

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6283319号
(P6283319)

(45) 発行日 平成30年2月21日(2018.2.21)

(24) 登録日 平成30年2月2日(2018.2.2)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/576	(2006.01)	GO 1 N 33/576	B
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	N
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 A
A 6 1 K 31/661	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 7 5
A 6 1 P 1/16	(2006.01)	A 6 1 K 31/661	

請求項の数 10 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-552496 (P2014-552496)
 (86) (22) 出願日 平成25年1月17日(2013.1.17)
 (65) 公表番号 特表2015-505371 (P2015-505371A)
 (43) 公表日 平成27年2月19日(2015.2.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2013/070573
 (87) 国際公開番号 W02013/107355
 (87) 国際公開日 平成25年7月25日(2013.7.25)
 審査請求日 平成27年8月7日(2015.8.7)
 (31) 優先権主張番号 201210019389.5
 (32) 優先日 平成24年1月21日(2012.1.21)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

前置審査

(73) 特許権者 510183280
 シャアメン ユニバーシティ
 中華人民共和国 361005 フージェ
 ン プロヴィンス、シャアメン、スーミン
 ディストリクト、スー ミン ナン ロ
 ード ナンバー422
 (73) 特許権者 514185884
 シャアメン イノバックス バイオテック
 カンパニー リミテッド
 中華人民共和国 361022 フージェ
 ン、シャアメン、ハイツァン、シンユエン
 ロード ナンバー 130
 (74) 代理人 110000855
 特許業務法人浅村特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗HBc 定量的検出方法、並びに慢性B型肝炎患者の疾患進行の監視及び管理並びに治療効果の予測におけるその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下のステップを含む方法を介して、慢性B型肝炎患者が薬物を受ける前にB型肝炎ウイルスに対する薬物の治療効果を予測するための、試料中のB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する総抗体のレベルを定量的に検出するための試薬を含む診断剤（但し該薬物はヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体である）：

(i) 診断剤を使用して慢性B型肝炎患者から血清試料中のB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する総抗体のレベルを定量的に検出するステップ、及び

(ii) 検出されたB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する総抗体のレベルが29000 IU/mlより高い場合、薬物が慢性B型肝炎ウイルス患者に対して有効であると決定するステップ。

【請求項2】

B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する総抗体レベルの定量的検出が、次の方法：酵素結合免疫吸着アッセイ、化学発光免疫検出法、時間分解蛍光検出法、免疫比濁法、免疫クロマトグラフィー法、及び免疫ろ過法のうちの1つ又は複数によって実施される、請求項1に記載の診断剤。

【請求項3】

B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する総抗体のレベルの1回の検出の直線ダイナミックレンジが1.5桁以上である、すなわち、1回の検出に対する正確な定量の上限値が、正確な定量の下限値より32倍以上大きい、請求項1に記載の診断剤。

10

20

【請求項 4】

B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する総抗体レベルの定量的検出が、以下のステップ:

a) B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体に特異的に結合できるB型肝炎ウイルスタンパク質を提供するステップであって、前記タンパク質が、1番目のアミノ酸から183番目のアミノ酸までのB型肝炎ウイルスコアタンパク質の完全長のアミノ酸配列を含み、又はB型肝炎ウイルスコアタンパク質の主要な免疫優性領域のアミノ酸配列のみを含み、前記タンパク質が、固体支持体上に固定され、固相抗原として作用し、血清試料中に存在するB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する総抗体を捕捉するのに使用される、上記ステップ;

10

b) 固相抗原上で捕捉されるB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体に特異的に結合できる標識抗原を提供するステップであって、標識抗原が、1番目のアミノ酸から183番目のアミノ酸までのB型肝炎ウイルスコアタンパク質の完全長のアミノ酸配列を含み、又はB型肝炎ウイルスコアタンパク質の主要な免疫優性領域のアミノ酸配列のみを含み、標識抗原が、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びアクリジニウムエステルからなる群から選択されるシグナル発生物質を含む、上記ステップ;

c) 様々な濃度のB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体を含有する、3~6個の試料からなる、定量検量線を描くための濃度が公知の定量標準試料を提供するステップ;

d) 試験される試料又は定量標準試料を固相抗原と接触させ、その結果、前記試料中に存在する場合には、B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体が捕捉されて、固相抗原 - B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体の複合体を形成するステップ;

20

e) 標識抗原を、ステップd)の生成物、すなわち、固相抗原 - B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体の複合体と接触させて、その結果、固相抗原 - B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体 - 標識抗原の複合体を形成させるステップ;

f) シグナル発生を活性化できる基質又は溶液を、ステップe)で形成された固相抗原 - B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体 - 標識抗原の複合体と接触させて、その結果、測定可能なシグナルを発生させ、対応する測定機器を用いて、発生したシグナルの強度を測定するステップ;

g) 定量標準試料の測定されたシグナルの線形回帰フィッティングをそれらの対応する濃度を用いて実施して、測定シグナルから試料濃度を算出するための数式を得るステップ;

30

h) 試験される試料の測定されたシグナルをステップg)の式に導入し、試験される試料中のB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する総抗体の濃度を算出するステップ;

i) ステップh)で算出されたB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する総抗体の濃度が、検出方法の正確な定量の上限値より高い場合、測定された濃度が対応する検出方法の正確な定量の上限値から下限値の間の範囲に入るまで、試験される試料を希釈し、ステップa)~h)を繰り返すステップを含む、

請求項1に記載の診断剤。

【請求項 5】

前記B型肝炎ウイルスコアタンパク質の主要な免疫優性領域のアミノ酸配列が、B型肝炎ウイルスコアタンパク質の1番目のアミノ酸から149番目のアミノ酸までである、請求項4に記載の診断剤。

40

【請求項 6】

前記ステップ(c)における濃度の単位が、I U / m lである、請求項4に記載の診断剤。

【請求項 7】

前記ステップ(g)における定量標準試料が、3~6個の試料である、請求項4に記載の診断剤。

【請求項 8】

前記ステップ(i)において、試験される試料中に含有されるB型肝炎ウイルスコアタ

50

ンパク質に対する総抗体の濃度が、希釈後に測定された値に希釈率を掛ける計算によって得られる、請求項 4 に記載の診断剤。

【請求項 9】

前記薬物が、ラミブジン (LMV)、アデホビルジピボキシル (ADV)、エンテカビル (ETV)、テルビブジン (LdT)、及びテノホビルからなる群から選択される、請求項 1 から 8 までのいずれか一項に記載の診断剤。

【請求項 10】

前記薬物がアデホビルジピボキシル (ADV) である、請求項 9 に記載の診断剤。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、B型肝炎ウイルス (HBV) の検出及びB型肝炎ウイルス性肝炎の臨床診断に関し、より詳細には、患者の慢性B型肝炎の疾患進行を監視し、B型肝炎ウイルスに対する治療 (特に、インターフェロンに基づく治療及びヌクレオシド/ヌクレオチド類似体抗HBV薬物に基づく治療) を受ける慢性B型肝炎患者における治療効果を効果的に予測し、かくして、薬物を合理的に選択するように患者を導くために、B型肝炎コアタンパク質に対する抗体 (抗Hbc) の定量的検出を使用する方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

B型肝炎ウイルスの感染、特にB型肝炎ウイルスの慢性感染は、世界で最も重要な公衆衛生問題のうちの1つである。現在、全世界で、B型肝炎ウイルスに慢性感染した患者は3億5千万人を超えている。B型肝炎ウイルスの慢性感染は、慢性B型肝炎 (CHB)、肝硬変 (LC)、及び原発性肝細胞癌 (HCC) などの肝疾患をもたらす場合があり、全世界で毎年、100万人を超える人が、B型肝炎ウイルスの慢性感染及びそれによって引き起こされる関連疾患が原因で死亡している^[1]。

【0003】

現在のところ、B型肝炎ウイルスの慢性感染を治療するための薬物は、2つのグループ、すなわちインターフェロン (IFN) 及びヌクレオシド/ヌクレオチド類似体 (NA) に主に分類されている。前者には、通常のインターフェロン (IFN) 及びペグインターフェロン (Peg-IFN、長時間作用性インターフェロンとも呼ばれる) が含まれ、これらは、主に患者の免疫能を総体的に増強することによってHBVを阻害しCHBを治療する効果をもたらす。一方、後者には、5種類の薬物、すなわちラミブジン (LMV)、アデホビルジピボキシル (ADV)、エンテカビル (ETV)、テルビブジン (LdT)、及びテノホビルが主に含まれ、これらは、HBVのポリメラーゼ活性を直接阻害することによってHBV複製を阻害する。B型肝炎ウイルスの慢性感染の場合、慢性B型肝炎を治療するために上記の薬物を使用する最終目的は、患者においてB型肝炎表面抗原 (HBsAg) に関する血清学的陰性又はセロコンバージョン (HBsAg消失又はHBsAgセロコンバージョン) を起こすことである。しかし、上記の既存の薬物がHBsAg消失又はHBsAgセロコンバージョンを実現する効力は限られており、通常、数年間の連続的治療が必要とされる。さらに、B型肝炎ウイルスE抗原セロコンバージョン (HBeAgセロコンバージョン) は、B型肝炎ウイルスの慢性感染の処置中に起こる別の重要な事象であり、通常、臨床的肝炎の寛解及び良好な予後を伴う。したがって、臨床医及び研究者は、「治療後、HBeAgセロコンバージョンが患者において起こるかどうかが」、治療が有効であるか否かを判定するための第1の指標として一般に使用する。HBeAgセロコンバージョンに加えて、ウイルス学的著効 (SVR) もまた、B型肝炎の臨床的治療の治療効果を判定するための第2の指標として使用されている^[2、3]。

30

40

【0004】

慢性B型肝炎患者がHBeAgセロコンバージョンを達成するという治療法のエンドポ

50

イントの点から見ると、IFNとNAの間には、治療効果及び薬物コンプライアンスの点で有意差がある。IFN（主に、Peg-IFN又は長時間作用性インターフェロンを指す）の方がNAより優れた治療効果を有し、前者を用いた治療から1年（52週）後に、HBeAg陽性患者の30～50%がHBeAgセロコンバージョンを達成できたのに対し、後者を用いた治療では、HBeAgセロコンバージョンを達成することができたのはHBeAg陽性患者の10～30%に過ぎなかった。しかし、IFN治療法の副作用の方がNAの副作用よりも通常は重く、通常、対象は、発熱、頭痛、衰弱、脱毛、白血球減少などの有害反応を伴い、一部の患者はこれらの副作用に耐えることができなかった。一方、NAの経口薬の方が副作用は少なく、コンプライアンスが良好である。価格の面では、IFN（主に、Peg-IFN又は長時間作用性インターフェロンを指す）を用いて1年

10

【0005】

患者におけるHBeAgセロコンバージョンの実現は、患者その人自体がHBVに対する十分な特異的免疫能を有しているかどうか、又は患者が薬物療法によってHBVに対する十分な特異的免疫能を獲得し得るかどうか主に依存する。したがって、慢性B型肝炎患者のHBVに対する特異的免疫能の定量的アッセイは、治療すべき慢性B型肝炎患者においてHBeAgセロコンバージョンが起こる確率を予測するのに使用され得る。長い間、慢性B型肝炎患者の血清ALTレベルが、HBVに対する宿主免疫能を評価するための間接的な代用マーカーとして使用されている。これは、慢性B型肝炎患者の血清ALTレベルが、患者の肝細胞の炎症/壊死レベルを反映するためである。一方でHBVは免疫の原因となるウイルスであり、抗HBV T細胞によって媒介される免疫学的応答が原因で肝臓炎症又は肝細胞壊死を誘発し、したがって、血清ALTレベルと宿主の抗HBV免疫能の間には一定の相関関係が存在する。一般に、血清ALTレベルが正常値上限（ULN）より2倍大きい患者は、肝炎反応のない患者、すなわち血清ALTレベルが正常値上限より低い慢性B型肝炎患者よりも、抗HBV治療の治療効果（治療によって実現するHBeAgセロコンバージョンの確率を指す）が通常は優れており、血清ALTレベルが正常値上限（ULN）より5倍大きい患者は、肝炎反応があるがALTレベルが比較的低い患者よりも、抗HBV治療の治療効果が通常は優れていると考えられている。それでもやはり、血清ALTレベルは、肝臓炎症の程度を主に表し、ALTレベルはHBV固有の指標ではなく、他の因子（合併した自己免疫性肝炎、アルコール性肝疾患、HCV又は他の肝炎ウイルスの感染など）の影響を容易に受ける場合があり、半減期は短いため、慢性B型肝炎の治療の治療効果を予測するのにALTレベルを使用することはあまり信頼性が高くない。血清ALTに加えて、HBVに特異的なT細胞の免疫学的応答に関するアッセイ（例えば、in vitro刺激サイトカイン放出試験）もまた、慢性B型肝炎の治療の治療効果を予測するために使用され得るが、その作業は比較的複雑であり、臨床的な実践及び推進は非常に困難であり、試験試料に対する要件が高く（新鮮な全血試料が必要とされる）、したがって、その応用の可能性は非常に限られている。要約すれば、治療の前に治療効果を評価する有効な方法が当技術分野では未だにない。

