要使用非常复杂的科学仪器和需要经过培训的技术人
15 员。此外，密螺旋体测定不能作为检测抗生素治疗成功与否的试验，
这是因为在治愈后抗梅毒密螺旋体抗体持续存在，在约 85%的成功治
疗的个体中，试验结果甚至在根除感染后仍保持阳性。

20 因此，需要一种灵敏且特异的检测样品中梅毒密螺旋体感染的单
一测定，用于早期梅毒或神经梅毒的诊断。同样需要的是一种简单且
不昂贵的可用于检测梅毒治疗成功与否的测定。

发明概述

25 提供了一种检测梅毒密螺旋体感染并由此诊断梅毒的抗原组合物
和方法。抗原组合物含有合成的心磷脂和合成的卵磷脂的组合或混合
物。优选的抗原组合物还含有胆固醇。优选的抗原组合物进一步含有
醇。醇使抗原组合物中的脂质溶解，形成悬浮液。抗原组合物可作为
试验中的试剂用于检测生物样品中与梅毒密螺旋体感染相关的抗体，
所述生物样品特别是指体液，例如血清或脑脊液。抗原组合物优选是
30 用于检测或测量与梅毒密螺旋体感染相关的抗体的免疫测定试剂。

更优选的抗原组合物含有经纯化的合成的心磷脂、合成的卵磷脂、天然或非合成的胆固醇和醇。组合物中合成的心磷脂和卵磷脂的最佳纯度是 99%或更高。胆固醇的最佳纯度是 98%或更高，或者是无灰的。抗原组合物更优选含有四肉豆蔻酰心磷脂、1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱、胆固醇和绝对（100%）乙醇。组合物中合成的心磷脂的体积浓度约 0.01-0.05%，优选约 0.02-0.04%，更优选 0.03%。组合物中合成的卵磷脂的优选体积浓度是约 0.11-0.16%，更优选 0.14%。组合物中胆固醇的优选体积浓度是约 0.9%，组合物中其余的是醇。

10

本文提供的抗原组合物通常也可作为体外研究工具用于研究梅毒。更特别地，所述组合物可用于测定或诊断试剂盒中，以检测梅毒密螺旋体感染的存在，其用于诊断或预测梅毒疾病的发病或复发。

15

本文提供的优选方法是检测生物样品如血清或脑脊液中心磷脂抗体的免疫测定。依据所述方法，在有助于样品中的抗类脂质抗体与合成的心磷脂-卵磷脂基质结合的条件下，本文所述的抗原组合物与生物样品混合足够长的时间，以形成抗体-抗原复合体。然后使用本领域技术人员熟知的方法如絮凝或微絮凝试验等来检测该复合体。

20

因此，本发明的一个目的是提供检测梅毒密螺旋体感染载体的方法，由此防止梅毒密螺旋体从一个宿主传播到另一个宿主。

本发明的另一个目的是提供灵敏的诊断早期或潜伏梅毒或者神经梅毒的方法。

25

本发明的又一个目的是提供快速、简便且不昂贵的准确检测梅毒密螺旋体的测定。

本发明的又一个目的是提供生产费用不高的抗原组合物，用于可

30

再现地测量或检测梅毒密螺旋体。

本发明的又一个目的是提供检测梅毒密螺旋体的试验，其具有VDRL抗原标准化和稳定的优点。

5

在阅读了以下对所公开的实施方案和所附权利要求书的具体描述后，本发明的这些和其他目的、特征和优点将是十分明显的。

具体描述

10

本文提供了一种检测梅毒密螺旋体的抗原组合物和方法。所述抗原组合物含有合成的心磷脂和合成的卵磷脂的组合或混合物。心磷脂是一种具有抗原特性的1,3-双(磷脂酰基)甘油。卵磷脂是一种磷脂。抗原组合物优选还含有非合成的(天然)胆固醇。醇也是优选的抗原组合物中的一个组分。醇使脂质溶解，由此形成悬浮液。合成的心磷脂和卵磷脂具有99%或更高的最佳纯度。胆固醇具有98%或更高的最佳纯度，或者是无灰的。抗原组合物可作为测定中的试剂用于检测生物样品中与梅毒密螺旋体感染相关的抗体。抗原组合物优选是用于检测或测量在被梅毒密螺旋体感染的个体中产生的抗体的免疫测定试剂，其用于诊断或预测梅毒的发病或复发。

