



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2001135795/15, 08.06.2000

(24) Дата начала действия патента: 08.06.2000

(30) Приоритет: 09.06.1999 US 60/138,192

(43) Дата публикации заявки: 27.08.2003

(45) Опубликовано: 20.01.2005 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 4307074 A, 22.12.1981. GB 1053504 A, 17.03.1994. GOKHALE P. et al., An improved method of encapsulation of doxorubicin in liposomes: Pharmacological, toxicological and therapeutic evaluation, British journal of Cancer, 1996, v. 74, N.1, pp.43-48.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 09.01.2002

(86) Заявка РСТ:
US 00/15828 (08.06.2000)

(87) Публикация РСТ:
WO 00/75666 (14.12.2000)

Адрес для переписки:
105023, Москва, ул. Б.Семеновская, 49, оф.404,
Центр "ИННОТЭК", пат.пов. О.В.Аргасову

(72) Автор(ы):

ПОУП Виктория (US),
КАСТРО Арнолд Р. (US),
МОРРИЛЛ Уильям Э. (US)

(73) Патентообладатель(ли):

ПРАВИТЕЛЬСТВО СОЕДИНЕННЫХ ШТАТОВ
АМЕРИКИ, представляемое СЕКРЕТАРЕМ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И
СЛУЖБЫ ДЛЯ ЛЮДЕЙ (US)

(54) АНТИГЕННАЯ КОМПОЗИЦИЯ И СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ ПРИСУТСТВИЯ TREPONEMA PALLIDUM У ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается антигенной композиции и способа обнаружения антител к Treponema pallidum при диагностике сифилиса. Антигенная композиция содержит синтетический кардиолипин и синтетический лецитин

(1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин)

и может дополнительно содержать холестерин и спирт. Антигенная композиция пригодна в качестве иммунореагента в иммунологических анализах для обнаружения антител, ассоциированных с инфекцией T. pallidum. Преимущество заключается в том, что способ является чувствительным и специфичным в отношении инфекции T.pallidum. 2 н. и 21 з.п. ф-лы, 8 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2001135795/15, 08.06.2000**

(24) Effective date for property rights: **08.06.2000**

(30) Priority: **09.06.1999 US 60/138,192**

(43) Application published: **27.08.2003**

(45) Date of publication: **20.01.2005 Bull. 2**

(85) Commencement of national phase: **09.01.2002**

(86) PCT application:
US 00/15828 (08.06.2000)

(87) PCT publication:
WO 00/75666 (14.12.2000)

Mail address:
**105023, Moskva, ul. B.Semenovskaja, 49, of.404,
Tsentr"INNOTEhK", pat.pov. O.V.Argasovu**

(72) Inventor(s):

**POUP Viktorija (US),
KASTRO Arnold R. (US),
MORRILL Uil'jam Eh. (US)**

(73) Proprietor(s):

**PRAVITEL'STVO SOEDINENNYKh SHtATOV
AMERIki, predstavljajemoe SEKRETAREM
MINISTERSTVA ZDRAVOKhRANENIJa I
SLUZhBY DLJa LJudeJ (US)**

(54) **ANTIGENIC COMPOSITION AND METHOD FOR DETECTION OF PRESENCE OF TREPONEMA PALLIDUM IN HUMAN**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, infectious diseases.

SUBSTANCE: invention relates to antigenic composition and a method for detection of antibodies raised to Treponema pallidum in syphilis diagnosis. The antigenic composition comprises synthetic cardiolipin and synthetic lecithin (1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)

and can comprise additionally cholesterol and alcohol. The antigenic composition can be used as an immunoreagent in immune analysis for detection of antibodies associated with the T. pallidum infection. The proposed method shows the enhanced sensitivity and specificity with respect to the T. pallidum infection.

EFFECT: improved detecting method.

23 cl, 8 tbl, 7 ex

Данное изобретение выполнено Центром по Контролю и Предупреждению Заболеваний СДС, ведомства Правительства Соединенных Штатов.

Область данного изобретения

Изобретение относится к областям микробиологии и иммунологии, а точнее имеет отношение к композициям и способам для обнаружения, диагностирования и контроля за лечением сифилиса. Изобретение, в частности, имеет отношение к антигенным композициям синтетического кардиолипина и синтетического лецитина и их применению в иммунологических анализах.

Предпосылка данного изобретения

Сифилис является венерической болезнью (STD), вызываемой бактерией *Treponema pallidum*. Ежегодно сообщается о свыше 100000 случаях сифилиса у взрослых во всемирном масштабе. Заболевание передается также по наследству, поражая 3000 или более младенцев ежегодно. Невозможность получения лечения антибиотиками на ранних стадиях заболевания позволяет прогрессирование заболевания по всему телу, часто приводящее к необратимому поражению органов, психозу, слепоте или смерти. Распространение вируса иммунодефицита человека (HIV) (ВИЧ) по всему миру чрезвычайно усилило серьезность сифилиса как проблемы для здоровья, так как язвы половых органов, полученные во время ранних стадий сифилитической инфекции, способствуют передаче заражения ВИЧ половым путем.

Течение сифилиса было разделено на стадии: первичную, вторичную, скрытую, нейросифилис и третичную (позднюю). Инфицированный индивидуум может заражать других во время первых двух стадий. Передача происходит тогда, когда бактерии распространяются из язвы инфицированного человека на кожу или слизистые оболочки половых органов, рта или ануса сексуального партнера. Организмы *T. pallidum* могут также проникать через поврежденную кожу на других частях тела. Во время третичного сифилиса и нейросифилиса бактериальная инфекция не контагиозна, тем не менее инвазия (вторжение) микроорганизма в органы, ткани и головной мозг может иметь фатальные последствия, как например, серьезные сердечно-сосудистые нарушения или неврологическое расстройство.

Вертикальная или трансплацентарная сифилитическая инфекция может произойти в течение первых четырех лет, если беременная женщина инфицирована и не лечится. Хотя соответствующее лечение матери обычно предупреждает врожденный сифилис, сообщалось, что приблизительно 25% зародышей человека, которые были подвергнуты инфекции *T. pallidum in utero*, были мертворожденными. Некоторые младенцы с врожденным сифилисом имеют симптомы при рождении, но большинство развивают симптомы в послеродовые два-три месяца. Эти симптомы включают язвы на коже, сыпи, лихорадочные состояния, распухшие печень и селезенку, желтуху, анемию и различные пороки развития. По мере того как инфицированные младенцы развиваются, они могут развивать симптомы сифилиса поздней стадии, включая необратимое поражение костей, зубов, глаз, ушей и головного мозга.