20

30

40

【0006】

B型肝炎コアタンパク質に対する抗体（抗HBc）は、HBV感染の最も典型的な血清学的指標のうちの1つであり、抗HBcの定性的検出（抗HBcが陽性であるかどうかを判定する）が、B型肝炎ウイルス感染の臨床診断において、35年を超えて使用され続けている。血清抗HBc陽性の結果から、その対象がHBVに感染していたか、又は感染していることが示唆され、通常、この抗体は、HBV感染者の血清中に継続的に一存在する。現在のところ、抗HBc抗体の検出のために開発された方法は、競合的又は抑制的な免疫検出のメカニズムに主として基づいており、これらの方法は、抗HBcの定性的検出のために効果的に使用され得る。しかし、技術的メカニズムに制限があるため、それらの

50

直線検出ダイナミックレンジは通常狭く（一般に、1桁の範囲内）、それらの検出安定性は乏しく、抗HBcの定量的検出に満足いくように応用することはできない。関連する再調査に基づくと、本発明の発表以前に抗HBcの定量的検出のための有効な方法及び試薬はなく、抗HBcの定量的検出の臨床的価値及び対応する使用は、これまで不明である。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

B型肝炎ウイルスコアタンパク質は非常に強力な免疫原性を有しているため、その血清抗体レベルは、宿主個体におけるHBVを特異的に対象とする体液性免疫応答（B細胞免疫応答）の能力を示し、HBVに対する宿主の全体的な免疫学的能力を反映する。このために、本発明の発明者らは、慢性B型肝炎患者の血清抗HBcレベルを正確に検出すれば、患者におけるHBVに対する特異的免疫応答の能力を示唆でき、患者が受ける薬物（インターフェロン薬物、ヌクレオシド/ヌクレオチド類似体を含む）治療の最終的治療効果を予測することができると考えている。本発明は、B型肝炎ウイルスに感染した患者の血清/血漿中の抗HBc抗体レベルを正確に定量的に検出するための方法、並びに患者において慢性B型肝炎の進行を監視する際、及び慢性B型肝炎患者における治療の治療効果を予測する際の、抗HBcの定量的検出の使用に関する。

10

【0008】

詳細には、本発明は、血清抗HBcレベルを正確に定量的に検出するための免疫学的検出方法であって、酵素結合免疫吸着アッセイ又は化学発光検出法によって実行することができる、上記方法に関する。

20

【0009】

この方法には、1回の検出の直線ダイナミックレンジが1.5桁以上である、すなわち、1回の検出に対する正確な定量の上限値が、正確な定量の下限値より少なくとも3.2倍大きいという利点がある。この特徴は、血清抗HBcレベルの正確な定量的検出の基本原則であり、本発明より前の先行技術における抗HBc検出方法はこの特徴を有していない。

【0010】

B型肝炎ウイルスに慢性感染した様々な時期の患者の試料、及び患者の疾患過程の自然な進行中の一連の試料にこの方法を適用することによって得られた結果から、血清抗HBcの定量的レベルと患者の肝炎活動性及び宿主免疫状態とは高い相関関係があり、抗HBcの定量的測定値を用いて、患者が免疫活性化又は肝炎活動性の時期にあるかどうかを効果的に見分けられることが示された。このことから、本発明によって開示される抗HBcの定量的検出のための方法又はその等価な方法の臨床的使用は、慢性B型肝炎患者の疾患進行を監視及び判定する助けとなることが示唆される。

30

【0011】

アデホビルジピボキシル及び長時間作用性インターフェロンによる治療を受ける慢性肝炎患者のコホート試料にこの方法を適用することによって得られた結果から、抗HBc基本レベルが治療奏効率と正の相関関係にあることが示された。このことから、本発明によって開示される抗HBcの定量的検出のための方法又はその等価な方法の臨床的使用は、アデホビルジピボキシル、長時間作用性インターフェロン、又は類似したメカニズムを有するものなどの薬物による治療を慢性B型肝炎患者が受ける前に治療効果を評価及び予測することを可能にし、治療用薬物及び治療時間の選択を手引きし、それによって治療効率を改善する助けとなることが示唆される。

40

【0012】

その一方で、本発明は、慢性B型肝炎患者の疾患進行を監視し、且つ/又は慢性B型肝炎患者がB型肝炎ウイルスに対する治療を受ける前に治療効果を効果的に予測するための診断剤を製造する際の、B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体のレベルを定量的に検出するための試薬の使用に関する。

50

【 0 0 1 3 】

特定の一実施形態において、B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体の定量的検出は、次の方法：酵素結合免疫吸着アッセイ、化学発光免疫検出法、時間分解蛍光検出法、免疫比濁法、免疫クロマトグラフィー法、免疫ろ過 (immuno-percolation) 法のうちの1つ又は複数によって実施される。

【 0 0 1 4 】

特定の一実施形態において、B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体レベルの1回の検出の直線ダイナミックレンジは1.5桁以上である、すなわち、1回の検出に対する正確な定量の上限値は、正確な定量の下限値より3.2倍以上大きい。

【 0 0 1 5 】

特定の一実施形態において、B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体の定量的検出は、以下のステップを含む：

a) B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体に特異的に結合できるB型肝炎ウイルスタンパク質を提供するステップであって、前記タンパク質が、B型肝炎ウイルスコアタンパク質の完全長のアミノ酸配列(1番目のアミノ酸から183番目のアミノ酸まで)を含んでよく、又はB型肝炎ウイルスコアタンパク質の主要な免疫優性領域のアミノ酸配列のみ(例えば、1番目のアミノ酸から149番目のアミノ酸まで)を含んでよく、前記タンパク質が、固体支持体上に固定され、固相抗原として作用し、血清試料中に存在するB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体を捕捉するのに使用される、上記ステップ；

b) 固相抗原上で捕捉されるB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体に特異的に結合できる標識抗原を提供するステップであって、標識抗原が、B型肝炎ウイルスコアタンパク質の完全長のアミノ酸配列(1番目のアミノ酸から183番目のアミノ酸まで)を含んでよく、又はB型肝炎ウイルスコアタンパク質の主要な免疫優性領域のアミノ酸配列のみ(例えば、1番目のアミノ酸から149番目のアミノ酸まで)を含んでよく、標識抗原上のシグナル発生物質が、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、又はアクリジニウムエステルであり得る、上記ステップ；

c) 様々な濃度のB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体を含有する、通常3~6個の試料からなる、定量検量線を描くための濃度が公知の定量標準試料を提供するステップであって、濃度の単位が、IU/ml、PEIU/ml、又は起源を追跡することができる(source can be traced)濃度若しくは力価の他の単位であり得る、上記ステップ；

d) 試料(試験される試料又は定量標準試料)を固相抗原と接触させ、その結果、前記試料中に存在する場合には、B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体が捕捉されて、固相抗原-B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体の複合体を形成する、ステップ；

e) 標識抗原を、ステップd)の生成物、すなわち、固相抗原-B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体の複合体と接触させて、その結果、固相抗原-B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体-標識抗原の複合体を形成させる、ステップ；

f) シグナル発生を活性化できる基質又は溶液を、ステップe)で形成された固相抗原-B型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体-標識抗原の複合体と接触させて、その結果、測定可能なシグナルを発生させ、対応する測定機器を用いて、発生したシグナルの強度を測定する、ステップ；

g) 定量標準試料(通常、3~6個の試料)の測定されたシグナルの線形回帰フィッティングをそれらの対応する濃度を用いて実施して、測定シグナルから試料濃度を算出するための数式を得るステップ；

h) 試験される試料の測定されたシグナルをステップg)の式に導入し、試験される試料中のB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体の濃度を算出するステップ；

i) ステップh)で算出されたB型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体の濃度が、検出方法の正確な定量の上限値より高い場合、測定された濃度が対応する検出方法の正確な定量の上限値から下限値の間の範囲に入るまで、試験される試料を希釈し、ステップa

10

20

30

40

50

) ~ h) を繰り返すステップであって、試験される試料中に含有される B 型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体の濃度が、希釈後に測定された値に希釈率を掛ける計算によって得られる、上記ステップ。

【0016】

特定の一実施形態において、本発明の診断剤は、様々な治療用薬物を与えられる慢性 B 型肝炎患者において使用され、前記薬物は、長時間作用性インターフェロン（ペグ化インターフェロン、ペグインターフェロン）、通常のインターフェロン（インターフェロン）、ラミブジン（LMV）、アデホビルジピボキシル（ADV）、エンテカビル（ETV）、テルビブジン（LdT）、テノホビル、又は慢性 B 型肝炎の治療において有用な他の薬物を含む。

10

【0017】

特定の一実施形態において、治療の前に患者における治療の治療効果を予測するための一般的な基準は、治療前の患者血清中の B 型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体のレベルがより高い患者において得られる治療効果（奏効率）が、治療前の患者血清中の B 型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体のレベルがより低い患者のものより優れていることであり；治療効果の基準は、B 型肝炎ウイルス E 抗原セロコンバージョン（すなわち、治療を受ける慢性 B 型肝炎患者における HBeAg (+) / 抗 HBe (-) から HBeAg (-) / 抗 HBe (+) への変換）であってもよく、又はウイルス学的応答（virology response）（すなわち、慢性 B 型肝炎患者において血清 HBV DNA 量が 1000 コピー / ml 以下まで減少する）又は疾患状態の寛解若しくは良好な

20

【0018】

特定の一実施形態において、慢性 B 型肝炎患者の疾患進行を監視するための一般的な基準は、患者の肝臓炎症の発生及び B 型肝炎ウイルスに特異的な宿主免疫応答の活性化を示唆する、B 型肝炎ウイルスコアタンパク質に対する抗体のレベルの異常な上昇である。

【0019】

特定の一実施形態において、本発明は、アデホビルジピボキシル及びペグ化インターフェロンによる治療を受ける慢性 B 型肝炎患者の応答を評価するためのキットを製造する際の抗 HBc の使用に関する。

【0020】

特定の一実施形態において、本発明は、慢性 B 型肝炎患者の疾患進行を監視するためのキットを製造する際の抗 HBc の使用に関する。

30

【0021】

特定の一実施形態において、本発明は、B 型肝炎患者の病期を予測するためのキットを製造する際の抗 HBc の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】抗 HBc ELISA 定量法の直線ダイナミック（dynamic）レンジを示すグラフである。

【図2】抗 HBc ELISA 定量法の実験内（A）及び実験間（B）の正確性を示すグラフである。

40

【図3】104 個の試料の抗 HBc ELISA 定量検出の結果の一貫性を示すグラフである。

【図4】抗 HBc CLEIA 定量法の直線ダイナミック（dynamic）レンジを示すグラフである。

【図5】抗 HBc CLIA 定量法の直線ダイナミック（dynamic）レンジを示すグラフである。

【図6】様々な時期の HBV 感染患者の血清抗 HBc レベルの分布を示すグラフである：（A）様々な時期の HBV 感染患者の血清抗 HBc レベル及び ALT レベル；（B）様々な時期の HBV 感染患者の血清 HBV DNA レベル及び HBsAg レベル；（C）血清

50

抗HBcレベルに基づいて対象の免疫活性化状態を判定するためのROC曲線解析；(D)ALTに基づいて層別化した様々な患者の平均抗HBcレベル；(E)血清抗HBcレベル及びALTレベルの相関解析。頭字語に関する注釈：PBI、感染前の患者；IT、免疫寛容期にある患者；IC、免疫クリアランス期にある患者；LR、低複製期にある患者；ENH、HBsAg陰性肝炎；LC、肝硬変の患者；HCC、原発性肝臓癌の患者。

