



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112014017877-1 B1



(22) Data do Depósito: 17/01/2013

(45) Data de Concessão: 25/01/2022

(54) Título: MÉTODO PARA PREVER UM EFEITO TERAPÊUTICO E USO DE ANTI-HBC TOTAL EM UMA AMOSTRA DE SORO OU PLASMA

(51) Int.Cl.: A61K 39/29; A61P 1/16.

(30) Prioridade Unionista: 21/01/2012 CN 201210019389.5.

(73) Titular(es): XIAMEN UNIVERSITY; XIAMEN INNOVAX BIOTECH CO., LTD..

(72) Inventor(es): QUAN YUAN; LIUWEI SONG; WENBIN ZHOU; ZUXING WENG; FEIHAO XU; SHENGXIANG GE; JUN ZHANG; NINGSHAO XIA.

(86) Pedido PCT: PCT CN2013070573 de 17/01/2013

(87) Publicação PCT: WO 2013/107355 de 25/07/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/07/2014

(57) Resumo: USO DE UM REAGENTE PARA DETECÇÃO QUANTITATIVA DO NÍVEL DE UM ANTICORPO CONTRA A PROTEÍNA DO NÚCLEO DO VÍRUS DA HEPATITE B E USO DE ANTI-HBC NA FABRICAÇÃO DE UM KIT. A presente invenção refere-se a um método para quantificar a detecção do anti-HBc e seu uso no monitoramento do progresso da doença de pacientes com hepatite crônica B e prever efeitos terapêuticos. Através da quantificação da detecção dos anticorpos contra a proteína do núcleo da hepatite B (anti-HBc), é capaz de monitorar o progresso da doença de pacientes da hepatite B crônica, efetivamente prever efeitos terapêuticos nos pacientes com hepatite B crônica que aceitaram uma terapia contra o vírus da hepatite B (especialmente, uma terapia baseada no interferon e uma terapia baseada no fármaco anti-HBV do nucleosídeo/análogo de nucleotídeo), e assim guiar os pacientes para fármacos razoavelmente escolhidos.

"MÉTODO PARA PREVER UM EFEITO TERAPÊUTICO E USO DE ANTI-HBC TOTAL EM UMA AMOSTRA DE SORO OU PLASMA"

Campo técnico

[0001] A presente invenção se refere à detecção do vírus da hepatite B (HBV) e diagnóstico clínico da hepatite tipo B viral, mais especificamente se refere a um método de uso da detecção quantitativa de anticorpos contra a proteína do núcleo da hepatite B (anti-HBc) para monitoramento do progresso da doença da hepatite B crônica em pacientes, prevendo, efetivamente, efeitos terapêuticos nos pacientes com hepatite B crônica que aceitaram uma terapia crônica o vírus da hepatite B (especialmente, uma terapia com base o interferon e uma terapia baseada no fármaco anti-HBV de nucleotídeo/análogo de nucleotídeo), e assim guiar os pacientes para os fármacos de escolha razoável.

Antecedentes da invenção

[0002] A infecção por vírus da hepatite B, especialmente a infecção crônica do vírus da hepatite B, é um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo. Atualmente, existem mais do que 0,35 bilhões de pacientes com infecção crônica do vírus da hepatite B no mundo. A infecção crônica do vírus da hepatite B pode resultar em doenças no fígado tais como hepatite B crônica (CHB), cirrose hepática (LC) e carcinoma hepatocelular primária (HCC), e mais do que 1 milhão de pessoas morrem a cada ano, no mundo, devido a infecção crônica de vírus de hepatite B e doenças associadas causadas por ele^[1].

[0003] Atualmente, os fármacos para o tratamento da infecção crônica do vírus da hepatite B são principalmente divididos em dois grupos: interferon (IFNs) e análogos de

nucleosídeo/análogos de nucleosídeo (Nas). O último inclui interferon normal (IFN) e pegainterferon (Peg-IFN, também chamado como interferon de longa duração), que trazem certos efeitos de inibição de HBV e tratamento de CHB primariamente, por melhora total da imunocompetência de pacientes; enquanto o último inclui, principalmente, 5 fármacos: lamivudine (LMV), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudina (LdT) e tenofovir, que inibem a replicação HBV diretamente através da inibição da atividade da polimerase de HBV. Para a infecção crônica do vírus da hepatite B, o objetivo final usando os fármacos acima para tratamento da hepatite B crônica é dar negatividade sorológica ou soroconversão para o antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg) (perda de HBsAg ou soroconversão de HBsAg) em pacientes. Entretanto, os fármacos existentes acima mencionados tem potência limitada para conseguir a perda de HBsAg ou soroconversão de HBsAg, e tratamento contínuo para vários anos é usualmente requerida. Ademais, a soroconversão do antígeno do vírus E da hepatite B (soroconversão HBeAg) é um outro evento importante durante o procedimento da infecção crônica do vírus da hepatite B, que acompanha, usualmente com remissão e bom prognóstico de hepatite clínica e, assim, os clínicos e pesquisadores usam, comumente "se a soroconversão de HBeAg ocorrer em pacientes após o tratamento" como indicador primário para determinação se o tratamento é efetivo ou não. Apesar da soroconversão HBeAg, sustentar a resposta virológica (SVR) também é utilizado como um indicador secundário para determinação dos efeitos terapêuticos do tratamento clínico da hepatite B^[2,3].
[0004] Em vista do ponto final da terapia em que os pacientes com hepatite B crônica conseguem soroconversão

HBeAg, não existem diferenças significantes em termos de efeitos terapêuticos e aquiescência dos fármacos entre IFNs e Nas. IFNs (principalmente referido como Peg-IFN ou interferon de longa duração) tem efeitos terapêuticos superior aos Nas, 30-50% de pacientes HBeAg positivos poderiam conseguir a soroconversão HBeAg após um tratamento de ano (52 semanas) com o último, enquanto apenas 10-30% de pacientes HBeAg positivos poderiam conseguir a soroconversão de HBeAg com o tratamento do último. Entretanto, os efeitos colaterais da terapia de IFNs são usualmente maiores que aqueles de Nas, os indivíduos são, usualmente, acompanhados com reação colateral, tal como, febre, dor de cabeça, fraqueza, epilação, leucopenia, e alguns pacientes poderão não permanecer com estes efeitos colaterais. Em contraste, os fármacos orais de Nas têm menos efeitos colaterais, e boa aquiescência. Em termos de preço, o custo do fármaco para um tratamento de um ano com IFNs (principalmente referindo-se ao Peg-IFN ou interferon de longa duração) é de cerca de 15,000 RBM, enquanto o custo do fármaco para o tratamento com o Nas é usualmente menor que 10,000 RMB. Em vista das diferenças acima, dos dois grupos de fármacos, é de fundamental significância realizar a avaliação efetiva e a previsão antes do tratamento dos pacientes e, então selecionar um fármaco otimizado para o tratamento de hepatite B crônica.

[0005] Para conseguir a soroconversão de HBeAg em um paciente, depende, principalmente de se o paciente *per se* tem suficiente imunocompetência específica contra o HBV, ou se o paciente poderia obter imunocompetência específica suficiente contra o HBV via terapia com fármaco. Assim, a avaliação quantitativa da imunocompetência específica contra HBV de um

paciente com a hepatite B crônica poderia ser utilizado para prever a probabilidade da soroconversão HBeAg ocorrendo no paciente com hepatite B crônica a ser tratada. Por um longo período, o nível ALT do soro de um paciente com hepatite B crônica é utilizado como um marcador indireto substituto para avaliação da imunocompetência do hospedeiro contra HBV. Isto é devido ao nível ALT do soro do paciente com hepatite B crônica reflete nível e inflamação/necrose das células do fígado do paciente, enquanto HBV é imune ao vírus causador, que induz a inflamação do fígado ou necrose das células do fígado devido à resposta imunológica mediada pelas células anti-HBV T, de modo que existe certa correlação entre o nível ALT no soro e a imunocompetência do anti-HBV no hospedeiro. Em geral, acredita-se que os pacientes com o nível ALT no soro maior que o limite normal superior (ULN) 2 vezes tem, usualmente, melhor efeito terapêutico no tratamento anti-HBV (referindo à probabilidade de soroconversão HBeAg conseguida por tratamento) mais do que aqueles sem reação para hepatite, ou seja, pacientes com hepatite B crônica com nível ALT no soro menor que o limite normal superior, enquanto pacientes com um nível ALT no soro maior que o limite normal superior (ULN) 5 vezes tiveram, usualmente melhor efeitos terapêuticos no tratamento anti-HBV do que aqueles pacientes que tiveram reação de hepatite mas tiveram nível ALT relativamente menor. Todavia, o nível ALT no soro representa, primariamente, o grau de inflamação do fígado, nível ALT não é um índice HBV específico e pode facilmente ser afetado por outros fatores (tais como, acompanhado de hepatite autoimune, doenças alcoólicas do fígado, infecção de HCV ou outras viroses de hepatite), seu período de meia vida é curto e, assim, não é

muito confiável para utilizar o nível ALT para prever os efeitos terapêuticos no tratamento de hepatite B crônica. Além disso, o ALT no soro avalia a resposta imunológica da célula T específica para HBV (por exemplo, teste de liberação do estímulo da citocina *in vitro*) pode também ser utilizada para previsão dos efeitos terapêuticos no tratamento de hepatite B crônica, mas sua operação é relativamente complicada, sua prática clínica e promoção são muito difícil, isto envolve altos requerimentos para as amostras de teste (toda a amostra de sangue fresca é requerida) e, assim, sua possibilidade de aplicação é muito limitada. Em resumo, ainda não existe um método efetivo de avaliação dos efeitos terapêuticos antes da terapia existente na técnica.

[0006] Os anticorpos contra a proteína do núcleo da hepatite B (anti-HBc) são um dos indicadores sorológicos mais típicos para a infecção HBV, e detecção qualitativa do anti-HBc (determinando se o anti-HBc é positivo) foi utilizado por mais do que 35 anos no diagnóstico clínico de infecção do vírus da hepatite B. O resultado positivo no soro anti-HBV sugere que o indivíduo foi ou está sendo infectado com HBV, e este antícorpo usualmente existente continua no soro da pessoa infectada com HBV pela vida. Na presente, os métodos desenvolvidos para detecção dos anticorpos anti-HBc são primariamente com base no mecanismo de imunodetectação competitiva ou supressiva, e estes métodos podem ser efetivamente utilizados para detecção qualitativa de anti-HBc. De acordo com as revisões relatadas, não existe um método efetivo e o reagente para detecção quantitativa de anti-HBc antes da publicação da presente invenção, e os valores clínicos e usos correspondentes de detecção

quantitativa do anti-HBc são desconhecidas até então.

Sumário da invenção

[0007] Uma vez que a proteína do núcleo do vírus da hepatite B tem muito forte imunogenicidade, seu nível de anticorpo no soro indica a capacidade de resposta imune humoral (resposta imune da célula B) especificamente contra HBV no indivíduo hospedeiro, e reflete toda a competência imunológica do hospedeiro contra HBV. Para este fim, os inventores da presente invenção acreditam que a detecção precisa do nível anti-HBc no soro dos pacientes da hepatite B crônica poderia indicar competência da resposta imune específica contra HBV em pacientes, e pode prever efeitos terapêuticos finais do tratamento com fármacos (incluindo fármacos interferon, análogos de nucleosídeo/análogos de nucleotídeo) a ser aceito pelos pacientes. A presente invenção refere-se a um método para detecção quantitativa precisa do nível de anticorpo do anti-HBc no soro/plasma de um paciente com infecção por vírus da hepatite B, e um uso de detecção quantitativa do anti-HBc no monitoramento do progresso da hepatite B crônica nos pacientes, bem como previsão dos efeitos terapêuticos do tratamento nos pacientes com hepatite B crônica.

[0008] Especificamente, a presente invenção refere-se a um método para detecção imunológica para precisar quantitativamente o nível de anti-HBc no soro, o método sendo capaz de ser executado pela análise imunoabsorvente ligada a enzima ou método de detecção quimioluminescente.

[0009] O método tem a vantagem que a faixa dinâmica linear de uma detecção única é da ordem de 1,5 de magnitude ou mais, ou seja, o limite superior da quantificação precisa para

detecção única é pelo menos 32 vezes maior que o limite inferior de quantificação precisa. Esta característica é uma base para detecção quantitativa precisa do nível de anti-HBC no soro, e não é possuída pelos métodos para detecção do anti-HBC na técnica anterior antes da presente invenção.

[0010] Os resultados obtidos pela aplicação do método para a amostra de pacientes de estágios diferentes de infecção crônica do vírus da hepatite B e série de amostras do progresso natural da doença em curso nos pacientes mostraram que o nível quantitativo de anti-HBC no soro é altamente correlacionado à atividade de hepatite e o estado imune do paciente hospedeiro, e o valor medido quantitativamente de anti-HBC poderia ser utilizado para discriminá-lo efetivamente se os pacientes são do estágio de ativação imune, ou atividade hepática. Isto sugere que o uso clínico do método para detecção quantitativa do anti-HBC como descrito pela presente invenção ou métodos equivalentes do mesmo são condutivos para monitorar e determinação do progresso da doença de pacientes com hepatite B crônica.

[0011] Os resultados obtidos por aplicação do método de coorte da amostra de pacientes hepatites crônicos aceitando o tratamento de adefovir dipivoxil e interferon de longa ação mostrou que o nível anti-HBC básico foi na correlação positiva com taxa de resposta terapêutica. Isto sugere que o uso clínico do método para detecção quantitativa do anti-HBC como descrito pela presente invenção ou métodos equivalentes dos mesmos podem avaliar e prever efeitos terapêuticos antes dos pacientes com hepatite B crônica aceitarem o tratamento de fármacos, tais como adefovir dipivoxil, interferon de longa ação ou aqueles com mecanismo similar, e são condutores

para guiar a seleção de fármacos terapêuticos e o tempo terapêutico, melhorando, desse modo à eficiência terapêutica.

[0012] Por outro lado, a presente invenção se refere ao uso de um reagente para detecção quantitativa do nível de anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B na fabricação e um agente de diagnóstico para monitoramento do progresso da doença de pacientes da hepatite B crônica e/ou efetivamente prever os efeitos terapêuticos antes dos pacientes com hepatite B crônica aceitarem o tratamento contra o vírus da hepatite B.

[0013] Em uma concretização específica, a detecção quantitativa do anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B é realizada por um ou mais dos métodos a seguir: um imunoensaio enzimático de fase sólida, método de imunodetecção quimioluminescente, método de detecção fluorescente em função do tempo, método de imunoturbidez, método imunocromatográfico, método de imuno-percolação.

[0014] Em uma concretização específica, a detecção única de nível do anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B tem uma faixa dinâmica linear da ordem de 1,5 magnitudes ou mais, ou seja, o limite superior de quantificação precisa para detecção única é 32 vezes ou maior que o limite inferior da quantificação precisa.

