

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 274**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2013 PCT/CN2013/070573**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13107355**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2013 E 13738450 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2805729**

54 Título: **Detección cuantitativa de anti-HBc para predecir el efecto terapéutico de pacientes con hepatitis B crónica**

30 Prioridad:

21.01.2012 CN 201210019389

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.05.2019

73 Titular/es:

**XIAMEN UNIVERSITY (50.0%)
No. 422, Siming Nan Road Siming District
Xiamen, Fujian 361005, CN y
XIAMEN INNOVAX BIOTECH CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**YUAN, QUAN;
SONG, LIUWEI;
ZHOU, WENBIN;
WENG, ZUXING;
XU, FEIHAI;
GE, SHENGXIANG;
ZHANG, JUN y
XIA, NINGSHAO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 714 274 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Detección cuantitativa de anti-HBc para predecir el efecto terapéutico de pacientes con hepatitis B crónica

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a la detección del virus de la hepatitis B (VHB) y al diagnóstico clínico de la hepatitis vírica de tipo B, más específicamente, se refiere a un procedimiento para usar detección cuantitativa de anticuerpos contra la proteína core de la hepatitis B (anti-HBc) para monitorizar la progresión de la enfermedad de la hepatitis B crónica en pacientes, prediciendo de manera eficaz los efectos terapéuticos en pacientes con hepatitis B crónica que aceptan una terapia contra el virus de la hepatitis B (especialmente, una terapia a base de interferón y una terapia a base de un fármaco anti-VHB de análogo de nucleósido/nucleótido) y por lo tanto, orientar a los pacientes para elegir los fármacos de manera razonable.

Antecedentes de la técnica

15 La infección por el virus de la hepatitis B, especialmente la infección crónica por el virus de la hepatitis B, es uno de los problemas de salud pública más importantes en el mundo. En la actualidad, hay más de 350 millones de pacientes con infección crónica por virus de la hepatitis B en el mundo. La infección crónica por el virus de la hepatitis B puede provocar enfermedades hepáticas, tales como hepatitis B crónica (HBC), cirrosis hepática (CH) y carcinoma hepatocelular primario (CHP) y más de 1 millón de personas fallecen cada año en todo el mundo a causa de la infección crónica por el virus de la hepatitis B y enfermedades asociadas causadas por el mismo^[1].

20 En la actualidad, los fármacos para el tratamiento de la infección crónica por el virus de la hepatitis B se dividen principalmente en dos grupos: interferones (IFN) y análogos de nucleósido/nucleótido (AN). Los primeros incluyen interferón normal (IFN) y peginterferón (Peg-IFN, también denominado interferón de acción prolongada), que proporciona los efectos de inhibir el VHB y tratar la HBC principalmente potenciando la inmunocompetencia general de los pacientes; mientras que el último incluye principalmente 5 fármacos: lamivudina (LMV), adefovir dipivoxil (ADV), Entecavir (ETV), Telbivudina (LdT) y Tenofovir, que inhiben la replicación del VHB inhibiendo directamente la actividad polimerasa del VHB. Para la infección crónica por el virus de la hepatitis B, el objetivo final del uso de los fármacos anteriores para el tratamiento de la hepatitis B crónica es obtener negatividad serológica o seroconversión para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) (pérdida de HBsAg o seroconversión de HBsAg) en los pacientes. Sin embargo, los anteriores fármacos existentes tienen una potencia limitada para lograr la pérdida de HBsAg o la seroconversión de HBsAg y normalmente se necesita tratamiento durante varios años. Además, la seroconversión de antígeno E del virus de la hepatitis B (seroconversión de HBeAg) es otro evento importante durante el procedimiento de la infección crónica por el virus de la hepatitis B, que normalmente va acompañado de remisión y un buen pronóstico de la hepatitis clínica y por lo tanto, los médicos e investigadores usan normalmente "si se produce o no la seroconversión de HBeAg en los pacientes tras el tratamiento" como indicador primario para determinar si el tratamiento es eficaz o no. Aparte de la seroconversión de HBeAg, también se usa la respuesta virológica sostenida (SVR) como indicador secundario para determinar los efectos terapéuticos del tratamiento clínico de la hepatitis B^[2,3].

40 En vista del objetivo de la terapia de que los pacientes con hepatitis B crónica logren seroconversión de HBeAg, existen diferencias significativas en lo referente a los efectos terapéuticos y al cumplimiento farmacológico entre IFN y NA. Los IFN (haciendo referencia principalmente a PG-IFN o interferón de acción prolongada) tienen efectos terapéuticos superiores a los NA, un 30-50 % de los pacientes positivos para HBeAg pueden lograr seroconversión de HBeAg tras un año (52 semanas) de tratamiento con el primero, mientras que solo un 10-30 % de los pacientes positivos para HBeAg pueden lograr seroconversión de HBeAg con el tratamiento con el último. Sin embargo, los efectos secundarios de la terapia con IFN normalmente son mayores que los de los NA, los sujetos normalmente padecen reacciones adversas, tales como fiebre, dolor de cabeza, debilidad, pérdida de cabello, leucopenia y algunos pacientes no pueden soportar estos efectos secundarios. En cambio, los fármacos orales de NA tienen menos efectos secundarios y un buen cumplimiento terapéutico. En lo referente al precio, el coste del fármaco para un año de tratamiento con IFN (referido principalmente a Peg-IFN o interferón de acción prolongada) es de aproximadamente 15.000 RMB, mientras que el coste del fármaco para el tratamiento con NA es normalmente menor de 10.000 RMB. En vista de las diferencias anteriores de los dos grupos de fármacos, tiene una importancia fundamental llevar a cabo una evaluación y predicción eficaz antes del tratamiento de los pacientes y después, seleccionar un fármaco optimizado para el tratamiento de la hepatitis B crónica.

55 La consecución de seroconversión de HBeAg en un paciente depende principalmente de si el paciente en sí tiene una inmunocompetencia específica suficiente contra el VHB o de si el paciente podría obtener una inmunocompetencia específica suficiente contra el VHB mediante una terapia farmacológica. Por lo tanto, la evaluación cuantitativa de la inmunocompetencia específica contra el VHB de un paciente con hepatitis B crónica podría usarse para predecir la probabilidad de que se produzca la seroconversión de HBeAg en el paciente con hepatitis B crónica que se vaya a tratar. Durante mucho tiempo, se ha usado el nivel sérico de ALT de un paciente con hepatitis B crónica como un supuesto marcador indirecto para la evaluación de la inmunocompetencia del hospedador contra el VHB. Esto se debe a que el nivel sérico de ALT del paciente con hepatitis B crónica se refleja en el nivel de inflamación/necrosis de las células hepáticas del paciente, mientras que el VHB es el virus causativo

- 5 inmunitario, que induce inflamación hepática o necrosis de las células hepáticas causada por la respuesta inmunológica mediada por linfocitos T anti-VHB, por lo que hay cierta correlación entre el nivel sérico de ALT y la inmunocompetencia anti-VHB del hospedador. En general, se cree que los pacientes con niveles séricos de ALT 2 veces mayores que el límite superior de la normalidad (LSN) tienen mejores efectos terapéuticos en el tratamiento anti-VHB (en referencia a la probabilidad de seroconversión de HBeAg lograda por el tratamiento) que aquellos sin reacción de hepatitis, es decir, pacientes con hepatitis B clínica con niveles séricos de ALT menores del límite superior de la normalidad, aunque los pacientes con niveles séricos de ALT 5 veces mayores que el límite superior de la normalidad (LSN) tienen mejores efectos terapéuticos en el tratamiento anti-VHB que aquellos pacientes que han reaccionado a la hepatitis pero tienen un nivel de ALT relativamente menor. Aunque el nivel sérico de ALT representa principalmente el grado de inflamación del hígado, el nivel de ALT no es un índice específico de VHB y puede verse afectado fácilmente por otros factores (tal como acompañando a la hepatitis autoinmunitaria, enfermedades hepáticas alcohólicas, infección por VHC u otros virus de la hepatitis), su periodo de semivida es corto y por lo tanto, no es fiable usar el nivel de ALT para predecir los efectos terapéuticos en el tratamiento de la hepatitis B crónica. Aparte de ALT sérico, también puede usarse un ensayo para la respuesta inmunológica de linfocitos T específica para el VHB (por ejemplo, prueba de estimulación *in vitro* de liberación de citocinas) para la predicción de los efectos terapéuticos en el tratamiento de la hepatitis B crónica, pero su funcionamiento es relativamente complicado, su práctica clínica y promoción son muy complicadas, implica altos requisitos para las muestras de ensayo (se requieren muestras de sangre completa fresca) y por lo tanto, su potencial de aplicación es muy limitado. En resumen, aún no hay un procedimiento en la técnica para evaluar los efectos terapéuticos antes de la terapia.
- 10 Los anticuerpos contra la proteína core de la hepatitis B (anti-HBc) son uno de los indicadores serológicos más típicos para la infección por VHB y se ha usado la detección cualitativa de anti-HBc (determinando si se es positivo para anti-HBc) durante más de 35 años en el diagnóstico clínico de la infección por el virus de la hepatitis B. Un resultado positivo en suero a anti-HBc sugiere que el sujeto ha estado o se encuentra infectado por VHB y este anticuerpo normalmente existe de manera continua en el suero de una persona infectada por VHB de por vida. En la actualidad, los procedimientos desarrollados para la detección de anticuerpos anti-HBc se basan principalmente en el mecanismo de inmunodetección competitiva o supresora y estos procedimientos pueden usarse de manera eficaz para la detección cualitativa de anti-HBc. Sin embargo, al estar restringida por el mecanismo técnico, su intervalo lineal de detección dinámica es normalmente estrecho (generalmente en el intervalo de un orden de magnitud) y su estabilidad de detección es escasa y no puede aplicarse satisfactoriamente para la detección cuantitativa de anti-HBc. De acuerdo con las revisiones relacionadas, no hay un procedimiento y un reactivo eficaz para la detección cuantitativa de anti-HBc antes de la publicación de la presente invención; y hasta ahora se desconocen los valores clínicos y los usos correspondientes de la detección cuantitativa de anti-HBc.
- 15 Rodella A y col., Journal of Clinical Virology, vol. 37, 2006, páginas 206-212 desvela marcadores serológicos del virus de la hepatitis B (VHB) estudiados mediante nuevos inmunoensayos cuantitativos para estudiar su comportamiento y posible papel en las diversas fases de la infección por VHB.
- 20 El documento CN 101 545 906 A se refiere a un kit de medición de inmunoensayo de quimioluminiscencia y a un procedimiento de preparación del mismo para partículas magnéticas de anticuerpo contra core de la hepatitis B.
- 25 El documento CN 101 726 596 A desvela una tira de ensayo inmunocromatográfica de microesfera fluorescente para evaluar cinco índices de la hepatitis B.
- 30 El documento CN 1 908 666 A desvela una caja de reactivo de diagnóstico inmunológico ligando a enzimas en sándwich dual para el anticuerpo contra core de la hepatitis B.
- El documento CN 1 694 898 A proporciona un procedimiento para la proteína pre-core del VHB y la detección de la proteína capaz de formar partículas.
- 35 Colloredo Mels G y col., Archives of Virology, vol. Supl. 8, 1993, páginas 203-211 desvela las mediciones de anti-HBc para definir un valor de corte para el diagnóstico de la hepatitis B crónica.
- 40 Brunetto M y col, Journal of Hepatology, 1993, páginas 431-436 desvela un análisis semicuantitativo de IgM sérica anti-HBc como herramienta para el diagnóstico de la hepatitis B crónica.
- 45 Colloredo G y col., Journal of viral hepatitis, vol. 6, 1999, páginas 429-434 se refiere a la evaluación cuantitativa de IgM para HBc como herramienta para la predicción de la actividad necroinflamatoria de la hepatitis B crónica.
- 50 Galli C y col., J MED VIROL, vol. 80, n.º 6, 2008, páginas 974-979 se refiere al papel de la serología para el estudio de la infección crónica por el virus de la hepatitis B.
- Han Y y col., J CLIN VIROL, vol. 52, n.º 4, 2011, páginas 295-299 desvela el uso de un sistema cuantitativo rutinario para analizar la actividad, el contenido y la afinidad de un anticuerpo contra el antígeno core de la hepatitis B.
- 55 Marinos G y col., Hepatology, vol. 19, n.º 2, 1994, páginas 303-311 desvela la evaluación cuantitativa de IgM anti-HBc sérica en el transcurso natural y durante el tratamiento con interferón de la infección crónica por hepatitis B.

Chen JJ y col., *Alimentary pharmacology & therapeutics*, vol. 23, n.º 1, 2006, páginas 85-90 se refiere a la respuesta a la monoterapia con lamivudina en pacientes con hepatitis B crónica.

Contenido de la invención

5 Ya que la proteína core del virus de la hepatitis B tiene una inmunogenicidad muy potente, si nivel de anticuerpo sérico indica la capacidad de la respuesta inmunitaria humoral (respuesta inmunitaria de linfocitos B) específicamente contra el VHB en el hospedador individual y refleja la competencia inmunológica completa del hospedador contra el VHB. Para este fin, los inventores de la presente invención creen que la detección precisa del nivel total de anti-HBc en suero o plasma de pacientes con hepatitis B crónica podría indicar la competencia de la respuesta inmunitaria específica contra el VHB en los pacientes y puede predecir los efectos terapéuticos finales del tratamiento con fármacos (incluyendo fármacos de interferón, análogos de nucleósidos/nucleótidos) para ser aceptados por los pacientes. La presente invención se refiere a un procedimiento para la detección cuantitativa precisa del nivel de anticuerpo de anti-HBc total en suero/plasma de un paciente con infección por el virus de la hepatitis B y al uso de detección cuantitativa de anti-HBc total para controlar la progresión de la hepatitis B crónica en pacientes, así como predecir los efectos terapéuticos del tratamiento en pacientes con hepatitis B crónica.

15 Específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento de detección inmunológico para cuantificar de manera precisa la detección del nivel de anti-HBc total en suero o plasma, siendo capaz el procedimiento de llevarse a cabo mediante ensayo inmunosorbente ligado a enzimas o un procedimiento de detección quimioluminiscente.

20 El procedimiento tiene la ventaja de que el intervalo lineal dinámico de una sola detección es de 1,5 órdenes de magnitud o más, es decir, el límite superior de cuantificación precisa para una sola detección es al menos 32 veces mayor que el límite inferior de cuantificación precisa. Esta característica es la base para la detección cuantitativa precisa del nivel de anti-HBc total en suero o plasma y los procedimientos para la detección de anti-HBc de la técnica anterior antes de la presente invención no la poseen.

25 Los resultados obtenidos aplicando el procedimiento a muestras de pacientes en distintos estadios de infección crónica por el virus de la hepatitis B y a series de muestras de la progresión natural del transcurso de la enfermedad de pacientes mostró que el nivel cuantitativo total de anti-HBc en suero o plasma está altamente correlacionado con la actividad de la hepatitis y el estado inmunitario hospedador de los pacientes y el valor medido cuantitativamente de anti-HBc total puede usarse para discriminar de manera eficaz si los pacientes se encuentran en la etapa de activación inmunitaria o de activación de la hepatitis. Esto sugiere que el uso del procedimiento para la detección cuantitativa de anti-HBc total como se desvela por la presente invención o los procedimientos equivalentes de los mismos posibilitan la monitorización y determinación de la progresión de la enfermedad de pacientes con hepatitis B crónica.

