



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102016071 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 13

(21) 申请号 200980113181. 6

(22) 申请日 2009. 04. 03

(30) 优先权数据

61/042721 2008. 04. 05 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 10. 08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CN2009/000364 2009. 04. 03

(87) PCT申请的公布数据

W02009/121243 EN 2009. 10. 08

(71) 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

(72) 发明人 陈继明 陈立怡 黎青龙 袁孟峰

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 李进 刘健

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 3 页

(54) 发明名称

对治疗性化合物敏感性降低的乙型肝炎变异株、变异株的检测及其用途

(57) 摘要

本发明提供用于以下方面的诊断试剂盒和材料:1) 预测慢性乙型肝炎病毒(HBV)携带者对用核苷/核苷酸类似物或其组合治疗的长期反应;2) 检测对抗体检测的反应性降低的HBV变异株;3) 检测在前核心/核心区负面影响肝病进程的HBV变异株;4) 鉴定HBV基因型。

1. 一种用于测定从患者生物样品中提取的 HBV 是否对 LMV、ADV 和 / 或对其它核苷 / 核苷酸类似物、干扰素或其它抗 HBV 药剂或其组合的敏感性下降的方法, 其中所述方法包括从所述 HBV 中分离出 DNA 或 RNA, 同时在编码 HBV 聚合酶的基因中筛选出多种突变, 其中所述方法能够同时检出所述 DNA 聚合酶的多个氨基酸取代、缺失和 / 或添加, 且其中所述方法可同时检出 HBV DNA 聚合酶中的多种突变, 包括选自以下的多种突变: rtL80I、rtL82M、rtF166L、rtQ215S 和 rtM204I/V/S+/-rtL180M。

2. 一种用于测定从患者生物样品中提取的 HBV 是否对 LMV、ADV 和对其它核苷 / 核苷酸类似物、干扰素和 / 或其它抗 HBV 药剂或其组合的敏感性下降的方法, 其中所述方法包括从所述 HBV 中分离出 DNA 或 RNA, 同时在影响病毒复制和 / 或改变 HBeAg 表达和 / 或使 HBxAg 突变的核心启动子和 / 或前核心区中筛选出多种突变, 其中所述方法能够同时检出多种突变, 且其中所述方法可同时检出核心启动子和 / 或前核心区中的多种突变, 包括选自以下的多种突变: A1752G/T、T1753C、T1754C、C1856T、C1862T、G1898A 和 G1899A。

3. 一种用于测定 HBV 对抗体的反应性例如疫苗逃逸、免疫球蛋白疗法逃逸或抗 HBV 血清学检测逃逸或其组合是否降低的方法, 其中所述方法包括从所述 HBV 中分离出 DNA 或 RNA, 同时在编码 HBV 包膜蛋白的基因中筛选出多种突变, 其中所述方法能够同时检出所述包膜蛋白的多个氨基酸取代、缺失或添加, 且其中所述方法可同时检出 HBV 包膜蛋白中的多种突变, 包括选自以下的多种突变: sQ101、sL104、sC107、sS/T114、sT115、sT116、sC121、sK/R122、sT123、sC124、sI/T126、sQ129、sG130、sN/T131、sF/Y134、sP135、sS136、sC137、sC138、sC139、sT/S140、sK141、sP142、sN146、sC147、sT148、sP153、sS154、sS155、sA157、sF/L158、sA/G159、sW163、sS167 和 sA/D168。

4. 一种用于测定 HBV 的基因型的方法, 其中所述方法包括从所述 HBV 中分离出 DNA 或 RNA, 同时筛选出 HBV 基因组特定位置上的多个基因型特异性核苷酸, 其中所述方法能够同时检出多个核苷酸, 且其中所述核苷酸包括选自以下基因型的多个核苷酸: 基因型 A: T451 和 T586; 基因型 B: A321、T324 和 G408; 基因型 C: A491 和 G633; 基因型 D: T289、A290 和 T867; 基因型 E: C705、C706、T837、C840 和 C843; 基因型 F: A628、T837 和 A838; 基因型 G: T306、T936 和 G939; 以及基因型 H: T493、A494、A838、A840、G841 和 C842。

5. 权利要求 1 的方法, 其中所述 HBV DNA 聚合酶中的突变包括 rtL80I、rtL82M、rtF166L、rtQ215S 和 rtM204I/V/S+/-rtL180M。

6. 权利要求 2 的方法, 其中所述核心启动子和 / 或前核心区中的突变包括 A1752G/T、T1753C、T1754C、C1856T、C1862T、G1898A 和 G1899A。

7. 权利要求 3 的方法, 其中所述 HBV 包膜蛋白中的突变包括 sQ101、sL104、sC107、sS/T114、sT115、sT116、sC121、sK/R122、sT123、sC124、sI/T126、sQ129、sG130、sN/T131、sF/Y134、sP135、sS136、sC137、sC138、sC139、sT/S140、sK141、sP142、sN146、sC147、sT148、sP153、sS154、sS155、sA157、sF/L158、sA/G159、sW163、sS167 和 sA/D168。

8. 权利要求 4 的方法, 其中所述核苷酸和 / 或位置包括基因型 A: T451 和 T586;

基因型 B：A321、T324 和 G408；基因型 C：A491 和 G633；基因型 D：T289、A290 和 T867；基因型 E：C705、C706、T837、C840 和 C843；基因型 F：A628、T837 和 A838；基因型 G：T306、T936 和 G939；以及基因型 H：T493、A494、A838、A840、G841 和 C842。

9. 一种用于检测 HBV 变异株的突变和 / 或基因型的方法，其中所述方法包括从所述 HBV 中分离出 DNA 或 RNA，并筛选出突变 DNA 或 RNA，其中所述方法能够同时检出 DNA 或 RNA 的多个突变和 / 或基因型，且其中可用肉眼观察结果。

10. 权利要求 9 的方法，所述方法使用：

a) 寡核苷酸阵列，用于分析含有可变序列的靶序列；和

b) 具有足够大小和间距的斑点的阵列，可供肉眼观测各个斑点；

且其中所述方法包括：

a) 在允许杂交的条件下，使可能含有突变的样品核酸与阵列接触；

b) 在含有生物素标记的核苷酸和酶的反应物中，使在其 3' 端具有精确匹配的每个寡核苷酸延伸；和

c) 通过比色反应检测延伸的每个寡核苷酸。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述酶是反转录酶或 DNA 聚合酶。