20

本文所述的方法是检测或定量生物样品中与患者的梅毒密螺旋体感染相关的抗体的测定，所述生物样品特别是指体液，例如血清或脑脊液。所述方法允许检测与梅毒密螺旋体感染相关的循环抗体，从而检测或监测梅毒密螺旋体感染。本文提供的优选方法是免疫测定。依据所述优选的方法，在有助于样品中的抗类脂质抗体与抗原组合物中的心磷脂结合的条件下，所述抗原组合物与生物样品混合足够长的时间，以形成抗体-抗原复合物。然后使用本领域技术人员熟知的方法来检测这些抗体-抗原复合物，如VDRL絮凝或微絮凝试验，其通过显微镜来进行读数。

30

定义

本文使用的术语“一种”和“所述”是指“一个或更多”并包括复数，除非根据上下文该解释是不适当的。

- 5 本文使用的术语“抗体”包括单克隆抗体、多克隆、嵌合、单链、双特异性、猿猴源化（simianized）、人源化抗体以及 Fab 片段，包括 Fab 免疫球蛋白表达文库的产物。

10 当涉及抗体时，“特异性结合”或“特异性免疫反应”是指在异源肽、蛋白、脂质和其他生物物质的异相群体中，确定目标抗原存在的结合反应。因此，在指定的免疫测定条件下，指定的抗原优先与特定抗体结合，且不以显著量与样品中的其他抗体结合。在这样的条件下的特异性结合需要根据对特定抗体的特异性而筛选出的抗原。多种免疫测定形式可用于筛选与特定抗体有特异性免疫反应性的抗原。例如，通常使用固相 ELISA 免疫测定来筛选与抗体有特异性免疫反应性的抗原。参见，Harlow 和 lane(1988), *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, 其中描述了可用于确定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件。

20 术语“抗原”是指可在哺乳动物中诱导免疫应答的实体或其片段。该术语包括免疫原和赋予抗原性或抗原决定簇的区域。本文使用的术语“抗原组合物”是指含有合成的心磷脂和合成的卵磷脂的组合物。本文使用的“抗原决定簇”是指抗体所识别的抗原区域。

25 本文使用的术语“检测”是指定性或定量确定所研究的生物分子的存在。

“经分离的”是指生物分子至少不含有其天然存在时所伴有的一些成分。

30

抗原组合物

5 本文提供的组合物含有一个或多个合成的心磷脂和卵磷脂的组合、悬浮液或物理混合物。优选的组合物含有合成的心磷脂、合成的卵磷脂和合成的或非合成的（天然存在的）胆固醇。优选的组合物含有合成的心磷脂、合成的卵磷脂、天然胆固醇和醇。

10 组合物中合成的心磷脂的优选体积浓度是约 0.02-0.04%，更优选 0.03%。组合物中合成的卵磷脂的优选体积浓度是约 0.11-0.16%，更优选 14%。组合物中天然胆固醇的优选体积浓度是约 0.9%，组合物中其余的是醇，优选乙醇，最优选绝对（100%）乙醇。

15 合成的心磷脂可从植物源半合成脂质前体合成。在最优选的实施方案中，所述心磷脂是四肉豆蔻酰心磷脂，其可商购自例如 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) 等供应商。

20 合成的卵磷脂可来源于大豆或鸡蛋。在优选的实施方案中，所述卵磷脂是 16:0, 18:1 卵磷脂，即 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱或 3-sn-磷脂酰胆碱（sn 意味着按立体专一性编号），其也可商购自例如 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) 等供应商。

25 在最优选的实施方案中，组合物是在绝对乙醇中含有约 0.03% 四肉豆蔻酰心磷脂、0.11-0.16% 1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱和 0.9% 天然胆固醇的悬浮液。所述胆固醇也可商购自例如 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)。所述醇可商购自 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) 例如等化学供应商。

30 当与醇混合在一起时，心磷脂、卵磷脂和胆固醇形成脂质基质或胶束。正如下面具体描述的，与人梅毒密螺旋体感染的存在相关的抗体，在本文中称为抗心磷脂抗体，与脂质胶束结合并形成抗体-抗原复合物。因此，这些抗体-抗原复合体的检测或测量可用于诊断梅毒密螺

旋体感染。尽管不希望为以下假设所束缚，但仍相信和抗心磷脂基质抗体与天然存在的心磷脂和卵磷脂的结合相比，抗心磷脂基质抗体与本文所述的合成抗原组合物的结合具有更高的特异性和亲和力。由此，合成抗原组合物提供了更有效、更灵敏且更特异的工具，以检测与梅毒感染相关的抗体。

