

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017年9月8日 (08.09.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/148432 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2017/075542
- (22) 国际申请日: 2017年3月3日 (03.03.2017)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201610121177.6 2016年3月4日 (04.03.2016) CN
- (71) 申请人: 厦门大学 (XIAMEN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。
- (72) 发明人: 葛胜祥 (GE, Shengxiang); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 王邵娟 (WANG, Shaojuan); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 熊丽霞 (XIONG, Lixia); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 刘永亮 (LIU, Yongliang); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。 夏宁邵 (XIA, Ningshao); 中国福建省厦门市思明区思明南路 422 号, Fujian 361005 (CN)。
- (74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OF-

FICE); 中国北京市西城区阜成门外大街 2 号万通新世界广场 8 层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: METHOD AND TEST KIT FOR PREDICTING IFN α TREATMENT RESPONSE OF CHRONIC HEPATITIS B PATIENT

(54) 发明名称: 用于预测慢性乙肝患者对 IFN α 治疗的应答的方法和试剂盒

(57) Abstract: The present invention provides a marker for predicting an IFN α treatment response of a chronic hepatitis B patient. The invention further provides a method for predicting the IFN α treatment response of the chronic hepatitis B patient. The method comprises measuring an expression level of the marker in PBMC of the chronic hepatitis B patient. The invention also provides a kit for using the method.

(57) 摘要: 本发明提供了用于预测慢性乙肝患者对 IFN α 治疗的应答的标志物。本发明还提供了用于预测慢性乙肝患者对 IFN α 治疗的应答的方法, 其包括测定慢性乙肝患者 PBMC 中这类标志物表达水平的步骤。本发明还提供了用于上述方法的试剂盒。



WO 2017/148432 A1

用于预测慢性乙肝患者对 IFN α 治疗的应答的方法和试剂盒

技术领域

本发明涉及用于预测慢性乙肝患者对 IFN α 治疗的应答的标志物。本发明还涉及用于预测慢性乙肝患者对 IFN α 治疗的应答的方法，其包括测定慢性乙肝患者 PBMC 中这类标志物表达水平的步骤。本发明还涉及用于上述方法的试剂盒。

背景技术

乙型肝炎病毒感染，尤其是慢性乙型肝炎病毒感染是全球最为重要的公共卫生问题之一，目前全球约有超过 3.5 亿的慢性乙型肝炎病毒感染者。慢性乙型肝炎病毒感染可造成慢性乙型病毒性肝炎（Chronic hepatitis B, CHB）、肝硬化（Liver cirrhosis, LC）和原发性肝细胞癌（Hepatocellular carcinoma, HCC）等肝脏疾病，由慢性乙型肝炎病毒感染及其所引起的相关疾病所导致的死亡，全球每年超过 100 万人。

大部分的慢性 HBV 感染患者表现为无明显临床症状，其中约 10-30% 的患者发展成肝硬化或者肝癌。慢性 HBV 感染是一个动态过程，其感染的自然史可划分为 4 个不同的、且不一定存在必然联系的阶段：1) 免疫耐受阶段，特点是 HBeAg 呈阳性，血清 HBV DNA 复制活跃，ALT 水平正常或较低，一般不发生纤维化；2) 主动免疫阶段/免疫清除阶段，特点是 HBeAg 呈阳性但其水平开始下降，HBV DNA 复制水平降低，血清 HBsAg 水平下降，ALT 持续升高或波动。处于此期患者的 CTL 反应被激活，容易出现持续时间不等的中度或严重的炎症反应和肝纤维化；3) 非活动携带阶段，这个阶段患者 HBV DNA 处于低复制期，DNA 水平极低甚至检测不出来，HBsAg 水平显著降低，ALT 水平显示正常，肝组织没有或仅有轻度炎症，HBeAg 阴性、anti-HBe 阳性，这个时期意味着患者的 HBV 感染已得到免疫控制，也预示着一个长期且较好的预后，大部分患者发生肝硬化甚至肝癌的几率很低；4) HBeAg 阴性肝炎期，属于慢性乙肝的晚期阶段，其主要特点为 HBV DNA 和 ALT 水平周期性波动以及活动性肝炎，并以前 C 区和 / 或基本核心启动子（BCP）变异的 HBV 病毒为主，不能表达或表达极低水平的 HBeAg。

HBV 病毒对宿主细胞并没有直接的致病作用，其主要的致病机理是 HBV 病毒引起宿主免疫应答，免疫应答进而引起免疫肝组织损伤。慢性 HBV 感染的治疗方式需要根据患者个体的不同情况来给予不同的抗病毒治疗。抗病毒治疗的目的是使 HBV 病毒持续被抑制，

阻止肝炎向纤维化、肝硬化甚至是肝癌的发展或转化，延长患者的生存期及提高生活质量。

目前有 8 种药物可用于 CHB 抗病毒治疗，包括 6 种核苷类似物：拉米夫定（LAM）、替比夫定（LdT）、恩曲他滨（FTC）、恩替卡韦（ETV）、阿德福韦（ADV）、替诺福韦（TDF）；2 种干扰素：普通干扰素（IFN α ）和聚乙二醇干扰素（PEG-IFN α ）。核苷类似物的主要作用是通过抑制 HBV 聚合酶的活性来抑制 HBV 病毒的复制。1976 年 Greenberg 首次报道了 IFN α 治疗慢性乙型肝炎的疗效，IFN α 是最早被 FDA 批准用于治疗慢性乙肝的药物，PEG-IFN α 也被作为治疗慢性乙肝的首选药物，具有抗病毒和免疫调节的双重作用。IFN α 的主要优点是无耐药性、并且具有免疫介导的控制 HBV 感染的作用，从而使治疗结束时患者有更高机会出现 HBeAg 血清学转换、更持久的病毒学应答以及 HBsAg 清除，使患者中的 HBV DNA 水平维持在检测下限。

抗病毒治疗必须保证一定程度上的病毒学抑制并能够产生生化缓解，组织学恢复及防止并发症的发生。理想的 HBV 治疗终点是 HBsAg 消失，但是现有的抗病毒药物难以达到这个目标，所以更现实的治疗终点是能够诱导一个持续的病毒学抑制状态。抗病毒应答可以分为生化水平、血清水平、病毒学水平和组织学水平。所有的应答都可以在治疗过程中和治疗后的某些时间点来进行评估。临床研究显示，CHB 患者使用 IFN α 常规治疗 6 个月的应答率仅为 25-40%。测定 CHB 患者针对 HBV 特异性免疫应答能力可能能够预测 CHB 患者接受治疗的预期疗效。长期以来，由于缺乏意义明确的抗 HBV 免疫应答指标，CHB 患者血清 ALT 水平被作为衡量宿主抗 HBV 免疫能力的间接替代指标，但预测结果并不理想。若能在治疗前进行治疗应答预测，对于优化药物选择，提高治疗依从性以及保障疗效具有十分重要的意义。

因此，本领域需要能够简单、方便、快速且具有高准确性和特异地预测 CHB 患者对 IFN α 治疗的应答的标志物。

发明内容

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、生物化学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语“IFN α ”或“ α 型干扰素”包括所有天然或重组的 α 型干扰素，特别优选地为人 α 型干扰素，例如重组人 α 型干扰素，包括但不限于IFN α -1b（例如可获得自Schering Corporation, Kenilworth, N. J.的Intron[®]A干扰素）、IFN α -2a（例如可获得自Hoffmann-La Roche, Nutley, N. J.的Roferon[®]-A干扰素）或IFN α -2b（例如可获得自Schering Corporation, Kenilworth, N. J.的Viraferon[®]-A干扰素）；例如天然 α 型干扰素的混合物，包括但不限于IFN α -n1（例如可获得自Sumitomo, Japan的Sumiferon[®]或Glaxo-Wellcome Ltd., London, Great Britain的Wellferon[®]干扰素 α -n1）或IFN α -n3（例如可获得自Interferon Sciences的Alferon N[®]干扰素）。在本发明中，术语“IFN α ”或“ α 型干扰素”还包括任何具有IFN α 生物学活性的物质，例如突变或修饰过的IFN α ，例如IFN α 的PEG衍生物（PEG-IFN α ）。在本发明中，术语“IFN α ”或“ α 型干扰素”不受任何特定的获得来源的限制，可通过市售来源获得或通过本领域技术人员已知的常规技术产生，所述生产方法包括但不限于生物来源提取法和基因工程提取法，其详细描述于例如“Pestka S. Arch Biochem Biophys. 1983 Feb 15; 221(1):1-37”（其通过引用并入本文）。

如本文中所使用的，术语“HBV抗原”是指，存在于乙型肝炎病毒（HBV）中能够诱发机体产生免疫反应的蛋白，包括乙型肝炎病毒核心抗原（HBcAg）、乙型肝炎病毒表面抗原（HBsAg）和乙型肝炎病毒E抗原（HBeAg）。

如本文中所使用的，术语“HBcAg”是指，乙型肝炎病毒（HBV）的核心抗原蛋白，其是本领域技术人员公知的（参见，例如GENBANK登录号：CAM31905.1）。

