



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107533060 B

(45)授权公告日 2019.11.05

(21)申请号 201680027067.1

(22)申请日 2016.03.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107533060 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(30)优先权数据
62/131,062 2015.03.10 US
62/181,685 2015.06.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.11.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/021379 2016.03.08

(87)PCT国际申请的公布数据
W02016/144962 EN 2016.09.15

(73)专利权人 生物辐射实验室股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 R·考尔 郑伟明 R·沃克尔

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100
代理人 陈扬扬 余颖

(51)Int.Cl.
G01N 33/571(2006.01)
G01N 33/92(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 101243321 A,2008.08.13,说明书第4
页,第6-10页,第30页,第33-47页,说明书实施例
9-12.

CN 101881772 A,2010.11.10,说明书第6-
42段.

US 2014322800 A1,2014.10.30,说明书第
15段,第18段,第22-49段,第94段,第106段,第
149-153段,第174-198段.

WO 0075666 A1,2000.12.14,全文.

CN 101711361 A,2010.05.19,全文.

CN 101341408 A,2009.01.07,全文.

US 2006171967 A1,2006.08.03,全文.

CN 102095861 A,2011.06.15,全文.

Gomez,E等.Evaluation of the Bio-Rad
BioPlex 2200 Syphilis Multiplex Flow
Immunoassay for the Detection of IgM- and
IgG-Class Antitreponemal Antibodies.
《CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY》.2010,第
17卷(第6期),第966-968页.

Castro,AR等.Novel Point-of-Care Test
for Simultaneous Detection of
Nontreponemal and Treponemal Antibodies
in Patients with Syphilis.《JOURNAL OF
CLINICAL MICROBIOLOGY》.2010,第48卷(第12
期),第4615-4619页.

审查员 刘莉丹

权利要求书2页 说明书18页 附图2页

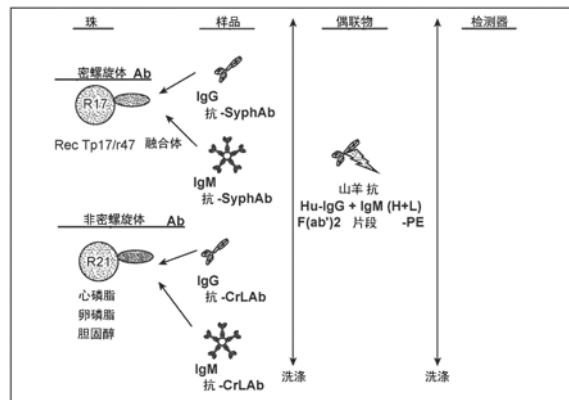
(54)发明名称

组合密螺旋体和非密螺旋体梅毒测试

(57)摘要

本文提供了用于检测指示个体中梅毒感染的存在和阶段的抗体的多重试验。感染梅毒的个体产生针对梅毒组分的抗体和与感染相关的脂质细胞碎片。本申请是这些不同抗体靶标在单一试验中的首次组合。

CN 107533060 B



1. 一种试剂盒,其包含:

(i) 用心磷脂-卵磷脂-胆固醇抗原包被的珠,其中所述珠的制备是通过胺官能化的珠与心磷脂-卵磷脂-胆固醇抗原在pH5-8的偶联缓冲液中孵育使所述心磷脂-卵磷脂-胆固醇抗原通过离子相互作用附连至珠;和

(ii) 用苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*) 抗原包被的珠;

其中 (i) 和 (ii) 以混合物包装在相同隔室的pH5-8的缓冲液中,所述混合物包含离子或两性去污剂。

2. 如权利要求1所述的试剂盒,所述混合物包含两性去污剂。

3. 如权利要求2所述的试剂盒,所述两性去污剂是CHAPS、CHAPSO、IGEPAL或两性洗涤剂 Zwittergent 3-8、3-10、3-12、3-14和3-16。

4. 如权利要求1所述的试剂盒,其中 (i) 的珠用聚乙烯亚胺、乙二胺或聚赖氨酸官能化。

5. 如权利要求4所述的试剂盒,其中 (i) 的珠用聚乙烯亚胺官能化。

6. 如权利要求1所述的试剂盒,其中苍白密螺旋体抗原是r17和r47的融合体。

7. 如权利要求1-6任一所述的试剂盒,还包含标记的抗人免疫球蛋白抗体。

8. 如权利要求7所述的试剂盒,其中所述标记的抗人免疫球蛋白抗体对IgG或IgM有特异性。

9. 如权利要求7所述的试剂盒,其中所述标记的抗人免疫球蛋白抗体是结合人IgG和人IgM的抗体偶联物。

10. 如权利要求7所述的试剂盒,其中所述试剂盒包含IgG特异性的第一标记的抗人免疫球蛋白抗体和IgM特异性的第二标记的抗人免疫球蛋白抗体。

11. 如权利要求10所述的试剂盒,其中所述第一和第二标记的抗人免疫球蛋白抗体具有相同的标记物。

12. 如权利要求10所述的试剂盒,其中所述第一和第二标记的抗人免疫球蛋白抗体具有不同的标记物。

13. 如前述权利要求1-6中任一项所述的试剂盒,还包含洗涤溶液或洗涤原液,其包含磷酸盐缓冲盐水。

14. 如权利要求13所述的试剂盒,其中所述洗涤溶液或洗涤原液包含非离子型去污剂。

15. 如前述权利要求1-6中任一项所述的试剂盒,其中 (ii) 的珠通过共价相互作用附连至苍白密螺旋体抗原。

16. 如前述权利要求1-6中任一项所述的试剂盒,其中 (i) 和 (ii) 的珠带不同标记,具有不同尺寸,或具有不同重量。

17. 如前述权利要求1-6中任一项所述的试剂盒,还包含以下至少一种:(iii) 用凝血因子XIII特异性抗体包被的珠和 (iv) 用四甲基若丹明包被的珠。

18. 一种检测样品中存在梅毒抗体的方法,包括:

(a) 使所述样品与 (i) 用心磷脂-卵磷脂-胆固醇抗原包被的珠,其中所述珠的制备是通过胺官能化的珠与心磷脂-卵磷脂-胆固醇抗原在pH5-8的偶联缓冲液中孵育使所述心磷脂-卵磷脂-胆固醇抗原通过离子相互作用附连至珠,和 (ii) 用苍白密螺旋体抗原包被的珠在pH5-8的包含离子或两性去污剂的试验缓冲液中混合,从而形成样品-珠混合物;

(b) 洗涤所述样品-珠混合物以去除未结合的样品;

(c) 使所述样品-珠混合物与标记的抗人免疫球蛋白抗体接触;并且

(d) 通过检测所述抗人免疫球蛋白抗体上的标记物来检测梅毒抗体的存在。

19. 如权利要求18所述的方法,所述混合物包含两性去污剂。

20. 如权利要求19所述的方法,所述两性去污剂是CHAPS、CHAPSO、IGEPAL或两性洗涤剂 Zwittergent 3-8、3-10、3-12、3-14和3-16。

21. 如权利要求18所述的方法,其中(i)的珠用聚乙烯亚胺、乙二胺或聚赖氨酸官能化。

22. 如权利要求21所述的方法,其中(i)的珠用聚乙烯亚胺官能化。

23. 如权利要求18所述的方法,还包括在步骤(c)和(d)之间洗涤以去除未结合的标记的抗人免疫球蛋白抗体。

24. 如权利要求18-23任一所述的方法,其中在没有非离子型去污剂的情况下进行步骤(c)。

25. 如权利要求18-23中任一项所述的方法,其中在离子型或两性离子型去污剂的存在下进行步骤(c)。

26. 如权利要求18-23中任一项所述的方法,其中所述标记的抗人免疫球蛋白抗体对IgG或IgM有特异性。

27. 如权利要求18-23中任一项所述的方法,其中所述标记的抗人免疫球蛋白抗体是结合人IgG和人IgM的抗体偶联物。

28. 如权利要求18-23中任一项所述的方法,其中步骤(c)包括使样品-珠混合物与IgG特异性的第一标记的抗人免疫球蛋白抗体和IgM特异性的第二标记的抗人免疫球蛋白抗体接触。

29. 如权利要求28所述的方法,其中所述第一和第二抗人免疫球蛋白抗体具有相同的标记物。

30. 如权利要求28所述的方法,其中所述第一和第二抗人免疫球蛋白抗体具有不同的标记物。

31. 如权利要求18-23中任一项所述的方法,其中苍白密螺旋体抗原是r17和r47的融合体。

32. 如权利要求18-23中任一项所述的方法,其中(i)的珠通过共价相互作用附连至苍白密螺旋体抗原。

组合密螺旋体和非密螺旋体梅毒测试

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年3月10日提交的美国临时专利申请62/131,062和2015年6月18日提交的美国临时专利申请62/181,685的优先权,其各自通过引用将其全部内容纳入本文。

背景技术

[0003] 梅毒是通过螺旋细菌苍白密螺旋体 (*Treponema pallidum*) 引起的性传播疾病。梅毒的血清学测试可被分成两类,非密螺旋体和密螺旋体测试。非密螺旋体测试检测针对从破坏的宿主细胞中释放的类脂物质的非密螺旋体抗体(反应素)。最广泛使用的非密螺旋体测试是性病研究实验室(VDRL)和快速血浆反应素(RPR)测试,其是采用基于心磷脂-卵磷脂-胆固醇的抗原的测试(通常是絮凝测试)。非密螺旋体测试具有广泛可用、廉价和方便实施的优点。这些测试的结果通常在成功治疗后恢复为阴性,因此它们可用于监测针对治疗的响应。然而,这些测试一般需要主观解释,因此它们难以解释,尤其针对弱反应性血清。非密螺旋体测试也具有有限的高体积测试和自动化的潜力。相反,密螺旋体测试检测针对苍白密螺旋体的天然或重组表面抗原,如15kDa、17kDa、和47kDa蛋白的抗体。密螺旋体测试包括苍白密螺旋体被动颗粒凝集(TP-PA)试验,荧光密螺旋体抗体吸附(FTA-ABS)测试,和大多数酶免疫测定(EIA)测试。与非密螺旋体测试相比,密螺旋体测试显示出较高的特异度和灵敏度。然而,它们不能用于监测对治疗的响应,因为密螺旋体抗体在感染后的数年内仍然存在。