本领域技术人员知道，可以用可测的标记来标记抗原组合物的一个或多个组分，从而有助于直接测量或检测抗体-抗原复合体的形成。各种类型的标记和将标记与抗原组合物偶联的方法是本领域技术人员所熟知的。

此外，抗原组合物可作为实验室研究工具来用于生产、分离或纯化抗心磷脂抗体，所述抗体通常可用于研究梅毒。因此，抗原组合物可用于体内或体外诊断及实验室研究等目的。

VDRL 抗原的制备

例如可通过制备体积浓度为 0.02-0.04%、更优选 0.03% 的四肉豆蔻酰心磷脂的乙醇溶液来制备 VDRL 抗原。向心磷脂溶液中加入体积浓度为约 0.11-0.16%、更优选 0.14% 的合成的卵磷脂的乙醇溶液，和 0.9% 天然胆固醇的乙醇溶液。按以下顺序加入各组分：心磷脂、卵磷脂、胆固醇和用于达到一定体积的乙醇。在测试前，使抗原溶解，在室温下保存过夜。

抗心磷脂抗体的检测

本文提供的方法包括诊断和预测方法，检测和量化能与上述抗原组合物结合的抗体。这些方法允许检测与心磷脂-卵磷脂基质结合的循环抗体，以指示梅毒密螺旋体感染的存在并由此诊断感染或监测对梅毒密螺旋体感染进行的抗生素治疗的进展。

在本领域中已知有许多技术可用于检测或测量抗体-抗原复合

体，在本文中指免疫复合物。经典的方法涉及使含有抗体的样品与已知过量的对抗体有特异性的抗原反应，使结合抗原与游离抗原分开，确定结合抗原或游离抗原的量。如果测量的是游离抗原，则结合抗原的量可通过用已知的起始量减去游离抗原的量而计算得到。抗原常常直接或间接地用报告基团或可测标记来标记，以帮助确定本文所述抗体-抗原复合物的量。报告基团或“标记”一般是荧光或放射性基团或酶。然后使用本领域技术人员熟知的方法来检测标记，例如分光光度法、闪烁计数或流式细胞计量术。

5

此外，抗原也可与固相珠或颗粒偶联，所述固相珠或颗粒是经过滤、离心或从混合物中取出的，例如通过磁性移出金属或磁化颗粒。将抗原与固相珠如乳胶珠连接，提供了一种更灵敏且快速的新玻片凝集试验。

10

在优选的实施方案中，抗原经心磷脂分子与上述珠相连。抗原与珠相连的一个方法是修饰心磷脂分子从而使之能与珠共价连接。例如，将胺基团连接到心磷脂脂肪酸链的末端甲基上。以此方式修饰的心磷脂可与羧基化或胺基化（aminealated）的乳胶珠相连。

15

如下进行检测样品中抗心磷脂抗体的优选免疫测定。使用本领域技术人员熟知的方法来收集或获得样品。自生物来源获得含待测抗心磷脂抗体的样品。样品优选获自生物流体，例如，但不限于，全血、血清、血浆、唾液、脑脊液等。当样品是血清或脊髓液时，得到最佳诊断结果。样品在免疫测定之前可经过滤或经其他处理，以便获得最佳的免疫测定结果。

20

25

然后，将样品与本文所述抗原组合物一起温育，以形成抗体-抗原免疫复合物。然后，使用本领域技术人员熟知的方法来检测抗体-抗原复合物。本文使用的术语“检测”意指使用已知技术来检测生物分子，例如采用免疫化学或组织学方法。这些方法包括使用脂质的单克

30

隆或多克隆抗体的免疫学技术，例如酶联免疫吸附测定（ELISA）、夹心测定、流式细胞计数测定、放射免疫分析或本领域技术人员公知的其他类型涉及抗体的测定。

5 在所述方法的优选实施方案中，通过在絮凝试验中使用本文描述的合成抗原组合物来检测样品中的抗心磷脂抗体。已知絮凝试验的例子包括未加热血清反应素试验（USR）、快速血浆反应素 10 毫米圆形卡片试验（RPR）、甲苯胺红未加热血清试验（TRUST）和 VDRL 玻片测定。这些测定均是絮凝试验。本领域技术人员知道，也可在凝集
10 试验中使用本文所述的抗原组合物来检测抗心磷脂抗体，这些试验还使用载体颗粒。在更优选的方法实施方案中，在 VDRL 玻片测定中使用合成抗原组合物，正如下文所简要描述的，具体可参见：性病研究实验室(VDRL)玻片试验（Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) Slide Test），Kennedy, E.J. Jr. 和 Creighton, E.T., 157-78 (1998)，A
15 Manual of Tests for Syphilis, 第9版, Larsen, S.A., Pope, V., Johnson, R.E. 和 Kennedy, E.J. Jr.（编辑），美国公共卫生协会，哥伦比亚特区华盛顿，所述文献引入本文作参考。