【図7】慢性B型肝炎ウイルス保有者の自然な進行期間中の血清抗HBc、ALT、HBVDNA、及びHBsAgのレベルの動態変化を示すグラフである。

【図8】治療前の慢性B型肝炎患者の血清抗HBcレベルを用いて予測された、治療後のHBsAgセロコンバージョン率を示す図である。(A)治療前の抗HBcレベルを用いて、アデホビルジピボキシルによる治療を受けた後の慢性B型肝炎患者のHBsAgセロコンバージョンを予測；(B)治療前の抗HBcレベルを用いて、ペグ化インターフェロンによる治療を受けた後の慢性B型肝炎患者のHBsAgセロコンバージョンを予測；(C)血清抗HBcレベルを用いて、アデホビルジピボキシルによる治療を受けた後の患者におけるHBsAgセロコンバージョン発生率を予測；(D)血清抗HBcレベルを用いて、ペグ化インターフェロンによる治療を受けた後の患者におけるHBsAgセロコンバージョン発生率を予測；(E)治療前の抗HBcレベルを用いて、ベースラインALTレベルが異なる層別化された患者におけるHBsAgセロコンバージョン率を予測；

【図9】アデホビルジピボキシル及びペグ化インターフェロンによる治療を受けた後の、ベースライン抗HBcレベルが異なる層別化された患者におけるHBsAgセロコンバージョン発生率を示す図である。

【図10】アデホビルジピボキシルによる治療中及び治療後の患者において定量した血清マーカーレベルの動態変化を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0023】

別段の定めがない限り、本発明の本文で使用される技術用語又は科学用語はすべて、本発明に関連する分野の当業者に公知である共通の意味を有する。

【0024】

本発明の例1において、抗HBc ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ、マイクロウェルプレート法)定量的検出方法が確立された。この方法により、血清試料中の抗HBcの含有量を正確に測定することができ、1回の検出の正確な定量のための直線ダイナミックレンジは、最大で1.8桁(0.04~2.5IU/ml)であった。このような特徴は、抗HBcを検出するための公知の方法は有していなかった^[4, 5]。

【0025】

例2において、抗HBc CLIA(化学発光酵素結合免疫アッセイ、マイクロウェルプレート法)定量的検出方法が確立された。この方法により、血清試料中の抗HBcの含有量を正確に測定することができ、1回の検出の正確な定量のための直線ダイナミックレンジは、最大で2.7桁(0.04~20IU/ml)であった。この方法の直線ダイナミックレンジは、例1で説明した抗HBc ELISA定量的検出方法のものより広く、その結果、抗HBcの多い試料を検出するのに必要とされる希釈回数は著しく減少し、効率は改善した。

【0026】

例3において、抗HBc CLIA(直接的化学発光免疫アッセイ、微粒子法)定量的検出方法が確立された。この方法により、血清試料中の抗HBcの含有量を正確に測定することができ、1回の検出の正確な定量のための直線ダイナミックレンジは、最大で3.02桁(0.02~20.8IU/ml)であった。この方法により、例1で説明した抗HBc ELISA定量的検出方法と比べて、1回の検出の直線ダイナミックレンジは有意に広がり、その結果、抗HBcの多い試料を検出するのに必要とされる希釈回数は著しく減少し、効率は改善した。この方法は、検出用に単一の試験管が使用されるという点で、例2で説明した抗HBc CLIA定量的検出方法とは異なり、全自動機器が装備された場合、診療所において任意の時点におけるピックアップ検出(pick-up de

10

20

30

40

50

t e c t i o n) のために使用され得る。

【 0 0 2 7 】

例 4 において、上記の抗 H B c 定量的検出方法は、様々な段階の H B V 感染者の血清抗 H B c レベル分布を評価するために適用された。評価結果から、慢性 B 型肝炎ウイルス感染者において、血清抗 H B c レベルは感染者の肝炎活動性及び宿主免疫状態に関連していることが示された。したがって、抗 H B c レベルは、慢性 B 型肝炎ウイルス感染者が免疫活性化状態であるか、又は肝炎活動的状態であるかを判定するために使用され得、診断精度 (A U R O C) は 0 . 9 1 8 (9 5 % C I : 0 . 8 8 8 ~ 0 . 9 4 8) であり、測定の閾値は 7 4 0 0 I U / m l であった。これらの結果から、本発明において開示される抗 H B c 定量的検出方法によって得られる検出結果は、臨床医が患者の疾患段階を判定するの

10

【 0 0 2 8 】

例 5 において、上記の抗 H B c 定量的検出方法は、慢性 B 型肝炎ウイルス感染者の自然な進行期間中の抗 H B c レベルの動態変化及び他の指標との関係性を評価するために適用された。評価結果から、慢性 B 型肝炎ウイルス感染者の肝臓炎症が活動性である場合、抗 H B c 及び A L T はほぼ同時に増加し、抗 H B c ピーク値は A L T ピーク値から 3 ~ 8 週間後に通常現われるが、時として、A L T ピークの出現の前又は同時に現われる場合もあり；肝炎の回復期の間、A L T は直ちに正常に戻ったのに対し、抗 H B c は 1 2 ~ 2 0 週後にベースラインレベルに戻った。この結果から、本発明の定量的検出方法によって測定される、慢性 B 型肝炎ウイルス感染者の抗 H B c レベルは、A L T 測定の補完的指標として

20

【 0 0 2 9 】

例 6 において、抗 H B c 定量的検出方法は、アデホビルジピボキシル及びペグ化 (p e g l y a t e d) インターフェロンによる治療を受ける慢性 B 型肝炎患者の応答を評価するために適用された。結果から、慢性 B 型肝炎患者の治療前の抗 H B c レベルは、治療後の H B e A g セロコンバージョン率と正の相関関係にあることが示された。すなわち、治療前の抗 H B c レベルが高い (この例においては 2 9 0 0 0 I U / m l) 患者では、安価で副作用が少ないが治療効果が十分ではないアデホビルジピボキシルでさえ、所望の効果を達成することができたが、一方、治療前の抗 H B c のレベルが中程度 (この例においては 9 0 0 0 ~ 2 9 0 0 0 I U / m l) 又はレベルが低い (この例においては < 9 0 0 0 I U / m l) 患者の場合、アデホビルジピボキシルの治療効果は、高価で副作用が多いが、より強力である長時間作用性インターフェロンに著しく劣っていた。治療前の抗 H B c レベルが高い (この例においては 2 9 0 0 0 I U / m l) 患者では、ウイルス複製に対するアデホビルジピボキシルの阻害効果が、治療前の抗 H B c レベルが低い (< 2 9 0 0 0 I U / m l) 患者における阻害効果よりも著しく優れていた。この結果から、本発明の定量的検出方法を使用して、治療を受ける前の慢性 B 型肝炎ウイルス感染者の抗 H B c レベルを測定することにより、アデホビルジピボキシル、長時間作用性インターフェロン、又は同様のメカニズムを有する他の薬物による治療を受けた後に予想される治療効果を予測でき、このことは、治療用薬物及び治療時間の選択を手引きし、それによって治療効率

30

40

【 0 0 3 0 】

以下の実施例は、本発明をさらに説明し、例示する。これらの実施例は、本発明を例示すると意図され、実施例におけるすべての試薬、化学物質又は生物学的活性材料の濃度、使用される患者、及び他の変量 (v a r i a n t) は、本発明の範囲を限定するのではなく、本発明の用途を例示するにすぎない。

【 実施例 】

【 0 0 3 1 】

1 . 二重抗原サンドイッチアッセイ抗 H B c 定量的酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) 方法

50

【0032】

1.1 固定化抗原及び標識抗原の調製

この方法において、使用される固定化抗原及び標識抗原は、試料中の抗HBc抗体に特異的に結合できるB型肝炎ウイルスコア抗原(HBcAg)であり、抗原は、HBcAgの完全長アミノ酸配列(Cp183)を含んでもよく、又はHBcAgの主要な免疫優性領域のアミノ酸配列(Cp149)を含むだけでもよかった。本発明で使用するHBcAgは、大腸菌(E.coli)を用いた組換え発現及び精製によって得た。Cp149組換え抗原の発現方法及び精製方法については、Adam Zlotnickら^[6]によって開示されている方法を参照することができ、一方、Cp183組換え抗原の発現方法及び精製方法については、An Liら^[5]によって開示されている方法を参照することができ、本発明において、通常、Cp149組換え抗原を固定化抗原として使用し、Cp183組換え抗原を標識抗原として使用した。

10

【0033】

1.2 反応プレートの準備

(1.2.1) Cp149抗原を、50mM CB緩衝液(pH9.6)(NaHCO₃/Na₂CO₃緩衝液、最終濃度は50mMであり、pH値は9.6であった)で希釈した。最終濃度は3µg/mlであった。

(1.2.2) 100µlのコート溶液を96ウェルELISAプレートの各ウェルに添加し、2~8で16~24時間コーティングし、次いで、37で2時間コーティングした。

20

(1.2.3) PBST洗浄溶液(20mM PB7.4、150mM NaCl、0.1%Tween20)を用いて、洗浄を1回行った。次いで、ブロッキング溶液(pH7.4、20%のウシ胎児血清及び1%のカゼインを含有する20mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄緩衝液)200µlを各ウェルに添加し、37で2時間ブロッキングし、ブロッキング溶液を廃棄した。乾燥させた後、プレートをアルミニウムホイルの袋に入れ、予備用途用(for standby use)2~8で保管した。

【0034】

1.3 Cp183抗原のHRP標識

改良した過ヨウ素酸ナトリウム法を使用した。Cp183組換え抗原10mgを標識する例は次のとおりであった。

30

(1.3.1) 濃度2mg/lのCp183組換え抗原(5ml)を透析袋に入れ、50mM CB緩衝液を用いて4で4時間透析した。透析中、2時間に1回、透析緩衝液を交換した。

(1.3.2) HRP 40mgを正確に計量し、ddH₂O 2ml中に溶解し、溶解後、20mg/ml NaIO₄溶液2mlを添加し、室温で30分間反応させた。次いで、エチレングリコール40ulを添加し、4で30分間反応させて、HRP活性化溶液(10mg/ml、4ml)を得た。

(1.3.3) ステップ1.3.2で得られたHRP活性化溶液を、Cp183組換え抗原を入れた透析袋に添加し、均一に混合し、次いで、暗条件下、4で6~8時間、50mM CB緩衝液を用いて透析した。透析中、2時間に1回、透析緩衝液を交換した。

40

(1.3.4) NaBH₄溶液(5mg/ml)0.4mlを調製し、ステップ1.3.3で得られた標識反応溶液に添加し、均一に混合し、暗条件下、4で2時間、反応させた。

(1.3.5) ステップ1.3.4を完了した後、標識反応溶液を新しい透析袋に入れ、4で4時間、PBS緩衝液を用いて透析した。

(1.3.6) ステップ1.3.5を完了した後、Cp183-HRP標識を分離するために、GE Company製のSephacryl S-300 HRクロマトグラフィークラムを用いて精製を行った。

(1.3.7) ステップ1.3.6で分離及び精製されたCp183-HRP標識を2mg/mlに濃縮し、次いで、グリセロールを体積比1:1で加え、均一に混合し、予備

50

用途用に - 20 で保管した。

(1 . 3 . 8) ステップ 1 . 3 . 7 で得られた Cp 1 8 3 - H R P 標識を、体積比 1 / 4 0 0 0 で酵素標識希釈緩衝液 (p H 7 . 4 、 2 0 % のウシ胎児血清、 1 % のカゼイン、 1 0 % のショ糖、 0 . 0 5 % のアミノピリンを含有する 2 0 m M N a ₂ H P O ₄ / N a H ₂ P O ₄ 緩衝液) を用いて希釈して、酵素標識反応溶液を得、これを均一に混合し、予備用途用に 2 ~ 8 で保管した。

【 0 0 3 5 】

1 . 4 定量用標準試料

抗 H B c 定量的検出のための定量用標準試料は、様々な濃度の B 型肝炎ウイルスコアタンパク質抗体の系列試料からなっていた。濃度の単位は、 I U / m l 、 P E I U / m l であり得、又は起源を追跡することができる (s o u r c e c a n b e t r a c e d) 濃度若しくは力価の他の任意の単位であり得た。本発明では、一般的な国際単位 (I U / m l) を抗 H B c 定量的検出のための単位として使用し、 N I B S C ^[7] によって公開されている抗 H B c W H O 標準試料 (コード : 9 5 / 5 2 2 、 5 0 I U / アンプル) を、 4 0 I U / m L 、 2 0 I U / m L 、 1 0 I U / m L 、 5 I U / m L 、 2 . 5 I U / m L 、 1 . 2 5 I U / m L 、 0 . 6 2 5 I U / m L 、 0 . 3 1 2 5 I U / m L 、 0 . 1 5 6 I U / m L 、 0 . 0 7 8 I U / m L 、 0 . 0 3 9 I U / m L 、 0 . 0 2 I U / m L 、 0 . 0 1 I U / m L 、 すなわち合計で 1 3 種の異なる濃度に達するように、段階的に希釈した。標準試料を希釈するのに使用される基質溶液は、抗 H B c 陰性の健康な血液ドナーに由来する血漿若しくは血清であり得、又は 2 0 % のウシ胎児血清を含有する P B S 溶液であり得た。