[0004] 使用常规算法(患者试样由非密螺旋体测试筛选,之后进行密螺旋体测试确认)或反向算法(患者试样由密螺旋体测试筛选,之后进行非密螺旋体确认)来诊断梅毒。基本上,这两种算法均遵照阳性初始筛选和确认测试进行。

发明内容

[0005] 本文提供了检测来自怀疑具有梅毒感染的个体的样品中非密螺旋体和密螺旋体抗体的试剂盒。在一些实施方式中,该试剂盒包含(i)被类脂抗原(例如,心磷脂,卵磷脂,胆固醇,或其混合物)包被的固体支持物(例如,微颗粒,珠,或表面如芯片,微滴定板,膜,或玻璃);和(ii)被苍白密螺旋体抗原包被的固体支持物(例如,微颗粒,珠,或表面如芯片,微滴定板,膜,或玻璃)。在一些实施方式中,(i)和(ii)被包装到相同隔室中(例如,在容器或管中的相同混合物中,或包被在相同表面上,例如ELISA孔的表面上)。在一些实施方式中,(i)和(ii)被包装到分开的隔室中。在一些实施方式中,珠在包含pH缓冲剂(例如,瑞兹姆碱(Trizma)、甘氨酸,磷酸盐)和盐(例如,NaCl)的储存缓冲液中。在一些实施方式中,储存缓冲液还包含离子型或两性离子型去污剂。在一些实施方式中,试剂盒还包含试验缓冲液和/或样品稀释缓冲液。在一些实施方式中,储存缓冲液,试验缓冲液,和/或样品稀释缓冲液缺少非离子型去污剂。

[0006] 在一些实施方式中,类脂抗原是心磷脂、卵磷脂或胆固醇。在一些实施方式中,苍

白密螺旋体抗原是r15、r17、r47、其混合物,或r17和r47的融合体。

[0007] 在一些实施方式中,试剂盒还包含标记的抗免疫球蛋白(Ig)抗体,例如,抗人Ig抗体。在一些实施方式中,抗-Ig抗体对IgG(例如,人IgG)和/或IgM(例如,抗人IgM)有特异性。在一些实施方式中,标记的抗人免疫球蛋白抗体是结合人IgG和人IgM的抗体偶联物。在一些实施方式中,试剂盒包含IgG特异性的第一标记的抗人Ig抗体和IgM特异性的第二标记的抗人Ig抗体。抗人IgG抗体和抗人IgM抗体可能具有相同或不同的标记物。

[0008] 在一些实施方式中,试剂盒还包含洗涤溶液或洗涤原液(例如,浓缩或脱水)。在一些实施方式中,洗涤溶液或洗涤原液包含PBS,和任选的离子型、非离子型、或两性离子型去污剂。在一些实施方式中,洗涤溶液具有非离子型去污剂。在一些实施方式中,洗涤溶液缺少非离子型去污剂。

[0009] 在一些实施方式中,类脂抗原通过离子型相互作用与(i)的固体支持物偶联(附连)。在一些实施方式中,用聚乙烯亚胺(PEI)包被(i)的固体支持物。在一些实施方式中,苍白密螺旋体抗原通过共价相互作用与(ii)的固体支持物偶联。在一些实施方式中,(i)和(ii)的固体支持物(例如,微颗粒或珠)带不同标记,具有不同尺寸,或具有不同重量。

[0010] 在一些实施方式中,试剂盒还包含至少一种对照试剂。在一些实施方式中,对照试剂是内部对照试剂,例如,待用于与试验试剂和样品相同的反应管或容器中。在这种情况下,内部对照可例如,用不同标记物或重量与其他固体支持物区分,如下文进一步详述。在一些实施方式中,对照试剂是固体支持物,其中固体支持物偶联至结合试样特异性分析物的试剂(例如,试样验证对照,例如,血清验证珠)。因此,在一些实施方式中,试剂盒还包含(iii)用样品质量对照试剂包被的珠(例如,用与共同血清元素反应的试剂,如凝血因子(例如,FXIII),球蛋白,或白蛋白特异性抗体包被的血清验证珠(SVB))。在一些实施方式中,试剂盒还包含对照,其包含对照,其缺少试剂的固体支持物作为空白,例如,(iv)试剂空白珠(RBB)。在一些实施方式中,试剂盒还包含对照以确定信号的质量,例如,用已知标记物或标记物组合标记的固体支持物。例如,在一些实施方式中,试剂盒包含(v)信号质量对照珠(例如,具有固有荧光的内部标准珠(ISB))。在一些实施方式中,试剂盒仅包含(iii)、(iv)或(v)中之一。在一些实施方式中,试剂盒包含(iii)、(iv)和(v)。在一些实施方式中,试剂盒包含对照中的两种的任意组合(例如,(iii)和(iv),(iii)和(v),或(iv)和(v))。

[0011] 还提供了检测样品,例如,来自例如人的个体的生物学样品中存在梅毒抗体的方法。在一些实施方式中,该方法包括(a)使样品与(i)用类脂抗原(例如,心磷脂-卵磷脂-胆固醇抗原)包被的固体支持物(例如,微颗粒、珠、或表面)和(ii)用苍白密螺旋体抗原包含的固体支持物(例如,微颗粒、珠、或表面)在相同隔室中接触,从而形成样品-支持物(例如,样品-珠)混合物;(b)洗涤样品-支持物混合物以去除未结合的样品;(c)使样品-支持物混合物与标记的抗免疫球蛋白(Ig)抗体(例如,抗人Ig抗体)接触;和(d)通过检测抗Ig抗体上的标记物来检测梅毒抗体的存在。在一些实施方式中,在不包含非离子型去污剂的缓冲液中进行步骤(a)和/或步骤(c)。

[0012] 在一些实施方式中,该方法还包括在步骤(c)和(d)之间洗涤以去除未结合的抗Ig抗体。在一些实施方式中,用非离子型去污剂来进行洗涤。在一些实施方式中,在没有非离子型去污剂的情况下进行洗涤。在一些实施方式中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS),任选地和离子型、非离子型或两性离子型去污剂来进行洗涤。在一些实施方式中,非离子型去污剂用于

本文所述的试验中的洗涤缓冲液,但是其浓度低于具有亲水性(非脂质)组分的标准试验。在一些实施方式中,与具有亲水性(非脂质)组分的标准试验相比,以减少的持续时间来进行用非离子型去污剂的洗涤(例如,2-20、1-10、或2-8秒,相比于10-60、或30-90秒)。在一些实施方式中,与具有亲水性(非脂质)组分的标准试验相比,用非离子型去污剂进行较少的洗涤(例如,在试验期间2-4、2、3、或4次,相比于4、8、或5-10次)。

[0013] 在一些实施方式中,标记的抗Ig抗体是抗人Ig。在一些实施方式中,标记的抗Ig抗体对IgG和/或IgM有特异性。在一些实施方式中,标记的抗人免疫球蛋白抗体是结合人IgG和人IgM的抗体偶联物。在一些实施方式中,步骤(c)包括使样品-支持物混合物与IgG特异性的第一标记的抗人Ig抗体和IgM特异性的第二标记的抗人Ig抗体接触。可用相同或不同的标记物来标记第一和第二标记的抗体。

[0014] 在一些实施方式中,该方法还包括开出疗程,如果在步骤(d)中检测到梅毒抗体。在一些实施方式中,疗程包括用抗生素(例如,青霉素、四环素、多西环素等)治疗。

[0015] 附图简要说明

[0016] 图1显示了在自动化平台(例如,BioPlex™2200)上检测密螺旋体和非密螺旋体抗体的组合测试的示意图。

[0017] 图2显示了珠表面官能化以使得用脂质非密螺旋体抗原包被珠。

具体实施方式

[0018] A. 引言

[0019] 本文描述了用于同时检测患者样品中密螺旋体和非密螺旋体抗体的新组合测试。该试验可在自动化平台上高效进行。组合测试包括密螺旋体测试(例如,用第一标记物标记并用苍白密螺旋体重组r17和r47融合蛋白包被的珠),和非密螺旋体测试(例如,用第二标记物标记并用心磷脂-卵磷脂-胆固醇的抗原混合物包被的珠)。组合测试也可包括标记的抗人IgG和标记的抗人IgM(例如,抗-hIgG-PE和抗-hIgM-PE)以对试样中的密螺旋体和非密螺旋体抗体进行定量。

