



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104126124 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 29

(21) 申请号 201380010278. 0

(22) 申请日 2013. 02. 18

(30) 优先权数据

12156192. 2 2012. 02. 20 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 08. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/053150 2013. 02. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/124229 EN 2013. 08. 29

(71) 申请人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

申请人 阿姆斯特丹大学学术医学中心

(72) 发明人 U·克劳斯 B·希普

V·P·格鲁纳特 B·乌普迈尔

U·洛帕汀 A·德涅特 H·里辛克

H·扎伊捷尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

G01N 33/576 (2006. 01)

G01N 33/68 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书14页

序列表6页 附图5页

(54) 发明名称

用于慢性 HBV 患者的反应预测和疗法监测的
HBV 免疫复合物

(57) 摘要

本发明涉及用于将患有乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感的方法, 所述方法包括步骤:a) 确定所述受试者的样品中 HBV 免疫复合物的量, b) 将步骤 a) 中获得的 HBV 免疫复合物的量与参考值比较, 和 c) 基于步骤 b) 中比较的结果, 将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感。本发明进一步涉及确定来自患有 HBV 感染的受试者的样品中 HBV 免疫复合物的量的用途和 HBV 免疫复合物的检测剂用于将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感用途。另外, 本发明涉及可将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感的装置和试剂盒。

1. 一种用于将患有乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感的方法,所述方法包括步骤:

- a) 确定所述受试者的样品中 HBV 免疫复合物的量,
- b) 将步骤 a) 中获得的 HBV 免疫复合物的量与参考量比较,并且
- c) 基于步骤 b) 中比较的结果,将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感,其中受试者的 HBV e 抗原状态是未知的。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述 HBV 感染是慢性 HBV 感染。

3. 根据权利要求 1 至 2 中任一项所述的方法,其中干扰素治疗包括用 PEG- 干扰素和病毒 DNA 聚合酶抑制剂治疗。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述 PEG- 干扰素治疗是 **PEGasys®** 和所述病毒 DNA 聚合酶抑制剂是 **Adefovir®**。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法,其中 HBV 免疫复合物包含乙型肝炎可溶性抗原 (HBsAg) 和抗 HBsAg IgG。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的方法,其中增加的 HBV 免疫复合物的量表示受试者对干扰素治疗敏感,减少的 HBV 免疫复合物的量表示受试者对干扰素治疗不敏感。

7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的方法,其中样品是血清样品。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的方法,其中用抗免疫球蛋白抗体检测 HBV 免疫复合物的量。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法,其中 i) HBV 免疫复合物包含抗 HBsAg IgG、抗 HBeAg IgG 或抗 HBcAg IgG,其中 ii) 用抗 (聚集的人 IgG) IgM 检测 HBV 免疫复合物的量。

10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的方法,其中用酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 确定 HBV 免疫复合物的量。

11. 来自患有 HBV 感染的受试者的样品中 HBV 免疫复合物的量或用于这种样品中的 HBV 免疫复合物的检测剂用于将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感的用途。

12. 一种用于将患有乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感的装置,包括用于确定 HBV 免疫复合物的量的分析单元,和用于将所述量与参考量比较以及用于将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感的评价装置。

13. 一种试剂盒,其包含实施本发明方法的说明书、用于确定 HBV 免疫复合物的量的检测剂,和优选地允许将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对标准干扰素治疗敏感的参考量的标准。

14. 根据权利要求 11 所述的用途,根据权利要求 12 所述的装置,或根据权利要求 13 所述的试剂盒,其中受试者的 HBV e 抗原状态是未知的。

用于慢性 HBV 患者的反应预测和疗法监测的 HBV 免疫复合物

[0001] 本发明涉及诊断学领域。特别地,它涉及用于将患有乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感的方法,所述方法包括步骤:a) 确定所述受试者的样品中 HBV 免疫复合物的量,b) 将步骤 a) 中获得的 HBV 免疫复合物的量与参考值比较,和 c) 基于步骤 b) 中比较的结果,将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感。本发明进一步涉及确定来自患有 HBV 感染的受试者的样品中 HBV 免疫复合物的量的用途和 HBV 免疫复合物的检测剂的用途,用于将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感。另外,本发明涉及允许将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感的装置和试剂盒。

[0002] 乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (HBV) 引起的肝脏传染性炎症性疾病。该病毒因暴露于体液而传播,通过输血、透析、毒品成瘾者共用针头和围产期感染传播是主要的传播模式。

[0003] 急性乙型肝炎病毒感染以肝脏炎症、呕吐和黄疸为特征。症状一般持续几周并且随后逐渐改善,同时免疫系统清除感染。完全康复和建立保护性免疫的概率随年龄而增加:尽管仅 5% 成人将患有持续多于数周的持续性感染,即慢性 HBV 感染,但是对于幼儿,这种比率升至 70%、并且对于围产期感染的新生儿,升至 95%。

[0004] 慢性 HBV 与形成肝硬化和肝癌的严重风险相关,这是为何 HBV 已经由 WHO 国际癌症研究机构 (WHO's International Agency for the Research on Cancer, IARC) 划归为 I 类致癌原,即对人致癌的病原体。因此对患者而言接受治疗允许患者的免疫系统清除感染的治疗是极为重要的。常见治疗方案包括抑制病毒 DNA 聚合酶的核苷或核苷酸类似物,连同干扰素 α 。一项重要改进是将 PEG 化干扰素 (例如 **Pegasys®**) 引入疗法,从而提供延长的干扰素半寿期。关于 HBV 感染的流行病学和治疗的综述,见 J. L. Dienstag *N Engl J Med* 2008, 359 ;1486-1500。

[0005] 慢性 HBV 感染的血清学是复杂的,因为在一方面,抗 HBV 高滴度与疾病的严重性直接相关,但在另一方面,发现抗 HBV e 抗原抗体在自发性血清转换 (即从血清清除 HBV e 抗原) 多年前即存在于患者中 (Maruyama 等人, (1993), *J. Clin. Invest.* 91, 2586-2595)。尽管治疗改进,但仍仅一部分患者将经过治疗清除感染,而其他患者将不清除。第二组患者 (非反应个体) 的成员常常可以在更激进的治疗方案 (例如剂量增加、治疗延长或额外用药) 下清除感染。因此将需要能够预测患者对标准干扰素治疗的反应,目的在于从一开始就可以调整治疗。在最近的改进中,发现在 12 周治疗后确定患者样品中 HBV 可溶性抗原 (HBsAg) 的变化允许利用临界值预测疗法成效。然而,临界值仅对还存在 HBV e 抗原 (HBeAg) 阳性的患者有效,所致患者主要是亚太地区患者中的病例。在例如欧洲主要为 HBeAg 阴性的患者中,临界值非常难以限定,使用在疗法启动和第 12 周之间至少 10% 的下降作为临时替代物。

[0006] 最近,据报道在 HBeAg 阳性患者中,在疗法启动之前高含量的包含 HBsAg 和抗 HBsAg-IgG 的 HBV 复合物与对标准干扰素疗法的良好反应相关。然而,这不允许预测 HBeAg 阴性患者。总之,目前没有这样的方法,所述方法将允许在治疗启动之前对全部患者组预测

疗法成效,无论他们的 HBeAg 状态如何。

[0007] 因此,作为本发明基础的技术问题可以视为提供用于符合前述需要的手段和方法。这个技术问题通过权利要求中及下文表征的实施方案解决。

[0008] 因此,本发明涉及一种用于将患有乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感的方法,所述方法包括步骤:

[0009] a) 确定所述受试者的样品中 HBV 免疫复合物的量,

[0010] b) 将步骤 a) 中获得的 HBV 免疫复合物的量与参考值比较;并且

[0011] c) 基于步骤 b) 中比较的结果,将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感。

[0012] 本发明的方法优选地是一种体外方法。另外,它可以包括除上文明确提到的那些之外的步骤。例如,其他步骤可以例如涉及预处理步骤 a) 的样品或评价由该方法获得的结果。另外,可以使用内部对照,如样品质量对照或性能对照。该方法可以手工地实施或由自动化辅助。优选地,步骤 (a) 至 (c) 可以总体上或部分地由自动化辅助,例如由用于确定步骤 (a) 中 HBV 免疫复合物的合适机器人设备和感知设备辅助。

[0013] 如本文所用,术语“鉴定”意指将受试者划入对干扰素治疗敏感的受试者组(所谓“反应个体”),或划入对干扰素治疗不敏感的受试者组(所谓“非反应个体”)。如本领域技术人员将理解,前述鉴定通常不旨在对于待分析的受试者达到 100% 正确。然而,本术语要求评估将对统计显著部分的待分析的受试者有效。本领域技术人员可容易地使用各种熟知的统计评价工具(例如,置信区间确定、p-值测定、Student 氏 t-检验、Mann-Whitney 检验等)确定某个部分是否为统计显著。详见 Dowdy 和 Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley&Sons, New York 1983。优选的置信区间是至少 90%、至少 95%、至少 97%、至少 98% 或至少 99%。p-值优选地是 0.1、0.05、0.01、0.005 或 0.0001。优选地,本发明构思的概率允许这种区分将对给定族群或群体的至少 60%、至少 70%、至少 80% 或至少 90% 受试者是正确的。