Первым симптомом первичного сифилиса является язва или шанкр. Шанкр появляется в пределах от десяти дней до трех месяцев после экспозиции и обычно обнаруживается на той части тела, которая была незащищенной от язвы инфицированного полового партнера, как, например, половой член, наружные женские половые органы, влагалище, шейка матки, прямая кишка, язык или губа. Так как шанкр сохраняется только несколько недель и может быть безболезненным или возникать внутри тела, он может пройти незамеченным. Шанкр исчезает с лечением или без лечения. У лиц, которые не лечатся, вторичные симптомы появятся приблизительно через девять недель после проявления первичного поражения.

Вторичный сифилис часто отмечается кожной сыпью, которая характеризуется коричневыми язвами размером приблизительно с пенни. Так как активные бактерии присутствуют в этих язвах, любой физический контакт, половой или неполовой, с пораженной кожей инфицированного индивидуума может распространить инфекцию на этой стадии. Другие симптомы включают легкое лихорадочное состояние, утомление,

головную боль, ангину, гнездную плешивость и опухшие лимфатические узлы. Эти симптомы могут быть слабыми и, подобно шанкру первичного сифилиса, исчезнут с лечением или без лечения. Затем, в отсутствие лечения, инфицированный человек вступает в скрытый период.

- 5 Скрытый сифилис характеризуется отсутствием клинических признаков или патологических показателей в спинно-мозговой жидкости (CSF) вместе с положительными результатами серологических тестов. Ранний скрытый сифилис, который возникает в течение первого года заражения, является потенциально передающимся, и могут возникать рецидивы, в то время как поздний скрытый сифилис связан с иммунитетом к рецидиву и
- 10 устойчивостью к повторной инфекции.

- Во время ранних стадий заражения сифилисом бактерии могут поражать нервную систему. В отсутствие лечения, может развиваться нейросифилис. Прогрессирование заболевания в сторону нейросифилиса может продолжаться до двадцати лет и у некоторых лиц, имеющих нейросифилис, не удается обнаружить узнаваемые симптомы, что делает
- 15 диагностику очень трудной. Те лица, которые действительно обнаруживают симптомы, могут жаловаться на головную боль, кривошею или жар, которые являются результатом воспаления выстилки головного мозга. Пароксизмы и признаки инсульта, такие как окоченение, слабость или проблемы со зрением, могут также поражать больных нейросифилисом.

- 20 Хотя приблизительно две трети лиц, инфицированных *T.pallidum*, которые не смогли получить лечение, не испытывают дальнейших последствий болезни, приблизительно у одной трети лиц с нелеченным скрытым сифилисом обнаруживаются осложнения позднего, или третичного, сифилиса. Во время третичной стадии сифилиса бактерии поражают сердце, глаза, головной мозг, нервную систему, кости, суставы или почти любую другую
- 25 часть тела. Третичная стадия может длиться годами или даже десятилетиями. Поздний сифилис обычно приводит к сердечно-сосудистому заболеванию, психическому расстройству, слепоте или даже смерти.

- Из-за иногда серьезных или угрожающих жизни результатов сифилитической инфекции и риска передачи или заражения ВИЧ точный и ранний диагноз заражения является
- 30 необходимым. Сифилис, однако, иногда назывался "великим имитатором", поскольку его ранние симптомы являются похожими на симптомы многих других заболеваний. Поэтому врач обычно не полагается только на распознавание признаков и симптомов сифилиса, но основывается на результатах клинических тестов, включая микроскопическую идентификацию бактерий сифилиса и аналитические тесты на проявления заражения
- 35 сифилисом в биологических пробах.

- Диагностику сифилиса путем микроскопической идентификации бактерий выполняют обычно следующим образом. Берут соскоб с поверхности язвы или шанкра и исследуют под специальным "темнопольным" микроскопом, чтобы обнаружить микроорганизм. Микроскопия в темном поле требует значительного мастерства и склонна к неправильному
- 40 истолкованию.

- По этим причинам большинство случаев сифилиса сначала диагностируют серологически, используя нетрепонемные тесты. Нетрепонемные тесты обнаруживают вещества, как, например, антитела, которые образуются в присутствии инфекции *T.pallidum*. Доступными в настоящее время нетрепонемными анализами, наиболее часто
- 45 используемыми для обнаружения доказательства заражения сифилисом, являются тест Научно-исследовательской лаборатории по изучению венерических заболеваний (VDRL) и быстрый тест на реакины в плазме (RPR). VDRL-тест использует липиды, полученные из природных источников, чтобы обнаружить аниптилоидные антитела, которые генерируются после заражения *T.pallidum*. Эти антитела производятся против
- 50 кардиолипина *T.pallidum*-микроорганизмов иммунной системой индивидуума, инфицированного *T.pallidum*, и могут быть обнаружены в сыворотке или спинно-мозговой жидкости индивидуума.

Одним недостатком имеющихся в настоящее время нетрепонемных реакций является их

низкая специфичность. Многие медицинские состояния, включая микоплазменные инфекции, пневмонию, малярию, острые бактериальные и вирусные инфекции и аутоиммунное заболевание, могут служить причиной ложноположительных результатов тестов в существующих в настоящее время тестах на сифилис.

5 Например, применение внутривенного лекарственного средства или аутоиммунное заболевание вызывают поражение ткани, которое приводит к выделению кардиолипина и продуцированию антикардиолипиновых антител. Обнаружение этих антикардиолипиновых антител в нетрепонемном тесте может поэтому давать ложноположительный результат. Успешный диагноз является чрезвычайно проблематичным для обнаружения

10 нейросифилиса.

Вследствие наличия ложноположительных и ложноотрицательных результатов при использовании этих существующих тестов для подтверждения обычно требуется альтернативный метод анализа, такой как микроскопия или серологический тест на основе трепонемы. Обычные трепонемные тесты включают в себя флуоресцентный тест на

15 абсорбцию трепонемных антител (FTA-ABS) и тест FTA-ABS двойного окрашивания (FTA-ABS DS). Хотя тесты на основе трепонемы могут быть использованы для подтверждения позитивного результата теста, эти тесты зачастую являются дорогостоящими, сложными и длительными, и могут требовать применения крайне сложного научного оборудования и обученного научного персонала. К тому же,

20 трепонемные анализы не могут быть использованы в качестве тестов для мониторинга успеха лечения антибиотиками, поскольку, вследствие продолжающегося после лечения наличия антител к *T.pallidum*, результаты тестов остаются положительными даже после уничтожения инфекции у приблизительно 85% успешно излеченных пациентов.