12. 权利要求 10 的方法，其中所述比色反应由链霉抗生物素碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶催化。

13. 权利要求 10 的方法，其中在比色反应中的所述底物是 BCIP/NBT 或 4- 氯 -1- 萘酚。

14. 一种用于检测 HBV 变异株的突变和 / 或基因型的试剂盒，其中所述试剂盒包含具有用于检测所述 HBV 变异株的突变和 / 或基因型的核苷酸序列的载玻片。

对治疗性化合物敏感性降低的乙型肝炎变异株、变异株的检测及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求保护 2008 年 4 月 5 日提交的美国临时申请顺序号 61/042,721 的权益，该申请通过引用其整体结合到本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 乙型肝炎病毒 (HBV) 感染是影响世界范围大约 20 亿人口的严重的全球性健康问题。大约 4 亿受 HBV 感染的人是长期携带者。每年约 1 百万人死于各种 HBV 疾病，例如慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌 (HCC) (世界卫生组织 (World Health Organization), 2000)。这种疾病在西方国家相对较少，主要在成人期得病。然而，该疾病在亚洲和非洲国家实际上是流行病，其中大多数慢性 HBV 感染是在围产期或儿童期获得的。

[0005] 乙型肝炎病毒 (HBV) 是一种约 3200 个碱基的小 DNA 病毒，具有广泛的序列变异性。目前已确定的有 8 种基因型 (A ~ H)。

[0006] 这种病毒可引起虚弱性疾病症状。急性感染可能导致肝衰竭，但这种情况极少见。在出生时或在婴儿期受到感染的人，90% 以上的乙型肝炎感染会发展成慢性形式。在 25-40% 患者中，慢性感染最终导致肝硬化和肝癌。据估计，HBV 引起全球 30% 的肝硬化和 50% 的 HCC (Perz 等, 2006)。这个沉重的负担使得开发有效用于降低 HCC 风险的抗病毒疗法的需求变得十分突出 (Liaw 等, 2004)。监测患者对这类疗法的反应也因此十分重要。

[0007] HBV 主要是垂直传播，病毒由受感染的母亲传给出生时的婴儿。婴儿也可通过与受感染的父母和兄弟姐妹紧密接触而被感染。HBV 也可通过性接触或与受感染血液接触而水平传播。

[0008] 该病毒通过 RNA 中间体复制，并利用在其复制策略中缺乏校正能力的反转录。HBV 基因组部分是双链，在 4 个重叠可读框中编码包膜、前核心 (precore)/ 核心、反转录酶 / 聚合酶和 X 基因。

[0009] 包膜蛋白抗原称为 HBsAg (乙型肝炎表面抗原)，它构成病毒的外表层。核心蛋白抗原称为 HBcAg (乙型肝炎核心抗原)，它构成包裹 HBVDNA 的病毒核心。前核心蛋白抗原称为 HBeAg (乙型肝炎 e 抗原)，其功能不详。X 蛋白抗原称为 HBxAg (乙型肝炎 x 抗原)，其确切功能也不详。

[0010] 聚合酶基因与包膜基因重叠。因此，影响聚合酶基因的催化结构域的突变也可影响包膜蛋白的蛋白质序列，反之亦然。

[0011] 慢性乙型肝炎感染的现行治疗包括干扰素和核苷 / 核苷酸类似物。遗憾的是，用干扰素治疗有许多副作用，且只有少数患者对治疗起反应。

[0012] 核苷或核苷酸类似物是经化学方法改造的核苷酸，被开发用作在病毒复制期间抑制病毒 DNA 合成的取代结构单元。目前已获准 (在美国) 用于慢性乙型肝炎治疗的核苷和核苷酸类似物为：拉米夫定 (lamivudine) (3TC 或 LMV)、替比夫定 (telbivudine) (L-dT)、恩替卡韦 (entecavir) (ETV)、阿德福韦 (adefovir) (ADV) 和替诺福

韦 (tenofovir)。

[0013] 虽然这些化合物在抑制 HBV DNA 合成方面已见成效，但是它们需要长期治疗，而且在长期治疗中，存在出现抗药性突变型 HBV 毒株的可能。在用 LMV 长期治疗的患者中，赋以普遍抗药性的突变为 rtM204I/V+/-rtL180M(Allen 等，1998) 以及其它突变。在一些患者中，在长期治疗时出现在 HBV DNA 聚合酶基因的 B、C 和 D 结构域上携带突变的抗药性病毒毒株。因此与 LMV 治疗而无抗药性病毒的患者相比，这些患者具有较高的发生 HCC 的风险。

[0014] 另外，在乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg) 血清转化的过程中，因免疫压力下的选择所致出现前核心和核心启动子突变体。这些前核心突变体意味着会引起更严重的 HBV 感染。核心启动子突变体，在引起前核心 mRNA 转录和 HBeAg 产生降低的同时提高病毒复制，同样与 HCC 的发生有关。

[0015] Kazim 等人 (2006) 报道了核心启动子和 YMDD 基序突变与在进行长期 LMV 疗法的患者中的病毒突破 (viral breakthrough) 有关。同样，在接种 HBV 疫苗的儿童中，在肝移植后接受抗 HBV 免疫球蛋白疗法的患者中，在具有隐伏感染的患者中 (Weber, 2005) 以及在使用 LMV 治疗的患者中 (Torresi 等，2002)，发现了编码表面抗原的基因变异体。

[0016] HBV 疫苗的保护是基于针对 HBV 表面抗原 (HBsAg) 的主要抗原表位的抗体的诱导。对于患有乙型肝炎相关的末期肝病并已进行肝移植的患者，通过给予从已接种疫苗的受治疗者中得到的乙型肝炎免疫球蛋白，来针对复发性 HBV 感染提供预防。此外，免疫逃逸 HBV 突变体的出现即使在有足够抗体效价的情况下也导致病毒持续感染。