在本发明中，当提及HBcAg的氨基酸序列时，参照SEQ ID NO: 38所示的序列来进行描述。然而，本领域技术人员理解，在HBcAg的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异（包括但不限于，置换，缺失和/或添加，例如不同基因型、基因亚型或不同血清型、血清亚型的HBcAg），而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“HBcAg”应包括所有此类序列，包括例如SEQ ID NO: 38所示的序列以及其天然或人工的变体。并且，当描述HBcAg的序列片段时，其不仅包括SEQ ID NO: 38的序列片段，还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。例如，表述“HBcAg的第1-183位氨基酸残基”包括，SEQ ID NO: 38的第1-183位氨基酸残基，以及其变体（天然或人工）中的相应片段。在本发明中，表述“相应片段”是指，当对序列进行最优比对时，即当序列进行比对以获得最高百分数同一性时，进行比较的序列中位于等同位置的片段。

在本发明中，术语“HBcAg”不受任何特定的合成蛋白的方法限制，可通过本领域技术人员已知的常规技术产生，例如 DNA 重组技术或化学合成技术。

如本文中所使用的，表述“HBcAg 的抗原性片段”是指，HBcAg 蛋白经过截短后得到的氨基酸序列片段（即，多肽），该片段具有与相应的全长蛋白相同的生物学活性，即可刺激并活化来自慢性乙肝患者的 PBMC。例如本发明中 SEQ ID NO: 3-37 所示的氨基酸序列片段即为 HBcAg 的抗原性片段。在本发明中，该抗原性片段不受任何特定的合成多肽的方法限制，可通过本领域技术人员已知的常规技术产生，例如 DNA 重组技术或化学合成技术。

在本发明中，HBcAg 或其抗原性片段（例如，分别具有如 SEQ ID NO: 3-37 所示的氨基酸序列的抗原性片段）可以通过 DNA 重组技术获得，例如通过使用无细胞表达系统从编码这些蛋白或多肽的多核苷酸获得（无细胞表达系统包括例如基于网织红细胞裂解物的表达系统、基于麦胚提取物的表达系统以及基于大肠杆菌提取物的表达系统）；或通过使用体内表达系统（例如，大肠杆菌原核表达系统、酵母真核表达系统）从编码这些蛋白或多肽的多核苷酸获得。作为另外一种选择，HBcAg 或其抗原性片段（例如，分别具有如 SEQ ID NO: 3-37 所示的氨基酸序列的抗原性片段）可以通过化学合成产生。蛋白或多肽化学全合成的方法在本领域内是熟知的（参见，例如，Raibaut L, et al., *Top Curr Chem.* 2015; 363: 103-54; Thapa P, et al. *Molecules.* 2014; 19(9):14461-83; Dawson PE, et al., *Science*, 1994; 266(5186): 776-9; 和 Wang P, et al., *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39(47): 88711-14; 其通过引用并入本文），并且包括但不限于：固相肽合成技术（Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS）或液相分段合成技术（例如，天然化学连接法(Native Chemical Ligation, NCL)、叠氮法(Azide method)、转移活化酯法(Transfer Active Ester Condensation, TAEC)）。

如本文中所使用的，表述“分别具有如 SEQ ID NO: 3-37 所示的氨基酸序列的抗原性片段”是指，具有 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列的抗原性片段、具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列的抗原性片段、…具有 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列的抗原性片段、和具有 SEQ ID NO: 37 所示的氨基酸序列的抗原性片段的组合。

如本文中所使用的，术语“免疫学检测”是指，利用抗原-抗体之间的特异性相互作用/结合亲和力来进行的测定，其一般可用于检测特定抗原或者抗体在样品中的存在或水平。此类免疫学测定是本领域技术人员公知的，包括但不限于，ELISA 检测，Elispot 检

测, Western 印迹, 表面等离子共振法等。关于免疫学测定的详细描述, 可参见例如, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989)。

如本文中所使用的, 术语“抗体”是指, 通常由两对多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ , 并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内, 可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接, 重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子, 包括免疫系统的各种细胞(例如, 效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)), 其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 VH 和 VL 由按下列顺序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 *Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia 等人 (1989) *Nature* 342:878-883 的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如, 其包括, 特别地, 重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体, 例如, IgG (例如, IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的, 抗体的“抗原结合片段”是指, 全长抗体的一个或多个部分, 所述部分保持结合抗体所结合的共同抗原(例如, OAS2 或 USP18)的能力, 能够与完整抗体竞争对抗原的特异性结合。通常参见, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989), 其以其全文通过引用合并入本文, 用于所有目的。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗原结合片段。在一些情况下, 抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如, scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽, 其包含足以赋予多肽特异性结合抗原能力的抗体的至少一部分。

如本文中所使用的, 术语“核酸适体(Aptamer)”是指, 能够高亲和性和高特异性

地结合目的靶蛋白或其它生物靶分子的单链寡核苷酸，其可折叠形成例如茎环 (Stem-Loop)、发夹 (Hairpin)、假结 (Pseudoknot) 或 G-四聚体 (G-tetramer) 的热力学稳定的三维空间结构，通过例如结构互补、碱基堆积力、范德华力、氢键或静电作用与目的靶蛋白或其它生物靶分子特异性结合。核酸适体可以为 DNA 或 RNA，也可以包含核酸类似物 (例如锁核酸 (LNA)、肽核酸 (PNA)、二醇核酸 (GNA) 或苏糖核酸 (TNA))。获得结合特定靶蛋白的核酸适体的方法是本领域公知的，例如 SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 筛选技术。

如本文中所使用的，术语“靶向多肽”是指，可以特异性结合目的靶蛋白的多肽分子。在本发明中，该靶向多肽可包含天然氨基酸、合成的氨基酸或采用与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸模拟物 (mimetics)。天然存在的氨基酸为通过遗传密码来编码的那些以及后来修饰的那些氨基酸，例如，羟基脯氨酸、 γ -羟基谷氨酸盐、O-磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸或磷酸酪氨酸。在本发明中，可基于亲和力来确定靶向多肽与其目的靶蛋白之间的“特异性”，该亲和力可用靶向多肽与其所结合的目的靶蛋白的解离平衡常数 (即， K_D 值) 进行描述。 K_D 值越低，靶向多肽与其所结合的目的靶蛋白之间的结合强度越强。在本领域中通常已知，大于约 10^{-5} M 的 K_D 值通常被认为表示非结合或非特异性结合。取决于具体的目的靶蛋白，可以通过本领域技术人员已知的方法获得特异性结合该靶蛋白的靶向多肽，例如通过噬菌体展示技术或蛋白质微阵列技术进行筛选。

如本文中所使用的，表述“对 IFN α 治疗应答”是指，慢性乙肝患者接受 IFN/PEG-IFN 治疗后，出现病毒学应答或血清学应答的情况。其中，所述病毒学应答是指治疗后 6 个月 HBV DNA < 2000 IU/ml，并且停药后维持 6 到 12 个月；所述血清学应答是指 HBeAg 阴转并出现 anti-HBe (参见，EASL 慢性乙型肝炎临床实践指南 (2012 版))。相应地，表述“对 IFN α 治疗无应答”是指，慢性乙肝患者接受 IFN/PEG-IFN 治疗后，未满足上文所描述的条件情况。

如本文中所使用的，术语“统计分析值”是指，对通过各种检测方法得到的检测结果进行统计分析后得到的值。各种统计分析方法是本领域公知的 (参见，例如 PCT 国际申请 W02009064901，其通过引用并入本文)，并且包括但不限于检测结果的线性组合、线性回归模型、Logistic 回归模型、线性判别分析 (LDA) 模型、最近邻模型或微阵列预测分析 (PAM)。通常而言，特别优选的是，所述统计分析值为通过 Logistic 回归模型进行统计分析得到的值。Logistic 回归模型具体描述于例如“胡春艳. 四种肿瘤标志物在

卵巢癌血清中的联合检测[D]. 广州: 中山大学, 2008: 1-39”, 其全部通过引用并入本文。

如本文中所使用的, 术语“参考值”(也称为最佳诊断界值)是指能够反映对 IFN α 治疗无应答的 CHB 患者群体的状况的值。在本发明中, 参考值包括例如, 根据对 IFN α 治疗无应答的 CHB 患者群体样品中的标志物水平或根据 IFN α 和/或 HBV 抗原刺激前后对 IFN α 治疗无应答的 CHB 患者群体样品中的标志物水平的变化倍数(相对表达水平), 所确定的一个正常数值或数值范围; 以及, 对从对 IFN α 治疗无应答的 CHB 患者群体的样品获得的检测值(例如, 前文所述的标志物水平的变化倍数)进行统计分析而得到的值(统计分析值)。确定最佳诊断界值的方法是本领域熟知的, 包括但不限于受试者工作特征曲线分析(Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis), 其详细描述于例如“Habibzadeh F, et al., *Biochem Med (Zagreb)*. 2016 ;26(3):297-307”和“陈卫中等. ROC 曲线中最佳工作点的选择[J]. *中国卫生统计*, 2006, 23:157-158”, 其全部通过引用并入本文。