30 Los resultados obtenidos aplicando el procedimiento a muestras de cohortes de pacientes con hepatitis crónica que aceptaron el tratamiento con adefovir dipivoxil e interferón de acción prolongada mostraron que el nivel básico total de anti-HBc se encontraba en correlación positiva con la tasa de respuesta terapéutica. Esto sugiere que el uso del procedimiento para la detección cuantitativa de anti-HBc total como se desvela por la presente invención o los procedimientos equivalentes de los mismos pueden evaluar y predecir los efectos terapéuticos antes de que los pacientes con hepatitis B crónica acepten el tratamiento con fármacos tales como adefovir dipivoxil, interferón de acción prolongada o aquellos con un mecanismo similar y posibilitan guiar la selección de fármacos terapéuticos y del tiempo terapéutico, mejorando de este modo la eficacia terapéutica.

40 Además, se desvela el uso de un reactivo para la detección cuantitativa del nivel de anticuerpo contra la proteína core del virus de la hepatitis B en la fabricación de un agente de diagnóstico para monitorizar la progresión de la enfermedad de pacientes con hepatitis B crónica y/o predecir de manera eficaz los efectos terapéuticos antes de que los pacientes con hepatitis B crónica acepten el tratamiento contra el virus de la hepatitis B.

45 En una realización específica, la detección cuantitativa del anticuerpo contra anti-HBc total se lleva a cabo mediante uno o más de los siguientes procedimientos: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, procedimiento de inmunodetección quimioluminiscente, procedimiento de detección de fluorescencia resuelta en tiempo, procedimiento de inmunoturbidimetría, procedimiento de inmunocromatográfico, procedimiento de inmunopercolación.

50 En una realización específica, la detección individual del nivel de anti-HBc total tiene un intervalo dinámico lineal de 1,5 órdenes de magnitud o más, es decir, el límite superior de cuantificación precisa para una sola detección es 32 veces o más mayor que el límite inferior de cuantificación precisa.

En una realización específica, la detección cuantitativa de anti-HBc total comprende las siguientes etapas:

55 a) proporcionar una proteína de virus de la hepatitis B capaz de unirse de manera específica a anti-proteína HBc total, la proteína puede comprender la secuencia de aminoácidos completa de la proteína core del virus de la hepatitis B (desde el 1^{er} aminoácido hasta el 183^{er} aminoácido) o puede comprender únicamente una secuencia de aminoácidos de la zona inmunodominante primaria de la proteína core del virus de la hepatitis B (por ejemplo, desde el 1^{er} aminoácido hasta el 149^o aminoácido), la proteína se inmoviliza sobre un soporte sólido, actúa como un antígeno en fase sólida y se usa para capturar un anticuerpo contra la proteína core del virus de la hepatitis B

en una muestra de suero;

5 b) proporcionar un antígeno marcado capaz de unirse de manera específica a anti-HBc total que se captura sobre el antígeno de fase sólida, el antígeno marcado puede comprender la secuencia de aminoácidos completa de la proteína core del virus de la hepatitis B (desde el 1^{er} aminoácido hasta el 183^{er} aminoácido) o puede comprender únicamente una secuencia de aminoácidos de la zona inmunodominante primaria de la proteína core del virus de la hepatitis B (por ejemplo, desde el 1^{er} aminoácido hasta el 149^o aminoácido), la sustancia que genera la señal en el antígeno marcado puede ser peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o éster de acridinio;

10 c) proporcionar muestras patrón de cuantificación con concentraciones conocidas para representar una curva patrón de cuantificación, que normalmente consiste en 3-6 muestras que contienen anti-HBc total en diferentes concentraciones. La unidad de concentración puede ser UI/ml, PEUI/ml u otras unidades de concentración o título cuya fuente pueda trazarse;

15 d) poner en contacto la muestra (muestra que se va a ensayar o muestra patrón de cuantificación) con el antígeno en fase sólida de tal forma que el anti-HBc total, en caso de que exista, en la muestra se captura para formar un complejo de antígeno total anti-HBc en fase sólida;

e) poner en contacto el antígeno marcado con el producto de la etapa d), es decir, el complejo de antígeno en fase sólida-anticuerpo frente a anti-HBc total, a fin de formar un complejo de antígeno en fase sólida-anticuerpo frente a anti-antígeno HBc total marcado;

20 f) poner en contacto un sustrato o una solución capaz de activar la generación de señales con el complejo de antígeno en fase sólida-anticuerpo total anti-antígeno de HBc marcado formado en la etapa e), a fin de generar una señal medible y medir la intensidad de la señal generada con un instrumento de medida correspondiente;

g) llevar a cabo un ajuste de regresión lineal de las señales medidas de muestras patrón de cuantificación (normalmente 3-6 muestras) con sus concentraciones correspondientes, para obtener una fórmula matemática para calcular la concentración de la muestra a partir de una señal de medida;

25 h) introducir la señal medida de la muestra que se vaya a ensayar en la fórmula de la etapa

g) y calcular la concentración de anti-HBc total en la muestra que se vaya a ensayar;

30 i) cuando la concentración de anti-HBc total calculada en la etapa h) es mayor que el límite superior de cuantificación precisa del procedimiento de detección, la muestra que se va a ensayar se diluye y se repiten las etapas a) a h), hasta que la concentración medida se encuentra en el intervalo entre el límite superior y el límite inferior de cuantificación precisa del procedimiento de detección correspondiente. La concentración de anti-HBc total contenida en la muestra que se vaya a ensayar se obtiene calculando la multiplicación del valor medido tras la dilución por la relación de dilución.

35 En una realización específica, el agente diagnóstico de la presente invención se usa en pacientes con hepatitis B crónica que aceptan diferentes fármacos terapéuticos, los fármacos incluyen: interferón de acción prolongada (interferón pegilado, Peginterferón), interferón normal (interferón), lamivudina (LMV), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudina (LdT), tenofovir u otros fármacos útiles en el tratamiento de la hepatitis B crónica.

40 En una realización específica, el criterio común para predecir el efecto terapéutico de una terapia en pacientes antes de la terapia es: el efecto terapéutico (tasa de respuesta) obtenido por pacientes con un mayor nivel de anticuerpo contra la proteína core del virus de la hepatitis B en suero de pacientes antes de la terapia es superior al de pacientes con un nivel menor de anticuerpo contra la proteína core del virus de la hepatitis B en el suero de pacientes antes de la terapia; el criterio de efecto terapéutico puede ser seroconversión de antígeno E del virus de la hepatitis B (es decir, conversión de HBeAg(+)/anti-HBe(-) a HBeAg(-)/anti-HBe(+)) en pacientes con hepatitis B crónica que aceptan la terapia) o puede ser la respuesta virológica (es decir, carga de ADN de VHB en suero que se encuentra por debajo de 1000 copias/ml o menos en pacientes con hepatitis B crónica) u otros indicadores clínicos que pueden indicar la remisión de la patología o un buen pronóstico.

45 Se desvela además el criterio común para monitorizar la progresión de la enfermedad de pacientes con hepatitis B crónica, que es: aumento anormal del nivel de anticuerpo contra la proteína core del virus de la hepatitis B, que sugiere la aparición de inflamación hepática de los pacientes y la activación de la respuesta inmunitaria del hospedador, específicamente contra el virus de la hepatitis B.

50 Se desvela además, un uso de un anti-HBc en la fabricación de un kit para evaluar la respuesta en pacientes con hepatitis B crónica que aceptan la terapia de adefovir dipivoxil e interferón pegilado.

Además, se desvela un uso de anti-HBc en la fabricación de un kit para monitorizar la progresión de la enfermedad de pacientes con hepatitis B crónica.

Además, se desvela un uso de anti-HBc en la fabricación de un kit para predecir el estadio de la enfermedad de

pacientes con hepatitis B.

Breve descripción de los dibujos

La Fig.1 muestra el intervalo lineal dinámico del procedimiento de cuantificación del ELISA de anti-HBc.

5 La Fig.2 muestra la precisión intra-experimental (A) e inter-experimental (B) del procedimiento de cuantificación del ELISA de anti-HBc.

La Fig.3 muestra la consistencia de los resultados de detección de cuantificación del ELISA de anti-HBc de 104 muestras.

La Fig.4 muestra el intervalo lineal dinámico del procedimiento de cuantificación del CLEIA de anti-HBc.

La Fig.5 muestra el intervalo lineal dinámico del procedimiento de cuantificación del CLIA de anti-HBc.

10 La Fig.6 muestra la distribución del nivel sérico de anti-HBc de pacientes infectados con VHB en diferentes estadios:

(A) nivel sérico de anti-HBc y nivel de ALT de pacientes infectados con VHB en diferentes estadios;

(B) nivel sérico de ADN de VHB y nivel de HBsAg de pacientes infectados con VHB en diferentes estadios;

15 (C) análisis de curva ROC para determinar el estado de activación inmunitaria del sujeto basándose en el nivel sérico de anti-HBc;

(D) nivel medio de anti-HBc de diferentes pacientes estratificados por ALT;

(E) análisis de correlación del nivel sérico de anti-HBc y el nivel de ALT.

20 Notación de los acrónimos: PAI, pacientes antes de infectarse; TI, pacientes en la fase de tolerancia inmunitaria; EI, pacientes en la fase de eliminación inmunitaria; BR, pacientes en la fase de baja replicación; HNE, hepatitis negativa a HBeAg; CH, pacientes con cirrosis hepática; CHP, pacientes con cáncer de hígado primario.

La Fig.7 muestra los cambios dinámicos de los niveles séricos de anti-HBc, ALT, ADN de VHB y HBsAg durante la progresión natural de portadores crónicos del virus de la hepatitis B.

La Fig.8 muestra la tasa de seroconversión de HBeAg después del tratamiento predicha por el nivel sérico de anti-HBc de pacientes con hepatitis B crónica antes de la terapia:

25 (A) usando el nivel de anti-HBc antes del tratamiento para predecir la seroconversión de HBeAg de pacientes con hepatitis B crónica tras aceptar la terapia con adefovir dipivoxil;

(B) usando el nivel de anti-HBc antes del tratamiento para predecir la seroconversión de HBeAg de pacientes con hepatitis B crónica tras aceptar la terapia con interferón pegilado;

30 (C) usando el nivel sérico de anti-HBc para predecir la tasa de aparición de seroconversión de HBeAg en pacientes tras aceptar la terapia con adefovir dipivoxil;

(D) usando el nivel sérico de anti-HBc para predecir la tasa de aparición de seroconversión de HBeAg en pacientes tras aceptar la terapia con interferón pegilado;

(E) usando el nivel de anti-HBc antes del tratamiento para predecir la tasa de seroconversión de HBeAg en pacientes estratificados con diferentes niveles basales de ALT;

35 La Fig.9 muestra las tasas de seroconversión de HBeAg en pacientes estratificados con diferentes niveles basales de anti-HBc tras aceptar la terapia con adefovir dipivoxil e interferón pegilado;

La Fig.10 muestra los cambios dinámicos de los niveles cuantificados de marcadores séricos en pacientes durante y después de la terapia con adefovir dipivoxil.

Modelos específicos para llevar a cabo la invención

40 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos o científicos usados en el presente texto tienen los significados comunes conocidos por los expertos en la materia asociada con la presente invención.

45 En el ejemplo 1 de la presente invención, se estableció un procedimiento de detección cuantitativa ELISA para anti-HBc (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, procedimiento en placa de micropocillos), este procedimiento pudo determinar con precisión el contenido de anti-HBc en muestras de suero, el intervalo dinámico lineal para la cuantificación precisa fue de hasta 1,8 órdenes de magnitud (0,04-2,5 UI/ml) y dicha característica no la poseían los

procedimientos conocidos para la detección de anti-HBc^[4,5].

En el ejemplo 2, se estableció un procedimiento de detección cuantitativa CLEIA para anti-HBc (ensayo quimioluminiscente ligado a enzimas, procedimiento en placa de micropocillos), este procedimiento pudo determinar con precisión el contenido de anti-HBc en muestras de suero, el intervalo dinámico lineal para la cuantificación precisa de la detección individual fue de hasta 2,7 órdenes de magnitud (0,04-20 UI/ml). El intervalo dinámico lineal de este procedimiento es más amplio que el del procedimiento de detección cuantitativa ELISA para anti-HBc, como se describe en el ejemplo 1, por lo que el número de dilución necesario para la detección de muestras con alto anti-HBc se redujo notablemente y se mejoró la eficacia.

En el ejemplo 3, se estableció un procedimiento de detección cuantitativa CLIA (inmunoensayo quimioluminiscente directo, procedimiento con micropartículas), este procedimiento pudo determinar con precisión el contenido de anti-HBc en muestras de suero, el intervalo dinámico lineal para la cuantificación precisa de la detección individual fue de hasta 3,02 órdenes de magnitud (0,02-20,8 UI/ml). Este procedimiento amplió significativamente el intervalo dinámico lineal para la detección individual en comparación con el procedimiento de detección cuantitativa ELISA para anti-HBc, como se describe en el ejemplo 1, por lo que el número de dilución necesario para la detección de muestras con alto anti-HBc se redujo notablemente y se mejoró la eficacia. Este procedimiento difiere del procedimiento de detección cuantitativa CLEIA para anti-HBc, como se describe en el ejemplo 2 en que se usa un solo tubo para la detección y cuando se montó un equipo completamente automático, se pudo usar para la detección inmediata en cualquier momento en la clínica.

En el ejemplo 4, se aplicó el procedimiento de detección cuantitativa anti-HBc para la evaluación de la distribución del nivel sérico de anti-HBc de personas infectadas por VHB en diferentes fases. Los resultados de la evaluación mostraron que en personas con infección crónica por el virus de la hepatitis B, el nivel sérico de anti-HBc se relacionó con la actividad de la hepatitis y el estado inmunitario del hospedador de las personas infectadas. Por lo tanto, se pudo usar el nivel de anti-HBc para determinar si las personas infectadas por el virus de la hepatitis B se encontraban en estado de activación inmunitaria o en estado de hepatitis activa, la precisión diagnóstica (AUROC) fue de 0,918 (IC del 95 %: 0,888-0,948) y el valor umbral para la determinación fue de 7400 UI/ml. Estos resultados mostraron que los resultados de la detección obtenidos mediante el procedimiento de detección cuantitativa para anti-HBc desvelados en la presente invención pueden ayudar a los profesionales médicos a determinar la fase de la enfermedad del paciente.

En el ejemplo 5, se aplicó el procedimiento de detección cuantitativa de anti-HBc anterior para evaluar los cambios dinámicos del nivel de anti-HBc durante la progresión natural de personas con infección crónica por el virus de la hepatitis B y sus relaciones con otros índices. Los resultados de la evaluación mostraron que cuando las personas infectadas de manera crónica por el virus de la hepatitis B tenían actividad de inflamación del hígado, anti-HBc y ALT aumentaron prácticamente a la vez, el valor de pico de anti-HBc apareció normalmente 3-8 semanas después del valor de pico de ALT, pero en ocasiones pudo aparecer antes o al mismo tiempo que la aparición del pico de ALT; durante la fase de recuperación de la hepatitis, ALT volvió a la normalidad rápidamente, mientras que anti-HBc volvió al nivel basal 12-20 semanas después. Este resultado sugiere además que podía usarse el nivel de anti-HBc de personas infectadas de manera crónica por el virus de la hepatitis B mediante el procedimiento de detección cuantitativa de la presente invención como índice complementario para la medición de ALT, que puede ayudar a los profesionales sanitarios a determinar si los pacientes se encuentran en la fase activa de la hepatitis o si han tenido actividad de hepatitis en los últimos 3-4 meses.