 如下进行 VDRL 玻片测定。在容器中加入 VDRL 缓冲盐溶液，
20 其中含有甲醛、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和蒸馏水。以恒速将抗原组合物慢慢加入盐溶液中，同时摇动容器，然后搅拌混合物以充分混合各组分并形成悬浮液。将样品如血清加入石蜡或带瓷环玻片的环中，加入一滴抗原组合物悬浮液。旋转玻片以混合样品和抗原组合物，然后经显微镜读数。存在凝块、聚集现象或不平滑，表示抗体-抗原形
25 成。抗原悬浮液的连续稀释液可用于定性测量样品中的抗体。通过使用标准浓度的抗体进行测定并比较样品结果和标准品的结果，可进行定量测定。

 可以理解，测定方法包括使用上述合成抗原组合物和本文所述抗原的合成衍生物组合物，条件是所述衍生物保留了抗原活性或表现出
30

等量的抗原活性，并对抗心磷脂抗体有特异性。

检测梅毒密螺旋体存在的试剂盒

还提供了通过检测抗心磷脂抗体存在或对其定量来诊断或评价梅毒感染的试剂盒。所述试剂盒可具有本领域普通技术人员所熟知的任何构造，并可用于实施一个或更多本文所述检测生物样品中抗心磷脂-卵磷脂基质抗体或者检测或监测患者或载体中梅毒密螺旋体感染的方法。试剂盒是十分方便的，因为它包括了许多（如果不是全部的话）必要试剂，所述试剂用于进行检测生物样品中梅毒抗体的测定。试剂可以经预先测量或以稳定形式含在容器中或在固相上，在其中或其上可进行所述测定，由此可使由实施测定的个体所进行的操作次数减至最少。此外，可与试剂盒中所包括的标准品如预定量的抗体同时进行测定，从而可确证或测量试验的结果。

试剂盒优选含有本文所述的抗原组合物，其可用于检测与梅毒密螺旋体感染相关的心磷脂抗体。试剂盒还优选含有胆固醇，并还可含有有助于检测抗体-抗原复合体的适宜的试剂。试剂盒另外还可含有用于安全获得样品的装置，装有试剂的容器，用于稀释样品或试剂的缓冲液，以及 VDRL、RPR 和 TRUST 测定中使用的圆形卡片例如 10 毫米玻片或 18 毫米圆形卡片。

测定试剂盒包括但不限于准备用于以下技术中的试剂：絮凝试验，例如 USR、RPR 和 TRUST；凝集测定；和夹心或 ELISA 测定。与这些技术一同使用的材料包括但不限于：微量滴定板、用于快速监测生物流体的由抗体包被的条或浸棒（dipstick）。对于每一试剂盒，确定测定的范围、灵敏度、精确度、可靠性、特异性和再现性。使用参照对照血清并将血清滴定至终点可实现标准化，或者也可使用一组血清。

在更优选的实施方法中，测定试剂盒使用 VDRL 玻片技术，并提

供说明书和上述抗原组合物。该试剂盒可用于测量梅毒密螺旋体感染，更具体而言，可用于测量针对生物流体中的心磷脂的抗体，所述生物流体来自表现出梅毒症状或有梅毒感染危险的人。

- 5 通过以下实施例进一步说明本发明，这些实施例并不对本发明的保护范围构成限制。相反，应当清楚地认识到，该技术手段可具有多种其他的实施方案、修改或等价形式，在阅读了本说明书之后，本领域技术人员可理解这些变化，它们并没有超出本发明的精神和/或所附权利要求的范围。

10

实施例 1

制备合成的心磷脂和卵磷脂组合物

15 从 Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) 得到粉末形式的经硅胶层析纯化至约 99%纯度的四肉豆蔻酰心磷脂。最终浓度的钠盐溶液通过薄层层析和高效液相层析测试纯度。样品保存在-20℃。所述四肉豆蔻酰心磷脂最初是从植物来源的半合成脂质前体合成的。