Поэтому необходим единый тест для чувствительного и специфического обнаружения

25 инфекции *T.pallidum* в пробе для диагностики начальной стадии сифилиса или нейросифилиса. Также необходим простой, дешевый анализ, который мог бы применяться для мониторинга успеха лечения сифилиса.

Сущность изобретения

Обеспечены антигенная композиция и способ для обнаружения инфекции *Treponema pallidum* и, следовательно, диагностики сифилиса. Антигенная композиция содержит комбинацию или смесь синтетического кардиолипина и синтетического лецитина. Предпочтительная антигенная композиция содержит также холестерин. Предпочтительная антигенная композиция, кроме того, включает в себя спирт. Спирт солюбилизирует липиды в антигенной композиции, образуя суспензию. Антигенная композиция применима в

35 качестве реагента в тестах для обнаружения антител, связанных с заражением *T.pallidum*, в биологической пробе, в частности, в жидкости тела, в такой как сыворотка или ликвор. Предпочтительно, антигенная композиция является реагентом иммунологического анализа для обнаружения или титрования антител, ассоциированных с инфекцией *T.pallidum*.

Более предпочтительная антигенная композиция содержит очищенный, синтетический

40 кардиолипин, синтетический лецитин, природный, или несинтетический, холестерин и спирт. Оптимальная чистота синтетического кардиолипина и лецитина в композиции составляет 99% или выше. Оптимальная чистота холестерина составляет 98% или выше, или он является беззольным. Наиболее предпочтительно, антигенная композиция содержит тетрамиристоил-кардиолипин, 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин,

45 холестерин и абсолютный (100%) этанол. Предпочтительная концентрация по объему синтетического кардиолипина в композиции находится между приблизительно 0,02 и 0,04%, более предпочтительно 0,03%. Предпочтительная концентрация по объему синтетического лецитина в композиции находится между приблизительно 0,11 и 0,16%, более предпочтительно 0,14%. Предпочтительная концентрация по объему холестерина в

50 композиции составляет около 0,9% и оставшейся частью композиции является спирт.

Антигенная композиция, обеспеченная здесь, является также полезной вообще в качестве исследовательского инструмента для изучения сифилиса *in vitro*. Более конкретно, композиция является особенно полезной в тестах или диагностических наборах

для обнаружения наличия инфекции *T.pallidum*, которое является диагностическим или прогностическим в отношении появления или рецидива заболевания сифилисом.

Предпочтительный способ, представленный здесь, является иммунологическим анализом для обнаружения кардиолипидных антител в биологической пробе, как например, в сыворотке или ликворе. В соответствии с этим способом, антигенную композицию, описанную здесь, объединяют с биологической пробой на достаточное количество времени в условиях, которые способствуют связыванию антилипоидных антител в пробе с синтетическим кардиолипин-лецитиновым матриксом с образованием комплекса антиген-антитело. Этот комплекс затем обнаруживают с применением способов, хорошо известных специалистам в данной области, как, например, тесты флуккулации или микрофлуккулации, или т.п. Следовательно, задачей настоящего изобретения является обеспечение способа для обнаружения носителей инфекции *T.pallidum* и, таким образом, предупреждения распространения *T.pallidum* от одного хозяина к другому.

Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение чувствительного способа для диагностики раннего или скрытого сифилиса, или нейросифилиса.

Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение быстрого, простого и дешевого анализа для точного обнаружения *T.pallidum*.

Дальнейшей задачей настоящего изобретения является обеспечение дешево изготавливаемой антигенной композиции для воспроизводимого измерения или обнаружения *T.pallidum*.

Следующей задачей настоящего изобретения является обеспечение теста для обнаружения *T.pallidum*, который дает преимущества в стандартизации и стабильности VDRL-антигена.

Эти и другие задачи, признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными после обзора нижеследующего подробного описания его раскрытых вариантов и прилагаемой формулы изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Здесь описаны антигенная композиция и способ обнаружения *Treponema pallidum*. Антигенная композиция содержит смесь или комбинацию синтетического кардиолипина и синтетического лецитина. Кардиолипин представляет собой 1,3-бис(фосфатидил)глицерин, обладающий антигенными свойствами. Лецитин представляет собой фосфолипид. Предпочтительно, антигенная композиция содержит также несинтетический (природный) холестерин. Спирт также является компонентом предпочтительной антигенной композиции. Спирт солюбилизует липиды, образуя таким образом суспензию. Синтетические кардиолипин и лецитин имеют оптимальную чистоту 99% или выше. Холестерин имеет оптимальную чистоту 98% или выше и является беззольным. Антигенная композиция применима в качестве реагента в анализах для обнаружения антител, ассоциированных с инфекцией *T.pallidum*, в биологической пробе. Предпочтительно, антигенная композиция является реагентом иммунологического анализа для обнаружения или количественного определения антител, генерируемых в пациенте, инфицированном *T.pallidum*, реагентом, который является диагностическим или прогностическим в отношении наличия или рецидива сифилиса.

Описываемый здесь способ является реакцией для обнаружения или количественного определения антител, ассоциированных с инфекцией пациента *T.pallidum*, в биологической пробе, в частности в пробе жидкости тела, такой как сыворотка или ликвор. Способ позволяет детектировать циркулирующие антитела, ассоциированные с инфекцией *T.pallidum*, для обнаружения или мониторинга инфекции *T.pallidum*. Предпочтительный способ, обеспеченный здесь, является иммунологическим анализом. В соответствии с этим предпочтительным способом, антигенную композицию объединяют с биологической пробой на необходимый период времени в условиях, которые способствуют связыванию антилипоидных антител в пробе с кардиолипином в антигенной композиции с образованием комплексов антиген-антитело. Эти комплексы антиген-антитело затем детектируют с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной

области, таких как тест VDRL-флокуляции или микрофлокуляции, в котором результаты получают при помощи микроскопа.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Термины “a”, “an” и “the”, которые применяют здесь, обозначают “один и более” и включают в себя множественное число до тех пор, пока позволяет контекст.

Термин “антитела”, который применяют здесь, включает моноклональные антитела, поликлональные, химерные, одноцепочечные, биспецифические, обезьяньи и человеческие антитела, а также Fab-фрагменты, включая продукты библиотеки, экспрессирующей Fab иммуноглобулины.