En el ejemplo 6, se aplicó el procedimiento de detección cuantitativa de anti-HBc para evaluar la respuesta de pacientes con hepatitis B crónica que aceptan la terapia de adefovir dipivoxil e interferón pegilado. Los resultados demostraron que el nivel de anti-HBc antes de la terapia en los pacientes con hepatitis B crónica se correlacionó positivamente con la tasa de seroconversión de HBeAg tras la terapia: los pacientes con un alto nivel de anti-HBc (≥ 29000 UI/ml en el ejemplo) antes de la terapia pudieron lograr los efectos deseados incluso con adefovir dipivoxil, que era barato y tenía menos efectos secundarios, pero escasos efectos terapéuticos; mientras que para pacientes con un nivel medio (9000 - 29000 UI/ml en el ejemplo) o un nivel menor (< 9000 UI/ml en el ejemplo) de anti-HBc antes de la terapia, los efectos terapéuticos de adefovir dipivoxil fueron significativamente inferiores al interferón de acción prolongada, que era caro y tenía numerosos efectos secundarios, pero que era más potente. En los pacientes con un alto nivel de anti-HBc (≥ 29000 UI/ml en el ejemplo) antes de la terapia, el efecto inhibitor de adefovir dipivoxil contra la replicación vírica fue significativamente superior a aquel en pacientes con un bajo nivel de anti-HBc (< 29000 UI/ml) antes de la terapia. Este resultado sugirió que el uso del procedimiento de detección cuantitativa de la presente invención para medir el nivel de anti-HBc de personas con infección crónica por el virus de la hepatitis B antes de que aceptasen la terapia podía predecir los efectos terapéuticos esperados después de que aceptasen la terapia con adefovir dipivoxil, interferón de acción prolongada u otros fármacos que tengan un mecanismo similar, lo que posibilita guiar la elección del fármaco terapéutico y del tiempo terapéutico, mejorando de este modo la eficacia terapéutica.

Los siguientes ejemplos describen e ilustran adicionalmente la presente invención. Los ejemplos pretenden ilustrar la presente invención y las concentraciones de todos los reactivos, compuestos químicos o materiales biológicos activos, los pacientes empleados y otras variantes en los ejemplos sirven simplemente para ilustrar la aplicación de la presente invención, en lugar de para limitar el ámbito de la presente invención.

Ejemplo

1. Procedimiento de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) cuantitativo en sándwich con antígeno dual

1.1 Preparación de antígeno inmovilizado y antígeno marcado

En el procedimiento, el antígeno inmovilizado y el antígeno marcado empleados fueron el antígeno de core del virus de la hepatitis B (HBcAg) capaz de unirse específicamente a anticuerpos anti-HBc en una muestra, el antígeno podía comprender la secuencia de aminoácidos de longitud completa de HBcAg (Cp183) o podía comprender simplemente una secuencia de aminoácidos de la zona inmunodominante primaria de HBcAg (Cp149). El HBcAg usado en la presente invención se obtuvo mediante expresión recombinante en *E. coli* y purificación. En lo referente a los procedimientos de expresión y purificación para el antígeno recombinante Cp149, puede remitirse a los procedimientos desvelados por Adam Zlotnick, y col^[6], mientras que en lo referente a los procedimientos de expresión y purificación para el antígeno recombinante Cp183, puede remitirse a los procedimientos desvelados por An Li, y col^[9]. En la presente invención, El antígeno recombinante Cp149 se usó normalmente como antígeno inmovilizado, mientras que el antígeno recombinante Cp183 se usó como antígeno marcado.

1.2 Preparación de la placa de reacción

(1.2.1) Se diluyó el antígeno Cp149 con solución de tampón CB 50 mM a pH 9,6 (solución de tampón de NaHCO₃/Na₂CO₃, la concentración final fue de 50 mM, el valor de pH fue de 9,6) y la concentración final fue de 3 µg/ml.

(1.2.2) Se añadieron 100 µl de solución de recubrimiento a cada pocillo de una placa de ELISA de 96 pocillos, recubriendo a 2-8 °C durante 16-24 h, después recubriendo a 37 °C durante 2 h.

(1.2.3) Se usó solución de lavado de PBST (20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1 %) para llevar a cabo el ensayo una vez. Después, se añadieron a cada pocillo 200 µl de solución de bloqueo (pH 7,4, solución de tampón de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 20 mM que contenía suero fetal bovino al 20 % y caseína al 1 %), bloqueando a 37 °C durante 2 h; y desechando la solución de bloqueo. Después de secar, se colocó la placa en una bolsa de papel de aluminio y se almacenó a 2-8 °C para su uso posterior.

1.3 Marcaje con HRP del antígeno Cp183

Se usó el procedimiento de peryodato de sodio mejorado. El ejemplo de marcaje de 10 mg de antígeno recombinante Cp183 fue como sigue.

(1.3.1) El antígeno recombinante Cp183 (5 ml) con una concentración de 2 mg/l se cargó en una bolsa de diálisis, se dializó con solución de tampón CB 50 mM a 4 °C durante 4 h y se cambió la solución de tampón de diálisis una vez cada 2 h durante la diálisis.

(1.3.2) Se pesaron de manera precisa 40 mg de HRP, se disolvieron en 2 ml de ddH₂O, tras la disolución, se añadieron 2 ml de 20 mg/ml de solución de NaIO₄, se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 min; después se añadieron 40 µl de etilenglicol, se hicieron reaccionar a 4 °C durante 30min para obtener una solución de activación de HRP (10 mg/ml, 4 ml).

(1.3.3) Se añadió la solución de activación de HRP obtenida en la etapa 1.3.2 a una bolsa de diálisis cargada con antígeno recombinante Cp183, se mezcló hasta la homogeneidad y después se dializó con solución de tampón CB 50 mM a 4 °C en condiciones de oscuridad durante 6-8 h y se cambió la solución de tampón de diálisis una vez cada 2 h durante la diálisis.

(1.3.4) Se prepararon 0.4 ml de solución de NaBH₄ (5 mg/ml), se añadieron a la solución de reacción marcada obtenida en la etapa 1.3.3, se mezclaron hasta la homogeneidad, y se hicieron reaccionar a 4 °C durante 2 h en condiciones de oscuridad.

(1.3.5) Tras completar la etapa 1.3.4, se cargó la solución de reacción marcada en una nueva bolsa de diálisis y se dializó con solución de tampón de PBS a 4 °C durante 4 h.

(1.3.6) Tras completar la etapa 1.3.5, se llevó a cabo la purificación con una columna de cromatografía Sephacryl S-300 HR producida por GE Company, a fin de separar Cp183-marcador de HRP.

(1.3.7) Se concentró el Cp183-marcador de HRP separado y purificado en la etapa 1.3.6 hasta 2 mg/ml, después, se añadió glicerol a una relación de volumen de 1:1, se mezcló hasta la homogeneidad y se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

(1.3.8) El Cp183-marcador de HRP obtenido en la etapa 1.3.7 se diluyó con tampón de dilución de enzima marcadora (pH 7,4, solución de tampón de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 20 mM que contiene suero fetal bovino al 20 %, caseína al 1 %, sacarosa al 10 %, aminopirina al 0,05 %) a una relación de volumen de 1/4000 para obtener una solución de reacción enzimática marcada, que se mezcló hasta la homogeneidad y se almacenó a 2-8 °C para su

uso posterior.

1.4 Muestras de patrón cuantitativo

Las muestras de patrón cuantitativo para la detección cuantitativa de anti-HBc consistieron en una serie de muestras de anticuerpo para proteína core del virus de la hepatitis B con diferentes concentraciones. La unidad de concentración puede ser UI/ml, PEUI/ml o puede ser cualquier otra unidad de concentración o título cuya fuente pueda trazarse. En la presente invención, se usó la unidad internacional común (UI/ml) como unidad para la cuantificación de anti-HBc, la muestra patrón OMS anti-HBc (código: 95/522, 50 UI/ampolla) desvelada por NIBSC^[7] se diluyó en serie hasta alcanzar 40 UI/ml, 20 UI/ml, 10 UI/ml, 5 UI/ml, 2,5 UI/ml, 1,25 UI/ml, 0,625 UI/ml, 0,3125 UI/ml, 0,156 UI/ml, 0,078 UI/ml, 0,039 UI/ml, 0,02 UI/ml, 0,01 UI/ml, es decir, 13 concentraciones diferentes en total. La solución de sustrato usada para diluir la muestra patrón puede ser plasma sanguíneo o suero de donantes de sangre sanos negativos para anti-HBc o puede ser solución de PBS que contiene suero fetal bovino al 20 %.

1.5 Detección cuantitativa ELISA de anti-HBc

Se proporcionó una muestra de suero (n.º P1) de un paciente con hepatitis B crónica y se llevó a cabo la detección cuantitativa de acuerdo con las siguientes etapas. En vista del hecho de que los pacientes con hepatitis B crónica normalmente tienen un nivel relativamente elevado de anti-HBc, se diluyó la muestra con solución de PBS que contenía un 20 % de suero fetal bovino hasta alcanzar 4 tasas de dilución: 1:500, 1:2500, 1:12500, 1:62500 y después se usó para la detección ELISA cuantitativa.

(1.5.1) Reacción de muestra: se proporcionó una placa de ELISA recubierta, se añadieron a cada pocillo 90 µl de solución de dilución de muestra, también se añadieron a cada pocillo 10 µl de muestra o de muestra patrón, se agitó y se mezcló, después se incubó y se hizo reaccionar a 37 °C durante 30 min.

(1.5.2) Reacción de marcaje enzimático: tras completarse la etapa 1.5.1, se lavó la placa de ELISA con solución de lavado de PBST (20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1 %) 5 veces, se añadieron a cada pocillo 100 µl de la solución de reacción de marcador enzimático obtenida en la etapa 1.3.8, se incubó y se hizo reaccionar a 37 °C durante 30 min.

(1.5.3) Reacción de revelado del color: tras completarse la etapa 1.5.2, se lavó la placa de ELISA con solución de lavado de PBST (20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1 %) 5 veces, se añadieron a cada pocillo 50 µl de agente revelador de color TMB (proporcionado por Beijing Wantai Biological Pharmacy Co., Ltd.), se incubó y se hizo reaccionar a 37 °C durante 15 min.

(1.5.4) Reacción de paro y lectura de valores: tras completarse la etapa 1.5.3, se añadieron a cada pocillo de la placa de ELISA 50 µl de la solución de paro (proporcionado por Beijing Wantai Biological Pharmacy Co., Ltd.) y se detectó el valor de $DO_{450/630}$ de cada pocillo con un lector de placas.

(1.5.5) Representación de la curva patrón cuantitativa: tras completarse la etapa 1.5.4, se sometieron a regresión lineal los valores medidos de 13 muestras de patrón cuantitativo y las concentraciones correspondientes de las mismas y se representó la curva de patrón cuantitativo de la Fig.1. De acuerdo con la Fig.1, el procedimiento ELISA anti-HBc tuvo un límite superior de 2,5 UI/ml y un límite inferior de 0,04 UI/ml para una cuantificación precisa y su intervalo dinámico lineal fue de 1,8 órdenes de magnitud. La fórmula para calcular la concentración de anti-HBc a partir del valor medido de $DO_{450/630}$ fue: $Conc_{anti-HBc} (UI/ml) = 1,2104 \times DO_{450/630} - 0,011$.

(1.5.6) Obtención de la concentración de anti-HBc de la muestra que se va a ensayar: se sometieron a las muestras diluidas en serie de suero de P1 a las etapas 1.5.1 a 1.5.5, después, el valor medido de $DO_{450/630}$ para la relación de dilución de 1:500 fue de 3,899; el valor medido de $DO_{450/630}$ para la relación de dilución de 1:2500 fue de 3,801; el valor medido de $DO_{450/630}$ para la relación de dilución de 1:12500 fue de 2,988, el valor medido de $DO_{450/630}$ para la relación de dilución de 1:62500 fue de 0,301; se introdujeron los valores anteriores medidos en la fórmula para calcular la concentración de anti-HBc obtenida en la etapa 1.5.5 y el valor de concentración para la relación de dilución de 1:500 fue de 4,71 UI/ml, el valor de concentración para la relación de dilución de 1:2500 fue de 4,59 UI/ml, el valor de concentración para la relación de dilución de 1:12500 fue de 3,61 UI/ml, el valor de concentración para la relación de dilución de 1:62500 fue de 0,35 UI/ml. El valor de concentración medido para la relación de dilución de 1:62500 se encontró dentro del intervalo dinámico lineal (0,04-2,5 UI/ml) para la cuantificación precisa del método ELISA. Por lo tanto, la concentración original de anti-HBc de la muestra fue de $0,35 \times 62500 = 22083$ UI/ml.

(1.5.7) Evaluación de la precisión intra-ensayo del procedimiento de detección: se proporcionaron 6 muestras con concentraciones conocidas, que tenían valores cuantificados de anti-HBc de 5 UI/ml, 2,5 UI/ml, 1,25 UI/ml, 0,625 UI/ml, 0,3125 UI/ml, 0,156 UI/ml y en la misma prueba, se detectó repetidas veces cada muestra en 16 pocillos de acuerdo con las etapas 1.5.1 a 1.5.4 y se calculó por separado el coeficiente de variación intra-ensayo de los valores medidos de $DO_{450/630}$ de cada muestra tras la detección y se muestran en la Fig.2A, que indicó que los coeficientes de variación intra-ensayo de 6 muestras eran de entre un 2,8 % y un 10,1 %.

(1.5.8) Evaluación de la precisión inter-ensayo del procedimiento de detección: se proporcionaron 6 muestras

con concentraciones conocidas, que tenían valores cuantificados de anti-HBc de 5 UI/ml, 2,5 UI/ml, 1,25 UI/ml, 0,625 UI/ml, 0,3125 UI/ml, 0,156 UI/ml. Se sometió a las 6 muestras anteriores a 16 pruebas de detección independientes de acuerdo con las etapas 1.5.1 a 1.5.4, después de completarse todas las pruebas, se calculó por separado el coeficiente de variación inter-ensayo de los valores medidos de $DO_{450/630}$ de cada muestra y se muestran en la Fig.2B, que indicó que los coeficientes de variación inter-ensayo de 6 muestras eran de entre un 4,4 % y un 10,5 %.

(1.5.9) Evaluación de la reproducibilidad de la detección cuantitativa de anti-HBc: se seleccionaron aleatoriamente 104 muestras de suero de pacientes con hepatitis B crónica (el nivel de anti-HBc era de entre $2,23 \log_{10}$ UI/ml a $5,37 \log_{10}$ UI/ml) y se sometieron a detección cuantitativa de anti-HBc de acuerdo con las etapas 1.5.1 a 1.5.6, la detección se repitió de manera independiente dos veces y se sometieron a los resultados de las dos pruebas de detección a análisis de regresión y se muestra en la Fig.3, que indicaron que los resultados de las dos pruebas de detección eran altamente consistentes, $R^2 = 0,988$.

2. Procedimiento de inmunoensayo quimioluminiscente ligado a enzimas (CLEIA) cuantitativo en sándwich con antígeno dual anti-HBc

2.1 Preparación de antígeno inmovilizado y antígeno marcado

Se usó el procedimiento de la sección 1.1 del ejemplo 1 de la presente invención para llevar a cabo la preparación.