如本文中所使用的, 术语“Ct 值(Cycle threshold, 循环阈值)”是指, 在荧光定量 PCR 检测中, 每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数。每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线, 其中以起始拷贝数的对数为横坐标, 以 Ct 值作为纵坐标。因此, 只要获得未知样品的 Ct 值, 即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。

如本文中所使用的, 术语“比较 Ct 法”是本领域熟知的一种 mRNA 相对定量分析方法, 其详细描述于例如 Livak KJ, 等人. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8 (其通过引用并入本文)。在进行实时 PCR (定量 PCR) 反应过程中, 可以假设每个 PCR 循环增加一倍的扩增产物, 而在 PCR 反应的指数期得出的 Ct 值可以反映出起始模板的拷贝数, 因此如果不同待测样品的 Ct 值相差一个循环, 则意味着它们的起始模板拷贝数具有 2 倍的差异。基于此, 通过比较不同样品的 Ct 值, 即可对待测样品中目的基因的相对表达水平作出判断。

如本文中所使用的, 术语“归一化(normalization)”或“标准化”是指, 通过比较不同样品中同一个基因的表达水平以消除由所采用的检测方法各个步骤中可能存在的可变产率所导致的表达差异。归一化的方法是本领域已知的, 包括但不限于详细描述于

PCT 国际申请 WO2013068422A1 或中国专利申请 201280035399.6 中的方法,例如基于内参基因的比较 Ct 法。

如本文中所使用的,术语“表达水平”是指,来自受试者的样品中由目的基因产生的基因产物的可测量的量,其中基因产物可以是转录产物或翻译产物。因此,表述“测定目的基因的表达水平”可以指,测定所述基因的 mRNA 或所述 mRNA 的片段的水平、或所述基因的 cDNA 或所述 cDNA 的片段的水平、或由所述基因编码的蛋白或其多肽片段的水平。

如本文中所使用的,术语“外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)”是指,外周血中具有单个细胞核的细胞的总称,包括但不限于淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK细胞)、单核细胞或树突状细胞。从外周血中获得 PBMC 的方法是本领域熟知的,包括但不限于 Ficoll 分层液法或 Percoll 分层液法。在本发明中,术语“用于分离 PBMC 的试剂”是指,在上文所描述的获得 PBMC 的方法中所需要用到的试剂,例如用于 Ficoll 分层液法的聚蔗糖-泛影葡胺溶液。在本发明中,术语“PBMC 分离装置”是指,能够来自受试者的样品(例如,外周血)中分离获得 PBMC 的装置,这类装置是本领域已知的,包括但不限于详细描述于中国专利申请 CN1958776A、CN102286360A 以及 CN105132278A 中的细胞分离装置,其全部通过引用并入本文。

如本文中所使用的,术语“外周血白膜层”是指,外周抗凝血经过自然沉降、离心或密度梯度离心后形成的一个组分,主要由白细胞(包括外周血单个核细胞)和血小板组成。抗凝血经过离心以后会形成上层的血浆、下层的红细胞以及二者之间薄薄的一层白色膜状物,约占血液总体积的 1%,被称为白膜层。

如本文中所使用的,术语“受试者”包括但不限于各种动物,特别优选的是人。

在本发明中,术语“稀释剂”优选为能够维持细胞渗透压的电解质溶液,必要时该溶液也具备保持生理 pH 值的作用。这类溶液是本领域熟知的,包括但不限于阿氏液(Alsever's solution)、Earle's 平衡盐溶液(EBSS)、Gey's 平衡盐溶液(GBSS)、Hanks' 平衡盐溶液(HBSS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)、Puck's 平衡盐溶液、Ringer's 平衡盐溶液(RBSS)、Simm's 平衡盐溶液(SBSS)、TRIS 缓冲液(TBS)、Tyrode's 平衡盐溶液(TBSS)、生理盐水或林格氏液(Ringer's Solution)。在某些实施方式中,所述稀释剂为磷酸盐缓冲液或生理盐水。

如本文中所使用的,术语“抗凝剂”是指,能够阻止血液凝固的试剂或物质,这类

物质是本领域熟知的，包括但不限于肝素、EDTA、草酸盐（例如，草酸钠、草酸钾、草酸铵）、枸橼酸钠（柠檬酸钠）。

如本文中所使用的，术语“培养液”或“培养基”是指，能够维持细胞活性的养料。通常所述养料含有氨基酸、维生素、碳水化合物、无机盐等。这类养料是本领域熟知的，包括但不限于 RPMI-1640 培养基或 DMEM 培养基。在本发明中，在来自所述受试者的样品中加入培养液或培养基的目的是为了维持样品中的细胞特别是 PBMC 的活性。维持血液成分中细胞的活性的方法为本领域所公知，本领域技术人员可以根据实际需要进行选择。在某些实施方案中，当样品为全血时，可以加入培养液，所述培养液例如为在磷酸盐缓冲液或生理盐水中添加适量的葡萄糖、氯化钠和氯化钾等；在某些实施方案中，所述培养液为在磷酸盐缓冲液中添加适量的葡萄糖和氯化钾。在某些实施方案中，当样品为外周血单个核细胞（PBMC）、外周血白膜层或其它含有 PBMC 的血液成分时，可以加入培养基，例如细胞培养基，例如适合维持血细胞特别是 PBMC 活性的细胞培养基，例如 RPMI-1640 培养基或 DMEM 培养基。

本申请的发明人在对慢性乙肝患者对 IFN α 治疗的应答情况进行追踪研究后，出人意料地发现，对 IFN α 治疗应答患者的治疗前 PBMC 样本中 OAS2 水平与对 IFN α 治疗无应答患者相比表现出明显差异，或对 IFN α 治疗应答患者的治疗前 PBMC 样本经体外诱导后其中 OAS2 和/或 UPS18 水平与对 IFN α 治疗无应答患者相比表现出明显差异，因而 OAS2 和/或 UPS18 可以作为用于预测 CHB 患者 IFN α 治疗应答的标志物。而在本申请之前，本领域长期以来缺乏意义明确的抗 HBV 免疫应答指标以预测 CHB 患者对 IFN α 治疗的应答情况。基于这一发现，本发明人开发了新的用于预测 IFN α 对 CHB 患者的治疗效果或 CHB 患者对 IFN α 治疗的应答的方法。

因此，在一个方面，本发明提供了一种试剂盒，其包括能够检测标志物表达水平的第一试剂，任选地还包括 IFN α 和/或刺激物；其中，所述标志物选自 OAS2 或 USP18，所述刺激物选自 HBV 抗原、HBV 抗原的抗原性片段或其任何组合。

在某些优选的实施方案中，所述 HBV 抗原为 HBcAg。在某些优选的实施方案中，所述 HBcAg 具有如 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。在某些优选的实施方案中，所述抗原性片段具有选自下列的氨基酸序列：SEQ ID NO: 3-37。

在一个特别优选的实施方案中，所述刺激物包含分别具有如 SEQ ID NO: 3-37 所示

的氨基酸序列的抗原性片段。

在某些优选的实施方案中，所述第一试剂为能够检测所述标志物的 mRNA 水平的试剂。这类试剂是本领域公知的，包括但不限于特异性结合目标序列的核酸探针、扩增目标序列的引物、非特异性荧光染料（例如，SYBR Green I）或其组合。在某些实施方式中，所述核酸探针可以为单标记的核酸探针，例如放射性核素（如 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 等）标记探针、生物素标记探针、辣根过氧化物酶标记探针、地高辛标记探针或荧光基团（如 FITC、FAM、TET、HEX、TAMRA、Cy3、Cy5 等）标记探针；所述核酸探针也可以为双标记的核酸探针，例如 Taqman 探针、分子信标、置换探针、蝎子引物探针、QUAL 探针、FRET 探针等。在某些实施方式中，所述第一试剂包括 Taqman 探针。在某些实施方式中，所述 OAS2 的 cDNA 具有如 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。在某些实施方式中，所述 USP18 的 cDNA 具有如 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

在某些优选的实施方案中，所述第一试剂为能够检测所述标志物的蛋白水平的试剂。这类试剂是本领域熟知的，包括但不限于能够和 OAS2 或 USP18 蛋白特异性结合的抗体、靶向多肽或核酸适体。在某些实施方式中，这类试剂带有可检测的标记，例如酶（如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等）、放射性核素（如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 等）、荧光染料（如 FITC、TRITC、PE、Texas Red、量子点、Cy7、Alexa 750 等）、吖啶酯类化合物、磁珠（例如，Dynabeads[®]）、胶体金或有色玻璃或塑料（例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶，等）珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素（例如，链霉亲和素）的生物素。

在某些优选的实施方案中，所述第一试剂通过免疫学检测来测定所述样品中 OAS2 或 USP18 的蛋白水平。在某些优选的实施方案中，所述免疫学检测选自 ELISA 检测、Elispot 检测、Western 印迹或表面等离子共振法。在某些实施方式中，所述第一试剂包括抗 OAS2 或 USP18 蛋白的抗体或其抗原结合片段。

在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒包含能够检测 OAS2 表达水平的第一试剂，任选地还包括 IFN α 和/或刺激物。

在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒包含能够检测 USP18 表达水平的第一试剂和 IFN α ，任选地还包括刺激物。