Фразы “специфически связывается с” или “специфически иммунореактивный с”, когда они относятся к антителу, обозначают реакцию связывания, которая является определяющей присутствия представляющего интерес антигена в присутствии гетерогенной популяции пептидов, белков, липидов и прочих биологических молекул. Таким образом, при указанных условиях иммунологического анализа, указанные антиген или антигены связываются преимущественно с конкретными антителами и не связываются в значимом количестве с другими антителами, присутствующими в образце. Специфическое связывание при таких условиях требует наличия антигена, который отобран по его специфичности в отношении конкретного антитела. Разнообразные формы иммунологического анализа могут быть применены для отбора антигенов, специфически иммунореактивных с конкретным антителом. Например, твердофазный иммуноанализ ELISA применяют рутинно для отбора антигена специфически иммунореактивного с антителом. См. Harlow and Lane (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, New York, в отношении описания форм и условий иммунологического анализа, которые могут применяться для определения специфической иммунореактивности.

Термин “антиген” относится к объекту или его фрагменту, который может индуцировать иммунный ответ у млекопитающих. Термин включает иммуногены и участки, ответственные за антигенность, или антигенные детерминанты. Термин “антигенная композиция” применяемый здесь, относится к композиции, содержащей синтетический кардиолипид и синтетический лецитин. Термин “антигенная детерминанта”, применяемый здесь, относится к участку антигена, который узнается антителом.

Применяемые здесь термины “обнаружение” или “детектирование” относятся к качественному или количественному определению присутствия исследуемых биомолекул.

Под термином “изолированный” имеется в виду биологическая молекула, не содержащая по меньшей мере некоторых компонентов, с которыми она природно встречается.

АНТИГЕННЫЕ КОМПОЗИЦИИ

Композиция, обеспеченная здесь, содержит комбинацию, суспензию или физическую смесь одного или нескольких синтетических кардиолипидов и лецитинов.

Предпочтительная композиция содержит синтетический кардиолипид, синтетический лецитин и синтетический или несинтетический (природно встречающийся) холестерин. Более предпочтительная композиция содержит синтетический кардиолипид, синтетический лецитин, природный холестерин и спирт.

Предпочтительная концентрация синтетического кардиолипидина в композиции равна приблизительно 0,02-0,04% по объему, более предпочтительно 0,03% по объему. Предпочтительная концентрация синтетического лецитина в композиции находится между приблизительно 0,11 и 0,16% по объему, более предпочтительно равна 0,14% по объему. Предпочтительная концентрация природного холестерина в композиции составляет приблизительно 0,9% по объему, а оставшуюся часть композиции составляет спирт, предпочтительно этанол, более предпочтительно абсолютный (100%) этанол.

Синтетический кардиолипид может быть синтезирован из полусинтетических липидных предшественников, происходящих из растительных источников. В наиболее предпочтительном варианте кардиолипид является тетрамиристоилкардиолипином,

который коммерчески доступен из фирм, например, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

Синтетический лецитин может быть получен из сои или яйца. В предпочтительном варианте лецитин представляет собой 16:0, 18:1 лецитин, описываемый так же как 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин или 3-sn-фосфатидилхолин (sn обозначает стереоспецифически пронумерован), который также является коммерчески доступным из фирм, например, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL).

В наиболее предпочтительном варианте композиция является суспензией, содержащей приблизительно 0,03% тетрамиристоилкардиолипина, 0,11-0,16% 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина и 0,9% природного холестерина в абсолютном этаноле. Холестерин также является доступным из коммерческих источников, например, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Спирт может быть куплен у поставщиков химических препаратов, как например, Sigma Chemical Company (St.Louis, MO).

При объединении вместе со спиртом кардиолипин, лецитин и холестерин образуют липидный матрикс или мицеллу. Как описано более подробно ниже, антитела, ассоциированные с присутствием инфекции *T.pallidum* в человеке, называемые здесь антикардиолипиновыми антителами, связываются с этими липидными мицеллами и образуют комплексы антиген-антитело. Таким образом, обнаружение или количественное определение этих комплексов антиген-антитело может быть использовано для диагностирования инфекции *T.pallidum*. Хотя и не желая быть связанными следующей гипотезой, авторы все же считают, что антитела к кардиолипиновому матриксу связываются с синтетической антигенной композицией, описываемой здесь, с гораздо большей специфичностью и с более высокой авидностью, чем они связываются с природно встречающимися кардиолипином и лецитином. Таким образом, синтетическая антигенная композиция обеспечивает более эффективный, более чувствительный и более специфический способ детектирования антител, ассоциированных с сифилитической инфекцией.

Специалистам в данной области будет понятно, что один или несколько компонентов антигенной композиции могут быть помечены детектируемой меткой для облегчения прямого измерения или детектирования образования комплекса антиген-антитело.

Специалистам в данной области хорошо известны различные типы меток и способы конъюгирования этих меток с антигенной композицией.

Антигенная композиция может быть также применена в качестве лабораторного научно-исследовательского инструмента для индуцирования, выделения или очистки антикардиолипиновых антител, и указанные антитела могут быть использованы для изучения сифилиса вообще. Таким образом, антигенная композиция является полезной для таких целей, как диагностика *in vivo* и *in vitro* и лабораторные исследования.

ПОЛУЧЕНИЕ VDRL-АНТИГЕНА

VDRL-антиген может быть получен, например, путем приготовления раствора тетрамиристоилкардиолипина в этаноле при концентрации по объему в пределах от 0,02 до 0,04%, более предпочтительно 0,03%. Раствор синтетического лецитина в этаноле, имеющий концентрацию по объему приблизительно от 0,11 до 0,16%, более предпочтительно 0,14%, и раствор природного 0,9%-ного холестерина в этаноле добавляют к раствору кардиолипина. Эти компоненты добавляют в следующей последовательности: кардиолипин, лецитин, холестерин и этанол до объема. Перед тестированием антиген сольбилизируют и хранят при комнатной температуре в течение ночи.

ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИКАРДИОЛИПИНОВЫХ АНТИТЕЛ

Обеспеченный здесь способ включает в себя диагностический и прогностический способы для обнаружения и количественного определения антител, способных связываться с антигенной композицией, описанной выше. Эти способы позволяют обнаружить циркулирующие антитела к кардиолипин-лецитиновому матриксу для того, чтобы указать на наличие инфекции *T.pallidum* и таким образом диагностировать заражение, или контролировать успех антибиотиков в лечении инфекции *T.pallidum*.

В данной области известно много способов для обнаружения или измерения комплексов антитело-антиген, называемых здесь также иммунокомплексами.