【 0 0 3 6 】

1 . 5 E L I S A による抗 H B c の定量的検出

慢性 B 型肝炎患者の血清試料 1 つ (P 1 番) を用意し、以下のステップに従って、抗 H B c 定量的検出を実施した。通常、慢性 B 型肝炎患者は抗 H B c のレベルが比較的高いという事実を考慮して、 2 0 % のウシ胎児血清を含有する P B S 溶液を用いて、 4 種の希釈率、すなわち 1 : 5 0 0 、 1 : 2 5 0 0 、 1 : 1 2 5 0 0 、 1 : 6 2 5 0 0 に達するように試料を希釈し、次いで、定量的 E L I S A 検出のために使用した。

(1 . 5 . 1) 試料の反応 : コーティングされた E L I S A プレート 1 枚を用意し、試料希釈溶液 9 0 μ l を各ウェルに添加し、試料又は標準試料 1 0 μ l も各ウェルに添加し、振盪及び混合し、次いで、 3 7 で 3 0 分間、インキュベートし反応させた。

(1 . 5 . 2) 酵素標識反応 : ステップ 1 . 5 . 1 を完了した後、 P B S T 洗浄溶液 (2 0 m M P B 7 . 4 、 1 5 0 m M N a C l 、 0 . 1 % T w e e n 2 0) を用いて E L I S A プレートを 5 回洗浄し、ステップ 1 . 3 . 8 で得られた酵素標識反応溶液 1 0 0 μ l を各ウェルに添加し、 3 7 で 3 0 分間、インキュベートし反応させた。

(1 . 5 . 3) 発色反応 : ステップ 1 . 5 . 2 を完了した後、 P B S T 洗浄溶液 (2 0 m M P B 7 . 4 、 1 5 0 m M N a C l 、 0 . 1 % T w e e n 2 0) を用いて E L I S A プレートを 5 回洗浄し、 T M B 発色剤 (B e i j i n g W a n t a i B i o l o g i c a l P h a r m a c y C o . , L t d . に よ っ て 提 供 さ れ る) 5 0 μ l を各ウェルに添加し、 3 7 で 1 5 分間、インキュベートし反応させた。

(1 . 5 . 4) 反応の停止及び値の読み取り : ステップ 1 . 5 . 3 を完了した後、 E L I S A プレートの各ウェルに停止液 (B e i j i n g W a n t a i B i o l o g i c a l P h a r m a c y C o . , L t d . に よ っ て 提 供 さ れ る) 5 0 μ l を添加し、プレートリーダーを用いて各ウェルの O D _{4 5 0 / 6 3 0} 値を検出した。

(1 . 5 . 5) 定量用検量線を描く : ステップ 1 . 5 . 4 を完了した後、 1 3 種の定量用標準試料の測定値及び対応するその濃度を線形回帰に供し、図 1 の定量用検量線を描いた。図 1 によれば、抗 H B c E L I S A 法の正確な定量的検出のための上限値は 2 . 5 I U / m l であり、下限値は 0 . 0 4 I U / m l であり、その直線ダイナミックレンジは 1 . 8 桁であった。 O D _{4 5 0 / 6 3 0} 測定値から抗 H B c 濃度を算出するための式は、次のとおりであった : 抗 H B c 濃度 (I U / m L) = 1 . 2 1 0 4 × O D _{4 5 0 / 6 3 0} - 0 .

011。

(1.5.6) 試験される試料の抗HBc濃度の取得：P1血清の段階的に希釈した試料をステップ1.5.1～1.5.5に供した。その際、希釈率1：500の場合のOD_{450/630}測定値は3.899であり、希釈率1：2500の場合のOD_{450/630}測定値は3.801であり、希釈率1：12500の場合のOD_{450/630}測定値は2.988であり、希釈率1：62500の場合のOD_{450/630}測定値は0.301であった。上記の測定値を、ステップ1.5.5で得られた抗HBc濃度算出用の式に導入したところ、希釈率1：500の場合の濃度の値は4.71IU/mlであり、希釈率1：2500の場合の濃度の値は4.59IU/mlであり、希釈率1：12500の場合の濃度の値は3.61IU/mlであり、希釈率1：62500の場合の濃度の値は0.35IU/mlであった。希釈率1：62500の場合の濃度測定値は、ELISA法の正確な定量のための直線ダイナミックレンジ(0.04～2.5IU/ml)の範囲内であった。したがって、試料の元の抗HBc濃度は、 $0.35 \times 62500 = 22083$ IU/mlであった。

10

(1.5.7) 検出方法のアッセイ内の正確性の評価：濃度が公知の6種の試料を用意した。これらは、抗HBcの定量した値が5IU/ml、2.5IU/ml、1.25IU/ml、0.625IU/ml、0.3125IU/ml、0.156IU/mlであった。同じ試験において、各試料をステップ1.5.1～1.5.4に従い16個のウェル中で繰り返し検出し、各試料のOD_{450/630}測定値のアッセイ内変動係数(variable coefficient)を検出後に別々に算出し、図2Aに示した。図2Aにおいて、6種の試料のアッセイ内変動係数が2.8%から10.1%の間であることが示された。

20

(1.5.8) 検出方法のアッセイ間の正確性の評価：濃度が公知の6種の試料を用意した。これらは、抗HBcの定量した値が5IU/ml、2.5IU/ml、1.25IU/ml、0.625IU/ml、0.3125IU/ml、0.156IU/mlであった。上記の6種の試料を、ステップ1.5.1～1.5.4に従う16回の独立した検出試験に供した。すべての試験を完了した後、各試料のOD_{450/630}測定値のアッセイ間変動係数を別々に算出し、図2Bに示した。図2Bにおいて、6種の試料のアッセイ間変動係数が4.4%から10.5%の間であることが示された。

30

(1.5.9) 抗HBc定量的検出の再現性の評価：慢性B型肝炎患者の血清試料104個(抗HBcレベルが $2.23 \log_{10}$ IU/mlから $5.37 \log_{10}$ IU/mlの間であった)を無作為に選択し、ステップ1.5.1～1.5.6に従う抗HBc定量的検出に供した。検出は、独立に2回繰り返し、2回の検出試験の結果を回帰分析に供し、図3に示した。図3において、2回の検出試験の結果の一貫性が高い($R^2 = 0.988$)ことが示された。

【0037】

2. 二重抗原サンドイッチアッセイ抗HBc定量的化学発光酵素結合免疫アッセイ(CLEIA)法

【0038】

2.1 固定化抗原及び標識抗原の調製

本発明の例1のセクション1.1の方法を用いて、調製を行った。

40

【0039】

2.2 化学発光反応プレートの準備

化学発光反応プレートを抗原用の固体支持体として使用したことを除いて、本発明の例1のセクション1.2の方法を用いた。

【0040】

2.3 Cp183抗原のHRP標識

本発明の例1のセクション1.3の方法及びステップを用いた。

【0041】

2.4 定量標準試料

50

定量用標準試料は、本発明の例1のセクション1.4のものと同じであった。

【0042】

2.5 CLEIAによる抗HBcの定量的検出

慢性B型肝炎患者の血清試料1つ(P1番)を用意し、以下のステップに従って、抗HBc定量的検出を実施した。通常、慢性B型肝炎患者は抗HBcのレベルが比較的高いという事実を考慮して、20%のウシ胎児血清を含有するPBS溶液を用いて、3種の希釈率、すなわち1:500、1:2500、1:12500に達するように試料を希釈し、次いで、定量的CLEIA検出のために使用した。

(2.5.1) 試料の反応：コーティングされた化学発光反応プレート1枚を用意し、試料希釈溶液90 μ lを各ウェルに添加し、次いで、試料又は標準試料10 μ lを各壁(wall)に添加し、振盪し均一に混合し、次いで、37 $^{\circ}$ Cで30分間、インキュベートし反応させた。

10

(2.5.2) 酵素標識反応：ステップ2.5.1を完了した後、PBST洗浄溶液(20mM PB7.4、150mM NaCl、0.1% Tween20)を用いて化学発光反応プレートを5回洗浄し、ステップ1.3.8で調製した酵素標識反応溶液100 μ lを各ウェルに添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分間、インキュベートし反応させた。

(2.5.3) 発光反応及び測定：ステップ2.5.2を完了した後、PBST洗浄溶液(20mM PB7.4、150mM NaCl、0.1% Tween20)を用いて化学発光反応プレートを5回洗浄し、Pierce Company製のPICO Chemiluminescent Substrate 100 μ lを各ウェルに添加し、Orin II化学発光検出器を用いて、各反応ウェルのルミネセンス値(RLU)を直ちに読み取った。

20

(2.5.4) 定量用検量線を描く：ステップ2.5.3を完了した後、13種の定量用標準試料の測定値及び対応するその濃度を線形回帰に供し、図4の定量用検量線を描いた。図4によれば、抗HBc CLEIA法の正確な定量のための上限値は20 IU/mlであり、下限値は0.04 IU/mlであり、その直線ダイナミックレンジは2.7桁であった。RLU測定値から抗HBc濃度を算出するための式は、次のとおりであった：抗HBc濃度(IU/ml) = $10^{(\log_{10}(RLU) \times 0.9337 - 5.3006)}$ 。

(2.5.5) 試験される試料の抗HBc濃度の取得：P1血清の段階的に希釈した試料をステップ2.5.1~2.5.4の測定に供した。希釈率1:500の場合のRLU測定値は12115100であり、希釈率1:2500の場合のRLU測定値は5067890であり、希釈率1:12500の場合のRLU測定値は889610であり、上記の測定値を、ステップ2.5.4で得られた抗HBc濃度算出用の式に導入したところ、希釈率1:500の場合の濃度の値は20.56 IU/mlであり、希釈率1:2500の場合の濃度の値は9.114 IU/mlであり、希釈率1:12500の場合の濃度の値は1.795 IU/mlであった。ここで、希釈率1:2500及び1:12500の場合の測定値は、本発明のCLEIA法の正確な定量のための直線ダイナミックレンジ(0.04~20 IU/ml)の範囲内であった。したがって、希釈率1:2500の場合の測定値を計算に使用した場合、試料の元の抗HBc濃度は、 $9.114 \times 2500 = 22784$ IU/mlであった。一方、希釈率1:12500の場合の測定値を計算に使用した場合、試料の元の抗HBc濃度は、 $1.795 \times 12500 = 22442$ IU/mlであった。2つの測定値の平均濃度は22613 IU/mlであり、この濃度の値とELISA法によって測定した試料の濃度の値22083 IU/mlとには、通常の変動範囲内である2.4%の誤差があった。

30

40

【0043】

3. 二重抗原サンドイッチアッセイ抗HBc定量的管状微粒子化学発光免疫アッセイ(CLIA)法

【0044】

3.1 固定化抗原及び標識抗原の調製

50

本発明の例1のセクション1.1の方法を用いて、調製を行った。

【0045】

3.2 化学発光反応プレートの準備

(3.2.1) 磁性ビーズ1mgを用意し、活性化緩衝液系(50mM MES 5.0) 1mlで2回洗浄し、上清を廃棄した。EDC 1mg及びNHS剤1mg(それぞれ、10mg/mlに達するように50mM MES 5.0を用いて調製した)を添加し、均一に混合し、室温で振盪して20分間活性化させた。

(3.2.2) 活性化された磁性ビーズを活性化緩衝液系(50mM MES 5.0) 1mlで2回洗浄し、上清を廃棄した。Cp149抗原25µgを添加し、均一に混合し、室温で振盪して3時間反応させた。

(3.2.3) PBST洗浄溶液(20mM PB7.4、150mM NaCl、0.1% Tween 20)を用いて、洗浄を3回行った。次いで、保存溶液(20mM PB7.4、0.1% BSA、100mM Gly、0.05% TW-20、0.1% Proclin) 2500µlを各ウェルに添加し、予備用途用に2~8 で保管した。

【0046】

3.3 Cp183抗原のアクリジニウムエステル標識

(3.3.1) タンパク質Cp183 50µgを用意し、標識緩衝液系(50mM リン酸緩衝液、pH 8.0) 300µlに添加し、アクリジニウムエステル(5mM NH₂S-SAE) 8µlを添加し、暗条件下、室温で30分間、反応させた。