在某些优选的实施方案中，本发明的试剂盒还包含用于预处理含有 PBMC 的样品的第二试剂，其中所述第二试剂包括选自下列的一种或多种试剂：用于稀释样品的稀释剂（例如，磷酸盐缓冲液或生理盐水）；用于阻止血液凝固的抗凝剂（例如，肝素）；用于维持

PBMC 活性的试剂(例如, 培养基或培养液); 和, 用于分离 PBMC 的试剂(例如, 淋巴细胞分离液, 例如聚蔗糖-泛影葡胺溶液)。在某些优选的实施方案中, 所述第二试剂包括用于维持 PBMC 活性的试剂(例如, 培养基或培养液), 和/或用于分离 PBMC 的试剂(例如, 淋巴细胞分离液, 例如聚蔗糖-泛影葡胺溶液)。

在某些优选的实施方案中, 本发明的试剂盒还包含采血装置(例如无热原真空采血管)和/或 PBMC 分离装置(例如 PBMC 细胞分离管)。

在某些优选的实施方案中, 本发明的试剂盒还包含能够检测内参基因表达水平的试剂, 所述内参基因在各组织和细胞中的表达相对恒定, 并在处理因素作用的条件下不会发生表达改变, 例如管家基因; 通常, 所述管家基因编码对维持细胞基本生命活动所必需的蛋白质, 其包括但不限于 β -actin、GAPDH、18S rRNA、 β 2-MG、UBC 或 α -tubulin。在某些优选的实施方案中, 所述能够检测内参基因表达水平的试剂为能够检测所述内参基因的 mRNA 水平的试剂。在某些优选的实施方案中, 所述能够检测内参基因表达水平的试剂为能够检测所述内参基因的蛋白水平的试剂。

在另一个方面, 本发明涉及能够检测标志物表达水平的试剂在制备试剂盒中的用途, 所述试剂盒用于预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答; 其中, 所述标志物选自 OAS2 或 USP18。

在某些优选的实施方案中, 所述试剂盒还包括 IFN α 和/或刺激物, 所述刺激物选自 HBV 抗原、HBV 抗原的抗原性片段或其任何组合。

在某些优选的实施方案中, 所述 HBV 抗原为 HBcAg。在某些优选的实施方案中, 所述 HBcAg 具有如 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。在某些优选的实施方案中, 所述抗原性片段具有选自下列的氨基酸序列: SEQ ID NO: 3-37。

在一个特别优选的实施方案中, 所述刺激物包含分别具有如 SEQ ID NO: 3-37 所示的氨基酸序列的抗原性片段。

在某些优选的实施方案中, 所述能够检测标志物表达水平的试剂为能够检测所述标志物的 mRNA 水平的试剂。这类试剂是本领域公知的, 包括但不限于特异性结合目标序列的核酸探针、扩增目标序列的引物、非特异性荧光染料(例如, SYBR Green I)或其组合。在某些实施方式中, 所述核酸探针可以为单标记的核酸探针, 例如放射性核素(如 ^{32}P 、 ^3H 、 ^{35}S 等)标记探针、生物素标记探针、辣根过氧化物酶标记探针、地高辛标记探

针或荧光基团（如 FITC、FAM、TET、HEX、TAMRA、Cy3、Cy5 等）标记探针；所述核酸探针也可以为双标记的核酸探针，例如 Taqman 探针、分子信标、置换探针、蝎子引物探针、QUAL 探针、FRET 探针等。在某些实施方式中，所述能够检测标志物表达水平的试剂包括 Taqman 探针。在某些实施方式中，所述 OAS2 的 cDNA 具有如 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。在某些实施方式中，所述 USP18 的 cDNA 具有如 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

可以采用本领域已知的 mRNA 检测方法测定所述标志物的 mRNA 水平，例如荧光定量 PCR，Northern 印迹法，原位杂交法，或包括 mRNA 扩增（例如反转录 PCR）和所述 mRNA 扩增产物的定量（例如电泳和染色）的方法。在某些优选的实施方案中，所述能够检测标志物表达水平的试剂通过 PCR 定量测定所述标志物的 mRNA 水平。在一个具体的实施方式中，所述能够检测标志物表达水平的试剂通过荧光定量 PCR 测定所述标志物的 mRNA 水平。

在某些优选的实施方案中，所述能够检测标志物表达水平的试剂为能够检测所述标志物的蛋白水平的试剂。这类试剂是本领域熟知的，包括但不限于能够和 OAS2 或 USP18 蛋白特异性结合的抗体、靶向多肽或核酸适体。在某些实施方式中，这类试剂带有可检测的标记，例如酶（如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等）、放射性核素（如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{32}P 等）、荧光染料（如 FITC、TRITC、PE、Texas Red、量子点、Cy7、Alexa 750 等）、吡啶酯类化合物、磁珠（例如，Dynabeads[®]）、胶体金或有色玻璃或塑料（例如，聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶，等）珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素（例如，链霉亲和素）的生物素。

在某些优选的实施方案中，所述能够检测标志物表达水平的试剂通过免疫学检测来测定所述样品中 OAS2 或 USP18 的蛋白水平。在某些优选的实施方案中，所述免疫学检测选自 ELISA 检测、Elispot 检测、Western 印迹或表面等离子共振法。在某些实施方式中，所述能够检测标志物表达水平的试剂包括抗 OAS2 或 USP18 蛋白的抗体或其抗原结合片段。

在某些优选的实施方案中，所述试剂盒还包含能够检测内参基因表达水平的试剂，所述内参基因在各组织和细胞中的表达相对恒定，并在处理因素作用的条件下不会发生表达改变，例如管家基因；通常，所述管家基因编码对维持细胞基本生命活动所必需的蛋白质，其包括但不限于 β -actin、GAPDH、18S rRNA、 β 2-MG、UBC 或 α -tubulin。在某些优选的实施方案中，所述能够检测内参基因表达水平的试剂为能够检测所述内参基

因的 mRNA 水平的试剂。在某些优选的实施方案中，所述能够检测内参基因表达水平的试剂为能够检测所述内参基因的蛋白水平的试剂。

在某些优选的实施方案中，所述试剂盒还包含一种或多种选自 1) -6) 的试剂或装置：

- 1) 用于稀释样品的稀释剂，例如磷酸盐缓冲液或生理盐水；
- 2) 用于阻止血液凝固的抗凝剂，例如肝素；
- 3) 用于维持 PBMC 活性的试剂，例如培养基或培养液；
- 4) 用于分离 PBMC 的试剂，例如淋巴细胞分离液，例如聚蔗糖-泛影葡胺溶液；
- 5) 采血装置，例如无热原真空采血管；和
- 6) PBMC 分离装置，例如 PBMC 细胞分离管。

在某些优选的实施方案中，所述试剂盒包括用于维持 PBMC 活性的试剂(例如，培养基或培养液)，和/或用于分离 PBMC 的试剂(例如，淋巴细胞分离液，例如聚蔗糖-泛影葡胺溶液)。

在某些优选的实施方案中，所述试剂盒通过包括下述步骤的方法来预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答：

(1) 使用能够检测标志物表达水平的试剂测定来自所述受试者的样品中所述标志物的表达水平，其中所述标志物为 OAS2；和

(2) 将该表达水平与参考值进行比较，或对该表达水平进行统计学分析以获得统计分析值，并将该统计分析值与参考值进行比较，并判断所述受试者是否会对 IFN α 治疗产生应答；

其中，所述样品包含外周血单个核细胞 (PBMC)，例如全血 (例如抗凝全血)、外周血单个核细胞 (PBMC)、或外周血白膜层。

在某些优选的实施方案中，当所述表达水平大于所述参考值时，或当所述表达水平的统计分析值大于所述参考值时，表明所述受试者会对 IFN α 治疗产生应答，适宜接受 IFN α 治疗；当所述表达水平不大于所述参考值时，或当所述表达水平的统计分析值不大于所述参考值时，表明所述受试者不会对 IFN α 治疗产生应答，不适宜接受 IFN α 治疗。

在某些优选的实施方案中，在步骤 (2) 中，使用 Logistic 回归模型对所述表达水平进行统计分析。

在某些优选的实施方案中，为了消除样品与样品之间的待测标志物起始值的差异，以使样品之间具有可比性，通常可以对不同样品中待测标志物的表达水平值进行归一化

处理，例如将样品中待测标志物的表达水平值与内参基因的表达水平值进行比较。因此，在步骤（1）中，所述标志物的表达水平为归一化表达水平。所述归一化表达水平可通过以下示例性方法获得：使用能够检测内参基因表达水平的试剂测定来自所述受试者的样品中所述内参基因的表达水平，并将所述标志物的表达水平与所述内参基因的表达水平进行比较，以获得所述标志物的归一化表达水平。在一个具体的实施方式中，在步骤（1）中，所述标志物的表达水平为归一化 mRNA 水平，其可通过以下示例性方法获得：使用比较 Ct 法将待测样品中所述标志物的 mRNA 水平与所述内参基因的 mRNA 水平进行比较，获得 $2^{-\Delta Ct}$ 值（ $\Delta Ct = Ct_{\text{待测标志物}} - Ct_{\text{内参基因}}$ ），该值即为所述标志物的归一化 mRNA 水平，也即所述标志物的表达量相比于内参基因的表达量的变化倍数。