Классические способы включают взаимодействие пробы, содержащей антитело, с известным избыточным количеством антигена, специфического для данного антитела, отделение связанного антигена от свободного и определение количества связанного антигена или свободного антигена. Если измеряют количество свободного антигена, то количество связанного антигена может быть вычислено вычитанием количества свободного антигена из известного исходного количества. Как описывается здесь, часто антиген является прямо или косвенно меченным репортерной группой или детектируемой меткой, чтобы помочь в определении количества комплекса антитело-антиген. Репортерная группа, или "метка" обычно представляет собой флуоресцентную или радиоактивную группу или фермент. Метку затем обнаруживают, используя хорошо известные для специалистов в этой области способы, такие как спектрофотометрия, сцинтилляционный счет или проточная цитометрия.

Альтернативно, антиген может быть конъюгирован с твердофазной гранулой или частицей, которую фильтруют, центрифугируют или удаляют из смеси другим способом, как например, магнитным удалением металлической или намагниченной частицы. Прикрепление антигена к твердофазным гранулам, например, латексным гранулам, обеспечивает новый более чувствительный и быстрый тест агглютинации на предметном стекле.

В предпочтительном варианте антиген прикрепляют к гранулам через молекулу кардиолипина. Один способ прикрепления антигена к гранулам состоит в модифицировании молекулы кардиолипина таким образом, чтобы она могла быть ковалентно связана с гранулами. Например, аминогруппа может быть присоединена к концевым метильным группам цепей жирных кислот кардиолипина. Модифицированный таким образом кардиолипид может быть присоединен к карбоксилированным или аминированным латексным гранулам.

Предпочтительный иммуноанализ для обнаружения антикардиолипиновых антител в пробе выполняют следующим образом. Пробу собирают или получают, используя способы, хорошо известные специалистам с квалификацией в этой области. Пробу, содержащую антикардиолипиновые антитела, которые должны быть обнаружены, получают из биологического источника. Пробу предпочтительно получают из биологической жидкости, такой как, но не только, цельная кровь, сыворотка крови, плазма крови, слюна, ликвор и т.п. Оптимальные диагностические результаты получают тогда, когда пробой является сыворотка или спинно-мозговая жидкость. Проба может быть отфильтрована или подвергнута другим манипуляциям перед иммуноанализом для оптимизации результатов иммунологического анализа.

Затем пробу инкубируют с антигенной композицией, описываемой здесь, для образования иммунокомплекса антитело-антиген. Комплекс антитело-антиген затем детектируют, используя способы, хорошо известные специалистам в данной области. Термин "детектирование" или "детектированные", в применении здесь, означает использование известных способов для обнаружения биологических молекул, например иммунохимических или гистологических способов. Такие способы известны в данной области, в том числе иммунологические способы, использующие моноклональные или поликлональные антитела к липидам, такие как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), "сэндвич" - анализы, проточно-цитометрические анализы, радиоиммунологические анализы или другие типы анализов с использованием антител, известные специалистам в данной области.

В предпочтительном варианте способа антикардиолипиновые антитела в пробе обнаруживают, применяя синтетическую антигенную композицию, описываемую здесь, в флокуляционном анализе. Примеры известных флокуляционных анализов включают серологический тест на определение реагинов в непрогретой сыворотке (USR), быстрый микротест на реагины в плазме с использованием 10-миллиметровых круглых карт (RPR),

серологический тест в непрогретых пробах сыворотки с использованием толуидинового красного (TRUST) и VDRL-тест на предметном стекле. Все эти тесты являются реакциями флуклюации. Специалистам в данной области будет понятно, что антикардиолипиновые антитела можно также обнаружить, применяя антигенную композицию, описываемую здесь, в реакциях агглютинации, в которых дополнительно применяют частицы носители. В более предпочтительном варианте способа синтетическую антигенную композицию используют в VDRL-реакции на предметном стекле, как описано кратко ниже и более подробно в Veneral Disease Research Laboratory (VDRL) Slide Test, Kennedy.E.J.Jr. and Creighton, E.T, 157-78 (1998) A Manual of Tests for Syphilis, 9th ed., Larsen, S.A., Pope, V., Johnson, R.E and Kennedy, E.J.Jr. (eds.), American Public Health Association, Washington, D.C., который включен здесь в виде ссылки.

VDRL-реакцию на предметном стекле выполняют следующим образом.

VDRL-забуференный солевой раствор, содержащий формальдегид, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl и дистиллированную воду, помещают в сосуд. Антигенную композицию добавляют медленно к солевому раствору при постоянной скорости во время вращения сосуда и смесь затем тщательно перемешивают, чтобы соединить содержимое и образовать суспензию. Пробу, например сыворотку, помещают внутрь парафином или керамическим материалом окольцованной лунки на предметном стекле и добавляют одну каплю суспензии антигенной композиции. Предметное стекло вращают, чтобы перемешать пробу с антигенной композицией, и затем предметное стекло исследуют микроскопически. Наличие агрегатов, слипающихся или шероховатых, указывает на образование комплекса антитело-антиген. Серийные разведения антигенной суспензии могут быть использованы для качественного измерения антител в пробе. Количественные определения могут быть сделаны посредством выполнения этого анализа со стандартными концентрациями антитела и сравнения результатов пробы с результатами, полученными со стандартами.

Как должно быть понятно, предполагается, что способы анализа включают в себя применение синтетических антигенных композиций, описанных выше, и синтетических производных антигенных композиций, описанных здесь, при условии, что эти производные сохраняют антигенную активность или демонстрируют эквивалентную антигенную активность и обладают специфичностью в отношении антикардиолипиновых антител.

НАБОР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ПРИСУТСТВИЯ *T.pallidum*

Обеспечен также набор для диагностирования, или, иначе говоря, оценки сифилитической инфекции путем обнаружения присутствия или количества антикардиолипиновых антител. Набор может быть в любой компоновке, хорошо известной специалистам в данной области, и является полезным для выполнения одного или нескольких способов, описываемых здесь для обнаружения антител к кардиолипин-лецитиновому матриксу в биологических пробах или для обнаружения или мониторинга инфекции *T.pallidum* у пациента или носителя. Данные наборы удобны по той причине, что они поставляют многие, если не все, из необходимых реактивов для проведения анализа для обнаружения сифилисных антител в биологической пробе. Реактивы могут быть заранее отмерены и содержаться в стабильной форме в сосудах или на твердой фазе, в которых или на которой анализ может быть выполнен, таким образом минимизируя число манипуляций, выполняемых человеком, проводящим анализ. Кроме того, анализ может быть выполнен одновременно со стандартом, который помещен с набором, таким как заранее определенное количество антитела, для того чтобы результаты анализа могли быть валидизированы или измерены.