(3.3.2) ステップ(3.3.1)で反応させた混合物に、停止緩衝液(100mM グリシンを含有するリン酸緩衝液、pH 8.0) 100µlを添加し、暗条件下、室温で30分間、反応させた。

(3.3.3) ステップ(3.3.2)で得られた標識されたタンパク質を透析袋に入れ、透析緩衝液(20mM リン酸緩衝液、pH 7.4)を用いて暗条件下、4 で6~8時間透析した。その際、2時間に1回、透析緩衝液を交換した。

(3.3.4) ステップ(3.3.3)で得られた標識されたタンパク質を保存用試験管に移し、2% BSA及び50%グリセロールを加え、予備用途用に-20 で保管した。

(3.3.5) ステップ3.3.4で得られたCp183-SAE標識を、体積比1/500でアクリジニウムエステル標識希釈緩衝液(20%のウシ胎児血清、1%のカゼイン、10%のショ糖、0.05%のアミノピリンを含有する20mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄緩衝液、pH 7.4)を用いて希釈して、発光標識反応溶液を形成させた。これを均一に混合し、予備用途用に2~8 で保管する。

【0047】

3.4 定量用標準試料

抗HBcの濃度が公知である試料P1(抗HBc = 22083 IU/ml)を用意し、20%のウシ胎児血清を含有するPBS溶液を用いて段階的に希釈した。これらは、CLIA法の定量用標準試料として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に達するように、別々に希釈した。

【0048】

3.5 CLIAによる抗HBcの定量的検出

慢性B型肝炎患者の血清試料1つ(P2番)を用意し、以下のステップに従って、抗HBc定量的検出を実施した。通常、慢性B型肝炎患者は抗HBcのレベルが比較的高いという事実を考慮して、20%のウシ胎児血清を含有するPBS溶液を用いて、2種の希釈率、すなわち1:500、1:2500に達するように試料を希釈し、次いで、定量的CLIA検出のために使用した。P2試料を例1の抗HBc ELISA定量的検出方法に供し、その抗HBc濃度を8069 IU/mlと決定した。

(3.5.1) 試料の反応：磁性ビーズ50µlを用意し、反応試験管に加え、次いで

10

20

30

40

50

、試料又は標準試料 10 μ l を各ウェルに添加し、振盪し均一に混合し、37 で15分間、インキュベートし反応させた。

(3.5.2) 発光標識反応：ステップ3.5.1を完了した後、PBST洗浄溶液(20mM PB7.4、150mM NaCl、0.1% Tween20)を用いて化学発光反応プレート(5回洗浄し、ステップ3.3.5で調製した発光標識反応溶液50 μ l を各ウェルに添加し、37 で10分間、インキュベートし反応させた。

(3.5.3) 発光反応及び測定：ステップ3.5.2を完了した後、PBST洗浄溶液(20mM PB7.4、150mM NaCl、0.1% Tween20)を用いて化学発光反応プレート(5回洗浄し、Sirius-Lシングルチューブ化学発光検出器を用いて励起溶液をその場所に(in-situ)注入し、光強度を同時に検出した。

(3.5.4) 定量用検量線を描く：ステップ3.5.3を完了した後、11種の定量用標準試料の測定値及び対応するその濃度を線形回帰に供し、図5の定量用検量線を描いた。図5によれば、抗HBc微粒子化学発光検出(CLIA)法の正確な定量のための上限値は20.8 IU/mlであり、下限値は0.02 IU/mlであり、その直線ダイナミックレンジは3.02桁であった。RLU測定値から抗HBc濃度を算出するための式は、次のとおりであった：抗HBc濃度(IU/ml) = $10^{(Log_{10}(RLU) \times 1.1409 - 5.861)}$ 。

(3.5.5) 試験される試料の抗HBc濃度の取得：P2血清の段階的に希釈した試料をステップ3.5.1~3.5.4の測定に供した。希釈率1:500の場合のRLU測定値は1571400であり、希釈率1:2500の場合のRLU測定値は380560であり、上記の測定値を、ステップ3.5.4で得られた抗HBc濃度算出用の式に導入したところ、希釈率1:500の場合の濃度の値は16.16 IU/mlであり、希釈率1:2500の場合の濃度の値は3.204 IU/mlであり、両方とも、CLIA法の正確な定量のための直線ダイナミックレンジ(0.02~20.8 IU/ml)の範囲に入った。したがって、希釈率1:500の場合の測定値を計算に使用した場合、試料の元の抗HBc濃度は、 $16.16 \times 500 = 8078$ IU/mlであった。一方、希釈率1:2500の場合の測定値を計算に使用した場合、試料の元の抗HBc濃度は、 $3.204 \times 2500 = 8010$ IU/mlであった。2つの測定値の平均濃度は8044 IU/mlであり、この濃度の値とELISA法によって測定した試料の濃度の値8069 IU/mlとは、通常の変動範囲内である3.1%の誤差があった。

【0049】

4. 様々な段階のHBV感染者の血清抗HBcレベルの分布

【0050】

4.1 代表的な患者血清試料の選択

本発明において、様々な段階のHBV感染者の血清抗HBcレベルの分布を研究するために、過去にHBVに感染し、治癒した健常者の血清試料350個及び慢性B型肝炎患者の血清試料488個を採取した。血清試料はすべて、血清を分離した後に-80で保管した。患者488名の内、患者109名は、原発性肝臓癌の患者であり、患者63名は肝硬変の患者であり、残りの患者316名は、単純な慢性B型肝炎の患者であった。患者はすべて、C型肝炎ウイルス(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、D型肝炎ウイルス(HDV)、E型肝炎ウイルス(HEV)に同時に感染している可能性を排除するように、且つ自己免疫性又は代謝性の肝臓疾患に同時に罹患しているという臨床的医学的証拠がないように、選択した。

【0051】

European Association For The Study Of The Liverの慢性B型肝炎の臨床的管理のための手引書(the Guide for Chronic Hepatitis B Clinic Management)(2009)に基づいて、単純な慢性B型肝炎の患者316名を異なる感染期に分けた。患者52名は、免疫寛容期(IT)にあり、年齢が35歳未満であり、HBeAg陽性であり、血清HBV DNA量が 5×10^7 コピー/mlより多く、過去12ヶ月の間に

測定されたALTレベルが常に正常値の上限（ULN、すなわち、本発明においては40 U/L）より低いことを特徴としていた。患者104名は、免疫クリアランス期（IC）にあり、HBeAg陽性であり、血清HBV DNA量が 1×10^4 コピー/mLより多く、ALTレベルがULNの2倍より高いことを特徴としていた。患者75名は、低複製期（LR）にあり、HBeAg陰性であり、血清HBV DNA量が 1×10^4 コピー/mLより少なく、過去12ヶ月の間に測定されたALTレベルが常にULNより低いことを特徴としていた。患者85名は、HBeAg陰性肝炎期にあり、HBeAg陰性であり、血清HBV DNA量が 2×10^4 コピー/mLより多く、ALTレベルがULNの2倍より高いことを特徴としていた。

【0052】

10

4.2 臨床検査方法

試料採取後24時間目に、患者の血清ALTレベル及び肝臓機能の他の生化学的指標を測定した。先行技術文献で報告されている方法を用いて、血清HBV DNA量及びHBV遺伝子型検出を行った。HBsAg定量は、Beijing Wantai Biological Pharmacy Co., Ltd.のHBsAg化学発光定量キットを用いることによって実施した。HBeAg及び抗HBeは、米国のAbbott LaboratoriesのArchitect化学発光自動検出システムを用いて測定した。

【0053】

4.3 患者の血清試料の抗HBc定量

これは、本発明の例1、例2、又は例3の方法を用いて実施した。

20

【0054】

4.4 統計学的方法

対応のないt検定又はクラスカル・ワリスANOVAを用いて、群間の連続変数の比較を行った。マンテル・ヘンツェルの²検定又はフィッシャーの正確検定を用いて、群間の分類変数（classified variable）の比較を行った。また、ピアソン検定を相関分析のために使用した。受信者動作特性（ROC）を用いて診断精度の分析を行い、診断効率を算出した（ROC曲線下面積、AUROC）。0.05未満のp値は、有意な統計学的差を有しているとみなした。

【0055】

4.4 患者コホートの基本的特徴

30

セクション4.1において説明したHBVに過去に感染した者及び慢性HBV保有者の人口統計学的特性（population statistics）、臨床的ウイルス学的検査、及び血液生化学的検査に関するバックグラウンドデータを表1に示す。

【表1】

表1: 様々な段階のHBV感染者の人口統計学的特性、臨床的ウイルス学的検査、及び血液生化学的検査に関するバックグラウンドデータ

病期: 患者数:	過去のHBV (n=350)	免疫寛容期 (n=52)	免疫クリアランス期 (n=104)	低複製期 (n=75)	E抗原陰性肝炎 (n=85)	B型肝炎肝硬変 (n=63)	B型肝炎原発性 肝臓癌 (n=109)
年齢(才)の中央値(範囲)	36 (1~59)	22 (4~35)	33 (10~65)	46 (11~75)	42 (17~82)	51 (26~77)	51 (35~77)
性別、男性/女性	156/194	26/26	84/20	46/29	70/16	47/16	96/13
遺伝子型、B/C	--	36/16	71/33	34/14 ^a	56/29	24/39	52/57
HBeAg陽性の数n(%)	0	52(100)	103(100)	0	0	20(32)	21(19.2)
ALT(U/L)の中央値(範囲)	14 (6~40)	24 (10~39)	266(81~3525)	21 (8~38)	460 (80~4093)	56 (11~1831)	59 (18~1337)
ALT上昇(>40U/L)の数n(%)	0	0	104 (100)	0	85 (100)	39 (62)	80 (73)
HBV DNA陽性率 %	0	100	100	100	100	100	100
Log ₁₀ コピー/mLの中央値(範囲)	--	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陽性率 %	0	100	100	100	100	100	100
Log ₁₀ IU/mLの中央値(範囲)	--	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)
抗HBc陽性率 %	100	100	100	100	100	100	100
Log ₁₀ IU/mLの中央値(範囲)	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)

注釈: ^a HBV DNA量が過剰に少なかったため、低複製期(LR)の患者27名のHBV遺伝子型を判定するのに成功しなかった。

【0056】

4.5 様々な段階のHBV感染者の血清抗HBcレベル

図6A/Bにおいて、様々な疾患段階の代表的な患者の血清抗HBcレベル、ALTレベル、HBsAgレベル、及びHBV DNA量の分布状況を示した。過去に感染した者

50

の血清抗HBcレベルは、慢性HBV保有者のものより有意に低かった（中央値： $0.4 \log_{10} \text{IU/ml}$ 対 $4.1 \log_{10} \text{IU/ml}$ 、 $p < 0.001$ 、1000分の1より低い）。感染期の異なる単純な慢性B型肝炎患者間で、血清抗HBcレベルは有意に異なっていた。免疫寛容期にある患者の血清抗HBcレベルの中央値は $3.4 \log_{10} \text{IU/ml}$ であり、免疫クリアランス期にある患者の血清抗HBcレベルの中央値は $4.4 \log_{10} \text{IU/ml}$ であり、低複製期にある患者の血清抗HBcレベルの中央値は $3.3 \log_{10} \text{IU/ml}$ であり、HBeAg陰性肝炎期にある患者の血清抗HBcレベルの中央値は $4.4 \log_{10} \text{IU/ml}$ であった。上記データの解析により、免疫クリアランス期及びHBeAg陰性肝炎期にある患者の血清抗HBcレベルは、免疫寛容期及び低複製期にある患者のものより有意に高く（ $p < 0.001$ ）、免疫クリアランス期及びHBeAg陰性肝炎期にある患者の血清抗HBcレベルには統計学的差はなく（ $p > 0.05$ ）、免疫寛容期及び低複製期にある患者の血清抗HBcレベルにも統計学的差はない（ $p > 0.05$ ）ことが示される。上記の結果から、慢性B型肝炎患者の血清抗HBcレベルは、宿主の免疫状態と強く相関していることが示される。高レベルの抗HBcは、患者が抗HBV免疫活性状態にあることを示し、対象個体が免疫活性状態にある（免疫クリアランス期又はHBeAg陰性肝炎期）にあるかどうかを判定するのに抗HBcレベルを使用する場合、ROC曲線解析による診断効率（AUROC、曲線下面積）は 0.918 （95%信頼区間： $0.888 \sim 0.948$ ）である（図6Cを参照されたい）。ROC曲線を用いて算出した 7400IU/ml という最適化カットオフ値を閾値として使用する場合、診断感度は87.3%であり、診断特異度は83.5%であった。