2.2 Preparación de la placa de reacción quimioluminiscente

Se usó el procedimiento de la sección 1.2 del ejemplo 1 de la presente invención, con la excepción de que se usó una placa de reacción quimioluminiscente como soporte sólido para el antígeno.

2.3 Marcaje con HRP del antígeno Cp183

Se usaron el procedimiento y las etapas de la sección 1.3 del ejemplo 1 de la presente invención.

2.4 Muestra de patrón de cuantificación

Las muestras de patrón de cuantificación fueron las mismas que las de la sección 1.4 del ejemplo 1 de la presente invención.

2.5 Detección cuantitativa CLEIA de anti-HBc

Se proporcionó una muestra de suero (n.º P1) de un paciente con hepatitis B crónica y se llevó a cabo la detección cuantitativa de acuerdo con las siguientes etapas. En vista del hecho de que los pacientes con hepatitis B crónica normalmente tienen un nivel relativamente elevado de anti-HBc, se diluyó la muestra con solución de PBS que contenía un 20 % de suero fetal bovino hasta alcanzar 3 tasas de dilución: 1:500, 1:2500, 1:12500 y después se usó para la detección CLEIA cuantitativa.

(2.5.1) Reacción de muestra: se proporcionó una placa de reacción quimioluminiscente recubierta, se añadieron a cada pocillo 90 μ l de solución de dilución de muestra, después se añadieron a cada pocillo 10 μ l de muestra o de muestra patrón, se agitó y se mezcló hasta la homogeneidad, después se incubó y se hizo reaccionar a 37 °C durante 30 min.

(2.5.2) Reacción de marcaje enzimático: tras completarse la etapa 2.5.1, se lavó la placa de reacción quimioluminiscente con solución de lavado de PBST (20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween20 al 0,1 %) 5 veces, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de la solución de reacción de marcador enzimático preparada en la etapa 1.3.8, se incubó y se hizo reaccionar a 37 °C durante 30 min.

(2.5.3) Reacción luminiscente y medición: tras completarse la etapa 2.5.2, se lavó la placa de reacción quimioluminiscente con solución de lavado de PBST (20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween20 al 0,1 %) 5 veces, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de sustrato quimioluminiscente PICO fabricado por Pierce Company, y se leyó inmediatamente el valor de luminiscencia (URL) de cada pocillo de reacción con un detector de quimioluminiscencia Orin II.

(2.5.4) Representación de la curva patrón cuantitativa: tras completarse la etapa 2.5.3, se sometieron a regresión lineal los valores medidos de 13 muestras de patrón cuantitativo y las concentraciones correspondientes de las mismas y se representó la curva de patrón cuantitativo de la Fig.4. De acuerdo con la Fig.4, el procedimiento CLEIA anti-HBc tuvo un límite superior de 20 UI/ml y un límite inferior de 0,04 UI/ml para una cuantificación precisa y su intervalo dinámico lineal fue de 2,7 órdenes de magnitud. La fórmula para calcular la concentración de anti-HBc a partir del valor medido de URL fue: $\text{Conc.anti-HBc (UI/ml)} = 10^{(\text{Log}_{10}(\text{RLU}) \times 0,9337 - 5,3006)}$.

(2.5.5) Obtención de la concentración de anti-HBc de la muestra que se va a ensayar: se sometieron a las muestras diluidas en serie de suero de P1 a la medición de las etapas 2.5.1 a 2.5.4, el valor medido de URL para la relación de dilución de 1:500 fue de 12115100; el valor medido de URL para la relación de dilución de 1:2500

fue de 5067890; el valor medido de URL para la relación de dilución de 1:12500 fue de 889610; se introdujeron los valores anteriores medidos en la fórmula para calcular la concentración de anti-HBc obtenida en la etapa 2.5.4 y el valor de concentración para la relación de dilución de 1:500 fue de 20,56 UI/ml, el valor de concentración para la relación de dilución de 1:2500 fue de 9,114 UI/ml, el valor de concentración para la relación de dilución de 1:12500 fue de 1,795 UI/ml, en los que los valores medidos para las relaciones de dilución de 1:2500 y 1:12500 se encontraban dentro del intervalo dinámico lineal (0.04-20 UI/ml) para la cuantificación precisa del presente procedimiento CLEIA. Por consiguiente, cuando se usó para el cálculo el valor medido para la relación de dilución de 1:2500, la concentración original de anti-HBc de la muestra fue de $9,114 \times 2500 = 22784$ UI/ml; mientras que cuando se usó para el cálculo el valor medido para la relación de dilución de 1:12500, la concentración original de anti-HBc de la muestra fue de $1,795 \times 12500 = 22442$ UI/ml. La concentración media de los valores medidos fue de 22613 UI/ml y este valor de concentración y el valor de concentración de 22083 UI/ml medido mediante el procedimiento de ELISA para la muestra tenía un error del 2,4 %, que se encontraba dentro del intervalo de variación normal.

3. Procedimiento de inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) cuantitativo con micropartículas tubulares anti-HBc

3.1 Preparación de antígeno inmovilizado y antígeno marcado

Se usó el procedimiento de la sección 1.1 del ejemplo 1 de la presente invención para llevar a cabo la preparación.

3.2 Preparación de la placa de reacción quimioluminiscente

(3.2.1) Se proporcionó 1 mg de perlas magnéticas, se lavó dos veces con 1 ml de sistema de tampón de activación (MES 5.0 50 mM) y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 1 mg de ECD y 1 mg de agente NHS (cada uno se preparó con MES 5.0 50 mM hasta alcanzar 10 mg/ml), se mezclaron hasta la homogeneidad, se agitaron a temperatura ambiente y se activaron durante 20 min.

(3.2.2) Se lavaron las perlas magnéticas activadas dos veces con 1 ml de sistema de tampón de activación (MES 5.0 50 mM) y se desechó el sobrenadante. Se añadieron 25 µg de antígeno Cp149, se mezclaron hasta la homogeneidad, se agitaron a temperatura ambiente y se hicieron reaccionar durante 3 h.

(3.2.3) Se usó solución de lavado de PBST (20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1 %) para llevar a cabo el ensayo 3 veces. Después, se añadieron a cada pocillo 2500 µl de solución conservante (20 mM pH 7,4, BSA al 0,1 %, Gly 100 mM, TW-20 al 0,05 %, Proclin al 0,1 %) y se almacenó a 2-8 °C para su uso posterior.

3.3 Marcaje con éster de acridinio del antígeno Cp183

(3.3.1) Se proporcionaron 50 µg de proteína Cp183, se añadieron a 300 µl de sistema de tampón de marcaje (tampón fosfato 50 mM, pH 8,0), se añadieron 8 µl de éster de acridinio (NHS-SAE 5 mM) y se hicieron reaccionar en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min.

(3.3.2) Se añadieron 100 µl de solución de tampón de paro (tampón fosfato que contiene glicina 100 mM, pH 8,0) a la mezcla que reaccionó en la etapa (3.3.1) y se hizo reaccionar en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min.

(3.3.3) Se cargó la proteína obtenida en la etapa (3.3.2) en una bolsa de diálisis, se dializó con una solución de tampón de diálisis (solución de tampón fosfato 20 mM, pH 7,4) a 4 °C en condiciones de oscuridad durante 6-8 h, en la que se cargó la solución de tampón de diálisis una vez cada 2 horas.

(3.3.4) Se transfirió la proteína obtenida en la etapa (3.3.3) a un tubo de conservación, se añadió BSA al 2 % y glicerol al 50 % y se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

(3.3.5) El Cp183-marcador de SAE obtenido en la etapa 3.3.4 se diluyó a una relación de volumen de 1/500 con solución tampón de dilución de éster de acridinio (solución de tampón de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 20 mM que contiene suero fetal bovino al 20 %, caseína al 1 %, sacarosa al 10 %, aminopirina al 0,05 %, pH 7,4) para formar una solución de reacción de marcador luminiscente, que se mezcló hasta la homogeneidad y se almacenó a 2-8 °C para su uso posterior.

3.4 Muestra de patrón de cuantificación

Se proporcionó la muestra de P1 con una concentración conocida de anti-HBc (anti-HBc = 22083 UI/ml), se diluyó en serie con solución de PBS que contenía suero fetal bovino al 20 % y se diluyó por separado hasta alcanzar 4000 UI/ml, 1333 UI/ml, 333 UI/ml, 83,3 UI/ml, 20,8 UI/ml, 5,21 UI/ml, 1,30 UI/ml, 0,33 UI/ml, 0,08 UI/ml, 0,02 UI/ml, 0,005 UI/ml, como muestras de patrón de cuantificación del procedimiento CLIA.

3.5 Detección cuantitativa CLIA de anti-HBc

Se proporcionó una muestra de suero (n.º P2) de un paciente con hepatitis B crónica y se llevó a cabo la detección cuantitativa de acuerdo con las siguientes etapas. En vista del hecho de que los pacientes con hepatitis B crónica

normalmente tienen un nivel relativamente elevado de anti-HBc, se diluyó la muestra con solución de PBS que contenía un 20 % de suero fetal bovino hasta alcanzar 2 tasas de dilución: 1:500, 1:2500 y después se usó para la detección CLIA cuantitativa. Se sometió a la muestra de P2 a un procedimiento de detección cuantitativa ELISA para anti-HBc del ejemplo 1 y se determinó que su concentración de anti-HBc era de 8069 UI/ml.

5 (3.5.1) Reacción de muestra: Se proporcionaron 50 μ l de perlas magnéticas y se añadieron a un tubo de reacción, después, se añadieron a cada pocillo 10 μ l de muestra o de muestra patrón, se agitó y se mezcló hasta la homogeneidad, se incubó y se hizo reaccionar a 37 °C durante 15 min.

10 (3.5.2) Reacción de marcaje luminiscente: tras completarse la etapa 3.5.1, se lavó una placa de reacción quimioluminiscente 5 veces con solución de lavado de PBST (20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1 %), se añadieron a cada pocillo 50 μ l de la solución de reacción de marcador luminiscente preparada en la etapa 3.3.5, se incubó y se hizo reaccionar a 37 °C durante 10 min.

15 (3.5.3) Reacción luminiscente y medición: tras completarse la etapa 3.5.2, se lavó una placa de reacción quimioluminiscente 5 veces con solución de lavado de PBST (20 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1 %), se inyectó *in situ* con solución de excitación usando el detector quimioluminiscente de un solo tubo Sirius L y se detectó al mismo tiempo la intensidad de la luz.

20 (3.5.4) Representación de la curva patrón cuantitativa: tras completarse la etapa 3.5.3, se sometieron a regresión lineal los valores medidos de 11 muestras de patrón cuantitativo y las concentraciones correspondientes de las mismas y se representó la curva de patrón cuantitativo de la Fig.5. De acuerdo con la Fig.5, el procedimiento de detección quimioluminiscente con micropartículas (CLIA) anti-HBc tuvo un límite superior de 20,8 UI/ml y un límite inferior de 0,02 UI/ml para una cuantificación precisa y su intervalo dinámico lineal fue de 3,02 órdenes de magnitud. La fórmula para calcular la concentración de anti-HBc a partir de un valor medido de URL fue:

$$\text{Conc.anti-HBc (UI/ml)} = 10^{(\text{Log}_{10}(\text{RLU}) \times 1,1409 - 5,861)}$$

25 (3.5.5) Obtención de la concentración de anti-HBc de la muestra que se va a ensayar: se sometieron a las muestras diluidas en serie de suero de P2 a la medición de las etapas 3.5.1 a 3.5.4, el valor medido de URL para la relación de dilución de 1:500 fue de 1571400; el valor medido de URL para la relación de dilución de 1:2500 fue de 380560; se introdujeron los valores anteriores medidos en la fórmula para calcular la concentración de anti-HBc obtenida en la etapa 3.5.4 y el valor de concentración para la relación de dilución de 1:500 fue de 16,16 UI/ml, el valor de concentración para la relación de dilución de 1:2500 fue de 3,204 UI/ml, encontrándose ambos dentro del intervalo dinámico lineal (0,02-20,8 UI/ml) para la cuantificación precisa del procedimiento CLIA. Por consiguiente, cuando se usó para el cálculo el valor medido para la relación de dilución de 1:500, la concentración original de anti-HBc de la muestra fue de $16,16 \times 500 = 8078$ UI/ml; mientras que cuando se usó para el cálculo el valor medido para la relación de dilución de 1:2500, la concentración original de anti-HBc de la muestra fue de $3,204 \times 2500 = 8010$ UI/ml. La concentración media de los valores medidos fue de 8044 UI/ml y este valor de concentración y el valor de concentración de 8069 UI/ml medido mediante el procedimiento de ELISA para la muestra tenía un error del 3,1 %, que se encontraba dentro del intervalo de variación normal.

4. Distribución de niveles séricos de anti-HBc de personas infectadas por VHB en diferentes fases

4.1 Selección transversal de muestras de suero de pacientes

40 En la presente invención, a fin de estudiar la distribución de niveles séricos de anti-HBc de personas infectadas por VHB en diferentes fases, se recogieron 350 muestras de suero de personas sanas que habían tenido en el pasado infección por VHB y se habían curado y 488 muestras de suero de pacientes con hepatitis B crónica y se almacenaron todas las muestras de suero a -80 °C después de separar el suero. Entre los 488 pacientes, 109 pacientes eran pacientes con cáncer de hígado primario, 63 pacientes eran pacientes con cirrosis hepática, los demás 316 pacientes eran pacientes con hepatitis B crónica simple y se seleccionó a los pacientes para excluir la posibilidad de haber tenido infección por el virus de la hepatitis C (VHC), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis D (VHD), virus de la hepatitis E (VHE) y no mostraban evidencias clínicas de haber tenido enfermedades hepáticas autoinmunitarias o metabólicas.

50 De acuerdo con la Guía para el control clínico de la hepatitis B crónica (2009) de la European Association For The Study Of The Liver, se dividió a los 316 pacientes con hepatitis B crónica en diferentes fases de la infección, en los que 52 pacientes se encontraban en la fase de tolerancia inmunitaria (TI), que presentaban una edad menor de 35, HBeAg positivo, carga de ADN de VHB en suero mayor de 5×10^7 copias/ml, niveles de ALT medidos durante los 12 meses previos siempre menores del límite superior de la normalidad (LSN, es decir, 40 U/l en la presente invención); 104 pacientes se encontraban en la fase de eliminación inmunitaria (EI), que presentaban HBeAg positivo, carga de ADN de VHB en suero mayor de 1×10^4 copias/ml, nivel de ALT mayor de 2 veces el LSN; 75 pacientes se encontraban en la fase de baja replicación (BR), que presentaban HBeAg negativo, carga de ADN de VHB en suero menor de 1×10^4 copias/ml, niveles de ALT medidos durante los 12 meses previos siempre menores del LSN; 85 pacientes se encontraban en la fase de hepatitis negativa a HBeAg, que presentaban HBeAg negativo, carga de ADN de VHB en suero mayor de 2×10^4 copias/ml y nivel de ALT mayor de 2 veces el LSN.