Набор, предпочтительно, содержит антигенную композицию, описанную здесь, которая может быть применена для обнаружения кардиолипиновых антител, ассоциированных с инфекцией *T.pallidum*. Данный набор также, предпочтительно, содержит холестерин и может дополнительно содержать соответствующие реактивы, которые помогают в обнаружении комплексов антиген-антитело. Набор может дополнительно содержать оборудование для безопасного получения пробы, сосуд для содержащихся реактивов,

буфер для разбавления пробы или реактивов, и круглые карты, например 10-миллиметровые предметные стекла или 18-миллиметровые круглые карты, применяемые в анализах VDRL, RPR и TRUST.

Набор для анализа содержит, но не ограничивается ими, реактивы, которые должны применяться в следующих тестах: реакциях флोकюляции, таких как USR, RPR и TRUST; реакциях агглютинации и "сэндвич" или ELISA-анализах. Материалы, применяемые вместе с этими способами, включают, но не ограничиваются ими, микротитрационные планшеты, полоски, покрытые антителами, или щупы для быстрого мониторинга биологических жидкостей. Для каждого набора установлены диапазон, чувствительность, точность, достоверность, специфичность и воспроизводимость анализа. Стандартизация может быть достигнута с использованием стандартной контрольной сыворотки и титрования до конечной точки сыворотки или может быть использована панель сывороток.

В более предпочтительном варианте набор для анализа использует способ VDRL-реакции на предметном стекле и обеспечивает инструкции и антигенные композиции, описанные выше. Набор пригоден для оценки инфекции *T.pallidum* и, более конкретно, для количественного определения антител, направленных на кардиолипиды в биологических жидкостях людей, проявляющих симптомы сифилиса, или людей, которые рискуют заразиться сифилисом.

Изобретение дополнительно иллюстрировано следующими примерами, которые не должны истолковываться никаким образом как накладывающие ограничения на сферу применения данного изобретения. Наоборот, должно быть ясно понятно, что применение может иметь различные другие варианты, модификации и эквиваленты данного изобретения, которые после прочтения этого описания могут предложить сами специалисты в данной области, не отступая от идеи данного изобретения и/или объема прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕР 1

Приготовление композиции синтетического кардиолипина и синтетического лецитина.

Тетрамиристоилкардиолипид, очищенный хроматографией на силикагеле почти до 99% чистоты, получали в форме порошка из Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Конечную концентрацию натриевой соли испытывали на чистоту тонкослойной хроматографией и высокоэффективной жидкостной хроматографией. Пробу хранили при -20° С. Тетрамиристоилкардиолипид был первоначально синтезирован из полусинтетических липидных предшественников, растительного происхождения.

Порошок лецитина (1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицерофосфохолина), очищенный хроматографией на силикагеле до приблизительно 99% чистоты, был также получен из Avanti Polar Lipids. Лецитин был первоначально выделен из соевых бобов.

Готовили 1,2%-ный раствор холестерина (Avanti Polar Lipids) в абсолютном этаноле и фильтровали с использованием промытой спиртом фильтровальной бумаги #560. Холестерин первоначально получали из шерстного жира (жиропота) и очищали перекристаллизацией и кристаллы хранили при -20° С.

Антигенную композицию готовили комбинированием синтетического кардиолипина с синтетическим лецитином, раствором холестерина и этанолом в этом порядке. Конечная концентрация синтетического кардиолипина была 0,02-0,03% по объему. Конечная концентрация синтетического лецитина была 0,11-0,16% по объему. Конечная концентрация холестерина была 0,9% по объему и оставшейся частью антигенной композиции был этанол.

ПРИМЕР 2

Сравнительный анализ VDRL-реакции на предметном стекле с синтетическими антигенами в сравнении с традиционной VDRL-реакцией на стекле

Сравнивали чувствительность VDRL-реакции на предметном стекле, использующей композицию, синтетических кардиолипина и лецитина, описанную в примере 1, с чувствительностью традиционной VDRL-реакции на стекле, описанной в Manual of tests for Syphilis, 9th ed., 159-77, Larsen, S.A., Pope, V., Johnson, R.E. and Kennedy, E.J.Jr. (Eds.),

American Public Health Association, Washington, D.C. Кратко, 0,4 мл VDRL-забуференного солевого раствора (формальдегид, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl и дистиллированная вода) наносили на дно круглой 30-миллилитровой склянки со стеклянной притертой пробкой с плоской внутренней поверхностью дна или в 25-миллилитровую колбу Эрленмейера с притертой стеклянной пробкой. Затем 0,5 мл суспензии антигенной композиции добавляли непосредственно к солевому раствору со скоростью 0,5 мл антигенной суспензии за 6 секунд, непрерывно вращая склянку. Вращение продолжали в течение 10 секунд до тех пор, пока не было добавлено 4,1 мл солевого буфера. Склянку плотно закрывали и встряхивали, начиная от дна к верху, приблизительно тридцать раз в течение 10 секунд.

Антигенную суспензию использовали в пределах восьми часов.

Качественные реакции выполняли помещением 50 мкл сыворотки внутрь парафином или керамикой окольцованной лунки на предметном стекле, используя безопасное устройство для пипетирования. Антигенную суспензию осторожно ресуспендировали и добавляли одну свободнопадающую каплю (17 мкл). Предметное стекло помещали на механический вращатель и вращали 4 минуты при 180 ± 2 об/мин. Предметное стекло немедленно вынимали и изучали под микроскопом, применяя 10X-окуляры и 10X-объектив. Результаты описывали следующим образом: реакционноспособные - средние или большие агрегаты, слабо или минимально реакционноспособные - маленькие агрегаты, нереакционноспособные - без агрегатов или очень легкая шероховатость. Количественные реакции проводили подобным образом с серийными двукратными разведениями сыворотки.

Результаты, изложенные ниже в Таблице 1, показали, что данная реакция, использующая синтетическую антигенную композицию, была более чувствительной, чем реакция, использующая стандартный VDRL-антиген, который изготовлен с использованием природных кардиолипина и лецитина.