20 还从 Avanti Polar Lipids 得到经硅胶层析纯化至约 99%纯度的卵磷脂（1-棕榈酰基-2-油酰基-sn-甘油-磷酸胆碱）。所述卵磷脂最初是从大豆中分离的。

25 制备 1.2%的胆固醇（Avanti Polar Lipids）绝对乙醇溶液并用乙醇冲洗的滤纸#560 过滤。所述胆固醇最初是从羊毛脂中得到的，并经重结晶纯化，晶体保存在-20℃。

30

使合成的心磷脂依次与合成的卵磷脂、胆固醇溶液和乙醇混合，从而制备抗原组合物。合成的心磷脂的终体积浓度是 0.02-0.03%。合成的卵磷脂的终体积浓度是 0.11-0.16%。胆固醇的终体积浓度是 0.9%，抗原组合物中其余的是乙醇。

30

实施例 2

合成的 VDRL 玻片测定与常规 VDRL 玻片测定的比较分析

5 将使用实施例 1 所述的合成心磷脂和卵磷脂组合物的 VDRL 玻片测定的灵敏度与 A Manual of Tests for Syphilis (第 9 版, 159-77, Larsen, S.A., Pope, V., Johnson, R.E. 和 Kennedy, E.J. Jr. (编辑), 美国公共卫生协会, 哥伦比亚特区华盛顿) 所述的常规 VDRL 玻片测定的灵敏度相比较。简言之, 将 0.4 ml VDRL 缓冲盐溶液(甲醛、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 NaCl 和蒸馏水) 加到具有平内底表面的带玻璃塞的 30 ml 圆底烧瓶或者 25 ml 锥形瓶的底部。然后, 将 0.5 ml 抗原组合物悬浮液直接加入盐溶液, 速度为 6 秒/0.5 ml 抗原悬浮液, 同时持续地转动烧瓶。持续转动 10 秒直至 4.1 ml 缓冲的盐溶液加完。给瓶塞紧盖, 在 10 秒内上下振摇约 30 次。抗原悬浮液在 8 小时内使用。

15 通过用安全移液装置将 50 μl 血清加入石蜡或带瓷环的玻片的一个环中来进行定性测定。抗原悬浮液温和地再次悬浮, 加入一滴自由落下的液体 (17 μl)。将玻片装到机械振摇器上, 以 180 ± 2 rpm 振摇 4 分钟。立即取出玻片并使用 10X 目镜和 10X 物镜经显微镜读数。结果报告如下: 反应性—中等或大凝块, 弱或极小反应性—小凝块, 非反应性—不聚集或有非常轻微的粗糙度。定量试验使用连续二倍稀释的血清类似地进行。

20 结果列于下表 1 中, 表明使用合成抗原组合物的试验比使用标准 VDRL 抗原的试验更加灵敏, 所述标准品是用天然心磷脂和卵磷脂制备的。

表 1 比较天然 VDRL 和合成 VDRL 测定的灵敏度

试验	灵敏度		
	初期	二期	潜伏期
天然 VDRL	80%	100%	85%
合成 VDRL	84%	100%	88%

25 使用实施例 1 所述的合成心磷脂和卵磷脂抗原组合物的 VDRL 玻

片测定以及常规 VDRL 玻片测定的灵敏度还与常规 RPR 玻片测定进行了比较。如下表 2 和表 3 所示，与使用非合成 VDRL 抗原的测定相比，使用合成 VDRL 抗原组合物的测定与用 RPR 试验测试为阳性的样品具有更高的反应性。

5

表 2
RPR 与合成 VDRL 的比较

RPR	合成 VDRL	
	反应性	非反应性
反应性*	41	13
非反应性	1	5

*所有 RPR 反应性均是最低反应性

表 3

RPR 与天然 VDRL 的比较

RPR	天然 VDRL	
	反应性	非反应性
反应性*	13	41
非反应性	0	6

*所有 RPR 反应性均是最低反应性

10

实施例 3

合成的 VDRL 抗原和天然 VDRL 抗原的比较分析（定性试验）

采用经非密螺旋体（RPR）试验测试为反应性的来自 100 份冷冻血清的样品，将 CDC 合成 VDRL 抗原和对照 VDRL 抗原（天然 VDRL 抗原）进行比较。血清样品在 56℃ 加热 30 分钟灭活。将 50μl 的各血清样品加入相应的石蜡或带瓷环的玻片中。将每种抗原各一滴（17μL）加入玻片的相应环中。将玻片装到机械振荡器上，以 180 rpm 振荡 4