[0015] Em uma concretização específica, a detecção quantitativa do anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B compreende as etapas a seguir:

[0016] (a) prover uma proteína do vírus da hepatite B capaz de se ligar especificamente de um anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B, a proteína pode compreender a extensão total da sequência de aminoácido da proteína do

núcleo do vírus da hepatite B (a partir do 1º aminoácido para o 183º aminoácido), ou pode compreender apenas uma sequência de aminoácido da zona primária imuno-dominante da proteína do núcleo do vírus da hepatite B (por exemplo, a partir do 1º aminoácido para o 149º aminoácido), a proteína é imobilizada sobre um substrato sólido, age como um antígeno de fase sólida, e é utilizado para capturar um anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B existente em uma amostra no soro;

[0017] (b) prover um antígeno marcado capaz de se ligar especificamente ao anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B que é capturado sobre o antígeno de fase sólida, o antígeno marcado pode compreender a extensão completa da sequência do aminoácido da proteína do núcleo do vírus da hepatite B (a partir do 1º aminoácido para o 183º aminoácido), ou pode compreender apenas uma sequência de aminoácido da zona primária imuno-dominante da proteína do núcleo do vírus da hepatite B (por exemplo, a partir do 1º aminoácido para o 149º aminoácido), a substância geradora de sinal sobre o antígeno marcado pode ser a peroxidase do rábano de ébano, fosfatase alcalina, ou éster de acridínio;

[0018] (c) prover as amostras padrões de quantificação com concentrações conhecidas para designar uma curva padrão de quantificação, que usualmente consiste de 3-6 amostras contendo o anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B em concentrações diferentes. A unidade de concentração pode ser IU/ml, PEIU/ml, ou outras unidades de concentração ou titulação cuja fonte pode ser tratada;

[0019] (d) contatar a amostra (amostra a ser testada ou amostra padrão de quantificação) com o antígeno de fase

sólida de modo que um anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus de hepatite B, se existente, na amostra é capturado para formar um complexo antígeno-anticorpo de fase sólida contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B;

[0020] (e) contatar o antígeno marcado com o produto da etapa (d), ou seja, o complexo antígeno-anticorpo de fase sólida contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B, de modo a formar um complexo do antígeno-anticorpo de fase sólida contra o antígeno marcado-proteína do núcleo do vírus da hepatite B;

[0021] (f) contar um substrato ou uma solução capaz de ativar a produção do sinal com o complexo de antígeno-anticorpo de fase sólida contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B-antígeno marcado como formado na etapa (e), de modo a gerar um sinal mensurável, e medir a intensidade do sinal gerado com um instrumento de medida correspondente;

[0022] (g) realizar o ajuste da regressão linear dos sinais medidos das amostras de quantificação padrão (usualmente 3-6 amostras) com suas concentrações correspondentes, para obter uma fórmula matemática para calcular a concentração da mostra a partir de um sinal mensurável;

[0023] (h) introduzir o sinal medido da amostra a ser testada dentro da fórmula da etapa (g), e calcular a concentração do anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B na amostra a ser testada;

[0024] (i) quando a concentração do anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B como calculado na etapa (h) é maior que o limite superior da quantificação precisa do método de detecção, a amostra a ser testada é diluída, e as etapas (a) a (h) são repetidas, até a

concentração medida cair na faixa entre o limite superior e limite inferior da quantificação precisa do método de detecção correspondente. A concentração do anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B contida na amostra a ser testada ser obtida com o cálculo da multiplicação do valor medido após a diluição através da proporção de diluição.

[0025] Em uma concretização específica, o agente de diagnóstico da presente invenção é utilizado nos pacientes com hepatite B crônica que aceitaram fármacos terapêuticos diferentes, o fármaco inclui: interferon de longa ação (interferon peguilado, peginterferon), interferon normal (interferon), lamivudine (LMV), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudine (LdT), tenofovir, ou outros fármacos úteis no tratamento da hepatite B crônica.

[0026] Em uma concretização específica, o critério comum para prever o efeito terapêutico de uma terapia em pacientes antes da terapia é: o efeito terapêutico (taxa de resposta) obtido por pacientes com nível maior do anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B no soro de pacientes antes da terapia ser superior aquela dos pacientes com o nível inferior do anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B no soro de pacientes antes da terapia; o critério do efeito terapêutico pode ser a soroconversão do antígeno E do vírus da hepatite B (ou seja, conversão do HBeAg(+)/anti-HBe(-) para HBeAg(-)/anti-HBe(+)) em paciente com hepatite B crônica que aceitaram a terapia), ou pode ser uma resposta virológica (ou seja, a carga de DNA no HBV do soro cai para 1000 cópias/ml ou menos nos pacientes com hepatite B crônica), ou outros indicadores clínicos que possam indicar a remissão da condição da doença ou bom

prognóstico.

[0027] Em uma concretização específica, o critério comum para monitorar o progresso da doença dos pacientes de hepatite B crônica é: aumento anormal do nível do anticorpo contra a proteína do núcleo do vírus da hepatite B que sugere a ocorrência da inflamação do fígado dos pacientes e ativação da resposta imune no hospedeiro especificamente contra o vírus da hepatite B.

[0028] Em uma concretização específica, a presente invenção se refere a um uso de anti-HBc na fabricação de um kit para avaliação da resposta nos pacientes com o vírus da hepatite B crônica que aceitaram a terapia de adefovir dipivoxil e interferon peguulado.

[0029] Em uma concretização específica, a presente invenção se refere a um uso de anti-HBc na fabricação de um kit para monitorar o progresso da doença de pacientes com hepatite B crônica.

[0030] Em uma concretização específica, a presente invenção se refere ao uso de anti-HBc na fabricação de um kit para prever o estágio da doença dos pacientes com hepatite B.

Breve descrição dos desenhos

[0031] A figura 1 ilustra a faixa linear dinâmica do método de quantificação ELISA anti-HBc;

[0032] A figura 2 ilustra a precisão em intra-experimental (A) e inter-experimental (B) do método de quantificação ELISA do anti-HBc;

[0033] A figura 3 ilustra a consistência dos resultados de detecção da quantificação de ELISA para anti-HBc de 104 amostras;

[0034] A figura 4 ilustra a faixa linear dinâmica do método

de quantificação CLEIA para anti-HBc;

[0035] A figura 5 ilustra a faixa linear dinâmica do método de quantificação CLIA para anti-HBc;

[0036] A figura 6 ilustra a distribuição do nível de anti-HBc no soro de pacientes infectados com HBV de estágios diferentes:

[0037] (A) nível de anti-HBc no soro e nível ALT de pacientes infectados com HBV de estágios diferentes;

[0038] (B) nível de DNA em HBV no soro e nível de HBsAg de pacientes infectados com HBV de estágios diferentes;

[0039] (C) análise da curva ROC para determinação do estado de ativação imune dos indivíduos com base nos nível anti-HBc no soro;

[0040] (D) média do nível anti-HBc de diferentes pacientes ALT estratificados;

[0041] (E) análise de correlação do nível de anti-HBc no soro e nível ALT;

[0042] Observação de acrônimos: PBI, pacientes antes de infectados; IT, paciente na fase de tolerância imune; IC, pacientes em fase de liberação imune; LR, pacientes em baixa fase de replicação; EHN, hepatite negativa HBeAg; LC, paciente com cirrose no fígado; HCC, pacientes de câncer de fígado primário.

[0043] A figura 7 ilustra a mudança dinâmica de níveis do anti-HBc no soro, ALT, HBV, DNA e HBsAg durante a progressão natural do veículo do vírus da hepatite B crônica;

[0044] A figura 8 ilustra o pós-tratamento na taxa de soroconversão de HBeAg como previsto com o nível de anti-HBc no soro dos paciente com hepatite B crônica antes da terapia:

[0045] (A) usando o nível anti-HBc antes do tratamento para

prever a soroconversão de HBeAg dos paciente com hepatite B crônica após aceitar a terapia de adefovir dipivoxil;

[0046] (C) usar o nível de anti-HBC no soro para prever a taxa de soroconversão de HBeAg em pacientes após aceitar a terapia do adefovir dipivoxil;

[0047] (D) usar o nível de anti-HBC no soro para prever a taxa da ocorrência da soroconversão de HBeAg em pacientes após aceitar a terapia do interferon peguulado;

[0048] (E) usar o nível anti-HBC antes do tratamento para prever a taxa de soroconversão HBeAg em pacientes estratificados dos níveis ALT da linha de base diferente;

[0049] A figura 9 ilustra as taxas de ocorrência da soroconversão de HBeAg em pacientes estratificados de níveis diferentes da linha de base anti-HBC após aceitar a terapia de adefovir dipivoxil e interferon peguulado; e

[0050] A figura 10 ilustra as mudanças dinâmicas dos níveis quantificados dos marcadores no soro em pacientes durante e após a terapia de adefovir dipivoxil.

Modelos específicos para realização da invenção

[0051] A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos utilizados no presente pedido tem significado comum conhecido pelos técnicos no assunto associados com a presente invenção.

[0052] No exemplo 1 da presente invenção, um ensaio imunoenzimático ELISA anti-HBC (ensaio imunoabsorvente de enzima ligada, método de placa de micro-poço), método de detecção quantitativa foi estabelecida, este método poderia precisamente determinar o conteúdo do anti-HBC no soro da amostra, a faixa dinâmica linear para quantificação precisa de detecção única foi de até 1,8 ordens de magnitude (0,04-

2,5 IU/ml), e tal como uma característica não possuída pelos métodos conhecidos para detecção de anti-HBc^[4,5].

[0053] No exemplo 2, um método de detecção quantitativa CLEIA anti-HBc (ensaio imune de enzima ligada quimioluminescente, método de placa de micro-poço) foi estabelecido, este método poderia determinar precisamente o conteúdo de anti-HBc na amostra do soro, a faixa dinâmica linear para quantificação precisa de detecção única foi de até 2,7 ordens de magnitude (0,04-20 IU/ml). A faixa dinâmica linear deste método é mais ampla do que o método de detecção quantitativo ELISA de anti-HBc, como descrito no Exemplo 1, de modo que o número de diluição requerido para detecção de amostras com alto conteúdo de anti-HBc foi notavelmente reduzido, e a eficiência foi melhorada.

[0054] No exemplo 3, um método de detecção quantitativa CLIA anti-HBc (análise imune de quimioluminescência direta, método de micro-partícula) foi estabelecido, este método poderia determinar precisamente o conteúdo de anti-HBc na amostra do soro, a faixa dinâmica linear para quantificação precisa de detecção única foi de até 3,02 ordens de magnitude (0,02-20,8 IU/ml). Este método ampliou significativamente a faixa dinâmica linear para detecção única em comparação com o método de detecção quantitativa ELISA anti-HBc, como descrito no Exemplo 1, de modo que o número de diluições requeridas para detecção as amostras com alto anti-HBc foi notavelmente reduzido, e a eficiência foi melhorada. Este método difere do método de detecção quantitativa anti-HBc CVLEIA como descrito no Exemplo 2 no qual o tubo único para detecção é utilizado, e quando o equipamento totalmente automático foi montado, poderia ser utilizado para levantar a detecção de qualquer

período na clínica.

[0055] No exemplo 4, o método de detecção quantitativa anti-HBc foi aplicado para avaliar a distribuição do nível de anti-HBc no soro da pessoa infectada com HBV de fases diferentes. Os resultados da avaliação mostraram que nas pessoas infectadas com o vírus da hepatite B crônica, o nível anti-HBc no soro relatado para a atividade de hepatite e estado imune do hospedeiro das pessoas infectadas. Assim, o nível anti-HBc poderia ser utilizado para determinar se a pessoa infectada com o vírus da hepatite B crônica estava em um estado de ativação imune ou estado ativo de hepatite, exatidão do diagnóstico (AUROC) foi 0,918 (95% CI: 0,888-0,948), e o valor limite para determinação foi 7400 IU/ml. Estes resultados mostraram que os resultados de detecção obtidos pelo método de detecção quantitativa de anti-HBc descritos na presente invenção pode auxiliar o médico clínico para determinar a fase da doença do paciente.

[0056] No exemplo 5, o método de detecção quantitativa anti-HBc foi aplicado para avaliar as mudanças dinâmicas do nível anti-HBc durante a progressão natural de pessoa infectada com o vírus da hepatite B crônica e sua relação com outros índices. Os resultados da avaliação mostraram que quando as pessoas infectadas com o vírus da hepatite B crônica tiveram atividade de inflamação de fígado, o anti-HBc e ALT aumentado quase ao mesmo tempo, o valor do pico de anti-HBc apareceu usualmente 3-8 semanas após o valor do pico ALT, mas algumas vezes poderia aparecer antes ou ao mesmo tempo como a aparência do pico ALT; durante a recuperação da fase de hepatite, ALT retornou rapidamente ao normal, enquanto o anti-HBc retornou ao nível da linha de base 12-20

semanas mais tarde. Este resultado sugere ainda que o nível anti-HBc do paciente infectado com hepatite B crônica como medido pelo método de detecção quantitativo da presente invenção poderia ser utilizado como um índice complementar para a medida de ALT, que pode auxiliar o médico clínico para determinar se os pacientes estão na fase ativa de hepatite ou tiveram atividade para hepatite dentro dos últimos 3-4 meses.

[0057] No exemplo 6, o método de detecção quantitativa anti-HBc foi aplicado para avaliar a resposta dos pacientes com hepatite B crônica aceitando a terapia de adefovir dipivoxil e interferon peguilado. Os resultados mostraram que o nível de anti-HBc antes da terapia nos pacientes com hepatite B crônica correlacionado positivamente para a taxa de soroconversão de HBeAg após a terapia: os pacientes com alto nível de anti-HBc (≥ 29000 IU/ml no exemplo) antes da terapia poderia conseguir os efeitos desejados mesmo com adefovir dipivoxil que foi barato e teve menos efeitos colaterais mas poucos efeitos terapêuticos; enquanto para os pacientes com o nível moderado (9000-29000 IU/ml no Exemplo) ou nível inferior (< 9000 IU/ml no Exemplo) de anti-HBc antes da terapia, os efeitos terapêuticos de adefovir dipivoxil foram significativamente inferior para interferon de longa ação que foi oneroso e teve altos efeitos colaterais mas foi mais potente. Nos pacientes com alto nível anti-HBc (≥ 29000 IU/ml no Exemplo) antes da terapia, o efeito de inibição de adefovir dipivoxil contra a replicação viral foi significativamente superior àquele nos pacientes com baixo nível anti-HBc (< 29000 IU/ml) antes da terapia. Este resultado sugeriu que o uso do método de detecção quantitativa da presente invenção para medir o nível de anti-

HBC das pessoas infectadas com o vírus da hepatite B crônica antes de eles aceitarem a terapia poderia prever os efeitos terapêuticos esperados após eles aceitarem a terapia de adefovir dipivoxil, interferon de longa ação ou outros fármacos tendo mecanismos similares, isto é conclusivo para guiar a escolha do fármaco terapêutica e o tempo terapêutico, melhorando, desse modo, a eficiência terapêutica.

[0058] Os exemplos a seguir descrevem adicionalmente e ilustram a presente invenção. Os exemplos pretendem ilustrar a presente invenção, e todos os reagentes, químicos ou concentrações de material biológico ativo, os pacientes utilizados e outras variantes nos exemplos são meramente para exemplificar a aplicação da presente invenção, ao invés de limitar o escopo de proteção da presente invenção.