4.2 Procedimiento de examen clínico

5 Se midieron el nivel sérico de ALT y otros índices de la función bioquímica hepática 24 h después de la recogida de la muestra; la detección de la carga de ADN de VHB en suero y del genotipo de VHB se llevaron a cabo usando procedimientos como los indicados en documentos de la técnica anterior; la cuantificación de HBsAg se llevó a cabo usando el kit de cuantificación quimioluminiscente de HBsAg de Beijing Wantai Biological Pharmacy Co., Ltd.; Se midieron HBeAg y anti-HBe con el sistema de detección de quimioluminiscencia automático Architect de Abbott Laboratories de los Estados Unidos.

4.3 Cuantificación de anit-HBc de muestras de suero de pacientes

Se llevó a cabo usando los procedimientos del ejemplo 1, el ejemplo 2 o el ejemplo 3 de la presente invención.

4.4 Procedimiento estadístico

10 La comparación de variables continuas entre los grupos se llevó a cabo usando la prueba de la t desapareada o ANOVA de Kruskal-Wallis; la comparación de las variables clasificadas entre grupos se llevó a cabo usando la prueba de χ^2 de Mantel-Haenszel o la prueba exacta de Fisher; y la prueba de Pearson se usó para el análisis de correlación. El análisis de precisión diagnóstica se llevó a cabo usando características operativas de receptor (ROC) y se calculó la eficacia diagnóstica (área bajo la curva ROC, AUROC). Se consideró que un valor de P menor de 15 0,05 tenía una diferencia estadística significativa.

4.4 Características básicas de la cohorte de pacientes

Los datos de fondo de las estadísticas de población, virología clínica y bioquímica sanguínea de las personas infectadas en el pasado por VHB y de los portadores crónicos de VHB como se describen en la sección 4.1 se muestran en la tabla 1.

20 Tabla 1: Datos de fondo de las estadísticas de población, virología clínica y bioquímica sanguínea de personas infectadas por VHB en diferentes fases

Fase de la enfermedad: Número de pacientes:	VHB en el pasado (n=350)	Fase de tolerancia inmunitaria (n=52)	Fase de eliminación inmunitaria (n=104)	Fase de replicación baja (n=75)	Hepatitis negativa a antígeno E (n=85)	Cirrosis por hepatitis B (n=63)	Cáncer de hígado primario por hepatitis B (n=109)
Edad, años, mediana (intervalo)	36 (1-59)	22 (4-35)	33 (10-65)	46 (11-75)	42 (17-82)	51 (26-77)	51 (35-77)
Sexo, hombres/mujeres	156/194	26/26	84/20	46/29	70/16	47/16	96/13
Genotipo, 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, mediana (intervalo)	14 (6-40)	24 (10-39)	266 (81-3525)	21 (8-38)	460 (80-4093)	56 (11-1831)	59 (18-1337)
Elevación de ALT (> 40 U/l), n (%)	0	0	104 (100)	0	85 (100)	39 (62)	80 (73)
Positivo a ADN de VHB, %	0	100	100	100	100	100	100
log ₁₀ copias/ml, mediana (intervalo)	--	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)

(continuación)

Fase de la enfermedad: Número de pacientes:	VHB en el pasado (n=350)	Fase de tolerancia inmunitaria (n=52)	Fase de eliminación inmunitaria (n=104)	Fase de replicación baja (n=75)	Hepatitis negativa a antígeno E (n=85)	Cirrosis por hepatitis B (n=63)	Cáncer de hígado primario por hepatitis B (n=109)
HBsAg-positivo, %	0	100	100	100	100	100	100
Log ₁₀ IU/ml, mediana (intervalo)	--	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)
Positivo a anti-HBc, %	100	100	100	100	100	100	100
Log ₁₀ IU/ml, mediana (intervalo)	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)

Notación: ^a ya que la carga de ADN de VHB era excesivamente baja, no se determinaron con éxito los genotipos del VHB de 27 pacientes en la fase de baja replicación (BR).

4.5 Niveles séricos de anti-HBc de personas infectadas por VHB en diferentes fases

Las Fig.6A/B muestran las situaciones de distribución del nivel sérico de anti-HBc, el nivel de ALT, el nivel de HBsAg y la carga de ADN de VHB de secciones transversales de pacientes en diferentes fases de la enfermedad. Las personas con infecciones pasadas tenían un nivel sérico de anti-HBc significativamente menor que el de los portadores crónicos de VHB (valor de la mediana: 0,4 frente a 4,1 log₁₀ UI/ml, p < 0,001, menor de 1000 veces); entre los pacientes con hepatitis B crónica simple en diferentes fases de la infección, los niveles séricos de anti-HBc eran significativamente diferentes. El valor de la mediana del nivel sérico de anti-HBc de los pacientes en la fase de tolerancia inmunitaria fue de 3,4 log₁₀ UI/ml, el valor de la mediana del nivel sérico de anti-HBc de los pacientes en la fase de eliminación inmunitaria fue de 4,4 log₁₀ UI/ml, el valor de la mediana del nivel sérico de anti-HBc de los pacientes en la fase de baja replicación fue de 3,3 log₁₀ UI/ml y el valor de la mediana del nivel sérico de anti-HBc de los pacientes en la fase negativa a HBeAg fue de 4,4 log₁₀ UI/ml. El análisis de los datos anteriores demuestra que los niveles séricos de anti-HBc de pacientes en la fase de eliminación inmunitaria y en la fase de hepatitis negativa a HBeAg son significativamente mayores que aquellos de pacientes en la fase de tolerancia inmunitaria y la fase de replicación baja (p < 0,001); no hay una diferencia estadística entre los niveles séricos de anti-HBc de pacientes en la fase de eliminación inmunitaria y la fase de hepatitis negativa a HBeAg (p > 0,05) y no hay una diferencia estadística entre los niveles séricos de anti-HBc de pacientes en la fase de tolerancia inmunitaria y la fase de replicación baja, ambas (p > 0,05). Los resultados anteriores demuestran que los niveles séricos de anti-HBc de pacientes con hepatitis B crónica son altamente correlativos al estado inmunitario del hospedador. Un alto nivel de anti-HBc indica que los pacientes se encuentran en estado inmunitario activo de anti-VHB, cuando se usa el nivel de anti-HBc para determinar si un sujeto se encuentra en el estado activo inmunitario (fase de eliminación inmunitaria o fase de hepatitis negativa a HBeAg), la eficacia diagnóstica (AUROC, área bajo la curva) es de 0,918 (intervalo de confianza del 95 %: 0,888-0,948) mediante análisis de curva ROC (véase: Fig.6C). Cuando se usa como valor umbral el valor de corte optimizado de 7400 UI/ml calculado usando la curva ROC, la sensibilidad diagnóstica es del 87,3 % y la especificidad diagnóstica es del 83,5 %.

4.6 Correlación del nivel de anti-HBc y el nivel de ALT en portadores crónicos del virus de la hepatitis B

Se analizaron los niveles séricos de anti-HBc de diferentes pacientes estratificados por ALT entre los 488 portadores crónicos del virus de la hepatitis B (incluyendo pacientes con hepatitis B crónica simple, pacientes con cirrosis por

hepatitis B y pacientes con cáncer de hígado primario por hepatitis B, $n = 488$) y los resultados se muestran en la Fig.6D. Entre los pacientes con $ALT \leq 5 \times LSN$, el nivel medio de anti-HBc de los pacientes aumentó con el aumento del nivel de ALT ($p \text{ tend} < 0,001$); mientras que cuando ALT alcanzó $5 \times LSN$, el nivel sérico de anti-HBc alcanzó el valor más elevado y no aumentó más ($p \text{ tend} = 0,63$). El análisis de correlación mostró (Fig.6E) que en los pacientes con $ALT \leq 5 \times LSN$ ($n = 328$), el nivel medio en suero de anti-HBc se encontraba en correlación positiva con el nivel de ALT (análisis de un solo factor: $r = 0,52$, $p < 0,001$; análisis de múltiples factores: $R = 0,53$, $p < 0,001$), pero no en correlación con el nivel de ADN de VHB ($p = 0,25$) o el nivel de HBsAg ($p = 0,33$). En los pacientes con $ALT \leq 5 \times LSN$, la correlación cuantitativa entre el nivel de anti-HBc y el nivel de ALT existe siempre entre pacientes masculinos ($r = 0,53$, $p < 0,001$) o pacientes femeninos ($r = 0,43$, $p < 0,001$); en pacientes infectados por el genotipo B del VHB ($r = 0,49$, $p < 0,001$) o pacientes infectados por el genotipo C del VHB ($r = 0,53$, $p < 0,001$); en pacientes HBeAg positivos ($r = 0,57$, $p < 0,001$) o pacientes HBeAg negativos ($r = 0,50$, $p < 0,001$). Cuando $ALT > 5 \times LSN$ ($n = 160$), el nivel de anti-HBc no tiene una correlación estadísticamente significativa con el nivel de ALT ($p = 0,43$), y no es correlativo al nivel de ADN de VHB ($p = 0,63$) o el nivel HBsAg ($p = 0,43$).

5. Cambio dinámico del nivel de anti-HBc en suero y relación del mismo con otros indicadores durante la progresión natural de los portadores crónicos del virus de la hepatitis B

5.1 Cohorte de pacientes

En este Ejemplo, se estudió una serie de muestras de suero para la observación vertical de la progresión natural de 9 pacientes en total que no aceptaron la terapia anti-VHB, el periodo medio de observación fue de 103 ± 38 semanas (57-168 semanas), las visitas de seguimiento se llevaron a cabo 5-17 veces y se usaron 77 muestras de suero.

5.2 Procedimiento de detección clínica

Se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en la sección 4.2 del ejemplo 4.

5.3 Cuantificación de anti-HBc de muestras de suero de pacientes

Se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en la sección 4.3 del ejemplo 4.

5.4 Procedimientos estadísticos

El análisis vertical de datos se llevó a cabo usando ecuaciones de estimación generalizada (GEE) y otros procedimientos estadísticos se llevaron a cabo de acuerdo con los descritos en el ejemplo 4.

5.5 Cambios dinámicos de marcadores séricos y relación entre ellos durante la progresión natural de los portadores crónicos del virus de la hepatitis B

Los cambios dinámicos en los niveles de anti-HBc, los niveles de ALT, los niveles de HBsAg y la carga de ADN de VHB de 9 pacientes (A a G) durante el periodo de observación de seguimiento se muestran en la Fig.7. El paciente A estaba en la fase de tolerancia inmunitaria durante el periodo de observación de seguimiento, cuya carga de ADN de VHB en suero y de HBsAg se encontraron siempre a altos niveles, mientras que el nivel de ALT y el nivel de anti-HBc se encontraron siempre a niveles muy bajos. Salvo para el paciente A, los otros pacientes (B a G) sufrieron activación de la hepatitis una o más veces. Observando a estos pacientes, se descubrió que el aumento del nivel de anti-HBc estaba siempre acompañado del aumento del nivel de ALT, es decir, acompañado de la aparición de hepatitis. En la mayoría de situaciones, cuando se produjeron ataques agudos de hepatitis, el nivel sérico de anti-HBc de los pacientes normalmente alcanzó valores máximos 3-8 semanas después que el nivel de ALT (Fig.7, por ejemplo, las situaciones del paciente C, el primer periodo del paciente D, el primer periodo del paciente F y los pacientes G e I); en algunos casos, el nivel sérico de anti-HBc de los pacientes pudo alcanzar un valor pico más temprano o al mismo tiempo en comparación con el nivel de ALT (Fig.7, por ejemplo, las situaciones del paciente B, paciente D, segundo periodo del paciente F y paciente E). Durante la fase de recuperación de la hepatitis, la reducción de anti-HBc fue más lenta que ALT y anti-HBc normalmente volvió al nivel basal 12-20 semanas después de que ALT volviese a la normalidad.

En general, el análisis vertical de datos de múltiples factores muestra que el nivel sérico de anti-HBc se correlaciona de manera independiente con el nivel de ALT ($\beta = 0,65$, $p < 0,001$), pero no tiene una correlación estadísticamente significativa con la carga de ADN de VHB en suero ($\beta = -0,006$, $p = 0,98$) y el nivel de HBsAg ($\beta = -0,034$, $p = 0,45$).

6. Puede usarse el nivel de anti-HBc para predecir los efectos terapéuticos de la terapia antivírica en pacientes con hepatitis B crónica.

6.1 Cohorte de pacientes

Cohorte de pacientes A: 49 pacientes HBeAg positivos, todos los pacientes aceptaron terapia con adefovir dipivoxil (10 mg/día), durante 96 semanas en total y se efectuaron visitas de seguimiento durante 12 semanas tras detener la terapia.

Cohorte de pacientes B: 48 pacientes HBeAg positivos, todos los pacientes aceptaron terapia con peginterferón alfa-

2a (interferón α -2a de acción prolongada, 180 μ g/semana), durante 24 semanas en total y se efectuaron visitas de seguimiento durante 24 semanas tras detener la terapia.

5 Todos los pacientes anteriores cumplieron los criterios de enfermedad adaptable para terapia antes de la terapia, según se recomienda por la Guía de control clínico de la hepatitis B crónica de APASL: HBsAg fue positivo durante 1 año consecutivo o más, HBeAg era positivo y anti-HBe era negativo, el nivel sérico de ALT era mayor de 2 veces el LSN; se seleccionó a los pacientes para excluir la posibilidad de haber tenido infección por el virus de la hepatitis C (VHC), virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis D (VHD), virus de la hepatitis E (VHE) y no mostraban evidencias clínicas de haber tenido enfermedades hepáticas autoinmunitarias o metabólicas.

6.2 Procedimiento de detección clínica

10 Se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en la sección 4.2 del ejemplo 4.

6.3 Cuantificación de anti-HBc de muestras de suero de pacientes

Se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito en la sección 4.3 del ejemplo 4.

6.4 Definición del fin terapéutico

15 El fin terapéutico principal se definió cuando se produjo la seroconversión de HBeAg al final de las visitas de seguimiento.

6.5 Procedimientos estadísticos.

Se llevaron a cabo todos los procedimientos estadísticos de acuerdo con los descritos en el ejemplo 4.

6.6 Características básicas de la cohorte de pacientes

Como se muestra en la tabla 2.

20 Tabla 2: Características basales de pacientes con hepatitis B crónica positivos para HBeAg que aceptan terapia con adefovir dipivoxil (cohorte A) y PEG-interferón (cohorte B)

	Cohorte A	Cohorte B	Valor de <i>P</i>
N.º	49	48	--
Estrategia de tratamiento	ADV 96 semanas	Pegasys 24 semanas	--
Edad, años, mediana (intervalo)	35 (26~48)	35 (15~57)	0,80
Sexo, hombres/mujeres	44/5	35/13	0,06
Genotipo, B/C	11/38	29/19	<0,001
Estratos de ALT, >5XLSN/≤ 55XLSN	12/37	16/32	0,34
ALT, U/l, mediana (intervalo) ^a	110 (44~402)	168 (32- 626)	0,008
ADN de VHB, log ₁₀ copias/ml, mediana (intervalo)	7,58 (3,97~9,29)	7,55 (3,44-9,59)	0,50
HBsAg, log ₁₀ UI/ml, mediana (intervalo)	4,44 (2,35- 5,47)	4,06 (1,53- 5,35)	0,005
IgM anti-HBc, valor de S/CO, mediana (intervalo)	2,10 (0,31~12,7)	1,78 (0,25~12,2)	0,45
Anti-HBc, log ₁₀ UI/ml, mediana (intervalo)	4,29 (3,08~5,11)	3,98 (2,41~5,36)	0,15

Notación: ^a todos los pacientes eran HBeAg positivos y tenían un nivel de ALT mayor de 2xLSN durante el cribado antes de la terapia; cuando comienza la terapia, los niveles de ALT de 11 pacientes (5 pacientes de la cohorte A y 6 pacientes de la cohorte B) se redujeron a 2xLSN o menor. ADV: adefovir dipivoxil; Pegasys: Interferón α -2a pegilado; LSN, límite superior de la normalidad.