[0017] 因此，开发有效的抗病毒疗法需要用于监测抗药性 HBV 毒株出现的方法以及开发检测和鉴定这些抗药性病毒的测定法，以使得临床医生可以在出现抗药性时及时改用不同的治疗方案。

[0018] 多项研究指出全球不同基因型的发生率 (Lindh, M, Anderson AS, Gusdal A.Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus--large-scale analysis using a new genotyping method(乙型肝炎病毒的基因型、nt 1858 变异株和地理起源 -- 采用新的基因型分型方法进行大规模分析).J Infect Dis 1997 ; 175 : 1285-1293 ; Chan HLY, Tsui SKW, Tse C-H, Ng EYT, Au TCC, Yuen L, Bartholomeusz A, Leung K-S, Lee K-H, Locarnini S, Sung JJY.Epidemiological and virological characteristics of 2 subgroups of hepatitis B virus genotype C(乙型肝炎病毒 C 基因型 2 亚型的流行病学和病毒学特征).J Infect Dis 2005 ; 191 : 2022-2032 ; 以及 Yuen M-F, Sablon E, Yuan H-J, Wong DK-H, Hui C-K, Wong BC-Y, Chan AO-O, Lai CL.Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma(乙型肝炎基因型在急性加重、HBeAg 血清转化、肝硬化相关并发症和肝细胞癌中的重要性).Hepatology 2003 ; 37 : 562-567) 以及不同基因型对疾病并发症 (例如肝硬化、HCC 的发生) 的诱因 (Kuang SY, Jackson PE, Wang J-B, Lu P-X, Munoz A, Qian G-S, Kensler TW, Groopman JD.Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development(血浆中乙型肝炎病毒的特定突变预示肝癌的发生).Proc Natl Acad Sci, USA 2004 ; 101 : 3575-3580 ; 以及 Yuen MF, Sablon E, Wong

DKH, Yuan H-J, Wong BC-Y, Chan AOO, Lai CL. Role of hepatitis B virus genotypes in chronic hepatitis B exacerbation (乙型肝炎病毒基因型在慢性乙型肝炎恶化中的作用). Clin Infect Dis 2003; 37: 593-597) 以及对治疗的反应 (Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B (乙型肝炎基因型与慢性乙型肝炎患者的临床结果相关联). Gastroenterology 2000; 118: 554-559; 118: 554-559; 以及 Buti M, Cotrina M, Valdes A, Jardi R, Rodriguez-Frias F, Esteban R. Is hepatitis B virus subtype testing useful in predicting virological response and resistance to lamivudine (乙型肝炎病毒亚型测定可用于预测病毒学应答和拉米夫定抗药性吗)? J Hepatol 2002; 36: 445-446)。

[0019] 为了辅助治疗乙型肝炎患者, 开发了基于反向斑点印迹 (RDB) 等位基因特异性寡核苷酸 (ASO) 杂交技术的各种测试条 (test strip) 以鉴定基因型 (INNO-LiPA HBV 基因型分型, Innogenetics NV, Belgium) 或突变 (INNO-LiPA HBV 前核心, Innogenetics NV, Belgium; 以及 INNO-LiPA DR, Innogenetics NV, Belgium)。因为对于在分析过程中的所有变异株, RDB-ASO 原理需要相同的杂交和洗涤条件, 所以所有正常和突变体探针可能需要相似的解链温度 (T_m) (Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA. Genetic analysis of amplified DNA with an immobilised sequence-specific oligonucleotide probe (用固定化序列特异性寡核苷酸探针进行的扩增 DNA 的遗传学分析). Proc Natl Acad Sci, USA. 1989; 86: 6230-6234)。这就给在一个 RDB 条带上测试 > 20 个突变 / 基因型提出了限制。目前需要 3 个单独的测试条来评价 8 种基因型和 12 个突变 (INNO-LiPA HBV 基因型分型, Innogenetics NV, Belgium; INNO-LiPA HBV 前核心, Innogenetics NV, Belgium; 以及 INNO-LiPA DR, Innogenetics NV, Belgium)。其他研究小组设计了寡核苷酸微阵列 / 芯片, 但均应用相同的 RDB-ASO 原理 (H, Cho M, Hco J, Kim H, Jun H, Shin W, Cho B, Park H, Kim C. Oligonucleotide chip for detection of lamivudine-resistant Hepatitis B Virus (用于检测拉米夫定抗性乙型肝炎病毒的寡核苷酸芯片). J Clin Microbiol 2004; 42: 4181-4188; Mao H, Wang H, Zhang D, Mao H, Zhao J, Shi J, Cui Z. Study of hepatitis B virus gene mutations with enzymatic colorimetry-based DNA microarray (用基于酶比色法的 DNA 微阵列进行乙型肝炎病毒基因突变的研究). Clin Biochem 2006; 39: 67-73; Song Y, Dai E, Wang J, Liu H, Zhai J, Chen C, Du Z, Guo Z, Yang R. Genotyping of hepatitis B virus (HBV) by oligonucleotides microarray (通过寡核苷酸微阵列进行的乙型肝炎病毒 (HBV) 的基因型分型). Mol Cell Probes. 2006 年 1 月在线发表; 以及 Li ZG, Chen LY, Huang J, Qiao P, Qiu JM, Wang SQ. Quantification of the relative levels of wild-type and lamivudine-resistant mutant virus in serum of HBV-infected patients using microarray (使用微阵列定量测定 HBV 感染患者血清中野生型和拉米夫定抗性突变体病毒的相对水平). J Viral Hepatitis 2005, 12: 168-175)。可检出突变的最大数目为 20。

[0020] 发明概述

[0021] 本发明提供用于以下方面的材料与方法: 1) 预测慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 携带者对治疗的长期反应; 2) 检测对抗体检测的反应性降低的前核心 / 核心区中的 HBV 变异株; 3) 检测负面影响肝病进程的 HBV 变异株; 和 4) 鉴定 HBV 基因型。

[0022] 有利的是，本发明提供用于同时分析所有或大部分目标 HBV 变异株的综合性 HBV 阵列。在一个实施方案中，这包括 8 种 HBV 基因型、5 个前核心突变、2 个核心启动子突变及 23 个 S 基因突变和 45 个 rt 聚合酶基因突变。采用这种测定法有利于快速容易和准确地检测患者血清样品中病毒的突变体和基因型。在一个实施方案中，无需仪器通过肉眼便可容易地观察到结果。