[0020] (i) 共价连接至抗原(密螺旋体)的珠和(ii)用脂质抗原(非密螺旋体)非共价包被的珠在单一试验或试剂盒中的组合不是直接的,因为通常使用不同的条件来储存和洗涤两种类型的珠。然而,使用本文公开的偶联技术和缓冲条件,组合的试剂稳定持续至少12-24个月。另外,尽管在储存溶液(其中储存固体支持物或珠)、样品稀释缓冲液、和试验溶液(其中样品与珠孵育)中缺少非离子型去污剂,试验仍然是灵敏且精确的。一般而言,非离子型去污剂用于各种溶液中以降低背景信号,但如本文所示,组合用疏水性非密螺旋体抗原包被的胺-官能化的珠和用亲水性非密螺旋体抗原包被的珠的试验以高精确性检测各种感染和治疗阶段的梅毒患者中的抗体。在一些实施方式中,非离子型去污剂用于本文所述的试验中的洗涤缓冲液,但是其浓度低于具有亲水性(非脂质)组分的标准试验。在一些实施方式中,与具有亲水性(非脂质)组分的标准试验相比,以降低的持续时间或频率来进行用非离子型去污剂的洗涤。

[0021] 组合两种类型的具有不同亲和性和复杂性的珠包括方法修饰,如从样品稀释剂中省去去污剂。两种类型的珠一般会在不同的条件下储存和使用;还没有人将两种形式,即亲水性和疏水性微环境组合在一个试验中。

[0022] 另外,本文所述的结果使用IgM-PE和IgG-PE偶联物鉴定反应素特异性IgM和IgG抗体。该方法有助于检测反应素阳性患者中存在IgM抗体。事实上,我们确定大部分抗反应素抗体是IgM同种型。现有的试验报道了没有鉴定抗体同种型的反应性/非反应性结果。IgM同种型抗体表示早期急性感染,并且IgG同种型抗体在之后变得普遍。RPR特异性IgM抗体的损失或降低可允许医生适当地监测或开出药物治疗(例如,针对更晚期的感染开出更高或更大频率剂量的抗生素)。在一些实施方式中,可通过单独监测抗-IgM-PE或抗-IgG-PE,或通过抗-Ig抗体上使用不同标记物来确定阶段。

[0023] B. 定义

[0024] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有本领域普通技术人员通常所理解的同样含义。参见例如Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (《细胞和分子生物学词典》), 埃尔斯威尔出版社 (Elsevier) (第4版2007); Sambrook等, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL (《分子克隆, 实验室手册》), 冷泉港实验室出版社 (冷泉港, 纽约1989)。

[0025] 多重试验是在单个样品中同时检测超过一种分析物的分析方法。多重试验方法和试剂描述于, 例如美国专利号6,773,578和W02008148883。

[0026] 本文所用术语“固体支持物”指固体惰性表面或物体, 其上可固定试剂, 如抗体或抗原。非限制性示例包括塑料、硝酸纤维素、膜、芯片、磁性或非磁性珠、和颗粒。本文所用术语“固定”指分子基础的偶联, 其在本文所述试验的任意步骤期间所施加的条件下都不会明显去偶联。这类固定可通过共价键、离子键、亲和型键或任意其他化学键实现。

[0027] 本文所用术语“颗粒”指任何形状或表面结构的固体或半固体主体, 通常线性尺寸为微米级(即小于100微米)。除非另有说明, 该术语与“微粒”可互换使用, 其是指微米级颗粒, 并且与“珠”可互换使用, 其是指形状是球形或近似球形的颗粒, 通常在组成上是聚合的。

[0028] 术语“容器”、“器皿”、“管”、“孔”、“隔室”等是指可容纳试剂或任何试验的容器。如果容器在试剂盒中并容纳试剂, 其一般可以是封闭或密封的。如果容器正用于试验, 其在试验步骤期间一般会是打开或可及的。

[0029] 术语“样品”和“生物样品”包括从生物体中得到的多种样品类型。该术语包括体液, 如唾液、痰液、血液、血液组分、血清、血浆、尿液和其它生物来源的液体样品、固体组织活检、组织培养物或取自培养的患者细胞的上清。在本发明的内容中, 生物样品一般是含可检测量抗体的体液, 例如, 痰液、粘液、粘膜组织活检或刮片。可在试验之前对生物样品进行加工以例如去除细胞或细胞碎片。该术语包含获得后经处理的样品, 如试剂处理、溶解、沉降或对某些组分的富集。

[0030] 本文所用术语“抗体”指由一个或多个免疫球蛋白基因编码的多肽, 或其特异性结合并识别分析物(抗原)的片段。识别的免疫球蛋白轻链被归类为 κ 或 λ 。免疫球蛋白重链分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ , 它们进而分别定义免疫球蛋白类型IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。在人中, IgG由四个称为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的亚类组成。

[0031] 免疫球蛋白G(IgG抗体)的结构单元的一个示例是四聚体。各这类四聚体由相同的两对多肽链组成, 每对包含一条“轻”链(约25kD)和一条“重”链(约50-70kD)。每条链的N末端确定约100至110个或更多个氨基酸构成的可变区, 所述可变区主要负责抗原识别。术语

“可变轻链” (VL) 和“可变重链” (VH) 分别指这些轻链和重链。

[0032] 例如, 抗体作为完整免疫球蛋白或由不同肽酶消化完整免疫球蛋白所产生的成熟表征的片段而存在。因此, 例如, 胃蛋白酶在铰链区中的二硫键连接附近消化抗体, 产生F(ab')₂, Fab的二聚体, 其本身是由二硫键连接于V_H-C_{H1}的轻链。可在温和条件下还原F(ab')₂二聚体以打断铰链区中的二硫连接, 从而将F(ab')₂二聚体转化为两个Fab'单体。Fab'单体实质上是具有部分铰链区的Fab (参见Paul编, *Fundamental Immunology* (《基础免疫学》), 第三版, 雷文出版社 (Raven Press), 纽约, 1993)。虽然根据对完整抗体的消化定义了多种抗体片段, 但是本领域技术人员应理解, 这类片段也可用化学方法或重组DNA方法从头合成。因此, 本文中术语“抗体”也包括通过全抗体修饰或用重组DNA方法从头合成所产生的抗体片段, 如单链Fv。

[0033] 抗体通常按照其靶标来表示。虽然命名有变化, 但本领域技术人员会熟悉并理解可对相同抗体应用数个名称。例如, 对IgM有特异性的抗体可被称为“抗-IgM”、“IgM抗体”、“抗-IgM抗体等。”

[0034] 本文所用术语“抗原”、“免疫原”、“抗体靶标”、“靶标分析物”和类似术语是指由抗体识别, 即可被抗体特异性结合的分子、化合物或复合物。该术语可以指可被抗体特异性识别的任意分子, 例如, 多肽、多核苷酸、糖、脂质、化学部分或其组合 (例如, 磷酸化或糖基化的多肽等)。本领域技术人员会理解该术语并不表示该分子在各种情况中是免疫原性的, 但仅仅表示其可被抗体靶向。

[0035] 抗体结合抗原上的“表位”。表位是抗原上被抗体识别并结合的局部位点。表位可包括几个氨基酸或几个氨基酸的部分, 例如, 5或6个, 或更多, 例如20个或更多氨基酸, 或这些氨基酸的部分。在一些情况中, 表位包括非蛋白质组分, 例如, 来自糖、核酸或脂质。在一些情况中, 表位是三维部分。因此, 例如, 在靶标是蛋白质的情况中, 该表位可由连续氨基酸、或来自蛋白质的不同部分的氨基酸组成, 这些部分部分通过蛋白质折叠靠近 (例如, 不连续表位)。这对于形成三维结构的其它类型的目标分子也是一样的。表位通常包含呈独特空间构象的至少3个、或更常见的是至少5个或8-10个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括, 例如X-射线晶体法和二维核磁共振。参见, 例如Epitope Mapping Protocols in *Methods in Molecular Biology* (《分子生物学方法中的表位作图方案》), 卷66, Glenn E. Morris编 (1996)。

[0036] 术语“对……有特异性”、“特异性结合”和类似术语指分子 (例如, 抗体或抗体片段) 与其靶标的结合亲和性比非靶标化合物高至少2倍, 例如至少4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、20倍、25倍、50倍或100倍中的任意情况。例如, 特异性结合给定抗体靶标的抗体通常以与非抗体靶标相比高至少2倍的亲和性结合抗体靶标。可使用标准方法来确定特异性, 例如固相ELISA免疫试验 (参见, 例如, Harlow和Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (《抗体使用实验室手册》) (1998), 描述可用于确定特异性免疫反应性的免疫试验模式和条件)。

[0037] 相对于抗体靶标 (例如, 抗原、分析物) 的术语“结合”一般表示抗体与纯群体中的大多数抗体靶标结合 (假定合适的摩尔比)。例如, 结合给定抗体靶标的抗体一般结合溶液中至少2/3的抗体靶标 (例如, 至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%中的任意情况)。本领域技术人员应理解, 取决于测定结合的

方法和/或阈值,可出现一些变化。

[0038] 术语“标记物”、“可检测标记物”、“可检测部分”和类似术语指可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其它物理手段检测的组合物。例如,可用的标签包括荧光染料(荧光团)、发光剂、高电子密度试剂、酶(例如,ELISA中常用)、生物素、地高辛、³²P和其它同位素、半抗原、以及可被检测的蛋白质(例如通过将放射性标签整合至肽中或或用于检测与肽特异性反应的抗体)。该术语包括单一标记试剂的组合,例如,提供独特可检测特征(例如,特定波长或波长组合下)的荧光团的组合。可以采用本领域已知的用于将标签偶联到需要的试剂的任何方法,例如,使用如下文献中所述的方法:Hermanson,《生物偶联技术》(Bioconjugate Techniques)1996,圣迭戈的学术出版社有限公司(Academic Press, Inc.)。

[0039] 当指代结果或信号时,术语“阳性”表示在样品中检测到分析物或物项的存在,在这种情况下,是表示梅毒感染的抗体。当指代结果或信号时,术语“阴性”表示在样品中检测到分析物或物项不存在。一般通过与至少一种对照物比较来确定阳性和阴性,所述对照物例如,样品确定为阳性或阴性对照物(例如,已知空白)所需要的阈值水平。