6.7 El nivel basal de anti-HBc se correlaciona con la tasa de aparición de seroconversión de HBeAg después de la terapia.

25 Tas la terapia y la observación de seguimiento, 9 de 49 pacientes de la cohorte A (que aceptan terapia con adefovir dipivoxil) tuvieron aparición de seroconversión de HBeAg al final de las visitas de seguimiento, la tasa terapéutica eficaz fue del 18,4 % (IC del 95 %: 8,8-32,0 %); aunque 23 de los 48 pacientes de la cohorte B (que aceptan terapia con interferón de acción prolongada) tuvieron aparición de seroconversión de HBeAg al final de las visitas de seguimiento, la tasa terapéutica eficaz fue del 47,9 % (IC del 95 %: 33,3-62,8 %).

Se analizaron los indicadores clínicos de los pacientes para los que fue eficaz la terapia y para los que no fue eficaz

la terapia en dos cohortes antes de aceptar la terapia y los resultados se muestran en la tabla 3. Para cualquiera de los pacientes tratados con adefovir dipivoxil o los pacientes tratados con interferón de acción prolongada, no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes para los que fue eficaz la terapia y pacientes para los que la terapia fue ineficaz en lo referente a la edad, la relación de género, el nivel de ALT, la carga sérica de ADN de VHB, el nivel de HBsAg y el nivel de IgM anti-HBc. Sin embargo, el nivel basal de anti-HBc de los pacientes para los que fue eficaz la terapia fue significativamente mayor al de pacientes para los que ineficaz la terapia: en la cohorte a, $4,58 \pm 0,28$ frente a $4,15 \pm 0,42$ log₁₀ UI/ml, $p = 0,005$; en la cohorte B, $4,32 \pm 0,66$ frente a $3,81 \pm 0,68$ log₁₀ UI/ml, $p = 0,011$. Este resultado sugiere que el nivel de anti-HBc antes de la terapia podía predecir los efectos terapéuticos esperados de los pacientes. El análisis ROC muestra que el valor de AUROC para la predicción de la seroconversión de HBeAg al final de las visitas de seguimiento usando el nivel basal de anti-HBc fue de 0,810 en la cohorte A (IC del 95 %: 0,675-0,948, $p = 0,004$, véase: Fig.8A), el mejor valor de corte fue de 29000 UI/ml, con el que la sensibilidad diagnóstica fue del 77,8 %, la especificidad diagnóstica fue del 77,5 %; el valor de AUROC en la cohorte B fue de 0,710 (IC del 95 %: 0,564-0,855, $p = 0,013$, véase: Fig.8B), el mejor valor de corte fue de 9000 UI/ml, con el que la sensibilidad diagnóstica fue del 69,6 % y la especificidad diagnóstica fue del 60,0 %.

15

Tabla 3: Análisis del valor de las características basales para la predicción de la seroconversión de HBeAg tras la terapia en pacientes con hepatitis B crónica HBeAg positivos que aceptan la terapia de adefovir dipivoxil (Cohorte A) y la terapia de PEG-interferón (Cohorte B)

Características	Cohorte A (adefovir dipivoxil)				Cohorte B (interferón α -2a pegilado)			
	SR(+)	SR(-)	Valor de p de una variable	Valor de p de múltiples variables	SR(+)	SR(-)	Valor de p de una variable	Valor de p de múltiples variables
N.º	9	40	--	--	23	25	--	--
Edad, años	35±4	36±6	0,87	0,80	34±11	36±10	0,54	0,80
Sexo, hombres/mujeres	7/2	37/3	0,45	0,26	17/6	18/7	0,88	0,85
Genotipo, B/C	2/7	9/31	0,99	0,46	15/8	14/11	0,52	0,90
Estratos de ALT, >5xLSN/ ≤5xLSN	3/6	9/31	0,77	0,45	15/8	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
ADN de VHB, log ₁₀ copias/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
HBSAg, log ₁₀ U/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
IgM anti-HBc, Valor de S/CO	3,13±1,39	2,51±2,49	0,47	0,88	3,38±2,85	2,72±3,43	0,47	0,75
Anti-HBc, log ₁₀ U/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

Notación: La edad, el nivel de ALT, la carga de ADN de VHB, el nivel de HBsAg, el nivel de anti-HBc y de anti-HBc se expresaron como media ± DT; SR: seroconversión de HBeAg.

6.8 Predicción de la tasa de aparición de seroconversión de HBeAg tras la terapia usando el nivel basal de anti-HBc

Se pudo usar el valor de corte calculado en la sección 6.7 antes de la terapia para predecir la tasa de aparición de seroconversión de HBeAg tras aceptar los pacientes la terapia. En la cohorte A, como se muestra en la Fig.8C, 7 de 16 pacientes con nivel basal de anti-HBc mayor de 29000 UI/ml tenían una aparición de seroconversión de HBeAg al final de las visitas de seguimiento (tasa eficaz: 43,8 %), mientras que solo 2 de 33 pacientes con nivel basal de anti-HBc menor de 29000 UI/ml tenían una aparición de seroconversión de HBeAg al final de las visitas de seguimiento (tasa eficaz: 6,1 %), la relación de tasas de aparición (relación de riesgo, RR) de seroconversión de HBeAg entre los grupos de anti-HBc elevado y bajo fue de 7,22 (IC del 95 %: 1,69-30,9, $p = 0,006$). En la cohorte B, como se muestra en la Fig.8D, 16 de 25 pacientes con nivel basal de anti-HBc mayor de 9000 UI/ml tenían una aparición de seroconversión de HBeAg al final de las visitas de seguimiento (tasa eficaz: 64,0 %), mientras que solo 7 de 23 pacientes con nivel basal de anti-HBc menor de 9000 UI/ml tenían una aparición de seroconversión de HBeAg al final de las visitas de seguimiento (tasa eficaz: 30,4 %), la relación de tasas de aparición (relación de riesgo, RR) de seroconversión de HBeAg entre los grupos de anti-HBc elevado y bajo fue de 2,10 (IC del 95 %: 1,06-4,17, $p = 0,006$).

Se analizaron adicionalmente los efectos de anti-HBc basal para la predicción de la seroconversión de HBeAg tras la terapia en pacientes con diferentes niveles de ALT y los resultados se muestran en la Fig.8E. En dos cohortes, para los subgrupos de pacientes con un nivel basal de ALT de $\leq 5 \times \text{LSN}$ o $> 5 \times \text{LSN}$, los pacientes con un mayor nivel de anti-HBc tuvieron una mayor tasa de aparición de seroconversión tras la terapia en comparación con los pacientes con un menor nivel de anti-HBc. Se combinaron para su análisis los pacientes que aceptaron la terapia de adefovir dipivoxil e interferón de acción prolongada y todos los pacientes se dividieron en 3 grupos: alto nivel de anti-HBc (≥ 29000 UI/ml), nivel medio de anti-HBc (9000-29000 UI/ml) y bajo nivel de anti-HBc (< 9000 IU/ml) y se analizaron las tasas de seroconversión de HBeAg de los pacientes de los 3 grupos tras la terapia y los resultados se muestran en la Fig.9. Entre los pacientes con un nivel basal de anti-HBc ≥ 29000 UI/ml, 9 de 16 pacientes que aceptaron la terapia de adefovir dipivoxil tuvieron seroconversión de HBeAg tras la terapia, esta tasa de respuesta fue del 43,8 %, aunque que esta tasa en 15 pacientes que aceptaron la terapia de interferón de acción prolongada fue del 66,7 % (10/15), no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ellas ($p = 0,82$); en cuanto a los pacientes con un nivel basal de anti-HBc de 9000-29000 UI/ml, solo 2 de 19 pacientes que aceptaron la terapia de adefovir dipivoxil tuvieron seroconversión de HBeAg tras la terapia, esta tasa de respuesta fue del 10,5 %, aunque que esta tasa en 10 pacientes que aceptaron la terapia de interferón de acción prolongada fue del 60,0 % (6/10), hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ellas ($p = 0,018$); en cuanto a los pacientes con un nivel basal de anti-HBc de < 9000 UI/ml, ninguno de los 16 pacientes que aceptaron la terapia de adefovir dipivoxil tuvieron seroconversión de HBeAg tras la terapia, mientras que 7 de 23 pacientes que aceptaron la terapia de interferón de acción prolongada tuvieron seroconversión de HBeAg (30,4 %), hubo una diferencia estadísticamente significativa entre ellos ($p < 0,001$).

6.9 Cambios dinámicos del nivel de anti-HBc de los pacientes durante y después de la terapia con adefovir dipivoxil

De acuerdo con los cambios dinámicos del nivel de anti-HBc de los pacientes durante y después de la terapia con adefovir dipivoxil (véase: Fig.10A) se pudo dividir la terapia completa y el periodo de observación en 3 fases: (1) desde el comienzo hasta 60 semanas después de comenzar la terapia, en esta fase, el nivel sérico medio de anti-HBc de los pacientes presentó una reducción lineal a medida que se continuaba la terapia ($r=0,99$, $p < 0,001$), reduciéndose $0,20 \pm 0,05 \log_{10}$ UI/ml cada 12 semanas; (2) 60 semanas tras comenzar la terapia hasta el final de la terapia (96 semanas), el nivel sérico medio de anti-HBc de los pacientes alcanzó un mínimo, no reduciéndose a medida que avanzaba la terapia ($p=0,87$); (3) tras la terapia con fármaco (108 semanas), el nivel sérico medio de anti-HBc de los pacientes presentó un rebote significativo en comparación con el de al final de la terapia (96 semanas), siendo el aumento medio de $0,29 \log_{10}$ UI/ml ($p < 0,001$). En general, el nivel de anti-HBc se redujo más lentamente que el nivel de ALT, el nivel de ADN de VHB y el nivel de HBsAg durante el procedimiento de la terapia, alcanzando este último una fase mínima 60 semanas después de comenzar la terapia, mientras que los 3 últimos indicadores alcanzaron la fase de mínimo 24 semanas después de comenzar la terapia. El análisis vertical de múltiples factores mostró que el nivel de anti-HBc se correlacionó de manera independiente con el nivel de ALT ($\beta = 0,830$, $p < 0,001$), pero no tuvo una correlación estadísticamente significativa con el nivel de ADN de VHB ($\beta = 0,003$, $p = 0,94$) o el nivel de HBsAg ($\beta = -0,061$, $p = 0,52$).

De acuerdo con los valores de corte clínicos determinados en la sección 6.7 del presente ejemplo, todos los pacientes que aceptaron la terapia de adefovir dipivoxil se dividieron en 2 grupos: > 29000 UI/ml ($n=16$, HBc-alto) y < 29000 UI/ml ($n=33$, HBc-bajo), los cambios dinámicos de los niveles séricos de anti-HBc, ADN de VHB, ALT y HBsAg durante y después de la terapia entre los dos grupos y los resultados se muestran en la Fig.10B. No hubo una diferencia estadística significativa entre los grupos de HBc-alto y HBc-bajo en cuanto al nivel de ADN de VHB ($7,61 \pm 1,15$ frente a $7,50 \pm 1,22 \log_{10}$ copias/ml, $p=0,77$) y el nivel de HBsAg ($4,34 \pm 0,31$ frente a $4,38 \pm 0,69 \log_{10}$ UI/ml, $p = 0,83$); mientras que el nivel basal de ALT del grupo de HBc-alto fue mayor que el del grupo de HBc-bajo, pero sin una diferencia estadísticamente significativa. Durante la terapia, las curvas de reducción del nivel de ALT y el nivel de anti-HBc de los dos grupos no mostraron diferencias significativas tanto en el análisis de los puntos de control o en el análisis vertical; sin embargo, tras la terapia con fármaco, el anti-HBc del grupo de HBc-bajo tuvo un rebote notable en comparación con el del grupo HBc-alto ($p=0,039$) y el nivel de ALT se encontraba en una situación similar, pero sin una significación estadística ($p=0,09$). En cuanto al nivel de ADN de VHB, los pacientes del grupo de HBc-alto tenían un nivel sérico de ADN de VHB significativamente menor que el del grupo de HBc-bajo ($p < 0,05$) ya

5 sea durante o después de la terapia (salvo al inicio). Al final del seguimiento, se redujo el nivel medio de ADN de VHB de los pacientes del grupo de HBc-alto en $3,48 \pm 2,24 \log_{10}$ copias/ml en comparación con el de antes de la terapia; mientras que se redujo el nivel medio de ADN de VHB de los pacientes del grupo de HBc-bajo en $1,69 \pm 2,05 \log_{10}$ copias/ml ($p=0,008$) en comparación con el de antes de la terapia. Las alteraciones en el nivel de HBsAg de los dos grupos no mostraron diferencias significativas.

Referencias:

- [1] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 2008;359:1486-1500.
- [2] Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2009;373:582-592.
- [3] Kwon H, Lok AS. Hepatitis B therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:275-284.
- 10 [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.
- [5] Li A, Yuan Q, Huang Z, Fan J, Guo R, Lou B, y col. Novel double-antigen sandwich immunoassay for human hepatitis B core antibody. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:464-469.
- 15 [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.
- [7] WHO International Standard: First International Standard for anti-Hepatitis B core antigen. 10 de noviembre de 2008 [citado; Disponible en: www.nibsc.ac.uk/documents/ifu/95-522.pdf]