10

20

【0057】

B型肝炎肝硬変患者及びB型肝炎原発性肝臓癌患者の血清抗HBcレベルを解析した。その結果を図6A/Bに示す。B型肝炎肝硬変患者間で、ALT ULNである患者39名（LC-b群）の血清抗HBcレベルは、ALT < ULNである患者24名（LC-a群）のものより有意に高かった（中央値は、 $4.2 \log_{10} \text{IU/ml}$ 対 $3.8 \log_{10} \text{IU/ml}$ であった。 $p = 0.016$ ）。一方、B型肝炎原発性肝臓癌患者間で、ALT ULNである患者80名（HCC-b群）の血清抗HBcレベルは、ALT < ULNである患者29名（HCC-a群）のものより有意に高かった（中央値は、 $4.1 \log_{10} \text{IU/ml}$ 対 $3.8 \log_{10} \text{IU/ml}$ であった。 $p = 0.006$ ）。上記の結果から、慢性肝炎ウイルス感染者の血清抗HBcレベルがALTレベル及び宿主の免疫状態と有意に相関していることがさらに裏付けられる。

30

【0058】

4.6 慢性B型肝炎ウイルス保有者の抗HBcレベル及びALTレベルの相関関係

慢性B型肝炎ウイルス保有者488名全員（単純な慢性B型肝炎患者、B型肝炎肝硬変患者、及びB型肝炎原発性肝臓癌患者を含む、 $n = 488$ ）をALTに基づいて層別化した様々な患者の血清抗HBcレベルを解析した。この結果を図6Dに示す。ALT $5 \times$ ULNである患者において、患者の平均抗HBcレベルはALTレベルの上昇と共に上昇した（ p 傾向 < 0.001 ）。一方、ALTが $5 \times$ ULNに達した場合、血清抗HBcレベルは最高値に達し、それ以上上昇しなかった（ p 傾向 = 0.63 ）。相関分析により、ALT $5 \times$ ULNである患者（ $n = 328$ ）において、平均血清抗HBcレベルはALTレベルと正の相関関係にある（単因子分析： $r = 0.52$ 、 $p < 0.001$ ；多因子分析： $R = 0.53$ 、 $p < 0.001$ ）が、HBV DNAレベル（ $p = 0.25$ ）ともHBsAgレベル（ $p = 0.33$ ）とも相関関係がないこと（図6E）が示されている。ALT $5 \times$ ULNである患者において、抗HBcレベルとALTレベルの間の定量的相関は、男性患者（ $r = 0.53$ 、 $p < 0.001$ ）又は女性患者（ $r = 0.43$ 、 $p < 0.001$ ）のどちらでも、HBV遺伝子型Bに感染した患者（ $r = 0.49$ 、 $p < 0.001$ ）又はHBV遺伝子型Cに感染した患者（ $r = 0.53$ 、 $p < 0.001$ ）のどちらでも、HBeAg陽性患者（ $r = 0.57$ 、 $p < 0.001$ ）又はHBeAg陰性患者（ $r = 0.50$ 、 $p < 0.001$ ）のどちらでも、常に存在する。ALT $> 5 \times$ ULN（ $n = 160$ ）である場合、抗HBcレベルは、ALTレベルとは統計学的に有意な相関関係は

40

50

なく ($p = 0.43$)、またHBV DNAレベル ($p = 0.63$)ともHBsAgレベル ($p = 0.43$)とも相関関係がない。

【0059】

5. 慢性B型肝炎ウイルス保有者の自然な進行期間中の血清抗HBcレベルの動態変化及び他の指標とのその関係

【0060】

5.1 患者コホート

本実施例において、抗HBV治療を受けなかった合計9名の患者から得た自然な進行を縦断的に観察 (vertical observation) するための血清系列試料を研究した。平均観察期間は 103 ± 38 週 (57 ~ 168 週) であり、追跡時の来院を 5 ~ 17 回実施し、血清試料77個を使用した。

【0061】

5.2 臨床的検出方法

これは、例4のセクション4.2において説明した方法に従って実施した。

【0062】

5.3 患者の血清試料の抗HBc定量

これは、例4のセクション4.3において説明した方法に従って実施した。

【0063】

5.4 統計学的方法

一般化推定方程式 (GEE) を用いて縦断的データ解析を行い、例4において説明したものに従って、他の統計学的方法を実施した。

【0064】

5.5 慢性B型肝炎ウイルス保有者の自然な進行期間中の血清マーカーの動態変化及びそれらの関係

追跡観察期間中の患者9名 (A ~ G) の抗HBcレベル、ALTレベル、HBsAgレベル、及び血清HBV DNA量の動態変化を図7に示した。患者Aは、追跡観察期間中、免疫寛容期にあり、その血清HBV DNA量及びHBsAgは常に極めて高レベルであったが、ALTレベル及び抗HBcレベルは常に極めて低レベルであった。患者Aを除いて、他の患者 (B ~ G) は全員、1回又は複数回の肝炎活性化を経験していた。これらの患者を観察することにより、抗HBcレベルの上昇は常にALTレベルの上昇を伴う、すなわち、肝炎の発病を伴うことが判明した。大半の状況において、肝炎の急性発病が起こった場合、患者の血清抗HBcレベルは通常、ALTレベルより3 ~ 8週遅れてピーク値に達した (図7、例えば、患者C、患者Dの第1の期間、患者Fの第1の期間、並びに患者G及び患者Iの状況)。場合によっては、患者の血清抗HBcレベルは、ALTレベルと比べて先に又は同時にピーク値に達することができた (図7、例えば、患者B、患者D、患者Fの第2の期間、並びに患者H及び患者Eの状況)。肝炎の回復期中、抗HBcの減少はALTより遅く、通常、ALTが正常に戻ってから12 ~ 20週間後に、抗HBcはベースラインレベルに戻った。

【0065】

一般に、多因子縦断的データ解析により、血清抗HBcレベルはALTレベルと独立に相関している ($r = 0.65$ 、 $p < 0.001$) が、血清HBV DNA量 ($r = -0.006$ 、 $p = 0.98$) 及びHBsAgレベル ($r = -0.034$ 、 $p = 0.45$) との間に統計学的に有意な相関関係はないことが示される。

【0066】

6. 抗HBcレベルを用いて、慢性B型肝炎患者における抗ウイルス治療法の治療効果を予測することができる。

【0067】

6.1 患者コホート

患者コホートA: HBsAg陽性患者49名。患者は全員、アデホビルジピボキシル ($10\text{mg}/\text{日}$) による治療を合計96週間受け、治療を中止してから12週間、追跡来院

10

20

30

40

50

した。

【0068】

患者コホートB：HB e A g陽性患者48名。患者は全員、ペグインターフェロン - 2 a（長時間作用性インターフェロン - 2 a、180 μg / 週）による治療を合計24週間受け、治療を中止してから24週間、追跡来院した。

【0069】

治療前の上記の患者はすべて、APASLの慢性B型肝炎の臨床的管理のための手引書（the Guide of Clinical Management of Chronic Hepatitis B）によって推奨されている治療法に適応できる疾患基準を満たしていた。すなわち、HB s A gが継続的に1年以上陽性であり、HB e A gが陽性であり抗HB eが陰性であり、血清ALTレベルはULNの2倍より高かった。患者は、C型肝炎ウイルス（HCV）、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、D型肝炎ウイルス（HDV）、E型肝炎ウイルス（HEV）に同時に感染している可能性を排除するように、且つ自己免疫性又は代謝性の肝臓疾患に同時に罹患しているという臨床的医学的証拠がないように、選択した。

10

【0070】

6.2 臨床的検出方法

これは、例4のセクション4.2において説明した方法に従って実施した。

【0071】

6.3 患者の血清試料の抗HB c定量

これは、例4のセクション4.3において説明した方法に従って実施した。

20

【0072】

6.4 治療終了の定義

主要な治療終了は、追跡来院の終了時にHB e A gセロコンバージョンが起こった場合と定義した。

【0073】

6.5 統計学的方法

統計学的方法はすべて、例4において説明した方法に従って実施した。

【0074】

6.6 患者コホートの基本的特徴

表2に示したとおりである。

30

【表2】

表2: アデホビルジピボキシル(コホートA)及びPEGインターフェロン(コホートB)による治療を受ける
HBeAg陽性慢性B型肝炎患者のベースラインの特徴

	コホートA	コホートB	P 値
数	49	48	--
治療戦略	ADV 96 週	Pegasys 24 週	--
年齢(才)の中央値(範囲)	35 (26~48)	35 (15~57)	0.80
性別、男性/女性	44/5	35/13	0.06
遺伝子型、B/C	11/38	29/19	<0.001
ALT 層、>5×ULN/≤5×ULN	12/37	16/32	0.34
ALT(U/L)の中央値(範囲) ^a	110 (44~402)	168 (32~626)	0.008
HBV DNA (log ₁₀ コピー/ml) の中央値(範囲)	7.58 (3.97~9.29)	7.55 (3.44~9.59)	0.50
HBsAg (log ₁₀ IU/ml) の中央値(範囲)	4.44 (2.35~5.47)	4.06 (1.53~5.35)	0.005
抗 HBe-IgM (S/CO 値) の中央値(範囲)	2.10(0.31~12.7)	1.78 (0.25~12.2)	0.45
抗 HBe (log ₁₀ IU/ml) の中央値(範囲)	4.29 (3.08~5.11)	3.98 (2.41~5.36)	0.15

注釈: ^a 患者はすべてHBeAg陽性であり、治療前のスクリーニングの間のALTレベルは2×ULNより高かった;治療を開始すると、患者11名のALTレベル(コホートAの患者5名及びコホートBの患者6名)は、2×ULN以下まで低下した。ADV:アデホビルジピボキシル; Pegasys:ペグ化インターフェロンα-2a;ULN、通常の上限值。

【0075】

6.7 ベースライン抗HBeレベルは、治療後のHBeAgセロコンバージョンの発生率と相関関係がある。

【0076】

治療及び追跡観察後、コホートA(アデホビルジピボキシルによる治療を受けている)の患者49名中9名は、追跡来院の終了時にHBeAgセロコンバージョンが起こっており、治療有効率は18.4%(95%CI:8.8~32.0%)であった。一方、コホートB(長時間作用性インターフェロンによる治療を受けている)の患者48名中23名は、追跡来院の終了時にHBeAgセロコンバージョンが起こっており、治療有効率は47.9%(95%CI:33.3~62.8%)であった。

【0077】

2つのコホート中の治療法が有効であった患者及び治療法が無効であった患者の、治療を受ける前の臨床的指標を解析し、その結果を表3に示した。アデホビルジピボキシルで治療した患者又は長時間作用性インターフェロンで治療した患者のいずれにおいても、年齢、性別比、ALTレベル、血清HBVDNA量、HBsAgレベル、及び抗HBe-IgMレベルの観点からは、治療法が有効であった患者と治療法が無効であった患者の間に統計的有意差はなかった。しかし、治療法が有効であった患者のベースライン抗HBeレベルは、治療法が無効であった患者のものより有意に高かった。コホートAでは $4.58 \pm 0.28 \log_{10} \text{ IU/mL}$ 対 $4.15 \pm 0.42 \log_{10} \text{ IU/mL}$ 、 $p = 0.005$ 、コホートBでは $4.32 \pm 0.66 \log_{10} \text{ IU/mL}$ 対 $3.81 \pm 0.68 \log_{10} \text{ IU/mL}$ 、 $p = 0.011$ 。この結果から、治療前の抗HBeレベルによって患者の予想される治療効果を予測できることが示唆される。ROC解析により、ベースライン抗HBeレベルを用いて追跡来院の終了時のHBeAgセロコンバージョンを予測するためのAUROC値がコホートAにおいて0.810であったこと(95

%)、CI: 0.675 ~ 0.948、 $p = 0.004$ 、図8Aを参照されたい。)、最良のカットオフ値は29000 IU/mlであり、診断感度は77.8%であり、診断特異度は77.5%であったこと、コホートBにおいてはAUROC値が0.710であったこと(95%CI: 0.564 ~ 0.855、 $p = 0.013$ 、図8Bを参照されたい。)、最良のカットオフ値は9000 IU/mlであり、診断感度は69.6%であり、診断特異度は60.0%であったことが示されている。

【表3】

表3: アデホビルジピボキシル(コホートA)による治療及びPEGインターフェロン(コホートB)による治療を受けるHBeAg陽性慢性B型肝炎患者における、治療後のHBeAgセロコンバージョンを断定(predication)するためのベースラインの特徴の値の分析