[0014] 优选地,根据本发明方法的鉴定可以在不知晓受试者的 HBV e 抗原状态的情况下实现,即这种鉴定导致将受试者正确划分至对干扰素治疗敏感的受试者组或对干扰素治疗不敏感的受试者组,无论所研究受试者的 HBeAg 状态如何。因而,该方法可以适用于血清样品中具有可检测量的 HBeAg 的受试者以及适用于血清样品中没有可检测量的 HBeAg 的受试者。

[0015] 术语“乙型肝炎病毒 (HBV)”指来自嗜肝 DNA 病毒科的作为乙型肝炎的致病因子的病毒物种。HBV 病毒粒子由外膜(也称作脂质包膜)、二十面体核衣壳和 DNA 基因组组成。HBV 在本领域中熟知并已得到表征。

[0016] 术语“乙型肝炎病毒感染”或“HBV 感染”指 HBV 在受试者中的可检测存在。优选地,通过在来自受试者的样品中检测出至少一种病毒多肽诊断 HBV 存在,更优选地,检测至少一种病毒抗原 HBs (HBsAg, Genbank 登录号 AAL66340.1 GI:18252577, SEQ ID NO:1), HBc (HBcAg, Genbank 登录号 CAA51257.1 GI:288930, SEQ ID NO:2) 和 HBe (HBeAg, Genbank 登录号 AAM96930.1 GI:22530876, SEQ ID NO:3)。技术人员理解,将 HBV 多肽作为生物标记提及,不作为具体多肽提及,并且术语 HBV 涵盖可能包含前述 HBV 多肽的序列变体的各种 HBV 毒株。因此,具有以 GenBank 登录号保藏的具体序列的前述多肽应理解为代表生物

标记的示例性序列。根据本发明还涵盖变体多肽,所述变体多肽因至少一个氨基酸添加、置换和/或缺失而与具体序列的多肽不同,只要它们也合适作为如上文讨论的 HBV 感染的生物标记。优选地,变体多肽与具体多肽同一至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99%。如本文所用,术语“同一”指以如下为特征的序列同一性:确定两个核酸序列或氨基酸序列之间相同氨基酸的数目,其中比对所述序列以获得最高等级的匹配。可以使用在计算机程序中代码化的公开技术或方法如,例如 BLASTP、BLASTN 或 FASTA (Altschul 1990, J Mol Biol 215, 403) 来计算。在一个方面,在整个氨基酸序列范围内计算同一性百分数值。对于技术人员,一系列基于多种算法的程序可用于比较不同的序列。在这种情况下中,Needleman 和 Wunsch 算法或 Smith 和 Waterman 算法产生特别可靠的结果。为实施序列比对,可以使用程序 PileUp (Higgins 1989, CABIOS 5, 151) 或程序 Gap 和 BestFit (Needleman 1970, J Mol Biol 48 ;443 ;Smith 1981, Adv Appl Math 2, 482),所述程序是 GCG 软件包 (Genetics Computer Group 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) 的部分。在本发明的另一个方面,使用程序 GAP,在整个序列区域范围内采用以下设置确定上文以百分数 (%) 提及的序列同一性值:空位权重:50,长度权重:3,平均匹配:10.000 和平均错配:0.000,除非另外说明,否则应当总是使用所述设置作为序列比对的标准设置。

[0017] 还优选地,通过在来自受试者的样品中检出至少一种病毒多核苷酸、优选地病毒 DNA,检测 HBV 的存在。病毒多核苷酸或整个 HBV 基因组的核苷酸序列是本领域熟知的。优选地,HBV 核苷酸序列以 GenBank 登录号 NC_003977.1 保藏。技术人员理解,将 HBV 多核苷酸作为生物标记提及,不作为具体多核苷酸提及,并且术语 HBV 涵盖包含变异核苷酸序列的各种 HBV 毒株。因此,具有以 GenBank 登录号保藏的具体序列的前述多核苷酸应理解为代表生物标记的示例性序列。根据本发明还涵盖变体多核苷酸,所述变体多核苷酸因至少一个核苷酸添加、置换和/或缺失而不同于具有具体序列的变体多核苷酸,只要它们也合适作为如上文讨论的 HBV 感染的生物标记。优选地,变体多核苷酸与具体多核苷酸同一至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99%。同一性可以如本文中他处对氨基酸序列所述那样计算。

[0018] 优选地,本文中提及的 HBV 感染是慢性 HBV 感染,其中所述慢性 HBV 感染优选地以 HBV 在受试者中可检测地存在多于 4 周、多于 5 周、多于 6 周、多于 7 周、多于 8 周、多于 9 周、多于 10 周、多于 11 周或多于 12 周为特征。更优选地,本文中提及的慢性 HBV 感染符合疾病预防控制中心 (CDC) 公开的定义,根据所述定义,慢性 HBV 感染以如下实验室标准为特征:乙型肝炎核心抗原的 IgM 抗体 (IgM 抗 HBc) 阴性并且以下检验之一为阳性结果:乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg) 或乙型肝炎病毒 (HBV) DNA,或者间隔至少 6 个月 HBsAg 阳性或 HBV DNA 阳性 2 次 (间隔 6 个月进行的这些检验的任何组合都是可接受的)。

[0019] 术语“干扰素治疗”和“标准治疗”优选地指用干扰素和优选地病毒 DNA 聚合酶抑制剂治疗 HBV 感染。然而,本发明还构思干扰素治疗优选地是用干扰素单一治疗并且标准治疗优选地是用病毒 DNA 聚合酶抑制剂单一治疗。优选地,如这个情境下提到的干扰素是与聚乙二醇共价结合的干扰素 (PEG-干扰素),更优选地,干扰素是干扰素 2 α ,最优选地,干扰素是与聚乙二醇共价结合的干扰素 2 α (PEG-干扰素 2 α ,市售为 **PEGasys®**)。优选地,病毒 DNA 聚合酶抑制剂是核苷酸或核苷类似物,更优选地是 {[2-(6-氨基-9H-嘌呤

呤-9-基)乙氧基]甲基}磷酸(例如**adefovir®**)。因而,标准或干扰素治疗优选地是用干扰素 2 α 和核苷酸类似物治疗。更优选地,标准或干扰素治疗是用 PEG-干扰素 2 α 和核苷酸类似物治疗,并且甚至更优选地标准干扰素治疗是用 PEG-干扰素 2 α (例如**PEGasys®**)和**adefovir®**治疗持续少于 1 年。最优选地,标准干扰素治疗是根据以下治疗计划用 PEG-干扰素 2 α (例如**PEGasys®**)和**adefovir®**治疗:通常,通过皮下施用(每周皮下注射)实施**PEGasys®**治疗持续 48 周时间,而将病毒 DNA 聚合酶抑制剂(核苷/核苷酸类似物)经口服施用更长时间,即在 80%患者中持续超过 1 年。关于详细内容,还见 J. L. Dienstag N Engl J Med 2008, 359;1486-1500。

[0020] 术语“对干扰素治疗敏感”意指与成功治疗的机率相比,可以成功地治疗受试者或可以至少以显著增加的可能性成功地治疗受试者。可以通过如本文提到的干扰素治疗成功治疗的受试者也称作反应个体。如果将 HBV 感染、与之相关的至少一种症状或与之相伴的至少一种并发症改善到显著程度和/或治愈,则如本文提到的治疗是成功的。优选地,成功的治疗还伴随在如本文以上所述来自受试者的样品中可检测的 HBV 多肽和/或 HBV 多核苷酸减少。更优选地,成功的治疗特征如下:在治疗最多 1 年、最多 50 周、最多 49 周或最多 48 周后来自受试者的样品中不存在可检测量的 HBsAg 和/或 HBeAg,如治疗启动后 60 至 80 周、优选地 65 至 75 周,或最优选地 72 周所测定。

[0021] 不能通过干扰素治疗成功治疗的受试者也称作非反应个体。在这类受试者中,不出现 HBV 感染、与之相关的至少一种症状或至少一个并发症的改善或治愈。优选地,这种非反应个体受试者患有严重形式的慢性肝炎 B 病毒感染,其中在干扰素治疗之前和之后可检出 HBsAg,但是不可检出 HBeAg,或其中在标准干扰素治疗之前和之后可检出 HBsAg 和 HBeAg。应当考虑被鉴定为对干扰素治疗不敏感的受试者施用改良治疗措施,例如增加干扰素和/或聚合酶抑制剂的剂量和/或延长治疗和/或额外用药。