[0023] 在一个实施方案中，本发明涉及对核苷 / 核苷酸类似物的敏感性降低的乙型肝炎病毒变异株的鉴定。本发明还涉及对免疫试剂（例如抗病毒表面组分的抗体）的反应性降低的病毒变异株。本发明还涉及影响肝病进程的 HBV 变异株的鉴定。这些变异株包括 HBV 的基因型和在前核心 / 核心区、S 基因和 rt 聚合酶基因上具有突变的变异株。本发明进一步提供检测和监测这类变异株的测定法以及用于监测抗病毒治疗方案的测定法。

[0024] 有利的是，在一个实施方案中，本发明提供监测 HBV 变异株出现的测定法，所述 HBV 变异株对 LMV、其它核苷 / 核苷酸类似物或其组合以及其它抗 HBV 药剂或其组合具有抗药性或者对 LMV、其它核苷 / 核苷酸类似物或其组合以及其它抗 HBV 药剂或其组合的敏感性降低。这些 HBV 变异株的鉴定可用来指导医生改变或更换治疗方案。

[0025] 本发明还使得对抗体反应性降低的 HBV 毒株的鉴定成为可能。这包括逃避宿主的免疫应答或逃逸免疫测定法检测的 HBV 突变体。

[0026] 本发明还提供鉴定 HBV 的基因型的测定法。例如，患者的 HBV 的基因型可能影响肝病的进程和严重程度。

[0027] 在一个实施方案中，本发明通过鉴定特定的病毒标记物，提供用于检测目标 HBV 变异株的试剂盒、材料和方法。

[0028] 附图简述

[0029] 本专利的文件包括至少一张彩色制图。需要时支付必要费用后，由专利商标局 (Patent and Trademark Office) 提供带有彩色图的本专利复印件。

[0030] 图 1 是采用颜色检测方法的阵列照片。对于每组，正常引物在上，突变体引物在正常引物之下。

[0031] 图 2 是肉眼可见的阵列的斑点排列的一个实例。

[0032] 图 3 是显示检出各种突变的 HBV 阵列。

[0033] 发明详述

[0034] 本发明提供用于以下方面的材料与方法：1) 预测慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 携带者对治疗的长期反应；2) 检测对抗体检测的反应性降低的前核心 / 核心区中的 HBV 变异株；3) 检测负面影响肝病进程的 HBV 变异株；和 4) 鉴定 HBV 基因型。

[0035] 在一个实施方案中，本发明总的来讲涉及在体外和体内对核苷 / 核苷酸类似物的敏感性降低的乙型肝炎病毒变异株。本发明还涉及对免疫试剂（例如抗病毒表面组分的抗体）的反应性降低的病毒变异株。本发明还涉及影响肝病进程的 HBV 变异株的鉴定。这些变异株包括 HBV 的基因型和在前核心 / 核心区上具有突变的变异株。本发明还包括检测和监测这类变异株的测定法以及用于监测抗病毒治疗方案的测定法。

[0036] 有利的是，在一个实施方案中，本发明提供监测 HBV 变异株出现的测定法，所述 HBV 变异株对 LMV、其它核苷 / 核苷酸类似物或其组合以及其它抗 HBV 药剂或其组

合具有抗药性或者对 LMV、其它核苷 / 核苷酸类似物或其组合以及其它抗 HBV 药剂或其组合的敏感性降低。 这些 HBV 变异株的鉴定可用来指导医生改变或更换治疗方案。

[0037] 本发明还使得对抗体反应性降低的 HBV 毒株的鉴定成为可能, 所述 HBV 毒株例如逃避宿主的免疫应答或避开免疫测定法检测的突变体。

[0038] 本发明还提供鉴定 HBV 的基因型的测定法。 患者的 HBV 的基因型可影响肝病的进程和严重程度。

[0039] 有利的是, 本发明提供用于同时分析所有或大部分目标 HBV 变异株的综合性 HBV 阵列。 在一个实施方案中, 这包括 8 种 HBV 基因型、5 个前核心突变、2 个核心启动子突变及 23 个 S 基因突变和 45 个 rt 聚合酶基因突变。 采用这种测定法有利于快速容易和准确地检测患者血清样品中病毒的突变体和基因型。 在一个实施方案中, 无需仪器通过肉眼便可容易地观察到结果。

[0040] 可以采用用于检测病毒标记物的多种方法中的任一种实施本发明。 这些方法包括例如 ARMS(扩增受阻突变系统)PCR、PCR 或 ARMS-PCR 与 RFLP(限制性片段长度多态性)联用、PCR 加上杂交(例如反向斑点印迹)和等位基因特异性引物延伸亦在其中。

[0041] 本发明提供的试剂盒通常可装有以下的一种或多种: 载玻片(glass slide)(即 HBV 阵列)和用于覆盖样品的盖玻片; 反应物例如缓冲剂、dNTP 和聚合酶。 试剂盒还可包括用于肉眼检测的试剂, 例如链霉抗生物素-辣根过氧化物酶/碱性磷酸酶; 以及用于显色的底物, 例如 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(BCIP)和氮蓝四唑氯化物(NBT)。

[0042] 在一个实施方案中, 本发明提供用于针对以下方面检测病毒标记物的材料、试剂盒和方法: 对用 LMV 或其它核苷 / 核苷酸类似物或其组合治疗的长期反应、免疫逃逸和基因型分型。 可通过例如提取和扩增得自样品的 HBV 核酸, 并对扩增产物直接测序以确定这类病毒标记物是否存在于样品中, 来实施所述方法。

[0043] 在另一个实施方案中, 本发明提供能够检测病毒标记物和用于基因型分型的材料、试剂盒和寡核苷酸组(panel of oligonucleotide)。 在该实施方案中, 所述方法可以通过例如使得自 HBV 核酸的扩增产物与同 HBV 基因组序列互补的包括标记物的成组的寡核苷酸反应, 然后确定所述寡核苷酸是否与该核酸杂交或延伸。