特徴	コホートA(アデホビルジピボキシル)				コホートB(ペグ化インターフェロンα-2a)			
	SR(+)	SR(-)	単変量 p値	多変量 p値	SR(+)	SR(-)	単変量 p値	多変量 p値
数	9	40	--	--	23	25	--	--
年齢(才)	35±4	36±6	0.87	0.80	34±11	36±10	0.54	0.80
性別、男性/女性	7/2	37/3	0.45	0.26	17/6	18/7	0.88	0.85
遺伝子型、B/C	2/7	9/31	0.99	0.46	15/8	14/11	0.52	0.90
ALT層、>5×ULN/≤5×ULN	3/6	9/31	0.77	0.45	8/15	8/17	0.84	0.43
ALT, U/L	170±88	137±79	0.28	0.29	198±129	213±149	0.71	0.26
HBV DNA, log ₁₀ コピー/mL	7.03±1.40	7.65±1.13	0.16	0.12	7.64±0.92	7.04±1.61	0.12	0.11
HBeAg, log ₁₀ IU/mL	4.32±0.16	4.39±0.65	0.78	0.56	4.01±0.42	3.92±1.07	0.70	0.13
抗HBe-IgM, S/CO値	3.13±1.39	2.51±2.49	0.47	0.88	3.38±2.85	2.72±3.43	0.47	0.75
抗HBe, log ₁₀ IU/mL	4.58±0.28	4.15±0.42	0.005	0.032	4.32±0.66	3.81±0.68	0.011	0.026

注釈: 年齢、ALTレベル、HBV DNA量、HBeAgレベル、IgM-抗HBe、及び抗HBeレベルは、平均値 ± SDとして表した。SR: HBeAgセロコンバージョン。

【0078】

6.8 ベースライン抗HBeレベルを用いた、治療後のHBeAgセロコンバージョンの発生率の予測

【0079】

セクション6.7で算出されたカットオフ値を治療の前に用いて、患者が治療を受けた後のHBeAgセロコンバージョンの発生率を予測し得る。コホートAでは、図8Cで示したように、ベースライン抗HBeレベルが29000 IU/mlより高い患者16名中7名は、追跡来院の終了時にHBeAgセロコンバージョンが発生していた(有効率: 43.8%)。一方、ベースライン抗HBeレベルが29000 IU/mlより低い患者33名中2名のみで、追跡来院の終了時にHBeAgセロコンバージョンが発生していた(有効率: 6.1%)。高抗HBe群と低抗HBe群とのHBeAgセロコンバージョンの発生率の比(リスク比、RR)は7.22であった(95%CI: 1.69 ~ 30.9、 $p = 0.006$)。コホートBでは、図8Dで示したように、ベースライン抗HBeレベルが9000 IU/mlより高い患者25名中16名は、追跡来院の終了時にHBeAgセロコンバージョンが発生していた(有効率: 64.0%)。一方、ベースライン抗HBeレベルが9000 IU/mlより低い患者23名中7名のみで、追跡来院の終了時にHBeAgセロコンバージョンが発生していた(有効率: 30.4%)。高抗HBe群と低抗HBe群とのHBeAgセロコンバージョンの発生率の比(リスク比、RR)は2.10であった(95%CI: 1.06 ~ 4.17、 $p = 0.006$)。

【0080】

様々なALTレベルの患者における治療後のHBeAgセロコンバージョンを予測するためのベースライン抗HBeの効果さをさらに解析し、結果を図8Eに示した。2つのコホートにおいて、ベースラインALTレベルが5×ULN以下であるか、又は5×ULNを上回る患者の下位集団に関して、抗HBeレベルが低い患者と比べて、抗HBeレベルが高い患者ほど、治療後のセロコンバージョンの発生率が高かった。アデホビルジピボキシル及び長時間作用性インターフェロンによる治療を受けた患者を解析のために一緒にし、患者全員を3つの群、すなわち高抗HBeレベル(29000 IU/ml)、中抗HBeレベル(9000 ~ 29000 IU/ml)、及び低抗HBeレベル(< 9000 IU

10

20

30

40

50

/m l)に分け、3群の患者の治療後のH B e A gセロコンバージョン率を解析し、その結果を図9に示した。ベースライン抗H B cレベルが29000 IU/ml以上である患者のうちで、アデホビルジピボキシルによる治療を受けた患者16名中9名は、治療後にH B e A gセロコンバージョンが起こり、奏効率は43.8%であったのに対し、長時間作用性インターフェロンによる治療を受けた患者15名におけるこの比率は66.7% (10/15)であり、これらの間に統計的有意差はなかった($p = 0.82$)。ベースライン抗H B cレベルが9000~29000 IU/mlである患者の場合、アデホビルジピボキシルによる治療を受けた患者19名中2名のみで、治療後にH B e A gセロコンバージョンが起こり、奏効率は10.5%であったのに対し、長時間作用性インターフェロンによる治療を受けた患者10名におけるこの比率は60.0% (6/10)であり、これらの間に統計的有意差があった($p = 0.018$)。ベースライン抗H B cレベルが9000 IU/ml未満である患者の場合、アデホビルジピボキシルによる治療を受けた患者16名の内で、治療後にH B e A gセロコンバージョンが起こった者はいなかったのに対し、長時間作用性インターフェロンによる治療を受けた患者23名中7名でH B e A gセロコンバージョンが起こり(30.4%)、これらの間には統計的有意差があった($p < 0.001$)。

【0081】

6.9 アデホビルジピボキシルによる治療中及び治療後の患者の抗H B cレベルの動態変化

【0082】

アデホビルジピボキシルによる治療中及び治療後の患者の抗H B cレベルの動態変化(図10Aを参照されたい)に基づくと、治療及び観察の期間全体を3つの段階に分けることができた:(1)ベースライン~治療開始後60週目。この段階では、患者の平均血清抗H B cレベルは、治療の継続に伴って直線的低下を示し($r = 0.99$ 、 $p < 0.001$)、12週当たり $0.20 \pm 0.05 \log_{10}$ IU/mL低下した;(2)治療開始後60週目~治療の終了(96週目)まで。患者の平均血清抗H B cレベルは一定値に達し(reached a platform)、治療の継続に伴って低下しなかった($p = 0.87$);(3)薬物治療後(108週目)。患者の平均血清抗H B cレベルは、治療終了時(96週目)の値と比べて著しい急上昇を示し、平均して $0.29 \log_{10}$ IU/mL上昇した($p < 0.001$)。通常、治療処置中、抗H B cレベルは、ALTレベル、HBV DNAレベル、及びHBsAgレベルよりゆっくりと低下した。前者は治療開始後60週目に一定値の段階に達したのに対し、後者の3つの指標は、治療開始後24週目に一定値の段階に達した。多因子縦断解析により、抗H B cレベルは、ALTレベルとは独立に相関している($r = 0.830$ 、 $p < 0.001$)が、HBV DNAレベル($r = 0.003$ 、 $p = 0.94$)ともHBsAgレベル($r = -0.061$ 、 $p = 0.52$)とも統計学的に有意な相関関係はないことが示された。

【0083】

本実施例のセクション6.7で決定された臨床的カットオフ値に基づいて、アデホビルジピボキシルによる治療を受けた患者全員を29000 IU/ml以上($n = 16$ 、高H B c)及び29000 IU/ml未満($n = 33$ 、低H B c)の2群に分けた。これらの2群の間で、治療中及び治療後の血清抗H B c、HBV DNA、ALT、及びHBsAgのレベルの動態変化を比較し、その結果を図10Bに示した。HBV DNAレベル($7.61 \pm 1.15 \log_{10}$ コピー/mL対 $7.50 \pm 1.22 \log_{10}$ コピー/mL、 $p = 0.77$)及びHBsAgレベル($4.34 \pm 0.31 \log_{10}$ IU/mL対 $4.38 \pm 0.69 \log_{10}$ IU/mL、 $p = 0.83$)の点で、高H B c群と低H B c群の間に統計学的差はなかった。一方、高H B c群のベースラインALTレベルは低H B c群のものより高かったが、統計学的差はなかった。治療中、2つの群のALTレベル及び抗H B cレベルの減少曲線は、各監視点の解析においても縦断解析においても統計学的差を示さなかった。しかし、薬物治療後、低H B c群の抗H B cは、高H B c群の抗H B cと比べて注目すべき急上昇を示し($p = 0.039$)、ALTも同様の状況にあった

が、統計的有意性はなかった ($p = 0.09$)。HBV DNAレベルの場合、高HBc群の患者の血清HBV DNAレベルは、治療中又は治療後いずれも(ベースラインを除く)、低HBc群のもの比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。追跡終了時に、高HBc群の患者の平均HBV DNAレベルは、治療前のレベルと比べて $3.48 \pm 2.24 \log_{10}$ コピー/mL 低下していたのに対し、低HBc群の患者の平均HBV DNAレベルは、治療前のレベルと比べて $1.69 \pm 2.05 \log_{10}$ コピー/mL 低下していた ($p = 0.008$)。これら2群のHBsAgレベルの変化は、有意な差を示さなかった。

【0084】

参考文献:

[1] Dienstag JL. B型肝炎ウイルス感染。(Hepatitis B virus infection.) N Engl J Med 2008;359:1486-1500.

[2] Liaw YF, Chu CM. B型肝炎ウイルス感染。(Hepatitis B virus infection.) Lancet 2009;373:582-592.

[3] Kwon H, Lok AS. B型肝炎治療法。(Hepatitis B therapy.) Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2011;8:275-284.

[4] Deng LJ, Xu Y, Huang J. ヒトB型肝炎コア抗体を効果的に検出するための二重抗原サンドイッチELISAの開発。(Developing a double-antigen sandwich ELISA for effective detection of human hepatitis B core antibody.) Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2008;31:515-526.

[5] Li A, Yuan Q, Huang Z, Fan J, Guo R, Lou Bら. ヒトB型肝炎コア抗体に対する新規な二重抗原サンドイッチ免疫アッセイ。(Novel double-antigen sandwich immunoassay for human hepatitis B core antibody.) Clin Vaccine Immunol 2010;17:464-469.

[6] Zlotnick A, Johnson JM, Wingfield PW, Stahl SJ, Endres D. A 理論的モデルにより、B型肝炎ウイルスカプシドアセンブリの特徴の特定に成功。(A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly.) Biochemistry 1999;38:14644-14652.

[7] WHO国際標準:抗B型肝炎コア抗原に関する最初の国際標準。(WHO International Standard: First International Standard for anti-Hepatitis B core antigen.) 2008年11月10日 [www.nibsc.ac.uk/documents/ifu/95-522.pdfより引用]