在某些优选的实施方案中，在步骤（1）之前，所述方法还包括下列步骤中的一项或多项：（a）使用采血装置从所述受试者获得样品；（b）使用抗凝剂处理采血装置或来自所述受试者的样品；（c）使用用于维持 PBMC 活性的试剂处理来自所述受试者的样品；（d）使用稀释剂稀释来自所述受试者的样品；和（e）使用用于分离 PBMC 的试剂或 PBMC 分离装置从来自所述受试者的样品中分离获得 PBMC。

在某些优选的实施方案中，所述试剂盒通过包括下述步骤的方法来预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答：

（1）使用 IFN α 刺激来自所述受试者的至少一份样品作为待测样品，并将未经 IFN α 刺激的样品作为对照样品；或，使用 IFN α 和刺激物共同刺激来自所述受试者的至少一份样品作为待测样品，并将经所述刺激物刺激但未经 IFN α 刺激的样品作为对照样品；其中，所述刺激物选自 HBV 抗原、HBV 抗原的抗原性片段或其任何组合；

（2）使用能够检测标志物表达水平的试剂测定步骤（1）中各个样品中所述标志物的表达水平，并获得所述待测样品中该标志物的表达水平相比于所述对照样品中该标志物的表达水平的变化倍数，将该变化倍数作为所述待测样品中所述标志物的相对表达水平，其中所述标志物选自 OAS2 或 USP18；和

（3）将该相对表达水平与参考值进行比较，或对该相对表达水平进行统计学分析以获得统计分析值，并将该统计分析值与参考值进行比较，并判断所述受试者是否会对 IFN α 治疗产生应答；

其中，所述样品包含外周血单个核细胞（PBMC），例如全血（例如抗凝全血）、外周血单个核细胞（PBMC）、或外周血白膜层。

在某些优选的实施方案中，当所述相对表达水平小于所述参考值时，或当所述相对表达水平的统计分析值小于所述参考值时，表明所述受试者会对 IFN α 治疗产生应答，适宜接受 IFN α 治疗；当所述相对表达水平不小于所述参考值时，或当所述相对表达水平的统计分析值不小于所述参考值时，表明所述受试者不会对 IFN α 治疗产生应答，不适宜接受 IFN α 治疗。

在某些优选的实施方案中，在步骤（2）中，通过比较 Ct 法获得所述待测样品中该标志物的 mRNA 水平相比于所述对照样品中该标志物的 mRNA 水平的变化倍数，即所述待测样品中所述标志物的 mRNA 相对表达水平。

在某些优选的实施方案中，在步骤（3）中，使用 Logistic 回归模型对所述相对表达水平进行统计分析。

在某些优选的实施方案中，为了消除样品与样品之间的待测标志物起始值的差异，以使样品之间具有可比性，通常可以对不同样品中待测标志物的表达水平值进行归一化处理，例如将样品中待测标志物的表达水平值与内参基因的表达水平值进行比较。因此，在步骤（2）中，所述标志物的表达水平为归一化表达水平。所述归一化表达水平可通过以下示例性方法获得：使用能够检测内参基因表达水平的试剂测定来自所述受试者的样品中所述内参基因的表达水平，并将所述标志物的表达水平与所述内参基因的表达水平进行比较，以获得所述标志物的归一化表达水平。在一个具体的实施方式中，在步骤（2）中，所述标志物的表达水平为归一化 mRNA 水平，其可通过以下示例性方法获得：使用比较 Ct 法将待测样品中所述标志物的 mRNA 水平与所述内参基因的 mRNA 水平进行比较，获得所述标志物的归一化 mRNA 水平。进一步，通过比较 Ct 法获得所述待测样品中该标志物的均一化 mRNA 水平相比于所述对照样品中该标志物的均一化 mRNA 水平的变化倍数，即所述待测样品中所述标志物的 mRNA 相对表达水平。

在某些优选的实施方案中，在步骤（1）之前，所述方法还包括下列步骤中的一项或多项：（a）使用采血装置从所述受试者获得样品；（b）使用抗凝剂处理采血装置或来自所述受试者的样品；（c）使用用于维持 PBMC 活性的试剂处理来自所述受试者的样品；（d）使用稀释剂稀释来自所述受试者的样品；和（e）使用用于分离 PBMC 的试剂或 PBMC 分离装置从来自所述受试者的样品中分离获得 PBMC。

在另一个方面，本发明提供了用于预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果

或所述受试者对 IFN α 治疗的应答的方法，或获得诊断分析的结果的方法，其中所述诊断分析用于预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答，其包括下述步骤：

(1) 提供来自所述受试者的样品；

(2) 测定所述样品中标志物的表达水平，其中所述标志物为 OAS2；和

(3) 将该表达水平与参考值进行比较，或对该表达水平进行统计学分析以获得统计分析值，并将该统计分析值与参考值进行比较，并判断所述受试者是否会对 IFN α 治疗产生应答；

其中，所述样品包含外周血单个核细胞 (PBMC)，例如全血 (例如抗凝全血)、外周血单个核细胞 (PBMC)、或外周血白膜层。

在某些优选的实施方式中，在步骤(3)之后，所述方法还包括给所述受试者施用 IFN α 以治疗慢性乙肝的步骤，其中所述受试者被判断为会对 IFN α 治疗产生应答。

在某些优选的实施方案中，当所述表达水平大于所述参考值时，或当所述表达水平的统计分析值大于所述参考值时，表明所述受试者会对 IFN α 治疗产生应答，适宜接受 IFN α 治疗；当所述表达水平不大于所述参考值时，或当所述表达水平的统计分析值不大于所述参考值时，表明所述受试者不会对 IFN α 治疗产生应答，不适宜接受 IFN α 治疗。

在某些优选的实施方案中，在步骤(2)中，测定所述标志物的 mRNA 水平或蛋白水平。

在某些优选的实施方案中，在步骤(2)中，测定所述标志物的 mRNA 水平。可以采用本领域已知的 mRNA 检测方法测定所述标志物的 mRNA 水平，例如荧光定量 PCR，Northern 印迹法，原位杂交法，或包括 mRNA 扩增 (例如反转录 PCR) 和所述 mRNA 扩增产物的定量 (例如电泳和染色) 的方法。在某些优选的实施方案中，通过 PCR 定量测定所述标志物的 mRNA 水平。在一个具体的实施方式中，通过荧光定量 PCR 测定所述标志物的 mRNA 水平。在某些实施方式中，所述 OAS2 的 cDNA 具有如 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。在某些实施方式中，所述 USP18 的 cDNA 具有如 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

在某些优选的实施方案中，在步骤(2)中，测定所述标志物的蛋白水平。在某些优选的实施方案中，在步骤(2)中，通过免疫学检测来测定所述标志物的蛋白水平。进一步，在某些优选的实施方案中，所述免疫学检测选自 ELISA 检测、Elispot 检测、Western 印迹或表面等离子共振法。在某些实施方式中，在步骤(2)中，使用抗 OAS2 的抗体或

其抗原结合片段来检测 OAS2 的蛋白水平。

在某些优选的实施方案中，在步骤（3）中，使用 Logistic 回归模型对所述表达水平进行统计分析。

在某些优选的实施方案中，为了消除样品与样品之间的待测标志物起始值的差异，以使样品之间具有可比性，通常可以对不同样品中待测标志物的表达水平值进行归一化处理，例如将样品中待测标志物的表达水平值与内参基因的表达水平值进行比较。因此，在步骤（2）中，所述标志物的表达水平为归一化表达水平。所述归一化表达水平可通过以下示例性方法获得：使用能够检测内参基因表达水平的试剂测定来自所述受试者的样品中所述内参基因的表达水平，并将所述标志物的表达水平与所述内参基因的表达水平进行比较，以获得所述标志物的归一化表达水平。在一个具体的实施方式中，在步骤（2）中，所述标志物的表达水平为归一化 mRNA 水平，其可通过以下示例性方法获得：使用比较 Ct 法将待测样品中所述标志物的 mRNA 水平与所述内参基因的 mRNA 水平进行比较，获得 $2^{-\Delta Ct}$ 值（ $\Delta Ct = Ct_{\text{待测标志物}} - Ct_{\text{内参基因}}$ ），该值即为所述标志物的归一化 mRNA 水平，也即所述标志物的表达量相比于内参基因的表达量的变化倍数。

在某些优选的实施方案中，在步骤（1）之前，还包括下列步骤中的一项或多项：（a）从所述受试者获得样品；（b）向来自所述受试者的样品中加入抗凝剂，例如肝素；（c）从来自所述受试者的样品中获取 PBMC 或含有 PBMC 的血液成分（例如，外周血白膜层）；（d）向来自所述受试者的样品中加入培养液或培养基；和，（e）稀释来自所述受试者的样品。

在另一个方面，本发明提供了用于预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答的方法，或获得诊断分析的结果的方法，其中所述诊断分析用于预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答，其包括下述步骤：