[0040] “对照”样品或值是指用作参比,通常是已知参比的样品,其用于与测试样品比较。例如,测试样品可取自测试条件,例如,在测试化合物存在下,并且与来自已知条件的样品比较,例如,在没有测试化合物的条件下(阴性对照物),或存在已知化合物的条件下(阳性对照物)。对照物也可代表从多个测试或结果中收集的平均值。本领域技术人员会认识到可设计对照物来评价任意数量的参数,并且会理解那些对照物在给定情况下是有价值的并且能够基于与对照值的比较来分析数据。对照物对于确定数据的显著性也具有价值。例如,如果给定的参数在对照物中是变化的,则不认为测试样品中的变化是显著的。

[0041] “校准对照物”与阳性对照物类似,在于其包含已知量的已知分析物。在多重试验的情况下,可设计校准对照物以包含已知量的多种已知分析物。可在最小截止量处设定校准对照物中分析物的量,例如,使得较高的量会被认为对于分析物是“阳性”的,而较低的量会被认为对于分析物是“阴性”的。在一些情况中,可使用多水平校准对照物,使得可更精确地确定分析物量的范围。例如,试验可包括已知低和高的量,或已知最小、中间和最大量的校准对照物。

[0042] 对照也可设计成确保样品的完整性(例如,检测已知通常以特定水平存在的给定样品类型中的组分),或信号的完整性(例如,检测以已知量添加的荧光团)。这些对照可以是内部的(在正测试的相同样品中运行),或外部的(与正测试的样品分开运行)。在一些实施方式中,本发明公开的试验包括针对样品质量的对照。样品质量对照可包括,用结合血液组分,如凝血因子、白蛋白、球蛋白或纤维蛋白原(例如,抗因子XIII,参见例如,W02013192445)的试剂包被的固体支持物。这种组分(例如,血清验证珠或SVB)确保了血清或血浆存在且具有基线质量。样品质量对照也可包括单独的试剂空白珠(RBB),或与用结合血液组分的试剂包被的固体支持物。该组分用于鉴定和/或定量样品中的非特异性结合。在一些实施方式中,本发明公开的试验包括信号质量对照,例如,单独或与样品质量对照组合。该信号质量对照可以是具有固有荧光的,或用已知量的荧光团包被的固体支持物。该组分(例如,内部标准珠或ISB)可用于检测并补偿可能在分析期间出现的检测器波动。

[0043] 术语“诊断”是指对象患有感染、病症或疾病的相对概率。类似地,术语“预后”是指

对象中可能出现特定未来结果的相对概率。例如,在本发明的内容中,预后可以指个体在未来会受到感染的可能性(例如,如果免疫则不太可能)。术语并不是绝对的,如医学诊断领域的任意技术人员所理解。

[0044] “对象”、“患者”、“个体”和类似术语可互换使用并指代,除非另外说明,哺乳动物如人和非人灵长类,以及兔、大鼠、小鼠、山羊、猪和其它哺乳动物物种。该术语并不必然表示对象已经诊断患有特定疾病,但一般指代处于医务监督下的个体。患者可以是寻求治疗、监测、调节或改进现有治疗方案等的个体。

[0045] C. 用于检测密螺旋体和非密螺旋体抗体的多重试验

[0046] 本发明所述的试验包括单一试验中检测超过一种分析物,并因此描述为多重试验。本文所述的试验包括用于在可区分的固体支持物上固定多种分析物,使得多种分析物各自可被流式细胞术鉴定和定量的组分。试验组分和考量包括固体支持物 and 如何互相区分不同类型的固体支持物(例如,标记物和其它分化参数)、特异性固定所需分析物并去除其它样品材料的组分、和用于检测和定量所需分析物的标记物。

[0047] 在这种情况下,多重试验包括疏水性组分,例如,与脂质抗原(例如,心磷脂-卵磷脂-胆固醇)偶联的固体支持物,和亲水性组分,例如,偶联至梅毒抗原(例如,r15,r17,r47,或其混合物或融合体)的固体支持物。珠通常经官能化用于附连至蛋白质(在下文中进一步详述),但是基于特异性考量以允许同时用梅毒抗原包被的珠进行处理的方式附连脂质抗原。

[0048] 1. 非密螺旋体抗原与固体支持物的偶联

[0049] 非密螺旋体抗原混合物(RPP或VDRL)

[0050] 非密螺旋体抗原混合物可以是心磷脂(从牛心纯化或合成的二磷脂酰甘油)、卵磷脂(来自鸡蛋黄、大豆或合成)、和胆固醇,其中心磷脂、卵磷脂和胆固醇的重量比分别在0.03-1mg/mL、0.01-3mg/mL、和0.1-10mg/mL的范围内。像甲醇、氯仿、苯和丙酮那样的其他有机溶剂也可用于溶解非密螺旋体(RPR或VDRL)抗原。该实施例显示使用VDRL抗原与0.3mg/mL心磷脂、2.1mg/mL卵磷脂、和9mg/mL胆固醇。

[0051] 非密螺旋体抗原/珠偶联

[0052] 为了确保在珠表面上有对于与非密螺旋体抗原混合物的离子相互作用而言足够的正电荷,偶联缓冲液的pH可以低于胺官能化的珠的pI,其通常为5-8。示例包括MES缓冲液pH 6.1,磷酸盐缓冲液pH 7.0,和MOPS缓冲液pH 7.4。

[0053] 与珠偶联的带正电荷的配体可以是胺官能分子,包括但不限于乙二胺、N,N-二乙基乙二胺、其他胺化合物、或聚阳离子聚合物诸如但不限于聚乙烯亚胺(PEI)。PEI可包括线性或支链聚乙烯亚胺,其含有仲氨基或叔氨基,分子量为1000至1,000,000道尔顿,或聚赖氨酸和其他共聚物,分子量为1000至300,000道尔顿。在一些实施方式中,聚赖氨酸为15,000至30,000道尔顿。

[0054] 2. 密螺旋体抗原与固体支持物的偶联

[0055] 密螺旋体抗原(例如,r15,r17,和r47,或其亚组合,混合物,或融合体)可通过共价结合偶联至固体支持物。在一些实施方式中,固体支持物经羧化,以允许方便地添加官能基团(例如,羧化的珠)。在一些实施方式中,羧化的支持物在添加密螺旋体抗原之前被活化并酯化。可使用水溶性碳二亚胺,如1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、1-环己

基-3-(2-吗啉基乙基) 碳二亚胺 (CMC), 或二环己基碳二亚胺 (DCC) 来实现羧基活化。可使用, 例如, NHS、NHSS 或 HOBt 来实现酯化。

[0056] 在羧基活化和酯化之后, 可向 pH 6-10 的缓冲液中活化的表面添加螺旋体抗原。示例包括 MES 缓冲液 pH 6.1, 磷酸盐缓冲液 pH 7.0, MOPS 缓冲液 pH 7.4, 和碳酸盐缓冲液 pH 9.0。

[0057] 在偶联之后, 可在含有蛋白质封闭剂如 BSA、酪蛋白、奶粉、小鼠 IgG、牛 γ 球蛋白 (BGG)、动物血清 (山羊、马、鼠) 的缓冲液中封闭固体支持物 (例如, 珠)。例如, 蛋白质封闭剂可以 0.1-10 重量/体积百分比范围的量存在。

[0058] 3. 储存缓冲液

[0059] 用非密螺旋体抗原包被的珠可在 pH 5-10, 例如, 6-8 的水性缓冲液中悬浮。非密螺旋体抗原包被的珠可与用密螺旋体抗原包被的珠一起储存, 或与之分开储存。可使用各种缓冲液, 如瑞兹姆碱、甘氨酸、和磷酸盐, 后者是最常用的。缓冲液的浓度一般在约 0.001 至 0.1M, 例如, 0.01-0.05M 的范围内。缓冲液可含有盐如氯化钠, 例如, 其范围为约 0.01 至 0.5M 或 0.05-0.2M。在一些实施方式中, 储存缓冲液还包含胆固醇。

[0060] 非离子型去污剂如吐温-20 可对非密螺旋体抗原 (例如, RPR) 包被的珠上的疏水性微环境产生有害的影响。这可导致非密螺旋体抗原不稳定性和弱的试验性能 (例如, 降低的 RPR-特异性抗体对抗原的亲合性)。

[0061] 因此, 为了储存或进行试验, 非离子型去污剂可被省去或用最小化或减轻不稳定性并使单独抗原稳定化或改善试验性能的添加剂替代。具体地, 可以约 0.1 至 1.0 重量/体积 (w/v) 百分比的量使用乙二胺四乙酸 (EDTA)。可以约 0.01 至 0.5w/v 百分比的量使用 CHAPS 或其他两性离子型去污剂如 CHAPS0、IGEPAL 和两性洗涤剂 (Zwittergent) 3-8、3-10、3-12、3-14 和 3-16。可以, 例如, 约 0.01 至 3w/v 百分比的量使用 BSA。可以, 例如, 约 0.05 至 25w/v 百分比的量使用甘油。可以, 例如, 约 0.005 至 0.1w/v 百分比的量使用叠氮化钠。

[0062] 偶联剂缓冲液还任选地包含 30-150 μ g/mL、30-100 μ g/mL、30 μ g/mL、35 μ g/mL、40 μ g/mL 或 50 μ g/mL 的浓度的胆固醇。在一些实施方式中, 该胆固醇是牛胆固醇。