[0044] 术语突变以其最广意义使用, 以包括任何氨基酸取代或缺失。

[0045] 与不能响应治疗和 / 或对抗体的反应性降低有关的突变

[0046] 本发明提供用于测定从患者生物样品中提取的 HBV 是否对 LMV、ADV 以及对其它核苷 / 核苷酸类似物或者其它抗 HBV 药剂或其组合的敏感性降低的方法。 在一个实施方案中, 该方法包括从 HBV 中分离出 DNA 或 RNA, 并筛选出在编码 HBV 聚合酶的基因中导致 DNA 聚合酶中至少一个氨基酸取代、缺失或添加的突变。 进一步的实施方案包括鉴定核心或前核心区中的突变。 在具体的实施方案中, 这些突变与病毒复制发生变化、HBeAg 表达和 / 或 HBeAg 突变有关。

[0047] HBV 聚合酶的氨基酸位置的编号与 Stuyver 等人(2001)提出的命名法一致, 使得 YMDD 的甲硫氨酸 M 是 HBV 聚合酶的第 204 个氨基酸。 蛋白质序列中某一特定突变用“XaaNXbb”表示, 其中 Xaa 为突变之前的氨基酸, N 为残基编号, Xbb 为突变氨基酸。 在“XaaNXbb”之前的“rt”是指“反转录酶”。“s”是指“包膜蛋白”。

[0048] 本发明发现, 突变 rtL80I、rtL82M、rtF166L 和 rtQ215S 与不能长期响应 LMV 高度相关。

[0049] 此外, 突变 rtL80I 和 rtQ215S 与不能长期响应 ADV 相关。

[0050] 而且, 以下核苷酸改变: A1752G/T、T1753C、T1754C、A1762T、G1764A、C1856T、T1858C、C1862T、G1896A、G1898A 和 G1899A 表示与 LMV 治疗失败相关的前核心 / 核心区中的点突变。在 HBV 中, 自唯一的 EcoRI 位点开始编号 (Galibert 等, 1979)。

[0051] 在包膜蛋白中在 sQ101、sL104、sC107、sS/T114、sT115、sT116、sC121、sK/R122、sT123、sC124、sI/T126、sQ129、sG130、sN/T131、sF/Y134、sP135、sS136、sC137、sC138、sC139、sT/S140、sK141、sP142、sN146、sC147、sT148、sP153、sS154、sS155、sA157、sF/L158、sA/G159、sW163、sS167 和 sA/D168 上的突变单独或组合地改变 HBsAg 的抗原性, 导致从疫苗诱导的免疫逃逸或免疫球蛋白疗法的失败或免疫测定法中的检测失败。

[0052] 本发明还提供结合并检测 HBV 核酸标记物的寡核苷酸探针。如上所述, 在一个实施方案中, 用于预测 HBV 携带者对用核苷酸 / 核苷类似物或其它抗 HBV 药剂的组合进行治疗的长期反应的病毒标记物, 存在于 HBV 聚合酶特定位置的特定氨基酸上。在一个实施方案中, 预测 HBV 携带者对用核苷酸 / 核苷类似物及其组合疗法治的长期反应的病毒标记物为: 单独或与其它突变 (例如 rtM204I/V/S+/-rtL180M) 组合的 rtL80I、rtL82M、rtF166L 和 rtQ215S。

[0053] 本发明还提供测定病毒标记物的方法, 所述病毒标记物预测抗 HBsAg 的失败、疫苗逃逸和免疫球蛋白疗法逃逸。在一个实施方案中, 所述方法包括从生物样品中分离出核酸, 筛选出编码 S 基因的序列中的突变, 其中在一个实施方案中, 存在的突变选自 sQ101、sL104、sC107、sS/T114、sT115、sT116、sC121、sK/R122、sT123、sC124、sI/T126、sQ129、sG130、sN/T131、sF/Y134、sP135、sS136、sC137、sC138、sC139、sT/S140、sK141、sP142、sN146、sC147、sT148、sP153、sS154、sS155、sA157、sF/L158、sA/G159、sW163、sS167 和 sA/D168。

[0054] 涉及肝病严重程度的突变

[0055] 本发明提供的其它重要诊断标记物为在 HBV 核心启动子和前核心 / 核心区中 A1752G/T、T1753C、T1754C、A1762T、G1764A、C1856T、T1858C、C1862T、G1896A、G1898A 和 G1899A 上的突变。这些突变涉及肝病进程的严重程度。

[0056] Sato 等人 (1995) 报道了暴发型肝炎或严重急性肝炎中核心启动子突变和 / 或前核心突变的相关性。我们在 LMV 治疗患者的 HBV 中观察到的前核心 / 核心突变的组合为:

[0057] A1752G、G1896A、rtL180M、rtM204I

[0058] T1753C、A1762T、G1764A、C1856T、T1858C、G1898A、G1899A

[0059] T1753C、A1762T、G1764A、G1896A、G1899A、rtL180M、rtM204V

[0060] T1753C、T1754C、A1762T、G1764A、C1856T、T1858C

[0061] T1753C、A1762T、G1764A、T1858C、rtM204I

[0062] A1762T、G1764A、T1858C、rtL180M、rtM204V

[0063] C1856T、T1858C、G1898A、rtL180M、rtM204V

[0064] C1862T、G1896A、G1899A、rtM204I

[0065] A1752G、T1858C、rtL180M、rtM204V。

[0066] 核心启动子和前核心区中的突变涉及病毒复制增加、HBeAg 表达降低和 HBxAg 发生突变。

[0067] HBV 基因型的检测

[0068] 本发明还包括测定生物样品中 HBV 的基因型的方法。

[0069] 基因型 A 可通过以下核苷酸来界定：T451 和 T586。

[0070] 基因型 B 可通过以下核苷酸来界定：A321、T324 和 G408。

[0071] 基因型 C 可通过以下核苷酸来界定：A491 和 G633。

[0072] 基因型 D 可通过以下核苷酸来界定：T289、A290 和 T867。

[0073] 基因型 E 可通过以下核苷酸来界定：C705、C706、T837、C840 和 C843。

[0074] 基因型 F 可通过以下核苷酸来界定：A628、T837 和 A838。

[0075] 基因型 G 可通过以下核苷酸来界定：T306、T936 和 G939

[0076] 基因型 H 可通过以下核苷酸来界定：T493、A494、A838、A840、G841 和 C842。

[0077] 对于每个基因型，跨过上述所有碱基的两个寡核苷酸可能是必要的并足以用于适当的鉴定。HBV 的基因型分型是重要的，因为例如 HBV 基因型影响肝病的进程和严重程度。