Exemplo

1. Análise imunoabsorvente da enzima quantitativa anti-HBc, e ensaio duplo do sanduíche duplo (ELISA)

[0059] 1.1 - Preparação do antígeno imobilizado e antígeno marcado

[0060] No método, o antígeno imobilizado e o antígeno marcado como utilizado, foram o antígeno do núcleo do vírus da hepatite B (HBcAg) capaz de se ligar especificamente aos anticorpos anti-HBc em uma amostra, o antígeno poderia compreender a sequência do aminoácido de extensão completa de HBcAg (Cp183), ou poderia meramente compreender uma sequência de aminoácido da zona imuno-dominante primária de HBcAg (Cp149). O HBcAg utilizado na presente invenção foi obtido pela expressão recombinante com *E. coli* e purificação. Como a expressão e o método de purificação para o antígeno de recombinação Cp149, um pode referir aos métodos descritos por

Adam Zlotnick, et al.^[6], enquanto como a expressão e os métodos de purificação para o antígeno recombinante Cp183, um pode referir-se aos métodos descritos por na Li, et al.^[5]. Na presente invenção, o antígeno recombinante cp149 foi usualmente utilizado como antígeno immobilizado, enquanto o antígeno recombinante Cp183 foi utilizado como antígeno marcado.

1.2 - Preparação da placa de reação:

[0061] (1.2.1) o antígeno Cp149 foi diluído com a solução tampão 50mM CB, pH 9,6 (NaHCO₃/solução tampão Na₂CO₃, concentração final foi de 50 mM, valor de pH foi de 9,6), e concentração final foi de 3 µg/ml.

[0062] (1.2.2) 100 ml da solução de revestimento foram adicionados em cada poço de uma placa de ELISA com 96 poços, o revestimento em 2-8°C durante 16-24 h, então o revestimento a 37°C durante 2 horas.

[0063] (1.2.3) a solução de lavagem PBST (20 mM de PB7,4, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20) foi utilizado para realizar a lavagem uma vez. Então, 200 µl da solução bloqueadora (pH 7,4, 20 mM de Na₂HPO₄/da solução tampão NaH₂PO₄ contendo 20% de soro bovino fetal e 1% de caseína) foi adicionada em cada poço, bloqueando a 37°C durante 2 horas; e descartando a solução bloqueadora. Após secagem, a placa foi colocada em uma bolsa de folha metálica de alumínio e armazenada a 2-8°C para uso com prontidão.

[0064] 1.3 HRP marcado com o antígeno Cp183:

[0065] Método de periodato de sódio melhorado foi utilizado. Exemplo de marcador a 10 mg do antígeno recombinante Cp183 foi como a seguir.

[0066] (1.3.1) o antígeno de recombinação Cp183 (5ml) com

concentração de 2mg/l foi carregado em uma bolsa de diálise, dialisado com 50 mM da solução tampão 50mM a 4°C durante 4 horas, e a solução tampão de diálise foi trocada uma vez a cada 2 horas durante a diálise.

[0067] (1.3.2) 40 mg de HRP foi pesado precisamente, dissolvido em 2 ml de ddH₂O, após dissolução, 2 ml de 2mg/ml da solução NaI₀₄ foi adicionado, reagido a temperatura ambiente durante 30 minutos; então 40ul de etileno glicol foi adicionado, reagido a 4°C durante 30 minutos para obter uma solução de ativação HRP (10 mg/ml, 4 ml).

[0068] (1.3.3) a solução de ativação e HRP obtido na etapa 1.3.2 foi adicionado em uma bolsa de diálise com o antígeno de recombinação Cp183, misturado homogeneousmente e então dialisado com a solução tampão CB 50 mM a 4°C sob a condição de escuridão durante 6-8 horas, e a solução tampão de diálise foi alterada uma vez por 2 horas durante a diálise.

[0069] (1.3.4) 0,4ml da solução NaBH₄ (5mg/ml) foi preparado, adicionado à solução de reação marcada, obtida na etapa 1.3.3, misturada homogeneousmente, reagida a 4°C durante 2 horas sob condição de escuridão.

[0070] (1.3.5) após a etapa 1.3.4 foi completada, a solução de reação marcada foi carregada dentro de uma nova bolsa de diálise, e dialisada com solução tampão PBS a 4°C durante 4 horas.

[0071] (1.3.6) após a etapa 1.3.5 foi completada, a purificação foi realização com coluna de cromatografia S-300 HR Sephadryl como produzido pela GE Company, de modo a separar o Cp183-HRP marcado.

[0072] (1.3.7) o Cp183-HRP marcado como separado e purificado na etapa 1.3.6 foi concentrado a 2mg/ml, então

glicerol foi adicionado em uma proporção de volume de 1:1, misturado homogeneamente e armazenado a -20°C para uso de prontidão.

[0073] (1.3.8) o Cp183-HRP marcado obtido na etapa 1.3.7 foi diluído com o tampão de diluição marcado com enzima (pH 7,4; 20 mM de Na₂HPO₄/solução tampão NaH₂PO₄ contendo 20% de soro bovino fetal, 1% de caseína, 10% de sucrose, 0,05% de aminopirina) em uma proporção de volume de 1/4000 para obter de uma solução de reação marcada com enzima, que foi misturado homogeneamente e armazenado a 2-8°C durante o uso de prontidão.

1.4 amostras padrões quantitativas:

[0074] As amostras padrões quantitativas para a detecção quantitativa anti-HBc consistiu de uma série de amostras do anticorpo da proteína do núcleo do vírus da hepatite B com concentrações diferentes. A unidade de concentração poderia ser IU/ml, PEIU/ml ou poderia ser quaisquer outras unidades de concentração ou titulação cuja fonte possa ser traçada. Na presente invenção, a unidade internacional comum (IU/ml) foi utilizada como unidade para a quantificação anti-HBc, amostra padrão WHO de anti-HBc (Código: 95/522, 50IU/ampola) descrito por NIBSC^[7] foi diluída serialmente para alcançar 40 IU/mL, 20 IU/mL, 10 IU/mL, 5 IU/mL, 2.5 IU/mL, 1.25 IU/mL, 0.625 IU/mL, 0.3125 IU/mL, 0.156 IU/mL, 0.078 IU/mL, 0.039 IU/mL, 0.02 IU/mL, 0.01 IU/mL, ou seja, um total de 13 concentrações diferentes. A solução de substrato utilizado por diluição da amostra padrão poderia ser o plasma do sangue ou soro a partir do doador de sangue saudável anti-HBc negativo, ou poderia ser a solução PBS contendo 20% do soro bovino fatal.

[0075] 1.5 Detecção quantitativa ELISA de anti-HBc

[0076] Uma amostra do soro (No.: P1) do paciente com hepatite B crônica foi provido, e a detecção quantitativa anti-HBc foi realizada de acordo com as etapas a seguir. Em vista do fato que os pacientes de hepatite B crônico usualmente teve nível relativamente alto de anti-HBc, a amostra foi diluída com a solução PBS contendo 20% do soro bovino fetal para alcançar 4 taxas de diluição: 1:500, 1:2500, 1:12500, 1:62500, e então utilizado para detecção quantitativa ELISA.

[0077] (1.5.1) reação da amostra: uma placa ELISA revestida foi provida, 90 μ l da solução de diluição da amostra foi adicionada para cada poço, 10 μ l da amostra ou amostra padrão foi também adicionada em cada poço, agitada e misturada, então incubada e reagida a 37°C durante 30 minutos.

[0078] (1.5.2) reação marcada com enzima: após a etapa 1.5.1 ser completada, a placa ELISA foi lavada com solução de lavagem PBST (20mM PB7.4, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20) por 5 vezes, cada poço foi adicionado com 100 μ l da solução de reação marcada com enzima como obtida na etapa 1.3.8, incubada e reagida a 37°C por 30 minutos.

[0079] (1.5.3) reação de desenvolvimento de cor: após a etapa 1.5.2 ser completada, a placa de ELISA foi lavada com a solução de lavagem PBST (20mM PB7.4, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20) por 5 vezes, cada poço foi adicionado com 50 μ l do agente de desenvolvimento de cor (provisto pela Beijing Wantai Biological Pharmacy Co., Ltd.) incubado e reagido a 37°C por 15 minutos.

[0080] Reação de parada e valor de leitura: após a etapa 1.5.3 ser completada, cada poço da placa de ELISA foi adicionada com 50 μ l da solução de parada (provista pela

Beijing Wantai Biological Pharmacy Co., Ltd.) e o valor OD_{450/630} de cada poço foi detectado com um leitor de placa.

[0081] (1.5.5) curva padrão quantitativa esboçada: após etapa 1.5.4 ser completada, os valores medidos de 13 amostras padrões quantitativas e concentrações correspondentes dos mesmos foram submetidos a regressão linear, e a curva padrão quantitativa da figura 1 foi desenhada. De acordo com a figura 1, o método ELISA anti-HBc teve um limite superior de 2,5 IU/ml e um limite inferior de 0,04 IU/ml para quantificação precisa, e sua faixa dinâmica linear foi de 1,8 ordens de magnitude. A fórmula para calcular a concentração anti-HBc a partir da medida do valor OD_{450/600} foi: Conc._{anti-HBc} (IU/mL) = 1.2104 X OD_{450/630} - 0,011.

[0082] (1.5.6) obtenção de concentração anti-HBc da amostra a ser testada: as amostras diluídas serialmente do soro P1 foram submetidos às etapas 1.5.1 a 1.5.5, então o valor medido OD_{450/630} para taxa de diluição de 1:500 foi 3,899; a medida do valor OD_{450/630} para a taxa de diluição de 1:2500 foi 3,801; a medida do valor de OD_{450/630} para taxa de diluição de 1:12500 foi de 2,988, o valor OD_{450/630} medido para a taxa de diluição e 1:62500 foi 0,301; os valores medidos acima foram introduzidos dentro da fórmula para calcular a concentração anti-HBc como obtida na etapa 1.5.5, e o valor de concentração para a taxa de diluição de 1:500 foi 4,71 IU/ml, o valor de concentração para a taxa de diluição de 1:2500 foi 4,59 IU/ml, o valor de concentração para a taxa de diluição de 1:12500 foi de 3,61 IU/ml, o valor de concentração para a taxa de diluição e 1:62500 foi 0,35 IU/ml. O valor de concentração medido para a taxa de diluição de 1:612500 estava dentro da faixa dinâmica linear (0,04-2,5

IU/ml) para quantificação precisa do método ELISA. Portanto, a concentração original anti-HBc da amostra foi $0,35 \times 62500 = 22083$ IU/ml.

[0083] Avaliação da precisão do ensaio-intra do método de detecção: 6 amostras com concentrações conhecidas foram providas, as quais tiveram valores quantificados anti-HBc de 5 IU/ml, 2,5 IU/ml, 1,25 IU/ml, 0,625 IU/ml, 0,3125 IU/ml, 0,156 IU/ml, e no mesmo teste, cada uma das amostras foram repetidamente detectada nos 16 poços de acordo com as etapas 1.5.1 para 1.5.4, e o coeficiente variável intra-ensaio da medida dos valores $OD_{450/630}$ de cada amostra foi separadamente calculada após detecção, e mostrado na figura 2A, que indicou que os coeficientes variáveis de intra-análise de 6 amostras foram entre 2,8% e 10,1%.

[0084] (1.5.8) avaliação da precisão de inter-análise do método de detecção: 6 amostras com concentrações conhecidas foram providas, as quais tiveram valores quantificados anti-HBc de 5 IU/ml, 2,5 IU/ml, 1,25 IU/ml, 0,625 IU/ml, 0,3125 IU/ml, 0,156 IU/ml. As amostras 6 acima foram submetidos a 16 testes de detecção independentes de acordo com as etapas 1.5.1 a 1.5.4, após todos os testes foram completados, o coeficiente variável inter-análise da medida dos valores $OD_{450/630}$ de cada amostra foi separadamente calculado, e mostrado na figura 2B, o que indicou que o coeficiente variável inter-análise de 6 amostras estavam entre 4,4% e 10,5%.

[0085] (1.5.9) avaliação da repetibilidade da detecção quantitativa anti-HBc: 104 amostras do soro dos pacientes de hepatite B crônica (nível anti-HBc estava entre $2,23 \log_{10}$ IU/ml para $5,37 \log_{10}$ IU/ml) foram selecionados

aleatoriamente, e submetidos a detecção quantitativa anti-HBc de acordo com as etapas 1.5.1 a 1.5.6, a detecção foi independentemente repetida duas vezes, e os resultados de dois testes de detecção foram submetidas para análise de regressão, e mostradas na figura 3, que indicou que os resultados de dois testes de detecção foram altamente consistentes, $R^2 = 0,988$.

2. Método (CLEIA) de imunoensaio de enzima ligada quimioluminescente quantitativo anti-HBc, análise de sanduiche duplo antígeno:

2.1. Preparação do antígeno imobilizado e antígeno marcado:

[0086] O método da seção 1.1 do Exemplo 1 da presente invenção foi utilizado para realizar a preparação.

2.2. Preparação da placa de reação quimioluminescente:

[0087] O método da seção 1.2 do Exemplo 1 da presente invenção foi utilizado, com exceção que a placa de reação quimioluminescente foi utilizada como o suporte sólido para o antígeno.

2.3 HRP marcado de antígeno Cp183

[0088] O método e as etapas da seção 1.3 do Exemplo 1 da presente invenção foram utilizados.

2.4 Quantificação da amostra padrão

[0089] A quantificação das amostras padrões foram as mesmas que aquelas da seção 1.4 do Exemplo 1 da presente invenção.

2.5 Detecção quantitativa CLEIA de anti-HBc

[0090] Uma amostra de soro (no.: P1) do paciente de hepatite B crônico foi provido, e a detecção quantitativa do anti-HBc foi realizada de acordo com as etapas a seguir. Em vista do fato de que os pacientes com hepatite B crônica usualmente terem nível relativamente alto de anti-HBc, a

amostra foi diluída com solução PBS contendo 20% de soro bovino fetal para alcançar 3 taxas de diluição: 1:500, 1:2500, 1:12500, e então utilizado para detecção CLEIA quantitativa.

[0091] Reação da amostra: uma placa de reação quimioluminescência revestida foi provida, cada poço foi adicionado com 90 μ l da solução de diluição da amostra, cada parede foi então adicionada com 10 μ l da amostra ou amostra padrão, agitada e misturada homogeneousmente, então incubada e reagida a 37°C durante 30 minutos.

[0092] (2.5.2) reação marcada com enzima: após a etapa 2.5.1 ser completada, a placa de reação quimioluminescente foi lavada com solução de lavagem PBST (20mM de PB7.4, 150mM de NaCl, 0,1% de Tween20), por 5 vezes, cada poços foi adicionado com 100 μ l da solução de reação marcada com enzima como preparada na etapa 1.3.8, incubada e reagida a 37°C durante 30 minutos.

[0093] (2.5.3) reação luminescente e medida: após a etapa 2.5.2 ser completada, a placa de reação quimioluminescente foi lavada com solução de lavagem PBST (20mM PB7.4, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20) por 5 vezes, cada poço foi adicionado com 100 μ l do substrato quimioluminescente PICO como fabricado por Pierce Company, e o valor luminescente (RLU) de cada poço de reação foi imediatamente lido com detector quimioluminescente Orin II.