[0063] 4. 试验缓冲液

[0064] 试验缓冲液 (例如, 用于用组合的珠进行抗体结合试验) 可包含缓冲剂, 如磷酸盐、MOPS、三乙醇胺 (TEA)、HEPES、TES、EPPS、或瑞兹姆碱。在一些实施方式中, 缓冲液的浓度为 10-100mM, 例如, pH 6.0-8.0。缓冲液还可包含氯化钠, 例如, 50-300mM。在一些实施方式中, 缓冲液含有蛋白质稳定剂, 如 BSA、酪蛋白、奶粉、小鼠 IgG、牛 γ 球蛋白 (BGG)、动物血清 (山羊、马、鼠)。在一些实施方式中, 蛋白质稳定剂的量的范围是终体积的 0-10%。缓冲液可含有防腐剂, 包括但不限于 ProClin 300、ProClin 900、苯甲酸钠和叠氮化钠。

[0065] 所有缓冲液可含有离子型和两性离子型去污剂, 如 CHAPS、IGEPAL、CHAPS0 和两性去污剂 3-8、3-10、3-12、3-14 和 3-16, 例如, 浓度为 0.05 至 1.0 或 0.1-0.5 体积百分比。

[0066] 5. 洗涤缓冲液

[0067] 洗涤缓冲液 (例如, 用于在各孵育步骤之后去除珠上的非反应性试剂和非特异性结合) 可包含缓冲剂, 如磷酸盐、MOPS、三乙醇胺 (TEA)、HEPES、TES、EPPS、或瑞兹姆碱。缓冲液的浓度可以是, 例如, 10-100mM, 例如, 在 pH 6.0-8.0 下。缓冲液还可包含氯化钠, 例如, 50-300mM。在一些实施方式中, 洗涤缓冲液可含有吐温-20 或非离子型去污剂, 如吐温 40、吐

温60和曲通X-100,浓度为0.05至1.0或0.1-0.5体积百分比。

[0068] 6. 对照

[0069] 对照(例如,内部对照)可用于本文所述的试验。可使用内部标准(例如,内部标准珠或ISB)来矫正由于电压尖峰或检测器温度的逐步变化或影响检测器性能的其他因素导致的信号波动。内部标准具有与试验化学独立的固有荧光。例如,可用四甲基若丹明,或不干扰或不与用于检测样品组分的标记物重叠的其他稳定标记物来衍生内部标准。

[0070] 也可使用样品对照来确定样品,例如,血清或血浆已经引入反应中并且还未被稀释。样品对照可包括用试剂包被的固体支持物,该试剂结合至样品的组分,例如,血清验证珠(SVB)。可用抗因子XIII抗体来包被血清验证支持物。可在夹心型免疫试验中测量可溶性因子XIII(β 亚基)。样品对照也可包括试剂空白对照,例如,没有用任何物质包被的固体支持物,以检测样品与固体支持物的背景结合。

[0071] 7. 固体支持物

[0072] 如上所述,本文所述的多重试验包括使用固体支持物,一般是颗粒(也称为微粒或珠)。为了通过流式细胞术进行检测,应该避免发出自发荧光的颗粒,因为这会增加背景信号,因而它们合适。通过标准乳液聚合从多种起始单体产生的颗粒一般显示出低自发荧光,而已经修饰以增加孔隙率(“大孔”颗粒)的那些颗粒显示高自发荧光。这类颗粒中的自发荧光随着尺寸和二乙烯基苯单体百分比的增加而增加。

[0073] 微粒的尺寸范围可变化而粒径范围不重要。在大多数情况中,在粒径上,微粒的聚集尺寸范围在约0.3微米至约100微米的范围内,例如,在约0.5微米至约40微米的范围内。

[0074] 本领域中通常使用磁性颗粒,并且可对于本文所述的试验更方便地进行分离和洗涤步骤。“磁性颗粒”、“磁力响应性材料”、“磁珠”等术语表示响应磁场的材料。磁力响应性材料包括顺磁性材料(例如铁、镍和钴,以及金属氧化物,如 Fe_3O_4 、 $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ 、 CoO 、 NiO 、 Mn_2O_3 、 Cr_2O_3 和 CoMnP)、铁磁性材料、亚铁磁性材料和变磁性材料。磁力响应性材料并非组成完整微粒,而是一般组成微粒的一个组分,而其余由聚合材料组成,其可以经化学衍生化以允许试验试剂(例如,抗原或抗体)连接。试验试剂的附连可以是直接的(例如,共价)或间接的(例如,通过非离子或其他亲和相互作用)。

[0075] 作为试验的一部分,施加并移去磁场的方法和仪器是本领域技术人员已知的并且在文献中报道。文献报道的示例是Forrest等,US 4,141,687;Ithakissios,US 4,115,534;Vlioger等,Aanalytical Biochemistry 205:1-7(1992);Dudley,Journal of Clinical Immunoassay 14:77-82(1991);和Smart,Journal of Clinical Immunoassay 15:246-251(1992)。

[0076] 形成微粒的聚合基质可以是与本文所述的试验相容的任意材料。该基质应该对于生物样品的组分和试验试剂是惰性的,具有最小的自发荧光,在试验中使用的样品和任何其它试剂或洗涤中是固态且不溶,并且能够将试验试剂固定于微球。合适的聚合物的示例是聚酯、聚醚、聚烯烃、聚环氧烷、聚酰胺、聚氨酯、多糖、纤维素和聚异戊二烯。许多聚合物中可使用交联来赋予微粒结构完整性和刚性。

[0077] 用于连接试验试剂(例如,抗原或抗体)的官能团可通过常规手段整合到聚合物结构中。合适的官能团的示例是胺基团、铵基团、羟基、羧酸基团和异氰酸酯基团。试验试剂一般通过例如连接基团与固相表面直接或间接共价结合。连接基团可用作增加固相表面上反

反应性基团的密度并降低空间位阻以增加试验的范围和灵敏度的手段,或者用作增加向固相表面增加特定类型的反应性基团以拓宽可与固相固定的试验试剂类型范围的手段。合适的可用连接基团的示例是聚赖氨酸、聚天冬氨酸、聚谷氨酸和聚精氨酸。

[0078] 多重试验中不同类型的微粒可通过例如尺寸、重量、光散射或吸收、反射、形状、或标记物(例如,荧光标记物)互相区分。

[0079] 在使用微粒尺寸作为分化因子(区分特性)的情况中,选择尺寸子范围的宽度和相邻子范围的平均直径之间的间隔以允许通过流式细胞术区分不同类型的微粒,这在流式细胞术的应用和说明之下对于本领域技术人员而言是明显的。一般而言,给定平均直径的子范围是平均直径的约±5%CV或更小,其中CV是变异系数并定义为颗粒直径的标准偏差除以平均颗粒直径再乘以100%。不同类型颗粒的子范围的平均直径一般由子范围之一的平均直径的至少约6%隔开,例如,子范围之一的平均直径的至少约8%或10%。

[0080] 光散射也可用于区分不同类型的微粒。侧角光散射随着颗粒尺寸、粒度、吸光度和表面粗糙度变化,而前向角光散射主要受到尺寸和折射率的影响。改变任意这些性质可能导致光散射差异,其可用作区分各组的手段。

[0081] 分化参数的另一个示例是吸光度。当向颗粒施加光时,颗粒对光的吸光度主要表示为侧向(侧角)散射光的强度变化,而前向散射光的强度相对不受影响。由此,通过观察横向散射光强度的差异来确定各种与颗粒相关的有色染料之间的吸光度差异。

[0082] 可将广泛的参数或特征用作区分参数以区分一组的颗粒和另一组的颗粒。区分参数可来自颗粒尺寸、来自颗粒组成、来自影响光散射的颗粒物理特征、来自将不同发射光谱和/或散射特征赋予颗粒的可激发荧光染料或有色染料,或者来自不同浓度的一种或多种荧光染料。

[0083] 当可区分特征是荧光染料或颜色时,可将其包被于微粒表面上,包埋在微粒内或者连接至微粒材料的分子。因此,可通过将聚合物材料与荧光染料混合,或通过使用染料浸渍微粒来制造荧光微粒。已整合有染料并因此适用于本发明的微粒是市售可得的,可购自供应商,如斯菲罗公司(Spherotech, Inc.) (美国伊利诺伊州利伯蒂维尔)和分子探针有限公司(Molecular Probes, Inc.) (美国俄勒冈州尤金)。可在例如网站 molbio.princeton.edu/facs/FCMsites.html 上找到流式细胞术产品的供应商。

[0084] 8. 可检测标记物

[0085] 本文所述的试验可具有多种标记的组分,例如,珠、二抗(例如,标记的抗Ig抗体)、信号质量和样品质量对照。标记物可以是直接或间接发射或生成可检测信号的任意物质或组分。在一些实施方式中,标记物是荧光团,其中许多在文献中报道并因此为本领域技术人员已知,并且其中许多易于购得。荧光团的文献来源包括Cardullo等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8790-8794 (1988); Dexter, J. of Chemical Physics 21: 836-850 (1953); Hochstrasser等, Biophysical Chemistry 45:133-141 (1992); Selvin, Methods in Enzymology 246:300-334 (1995); Steinberg, Ann. Rev. Biochem., 40:83-114 (1971); Stryer, Ann. Rev. Biochem., 47:819-846 (1978); Wang等, Tetrahedron Letters 31:6493-6496 (1990); 以及Wang等, Anal. Chem. 67:1197-1203 (1995)。

[0086] 以下是可用作标签的荧光团示例:

[0087] 4-乙酰胺基-4'-异硫氰酸根合芪-2,2' 二磺酸

- [0088] 吡啶
- [0089] 吡啶异硫氰酸酯
- [0090] 5-(2'-氨基乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)
- [0091] 4-氨基-N-[3-乙烯基磺酰基]苯基]萘酰亚胺-3,5二磺酸酯
- [0092] N-(4-苯胺基-1-萘基)马来酰亚胺
- [0093] 邻氨基苯甲酰胺(anthranilamide)
- [0094] BODIPY
- [0095] 亮黄(Brilliant Yellow)
- [0096] 香豆素
- [0097] 7-氨基-4-甲基香豆素(AMC,香豆素120)
- [0098] 7-氨基-4-三氟甲基香豆素(香豆素151)
- [0099] 花青染料
- [0100] 荧光桃红(cyanosine)
- [0101] 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)
- [0102] 5',5"-二溴连苯三酚-磺酞(溴邻苯三酚红)
- [0103] 7-二乙基氨基-3-(4'-异硫氰酸根合苯基)-4-甲基香豆素
- [0104] 二亚乙基三胺五乙酸
- [0105] 4,4'-二异硫氰根合二氢-芪-2,2'-二磺酸
- [0106] 4,4'-二异硫氰酸根合芪-2,2'-二磺酸
- [0107] 5-[二甲基氨基]萘-1-磺酰氯(DNS,丹酰氯)
- [0108] 4-(4'-二甲基氨基苯基偶氮)苯甲酸(DABCYL)
- [0109] 4-二甲基氨基苯基偶氮苯基-4'-异硫氰酸酯(DABITC)
- [0110] 曙红
- [0111] 曙红异硫氰酸酯
- [0112] 赤藓红B
- [0113] 赤藓红异硫氰酸酯
- [0114] 溴乙非啶(ethidium)
- [0115] 5-羧基荧光素(FAM)
- [0116] 5-(4,6-二氯三嗪-2-基)氨基荧光素(DTAF)
- [0117] 2',7'-二甲氧基-4'5'-二氯-6-羧基荧光素(JOE)
- [0118] 荧光素
- [0119] 荧光素异硫氰酸酯
- [0120] 荧胺
- [0121] IR144
- [0122] IR1446
- [0123] 孔雀石绿异硫氰酸酯
- [0124] 4-甲基伞形酮
- [0125] 邻甲酚酞
- [0126] 硝基酪氨酸

- [0127] 副品红
- [0128] 酚红
- [0129] 藻红蛋白(包括但不限于B型和R型)
- [0130] 邻苯二甲醛
- [0131] 芘
- [0132] 丁酸芘
- [0133] 琥珀酰亚胺基1-丁酸芘
- [0134] 量子点
- [0135] 活性红4(Cibacron亮红3B-A)
- [0136] 6-羧基-X-若丹明(ROX)
- [0137] 6-羧基若丹明(R6G)
- [0138] 丽丝胺若丹明B磺酰氯
- [0139] 若丹明B
- [0140] 若丹明123
- [0141] 若丹明X异硫氰酸酯
- [0142] 磺基若丹明B
- [0143] 磺基若丹明101
- [0144] 磺基若丹明101的磺酰氯衍生物(德州红)
- [0145] N,N,N',N'-四甲基-6-羧基若丹明(TAMRA)
- [0146] 四甲基若丹明
- [0147] 四甲基若丹明异硫氰酸酯(TRITC)
- [0148] 核黄素
- [0149] 玫红酸
- [0150] 镧系螯合衍生物

[0151] 用于免疫试验的优选的一组荧光团是荧光素、荧光素异硫氰酸酯、藻红蛋白、若丹明B和德州红(磺基若丹明101的磺酰氯衍生物)。本段落前列表中的任意荧光团可用于本发明所述的试验中,用于标记微粒或标记结合剂(例如,抗体或链霉亲和素)。荧光染料了通过常规共价结合,使用荧光染料上和微粒或结合剂上的合适官能团来连接。对此类基团的识别以及形成所述连接的反应对于本领域技术人员是显而易见的。可用于代替荧光团的其他标签是放射性标签和酶标签。这些方法也为本领域熟知。

[0152] D. 检测密螺旋体和非密螺旋体抗体

[0153] 一旦如上所述用密螺旋体和非密螺旋体包被固体支持物,包被的固体支持物与样品,例如,来自怀疑已接触梅毒的各自的生物学样品接触,例如,在如上所述的试验缓冲液存在下。可洗去未结合的样品。在该试验中,可使用3、4或5个洗涤步骤。添加标记的抗Ig抗体以允许检测与固体支持物结合的来自样品的抗体。在样品来自人的情况中,使用标记的抗人Ig抗体。例如,可使用抗IgG和抗IgM抗体,或同时结合IgG和IgM的抗体。

[0154] 可使用流式细胞术来检测试验组分的大小、重量、光散射、和荧光。流式细胞术方法和已知是本领域已知的。可在例如Introduction to Flow Cytometry:A Learning Guide(《流式细胞术介绍:学习指南》)(2000)美国BD公司(Becton,Dickinson,and

Company);McHugh,“Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes(用于多重可溶分析物的定量和同时检测的流式微球免疫试验)”Methods in Cell Biology42(《细胞生物学方法42》),B部分,(学术出版社(Academic Press),1994)中发现仪器和方法的说明。

[0155] 流式细胞术一般包括将悬浮液(例如,珠或微粒)以流以一次仅一个颗粒通过区域的方式通过光束和电子光学传感器。当各颗粒通过该区域时,由于颗粒的存在,光束被扰乱,检测到产生的散射光和荧光。仪器使用光信号鉴定各颗粒属于哪个亚组,连同标签的存在和量,从而可实现单独的试验结果。可在文献中找到关于流式细胞术的设备和方法的说明。示例是McHugh,“Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes(用于多个可溶性分析物的定量和同时检测的流式微球免疫试验)”,Methods in Cell Biology 42(《细胞生物学方法42》),B部分,(学术出版社(Academic Press),1994);McHugh等,“Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays Using Flow Cytometry Instrumentation(使用流式细胞术仪器的基于微球的荧光免疫试验)”,Clinical Flow Cytometry(《临床流式细胞术》),Bauer,K.D.,等编(巴尔的摩,马里兰州,美国:威廉姆斯和威廉姆斯公司(Williams and Williams),1993),第535-544页;Lindmo等,“Immunometric Assay Using Mixtures of Two Particle Types of Different Affinity(使用不同亲和性的两种颗粒混合物的免疫试验)”,J.Immunol.Meth.126:183-189(1990);McHugh,“Flow Cytometry and the Application of Microsphere-Based Fluorescence Immunoassays(流式细胞术和基于微球的荧光免疫试验的应用)”,Immunochemica 5:116(1991);Horan等,“Fluid Phase Particle Fluorescence Analysis:Rheumatoid Factor Specificity Evaluated by Laser Flow Cytometry(流相颗粒荧光分析:激光流式光度术评估的类风湿因子特异性)”,Immunoassays in the Clinical Laboratory(《临床实验室中的免疫试验》),185-189(利斯公司(Liss)1979);Wilson等,“A New Microsphere-Based Immunofluorescence Assay Using Flow Cytometry(一种新的使用流式细胞术的基于微球的免疫荧光试验)”,J.Immunol.Meth.107:225-230(1988)。

[0156] 也可用荧光成像仪(例如,Luminex Magpix®)来检测信号,例如,用于以ELISA形式运行的试验(例如,在微滴定板上)。另外,对于珠或板,可使用可寻址阵列来进行信号检测(例如,Illumina检测器或类似系统)。

[0157] E. 试剂盒

[0158] 还提供了用于检测入本文所述的密螺旋体和非密螺旋体抗体的试剂盒。在一些实施方式中,该试剂盒包含(i)与非密螺旋体抗原偶联的固体支持物(例如,珠)和(ii)与密螺旋体抗原偶联的固体支持物(例如,珠)。在一些实施方式中,(i)和(ii)的固体支持物在相同的储存隔室(例如,管或瓶)中。在一些实施方式中,(i)和(ii)的固体支持物在分开的储存隔室中。在一些实施方式中,(i)的固体支持物是PEI-官能化的。

[0159] 该试剂盒也可包括其他试剂,例如,二抗,试验缓冲液,洗涤缓冲液,和母液(例如,浓缩的缓冲液)。在一些实施方式中,二抗是标记的抗人Ig,如本文所述。在一些实施方式中,试剂盒可包括用于进行试验的耗材,如多孔板或管。

[0160] F. 实施例

[0161] 1. 实施例1

[0162] 该实施例显示组合密螺旋体和非密螺旋体测试(检测分别针对梅毒抗原和类脂抗原的抗体)与比较物在一组113个已知疾病阶段和治疗状态的临床血清样品,和285个梅毒测试有序(ordered)样品上的表现。使用如图1所示的BioPlex™2200平台测试患者样品中密螺旋体和非密螺旋体抗体的存在。