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para predecir un efecto terapéutico antes de que un paciente con hepatitis B crónica acepte un tratamiento contra el virus de la hepatitis B, que comprende la detección cuantitativa del nivel de anti-HBc total en una muestra de suero o plasma del paciente con hepatitis B crónica.
- 5 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la detección cuantitativa del anti-HBc total se lleva a cabo mediante uno o más de los siguientes procedimientos: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, procedimiento de inmunodetección quimioluminiscente, procedimiento de detección de fluorescencia resuelta en tiempo, procedimiento de inmunturbidimetría, procedimiento inmunocromatográfico, procedimiento de inmunopercolación.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la detección individual del nivel de anti-HBc total tiene un intervalo dinámico lineal de 1,5 órdenes de magnitud o más, es decir, el límite superior de cuantificación precisa para una sola detección es 32 veces o más alta que el límite inferior de cuantificación precisa.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la detección cuantitativa de anti-HBc total comprende las siguientes etapas:
- 15 a) proporcionar una proteína de virus de la hepatitis B capaz de unirse de manera específica a anti-HBc total, la proteína puede comprender la secuencia de aminoácidos completa de la proteína core del virus de la hepatitis B desde el 1^{er} aminoácido hasta el 183^{er} aminoácido o puede comprender únicamente una secuencia de aminoácidos de la zona inmunodominante primaria de la proteína core del virus de la hepatitis B, tal como desde el 1^{er} aminoácido hasta el 149^o aminoácido, la proteína se inmoviliza sobre un soporte sólido, actúa como un antígeno en fase sólida y se usa para capturar el anti-HBc total existente en una muestra de suero;
- 20 b) proporcionar un antígeno marcado capaz de unirse de manera específica al anti-HBc total que se captura sobre el antígeno de fase sólida, el antígeno marcado puede comprender la secuencia de aminoácidos completa de la proteína core del virus de la hepatitis B desde el 1^{er} aminoácido hasta el 183^{er} aminoácido o puede comprender únicamente una secuencia de aminoácidos de la zona inmunodominante primaria de la proteína core del virus de la hepatitis B, tal como desde el 1^{er} aminoácido hasta el 149^o aminoácido, la sustancia que genera la señal en el antígeno marcado puede ser peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o éster de acridinio;
- 25 c) proporcionar muestras patrón de cuantificación con concentraciones conocidas para representar una curva patrón de cuantificación, que normalmente consiste en 3-6 muestras que contienen anti-HBc total en diferentes concentraciones;
- 30 d) poner en contacto la muestra que se va a ensayar o la muestra patrón de cuantificación con el antígeno en fase sólida de tal forma que el anti-HBc total, si existe en la muestra, se captura para formar un complejo de antígeno anti-HBc en fase sólida;
- 35 e) poner en contacto el antígeno marcado con el producto de la etapa d), es decir, el complejo de antígeno en fase sólida-anti-HBc, a fin de formar un complejo de antígeno en fase sólida-anti-HBc;
- f) poner en contacto un sustrato o una solución capaz de activar la generación de señales con el complejo de antígeno en fase sólida-anti-HBc-antígeno marcado formado en la etapa e), a fin de generar una señal medible y medir la intensidad de la señal generada con un instrumento de medida correspondiente;
- 40 g) llevar a cabo un ajuste de regresión lineal de las señales medidas de muestras patrón de cuantificación, preferentemente 3-6 muestras, con sus concentraciones correspondientes, para obtener una fórmula matemática para calcular la concentración de la muestra a partir de una señal de medida;
- h) introducir la señal medida de la muestra que se va a ensayar en la fórmula de la etapa g) y calcular la concentración de anti-HBc total en la muestra que se vaya a ensayar;
- 45 i) si la concentración de anti-HBc total calculada en la etapa h) es mayor que el límite superior de cuantificación precisa del procedimiento de detección, la muestra que se va a ensayar se diluye y se repiten las etapas a) a h), hasta que la concentración medida se encuentra en el intervalo entre el límite superior y el límite inferior de cuantificación precisa del procedimiento de detección correspondiente, la concentración de anti-HBc total contenida en la muestra que se vaya a ensayar se obtiene calculando la multiplicación del valor medido tras la dilución por la relación de dilución.
- 50 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tratamiento implica un fármaco terapéutico seleccionado entre: interferón de acción prolongada, tal como interferón pegilado o Peginterferón, interferón, lamivudina (LMV), adefovir dipivoxil (ADV), entecavir (ETV), telbivudina (LdT), tenofovir u otros fármacos útiles en el tratamiento de la hepatitis B crónica.
- 55 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el criterio común para predecir el efecto terapéutico del tratamiento es el siguiente: el efecto terapéutico o la tasa de respuesta obtenida en un paciente con un mayor nivel de anti-HBc total en el suero del mismo es superior al de un paciente con un nivel menor de anti-HBc total en el suero del mismo; el criterio de efecto terapéutico puede ser seroconversión de antígeno E del virus de la hepatitis B, es decir, conversión de HBeAg(+)/anti-HBe(-) a HBeAg(-)/anti-HBe(+) en pacientes con hepatitis B crónica que aceptan la terapia o puede ser una respuesta virológica, es decir, la carga de ADN de VHB cae hasta 1000 copias/ml o menos en los pacientes con hepatitis B crónica u otros indicadores clínicos que puedan
- 60

indicar la remisión de la patología o un buen pronóstico.

7. Uso de anti-HBc total *in vitro* en una muestra de suero o plasma para evaluar la respuesta en un paciente con hepatitis B crónica antes de que el paciente con hepatitis B crónica acepte un tratamiento con adefovir dipivoxil o interferón pegilado.