[0094] (2.5.4) desenho da curva padrão quantitativa: após a etapa 2.5.3 ser completada, o valor medido de 13 amostras padrão quantitativa e correspondentes concentrações dos mesmos, foram submetidos à regressão, e a curva padrão quantitativa da figura 4 foi desenhada. De acordo com a

figura 4, o método CLEIA anti-HBc teve um limite superior de 20 IU/ml e um limite inferior de 0,04 IU/ml para quantificação precisa, e sua faixa dinâmica linear foi da ordem de 2,7 magnitudes. A fórmula para calcular a concentração anti-HBc a partir do valor RLU medido foi: conc.anti-HBc (IU/mL) = $10^{(\text{Log}_{10}(\text{RLU}) \times 0,9337 - 5.3006)}$.

[0095] (2.5.5) obtenção da concentração anti-HBc da amostra a ser testada: as amostras serialmente diluídas de soro P1 foram submetidas à medida das etapas 2.5.1 a 2.5.4, o valor RLU medido para taxa de diluição de 1:500 foi 5067890; o valor RLU medido para a taxa de diluição de 1:12500 foi de 889610; os valores medidos acima foram introduzidos dentro da fórmula para calcular a concentração de anti-HBc como obtida na etapa 2.5.4, e o valor de concentração para a taxa de diluição 1:500 foi 20,56 IU/ml, o valor de concentração para a taxa de diluição de 1:2500 foi de 9,114 IU/mL, o valor de concentração para a taxa de diluição de 1:12500 foi de 1,795 IU/ml, onde os valores medidos para as taxas de diluição de 1:2500 e 1:12500 estavam dentro da faixa dinâmica linear (0,04-20 IU/ml) para quantificação precisa do presente método CLEIA. Consequentemente, quando o valor medido para a taxa de diluição de 1:2500 foi utilizado para cálculo, a concentração original anti-HBc da amostra foi $9,114 \times 2500 = 22784$ IU/ml; enquanto quando o valor medido para a taxa de diluição de 1:12500 foi utilizado para cálculo, a concentração original anti-HBc da amostra foi $1,795 \times 12500 = 22442$ IU/ml. A concentração média de dois valores medidos foi de 22613 IU/ml, e este valor de concentração é o valor de concentração de 22083 IU/ml como medido pelo método ELISA para a amostra ter um erro de 2,4%, que estava na faixa de variação normal.

3. Análise duplo sanduíche do antígeno - método de imunoensaio quimioluminescente de micropartícula tubular quantitativa anti-HBc.

3.1. Preparação do antígeno imobilizado e do antígeno marcado [0096] O método da seção 1.1 do Exemplo 1 da presente invenção foi utilizado para realizar a preparação.

3.2 Preparação da placa de reação de quimioluminescente [0097] (3.2.1) 1 mg de contas magnéticas foram providas, lavadas duas vezes com 1ml do sistema de tampão de ativação (50 mM MÊS 5,0), e o sobrenadante foi descartado. 1mg de EDC e 1mg do agente NHS (cada um foi preparado com 50mM de MÊS 5,0 para alcançar 10 mg/ml) foram adicionados, misturados homogeneamente, agitados a temperatura ambiente e ativado por 20 minutos.

[0098] (3.2.2) as contas magnéticas ativadas foram lavadas duas vezes com 1 ml do sistema tampão de ativação (50 mM de MÊS 5.0), e o sobrenadante foi descartado. 25 μ g do antígeno Cp149 foram adicionados, misturado homogeneamente, agitado a temperatura ambiente e reagido pro 3 horas.

[0099] (3.2.3) solução de lavagem PBST (20mM de PB7.4, 150mM de NaCl, 0,1% de Tween 20) foi utilizado para realizar a lavagem por 3 vezes. Então, cada poço foi adicionado com 2500 μ l da solução conservante (20mM de PB7.4, 0,1% BSA, 100mM de Gli, 0,05% TW-20, 0,1% Proclin), e armazenado a 2-8°C para uso de emergência.

3.3 éster de acridínio marcador do antígeno Cp183

[0100] (3.3.1) 50 μ g da proteína Cp183 foi provida, adicionado a 300 μ l do sistema tampão marcado (50 mM de tampão fosfato, pH 8.0), adicionado com 8 μ l de éster acridínio (5mM de NHS-SAE), e reagido sob condição de escuridão em

temperatura ambiente para 30 minutos.

[0101] (3.3.2) 100 μ l da solução tampão de parada (tampão fosfato contendo 100mM de glicina, pH 8.0) foi adicionado à mistura reagida na etapa (3.3.1), e reagida sob condição de escuridão em temperatura ambiente durante 30 minutos.

[0102] (3.3.3) a proteína marcada obtida na etapa (3.3.2) foi carregada em uma bolsa de diálise, dialisado com solução tampão de diálise (20mM da solução tampão de fosfato, pH 7,4) a 4°C sob condição de escuridão por 6-8 horas, nas quais a solução de tampão de diálise foi alterada uma vez a cada 2 horas.

[0103] (3.3.4) a proteína marcada obtida na etapa (3.3.3) foi transferida em um tubo de conservante, adicionado com 2% de BASA e 50% de glicerol, e armazenado a -20°C para uso de emergência.

[0104] (3.3.5) o Cp183-SAE marcado obtido na etapa 3.3.4 foi diluído em uma proporção de volume de 1/500 com uma solução tampão de diluição de éster de acridínio marcado (20mM de da solução de tampão Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ contendo 20% de soro bovino fetal, 1% de caseína, 10% de sucrose, 0,05% de aminopirina, pH 7.4), para formar uma solução de reação luminescente marcada, que é misturada homogeneousmente e armazenada em 2-8°C para uso de emergência.

3.4 amostra padrão quantitativa

[0105] A amostra P1 com concentração conhecida de anti-HBc (anti-HBc = 22083 IU/ml) foi provida, diluída de maneira serial com solução PBS contendo 20% de soro bovino fetal, e separadamente diluído para alcançar 4000 IU/mL, 1333 IU/mL, 333 IU/mL, 83,3 IU/mL, 20,8 IU/mL, 5,21 IU/mL, 1,30 IU/mL, 0,33 IU/mL, 0,08 IU/mL, 0,02 IU/mL, 0,005 IU/mL, como

amostras padrões quantitativas do método CLIA.

3.5 detecção quantitativa CLIA de anti-HBc

[0106] Uma amostra de soro (No.: P2) do paciente de hepatite B crônica foi provida, e a detecção quantitativa anti-HBc foi realizada de acordo com as etapas a seguir. Em vista do fato de que os pacientes com hepatite B crônica usualmente tem nível relativamente alto de anti-HBc, a amostra foi diluída com solução PBS contendo 20% do soro bovino fetal para alcançar 2 taxas de diluição: 1:500, 1:2500, e então utilizado para detecção CLIA quantitativa. A amostra P2 foi submetida ao método de detecção quantitativa ELISA anti-HBc do exemplo 1 e sua concentração anti-HBc foi determinada como 8069 IU/mL.

[0107] (3.5.1) reação da amostra: 50 μ l da contas magnéticas foram providos e adicionados à um tubo de reação, cada poço foi então adicionado com 10 μ l da amostra ou amostra padrão, agitada e misturada homogeneamente, incubada e reagida a 37°C por 15 minutos.

[0108] (3.5.2) reação luminescente marcada: após a etapa 3.5.1 ser completada, uma placa de reação quimioluminescente foi lavada por 5 vezes com solução de lavagem PBST (20 mM de PB7.4, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20), cada poço foi adicionado com 50 μ l da solução de reação luminescente marcada como preparado na etapa 3.3.5, incubada e reagida a 37°C por 10 minutos.

[0109] (3.5.3) reação luminescente e medida: após a etapa 3.5.2 ser completada, a placa de reação quimioluminescente foi lavada por 5 vezes com solução de lavagem PBST (20mM de PB7.4, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20), injetada *in situ*, com solução de excitação usando detector de

quimioluminescência de tubo único Sirius-L, e a intensidade da luz foi detectada ao mesmo tempo.

[0110] (3.5.4) desenho da curva padrão quantitativa: após a etapa 3.5.3 ser completada, os valores medidos de 11 amostras quantitativas padrão e concentrações correspondentes das mesmas foram submetidas a uma regressão linear, e a curva padrão quantitativa da figura 5 foi desenhada. De acordo com a figura 5, o método de detecção quimioluminescente de micropartícula anti-HBc (CLIA) teve um limite superior de 20,8 IU/ml e um limite inferior de 0,02 IU/ml para quantificação precisa e sua faixa dinâmica linear foi da ordem de 3,02 amplitudes. A fórmula para calcular a concentração anti-HBc a partir de um valor RLU medido foi: Conc.anti-HBc (IU/mL) = $10^{(\text{Log}_{10}(\text{RLU}) \times 1.1409 - 5.861)}$.

[0111] (3.5.5) obtenção da concentração de anti-HBc da amostra a ser testada: as amostras serialmente diluídas do soro P2 foram submetidas para medida das etapas 3.5.1 a 3.5.4, o valor medido RLU para taxa de diluição de 1:500 foi 1571400; o valor RLU medido para taxa diluição de 1:2500 foi 380560; os valores medidos acima foram introduzidos dentro da fórmula para calcular a concentração anti-HBc como obtido na etapa 3.5.4, e o valor de concentração para a taxa de diluição de 1:500 foi 16,16 IU/ml, o valor da concentração para taxa de diluição de 1:2500 foi 3,204 IU/mL, ambos os quais estando dentro da faixa dinâmica linear (0,02-20,8 IU/mL) para quantificação precisa do método CLIA. Consequentemente, quando o valor medido para taxa diluição de 1:500 foi utilizado para calcular, a concentração anti-HBc original da amostra foi $16,16 \times 500 = 8070$ IU/ml; enquanto quando o valor medido para a taxa de diluição de 1:2500 foi

utilizado para calcular, a concentração anti-HBc original da amostra foi $3,204 \times 2500 = 8010$ IU/ml. A concentração média de dois valores medidos foi 8044 IU/ml, e este valor de concentração e o valor de concentração e 8069 IU/ml como medido pelo método ELISA para a amostra teve um erro de 3,1%, que estava na faixa de variação normal.

4. Distribuição dos níveis anti-HBc no soro de pessoas infectadas por HBV das diferentes fases.

4.1. Seleção de pacientes representativos das amostras do soro.

[0112] Na presente invenção, de modo a estudar a distribuição dos níveis de anti-HBc das pessoas infectadas por HBV de fases diferentes, 350 amostras do soro de pessoas saudáveis que tiveram infecção por HBV no passado e se curaram e 488 amostras de soro de pacientes com hepatite B crônica foram coletados, e todas as amostras dos oro foram armazenadas a -80°C após o soro ser separado. Entre os 488 pacientes, 109 pacientes forma pacientes com câncer de fígado primário, 63 pacientes foram pacientes com cirrose de fígado, 316 pacientes residuais forma pacientes com hepatite B crônica, e todos os pacientes foram escolhidos para excluir as possibilidades de ter infecção acompanhada do vírus da hepatite C (HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite D (HDV), vírus da hepatite E (HEV), e não teve evidência médica clínica de ter doenças de fígado metabólica ou autoimune acompanhada.

[0113] De acordo com o guia para "Gerenciamento Clínico de Hepatite B crônica" (2009) ("Chronic Hepatitis B Clinic Management") da Associação Europeia para estudo do fígado, os 316 pacientes com hepatite B crônica simples forma divididos

dentro das diferentes fases de infecção, nas quais 52 pacientes estavam na fase da imuno-tolerância (IT), os quais foram caracterizados com idade menor que 35, HBeAg positivo, carga de DNA HBV no soro maior que 5×10^7 cópias/ml, nível ALT como medido durante os últimos 12 meses com quase menos que o limite superior do normal (ULN, ou seja, 40 U/L na presente invenção); 104 pacientes estavam na fase de liberação-imune (IC), os quais foram caracterizados com HBeAg positivo, carga de DNA HBV no soro maior que 1×10^4 cópias/mL, nível ALT maior que 2 vezes ULN; 75 pacientes estavam na fase baixo-replicativa (LR), os quais foram caracterizados com HBeAg negativo, carga DNA HBV no soro menor que 1×10^4 cópias/ml, nível ALT como medido durante os últimos 12 meses quase menor que ULN; 85 pacientes estavam na fase de hepatite HBeAg negativa, os quais foram caracterizados com HBeAg negativa, carga de DNA HBV no soro maior que 2×10^4 cópias/ml, e nível ALT maior que 2 vezes ULN.

4.2 método de exame clínico

[0114] O nível ALT no soro e outros índices bioquímicos da função do fígado de pacientes foram medidos 24 horas após a coleta da amostra; a carga de DNA HBV no soro e a detecção do genótipo HBV foram realizadas pelo uso de métodos como relatado nos documentos da técnica anterior; a quantificação HBsAg foi realizada pelo uso do kit de quantificação quimioluminescente HBsAg da Beijing Wantai Biological Pharmacy Co., Ltd., HBeAg e anti-HBe foram medidos com o sistema de detecção quimioluminescente Architect da Abbott Laboratories, dos EUA.

[0115] 4.3 A quantificação anti-HBc das amostras de soro dos pacientes.

[0116] Foi realizado usando os métodos do Exemplo 1, Exemplo 2, ou Exemplo 3 da presente invenção.

4.4 Método Estatístico

[0117] A comparação das variáveis contínuas entre os grupos foi realizada usando o Teste-t não pareado, ou Kruskal-Wallis ANOVA; a comparação das variáveis classificadas entre os grupos foi realizada usando o teste Mantel-Haenszel X² ou teste exato de Fisher; e o teste Pearson foi utilizado para análise da correlação. A análise da precisão do diagnóstico foi realizada usando o receptor da característica de operação (ROC), e a eficiência de diagnóstico foi calculada (área sob a curva ROC, AUROC). O valor p menor que 0,05 foi considerado como tendo diferença estatística significante.

4.4 Características Básicas de coorte de paciente

[0118] Os dados antecedentes da estatística da população, virologia clínica e a bioquímica do sangue das pessoas infectadas por HBV no passado e por veículos HBV crônicos como descritos na seção 4.1 estão mostrados na tabela 1.

Tabela 1

Dados antecedentes da estatística da população, virologia clínica e bioquímica de sangue das pessoas infectadas HBV de fases diferentes.