10

20

30

【 図 1 】

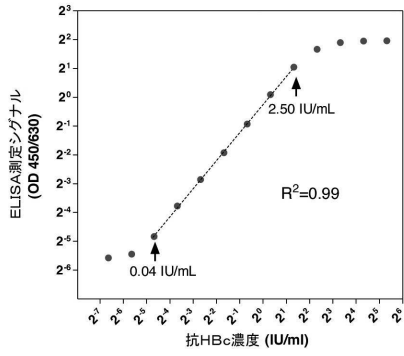


図 1

【 図 3 】

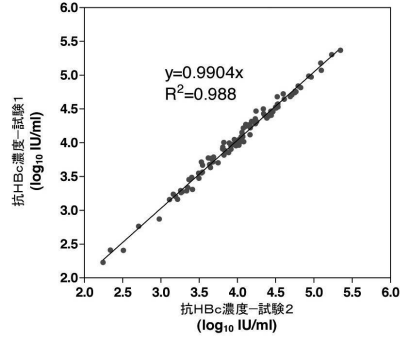


図 3

【 図 2 】

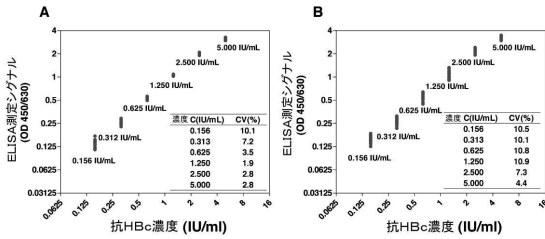


図 2

【 図 4 】

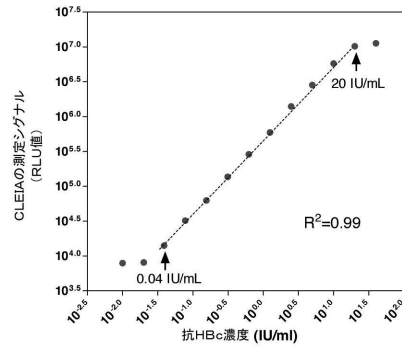


図 4

【 図 5 】

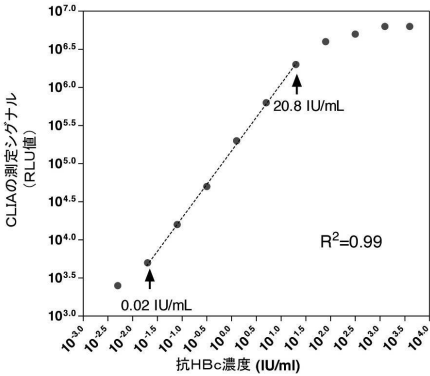


図 5

【 図 6 】

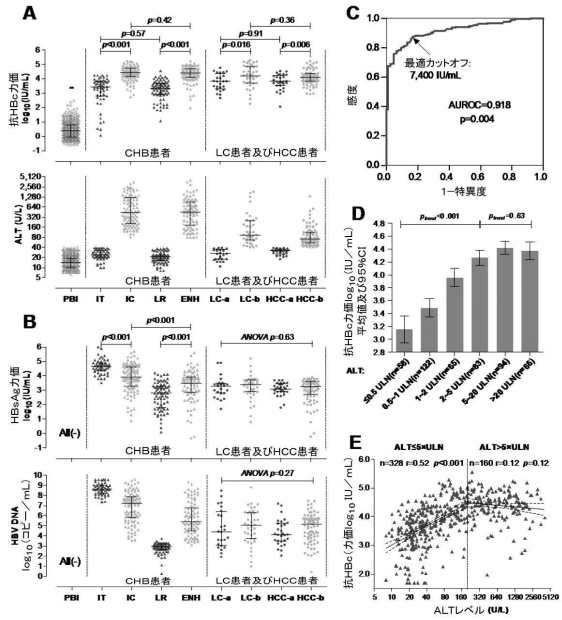


図 6

【 図 7 】

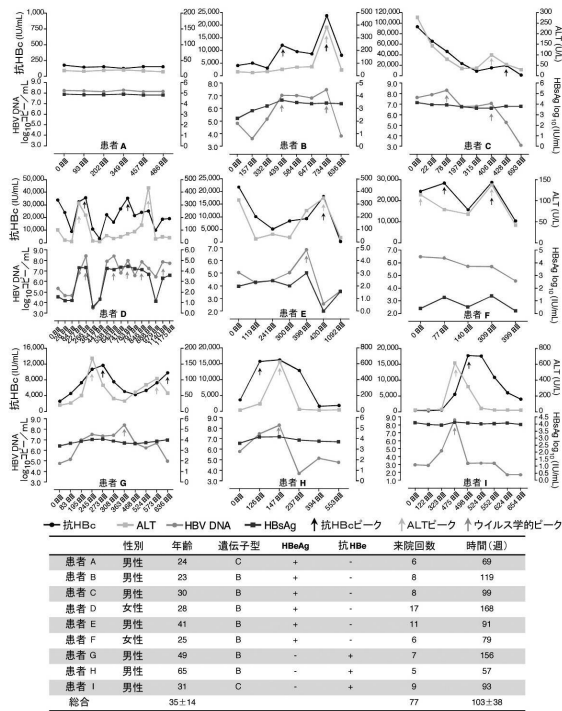


図 7

【 図 9 】

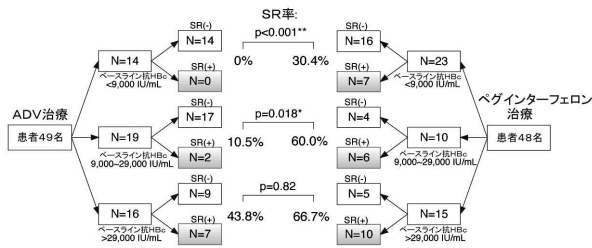


図 9

【 図 8 】

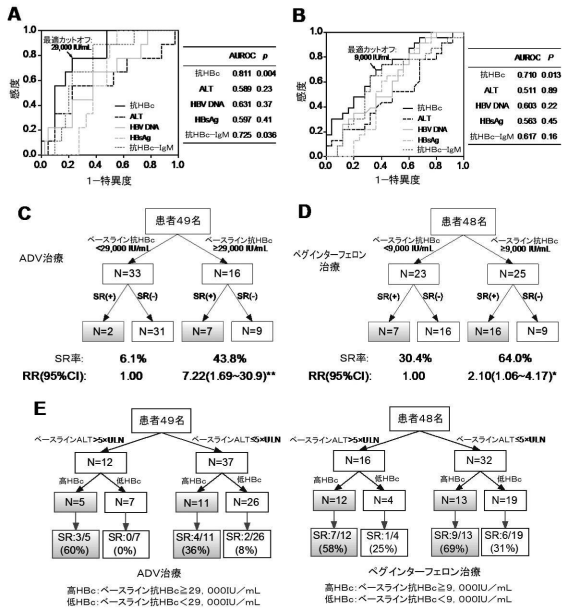


図 8

【 図 10 】

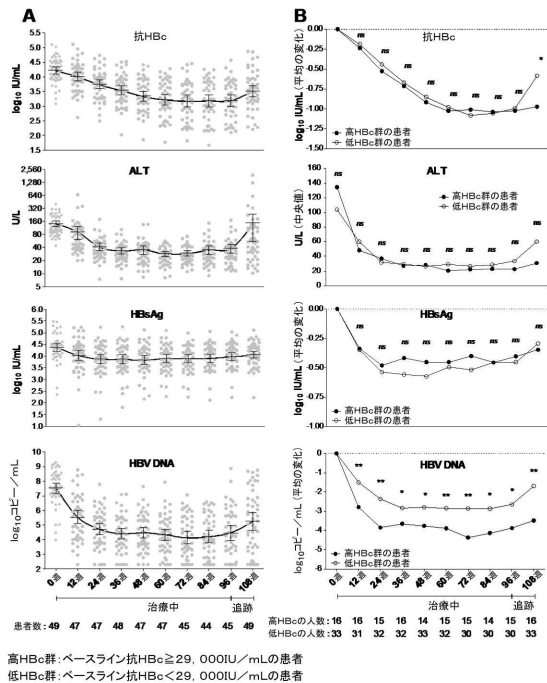


図 10

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 31/12	(2006.01)	A 6 1 P	1/16
A 6 1 K 38/21	(2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 K	38/21
		A 6 1 P	43/00 1 2 1

- (72)発明者 ユアン、クアン
中華人民共和国、フージェン、シャアメン、シャンガン ディストリクト、シャンガン サウス
ロード、シャンガン キャンパス オブ シャアメン ユニバーシティ
- (72)発明者 ソン、リュウエイ
中華人民共和国、フージェン、シャアメン、シャンガン ディストリクト、シャンガン サウス
ロード、シャンガン キャンパス オブ シャアメン ユニバーシティ
- (72)発明者 チョウ、ウェンビン
中華人民共和国、フージェン、シャアメン、ハイツァン、シンユエン ロード ナンバー 1 3 0
- (72)発明者 ウェン、ツーシン
中華人民共和国、フージェン、シャアメン、ハイツァン、シンユエン ロード ナンバー 1 3 0
- (72)発明者 シュウ、フェイハイ
中華人民共和国、フージェン、シャアメン、ハイツァン、シンユエン ロード ナンバー 1 3 0
- (72)発明者 ジェ、シェンシャン
中華人民共和国、フージェン、シャアメン、シャンガン ディストリクト、シャンガン サウス
ロード、シャンガン キャンパス オブ シャアメン ユニバーシティ
- (72)発明者 チャン、ジュン
中華人民共和国、フージェン、シャアメン、シャンガン ディストリクト、シャンガン サウス
ロード、シャンガン キャンパス オブ シャアメン ユニバーシティ
- (72)発明者 シャ、ニンシャオ
中華人民共和国、フージェン、シャアメン、シャンガン ディストリクト、シャンガン サウス
ロード、シャンガン キャンパス オブ シャアメン ユニバーシティ

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 中国特許出願公開第101545906(CN, A)
George Marinos et al., Quantitative Assessment of Serum IgM Anti-HBc in the Natural Course and During Interferon Treatment of Chronic Hepatitis B Virus Infection, Hepatology, 1994年, Vol.19, No.2, P303-311
Maurizia Rossana Brunetto et al., Monitoring the natural course and response to therapy of chronic hepatitis B with an automated semi-quantitative assay for IgM anti-HBc, Journal of Hepatology, 1993年, Vol.19, No.3, P431-436

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
A 6 1 K 3 1 / 6 6 1
A 6 1 K 3 8 / 2 1
A 6 1 P 1 / 1 6
A 6 1 P 3 1 / 1 2
A 6 1 P 4 3 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	慢性乙型肝炎患者的抗HBc定量检测方法及其在预测治疗效果中的应用		
公开(公告)号	JP6283319B2	公开(公告)日	2018-02-21
申请号	JP2014552496	申请日	2013-01-17
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学 字符男子鲍雄鹿生物科技有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	Shaamen大学 Shaamen Inobakkusu生物科技有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	Shaamen大学 Shaamen Inobakkusu生物科技有限责任公司		
[标]发明人	ユアंकアン ソソリユウエイ チヨウウエンビン ウエンツーシン シュウフェイハイ ジェシエンシャン チャンジュン シャニンシャオ		
发明人	ユアン、クアン ソン、リュウエイ チヨウ、ウエンビン ウエン、ツーシン シュウ、フェイハイ ジェ、シエンシャン チャン、ジュン シャ、ニンシャオ		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/53 G01N33/543 A61K31/661 A61P1/16 A61P31/12 A61K38/21 A61P43/00		
CPC分类号	A61P1/16 A61P31/12 A61P43/00 G01N33/56983 G01N33/5762 G01N2333/02 G01N2469/20 G01N2800/52 G01N2800/56 A01K67/0275 A01K2217/052 A01K2227/40 A01K2267/0393 A61K39/29 G01N33/5014 G01N33/5088		
FI分类号	G01N33/576.B G01N33/53.N G01N33/543.545.A G01N33/543.575 A61K31/661 A61P1/16 A61P31/12 A61K38/21 A61P43/00.121		
优先权	201210019389.5 2012-01-21 CN		
其他公开文献	JP2015505371A5 JP2015505371A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及定量检测抗-HBc的方法及其在监测慢性乙型肝炎患者疾病进展和预测治疗效果中的用途。通过定量检测抗乙型肝炎核心蛋白抗体 (Anti-HBc)，可以监测慢性乙型肝炎患者的疾病进展，有效预测接受乙型肝炎病毒治疗的慢性乙型肝炎患者的治疗效果 (尤其是基于干扰素的疗法和基于核苷/核苷酸类似物抗HBV药物的疗法)，从而引导患者合理选择药物。

(45) 発行日 平成30年2月21日(2018.2.21)

(24) 登録日 平成30年2月2日(2018.2.2)

(51) Int. Cl.	F I
GO I N 33/576 (2006.01)	GO I N 33/576 B
GO I N 33/53 (2006.01)	GO I N 33/53 N
GO I N 33/543 (2006.01)	GO I N 33/543 5 4 5 A
A 6 1 K 31/661 (2006.01)	GO I N 33/543 5 7 5
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 31/661

請求項の数 10 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-552496 (P2014-552496)	(73) 特許権者	510183280
(86) (22) 出願日	平成25年1月17日 (2013.1.17)		シャアメン ユニバーシティ
(65) 公表番号	特表2015-505371 (P2015-505371A)		中華人民共和国 3 6 1 0 0 5
(43) 公表日	平成27年2月19日 (2015.2.19)		フージェン プロヴィンス、シャアメン、スーミン
(86) 国際出願番号	PCT/CN2013/070573		ディストリクト、スー ミン ナン ロ
(87) 国際公開番号	W02013/107355		ード ナンバー4 2 2
(87) 国際公開日	平成25年7月25日 (2013.7.25)	(73) 特許権者	514185884
審査請求日	平成27年8月7日 (2015.8.7)		シャアメン イノバックス バイオテック
(31) 優先権主張番号	201210019389.5		カンパニー リミテッド
(32) 優先日	平成24年1月21日 (2012.1.21)		中華人民共和国 3 6 1 0 2 2
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		フージェン、シャアメン、ハイツァン、シンユエン
前置審査		(74) 代理人	110000855
			特許業務法人浅村特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗H B c 定量的検出方法、並びに慢性B型肝炎患者の疾患進行の監視及び管理並びに治療効果の予測におけるその使用