Таблица 1 Сравнение чувствительности VDRL-реакции с природными антигенами с VDRL-реакцией с синтетическими антигенами			
Чувствительность			
Реакция	Первичный	Вторичный	Скрытый
Природный VDRL-антиген	80%	100%	85%
Синтетический VDRL-антиген	84%	100%	88%

Сравнивали также чувствительности VDRL-реакции на предметном стекле, использующей антигенную композицию синтетических кардиолипина и лецитина, описанную в примере 1, и традиционной VDRL-реакции на стекле с традиционной RPR-реакцией на стекле. Как показано в таблицах 2 и 3 ниже, тест с использованием синтетической антигенной композиции VDRL был более реакционноспособным с пробами, которые тестировались положительно в RPR-реакции, чем тест с использованием не синтетического VDRL-антигена.

Таблица 2 RPR в сравнении с синтетическим VDRL		
Синтетический VDRL		
RPR	Реакционноспособные	Нереакционноспособные
Реакционноспособные*	41	13
Нереакционноспособные*	1	5
AL=L>* Все RPR-реактивности были минимально реакционноспособными		

Таблица 3 RPR в сравнении с природным VDRL		
Природный VDRL		
RPR	Реакционноспособные	Нереакционноспособные
Реакционноспособные*	13	41
Нереакционноспособные*	0	6
AL=L>* Все RPR-реактивности были минимально реакционноспособными		

ПРИМЕР 3

Сравнительный анализ синтетического VDRL-антигена и природного VDRL-антигена (качественный тест)

Пробы из 100 замороженных хранящихся наборов сывороток, реакционноспособных в нетрепонемном (RPR) тесте, применяли для сравнения синтетического VDRL-антигена CDC и контрольного VDRL-антигена (природного VDRL-антигена). Пробы сыворотки инаktivировали нагреванием в течение 30 минут при 56° С. Пятьдесят микролитров каждой пробы сыворотки помещали в соответствующую парафином или керамикой окольцованную лунку на предметном стекле. Каплю (17 мкл) каждого антигена помещали в соответствующие лунки предметного стекла. Предметные стекла помещали в механический вращатель и вращали в течение 4 минут при 180 об/мин и затем прочитывали микроскопически. Наблюдали и регистрировали степень флоккуляции двух антигенов.

Как описано в Таблице 4 (незадокументированно), все сыворотки (100%), реакционноспособные согласно RPR, были реакционноспособными с синтетическим VDRL-антигеном CDC, в то время как только 88% были реакционноспособными с природным VDRL-антигеном.

Дополнительно, в том же самом тесте сравнивали синтетический VDRL-антиген и природный VDRL-антиген, применяя 100 проб из задокументированных случаев сифилиса. Результаты этого теста также показаны в таблице 4 (задокументированно). Все результаты из этих тестов были подтверждены посредством SERODIA-реакции на агглютинацию частиц *Treponema pallidum* (TP-PA) (Fujirebio America, Inc., Fairfield, NJ).

Таблица 4				
		Число проб сывороток, реакционноспособных с,		
Категории сифилиса	Число проб сывороток	Синтетическим VDRL-антигеном	Природным VDRL-антигеном	TP-PA
Незадокументированный	100	100	88	99
Задокументированный				
без лечения Первичный	9	9	9	8
Вторичный	20	20	20	20
Латентный	6	5	5	6
С лечением Первичный	15	12	11	13
Вторичный	30	30	30	30
Латентный	20	18	17	19
Всего	200	194	180	195

ПРИМЕР 4

Сравнительный анализ синтетического VDRL-антигена и природного VDRL-антигена (количественный тест)

Пробы сыворотки из 100 замороженных, хранящихся сывороток, реакционноспособных по нетрепонемной (RPR) реакции, использовали для сравнения синтетического VDRL-антигена CDC и контрольного VDRL-антигена (природного VDRL-антигена). Пробы сыворотки разводили в два раза в тест-пробирке 0,9% солевым раствором. Пятьдесят микролитров каждого из пробирочных разведений переносили в соответствующие керамическим материалом или парафином окольцованные лунки на предметном стекле. Каплю (17 мкл) каждого из антигенов помещали в соответствующие лунки на предметном стекле. Предметные стекла помещали в механический вращатель и вращали 4 минуты при 180 об/мин. Титр конечной точки титрования каждого из разведений сыворотки прочитывали микроскопически. Одно различие из двойных разведений определяли как конечную точку, либо (R) для одного антигена, либо (N) для другого антигена.

Как видно из таблицы 5 (незадокументированно), эта реакция показала, что 85% замороженных, хранящихся сывороток, реакционноспособных в RPR-реакции, имели конечные титры на половину или одно разведение выше с синтетическим VDRL-антигеном CDC, чем с природным VDRL-антигеном. В 15% случаев конечный титр, полученный с синтетическим VDRL-антигеном CDC, был равен таковому, полученному с природным

VDRL-антигеном. Ни в одной из тестируемых проб титр конечной точки не был выше с природным антигеном, чем с синтетическим антигеном CDC.

Эту реакцию повторяли, используя 100 проб из задокументированных случаев сифилиса. Как видно из таблицы 5 (задокументированные), 84% сывороток из задокументированных случаев сифилиса имели титры конечной точки на половину или одно разведение выше с синтетическим VDRL-антигеном CDC. В 7% случаев титр конечной точки, полученной с синтетическим VDRL-антигеном CDC, был равен титру, полученному с природным VDRL-антигеном, в то время как в 3% случаев титр конечной точки природного VDRL-антигена был на половину или на одно разведение выше, чем титр таковой с синтетическим VDRL-антигеном CDC. Результаты этих реакций подтверждены TP-PA-реакцией.

Таблица 5				
Категория Сифилиса	Число проб	Синтетический VDRL-антиген CDC выше	Природный VDRL-антиген выше	Синтетический CDC и природный VDRL-антигены, равные по конечным точкам
Незадокументированный	100	85	0	0
Документированный				
Без лечения первичный	9	3	2	4
вторичный	20	20	0	0
латентный	6	4	0	1
С лечением первичный	15	10	0	2
вторичный	30	30	0	0
латентный	20	17	1	0
Итого	200	169	3	7

ПРИМЕР 5

Сравнительный анализ синтетического VDRL-антигена и природного VDRL-антигена (качественный тест) у пациентов, имеющих иные, чем сифилис, заболевания

Пробы из 100 пациентов, имеющих другие заболевания, чем сифилис, анализировали качественно с использованием процедуры примера 3. Эти тесты были подтверждены TP-PA-реакцией и FTA-ABS-реакцией. Результаты этих реакций сообщаются в Таблице 6, которая показывает, что все препараты были нереакционноспособными как с синтетическим VDRL-антигеном CDC, так и с природным VDRL-антигеном. Четыре препарата были реакционноспособными в TP-PA-реакции, но нереактивными в FTA-ABS-реакции.