Fase da doença: Número de pacientes:	Ultimo HBV (n=350)	Fase de tolerância- Imune (n=52)	Fase de Liberação - Imune (n=104)	Fase de baixa replicação (n=75)	Hepatite do antígeno E negativo (n=85)	Cirrose da Hepatite B (n=63)	Câncer de fígado por Hepatite B primária (n=109)
idade, anos, mediano (faixa)	36 (1-59)	22 (4-35)	33 (10-65)	46 (11-75)	42 (17-82)	51 (26-77)	51 (35-77)
gênero, macho/fêmeas	156/194	26/26	84/20	46/29	70/16	47/16	96/13
genótipo, B/C	--	36/16	71/33	34/14 ^a	56/29	24/39	52/57
HBeAg-positivo, n (%)	0	52(100)	103(100)	0	0	20(32)	21(19.2)
ALT, U/L, mediano (faixa)	14 (6-40)	24 (10-39)	266 (81-3525)	21 (8-38)	460 (80-4093)	56 (11-1831)	59 (18-1337)
Elevação ALT(> 40 U/L), n (%)	0	0	104 (100)	0	85 (100)	39 (62)	80 (73)
HBV DNA- positivo, %	0	100	100	100	100	100	100
Log ₁₀ cópias/mL, mediano (faixa)	--	8.6 (7.4-9.6)	7.2 (3.6-9.6)	2.9 (0.3-3.7)	5.4 (3.1-9.3)	4.7 (1.0-8.8)	4.9 (0.4-7.5)
HBsAg-positivo, %	0	100	100	100	100	100	100
Log ₁₀ IU/mL, mediano (faixa)	--	4.7 (3.5-6.0)	3.9 (0.9-5.7)	2.8 (0.1-4.2)	3.6 (-0.3-5.6)	3.3 (0.8-5.2)	3.2 (-0.2-3.9)
Anti-HBc- positivo, %	100	100	100	100	100	100	100
Log ₁₀ IU/mL, mediano (faixa)	0.4 (-0.6-2.5)	3.4 (0.1-4.2)	4.4 (2.7-5.3)	3.3 (1.1-4.5)	4.4 (2.0-5.2)	4.1 (2.3-5.3)	4.0 (2.1-5.6)

Anotação: ^a uma vez que a carga foi excessivamente baixa, genótipos HBV de 27 pacientes na fase de baixa replicação (LR) não foram determinados com sucesso.

4.5 níveis de anti-HBc no soro de pessoas infectadas com HBV de fases diferentes.

[0119] As figuras 6A/B mostraram as situações da distribuição do nível anti-HBc no soro, o nível ALT, o nível HBsAg e a carga de DNA HBV dos pacientes representativos de fases diferentes da doença. As pessoas infectadas no passado tiveram o nível de anti-HBc no soro significativamente menor que os veículos HBV crônicos (valor mediano: 0,4 versus 4,1 \log_{10} IU/ml, $p<0,001$, menor que 1000 vezes); entre os pacientes de hepatite crônica B simples de fases de infecção diferentes, níveis anti-HBc do soro foram diferentes significativamente. O valor mediano do nível de anti-HBc no soro dos pacientes da fase imune-tolerante foi $3,4 \log_{10}$ IU/ml, o valor mediano do nível anti-HBc no soro de pacientes da fase de liberação imune foi $4,4 \log_{10}$ IU/ml, o valor mediano do nível de anti-HBc no soro de pacientes com fase de baixa replicação foi de $3,3 \log_{10}$ IU/ml, e o valor mediano do nível anti-HBc no soro de pacientes na fase de hepatite HBeAg negativa foi de $4,4 \log_{10}$ IU/ml. A análise dos dados acima mostraram que os níveis anti-HBc no soro de pacientes da fase de liberação-imune e fase de hepatite HBeAg negativa são significativamente maiores que aquelas de pacientes da fase de imuno-tolerância e da fase de baixa replicação ($p <0,001$); não existe diferença estatística entre os níveis anti-HBc no soro de pacientes da fase de imuno-liberação e da fase de hepatite HBeAg negativa ($p> 0,05$), e não existe diferença estatística entre os níveis de anti-HBc no soro dos pacientes da fase de imuno-tolerância e da fase de baixa replicação, mesmo ($p > 0,05$). Os resultados acima mostram que os níveis anti-HBc no soro de pacientes com hepatite B crônica são

altamente correlativos ao estado imune do hospedeiro. O nível alto de anti-HBc indica que os pacientes são do estado imune-ativo do anti-HBV, quando o nível anti-HBc é utilizado para determinação se um indivíduo único está no estado imune-ativo (fase de imuno-liberação ou fase de hepatite HBeAg negativa), eficiência de diagnóstico (AUROC, área sob a curva) é 0,918 (95% do intervalo de confidência: 0,888-0,948) via análise de curva ROC (ver figura 6C). Quando o valor otimizado de corte de 7400 IU/ml como calculado usando a curva ROC é utilizado como o valor limite, a sensibilidade de diagnóstico é 87,3%, e a especificidade de diagnóstico é 83,5%.

[0120] Os níveis de anti-HBc no soro dos pacientes com cirrose por hepatite B e pacientes com câncer de fígado primário por hepatite B foram analisados e os resultados são mostrados na figura 6A/B. entre os pacientes com cirrose por hepatite B, o nível de anti-HBc no soro de 39 pacientes tendo $ALT \geq ULN$ (grupo LC-b) foi significativamente maior que o dos 24 pacientes tendo $ALT < ULN$ (grupo LC-a) (valor mediano foi de: $4,2 \log_{10}$ versus $3,8 \log_{10}$ IU/ml, $p = 0,016$); enquanto entre os pacientes com câncer de fígado primário por hepatite B, o nível de anti-HBc no soro de 80 pacientes tendo $ALT \geq ULN$ (grupo HCC-b) foi significativamente maior que o dos 29 pacientes tendo $ALT < ULN$ (grupo HCC-a) (valor mediano foi de: $4,1 \log_{10}$ versus $3,8 \log_{10}$ IU/ml, $p = 0,006$). Os resultados acima confirmam adicionalmente que o nível anti-HBc no soro das pessoas infectadas com o vírus da hepatite crônica é significativamente correlacionado ao nível ALT e ao estado imune do hospedeiro.

4.6 Correlação do nível anti-HBc e do nível ALT em veículos do vírus da hepatite B crônica.

[0121] Os níveis de anti-HBc no soro de diferentes pacientes estratificados ALT entre todos os 488 veículos do vírus da hepatite B crônica (incluindo os pacientes da hepatite B crônica simples, pacientes com cirrose por hepatite B e pacientes com câncer de fígado primário por hepatite B, n=488) foram analisados, e os resultados estão mostrados na figura 6D. Entre os pacientes com $ALT \leq 5 \times ULN$, o nível anti-HBc médio de pacientes aumentou com o aumento do nível ALT (tendência $p < 0,001$); enquanto quando o ALT alcançou $5 \times ULN$, o nível anti-HBc no soro alcançou o valor mais alto e não aumento mais (tendência $p = 0,63$). A análise de correlação mostrou (Figura 6E) que nos pacientes com $ALT \leq 5 \times ULN$ (n=328), a média do nível anti-HBc no soro foi na correlação positiva com o nível ALT (análise de fator único: $r = 0,52$, $p < 0,001$; análise de múltiplo fator: $R = 0,53$, $p < 0,001$), mas não em correlação com o nível de DNA HBV ($p = 0,25$) ou nível HBsAg ($p = 0,33$). Em pacientes com $ALT \leq 5 \times ULN$, a correlação quantitativa entre o nível anti-HBc e o nível ALT quase existe tanto nos pacientes machos ($r = 0,53$, $p < 0,001$) quanto nos pacientes fêmeas ($r = 0,43$, $p < 0,001$); tanto nos pacientes infectados com o genótipo B de HBV ($r = 0,49$, $p < 0,001$) quanto em pacientes infectados com genótipo C de HBV ($r = 0,53$, $p < 0,001$); tantos nos pacientes HBeAg positivos ($r = 0,57$, $p < 0,001$) quanto paciente HBeAg negativos ($r = 0,50$, $p < 0,001$). Quando $ALT > 5 \times ULN$ (n=160), o nível anti-HBc não correlaciona estatisticamente significante com o nível ALT ($p = 0,43$), e não está correlacionado ao nível de DNA HBV ($p = 0,63$) quanto ao nível HBsAg ($p = 0,43$) também.

[0122] 5. Mudança dinâmica do nível anti-HBc no soro e relação do mesmo com os outros indicadores durante a

progressão natural do veículo do vírus da hepatite B crônica.

5.1 coorte no paciente.

[0123] Neste exemplo, uma série de amostras do soro para observação vertical da progressão natural dos 9 pacientes no total, que não aceitaram a terapia anti-HBV foram estudados, período de observação média foi de $103+38$ semanas (57-168 semanas), seguindo-se as visitas realizadas pro 5-17 vezes, e 77 amostras do soro foram utilizadas.

5.2 método de detecção clínica

[0124] Foi realizado de acordo com o método descrito na seção 4.2 do Exemplo 4.

5.3 quantificação anti-HBc das amostras do soro de pacientes.

[0125] Foi realizado de acordo com o método descrito na seção 4.3 do Exemplo 4.

5.4 Métodos estatísticos

[0126] A análise de dados verticais foi realizada usando a equação de estimativa generalizada (GEE), e outros métodos estatísticos foram realizados de acordo com aqueles descritos no Exemplo 4.

5.5 mudança dinâmica dos marcadores no soro e a relação entre eles durante a progressão natural dos veículos do vírus da hepatite B crônica.

[0127] A mudança dinâmica de níveis anti-HBc, níveis ALT, níveis HBsAg e a carga de DNA HBV no soro de 9 pacientes (A até G) durante o período de observação a seguir estão mostrados na figura 7. O paciente a foi da fase da imunotolerância durante o período de observação a seguir, cuja carga de DNA HBV no soro e o HBsAg foram quase os níveis mais altos, enquanto o nível ALT e o nível anti-HBc foram constantemente os níveis mais baixos. Exceto para o paciente

a, outros pacientes (B a G) foram todos submetidos a um ou mais vezes a ativação de hepatite. Através da observação destes pacientes, foi encontrado que o aumento do nível anti-HBC foi constantemente acompanhado com o aumento do nível ALT, ou seja, acompanhado com a ocorrência da hepatite. Em muitas situações, quando o ataque agudo de hepatite ocorreu, o nível e anti-HBC no soro de pacientes usualmente alcança o valor de pico em 3-8 semanas mais tarde do que o nível ALT (Figura 7, por exemplo, as situações do paciente C, primeiro período do paciente D, primeiro período do paciente f, e pacientes G e I); em alguns casos, o nível de anti-HBC no soro de pacientes poderia alcançar o valor do pico mais cedo ou no mesmo, em comparação com o nível ALT (Figura 7, por exemplo, as situações de paciente B, paciente D, segundo período do paciente F e paciente H, paciente E). Durante a fase de recuperação da hepatite, a diminuição de anti-HBC foi menor que ALT, e anti-HBC usualmente retornou ao nível da linha de base 12-20 semanas após o ALT retornar ao normal.

[0128] Em geral, a análise de dados de múltiplos fatores verticais mostrou que o nível anti-HBC no soro são independentemente correlacionados com o nível ALT ($\beta=0,65$, $P<0,001$), mas não teve correlação estatisticamente significante com a carga de DNA HBV no soro ($\beta = 0,006$, $p = 0,98$), e nível HBsAg ($\beta = -0,034$, $p = 0,45$).

[0129] 6. Nível anti-HBC pode ser utilizado para prever os efeitos da terapia anti-viral em pacientes com hepatite B crônica.

6.1 coorte de paciente

[0130] O coorte de paciente A: 49 pacientes HBeAg positivo, todos os pacientes aceitaram a terapia de adefovir dipivoxil

(10mg/dia), durante 96 semanas no total, e foram visitados seguidamente por 2 semanas após a interrupção da terapia.

[0131] Coorte de paciente B: 48 pacientes HBeAg positivo, todos os pacientes aceitaram a terapia de interferon-peg alfa-2a (interferon de longa ação α -2a, 180 μ g/semana) adefovir dipivoxil (10mg/dia), durante 96 semanas no total, e foram visitados seguidamente por 2 semanas após a interrupção da terapia.

[0132] Os pacientes acima antes da terapia reuniram todos os critérios da doença adaptável para a terapia como recomendado pelo "Guia de gerenciamento clínico de hepatite B crônica de APSL: HBsAg" foi positivo por 1 ano consecutivo ou mais, HBeAg foi positivo e o anti-HBe foi negativo, o nível LAT no soro foi maior que 2 vezes de ULN; os pacientes foram escolhidos para excluir a possibilidade de ter infecção acompanhada do vírus da hepatite C (HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite D (HDV), vírus da hepatite E (HEV), e não tem evidência médica clínica de ter doenças de fígado metabólica ou autoimune acompanhadas.

6.2 método de detecção clínica.

[0133] Foi realizado de acordo com o método descrito na seção 4.2 do Exemplo 4.

6.3 quantificação anti-HBc das amostras do soro dos pacientes.

[0134] Foi realizado de acordo com o método descrito na seção 4.3 do Exemplo 4.

6.4 Definição da final terapêutico.

[0135] O fim terapêutico principal foi definido quando a soroconversão de HBeAg ocorreu no final da visita continuada.

6.5 Métodos estatísticos.

[0136] Todos os métodos estatísticos foram realizados de acordo com aqueles descritos no Exemplo 4.

6.6 Características básicas do corte de paciente.

[0137] Como mostrado na tabela 2.

Tabela 2

Características da linha de base dos pacientes com hepatite B crônica e HBeAg positivo aceitando a terapia de adefovir dipivoxil (Coorte A) e interferon-peg (Coorte B)

	COORTE A	COORTE B	VALOR P
NÃO	49	48	--
ESTRATÉGIA DE TRATAMENTO	ADV 96-WEEK	PEGASYS 24-WEEK	--
IDADE, ANO, MÉDIA (FAIXA)	35 (26~48)	35 (15~57)	0.80
GÊNERO, MACHO/FÊMEAS	44/5	35/13	0.06
GENÓTIPO, B/C	11/38	29/19	<0.001
ESTRATO ALT, >5×ULN/≤5×ULN	12/37	16/32	0.34
ALT, U/L, MÉDIA (FAIXA) ^A	110 (44~402)	168 (32~626)	0.008
HBV DNA, LOG ₁₀ CÓPIAS/ML, MÉDIA (FAIXA)	7.58 (3.97~9.29)	7.55 (3.44~9.59)	0.50
HBSAG, LOG ₁₀ IU/ML, MÉDIA (FAIXA)	4.44 (2.35~5.47)	4.06 (1.53~5.35)	0.005
ANTI-HBC-IGM, VALOR S/CO, MÉDIA (FAIXA)	2.10 (0.31~12.7)	1.78 (0.25~12.2)	0.45
ANTI-HBC, LOG ₁₀ IU/ML, MÉDIA (FAIXA)	4.29 (3.08~5.11)	3.98 (2.41~5.36)	0.15

Observação: ^a todos os pacientes foram HBeAg positivos e tiveram nível ALT maior que 2xULN durante a classificação antes da terapia; quando a terapia inicia, os níveis ALT de 11 pacientes (5 pacientes de coorte A, e 6 pacientes de coorte B) caíram para 2xULN ou menor. ADV: adefovir dipivoxil; Pegasys; interferon peguilado α-2a; ULN, limite superior do normal.

[0138] 6.7 nível anti-HBc da linha de base correlaciona com a taxa de ocorrência da soroconversão de HBeAg após a terapia.

[0139] Após a terapia e a observação de acompanhamento, 9 dos 49 pacientes do coorte A (aceitando a terapia com adefovir dipivoxil) tiveram ocorrência da soroconversão HBeAg na visita continuada, a taxa de eficácia terapêutica foi de 18,4% (95% de CI: 9,8-31,0%; enquanto 23 dos 48 pacientes de coorte B (aceitando a terapia do interferon de longa ação) tiveram a ocorrência da soroconversão de HBeAg na continuidade da visita, taxa de eficácia terapêutica foi de 47,9% (95% CI: 33,3-62,8%).