[0022] 如本文所用,术语“HBV 免疫复合物”指在至少一种 HBV 多肽和如下文所述的针对所述至少一种 HBV 多肽的至少一种免疫球蛋白(即抗 HBV 免疫球蛋白)之间形成的复合物。优选地,该复合物在至少一种 HBV 多肽和多于 1 种,多于 2 种、多于 3 种、多于 4 种、多于 5 种、多于 10 种、多于 20 种、多于 50 种或多于 100 种针对所述至少一种 HBV 多肽的抗 HBV 免疫球蛋白分子之间形成。优选地,HBV 多肽选自与上文相关的一系列 HBV 抗原,更优选地,HBV 多肽是 HBsAg。抗 HBV 免疫球蛋白优选地是在受试者的至少一种体液、优选地血液或血清中存在的可溶性免疫球蛋白。优选地,抗 HBV 免疫球蛋白是 IgG,更优选地是血清 IgG。最优选地,包含于 HBV 免疫复合物中的抗 HBV 免疫球蛋白是针对 HBsAg 的 IgG,即抗 HBsAg IgG。应当理解 HBV 免疫复合物可以包含在本说明书中明确详述之外的其他分子,然而,优选本发明的抗 HBV 免疫球蛋白和 HBV 多肽形成主要部分的 HBV 免疫复合物。因此,抗 HBV 免疫球蛋白和 HBV 多肽优选地构成 HBV 免疫复合物质量的至少 25%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%或至少 75%。更优选地,HBV 免疫复合物基本上由抗 HBV 免疫球蛋白和 HBV 多肽组成,即抗 HBV 免疫球蛋白和 HBV 多肽构成 HBV 免疫复合物质量的至少 80%、至少 90%或至少 95%。甚至更优选地,HBsAg 和抗 HBsAg IgG 构成主要部分的 HBV 免疫复合物。最优选地,HBV 免疫复合物基本上由 HBsAg 和抗 HBsAg IgG 组成。

[0023] 技术人员理解术语“免疫球蛋白”或“Ig”。它们指免疫球蛋白家族的成员分子,特征在于它们是由响应于与外来抗原接触的个体的免疫系统产生的可溶性多肽。优选地,免疫球蛋白是来自哺乳动物的免疫球蛋白,并且更优选地,免疫球蛋白是人免疫球蛋白。还优选地,免疫球蛋白选自 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM。更优选地,免疫球蛋白是 IgG,最优选地是人 IgG。人 IgG 以大约 150kDa 的分子质量和由两条约 50kDa 的相同重链和两条约 25kDa 的相同轻链组成的结构为特征。这两条重链经由二硫键彼此连接并与轻链连接以形成常见的 Y 形分子。优选地,IgG 是糖基化的,更优选地 IgG 通过 N-糖基化过程糖基化。优选地,IgG 属于亚组 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 之一。

[0024] 术语“抗免疫球蛋白抗体”优选地涉及来自抗体的蛋白家族中的可溶性分子,所述抗体识别免疫球蛋白,优选地识别人免疫球蛋白,即本发明的抗免疫球蛋白抗体优选地是抗人免疫球蛋白抗体,更优选地识别人 IgG,即抗人 IgG 抗体。本发明的抗免疫球蛋白抗体优选地是具有低到中等亲和力 (affinity) 的抗体和具有高亲合力 (avidity) 的抗体,如下文详述。抗体对表位的亲和力定义为在所述抗体上的抗原识别位点和该表位之间全部非共价相互作用的强度。具有高亲和力的抗体通过许多和 / 或强烈非共价相互作用与抗原牢固结合,并且因此保持与抗原结合持续相对长的时间段。在另一方面,具有低亲和力的抗体抗体以少和 / 或弱的非共价相互作用与抗原进行相互作用,并且因此与抗原快速解离。本领域技术人员已知的抗体的亲和力可以由它的解离常数 (K_d) 描述。优选地, 10^{-10} mol/l 至 10^{-9} mol/l 的解离常数表示极高亲和力, 10^{-8} mol/l 的解离常数表示高亲和力, 10^{-7} mol/l 的解离常数表示低亲和力,并且 10^{-6} mol/l 及更高的解离常数表示很低的亲和力。因而,抗免疫球蛋白抗体的解离常数优选地是 10^{-6} mol/l 至 10^{-8} mol/l,更优选地,解离常数是 10^{-7} 至 10^{-8} mol/l。在包含多于一个结合位点的分子 (例如抗体) 中,第一结合位点的相互作用增加其他结合位点相互作用的概率。技术人员将包含多于一个结合位点的分子和待结合的分子之间这类多重相互作用的强度称作亲合力。高亲合力因此可以补偿单个结合位点的相对低的亲和力。因而,抗免疫球蛋白抗体,优选地,具有多于 2 个抗原识别位点,更优选地多于 4 个抗原识别位点。最优选地,抗免疫球蛋白抗体具有 10 个或更多个抗原识别位点。优选地,抗免疫球蛋白抗体是 IgG、IgD、IgE,更优选地抗免疫球蛋白抗体是包含多于 2 个抗原识别位点的抗体,例如 IgA,最优选地,抗免疫球蛋白抗体是在一个分子中包含多于 4 个抗原识别位点的抗体,例如 IgM。抗免疫球蛋白抗体是多克隆或单克隆的,并且在在适用于抗体生产的哺乳动物中或哺乳动物细胞中产生。优选地,抗免疫球蛋白抗体与本发明免疫球蛋白的表位特异性结合。更优选地,抗免疫球蛋白抗体是抗人免疫球蛋白抗体,即与本发明的人免疫球蛋白结合,甚至更优选地,该结合是对人免疫球蛋白特异的。最优选地,抗免疫球蛋白抗体是抗人 IgG 抗体,即与人 IgG 特异性结合。然而,本发明还构思,抗免疫球蛋白抗体与由免疫球蛋白与 HBV 免疫复合物中的 HBV 多肽结合所形成的新表位 (neoepitope) 特异性结合。怎样产生抗体的方法是本领域熟知的并且例如包括,根据已知的方案免疫活动物或在细胞培养系统中产生单克隆抗体或多克隆抗体 (Sambrook 等人,1989,1989, Molecular Cloning:A Laboratory Manual)。优选地,抗免疫球蛋白抗体在小鼠、大鼠、兔、猪、牛、驴、山羊、绵羊等中或在卵中产生。然而,本发明还考虑在转基因植物中产生抗免疫球蛋白抗体。优选地,抗免疫球蛋白抗体是 IgM,最优选地是单克隆 IgM。更优选地,抗免疫球蛋白抗体是抗 (聚集的人 IgG) IgM,即对人 IgG 具有如本文以上所述的低亲和力和高亲合力

的 IgM, 例如, 如 WO 2008/135274 中所述 <h-agg. IgG>IgM, 最优选地, 抗人免疫球蛋白抗体是 MAb<h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM(DSM ACC2873)、MAb<h-Agg. -IgG>M-1.010.2-IgM 和 MAb<h-Agg. -IgG>M-1.1.7-IgM(表 1 中显示), MAb<h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM(DSM ACC2873) 是最优选的。

[0025] 优选地, 抗免疫球蛋白抗体携带标签。如本文所用的术语“标签”指能够产生可检测信号的任何物质。优选地, 标签是色原体、荧光、化学发光或电化学发光化合物、催化剂、酶、酶底物、染料、胶态金属或非金属粒子或有机聚合物颗粒等。

[0026] 如本文所用, 术语“受试者”指哺乳动物, 并且优选地指人。受试者优选地患有 HBV 感染。更优选地, 受试者患有慢性 HBV 感染。另外, 受试者优选地具有未知的 HBV e 抗原状态。

[0027] 术语“样品”指体液样品, 指来自组织或器官的样品, 或指从外体表或内体表获得的洗液/淋洗(wash/rinse)液样品。样品优选地包含多肽, 更优选地是 HBV 抗原, 最优选地是 HBsAg。本发明的方法涵盖血、血浆、血清、尿、唾液或泪液的样品。这类样品可以通过使用刷、(棉)药签、刮铲(spatula)、淋洗液/洗液、钻取活组织检查装置、用针和外科器械穿刺腔体(cavity)获得。然而, 作为本发明的样品, 还包括通过熟知技术获得的样品, 所述样品优选地包括来自泌尿生殖道、肛周区、肛管、口腔、上呼吸消化道和皮肤的刮擦、药签或活组织检查样品。无细胞流体可以通过分离技术如过滤或离心从体液或组织或器官获得。优选地, 样品从已知在被 HBV 感染的受试者中包含 HBV 多肽的体液(即, 优选地, 血、血清、唾液等)获得。应当理解可以进一步加工样品以实施本发明的方法。特别地, 可能通过本领域已知的方法和工具从获得的样品移除细胞。另外, 可通过本领域已知的方法和工具从获得的样品提取和/或纯化 HBV 免疫复合物。因而, 术语样品还可以指从如上文提到的任何样品纯化和/或提取的 HBV 免疫复合物。

[0028] 术语“确定”指对样品中存在的 HBV 免疫复合物的量定量, 即测量所述 HBV 免疫复合物的量或浓度, 优选地半定量或定量地测量。可以直接或间接地进行测量。确定免疫复合物的量可以按照技术人员已知的多种方式, 例如凝胶过滤层析, 随后蛋白质印迹法、免疫共沉淀法等完成。优选地, 通过在下文实施例中描述的方法确定 HBV 免疫复合物的量。有利地, 发现在实施例中使用的夹心-ELISA 允许可靠地对 HBV 免疫复合物定量。另外, 发现使用聚集的抗体, 例如聚集的 IgG, 作为抗人 Ig 抗体, 导致高度改善的信噪比。