[0163] 如图1所示,用重组密螺旋体r17-r47融合蛋白(Rec Tp17/r47融合体)包被的珠和用非密螺旋体抗原心磷脂、卵磷脂、和胆固醇包被的PEI-官能化的珠在试验缓冲液(50mM MOPS、150mM NaCl、0.05%BSA、10mM EDTA、0.1%CHAPS、20%甘油、和0.095%叠氮化钠)中混合。两组分析物珠可通过不同的标记物(R17对R21,用于密螺旋体对非密螺旋体珠)区分。使用两组对照珠,用FXIII包被的血清验证珠和用四甲基若丹明衍生的内部标准珠。由于荧光染料(分类染料)的独特组合,这些是可区分的。用样品稀释缓冲液(50mM TEA,150mM NaCl,75mM MgCl₂,3%BSA,0.03%小鼠IgG,0.47%γ球蛋白,0.0015%PSMA,10IU/L抑肽酶,0.1%苯甲酸钠,0.095%叠氮化钠,0.3%ProClin,在pH 7.4下)稀释样品。添加稀释的样品,各样品潜在包含抗密螺旋体抗体(IgG抗-Syph Ab和IgM抗-Syph Ab)和抗非密螺旋体抗体(IgG抗-CrL Ab和IgM抗-CrL Ab)。在20分钟孵育之后,在含有50mM PBS和0.1%吐温-20的洗涤缓冲液中洗涤珠。这些珠然后与偶联剂(对人IgG和IgM有特异性的标记的二抗)孵育。在这种情况下,偶联剂是用PE标记的双特异性抗人IgG和抗人IgM,其在50mM磷酸钠、150mM NaCl、1%BSA、0.1%小鼠IgG、3.3IU/L抑肽酶、0.1%苯甲酸钠、0.095%叠氮化钠、和0.3%ProClin,pH7.4的溶液中。在10分钟孵育之后,在含有50mM PBS和0.1%吐温-20的洗涤缓冲液中第二次洗涤珠。

[0164] 随后,洗涤的珠在鞘液(含0.3%ProClin 300和0.095%叠氮化钠的磷酸盐缓冲盐水(PBS))中悬浮并递送至检测器。通过流式细胞术检测各珠的荧光染料特征和结合的抗体存在。与各珠相关的密螺旋体和/或非密螺旋体特异性信号与匹配的对照比较并且报告结果。将测试珠信号除以ISB信号(荧光比率)可矫正包括针对检测器稳定性和波动的对照的运行内和运行之间的信号。

[0165] 获自组合测试的结果和获自比较物的那些结果的比较列于表1和2。

[0166] 表1

[0167]

梅毒类别	治疗状态	样品数量	BioPlex梅毒组合测试				比较物测试			
			密螺旋体试验		非密螺旋体试验		密螺旋体试验		非密螺旋体试验	
			R*	NR**	R	NR	R	NR	R	NR
一期	未治疗	8	8	0	7	1	8	0	7	1
	治疗	24	21	3	20	4	21	3	17	7
二期	未治疗	17	17	0	14	3	17	0	17	0
	治疗	25	25	0	16	9	25	0	15	10
潜伏	未治疗	7	7	0	5	2	7	0	6	1
	治疗	32	31	1	21	11	31	1	21	11
总医学诊断的梅毒样品		113	109	4	83	30	109	4	83	30
梅毒阴性样品		285	1	284	3	282	1	284	0	285

注: *R是反应性, **是非反应性。

[0168] 表2

梅毒类别	样品数量	BioPlex梅毒组合测试			
		密螺旋体试验		非密螺旋体试验	
		阳性一致%	阴性一致%	阳性一致%	阴性一致%
[0169] 医学诊断的梅毒样品	113	100% (109/109)	N/A	92.7% (77/83)	N/A
梅毒测试有序样品	285	N/A	99.6% (283/284)	N/A	98.9% (282/285)

[0170] 对于医学诊断的梅毒样品,在临床诊断的未治疗和测试的一期、二期和晚期感染,和组合密螺旋体测试以及比较物测试之间观察到出色的一致。组合测试在24个治疗的一期疾病试样中的20个中,17个治疗的二期疾病试样中的14个中,25个未治疗的二期疾病试样中的16个中,和7个未治疗的晚期疾病样品中的5个中检测到非密螺旋体抗体;而比较物非密螺旋体测试在24个治疗的一期疾病中的17个中,17个治疗的二期疾病中的17个中,25个未治疗的二期疾病中的15个中,和7个未治疗的晚期疾病试样中的6个中检测到。在285个梅毒阴性样品中,284个测试为密螺旋体抗体阴性,并且282个测试为非密螺旋体抗体阴性。总之,组合测试分别显示出针对密螺旋体抗体试验的100%灵敏度和99.6%特异性,和针对非密螺旋体抗体试验的92.7%灵敏度和98.9%特异性。

[0171] 2. 实施例2

[0172] 在第二实施例中,使用228个RPR/VDRL阳性血清样品、226个梅毒测试有序血清样品和122个已知疾病阶段和治疗状态的临床血清样品来评价检测针对密螺旋体和类脂抗原的抗体(密螺旋体和非密螺旋体的IgG和IgM)的组合密螺旋体和非密螺旋体测试的性能。然后,来自组合测试的结果与Diasorin Liaison™密螺旋体试验或Fujirebio Serodia™TPPA试验和BD Macro-Vue™RPR卡测试进行头对头(head-to-head)比较(表3-5)。

[0173] 对于RPR/VDRL阳性样品组,在Liaison™密螺旋体试验和组合测试的密螺旋体组分之间观察到99.5% (211/212) 的阳性一致和100% (14/14) 的阴性一致,表3a。相反,BD Macro-Vue RPR卡测试和组合测试的非密螺旋体组分之间的比较显示99.1% (217/219) 的阳性一致和71.4% (5/7) 的阴性一致,表3b。

[0174] 表3. 使用226个RPR/VDRL阳性样品组的Liaison™密螺旋体测试和组合试验密螺旋体组分之间(3a)以及BD Macro-vue™RPR试验和组合非密螺旋体试验组分之间(3b)的头对头比较。

[0175] 表3a

		Liaison™ 密螺旋体			总
		阳性	阴性	模棱两可	
[0176]	组合试验				
	密螺旋体				
	阳性	211	0	0	211
	阴性	1	14	0	15
	模棱两可	0	0	0	0
	总	212	14	0	226

[0177] 表3b

		BD Macro-Vue™ RPR		总	
		阳性	阴性		
[0178]	组合试验	阳性	217	2	219
	非密螺旋体	阴性	2	5	7
	总	219	7	226	

[0179] 在类似的试验条件下,测试有序样品组在Liaison™密螺旋体试验和组合试验的密螺旋体组分之间显示出93.3% (28/32) 的阳性一致和97.5% (193/198) 的阴性一致,表4a。在相同群内,人工BD Macro-Vue RPR卡测试和组合试验的非密螺旋体组分之间的阳性和阴性一致分别是95% (19/20) 和99.5% (207/208),表4b。

[0180] 表4. 使用228个测试有序样品组的Liaison™密螺旋体测试和组合试验密螺旋体组分之间 (2a) 以及BD Macro-vue RPR试验和组合非密螺旋体试验组分之间 (2b) 的头对头比较。

[0181] 表4a.

		Liaison™ 密螺旋体			总	
		阳性	阴性	模棱两可		
[0182]	组合试验	阳性	28	4	0	32
	密螺旋体	阴性	0	193	1	194
	模棱两可	1	1	0	2	
	总	29	198	1	228	

[0183] 表4b

		BD Macro-Vue™ RPR		总	
		阳性	阴性		
[0184]	组合试验 非密螺旋体	阳性	19	1	20
	阴性	1	207		208
	总	219	7		226

[0185] 为了评价组合试验的临床灵敏度,测试了总共122个具有已知临床状态的样品,表5。样品来自治疗和未治疗的具有一期、二期和潜伏感染的患者。使用组合密螺旋体试验,未治疗的样品显示出97.6% (40/41) 的总体灵敏度,而治疗的样品显示出95.1% (77/81) 的灵敏度。当在Fujirebio Serodia™ TPPA试验中平行测试相同的样品组时,未治疗和治疗的组观察到精确相等的灵敏度。在其他方面,组合非密螺旋体试验显示出与治疗的组的86.4% (70/81) 相比,未治疗的组的95.1% (39/41) 的总体灵敏度。这些结果与BD Macro-Vue™卡测试相反,其显示出未治疗的组的95.1%的总体灵敏度和治疗的组的75.3%的总体灵敏度。总之,这些结果表明了组合非密螺旋体试验的较高灵敏度。

[0186] 表5. 使用122个临床表征的一期、二期和潜伏梅毒样品比较组合试验与Fujirebio Serodia™TPPA和BD Macro-Vue™ RPR卡试验。

[0187]

组	密螺旋体		非密螺旋体	
	组合试验 密螺旋体	Serodia™ TPPA	组合试验 非密螺旋体	BD Micro-Vue™ RPR
未治疗	97.6% (40/41)	97.6% (40/41)	95.1% (39/41)	95.1% (39/41)
治疗	95.1% (77/81)	95.1% (77/81)	86.4% (70/81)	75.3% (61/81)

[0188] 3. 实施例3: 珠表面官能化用于用非密螺旋体抗原包被

[0189] 图2显示了用胺配体官能化珠来允许与脂质RPR抗原混合物的离子相互作用。带正电荷的配体首先通过被动吸附或共价结合结合至羧基珠以在珠表面引入正电荷。

[0190] 脂质(由于存在磷酸基团而具有净负电荷)不可直接偶联到活化的羧化珠上。为了结合心磷脂、胆固醇、和卵磷脂(一种脂质的三聚体(trio)),我们通过共价偶联带正电基团如聚乙烯亚胺(PEI)来改变磁珠上的净电荷。具有阳离子亚氨基的珠然后与带负电的脂质孵育。相互作用产生包被珠表面的稳定抗原,如稳定性研究所评价。

[0191] 如上所述,带正电的脂质可以是胺官能分子。我们测试了非密螺旋体抗原(RPR)结合用乙二胺、聚乙烯亚胺(PEI)和聚赖氨酸包被的珠结合的能力。

[0192] 表6: 用所示组分官能化的珠的性能

[0193]