[0140] Os indicadores clínicos dos pacientes para quem a terapia foi efetiva e os pacientes para os quais a terapia foi ineficaz em dois coortes antes de aceitar a terapia foram analisados, e os resultados foram mostrados na tabela 3. Tanto para os pacientes tratados com adefovir dipivoxil quanto para os pacientes tratados com interferon de longa ação, não existiram diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes para os quais a terapia foi efetiva e para os pacientes para os quais a terapia foi ineficaz em termos de idade, proporção do gênero, nível ALT, carga de DNA HBV no soro, nível HBsAg e nível anti-HBc-IgM. Entretanto, o nível anti-HBc da linha de base dos pacientes para os quais a terapia foi efetiva foi significativamente maior que aqueles dos pacientes para os quais a terapia não foi eficaz: no coorte A, $4,58 \pm 0,28$ versus $4,15 \pm 0,42 \log_{10}$ IU/mL, $p=0,005$; no coorte B, $4,32 \pm 0,66$ versus $3,81 \pm 0,68 \log_{10}$ IU/mL, $p=0,011$. Este resultado sugere que o nível anti-HBc antes da terapia poderia prever os efeitos terapêuticos esperados dos pacientes. A análise ROC mostra que o valor AUROC para prever a soroconversão HBeAg nas visitas continuadas usando a linha de base do nível anti-HBc foi 0,810 no Coorte A (95% CI:

0,675-0,948, $p=0,004$, ver figura 8 A), o melhor valor de corte foi 29000 IU/ml, com o qual a sensibilidade de diagnóstico foi 77,8%, a especificidade de diagnóstico foi 77,5%, o valor AUROC no coorte B foi 0,710 (955 CI: 0,564-0,855, $p=0,013$, ver figura 8B), o melhor valor de corte foi 9000 IU/ml, com o qual a sensibilidade do diagnóstico foi de 69,9%, e a especificidade do diagnóstico foi de 60,0%.

Tabela 3

Análise do valor das características da linha de base para previsão da soroconversão após terapia nos pacientes com hepatite B crônica HBeAg positivo aceitando a terapia de adefovir dipivoxil (Coorte A) e terapaita de interferon-PEG (Coorte B)

Características	Coorte A (adefovir dipivoxil)				Coorte B (interferon α -2a peguilado)			
	SR(+)	SR(-)	Variável única Valor <i>p</i>	Múltiplas variáveis Valor <i>p</i>	SR(+)	SR(-)	Variável única Valor <i>p</i>	Múltiplas variáveis Valor <i>p</i>
No.	9	40	--	--	23	25	--	--
Idade, anos	35 \pm 4	36 \pm 6	0.87	0.80	34 \pm 11	36 \pm 10	0.54	0.80
gênero, masculino/feminino	7/2	37/3	0.45	0.26	17/6	18/7	0.88	0.85
Genótipo, B/C	2/7	9/31	0.99	0.46	15/8	14/11	0.52	0.90
Estrato ALT, >5 \times ULN/ \leq 5 \times ULN	3/6	9/31	0.77	0.45	8/15	8/17	0.84	0.43
ALT, U/L	170 \pm 88	137 \pm 79	0.28	0.29	198 \pm 129	213 \pm 149	0.71	0.26
HBV DNA, \log_{10} cópias/mL	7.03 \pm 1.40	7.65 \pm 1.13	0.16	0.12	7.64 \pm 0.92	7.04 \pm 1.61	0.12	0.11
HBsAg, \log_{10} IU/mL	4.32 \pm 0.16	4.39 \pm 0.65	0.78	0.56	4.01 \pm 0.42	3.92 \pm 1.07	0.70	0.13
Anti-HBC-IgM, S/CO valor	3.13 \pm 1.39	2.51 \pm 2.49	0.47	0.88	3.38 \pm 2.85	2.72 \pm 3.43	0.47	0.75
Anti-HBC, \log_{10} IU/mL	4.58 \pm 0.28	4.15 \pm 0.42	0.005	0.032	4.32 \pm 0.66	3.81 \pm 0.68	0.011	0.026

Observação: idade, nível ALT, carga DNA HBV, nível HBsAg, nível IgM-Anti-HBC e anti-HBC foram expressos como média \pm SD; SR: soroconversão HBeAg

[0141] 6.8 Previsão da taxa de ocorrência da soroconversão HBeAg após a terapia usando o nível anti-HBc da linha de base

[0142] O valor de corte como calculado na seção 6.7 poderia ser utilizada antes da terapia para prever a taxa de ocorrência da soroconversão HBeAg após os pacientes aceitarem a terapia. No coorte A, como mostrado na figura 8C, 7 dos 16 pacientes com o nível anti-HBc da linha de base maior que 29000 IU/ml tiveram a ocorrência da soroconversão de HBeAg no final da visita (taxa efetiva: 43,8%), enquanto apenas 2 de 33 pacientes com o nível anti-HBc na linha de base com menos que 29000 IU/ml tiveram ocorrência da soroconversão HBeAg no acompanhamento do final da visita (taxa de eficácia: 6,1%), a proporção da taxa de ocorrência (proporção de risco, RR) da soroconversão HBeAg entre grupo alto e baixo anti-HBc foi 7,22 (95% CI: 1,69-30,9, p=0,006). No coorte B, como mostrado na figura 8d, 16 dos 25 pacientes com o nível anti-HBc da linha de base maior que 9000 IU/ml tiveram uma ocorrência da soroconversão HBeAg na no seguimento final da visita (taxa efetiva: 64,0%), enquanto apenas 7 dos 23 pacientes com o nível anti-HBc da linha de base menor que 9000 IU/ml tiveram ocorrência da soroconversão HBeAg no seguimento final da visita (taxa efetiva: 30,4%), a proporção das taxas de ocorrência (proporção do risco, Rr) da soroconversão HBeAg entre os grupos anti-HBc altos e baixos foi 2,10 (95% de CI: 1,06-4,17, p=0,006).

[0143] Os efeitos da linha de base anti-HBc para previsão da soroconversão HBeAg após a terapia em pacientes com diferentes níveis ALT foram ademais analisados, e os resultados estão mostrados na figura 8E. Em dois coortes, como para os subgrupos de pacientes com o nível ALT da linha

de base tanto de $\leq 5 \times \text{ULN}$ quanto $> 5 \times \text{ULN}$, os pacientes com maior nível anti-HBc tiveram maior taxa de ocorrência da soroconversão após a terapia na comparação com os pacientes com nível inferior anti-HBc. Os pacientes que aceitaram a terapia de adefovir dipivoxil e interferon de longa ação foram divididos dentro dos 3 grupos: alto nível anti-HBc ($> 29000 \text{ IU/ml}$), nível médio anti-HBc (9000-29000 IU/ml) e baixo nível anti-HBc ($< 9000 \text{ IU/ml}$), e a taxa de soroconversão HBeAg de pacientes dos 3 grupos após terapia foram analisadas, e os resultados estão mostrados na figura 9. Entre os pacientes com o nível na linha de base anti-HBc de $> 29000 \text{ IU/ml}$, 9 dos 16 pacientes aceitaram a terapia com interferon de longa ação foi 66,7% (10/15), não existe diferença estatisticamente significativa entre elas ($p=0,82$); como para os pacientes com o nível anti-HBc da linha de base de 9000-29000 IU/ml, apenas 2 dos 19 pacientes aceitaram a terapia do adefovir dipivoxil tiveram soroconversão HBeAg após a terapia, a taxa de resposta foi 10,5%, enquanto esta taxa em 10 pacientes que aceitaram a terapia do interferon de longa ação foi 60,0% (6/10), existiu uma diferença estatisticamente significante entre elas ($p=0,018$), como para os pacientes com o nível anti-HBc na linha de base de $< 9000 \text{ IU/ml}$, nenhum dos 16 pacientes que aceitaram a terapia de adefovir dipivoxil tiveram a soroconversão de HBeAg após a terapia, enquanto 7 dos 23 pacientes que aceitaram a terapia o interferon de longa ação tiveram soroconversão HBeAg (23,0,4%), apresentaram diferença estatisticamente significante entre elas ($p<0,001$).

[0144] 6.9 mudanças dinâmicas do nível anti-HBc de pacientes durante e após a terapia de adefovir dipivoxil.

[0145] De acordo com a mudança dinâmica do nível anti-HBc de pacientes durante e após a terapia de adefovir dipivoxil (ver: figura 10A), toda a terapia e o período de observação poderia ser dividido dentro de 3 fases: (1) linha de base para 60 semanas após início da terapia, nesta fase, a média no nível de anti-HBc no soro dos pacientes apresentaram um declínio linear com a continuação da terapia ($r=0,99$, $p<0,001$), declinação $0,20 \pm 0,05 \log_{10}$ IU/mL por 12 semanas; (2) 60 semanas após o início da terapia para o final da terapia (96 semanas), a média do nível do soro anti-HBc dos pacientes alcançaram uma plataforma, não declinando com a continuação da terapia ($p=0,87$); (3) após a terapia do fármaco (108 semanas), a média do nível anti-HBc no soro de pacientes apresentou um salto em comparação com aquela no final da terapia (96 semanas), média de aumento sendo $0,29 \log 10$ IU/ml ($p<0,001$). Em geral, o nível anti-HBc diminuiu mais lentamente do que o nível ALT, o nível de DNA HBV e o nível HBsAg durante o procedimento de terapia, o último alcançando a fase de plataforma em 60 semanas após o início da terapia, enquanto os últimos 3 indicadores alcançaram a fase da plataforma 24 semanas após o início da terapia. A análise vertical de múltiplos fatores mostrou o nível anti-HBc independentemente correlacionado ao nível ALT ($\beta= -0,830$, $p<0,001$), mas não tiveram correlação estatisticamente significante com o nível DNA HBV ($\beta=0,003$, $p = 0,94$) ou nível HBsAg ($\beta=-0,061$, $p=0,52$).

[0146] De acordo com os valores de corte clínico determinado na seção 6,7 do presente Exemplo, todos os pacientes aceitaram a terapia de adefovir dipivoxil foram divididos em 2 grupos; ≥ 29000 IU/ml ($n=16$, alto HBc) e <29000

IU/ml (n=33, baixo HBc), a mudança dinâmica do anti-HBc no soro, DNA HBV, níveis ALT e HBsAg durante e após a terapia entre os dois grupos foram comparadas, e os resultados foram mostrados na figura 10B. Não existe diferença estatística entre os grupos HBc alto, e HBc baixo em termos do nível de DNA HBV ($7,61 \pm 1,15$ versus $7,50 \pm 1,22$ \log_{10} cópias/mL, $p=0,77$) e nível HBsAg ($4,34 \pm 0,31$ versus $4,38 \pm 0,69$ \log_{10} IU/mL, $p=0,83$), enquanto o nível ALT da linha de base do grupo HBc-alto foi maior que aquele do grupo HBc-baixo, mas sem diferença estatisticamente diferente. Durante a terapia, a curva de declínio do nível ALT e o nível anti-HBc de dois grupos mostrou sem diferença significativa tanto na análise de cada um dos pontos de monitoramento ou na análise vertical; entretanto, após a terapia do fármaco, o grupo anti-HBc de baixo HBc tiveram um salto notável em comparação com aquela do grupo HBc-alto tiveram um nível de DNA HBV no soro significativamente menor que aquele do grupo HBc-baixo ($p<0,05$) tanto durante quanto após a terapia (exceto da linha de base). No final do acompanhamento, a média do nível de DNA HBV dos pacientes do grupo HBc-alto foi diminuído por $3,48 \pm 2,24$ \log_{10} cópias/mL em comparação com aquela antes da terapia; enquanto que o nível de DNA HBV médio dos pacientes do grupo HBc-baixo foi diminuído por $1,69 \pm 2,05$ \log_{10} cópias/mL ($p=0,008$) em comparação com aquela antes da terapia. As alterações no nível HBsAg de dois grupos não mostrou diferença significante.

Referências:

- [0147] [1] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 2008;359:1486-1500.
- [0148] [2] Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection.

Lancet 2009; 373:582-592.

[0149] [3] Kwon H, Lok AS. Hepatitis B therapy. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011; 8:275-284.

[0150] [4] Deng LJ, Xu Y, Huang J. Developing a double-antigen sandwich ELISA for effective detection of human hepatitis B core antibody. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2008; 31:515-526.

[0151] [5] Li A, Yuan Q, Huang Z, Fan J, Guo R, Lou B, et al. Novel double-antigen sandwich immunoassay for human hepatitis B core antibody. Clin Vaccine Immunol 2010; 17:464-469.

[0152] [6] Zlotnick A, Johnson JM, Wingfield PW, Stahl SJ, Endres D. A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly. Biochemistry 1999; 38:14644-14652.

[0153] [7] WHO International Standard: First International Standard for anti-Hepatitis B core antigen. 10 November, 2008 [cited; Available from: www.nibsc.ac.uk/documents/ifu/95-522.pdf.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para prever um efeito terapêutico, antes de um paciente com hepatite B crônica aceitar um tratamento contra o vírus da hepatite B, caracterizado pelo fato de compreender uma detecção quantitativa do nível de anti-HBc total em uma amostra de soro ou plasma de um paciente com hepatite B crônica.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a detecção da quantidade do anti-HBc total ser realizada por um ou mais dos métodos a seguir: ensaios de imunoabsorção enzimática, método de imunodetecção quimioluminescente, método de detecção de fluorescência resolvido com o tempo, método de imunoturbidimetria, método de imunocromatografia, método de imuno-percolação.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a detecção única do nível do anti-HBc total ter uma dinâmica linear variando de 1,5 da ordem de magnitude ou mais, ou seja, o limite superior da quantificação precisa para a detecção única ser 32 vezes ou mais, maior que o limite inferior da quantificação precisa.
4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a detecção quantitativa anti-HBc total compreender as etapas a seguir:
 - (a) prover uma proteína do vírus da hepatite B capaz de ligar, especificamente ao anti-HBc total, a proteína pode compreender a sequência de aminoácido de comprimento total da proteína do vírus da hepatite B a partir do 1º aminoácido para o 183º aminoácido, ou pode compreender apenas uma sequência de aminoácidos da zona primária imunodominante da proteína do núcleo do vírus da hepatite B, tal como a partir

do 1º aminoácido para ao 149º aminoácido, a proteína é imobilizada sobre um suporte sólido, age como um antígeno da fase sólida, e é utilizada para capturar o anti-HBc total existente em uma amostra de soro;

(b) prover um antígeno marcado capaz de se ligar especificamente ao anti-HBc total que é capturado sobre o antígeno da fase sólida, o antígeno marcado pode compreender a sequência de aminoácido completa da proteína do núcleo do vírus da hepatite B (a partir do 1º aminoácido para o 183º aminoácido), ou pode compreender apenas uma sequência de aminoácido da zona primária imunodominante da proteína do núcleo do vírus da hepatite B, tal como a partir do 1º aminoácido para o 149º aminoácido, o sinal gerando a substância sobre o antígeno marcado pode ser peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, ou éster acridínio;

(c) prover o padrão de quantificação das amostras com concentrações conhecidas para extrair a curva do padrão de quantificação, que consiste usualmente de 3-6 amostras contendo o anti-HBc total em diferentes concentrações;