[0029] 根据本发明, 可以通过用于确定样品中多肽或肽的量的全部已知手段实现确定 HBV 免疫复合物的量, 只要其适用于特异性检测本发明的 HBV 免疫复合物。优选地, 将使用与 HBV 免疫复合物特异性结合、从而可对其进行检测的检测剂。检测剂优选地涵盖与所述复合物特异性结合的抗体或其片段、与所述复合物特异性结合的适配体(apptamer)、抗运载蛋白(Anticalin)或设计的锚蛋白重复序列蛋白(DARPin)。优选地, 适用双特异性免疫测定法, 即如下测定法, 其中信号的存在或强度将取决于包含于 HBV 免疫复合物中的两种分子(即 HBV 多肽和抗 HBV 免疫球蛋白)的存在。所述工具包括可以按各种夹心、竞争或其他分析模式利用标记分子的免疫测定法装置和方法。所述测定法将形成指示 HBV 免疫复合物存在或不存在的信号。另外, 信号强度可以优选地直接或间接地相关于(例如反比于)样品中存在的 HBV 免疫复合物的量。所述方法优选地包括生物传感器、与免疫测定法偶联的光学装置、生物芯片、分析装置如质谱仪、NMR 分析仪或色谱装置。另外, 方法包括基于微量平

板 ELISA 的方法、全自动化或机器人免疫测定法（例如在多参数生物芯片平台或 Elecsys™ 分析仪上可用）、CBA（酶促结合测定法，例如在 Roche-Hitachi™ 分析仪上可用）和乳胶凝集测定法（例如在 Roche-Hitachi™ 分析仪上可用）。

[0030] 如本文所用的术语“量”涵盖本文中提及的 HBV 免疫复合物的绝对量、本文中提及的 HBV 免疫复合物的相对量或浓度，以及与之相关的任何值或参数。这些值或参数包括通过测量从本文中提及的 HBV 免疫复合物获得的来自所有特定物理或化学特性的强度信号值，例如，响应于本文中提及的多肽从生物读出系统确定的表达水平，或从特异性结合的配体获得的强度信号。应当理解也可以通过所有标准数学操作获得与前述量或参数相关的值。

[0031] 如本文所用的“比较”涵盖将待分析样品所包含的本文提及的 HBV 免疫复合物的量与本说明书中他处所述的合适参比样品中的所述 HBV 免疫复合物的量比较。还涵盖将样品中 HBV 免疫复合物的量与 HBV 抗原、优选地 HBsAg 的量的比率与合适的参考比率比较。应当理解如本文所用的比较，指比较相应的参数或值，例如，将如本文提到的 HBV 免疫复合物绝对量与所述 HBV 免疫复合物的绝对参比量比较；将如本文提到的 HBV 免疫复合物的浓度与所述 HBV 免疫复合物的参比浓度比较；将测试样品中从如本文提到的 HBV 免疫复合物获得的强度信号与参比样品中所述 HBV 免疫复合物的相同类型的强度信号比较；或将 HBV 免疫复合物的量对如本文提到的 HBV 抗原的量的比率与相应的参考比率比较。在本发明的方法中提及的比较可以人工地或在计算机辅助下实施。对于计算机辅助比较，测定的量或比率的值可以与对应于由计算机程序在数据库中存储的合适参比的值比较。该计算机程序还可以借助专家系统评价该比较的结果。因此，本文中提及的鉴定的结果可以按合适的输出格式自动提供。

[0032] 如本文所用，术语“参考值”指 HBV 免疫复合物的量，所述量允许评估样品所来源的受试者应对干扰素治疗敏感或干扰素治疗不敏感。合适的参考值可以从待分析的参比样品连同样品一起（即同时或相继）确定。

[0033] 原则上，可以基于给定的 HBV 免疫复合物的平均值或均值 (average or mean)，通过采用标准统计学方法，对如本文所述的受试者组或群组计算参考量。具体而言，一种检验法旨在诊断某事件存在与否的方法的准确度由其接受者操作特征 (ROC) 最佳描述（特别见 Zweig 1993, Clin. Chem. 39:561-577）。ROC 曲线是因在观察到的整个数据范围内连续变动决策阈值所产生的全部灵敏度与特异性成对值的曲线。诊断方法的临床表现取决于其准确度，即其将受试者正确划至某种预后或诊断的能力。通过在适于进行区分的完整阈值区间将灵敏度对 1-特异性作图，ROC 曲线指示两种分布之间的重叠。在 y-轴上是灵敏度或真阳性部分，其定义为真阳性试验结果数对真阳性数和假阴性试验结果数的乘积的比率。在疾病或病症存在的情况下，这又称作阳性 (positivity)。它完全从患病的亚组计算。在 x-轴上是假阳性部分或 1-特异性，其定义为假阳性试验结果数对真阴性数和假阳性结果数的乘积的比率。它是特异性的指标并且完全从未患病的亚组计算。因为完全通过使用来自两个不同亚组的试验结果分别计算真阳性分数和假阳性分数，所以 ROC 曲线与群组中事件的患病率无关。ROC 曲线上的每个点表示与特定决策阈值相对应的灵敏度 /-特异性配对物。完美区分（结果的两个分布中无重叠）的检验具有穿过左上角的 ROC 曲线，其中真阳性分数是 1.0 或 100%（完美灵敏度），假阳性分数是 0（完美特异性）。无区分（两个组的

结果的相同分布)的检验的理论曲线是从左下角至右上角的45°对角线。大部分曲线落在这两种极端情况之间。如果ROC曲线完全落在45°对角线以下,则通过将“阳性”标准从“大于”逆转至“小于”或相反操作容易地纠正这种情况。定性地,曲线越靠近左上角,则检验的总准确度越高。取决于所需的置信区间,可以从ROC曲线导出阈值,所述阈值允许以灵敏度和特异性的适宜平衡分别诊断或预测给定事件。因此,可以优选地通过如上文所述那样建立所述群组的ROC并从中导出阈值量,产生针对本发明方法所用的参考。取决于诊断方法的所需灵敏度和特异性,ROC曲线允许导出合适的阈值。

[0034] 优选地,如本文所用的参考量从治疗之前的受试者样品获得,但是对所述样品,已知它们的供体是否响应治疗。该参考量水平可以是离散的数值或可以是数值范围。显然,参考水平或量可以在HBV免疫复合物的个体种类之间变动。因此,测量系统优选地用一份样品或用一系列样品校准,所述样品包含已知量的HBV免疫复合物或多种HBV免疫复合物。更优选地,该系统用一系列混合物校准,所述混合物包含限定体积的仅含HBsAg的血清,即,包含大量的HBsAg但不含抗HBV免疫球蛋白或HBV免疫复合物的血清,和仅含抗HBsAg免疫球蛋白的血清,例如,包含高滴度抗HBsAg IgG但不包含HBsAg或HBV免疫复合物的血清。技术人员理解在这种情况下HBV免疫复合物的量将优选地表述为任意单位(AU)。因此,优选地通过将样品获得的信号与包含于校正曲线中的信号比较,确定HBV免疫复合物或多种HBV免疫复合物的量。

[0035] 适用于个体受试者的参考量可以根据各种生理学参数如年龄、性别或亚群变动。因此,合适的参考值可以通过本发明的方法,从待分析的参考样品连同测试样品一起(即同时或相继)确定。另外,可以优选地使用阈值量作为参考量。优选地,高于阈值量的HBV免疫复合物的量表示轻度的HBV感染;并且等于或低于阈值量的HBV免疫复合物的量表示重度的HBV感染。应当理解前述的量可以因统计学和测量误差变动。

[0036] 在本发明方法的一个实施方案中,已经发现增加的HBV免疫复合物的量优选地表示受试者对干扰素治疗敏感,而减少的HBV免疫复合物的量表示受试者对干扰素治疗不敏感。在这种情况下,参考量优选地是这些量,所述量是在治疗给定受试者群体或群组之前存在于患有HBV的受试者中的平均量或均数量(average or mean amount)。本文中提及的HBV免疫复合物量的减少或增加优选地是统计显著的减少或增加。

[0037] 参考量可以优选地从已知对干扰素治疗敏感的患有HBV的受试者或受试者组的样品导出。在这种情况下,确定与该参考量相比实质上相同或增加的HBV免疫复合物的量应当表示受试者对干扰素治疗敏感。减少的量应当表示对干扰素治疗不敏感的受试者。

[0038] 参考量还可以优选地从已知对干扰素治疗不敏感的患有HBV的受试者或受试者组的样品导出。在这种情况下,确定与该参考量相比实质上相同或减少的HBV免疫复合物的量应当表示受试者对干扰素治疗不敏感。增加的量应当表示对干扰素治疗敏感的受试者。