样品编号	乙二胺	聚乙烯亚胺	聚赖氨酸	RPR
SS0297856	175	514	546	RPR 阳性 (效价64)
SS0297418	289	866	902	
JV0144150	161	228	254	
JK0490505	116	576	470	
JK0489744	114	502	498	
HB70942	72	62	101	阴性
HB70946	94	62	110	
HB70953	53	49	67	
HB70958	51	57	75	
HB70964	55	57	92	

[0194] 珠用乙二胺、聚乙烯亚胺、或聚赖氨酸官能化并用RPR包被。包被的珠然后接触RPR抗体阳性样品(上5行)和抗体阴性样品(下5行)。在该试验中,聚乙烯亚胺(PEI)官能化的珠一般表现最佳,对阳性样品有较高的读出并且对阴性样品有较低的背景读出。

[0195] 提供上述实施例用于说明而非限制本发明的范围。本发明的其它变体对于本领域普通技术人员将是显而易见的并包括在所附权利要求中。通过引用将本文引用的所有发表物、数据库、网络资源、专利、专利申请和登录号全部纳入本文用于所有目的。

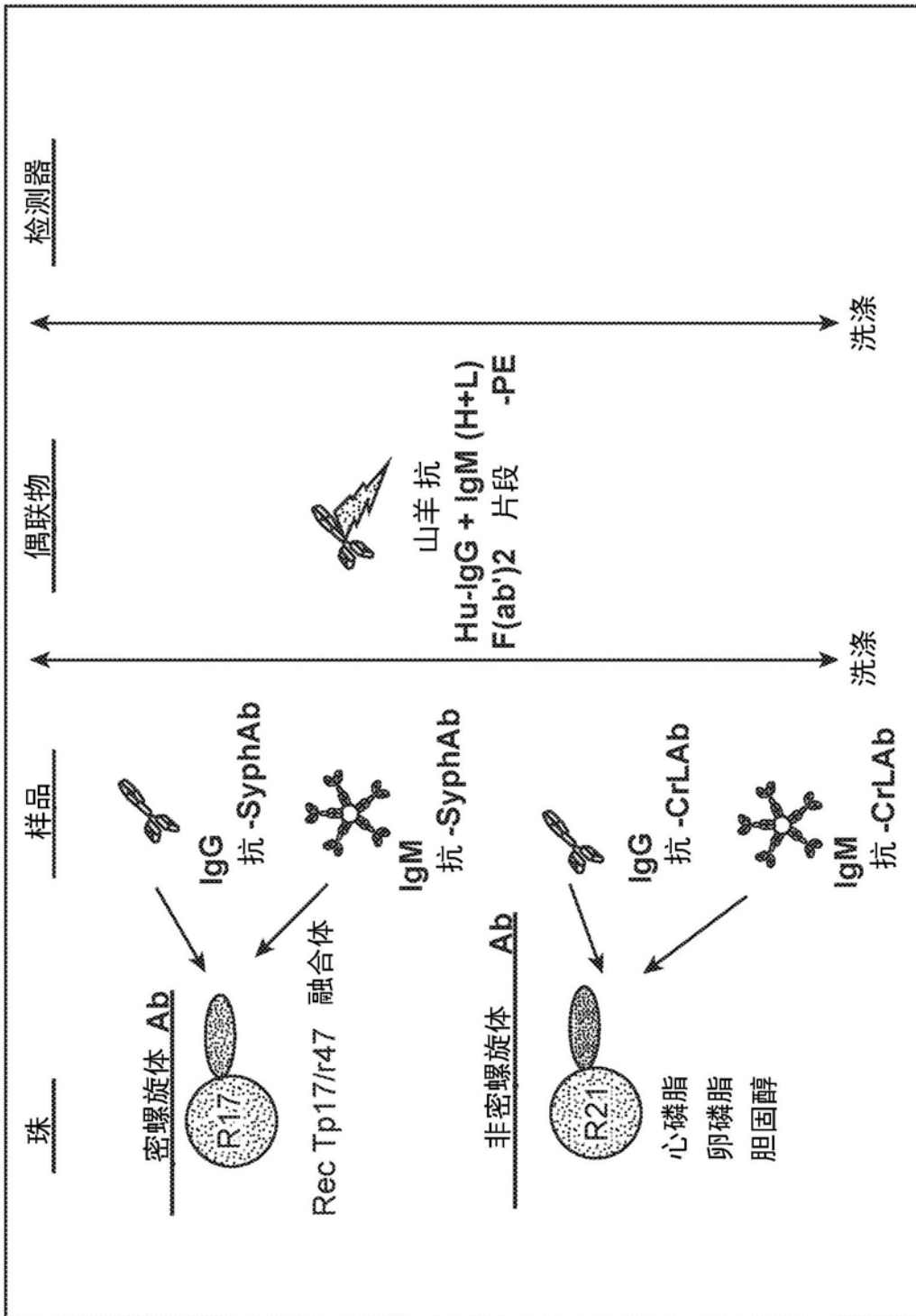


图1

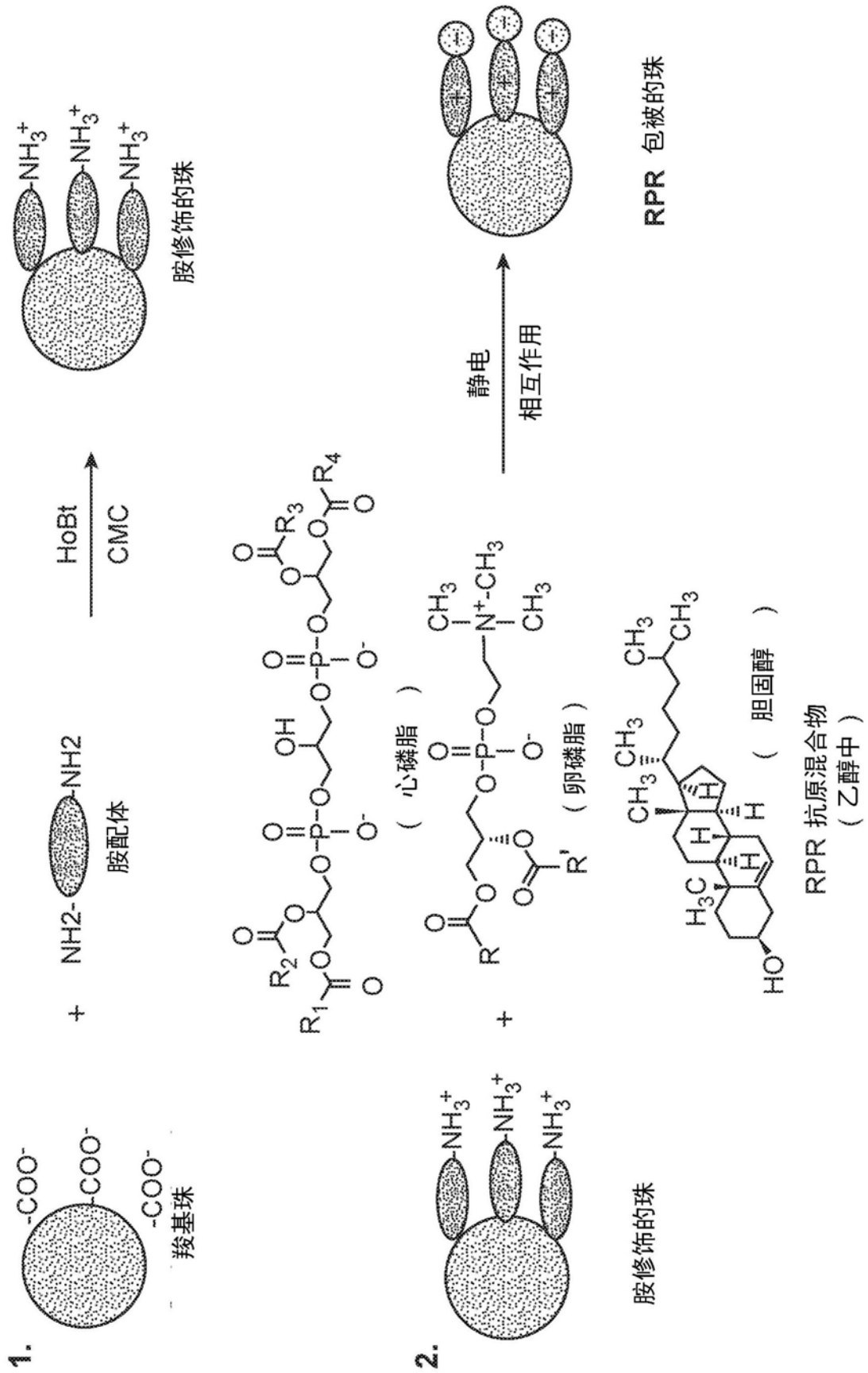


图2

专利名称(译)	组合密螺旋体和非密螺旋体梅毒测试		
公开(公告)号	CN107533060B	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN201680027067.1	申请日	2016-03-08
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	生物辐射实验室股份有限公司		
[标]发明人	R·考尔 郑伟明 R·沃克尔		
发明人	R·考尔 郑伟明 R·沃克尔		
IPC分类号	G01N33/571 G01N33/92 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54313 G01N33/571 G01N33/92 G01N2333/20 G01N2469/20 G01N33/543 G01N2405/04		
代理人(译)	陈扬扬 余颖		
优先权	62/131062 2015-03-10 US 62/181685 2015-06-18 US		
其他公开文献	CN107533060A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本文提供了用于检测指示个体中梅毒感染的存在和阶段的抗体的多重试验。感染梅毒的个体产生针对梅毒组分的抗体和与感染相关的脂质细胞碎片。本申请是这些不同抗体靶标在单一试验中的首次组合。