[0078] 在一个实施方案中，采用等位基因特异性列阵引物延伸 (allele-specific arrayed primer extension, AS-APEX) 方法 (Chan 等, 2004)。将寡核苷酸引物在经处理的载玻片上列阵，当寡核苷酸和模板精确匹配时，才会发生链合成或延伸。像在 RDB-ASO 杂交中的一样，为除去不稳定的复合物不需要严格洗涤，我们的研究表明，对可以同时进行分析的突变数目没有限制（载玻片的大小除外）。

[0079] 下列实施例说明用于实施本发明的方法。这些实施例不得解释为是限制性的。所有百分比按重量计，所有溶剂混合物比例按体积计，除非另有说明。对本领域技术人员显而易见的是，实施例包括使用已知来源（例如化学品供应商）的市售材料和试剂，其有关详情不再赘述。

[0080] 实施例 1- 病毒核酸的直接测序

[0081] 一般来讲，得自生物样品的 HBV 核酸需要提取和纯化，然后扩增，测序，然后产生检测标记物存在的序列。

[0082] 可通过例如 K 蛋白酶消化，随后通过苯酚、苯酚/氯仿提取和乙醇沉淀，来实现 HBV DNA 提取。或者，可以采用任何应用例如硅胶膜技术的市售试剂盒。

[0083] 可通过例如聚合酶链式反应 (PCR；Saiki 等, 1988) 进行扩增。

[0084] 可通过双脱氧核苷酸链终止法（亦称为 Sanger 反应）或通过 Sanger 反应的改进方式即具有荧光双脱氧核苷酸的循环测序反应来完成测序。虽然直接测序可检测所有的突变、新的突变和已知的突变，但是其灵敏度是一个缺点。一小群抗药性突变体需要达到 HBV 准种库总量的 20% 后，才可被检测出来。

[0085] 实施例 2- 通过寡核苷酸探针检测

[0086] 通过寡核苷酸方法检测变异株或突变体比直接测序灵敏得多。可以鉴定出低至 HBV 总群体 5% 的小群变异株, 即使在突变体出现早期, 在临床抗药性表现出来之前。

[0087] 通过使用一组寡核苷酸高灵敏度地同时检测大量突变或序列变异, 该方法可供预测对其它类别的核苷 / 核苷酸类似物的抗药性。

[0088] 1. 反向斑点印迹杂交

[0089] 可以将寡核苷酸探针 (其设计以针对以下方面来检测病毒标记物 : 对抗 HBV 疗法的长期反应、免疫逃逸和用于基因型分型) 列阵于膜或优选载玻片上, 然后与扩增和标记的 HBV 核酸杂交。杂交后, 将膜或载玻片在高严格性条件下洗涤。然后使杂交反应的结果可视化。

[0090] 在这种情况下, 诊断性核苷酸优选位于寡核苷酸的中间部分。

[0091] 可以在不对称 PCR 反应或链特异性降解中产生与寡核苷酸互补的标记的 HBV 靶标。

[0092] 与互补 HBV 核酸连接的标记物可以是生物素, 其中可视化需要与链霉抗生物素 - 辣根过氧化物酶 / 碱性磷酸酶形成复合物, 以及与底物例如 4- 氯 -3- 萘酚或 BICP-NBT 显色。或者, 可以使用荧光标记, 并通过使用激光扫描仪获取信号。还可随信号检测的相应方法而使用放射性标记或化学发光标记。

[0093] 2. 等位基因特异性列阵引物延伸

[0094] 采用综合性 HBV 阵列用于同时分析所有或大部分已知的目标 HBV 变异株。在一个实施方案中, HBV 变异株包括 8 种 HBV 基因型、5 个前核心突变、2 个核心启动子突变、23 个 S 基因突变和 45 个聚合酶基因突变。该方法可供检测患者血清样品的病毒突变体和基因型。

[0095] 在该方法中, 诊断性核苷酸可位于寡核苷酸的 3' 端。通过不对称 PCR 反应产生互补的单链 HBV 靶标。

[0096] 将寡核苷酸组列阵于载玻片上, 然后与反应物中的 HBV 靶标进行杂交, 所述反应物包括 : 缓冲剂、热稳定聚合酶和 dNTP (其中之一是标记的, 优选生物素 -dUTP 或加荧光标签的 dUTP 的形式)。在杂交反应期间, 当寡核苷酸在 3' 端与其 HBV 靶标精确匹配时, 便进行引物延伸。在杂交 / 延伸反应以除去未掺入的 dNTP 后, 洗涤载玻片。然后通过检测掺入新合成链的标记核苷酸来得到信号。

[0097] 对于每个待查询的核苷酸位置, 需要至少两种寡核苷酸引物, 一种寡核苷酸引物用于正常序列, 另一种寡核苷酸引物用于突变序列。在一个核苷酸位置上的多个核苷酸突变可能需要相同数目的突变寡核苷酸。引物在 5' 端通过共价键与固体表面 (在此实例中为载玻片) 连接, 3' 端是游离的, 以便在与 HBV 靶序列中的诊断性碱基或超过诊断性碱基最多两个碱基互补的碱基上杂交并终止。

[0098] 通过不对称扩增或通过链特异性降解, 接着通过纯化或浓缩, 来制备与所述寡核苷酸互补的 HBV 靶标。

[0099] 杂交 / 延伸反应糅合了杂交的识别性作用与聚合酶的碱基配对特异性。将含有 HBV 靶 DNA、缓冲剂、dATP、dGTP、dCTP、生物素 -dUTP 或加荧光标签的 dUTP 及热稳定聚合酶的溶液覆盖在已列阵的寡核苷酸引物上。只要寡核苷酸引物的 3' 碱基与靶标精确匹配, 便进行延伸; 标记的 dUTP 被掺入延伸链中。寡核苷酸 / 靶标错配将得