[0039] 有利地,发现确定来自受试者的样品中HBV免疫复合物的量允许鉴定将患有乙型肝炎病毒(HBV)感染的受试者鉴定为对标准干扰素治疗敏感。如本文在实施例中详述的,优选地,增加的HBV免疫复合物的量表示受试者对干扰素治疗敏感,而减少的HBV免疫复合物的量表示受试者对干扰素治疗不敏感。优选地,这意味具有大量HBV免疫复合物的受试者具有响应于标准干扰素治疗的高概率,并且意味具有少量HBV免疫复合物的受试者具有

响应于标准干扰素治疗的低概率。因此可以在疗法启动之前使用本发明的方法决定受试者是否应当用标准干扰素疗法治疗或该受试者是否应当优选地接受改良疗法。还有利地,发现知晓受试者的 HBeAg 状态并且因此确定其 HBeAg 状态与本发明的用于正确地鉴定对干扰素治疗敏感的受试者的方法无关。

[0040] 上文作出的定义在已作必要修正时适用于以下情况:

[0041] 本发明还构思一种通过干扰素疗法治疗患有 HBV 感染的受试者的方法,所述方法包括将受试者鉴定为对干扰素治疗敏感,优选地,通过本发明的前述方法鉴定,并且向被鉴定为干扰素治疗对敏感的受试者施用治疗有效量的如本文中他处所述的干扰素治疗。

[0042] 本发明还涉及一种用于在患有 HBV 感染的受试者中区分轻度 HBV 感染和重度 HBV 感染的方法,所述方法包括步骤:

[0043] a) 确定所述受试者的样品中 HBV 免疫复合物的量,

[0044] b) 将步骤 a) 中获得的 HBV 免疫复合物的量与参考值比较;并且

[0045] c) 基于步骤 b) 中比较的结果区分轻度 HBV 感染和严重 HBV 感染。

[0046] 在这种情况下,重度的 HBV 感染以如本文中他处所述的减少的 HBV 免疫复合物的量为特征,而轻度的 HBV 感染以增加的 HBV 免疫复合物的量为特征。在这种情况下,参考量优选地是这些量,所述量是在治疗给定受试者群体或群组之前存在于患有 HBV 的受试者中的平均量或均数量。

[0047] “轻度的 HBV 感染”优选地是一种可以通过如本文中他处所述的干扰素疗法治疗的形式,而“重度”优选地是不能通过干扰素疗法治疗的慢性 HBV 感染。

[0048] 本发明也涉及来自患有 HBV 感染的受试者的样品中 HBV 免疫复合物的量或用于这种样品中 HBV 免疫复合物的检测剂用于将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感用途。

[0049] 本文中他处详细描述了可以用于确定样品中存在的 HBV 复合物的合适检测剂。

[0050] 另外,本发明还涉及一种用于将患有乙型肝炎病毒 (HBV) 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感的装置,包括用于确定 HBV 免疫复合物的量的分析单元,和用于将所述量与参考量比较以及用于将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对干扰素治疗敏感的评价装置。

[0051] 如本文所用的术语“装置”指一种工具系统,所述系统至少包括彼此有效关联以允许区分的前述工具。上文与本发明方法相关地公开了用于确定所述 HBV 免疫复合物的量的优选工具和用于实施比较的工具。怎样以运行方式连接工具将取决于纳入装置中的工具的类型。例如,在使用自动确定 HBV 免疫复合物的量的工具情况下,由所述自动运行工具获得的数据可以由例如计算机程序处理,以建立诊断(即鉴定对敏感干扰素治疗的受试者)。在这种情况下,优选地,所述工具包含在单一装置中。所述装置可以因此包括用于测量样品中 HBV 免疫复合物的量的分析单元和用于处理所得数据以便诊断的评价装置。备选地,在工具如测试条(test stripe)用于确定 HBV 免疫复合物的量情况下,用于诊断的工具可以包括对照条或对照表,所述对照纸条或对照表将测定的量划至已知伴随响应于标准干扰素治疗或伴随不响应于干扰素治疗的量。用于检测的优选工具与涉及本发明以上方法的实施方案相联系地公开。在这种情况下,工具是有效关联的,在于该系统的用户由手册中给出的说明和阐释将确定该量的结果和其诊断值联系到一起。该工具在这种实施方案中可以作为独立的装置出现并且优选地包装在一起作为试剂盒。本领域技术人员将无需进行其他创造

性工作即可了解如何关联该工具。优选的设备是可以在不具备专业临床医生的特定知识的情况下应用的那些,例如,仅需要加载样品的测试条或电子装置。结果可以作为参量诊断原始数据的输出,优选地,作为绝对量或相对量给出。应当理解这些数据将需要由临床医生解释。但是,还构思了专家系统装置,其中输出包含不需要专业临床医生解释的处理过的诊断原始数据。其他优选的装置包括上文根据本发明方法所提及的分析单元/装置(例如,生物传感器、阵列、与特异性识别多肽的配体连接的固相支持物、等离子体表面共振装置、NMR波谱仪、质谱仪等)或评价单元/装置。

[0052] 本发明构思一种试剂盒,其包含实施本发明方法的说明书、用于确定 HBV 免疫复合物的量的检测剂,和优选地允许将患有 HBV 感染的受试者鉴定为对标准干扰素治疗敏感的参考量的标准。

[0053] 如本文所用,术语“试剂盒”指前述组分的综合,所述组分优选地分别在单一容器内部提供。该容器还优选地包括用于实施本发明方法的说明书。已经在本说明书中给出试剂盒的这类组分的例子以及它们的使用方法。试剂盒优选地含有即用型制剂形式的前述组分。优选地,试剂盒可以额外地包括说明书,例如,相对于本发明方法提供的诊断,解读任何测定结果的用户手册。特别地,这类手册可以包括将所确定 HBV 免疫复合物的量划分至诊断类型的信息。在本说明书中他处将找到详细内容。另外,这类用户手册可以提供关于正确使用试剂盒组分以确定相应生物标记的量的说明。用户手册可以按纸质形式或电子形式提供,例如存储在 CD 或 CDROM 上。本发明还涉及所述试剂盒在本发明的任何方法中的用途。

[0054] 将本说明书中援引的全部参考文献在此就其完整公开内容和本说明书中具体提到的公开内容而言均通过引用的方式并入。

[0055] 附图

[0056] 图 1:HBV 免疫复合物检测原理;抗 HBsAg 捕获抗体(生物素 aHBS1,生物素 aHBS2)与固体表面结合。将 HBV 免疫复合物(包含 HBsAg 和抗 HBsAG IgG)捕获至该表面并用单克隆 IgM 检测,所述单克隆 IgM 具有低亲和力,但对与地高辛配基(Digoxigenin)缀合的人 IgG 具有高亲合力(抗<聚集的人 IgG>IgM-地高辛配基)。

[0057] 图 2:研究设计的示意图。

[0058] 图 3:HBV 免疫复合物的量与不根据 HBeAg 状态区分的群组中针对标准治疗的反应;A) 和 B):在第 0 周(即在启动治疗之前,A) 和在治疗第 12 周(B)HBsAg 在来自响应于(R)或不响应于(NR)标准治疗的患者的血清样品中的浓度。反应个体和非反应个体之间的差异不是统计显著的。C) 和 D):在第 0 周(C) 和在治疗第 12 周(D)HBsAg/抗 HBsAG IgG 复合物在来自响应于(R)或不响应于(NR)标准治疗的患者的血清样品中的浓度。在第 0 周($p = 0.0093$) 和在第 12 周($P = 0.0179$),反应个体和非反应个体之间的差异是统计显著的。

[0059] 图 4:图 3 中获得的数据的 ROC 曲线。

实施例

[0060] 以下实施例应当仅说明本发明。它们应当不被解释为限制本发明的范围。

[0061] 实施例 1

[0062] 产生具有类风湿因子样特异性的单克隆小鼠 IgM 抗体

[0063] 免疫原 :H-IgG 聚合物 :

[0064] 将 10mg 人 IgG1 (Sigma 公司) 溶解于 0.6ml 25mM 碳酸氢盐缓冲液 pH 9.5 中。在添加 3.5 μ l 12.5% 戊二醛溶液后, 将它在室温温育 2 小时。随后, 将它在冰浴中冷却, 用 50mM 三乙醇胺溶液 pH 8.0 调节至 pH 8.3 并且添加 0.15ml 新鲜制备的硼氢化钠溶液 (8mg 硼氢化物 /ml 水)。在 0 $^{\circ}$ C 2.5 小时后, 将制备物在 4 $^{\circ}$ C 针对 10mM 磷酸钾缓冲液 /0.2M NaCl, pH 7.5 透析 16 小时。将含有 IgG 聚合物的透析液以等分试样贮存在 80 $^{\circ}$ C 或用于免疫和用于杂交瘤细胞的培养上清液中的特异性检验。从人 IgG3 (Sigma Company) 开始, 以相似方式产生 H-IgG3 聚合物。

[0065] 小鼠的免疫 :