（1）提供来自所述受试者的至少两份样品；

（2）使用 IFN α 刺激至少一份样品作为待测样品，并将未经 IFN α 刺激的样品作为对照样品；或，使用 IFN α 和刺激物共同刺激来自所述受试者的至少一份样品作为待测样品，并将经所述刺激物刺激但未经 IFN α 刺激的样品作为对照样品；其中，所述刺激物选自 HBV 抗原、HBV 抗原的抗原性片段或其任何组合；

(3) 测定步骤(2)中各个样品中标志物的表达水平,并获得所述待测样品中该标志物的表达水平相比于所述对照样品中该标志物的表达水平的变化倍数,将该变化倍数作为所述待测样品中所述标志物的相对表达水平,其中所述标志物选自 OAS2 或 USP18;和

(4) 将该相对表达水平与参考值进行比较,或对该相对表达水平进行统计学分析以获得统计分析值,并将该统计分析值与参考值进行比较,并判断所述受试者是否会对 IFN α 治疗产生应答;

其中,所述样品包含外周血单个核细胞(PBMC),例如全血(例如抗凝全血)、外周血单个核细胞(PBMC)、或外周血白膜层。

在某些优选的实施方式中,在步骤(4)之后,所述方法还包括给所述受试者施用 IFN α 以治疗慢性乙肝的步骤,其中所述受试者被判断为会对 IFN α 治疗产生应答。

在某些优选的实施方案中,当所述相对表达水平小于所述参考值时,或当所述相对表达水平的统计分析值小于所述参考值时,表明所述受试者会对 IFN α 治疗产生应答,适宜接受 IFN α 治疗;当所述相对表达水平不小于所述参考值时,或当所述相对表达水平的统计分析值不小于所述参考值时,表明所述受试者不会对 IFN α 治疗产生应答,不适宜接受 IFN α 治疗。

在某些优选的实施方案中,在步骤(2)中,所述 HBV 抗原为 HBVcAg。在某些优选的实施方案中,所述 HBVcAg 具有如 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列。在某些优选的实施方案中,所述抗原性片段具有选自下列的氨基酸序列: SEQ ID NO: 3-37。在一个特别优选的实施方案中,所述刺激物包含分别具有如 SEQ ID NO: 3-37 所示的氨基酸序列的抗原性片段。

在某些优选的实施方案中,在步骤(3)中,测定所述标志物的 mRNA 水平。可以采用本领域已知的 mRNA 检测方法测定所述标志物的 mRNA 水平,例如荧光定量 PCR, Northern 印迹法,原位杂交法,或包括 mRNA 扩增(例如反转录 PCR)和所述 mRNA 扩增产物的定量(例如电泳和染色)的方法。在某些优选的实施方案中,通过 PCR 定量测定所述标志物的 mRNA 水平。在一个具体的实施方式中,通过荧光定量 PCR 测定所述标志物的 mRNA 水平。在某些实施方式中,所述 OAS2 的 cDNA 具有如 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列。在某些实施方式中,所述 USP18 的 cDNA 具有如 SEQ ID NO: 2 所示的核苷酸序列。

在某些优选的实施方案中,在步骤(3)中,测定所述标志物的蛋白水平。在某些优

选的实施方案中，在步骤（3）中，通过免疫学检测来测定所述标志物的蛋白水平。进一步，在某些优选的实施方案中，所述免疫学检测选自 ELISA 检测、Elispot 检测、Western 印迹或表面等离子共振法。在某些实施方式中，在步骤（3）中，使用抗 OAS2 或 USP18 蛋白的抗体或其抗原结合片段来检测所述标志物的蛋白水平。

在某些优选的实施方案中，在步骤（3）中，通过比较 Ct 法获得所述待测样品中该标志物的 mRNA 水平相比于所述对照样品中该标志物的 mRNA 水平的变化倍数，即所述待测样品中所述标志物的 mRNA 相对表达水平。

在某些优选的实施方案中，在步骤（4）中，使用 Logistic 回归模型对所述相对表达水平进行统计分析。

在某些优选的实施方案中，为了消除样品与样品之间的待测标志物起始值的差异，以使样品之间具有可比性，通常可以对不同样品中待测标志物的表达水平值进行归一化处理，例如将样品中待测标志物的表达水平值与内参基因的表达水平值进行比较。因此，在步骤（3）中，所述标志物的表达水平为归一化表达水平。所述归一化表达水平可通过以下示例性方法获得：使用能够检测内参基因表达水平的试剂测定来自所述受试者的样品中所述内参基因的表达水平，并将所述标志物的表达水平与所述内参基因的表达水平进行比较，以获得所述标志物的归一化表达水平。在一个具体的实施方式中，在步骤（3）中，所述标志物的表达水平为归一化 mRNA 水平，其可通过以下示例性方法获得：使用比较 Ct 法将待测样品中所述标志物的 mRNA 水平与所述内参基因的 mRNA 水平进行比较，获得所述标志物的归一化 mRNA 水平。进一步，通过比较 Ct 法获得所述待测样品中该标志物的均一化 mRNA 水平相比于所述对照样品中该标志物的均一化 mRNA 水平的变化倍数，即所述待测样品中所述标志物的 mRNA 相对表达水平。

在某些优选的实施方案中，在步骤（1）之前，还包括下列步骤中的一项或多项：（a）从所述受试者获得样品；（b）向来自所述受试者的样品中加入抗凝剂，例如肝素；（c）从来自所述受试者的样品中获取 PBMC 或含有 PBMC 的血液成分（例如，外周血白膜层）；（d）向来自所述受试者的样品中加入培养液或培养基；和，（e）稀释来自所述受试者的样品。

本发明还包含以下示例性实施方案：

1. 用于体外诱导干扰素诱导基因（Interferon-stimulated genes, ISGs）的刺激

物，其包含 HBV 核心抗原的全长或部分片段的组合和/或 IFN α 。

2. 用于预测慢性乙肝患者 α 干扰素治疗效果的标志物，其中所述标志物为干扰素诱导基因 (Interferon-stimulated genes, ISGs)。

3. 项目 2 的标志物，其中所述干扰素诱导基因选自 OAS2 和 USP18。

4. 筛选用于预测慢性乙肝患者 α 干扰素治疗效果的标志物的方法，所述方法包括下述步骤：

1) 收集慢性乙肝患者用药前全血标本，分离 PBMC；

2) 用 HBV 核心抗原多肽段或 IFN α 或 HBV 核心抗原多肽段与 IFN α 的组合诱导 PBMC 样品；

3) 收集诱导后的 PBMC 样品，提取 RNA，反转录后检测 ISGs mRNA 水平；

4) 收集标本临床 IFN α 治疗应答结果，筛选 ISGs；

其中，比较 IFN α 治疗应答组和无应答组相同诱导条件下不同 ISGs mRNA 水平，IFN α 治疗应答组和无应答组 ISGs mRNA 水平高低的不同可以作为治疗效果的依据。

5. 项目 4 的方法，其中所述 HBV 核心抗原多肽段是 HBV 核心抗原的第 1-183 位氨基酸的多肽段。

6. 用于预测慢性乙肝患者 α 干扰素治疗效果的试剂盒，其包含 HBV 核心抗原多肽段和 IFN α 诱导物，和检测标志物 OAS2 和 USP18 水平的试剂。

7. 项目 6 的试剂盒，其中所述 HBV 核心抗原多肽段是 HBV 核心抗原的第 1-183 位氨基酸的多肽段。

8. 检测标志物 OAS2 和/或 USP18 水平的试剂在制备用于预测慢性乙肝患者 α 干扰素治疗效果的诊断剂中的用途。

9. 检测标志物 OAS2 和/或 USP18 水平的试剂在制备用于预测慢性乙肝患者 α 干扰素治疗效果的试剂盒中的用途。

10. 标志物 OAS2 和/或 USP18 用于预测慢性乙肝患者 α 干扰素治疗效果的用途。

11. 项目 8-10 任一项中的用途，其中所述标志物 OAS2 和/或 USP18 的检测包括定量检测标志物 OAS2 和/或 USP18 的 mRNA 水平。

12. 项目 8-10 任一项中的用途，其中通过荧光 PCR 定量检测标志物 OAS2 和/或 USP18 的 mRNA 水平。

13. 项目 8-10 任一项中的用途，其中用于检测标志物 OAS2 和/或 USP18 的 mRNA 水

平的引物和探针的序列为：

	Forward	5' -CAGACCCTGACAATCCACCT-3'
USP18	Reverse	5' -AGCTCATACTGCCCTCCAGA-3'
	Taqman probe	5' -FAM-TCTGCCACTCCCTGTACTTCCCC-BQH1-3'
	Forward	5' -TCAGCGAGGCCAGTAATCTT-3'
OAS2	Reverse	5' -GCAGAACATTCCAAGATGGT-3'
	Taqman probe	5' -FAM-AAAATATGCTGGCAATGGCTGAA-BQH1-3'

发明的有益效果

本发明通过大量实验和反复摸索发现了 OAS2 和/或 USP18 的表达水平在对 IFN α 治疗应答和对 IFN α 治疗无应答的 CHB 患者这两个群体中，存在显著差异，由此建立了一种简单、方便、快速且具有高准确性和特异性的预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答的预测方法。