(d) contatar a amostra a ser testada ou amostra padrão de quantificação com o antígeno da fase sólida de modo que o anti-HBc total, se existente, na amostra seja capturado para formar um complexo de fase sólida antígeno-anti-HBc;

(e) contatar o antígeno marcado com o produto da etapa (d), ou seja, o complexo da fase sólida antígeno-anti-HBc, de modo a formar um complexo da fase sólida antígeno-anti-HBc contra o antígeno marcado;

(f) contatar um substrato ou uma solução capaz de ativar o sinal gerado com o complexo da fase sólida do antígeno-anti-HBc contra o antígeno marcado como formado na etapa (e), de

modo a gerar um sinal mensurável, e medir a intensidade do sinal gerado com um instrumento de medida correspondente;

(g) realizar o ajuste da regressão linear dos sinais medidos das amostras padrões de quantificação (usualmente 3-6 amostras) com suas concentrações correspondentes, para obter uma fórmula matemática para calcular a concentração da amostra a partir de um sinal de medida;

(h) introduzir o sinal medido da amostra a ser testada dentro da fórmula da etapa (g), e calcular a concentração do anti-HBc total na amostra a ser testada;

(i) se a concentração do anti-HBc total, como calculado na etapa (h) é maior que o limite superior da quantificação precisa do método de detecção, a amostra a ser testada é diluída, e as etapas (a) a (h) são repetidas, até a concentração medida cair na faixa entre o limite superior e o limite inferior da quantificação precisa do método de detecção correspondente, a concentração do anti-HBc total contido na amostra a ser testada ser obtido com o cálculo da multiplicação do valor medido após a diluição pela proporção de diluição.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de envolver fármacos terapêuticos diferentes, selecionados de: interferon de longa ação, tal como interferon peguilhado, ou peginterferon, interferon, lamivudina (LMV), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudina (LdT), tenofovir, ou outros fármacos úteis no tratamento de hepatite B crônica.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de o critério comum para prever o efeito terapêutico ser como a seguir: o efeito terapêutico

(ou taxa de resposta) obtida em um paciente com um maior nível de anti-HBc em seu soro ser superior aquele de um paciente com nível inferior do anti-HBc total em seu soro; o critério do efeito terapêutico pode ser soroconversão do antígeno E do vírus da hepatite B, conversão a partir de HBeAg(+)/anti-HBe (-) para HBeAg(-)/anti-HBe(+) em pacientes com hepatite B crônica que aceitaram a terapia, ou pode ser uma resposta de virologia ou seja, DNA HBV no soro, a carga dentro de 1000 cópias/ml ou menos nos pacientes com hepatite B crônica, ou outros indicadores clínicos que podem indicar a remissão da condição da doença ou um bom prognóstico.

7. Uso de anti-HBc total em uma amostra de soro ou plasma, caracterizado pelo fato de ser dirigido à avaliação da resposta em um paciente com hepatite B crônica antes de o dito paciente aceitar a terapia de adefovir dipivoxil e interferon peguilado.