[0066] 将 12 周龄雌性 BALB/c 小鼠用 100 μ g H-IgG1 或 IgG3 聚合物连同佐剂 CFA (弗氏完全佐剂) 一起腹膜内首次免疫。在 8 日后, 用 CFA 中 100 μ g 相应的 IgG 聚合物实施进一步免疫。在初始免疫后 13 日, 在没有佐剂的情况下腹膜内施用 200 μ g 相应的聚合物, 在初始免疫后 14 日和 15 日, 在每种情况下腹膜内和静脉内施用 100 μ g。在 16 日后实施融合。

[0067] 杂交瘤克隆的产生 :

[0068] 融合和克隆 :

[0069] 遵循 Galfré, G., Methods in Enzymology 73(1981)3-46 中的方法, 使免疫小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞融合。免疫小鼠的大约 1×10^8 个脾细胞与 2×10^7 个骨髓瘤细胞 (P3X63-Ag8-653, ATCC CRL 1580) 混合并离心 (以 300g 和 4 $^{\circ}$ C 持续 10 分钟)。

[0070] 随后将细胞用不含胎牛血清 (FCS) 的 RPMI-1640 培养基洗涤 1 次并在 50ml 锥形管中以 400g 再次离心。添加 1ml PEG (聚乙二醇) (分子量 4000, MERCK, Darmstadt) 并通过抽吸混合。在 37 $^{\circ}$ C 于水浴中 1 分钟后, 逐滴添加不含 FCS 的 5ml RPMI 1640, 混合, 用培养基 (RPMI1640+10% FCS) 补充直至 50ml 并随后离心。使沉降的细胞悬于含有 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中并且接种在次黄嘌呤 - 偶氮丝氨酸选择培养基中 (RPMI1640+10% FCS 中的 100mmol/l 次黄嘌呤, 1 μ g/ml 偶氮丝氨酸)。添加白介素 6 (100U/mL) 至培养基作为生长因子。在约 10 日后, 对原代培养物测试特异性抗体合成。在 96 孔细胞培养平板中借助荧光激活的细胞分选仪克隆了显示与聚集的人 IgG1 的阳性反应, 但与单体 IgG 无交叉反应的原代培养物。添加白介素 6 (100U/mL) 至培养基作为生长添加物。

[0071] 以这种方式获得以下杂交瘤克隆 :

[0072] 表 1 :

[0073]

单克隆抗体名称	免疫原	亚类特异性聚合物
MAb<h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM	h-IgG1 聚合物	IgG1>IgG3>IgG4>IgG2
MAb<h-Agg. -IgG>M-1.010.2-IgM	h-IgG1 聚合物	IgG1>IgG3>IgG4>IgG2
MAb<h-Agg. -IgG>M-1.1.7-IgM	h-IgG3 聚合物	IgG1>IgG3>IgG2>IgG4

[0074] 对聚集的人 IgG 具有特异性的单克隆抗体的筛选试验。

[0075] 链霉亲和素包被的微量滴定平板 (MTPs) 用生物素化的人 IgG1 或 IgG3 包被。此

后将它们与细胞培养上清液中的单克隆抗体温育。随后,使用抗<小鼠-IgM>-过氧化物酶(POD)通过与POD底物反应,以惯常方式检测结合的抗体。

[0076] 使用与固相结合的人IgG确定亚类特异性:

[0077] 为了确定杂交瘤细胞的培养上清液中抗体的特异性,用重组链霉亲和素包被的MTP(MicroCoat Company,订购号12-K96N)用温育缓冲液中 $1\mu\text{g/ml}$ 亚类1或2或3或4的生物素化h-IgG(=h-IgG-Bi)包被。由于通过生物素与固相结合的IgG的行为类似聚集的聚合物IgG,所以这个实验方案可以用来确定亚类特异性。为此,将每孔 $100\mu\text{l}$ h-IgG-Bi溶液在室温伴随振摇温育60分钟,并且随后用0.9%NaCl/0.05%**Tween[®]20**洗涤3次。在下一个步骤中,将待检验的 $100\mu\text{l}$ 抗体溶液(培养上清液)添加至包被的板孔并且在室温伴以振摇温育1小时。用0.9%氯化钠/0.05%**Tween[®]20**洗涤3次后,在每种情况下添加 $100\mu\text{l}$ POD-标记的来自山羊抗小鼠IgM的多克隆抗体Fab片段(Dianova Company,订购号115-036-075,使用的浓度为 $0.16\mu\text{g/ml}$ 温育缓冲液)以检测来自样品的结合抗体,在室温伴以振摇温育1小时,并且随后用0.9%氯化钠/0.05%**Tween[®]20**洗涤3次。最后,添加 $100\mu\text{l}$ /孔**ABTS[®]**底物(Roche Diagnostics GmbH,订购号1684302),并且在室温30分钟后在来自Dynatech公司的MR700微量平板读数仪中测量405/492nm处的吸光度。

[0078] 温育缓冲液:40mM磷酸钠,pH 7.4,200mM酒石酸钠,0.1%**Tween[®]20**,0.2%牛血清白蛋白。

[0079] 确定与单体人IgG1的反应性/交叉反应:

[0080] 为了确定与未聚集的单体H-IgG1的反应性/交叉反应,将待检验的单克隆抗体在上文描述的试验中与渐增浓度或过量的非聚集的单体IgG1预温育。如果测量的信号保持不变处于高水平,则不存在交叉反应。如果测量的信号降低,则交叉反应已经出现。

[0081] 为此,将用重组链霉亲和素包被的微量滴定平板(MTP)(MicroCoat Company,订购号12-K96N)以温育缓冲液中的 $1\mu\text{g/ml}$ 生物素化HIgG1(=H-IgG1-Bi)包被。每孔使用 $100\mu\text{l}$ H-IgG1-Bi溶液并且将其在室温伴随振摇温育60分钟,并随后用0.9%NaCl/0.05%**Tween[®]20**洗涤3次。将待测试交叉反应的单克隆抗体与系列浓度直至 $1\mu\text{g/ml}$ 的未聚集的单聚IgG1预温育。预温育在未包被的96孔MTP中在室温1小时进行,同时振摇。

[0082] 在下一个步骤中,将 $100\mu\text{l}$ 这种溶液(抗体+过量的未聚集的单聚IgG1)添加至包被的板孔并且在室温伴以振摇温育1小时。用0.9%氯化钠/0.05%**Tween[®]20**洗涤3次后,在每种情况下添加 $100\mu\text{l}$ POD-标记的来自山羊抗小鼠IgM的多克隆抗体Fab片段(Dianova Company,订购号115-036-075,使用的浓度为 $0.16\mu\text{g/ml}$ 温育缓冲液)以检测来自样品的结合抗体,在室温伴以振摇温育1小时,并且随后用0.9%氯化钠/0.05%**Tween[®]20**洗涤3次。

[0083] 最后,添加 $100\mu\text{l}$ /孔**ABTS[®]**底物(Roche Diagnostics GmbH,订购号1684302),并且在室温30分钟后在来自Dynatech公司的MR700微量平板读数仪中测量405/492nm处

的吸光度。在本发明意义下适合的具有类风湿性因子样结合单克隆抗体识别全部人 IgG 亚类并且在竞争试验中显示出与单聚 h-IgG 交叉反应小于 10%。如果 HIgG1 聚合物用来确定反应性,则测量的信号大幅度降低。表 1 显示单克隆抗体的主要特性。

[0084] 发酵杂交瘤克隆以分离单克隆抗体:

[0085] 将获得的杂交瘤细胞以 1×10^5 个细胞/ml 的密度接种在含有 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中并在发酵器 (Thermodux Company, Wertheim/_Main, 型号 MCS-104XL, 订购号 144-050) 中增殖 7 日。培养上清液中达到 $100 \mu\text{g}$ 单克隆抗体/ml 的平均浓度。

[0086] 单克隆 MAb<h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM 的分离:

[0087] 将 5mg MAb<h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM(DSM ACC2873) 用 0.1M 磷酸钠缓冲液, pH 8.6 调节至总体积 2ml。将 $50 \mu\text{l}$ 1.11mM 地高辛配基-3-O-甲基-羰基- ϵ -氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯在二甲基亚砷中的溶液添加至这种溶液并随后在 25°C 搅拌 60 分钟。IgM 对活化型地高辛配基的比率是 1:10。将形成的 IgM-地高辛配基针对 20mM 磷酸钾缓冲液/0.1M NaCl/3%蔗糖, pH 7.5 透析。透析的 IgM-Dig 以等分试样贮藏在 -80°C。

[0088] 实施例 2

[0089] 多参数生物芯片平台上的全自动免疫测定法 (IMPACT)

[0090] 在 Hornauer, H 等人, *BIOspectrum, Special Proteomics* 10(2004)564-565 和 Hornauer, H. 等人, *Laborwelt* 4(2004)38-39 中描述了多参数生物芯片平台。为了确定复合物水平,使用基于阵列的测定法 (IMPACT - 免疫学多参数芯片技术 (Immunological Multi-Parameter Chip Technology), Roche Diagnostics)。

[0091] 将链霉亲和素涂层施加在黑色着染的聚苯乙烯支持物 (固相) 上约 2.5x6mm 的测试区的整个区域范围内。将成列的由治疗性抗体的生物素化片段组成的每列大约 10 至 20 个的相同点以喷墨方式施加至测试区域,每个点的直径约 $150 \mu\text{m}$ 。