与现有技术相比，本发明的技术方案具有以下有益效果：

(1) 首次发现慢性乙肝患者 PBMC 未经或经体外刺激后的 OAS2 表达水平能够用于预测 CHB 患者 IFN α 治疗的结果；

(2) 首次发现慢性乙肝患者 PBMC 经体外刺激后 USP18 的表达水平能够用于预测 CHB 患者 IFN α 治疗的结果；

(3) 所涉及的操作简单、方便：例如，通过采集全血、分离 PBMC，将其分装至细胞培养板并添加 IFN α 后，然后置于恒温培养箱中培养；培养一定时间后进行 mRNA 或蛋白水平的检测；

(4) 对实验条件、人员的技术能力、设备和环境的要求不高；

(5) 对 IFN α 治疗应答结果预测准确率高；

(6) 成本不高，易于推广，使用范围广。

下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述，但是本领域技术人员将理解，下列附图和实施例仅用于说明本发明，而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述，本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

附图说明

图 1 显示了在不同处理条件下，CHB 患者的 PBMC 的 OAS2 mRNA 水平在对 IFN α 治疗应答组 (Rs) 和无应答组 (NRs) 之间存在显著差异。其中，图 1a 显示 PBMC 不经体外诱导，应答组 OAS2 的 mRNA 水平显著高于无应答组。图 1b 显示 PBMC 经 IFN α 体外诱导后，应答组 OAS2 的 mRNA 相对表达水平显著低于无应答组。(注：*表示 $p < 0.05$ ，****表示 $p < 0.0005$)

图 2 显示了在不同处理条件下，CHB 患者的 PBMC 的 USP18 mRNA 水平在对 IFN α 治疗应答组 (Rs) 和无应答组 (NRs) 之间存在显著差异。其中，图 2a 显示 PBMC 经 IFN α 体外诱导后，应答组 USP18 的 mRNA 相对表达水平显著低于无应答组；；图 2b 显示 PBMC 经 IFN α 和 HBcAg 多肽库共同诱导后，应答组 USP18 的 mRNA 相对表达水平显著低于无应答组。(注：***表示 $p < 0.001$ ，****表示 $p < 0.0005$)

图 3 显示了 OAS2 N 检测法和 OAS2 (IFN α +N-N)检测法的 ROC 曲线。结果显示，OAS2 N 检测法和 OAS2 (IFN α +N-N)检测法对于预测 CHB 患者对 IFN α 治疗的应答均具有良好的灵敏度和特异性。

图 4 显示了 OAS2 (IFN α +N-N)检测法、USP18 (IFN α +N-N)检测法及两者联合检测的 ROC 曲线。结果显示，OAS2 (IFN α +N-N)检测法、USP18 (IFN α +N-N)检测法及两者的联合检测对于预测 CHB 患者对 IFN α 治疗的应答具有很好的灵敏度和特异性。

序列信息

本发明涉及的序列信息提供于下面的表 1 中。

表 1：序列信息

序列号 (SEQ ID NO:)	描述
1	OAS2 cDNA 的核苷酸序列
2	USP18 cDNA 的核苷酸序列
3~37	HBcAg 多肽库肽段序列 (P1-P35)
38	HBcAg 的氨基酸序列
39~74	引物
75~92	探针

OAS2 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 1)

ATGGGAAATGGGGAGTCCCAGCTGTCTCGGTGCCTGCTCAGAAGCTGGGTTGGTTTATCCAGGAA
TACCTGAAGCCCTACGAAGAATGTCAGACACTGATCGACGAGATGGTGAACACCATCTGTGACGTC

CTGCAGGAACCCGAACAGTTCCCCCTGGTGCAGGGAGTGGCCATAGGTGGCTCCTATGGACGGAAA
ACAGTCTTAAGAGGCAACTCCGATGGTACCCCTTGTCTCTTCTTCAGTGACTTAAAACAATTCAG
GATCAGAAGAGAAGCCAACGTGACATCCTCGATAAAAACCTGGGGATAAGCTGAAGTTCTGTCTGTTC
ACGAAGTGGTTGAAAAACAATTTTCGAGATCCAGAAGTCCCTTGATGGGTTCACCATCCAGGTGTTC
ACAAAAATCAGAGAATCTCTTTTCGAGGTGCTGGCCGCCCTTCAACGCTCTGAGCTTAAATGATAAT
CCCAGCCCCTGGATCTATCGAGAGCTCAAAAGATCCTTGGATAAGACAAAATGCCAGTCCCTGGTGAG
TTTGCAGTCTGCTTCACTGAACTCCAGCAGAAGTTTTTTGACAACCGTCCCTGGAAAACATAAGGAT
TTGATCCTCTTGATAAAGCACTGGCATCAACAGTGCCAGAAAAAAATCAAGGATTTACCCCTCGCTG
TCTCOGTATGCCCTGGAGCTGCTTACGGTGTATGCCTGGGAACAGGGGTGCAGAAAAGACAACCTTT
GACATTGCTGAAGGCGTCAGAACCGTTCTGGAGCTGATCAAAATGCCAGGAGAAGCTGTGTATCTAT
TGGATGGTCAACTACAACCTTTGAAGATGAGACCATCAGGAACATCCTGCTGCACCAGCTCCAATCA
GCGAGGCCAGTAATCTTGGATCCAGTTGACCCAAACCAATAATGTGAGTGGAGATAAAATATGCTGG
CAATGGCTGAAAAAGAAGCTCAAACTGGTTGACTTCTCCCAACCTGGATAATGAGTTACCTGCA
CCATCTTGGAAATGTTCTGCCTGCACCACTCTTACGACCCCAAGGCCACCTTCTGGATAAGTTCATC
AAGGAGTTTCTCCAGCCCAACAAATGCTTCTAGAGCAGATTGACAGTGCTGTTAACATCATCOGT
ACATTCCTTAAAGAAAACCTGCTTCCGACAATCAACAGCCAAGATCCAGATTGTCCGGGGAGGATCA
ACCGCCAAAGGCACAGCTCTGAAGACTGGCTCTGATGCCGATCTCGTCTGTGTTCCATAACTCACTT
AAAAGCTACACCTCCCAAAAAACGAGCGGCACAAAATCGTCAAGGAAATCCATGAACAGCTGAAA
GCCTTTTGGAGGGAGAAGGAGGAGGAGCTTGAAGTCAGCTTTGAGCCTCCCAAGTGAAGGCTCCC
AGGGTGTGAGCTTCTCTCTGAAATCCAAAGTCCCAACGAAAGTGTGAGCTTTGATGTGCTTCT
GCCTTTAATGCACTGGGTGAGCTGAGTTCTGGCTCCACACCCAGCCCGAGGTTTATGCAGGGCTC
ATTGATCTGTATAAATCCTCGAACCTCCCGGAGGAGAGTTTTCTACCTGTTTACAGTCCCTGCAG
CGAACTTCATTCGCTCCCGGCCACCAAACTAAAGGATTTAATTCGCCTGGTGAAGCACTGGTAC
AAAGAGTGTGAAAGGAACTGAAGCCAAAGGGGTCTTTGCCCCAAAGTATGCCTTGGAGCTGCTC
ACCATCTATGCCTGGGAGCAGGGGAGTGGAGTGCCGATTTTGACACTGCAGAAGGTTTCCGACA
GTCCTGGAGCTGGTACACAATATCAGCAGCTCTGCATCTTCTGGAAGTCAATTACAACCTTTGAA
GATGAGACCGTGAGGAAGTTTTCTACTGAGCCAGTTGCAGAAAACAGGCCTGTGATCTTGGACCCA
GCCGAACCCACAGGTGACGTGGGTGGAGGGGACCGTTGGTGTGGCATCTTCTGGCAAAAGAAGCA
AAGGAATGGTTATCCTCTCCCTGCTTCAAGGATGGGACTGGAAACCCAATACCACCTTGGAAAGTG
CCGGTAAAAGTCATCTAA

USP18 cDNA 的核苷酸序列 (SEQ ID NO: 2)

ATGAGCAAGGCGTTTGGGCTCCTGAGGCAAAATCTGTGTCAGTCCATCCTGGCTGAGTCCCTCGCAGTCC
CCGGCAGATCTTGAAGAAAAGAAGGAAGAAGACAGCAACATGAAGAGAGAGCAGCCCAGAGAGCGT
CCCAGGGCCTGGGACTACCCCTCATGGCCTGGTTGGTTTACACAACATTTGGACAGACCTGCTGCCTT
AACTCCTTGATTACAGGTGTTTCGTAATGAATGTGGACTTCACCAGGATATTGAAGAGGATCACGGTG
CCCAGGGGAGCTGACCAGCAGAGGAGAAGCGTCCCTTCCAGATGCTTCTGCTGCTGGAGAAGATG
CAGGACAGCCGGCAGAAAGCAGTGCCGCCCTGGAGCTGGCCTACTGCCTGCAGAAGTGCAACGTG
CCCTTGTTTGTCCAACATGATGCTGCCAACTGTACCTCAAACTCTGGAACCTGATTAAGGACCAG