15

分钟，然后经显微镜读数。观察并记录两种抗原的絮凝程度。

5 如表 4（未被检验的）所示，所有血清（100%）经 RPR 测试为反应性的，具有与 CDC 合成 VDRL 抗原的反应性，而只有 88%具有与天然 VDRL 抗原的反应性。

10 此外，合成 VDRL 抗原和天然 VDRL 抗原在同一试验中使用 100 份样品来进行比较，所述样品来自已被检验过并有记载的梅毒病例。该试验的结果也列于表 4 中（已被检验过的）。这些试验的所有结果均通过 SERODIA 梅毒密螺旋体颗粒凝集试验（TP-PA）（Fujirebio America, Inc., Fairfield, NJ）证实。

表 4

梅毒分类	血清样品数	与下列有反应性的血清数		
		合成的 VDRL 抗原	天然 VDRL 抗原	TP-PA
未被检验过的	100	100	88	99
已被检验过的 未受治 初期	9	9	9	8
二期	20	20	20	20
潜伏	6	5	5	6
接受治疗 初期	15	12	11	13
二期	30	30	30	30
潜伏	20	18	17	19
总数	200	194	180	195

15 实施例 4

合成的 VDRL 抗原和天然 VDRL 抗原的比较分析（定量试验）

20 采用经非密螺旋体（RPR）试验测试为反应性的来自 100 份冷冻血清的样品，将 CDC 合成 VDRL 抗原和对照 VDRL 抗原（天然 VDRL 抗原）进行比较。血清样品在测试管中用 0.9% 盐水稀释二倍。将 50 μ l 的各血清稀释液加入石蜡或带瓷环的玻片的相应环中。将每种抗原各一滴（17 μ L）加入玻片的相应环中。将玻片装到机械振摇器上，以 180

rpm 振摇 4 分钟。经显微镜读取各血清稀释液的终点滴度。将一个双倍稀释的区别定义为终点，对于一个抗原为 (R)，针对另一抗原为 (N)。

5 如表 5 (未被检验过的) 所示，该试验显示，在 RPR 试验中有反应性的冷冻血清中，其中 85% 与 CDC 合成 VDRL 抗原的终点滴度比与天然 VDRL 抗原的终点滴度大 0.5 或 1 个稀释度。在 15% 的情况中，用 CDC 合成 VDRL 抗原得到的终点滴度和用天然 VDRL 抗原得到的终点滴度相等。在所测试的样品中，没有一个与天然抗原的终点滴度比与 CDC 合成抗原的终点滴度高。

10 使用来自已被检验过并被记载的梅毒病例的 100 份样品重复该实验。如表 5 (已被检验过的) 所示，来自已被检验过并被记载的梅毒病例的血清中，84% 与 CDC 合成 VDRL 抗原的终点滴度比与天然 VDRL 抗原的终点滴度大 0.5 或 1 个稀释度。在 7% 的情况中，用 CDC 合成 VDRL 抗原得到的终点滴度和用天然 VDRL 抗原得到的终点滴度相等，而在 3% 的情况中，用天然 VDRL 抗原得到的终点滴度比用 CDC 合成 VDRL 抗原得到的终点滴度大 0.5 或 1 个稀释度。这些试验的结果通过 TP-PA 试验得以证实。

20

表 5

梅毒类别	样品数	CDC 合成 VDRL 抗原较高	天然 VDRL 抗原较高	CDC 合成和天然 VDRL 抗原终点相等
未被检验过的	100	85	0	0
已被检验过的 未受治 初期	9	3	2	4
二期	20	20	0	0
潜伏	6	4	0	1
接受治疗 初期	15	10	0	2
二期	30	30	0	0
潜伏	20	17	1	0
总数	200	169	3	7

实施例 5

在患有除梅毒外的疾病的患者中合成的 VDRL 抗原和天然 VDRL 抗原的比较分析（定性试验）

5

使用实施例 3 的步骤定性测试来自 100 名患有除梅毒外的疾病的患者的样品。这些试验通过 TP-PA 试验和 FTA-ABS 试验证实。这些试验的结果列于表 3 中，其表示所有样品与 CDC 合成 VDRL 抗原和天然 VDRL 抗原均是非反应性的。4 个样品在 TP-PA 试验中是反应性的，但在 FTA-ABS 试验中是非反应性的。