[0092] 使用以下试验特异性试剂引物:

[0093] 样品稀释缓冲液和检测抗体缓冲液:

[0094] 50mM Tris, pH 6.6; 30mM MES; 50mM NaCl; 0.1% 去垢剂 (聚多卡醇 (polydocanol)); 5mM EDTA; 0.5% 酪蛋白; 0.2% 防腐剂 (醋氧甲苯酸 (oxypyron) 和盐酸甲基异噻唑啉酮 (methylisothiazolone hydrochloride, MIT))

[0095] 如果样品显示极高浓度的 HBV-免疫复合物并且结果不在测量范围内,则使用 Elecsys Diluent MultiAssay (标识号 03609987) 进行样品的额外手工稀释。样品以 10 倍进阶 (例如 1:10, 1:100, 1:1000) 进一步稀释。

[0096] 洗涤缓冲液: 10mM Tris, 0.01% 聚多卡醇, 0.001% 醋氧甲苯酸, 0.001% MIT

[0097] 样品: 来自用聚乙二醇化干扰素 α -2 (Peginterferon alpha-2a, PEGASYS) 和 Adefovir (图 2, 表 2) 治疗之前和期间的慢性 HBV 患者的人血清。

[0098] 使用与 HBs 抗原特异性结合的两种不同的生物素化抗体作为生物素化的捕获抗体。HBs 抗原和抗 HBs 抗体的免疫复合物与固相结合捕获抗体结合。通过对人聚集的 IgG 特异的单克隆 IgM 抗体 (MAb<h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM) 检测免疫复合物 (图 1)。

[0099] 将样品用样品稀释缓冲液 1:5 稀释用于测量。将稀释的样品在 37°C 温育 12 分钟。在抽出样品后并用洗涤缓冲液洗涤测试区域后,与 MAb<h-Agg. -IgG>M-3.022.5-IgM(DSM ACC2873) (一种用地高辛标记的抗体 (Dig 标记的单克隆抗体 <h-Agg. -IgG>) 在 37°C 温

育 6 分钟,接着是一个洗涤步骤。与荧光标记的 <Dig> 抗体在 37℃温育 3 分钟并随后洗涤及吸干测试区域后,信号由 CCD 照相机检测 (图 3)。可以用合适的复合物 - 校准物计算浓度。

[0100] 表 2 :研究群体

[0101]

HBeAg 阳性 (n=29)			HBeAG 阴性 (n=21)	
HBsAg 血清转 换	HBeAg 血清转 换	非反应个 体	HBsAg 血清转 换	非反应个 体
n=4	n=10	n=15	n=5	n=16

[0102] 表 3 :ROC 分析的统计值 (图 4)

[0103]

检验	auc	std	LCL	UCL
复合物 (HBsAg/ 抗 HBsAG IgG)	0. 7258	0. 0768	0. 5753	0. 8764
HBsAg	0. 5054	0. 0920	0. 3250	0. 6858
HBsAg/ 复合物比率	0. 7093	0. 0776	0. 5572	0. 8613

Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu
 100 105 110

Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His
 115 120 125

Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly
 130 135 140

Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro
 145 150 155 160

Ile Ser Ser Ile Phe Ser Arg Thr Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu
 165 170 175

Ser Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly
 180 185 190

Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser
 195 200 205

Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly
 210 215 220

Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro
 225 230 235 240

Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile
 245 250 255

Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu
 260 265 270

[0003]

Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser
 275 280 285

Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ser Pro Ala Gln Gly
 290 295 300

Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn
 305 310 315 320

Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu
 325 330 335

Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro
 340 345 350

Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val
 355 360 365

Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Cys Leu Tyr Asn Ile Leu Ser
 370 375 380

Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile
 385 390 395 400

<210> 2

<211> 212

<212> PRT

<213> 乙型肝炎病毒

<400> 2

Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Ser Cys Pro Thr
 1 5 10 15

Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile

[0004]

	20		25		30										
Asp	Pro	Tyr	Lys	Glu	Phe	Gly	Ala	Thr	Val	Glu	Leu	Leu	Ser	Phe	Leu
	35						40					45			
Pro	Ser	Asp	Phe	Phe	Pro	Ser	Val	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp	Thr	Ala	Ser
	50						55					60			
Ala	Leu	Tyr	Arg	Asp	Ala	Leu	Glu	Ser	Pro	Glu	His	Cys	Ser	Pro	His
65					70					75					80
His	Thr	Ala	Leu	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Cys	Trp	Gly	Glu	Leu	Met	Thr
			85						90					95	
Leu	Ala	Thr	Trp	Val	Gly	Val	Asn	Leu	Glu	Asp	Pro	Ala	Ser	Arg	Asp
			100					105						110	
Leu	Val	Val	Ser	Tyr	Val	Asn	Thr	Asn	Met	Gly	Leu	Lys	Phe	Arg	Gln
	115						120					125			
Leu	Leu	Trp	Phe	His	Ile	Ser	Cys	Leu	Thr	Phe	Gly	Arg	Glu	Thr	Val
	130						135					140			
Ile	Glu	Tyr	Leu	Val	Ser	Phe	Gly	Val	Trp	Ile	Arg	Thr	Pro	Pro	Ala
145					150					155					160
Tyr	Arg	Pro	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Thr	Leu	Pro	Glu	Thr	Thr
				165					170						175
Val	Val	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Thr	Pro	Ser	Pro
				180					185					190	
Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Pro	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gln	Ser	Arg

[0005]

	195	200	205
Glu Ser Gln Cys			
210			
<210> 3			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 乙型肝炎病毒			
<400> 3			
Met Gln Leu Phe His Leu Cys Leu Ile Ile Ser Cys Thr Cys Pro Thr			
1	5	10	15
Val Gln Ala Ser Lys Leu Cys Leu Gly Trp Leu Trp Gly Met Asp Ile			
	20	25	30
Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu Leu Ser Phe Leu			
	35	40	45
Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Arg Asp Leu Leu Asp Thr Ala Ser			
	50	55	60
Ala Leu Tyr Arg Glu Ala Leu Glu Ser Pro Glu His Cys Ser Pro His			
	65	70	75
His Thr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Thr			
	85	90	95
Leu Ala Thr Trp Val Gly Asn Asn Leu Glu Asp Pro Ala Ser Arg Asp			
	100	105	110
Leu Val Val Asn Tyr Val Asn Thr Asn Met Gly Leu Lys Ile Arg Gln			
	115	120	125

[0006]

Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr Val
 130 135 140

Leu Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala
 145 150 155 160

Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ser Thr Leu Pro Glu Thr Thr
 165 170 175

Val Val Arg Arg Arg Asp Arg Gly Arg Ser Pro Arg Arg Arg Thr Pro
 180 185 190

Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln Ser Pro Arg Arg Arg Arg Ser Gln
 195 200 205