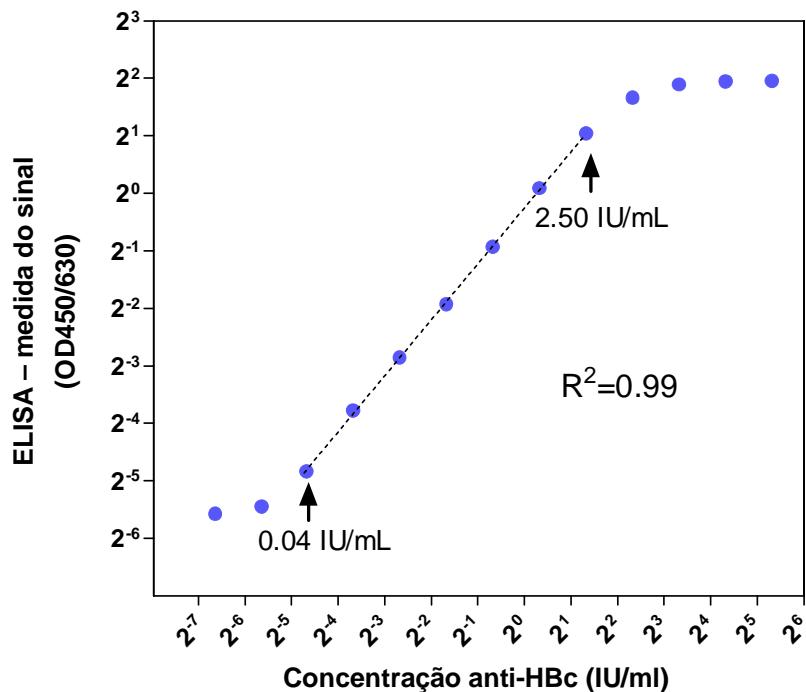


FIG.1

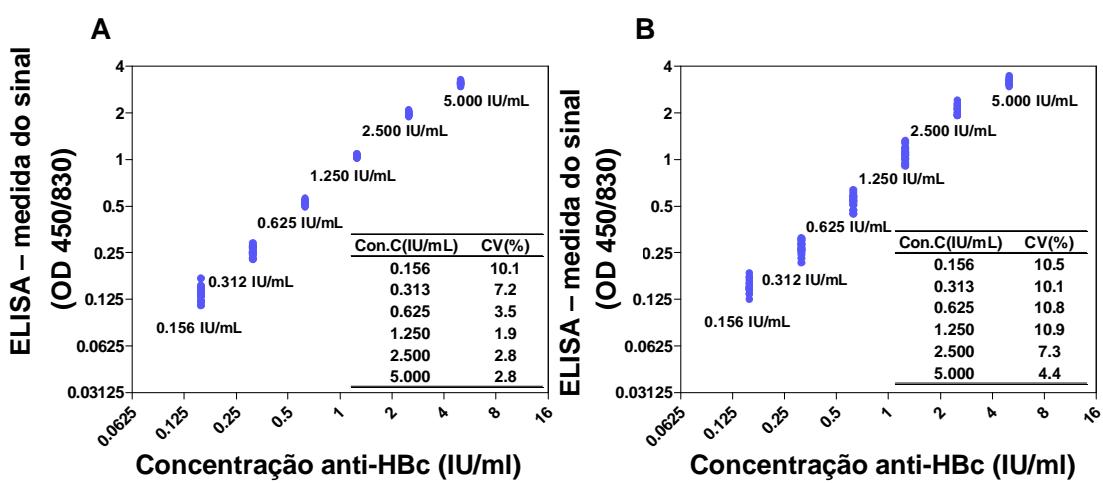


FIG.2

2/8

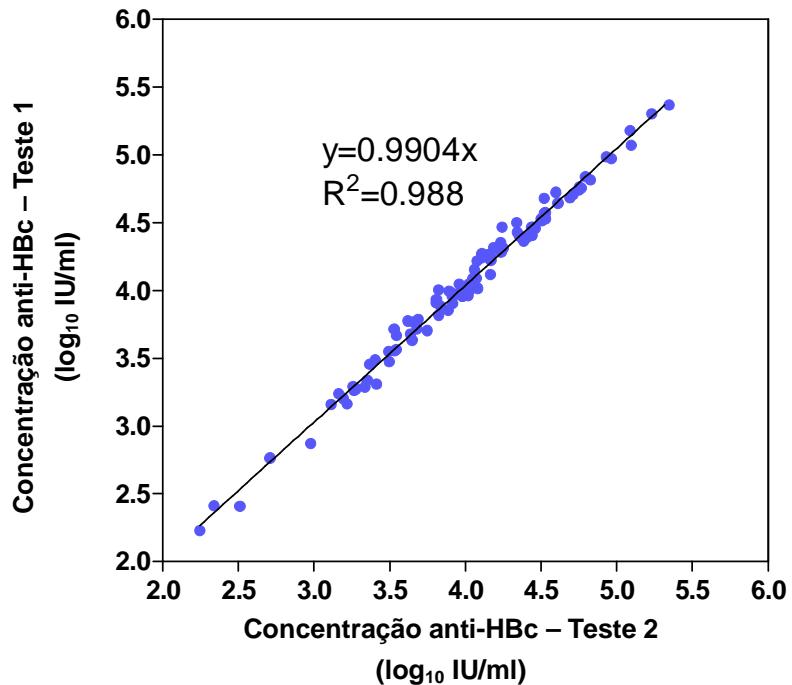


FIG.3

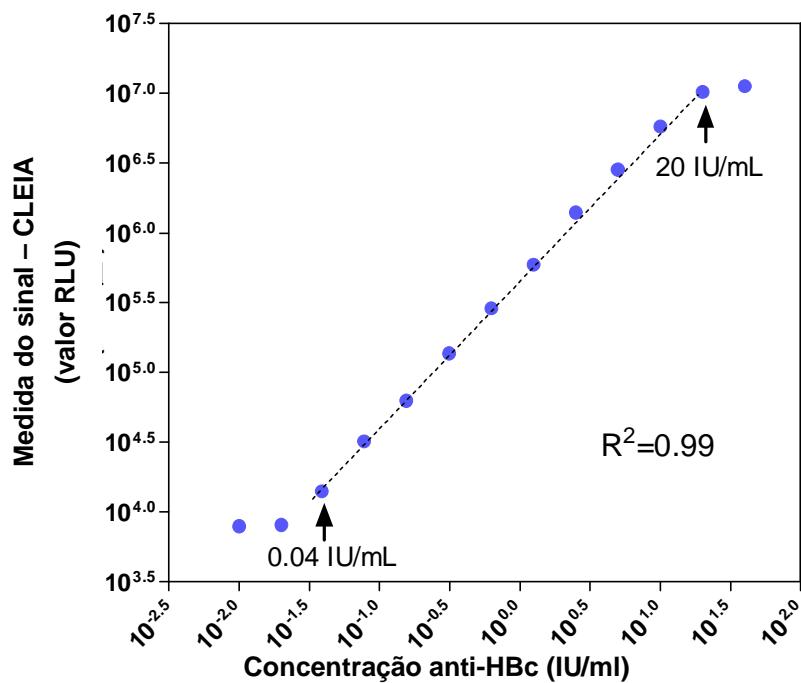


FIG.4

3/8

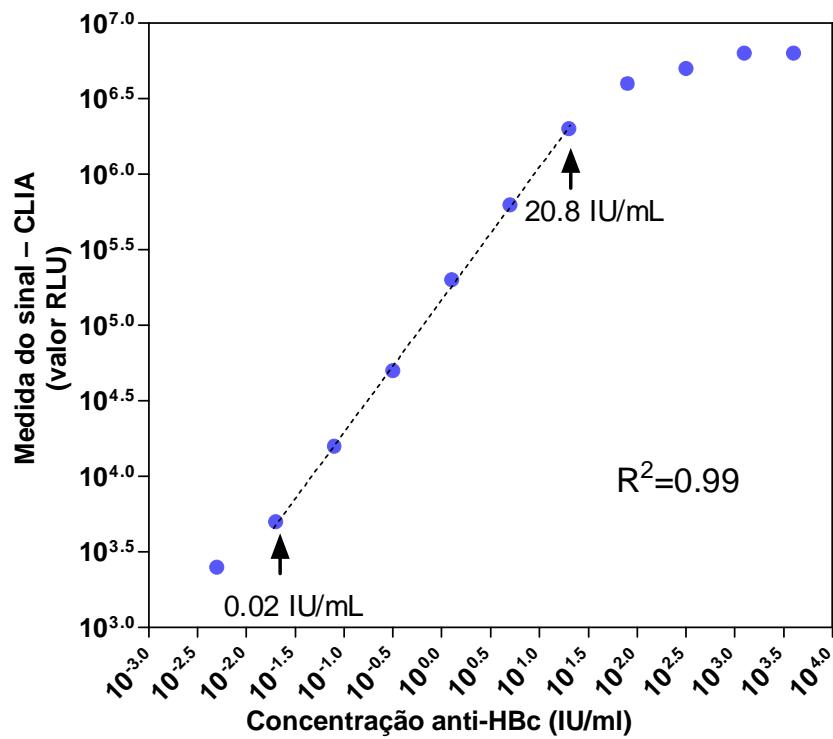


FIG.5

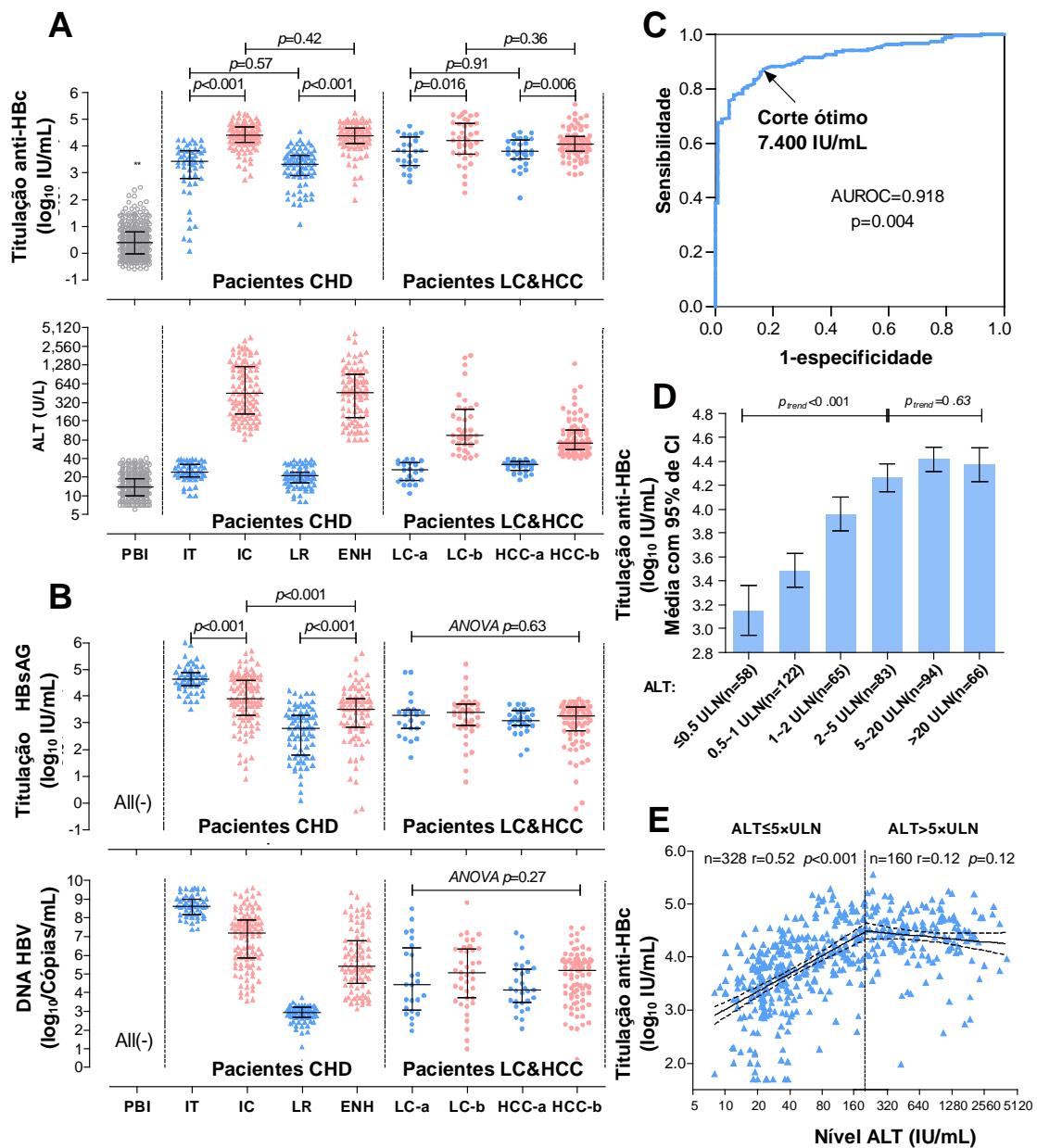
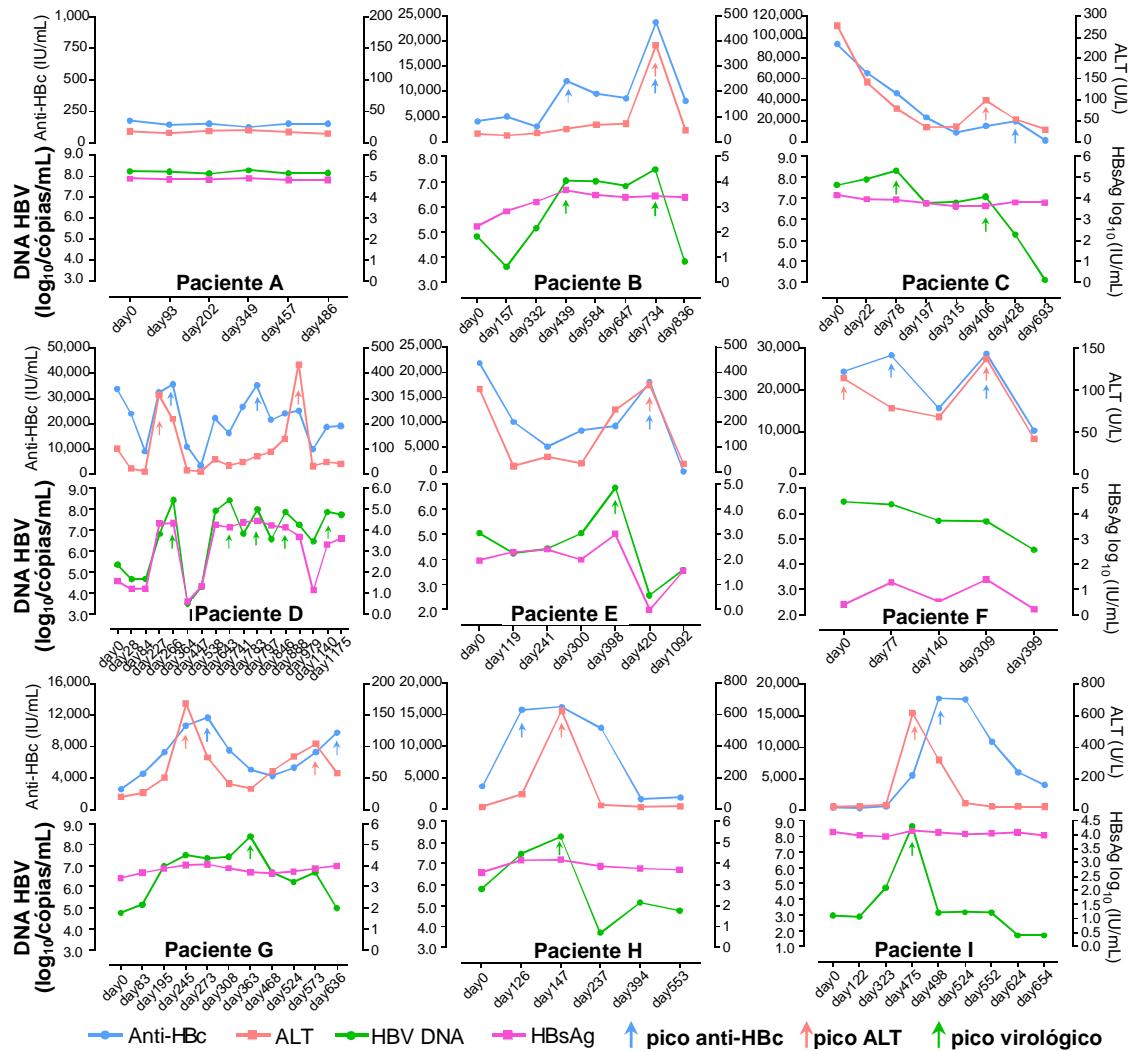


FIG.6

5/8



	Sexo	Idade	Gênero	HBeAg	anti-Hbe	Nº Visitas	Tempo (semanas)
Paciente A	Macho	24	C	+	-	6	69
Paciente B	Macho	23	B	+	-	8	119
Paciente C	Macho	30	B	+	-	8	99
Paciente D	Fêmea	28	B	+	-	17	168
Paciente E	Macho	41	B	+	-	11	91
Paciente F	Fêmea	25	B	+	-	6	79
Paciente G	Macho	49	B	-	+	7	156
Paciente H	Macho	65	B	-	+	5	57
Paciente I	Macho	31	C	-	+	9	93
Total		35 ± 14				77	103 ± 38

FIG.7

6/8

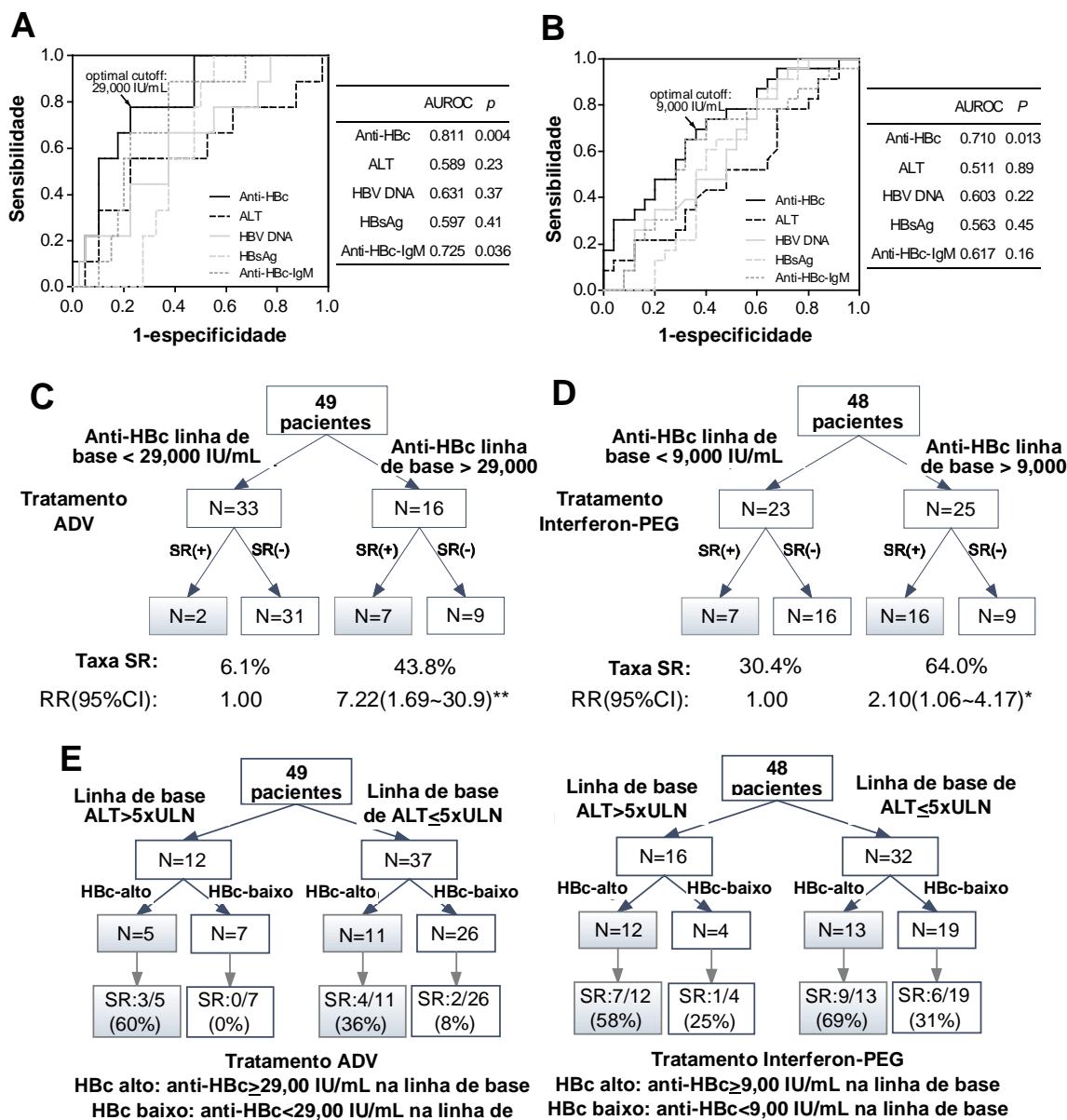


FIG.8

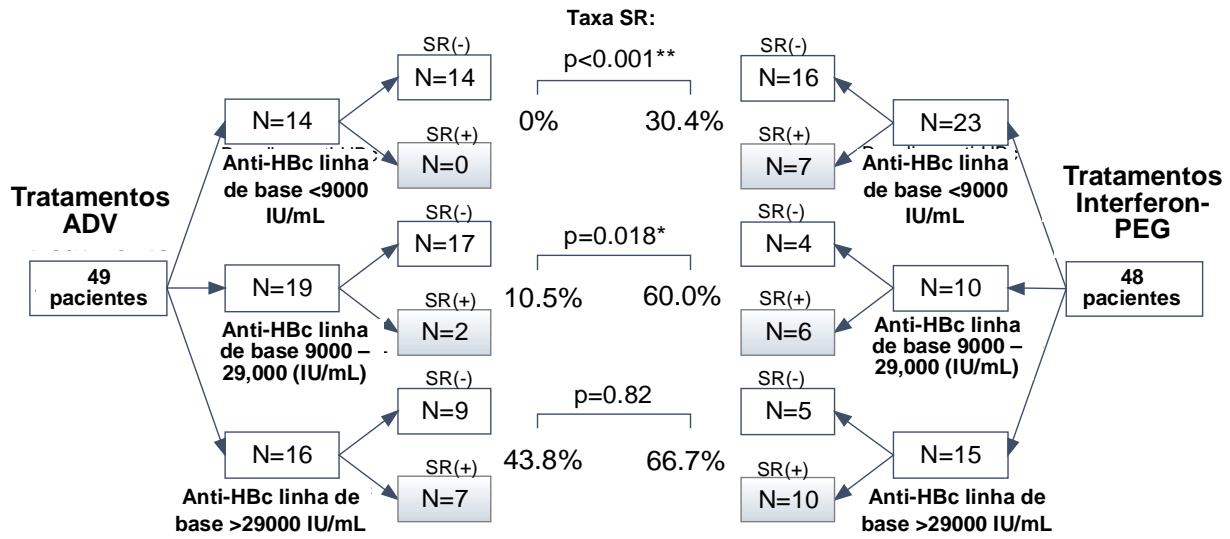
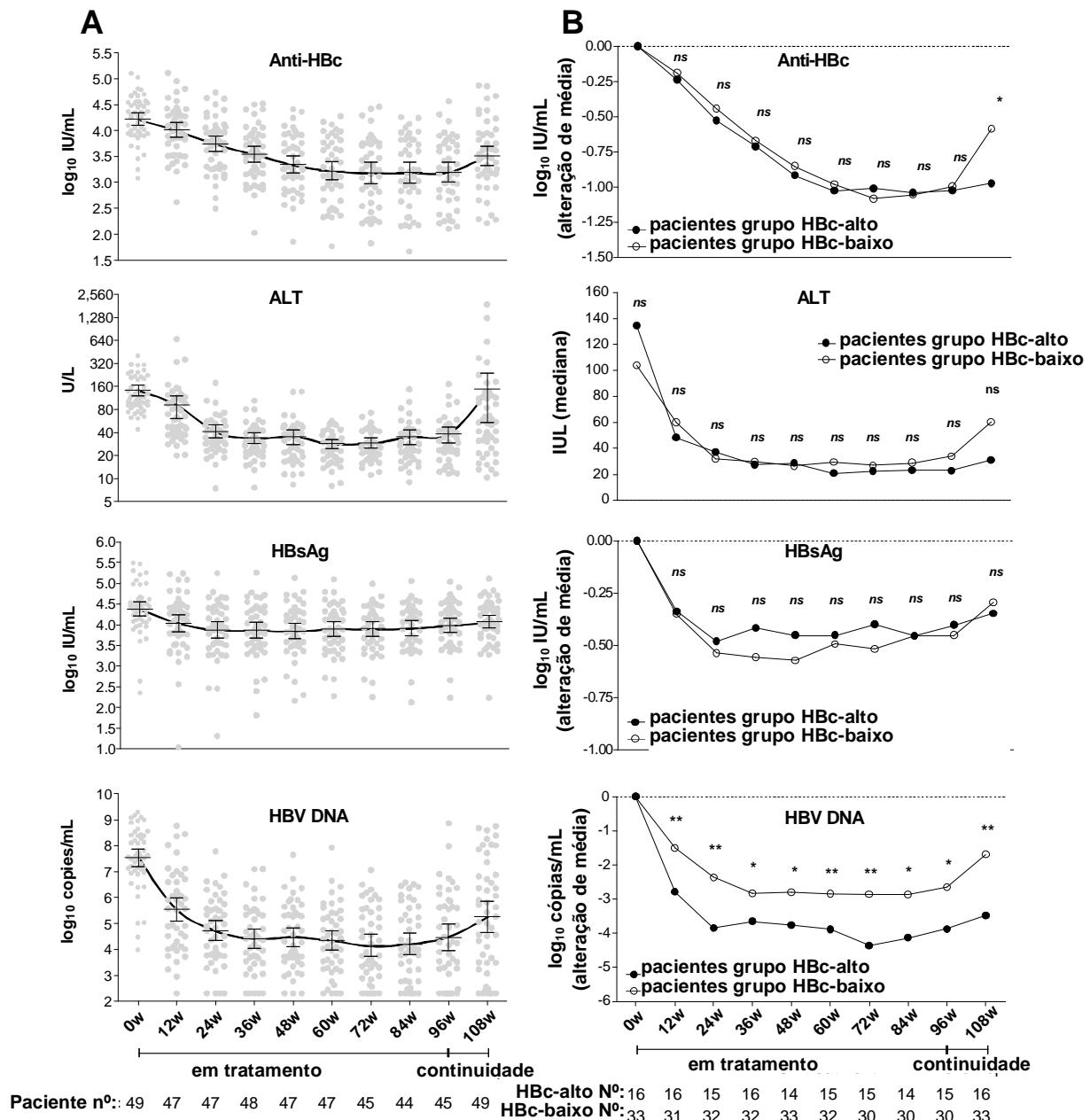


FIG.9

8/8



Grupo HBc-alto: pacientes com o anti-HBc ≥ 29000 IU/mL na linha de base
Grupo HBc-baixo: pacientes com o anti-HBc < 29000 IU/mL na linha de base

FIG.10