到阴性结果。

[0100] 通过洗涤终止反应，信号获取可按照延伸反应中所使用的标记进行。

[0101] 在一个实施方案中，从 100 名无关患者中获取样品，通过现有的商用试剂盒测定所述无关患者的 HBV 突变。用现有技术和本发明的技术从 46 个样品得到一致的结果。11 个样品的结果不一致，将含有 rt- 聚合酶 HBV 基因的这些样品的 DNA 片段克隆至质粒中，测序以证实阵列分析的结果。通过本发明的阵列分析发现 43 个样品产生额外的突变。通过测序同样证实了这些额外突变的存在。这就表明本发明的阵列在检测出现的突变体方面更灵敏。

[0102] 在一个实施方案中，在治疗开始前及在 2-5 年随访期间，采集得自正接受抗病毒疗法的 22 名 HBV 患者的血清样品，使用 HBV 阵列进行测定。结果表明，所述阵列可检测 < 70 个拷贝 /ml HBV DNA 样品中的突变。在现有商用试剂盒之前 3-7 个月，便能够检出赋予抗药性的突变。因此，本发明使医生能够在较早时间检出抗药性，并且在适当时，在发生明显的生化复发前使用备选药物。

[0103] 在一名患者中，在他的‘未经治疗 (naive)’血清样品（在抗病毒疗法开始前取样）中注意到 LMV 抗性突变 78T 的存在。在治疗后 14 个月，检出其它 LMV 抗性 HBV 突变体毒株 180M、200V 和 204V。因此用该阵列，可预测患者对某些抗病毒剂的最终耐药性，使得可以在疗法开始时使用备选药物。

[0104] 3. 用于肉眼观察阵列结果的阵列方法

[0105] 该方法适用于反向斑点印迹和等位基因特异性引物延伸格式两者。精选的标记为生物素。在反向斑点印迹法中，使用生物素 -dUTP 或生物素标记的引物以扩增 HBV 靶标。在延伸方法中，使用生物素 -dUTP 用于玻璃阵列上的原位链延伸。

[0106] 在该实施方案中，使用自动打印机 (robotic printer)；将每个寡核苷酸在紧密聚类 (tight cluster) 中打印 6 次 (3x2) 以产生寡核苷酸的局部沉积或斑点，使斑点足够大，彼此间隔得足够远，使得无需借助显微镜或精细放大仪就能检出各个斑点。

[0107] 斑点排列可呈由行和列组成的网格形式，优选在正常寡核苷酸之下打印突变体寡核苷酸。

[0108] 本发明还提供寡核苷酸的有序阵列，其中不同的寡核苷酸占据不同的位置，使得每一个都可通过其在阵列上的坐标或位置来寻址。

[0109] 在杂交或杂交 / 延伸反应后，洗涤阵列，除去未结合靶标或未掺入的核苷酸。将链霉抗生物素缀合的碱性磷酸酶的溶液覆盖在阵列上。碱性磷酸酶通过链霉抗生物素在杂交的靶标或新的合成链上与生物素络合。洗去过量的碱性磷酸酶，然后使阵列与底物例如 BCIP-NBT 一起孵育，在碱性磷酸酶的催化作用下产生蓝紫色沉淀。通过洗涤停止有色沉淀后，使阵列干燥。为了记录结果，阵列可用数码相机拍照，或者用平板式桌面扫描仪进行扫描。

[0110] 应当理解的是，本文所述实施例和实施方案仅用于说明目的，根据本发明所作的各种修改或变动可由本领域技术人员提出，并且包括在本申请的精神和范围内。

[0111] 本文提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物，包括所有数据和图表，均通过引用其整体予以结合到与本申请的明确教导一致的程度。

[0112] 参考文献

- [0113] Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD., Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine(乙型肝炎病毒拉米夫定抗性中突变的鉴定和表征).拉米夫定临床研究小组(Lamivudine Clinical Investigation Group).Hepatology.1998年6月;27(6):1670-7。
- [0114] Chan K, Wong MS, Chan TK, Chan V., A thalassaemia array for Southeast Asia(用于东南亚的珠蛋白生成障碍性贫血阵列).Br J Haematol.2004年1月;124(2):232-9。
- [0115] Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P., Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome(subtype ayw) cloned in E.coli(在大肠杆菌中克隆的乙型肝炎病毒基因组(亚型 ayw)的核苷酸序列), Nature.1979年10月;281(5733):646-50。
- [0116] Kazim SN, Chauhan R, Das BC, Sarin SK., Association of core promoter mutations with viral breakthrough in chronic hepatitis B patients on long-term lamivudine therapy(进行长期拉米夫定疗法的慢性乙型肝炎患者中核心启动子突变与病毒突破有关).J Gastroenterol Hepatol.2006年10月;21(10):1525-32。
- [0117] Liaw YF, Sung JJY, Chow WC, Farrell G, Lee C-Z, Yuen H, Tanwandee T, Tao Q-M, Shue K, Keene ON, Dixon JS, Gray F, Sabbat J, 隶属肝硬化亚洲拉米夫定多中心研究小组(Cirrhosis Asian Lamivudine Multicentre Study Group), Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease(用于慢性乙型肝炎和晚期肝病患者的拉米夫定).N Engl J of Med., 2004年10月;351(15):1521-31。
- [0118] Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP., The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide(乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染对全球性肝硬化和原发性肝癌产生影响).J Hepatol.2006年10月;45(4):529-38。
- [0119] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA., Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase(使用热稳定DNA聚合酶进行引物指导的DNA的酶促扩增).Science.1988年1月;239(4839):487-91。
- [0120] Sato S, Suzuki K, Akahane Y, Akamatsu K, Akiyama K, Yunomura K, Tsuda F, Tanaka T, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M., Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis(暴发型肝炎患者中在核心启动子内具有突变的乙型肝炎病毒毒株).Ann Intern Med.1995年2月;122(4):241-8。
- [0121] Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF., Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region(聚合酶区中人乙型肝炎病毒抗病毒药抗性突变的命名).Hepatology.2001年3月;33(3):751-7。
- [0122] Torresi J, Earnest-Silveira L, Deliyannis G, Edgton K, Zhuang H, Locarnini SA, Fyfe J, Sozzi T, Jackson DC., Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that

are selected by lamivudine therapy(由于通过拉米夫定疗法选择的重叠聚合酶基因中的序列变化而引起的乙型肝炎病毒 HBsAg 蛋白的抗原性降低).Virology.2002 年 2 月 ; 293(2) : 305-13。