Ser Arg Glu Ser Gln Cys
 210

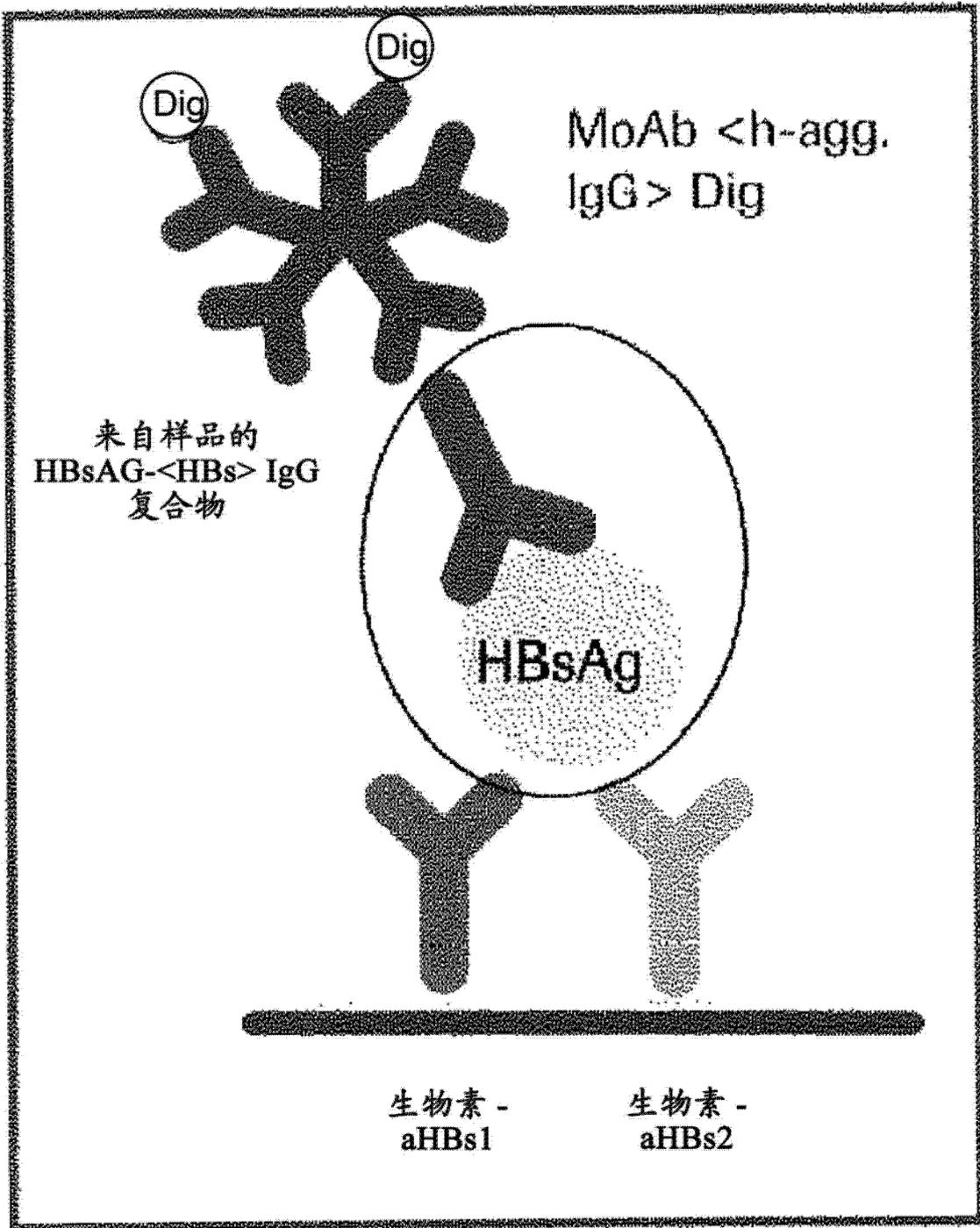


图 1

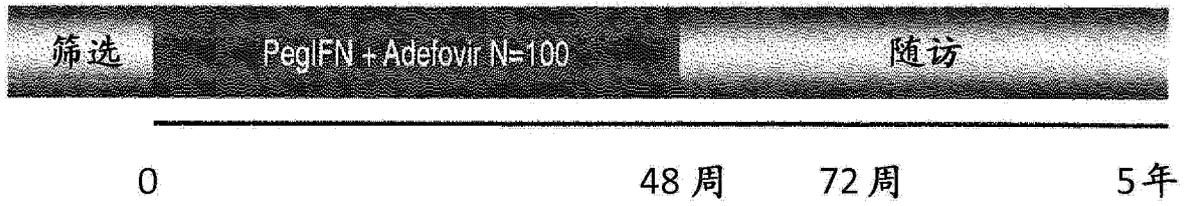


图 2

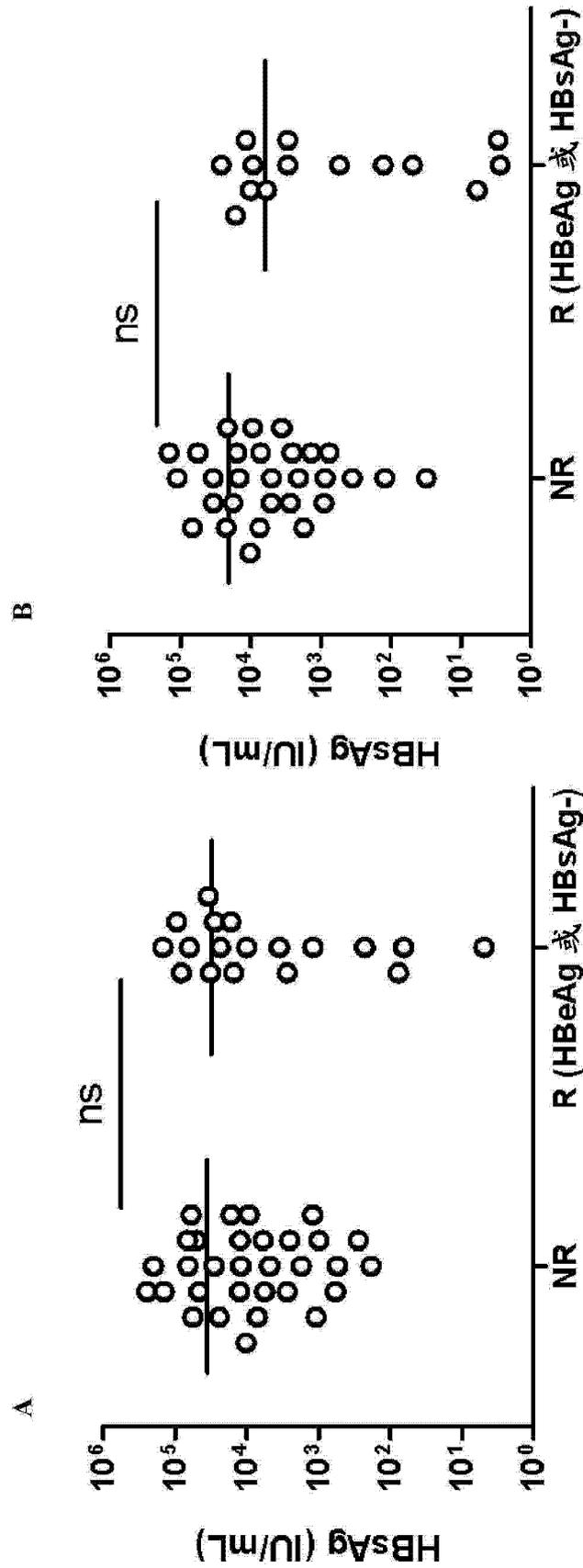


图 3

ROC 曲线

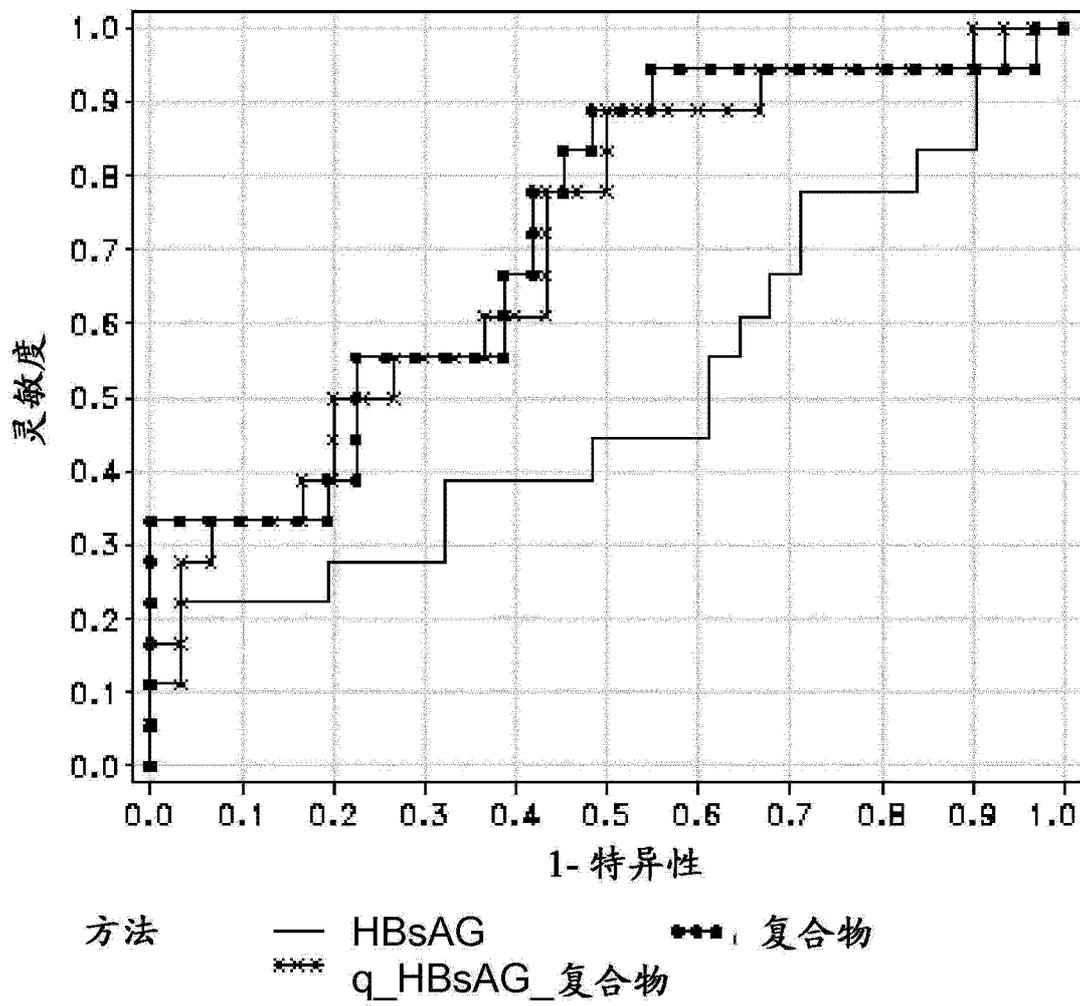


图 4