5

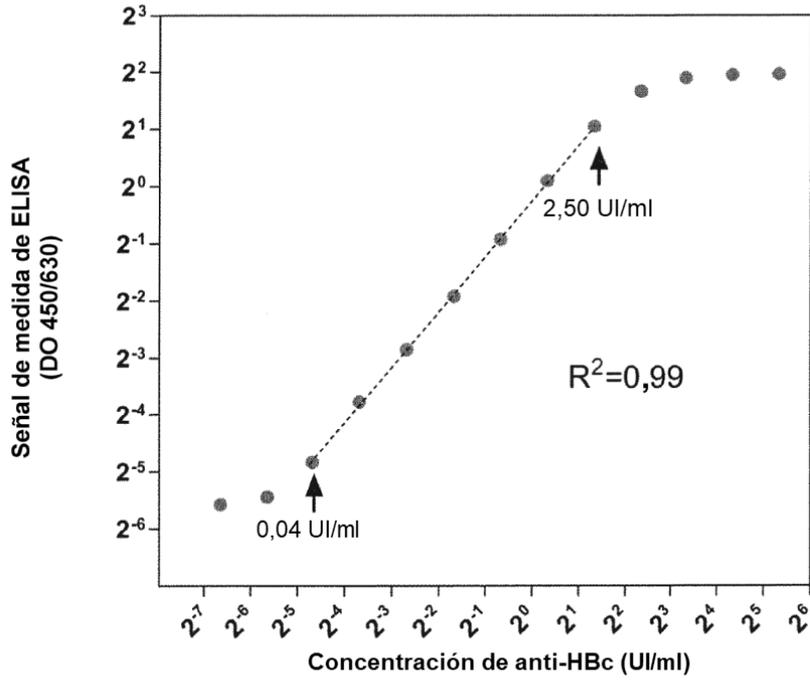


Fig. 1

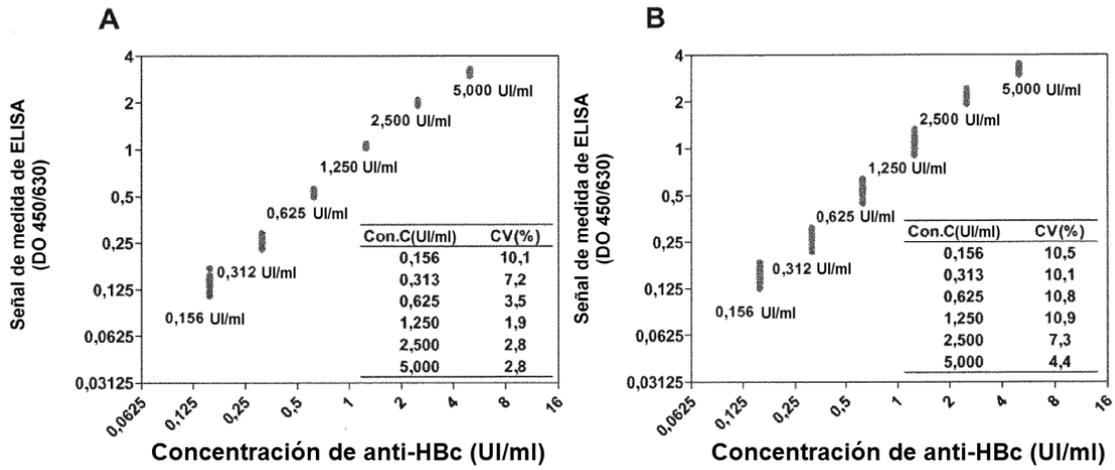


Fig. 2

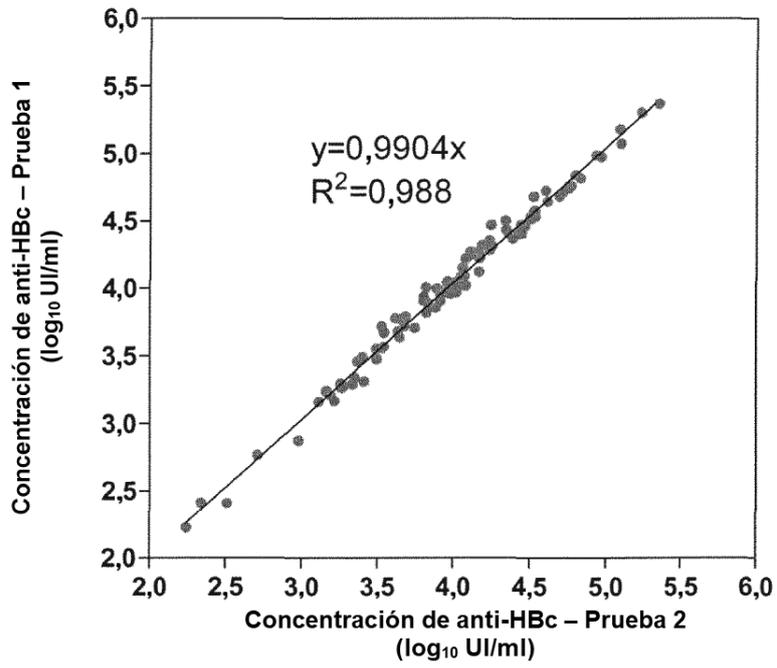


Fig. 3

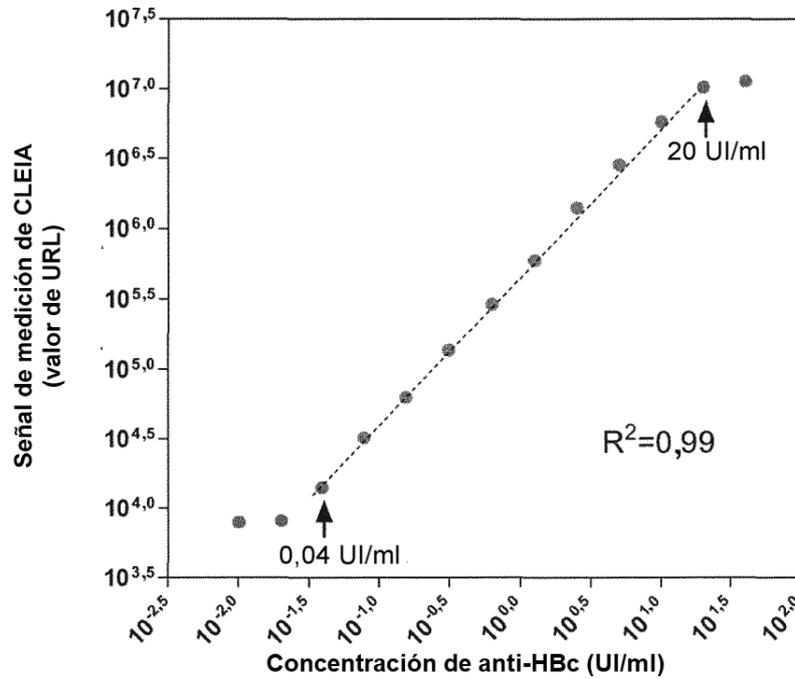


Fig. 4

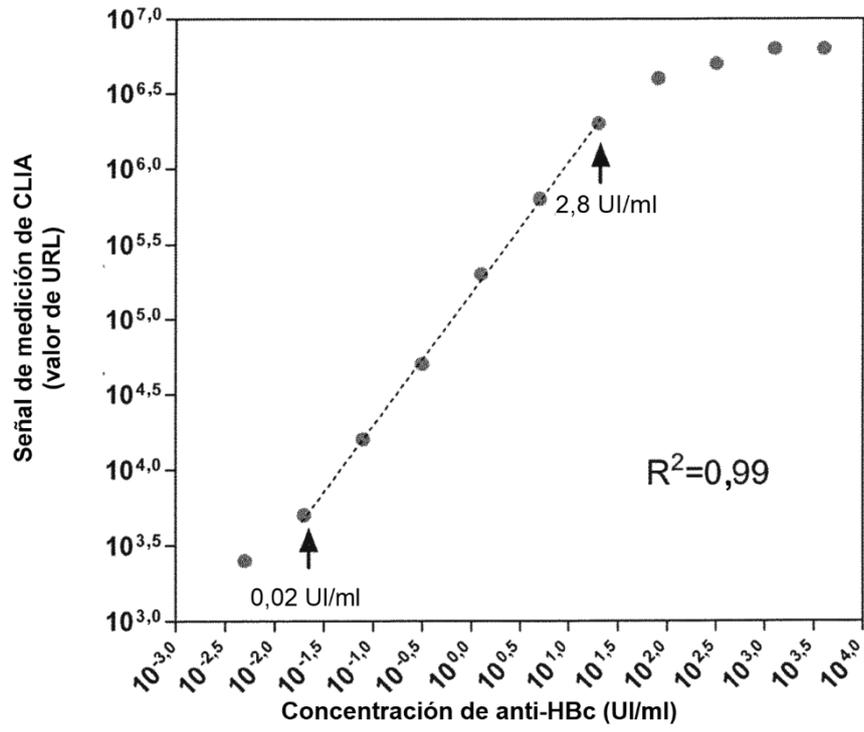


Fig. 5

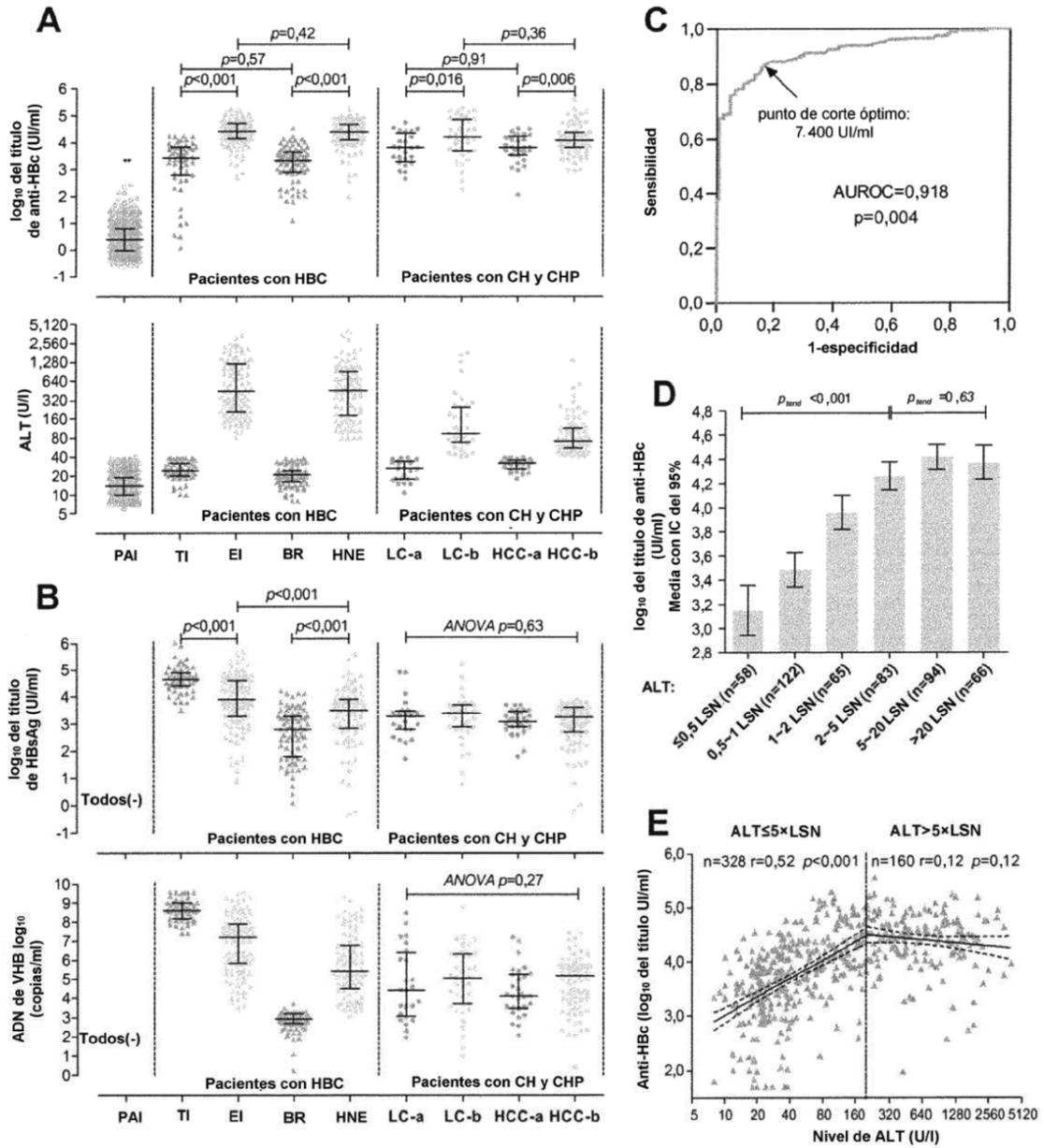
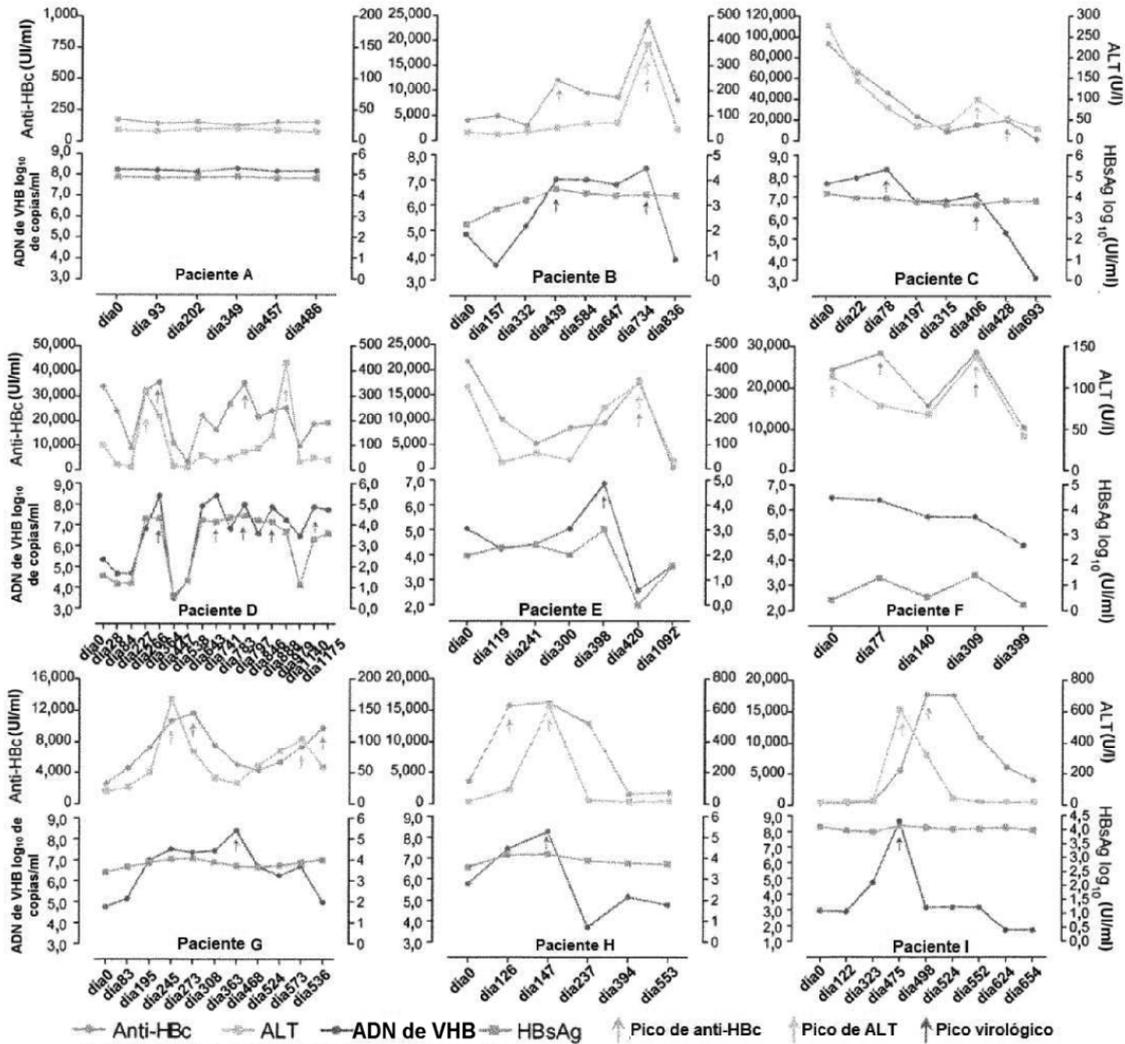


Fig. 6



	Sexo	Edad	Genotipo	HBeAg	Anti-HBe	N.º de visitas	Tiempo (semanas)
Paciente A	masculino	24	C	+	-	6	69
Paciente B	masculino	23	B	+	-	8	119
Paciente C	masculino	30	B	+	-	8	99
Paciente D	femenino	28	B	+	-	17	168
Paciente E	masculino	41	B	+	-	11	91
Paciente F	femenino	25	B	+	-	6	79
Paciente G	masculino	49	B	-	+	7	156
Paciente H	masculino	65	B	-	+	5	57
Paciente I	masculino	31	C	-	+	9	93
General		35 ± 14				77	103 ± 38

Fig. 7

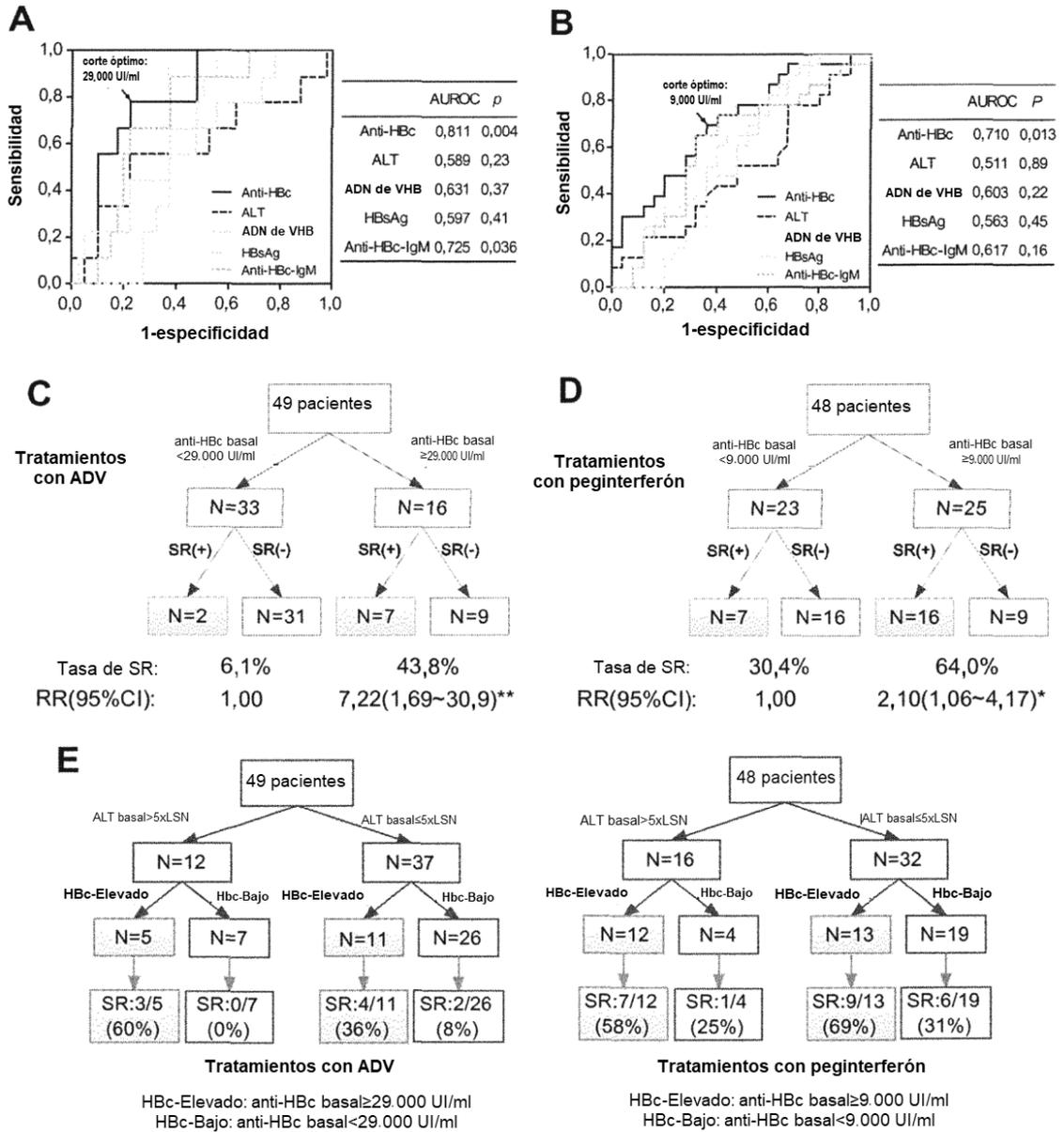


Fig. 8

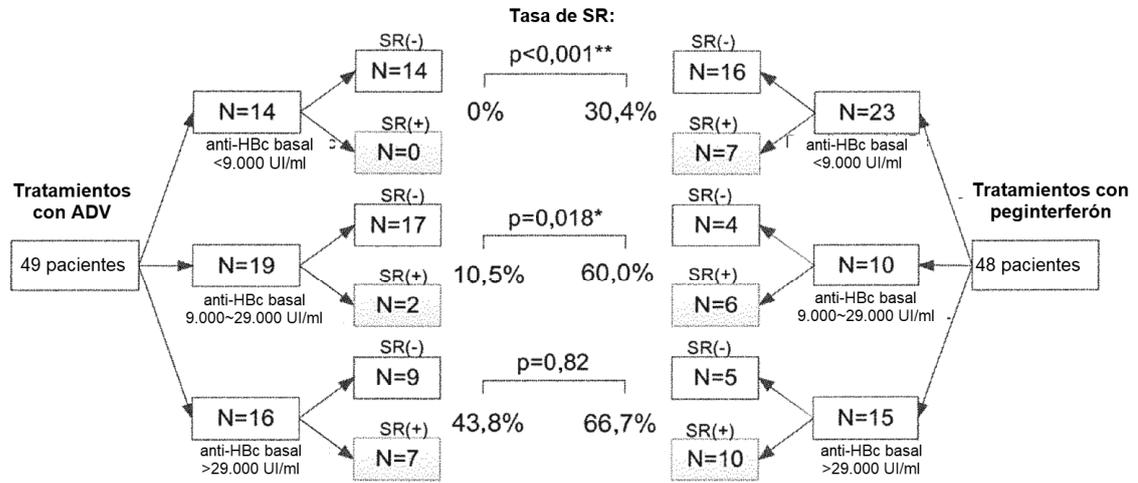
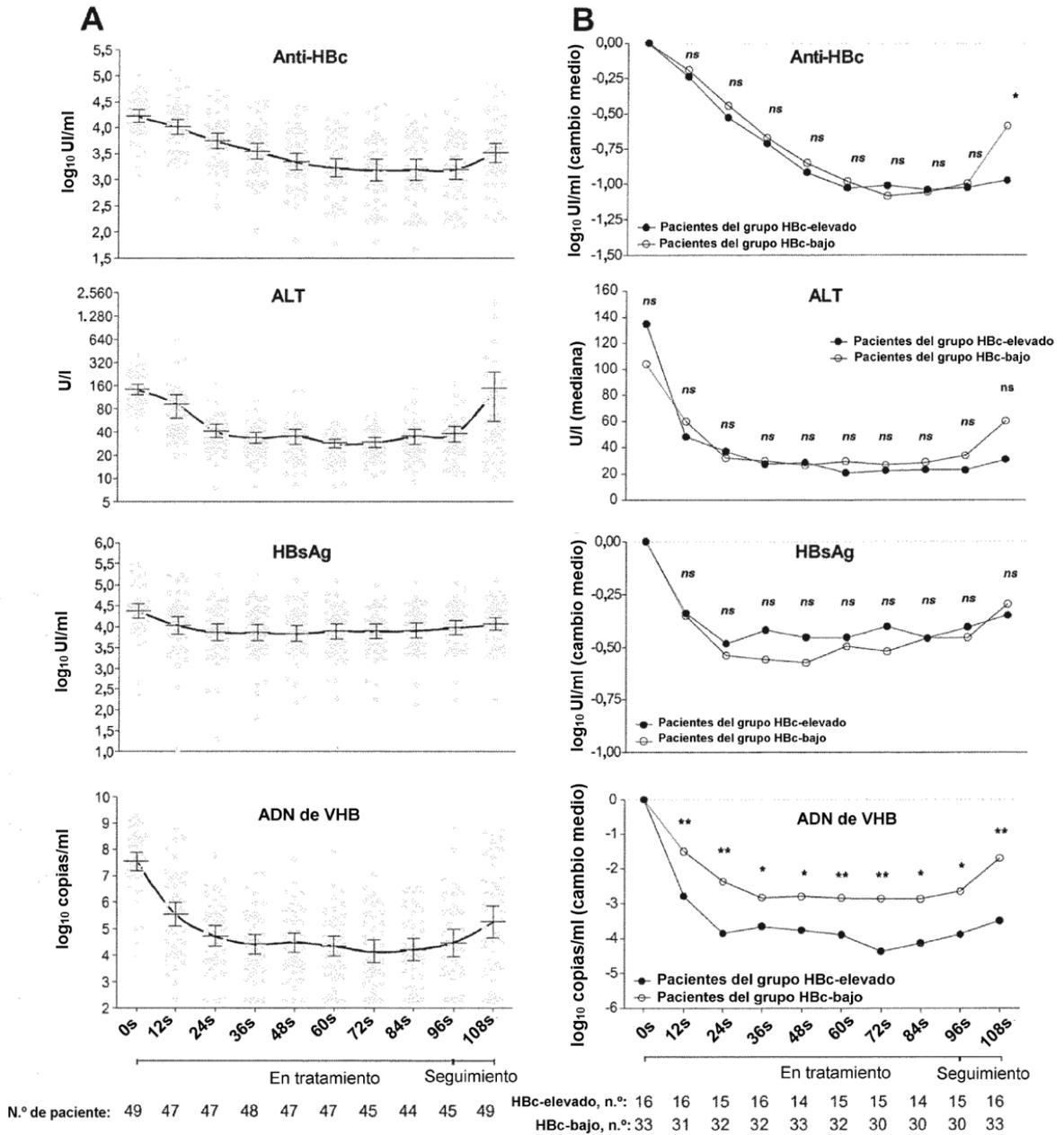


Fig. 9



Grupo de HBe-elevado: pacientes con anti-HBc basal \geq 29000 UI/ml
 Grupo de HBe-bajo: pacientes con anti-HBc basal $<$ 29000 UI/ml

Fig. 10