[0123] Weber B., Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus : clinical and diagnostic impact(乙型肝炎病毒 S 基因的遗传变异性 : 临床与诊断影响).J Clin Virol.2005 年 2 月 ; 32(2) : 102-12。

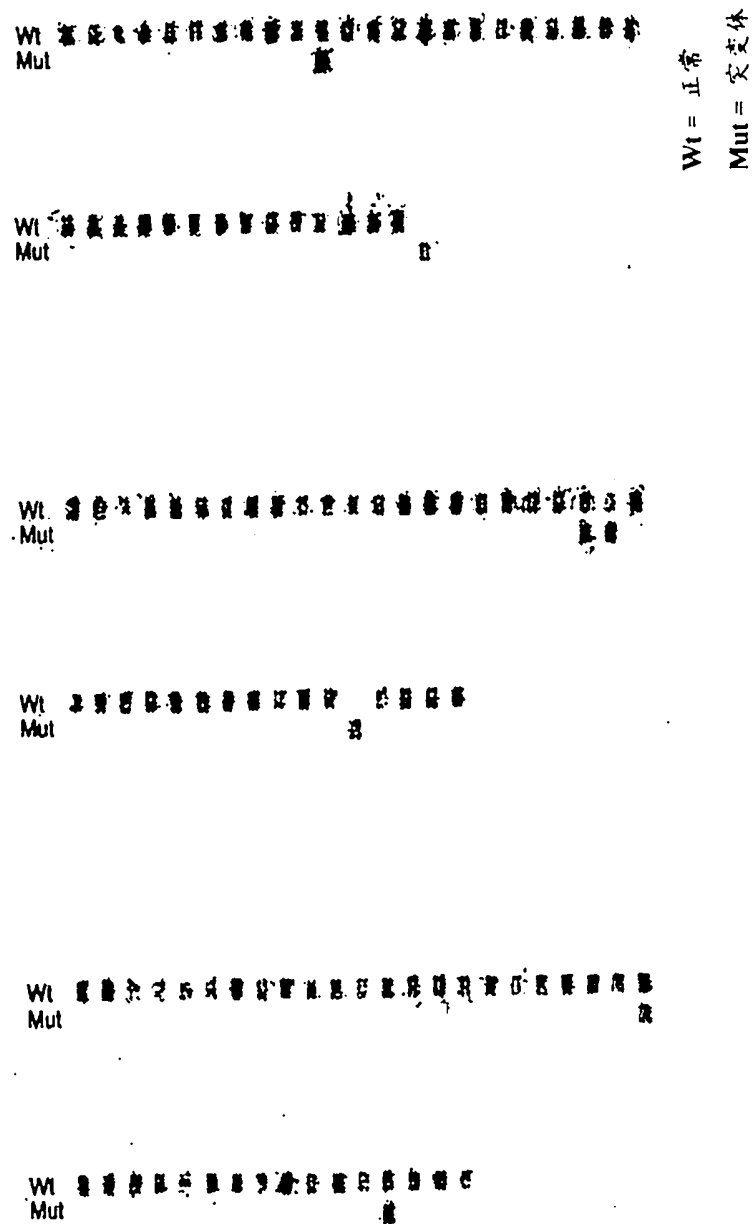


图 1

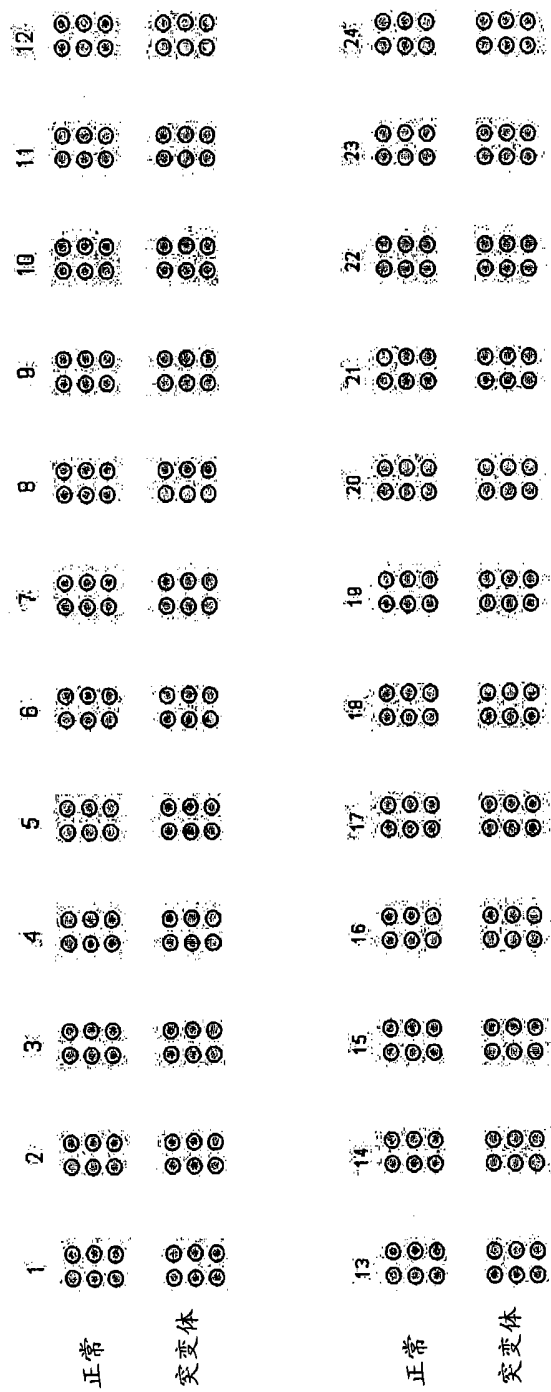


图 2

用于肉眼检测的斑点排列阵列的一个实例，有 2 个亚阵列，24 个查询位置，其中 3 x 2 斑点聚类构成一个斑点，突变体寡核苷酸直接打印在正常寡核苷酸下。

[illegible]

图 3