Таблица 6									
Число проб сыворотки реакционноспособных и нереакционноспособных									
Категория пробы	Число образцов	Синтетический VDRL-антиген CDC		VDRL-антиген Бектона-Диккинсона		TR-R A		RTA-AB S	
		R	N	R	N	R	N	R	N
Ревматическая атака	27	0	27	0	27	4	23	0	27
Ишемическая болезнь сердца, поражение артерии	9	0	9	0	9	0	9	ND	
Гипертензия	6	0	6	0	6	0	6	ND	
Диабет	4	0	4	0	4	0	4	ND	
Болезнь Паркинсона	2	0	2	0	2	0	2	ND	
Ожирение	2	0	2	0	2	0	2	ND	
Стенокардия	2	0	2	0	2	0	2	ND	
Смешанная категория	48	0	48	0	48	0	48	ND	
Общее число	100	0	100	0	100	4	96		
R=реакционноспособные; N=нереакционноспособные									

ПРИМЕР 6

Сравнительный анализ синтетического VDRL-антигена и природного VDRL-антигена (качественный тест) в биологических ложноположительных пробах

Пробы получали из 50 человек, которые исходно классифицировались как биологически (бактериологически) ложноположительные (BFP). Эти люди имели положительный

результат в нетрепонемном тесте и отрицательный результат в трепонемном тесте. Эти пробы анализировали с использованием процедуры примера 3. Результаты этого теста показаны в Таблице 7. Четыре пробы сыворотки, которые исходно были ошибочно классифицированы как BFP, были признаны реакционноспособными с синтетическим VDRL-антигеном CDC, TP-PA- и FTA-ABS-реакциями. Три из этих четырех проб были также реакционноспособными с природным VDRL-антигеном.

Таблица 7			
Реактивность пробы	TP-PA	Синтетический VDRL-антиген CDC	Природный VDRL-антиген
Реакционноспособные	4	28	27
Нереакционноспособные	46	22	23
R=реакционноспособные; N=нереакционноспособные			

ПРИМЕР 7

Сравнительный анализ синтетического VDRL-антигена и природного VDRL-антигена (качественный тест) в неизвестных пробах

495 проб из неидентифицированных пациентов проанализировали с синтетическим VDRL-антигеном CDC и природным VDRL-антигеном с использованием процедуры вышеуказанного примера 3. Реактивные пробы подтверждали TP-PA-реакцией, ELISA-анализом для IgG антител сифилиса или FTA-ABS-реакцией. 38 из этих проб были реакционноспособными в одной из трепонемных реакций и 457 были нереакционноспособными. Как можно видеть из Таблицы 8, все пробы, которые были реакционноспособными по отношению к трепонеме, были реакционноспособными с синтетическим VDRL-антигеном CDC, и 36 проб были реакционноспособными с природным VDRL-антигеном. Из 457 сывороточных проб, которые были нереакционноспособными по отношению к трепонеме, 452 пробы были нереакционноспособными с синтетическим VDRL-антигеном CDC и 450 проб были нереакционноспособными с природным VDRL-антигеном.

Таблица 8					
	Число тестов	Синтетический VDRL-антиген CDC		Природный VDRL-антиген	
		R	N	R	N
Реакционноспособные	38	38	0	36	2
Нереакционноспособные	457	5	452	7	450
R=реакционноспособные; N=нереакционноспособные					

Формула изобретения

1. Антигенная композиция для обнаружения присутствия *Treponema pallidum*, содержащая синтетический кардиолипид и 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит холестерин.

3. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что концентрация холестерина в композиции составляет приблизительно 0,9%.

4. Композиция по п.2, отличающаяся тем, что она дополнительно содержит спирт.

5. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что концентрация кардиолипина в композиции составляет приблизительно 0,02-0,04%.

6. Композиция по п.5, отличающаяся тем, что концентрация кардиолипина в композиции составляет приблизительно 0,03%.

7. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что концентрация 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина составляет приблизительно 0,11-0,16%.

8. Композиция по п.7, отличающаяся тем, что концентрация 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина составляет приблизительно 0,14%.

9. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что кардиолипид является

тетрамиристоилкардиолипином.

10. Композиция по п.4, отличающаяся тем, что спирт является этанолом.

11. Антигенная композиция по п.10, отличающаяся тем, что в ней, содержащей синтетический кардиолипид, 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, холестерин и этанол, концентрация кардиолипидов составляет приблизительно 0,02-0,04%, концентрация 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина составляет приблизительно 0,11-0,16%, а концентрация холестерина приблизительно 0,9%.

12. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что она содержит приблизительно 0,02-0,04% тетрамиристоилкардиолипидов, приблизительно 0,11-0,16% 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина и приблизительно 0,9% холестерина и этанол до полного объема.

13. Композиция по п.11, отличающаяся тем, что она содержит приблизительно 0,03% тетрамиристоилкардиолипидов, приблизительно 0,11-0,16% 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина и приблизительно 0,9% природного холестерина в абсолютном этаноле до полного объема.

14. Способ обнаружения присутствия *Treponema pallidum* у человека, включающий в себя объединение биологической пробы от человека с композицией, содержащей синтетический кардиолипид и 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, и обнаружение иммунного комплекса, образованного между антителом в биологической пробе и композицией.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что композиция дополнительно содержит холестерин и спирт.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что концентрация холестерина в композиции составляет приблизительно 0,9%.

17. Способ по п.15, отличающийся тем, что спирт является этанолом.

18. Способ по п.14, отличающийся тем, что концентрация кардиолипидов в композиции составляет приблизительно 0,02-0,04%.

19. Способ по п.14, отличающийся тем, что концентрация 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина в композиции составляет приблизительно 0,11-0,16%.

20. Способ по п.14, отличающийся тем, что кардиолипид в композиции является тетрамиристоилкардиолипином.

21. Способ по п.14, отличающийся тем, что обнаружение иммунного комплекса используется для диагноза сифилиса у человека.

22. Способ по п.14, отличающийся тем, что иммунный комплекс обнаруживают с использованием реакции флуккуляции или реакции агглютинации.

23. Способ по п.14, отличающийся тем, что он предусматривает

(a) получение биологической пробы от человека;

(b) объединение биологической пробы с композицией, содержащей приблизительно 0,02-0,04% тетрамиристоилкардиолипидов, приблизительно 0,11-0,16% 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина, приблизительно 0,9% холестерина и этанол до полного объема и

(c) обнаружение иммунного комплекса, образованного между антителом в биологической пробе и композицией.