10

表 6

样品类别	样品数	反应性和非反应性血清样品数							
		CDC 合成的 VDRL 抗原		VDRL 抗原		TP-PA		FTA-ABS	
		R	N	R	N	R	N	R	N
风湿热	27	0	27	0	27	4	23	0	27
冠状动脉疾病	9	0	9	0	9	0	9	ND	
高血压	6	0	6	0	6	0	6	ND	
糖尿病	4	0	4	0	4	0	4	ND	
帕金森氏症	2	0	2	0	2	0	2	ND	
肥胖症	2	0	2	0	2	0	2	ND	
咽喉炎(绞痛)	2	0	2	0	2	0	2	ND	
其它各种类别	48	0	48	0	48	0	48	ND	
	100	0	100	0	100	4	96		

R=反应性；N=非反应性

15

实施例 6

在生物假阳性样品中合成 VDRL 抗原和天然 VDRL 抗原的比较分析（定性试验）

样品来自 50 名最初被分类为生物假阳性（BFP）的个体。这些个体在非密螺旋体试验中为反应性的，在密螺旋体试验中为非反应性

20

的。这些样品使用实施例 3 的步骤进行测试。该试验的结果列于表 7 中。发现 4 个最初被误分为 BFP 的血清样品在使用 CDC 合成 VDRL 抗原、TP-PA 和 FTA-ABS 试验时为反应性的。这 4 个样品中有 3 个与天然 VDRL 抗原也有反应性。

5

表 7

样品反应性	TP-PA	CDC 合成的 VDRL 抗原	天然 VDRL 抗原
反应性	4	28	27
非反应性	46	22	23

R=反应性；N=非反应性

实施例 7

10 未知样品中合成 VDRL 抗原和天然 VDRL 抗原的比较分析（定性试验）

15 使用上面实施例 3 的步骤，用 CDC 合成 VDRL 抗原和天然 VDRL 抗原对没有患者标识的 495 个样品进行测试。反应性样品用 TP-PA 试验、针对梅毒 IgG 抗体的 ELISA 试验或 FTA-ABS 试验证实。38 个样品在一个密螺旋体试验中是反应性的，457 个样品是非反应性的。可从表 8 中看出，在密螺旋体反应性的血清样品中，所有样品与 CDC 合成 VDRL 抗原具有反应性，36 个样品与天然 VDRL 抗原具有反应性。在 457 个密螺旋体非反应性的血清样品中，452 个样品与 CDC 合成 VDRL 抗原具有反应性，450 个样品与天然 VDRL 抗原具有反应性。

20

表 8

	试验数	CDC 合成的 VDRL 抗原		天然 VDRL 抗原	
		R	N	R	N
反应性	38	38	0	36	2
非反应性	457	5	452	7	450

R=反应性；N=非反应性

专利名称(译)	使用合成抗原检测梅毒的方法		
公开(公告)号	CN1195986C	公开(公告)日	2005-04-06
申请号	CN00808540.4	申请日	2000-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	美国卫生及公共服务部		
申请(专利权)人(译)	美国政府健康及人类服务部		
当前申请(专利权)人(译)	美国政府健康及人类服务部		
[标]发明人	维多利亚波普 阿诺德R卡斯特罗 威廉E莫里尔		
发明人	维多利亚·波普 阿诺德·R·卡斯特罗 威廉·E·莫里尔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/571 G01N33/92		
CPC分类号	G01N2405/04 G01N33/92 G01N2333/20 G01N33/571		
代理人(译)	丁业平 王维玉		
优先权	60/138192 1999-06-09 US		
其他公开文献	CN1353815A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

描述了用于检测梅毒密螺旋体抗体和诊断梅毒的抗原组合物和方法。所述抗原组合物含有合成的心磷脂和合成的卵磷脂。所述抗原组合物还可含有胆固醇和醇。所述抗原组合物可在免疫测定中作为免疫试剂用于检测与梅毒密螺旋体感染相关的抗体。所述方法对于梅毒密螺旋体感染具有灵敏性和特异性。

RPR 与天然 VDRL 的比较

RPR	天然 VDRL	
	反应性	非反应性
反应性*	13	41
非反应性	0	6

*所有 RPR 反应性均是最低反应性