ATCACTGATGTGCACTTGGTGGAGAGACTGCAGGCCCTGTATACGATCCGGGTGAAGGACTCCTTG
ATTTGCGTTGACTGTGCCATGGAGAGTAGCAGAAAACAGCAGCATGCTCACCCCTCCCACCTTTCTCTT
TTTGATGTGGACTCAAAGCCCCTGAAGACACTGGAGGACGCCCTGCACTGCTTCTTCCAGCCCAGG
GAGTTATCAAGCAAAAAGCAAGTGCTTCTGTGAGAACTGTGGGAAGAAGACCCGTGGGAAACAGGTC
TTGAAGCTGACCCATTTGCCCCAGACCCTGACAAATCCACCTCATGCGATTCTCCATCAGGAATTCA
CAGACGAGAAAAGATCTGCCACTCCCTGTACTTCCCCCAGAGCTTGGATTTCCAGCCAGATCCTTCCA
ATGAAGCGAGAGTCTTGTGATGCTGAGGAGCAGTCTGGAGGGCAGTATGAGCTTTTTGCTGTGATT
GCGCACGTGGGAATGGCAGACTCCGGTCATTACTGTGTCTACATCCGGAATGCTGTGGATGGAAAA
TGGTTCTGCTTCAATGACTCCAATATTTGCTTGGTGTCCCTGGGAAGACATCCAGTGTACCTACGGA
AATCCTAACTACCACTGGCAGGAAACTGCATATCTTCTGGTTTACATGAAGATGGAGTGCTAA

HBcAg 多肽库肽段序列 (P1-P35) (SEQ ID NO: 3~37)

- P1: MDIDPYKEFGASVEL (SEQ ID NO: 3)
- P2: YKEFGASVELLSFLP (SEQ ID NO: 4)
- P3: ASVELLSFLPSDFFP (SEQ ID NO: 5)
- P4: LSFLPSDFFPSVRDL (SEQ ID NO: 6)
- P5: SDFFPSVRDLLDTAS (SEQ ID NO: 7)
- P6: SVRDLLDTASALYRE (SEQ ID NO: 8)
- P7: LDTASALYREALESP (SEQ ID NO: 9)
- P8: ALYREALESPHEHCSP (SEQ ID NO: 10)
- P9: ALESPEHCSPHHTAL (SEQ ID NO: 11)
- P10: EHCSPHHTALRQAIL (SEQ ID NO: 12)
- P11: HHTALRQAILCWGEL (SEQ ID NO: 13)
- P12: RQAILCWGELMNLAT (SEQ ID NO: 14)
- P13: CWGELMNLATWVGSN (SEQ ID NO: 15)
- P14: MNLATWVGSNLEDPA (SEQ ID NO: 16)
- P15: WVGSNLEDPASRELV (SEQ ID NO: 17)
- P16: LEDPASRELVVSYVN (SEQ ID NO: 18)
- P17: SRELVVSYVNVNMGL (SEQ ID NO: 19)
- P18: VSYVNVNMGLKIRQL (SEQ ID NO: 20)
- P19: VNMGLKIRQLLWFHI (SEQ ID NO: 21)
- P20: KIRQLLWFHISCLTF (SEQ ID NO: 22)
- P21: LWFHISCLTFGRETV (SEQ ID NO: 23)
- P22: SCLTFGRETVLEYLV (SEQ ID NO: 24)
- P23: GRETVLEYLVSFGVW (SEQ ID NO: 25)
- P24: LEYLVSFGVWIRTPP (SEQ ID NO: 26)
- P25: SFGVWIRTPPAYRPP (SEQ ID NO: 27)
- P26: IRTPPAYRPPNAPIL (SEQ ID NO: 28)

P27: AYRPPNAPILSTLPE (SEQ ID NO: 29)
 P28: NAPILSTLPETTVVR (SEQ ID NO: 30)
 P29: STLPETTVVRRRGRS (SEQ ID NO: 31)
 P30: TTVVRRRGRSPRRRT (SEQ ID NO: 32)
 P31: RRRGRSPRRRTSPRR (SEQ ID NO: 33)
 P32: PRRRTSPRRRRRSQS (SEQ ID NO: 34)
 P33: PSPRRRRRSQSPRRR (SEQ ID NO: 35)
 P34: RRSQSPRRRRRSQSRE (SEQ ID NO: 36)
 P35: QSPRRRRRSQSRESQC (SEQ ID NO: 37)

HBcAg 的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 38)

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFPPSVRGLLDTASALYREALSPEHCSPHHTALRQAILCWGELM
 TLATWVGVNLEDPASRDLVVSYVNTNMGLKFRQLLWFHISCLTFGRETVIEWLVSFGVWIRTPPAY
 RPPNAPILSTLPETTVVRRRGRSPRRRTSPRRRRRSQSPRRRRRSQSRESQC

引物 (5' -3') (SEQ ID NO: 39~74)

USP18-Forward: CAGACCCTGACAATCCACCT (SEQ ID NO: 39)
 USP18-Reverse: AGCTCATACTGCCCTCCAGA (SEQ ID NO: 40)
 OAS2-Forward: TCAGCGAGGCCAGTAATCTT (SEQ ID NO: 41)
 OAS2-Reverse: GCAGAACATTCCAAGATGGT (SEQ ID NO: 42)
 LGP1-Forward: GCAGGAAGACAGTGGAGAGC (SEQ ID NO: 43)
 LGP1-Reverse: GAGCCAGCACTTCTGGGTAG (SEQ ID NO: 44)
 LAP3-Forward: GGTGCCATGGATGTAGCTTT (SEQ ID NO: 45)
 LAP3-Reverse: AGAGAGGCATCCTCCAGACA (SEQ ID NO: 46)
 GIP3-Forward: CTCGCTGATGAGCTGGTCT (SEQ ID NO: 47)
 GIP3-Reverse: ATACTTGTGGGTGGCGTAGC (SEQ ID NO: 48)
 CEB1-Forward: GATTGCTGGAGGGAATCAAA (SEQ ID NO: 49)
 CEB1-Reverse: TTGGATTCCCTTTTTGTGC (SEQ ID NO: 50)
 ATF5-Forward: AGCCCCGTCTTGGATACT (SEQ ID NO: 51)
 ATF5-Reverse: CGAGAAGGTTGAGGTGGAGA (SEQ ID NO: 52)
 GIP2-Forward: CGCAGATCACCCAGAAGATC (SEQ ID NO: 53)
 GIP2-Reverse: GCCCTTGTTATTCCTCACCA (SEQ ID NO: 54)
 OAS3-Forward: GTCAAACCCAAGCCACAAGT (SEQ ID NO: 55)
 OAS3-Reverse: GGGCGAATGTTACAAAAGTT (SEQ ID NO: 56)
 RPLP2-Forward: GCTGTAGCCGTCTCTGCTG (SEQ ID NO: 57)
 RPLP2-Reverse: AAAAAGGCCAAATCCCATGT (SEQ ID NO: 58)
 STXBP5-Forward: GTTCATCTGATGGGCTTCGT (SEQ ID NO: 59)
 STXBP5-Reverse: TTTGTTGTGGTGGTTCTCCA (SEQ ID NO: 60)
 Viperin-Forward: CTTTGTCTGGGAAGCTCTTG (SEQ ID NO: 61)

Viperin-Reverse: CAGCTGCTGCTTTCTCCTCT (SEQ ID NO: 62)
 RPS28-Forward: CCGTGTGCAGCCTATCAAG (SEQ ID NO: 63)
 RPS28-Reverse: TTTACATTGCGGATGATGGA (SEQ ID NO: 64)
 PI3KAP1-Forward: CTGCAGAGAGCTTTCCATCC (SEQ ID NO: 65)
 PI3KAP1-Reverse: GTCTCTGGCTCATCGTCACA (SEQ ID NO: 66)
 MX1-Forward: GTGCATTGCAGAAGGTCAGA (SEQ ID NO: 67)
 MX1-Reverse: CTGGTGATAGGCCATCAGGT (SEQ ID NO: 68)
 DUSP1-Forward: CCAACCATTTTGAGGGTCAC (SEQ ID NO: 69)
 DUSP1-Reverse: ACCCTTCCTCCAGCATTCTT (SEQ ID NO: 70)
 ETEF1-Forward: AGCGGAAGGAGGAGAAAAAG (SEQ ID NO: 71)
 ETEF1-Reverse: GTACTCTTGGGCAGGTGAGC (SEQ ID NO: 72)
 β -actin-Forward: CAAAGACCTGTACGCCAACACA (SEQ ID NO: 73)
 β -actin-Reverse: GGAGTACTTGGCTCAGGAGG (SEQ ID NO: 74)
 探针 (5' -3') (SEQ ID NO: 75~92)
 USP18-probe: TCTGCCACTCCCTGTACTTCCCC (SEQ ID NO: 75)
 OAS2-probe: AAAATATGCTGGCAATGGCTGAA (SEQ ID NO: 76)
 LGP1-probe: CTTGGGGAGGCCTCTCTGCAG (SEQ ID NO: 77)
 LAP3-probe: AATTCATCCTGGCTCTGGAACAA (SEQ ID NO: 78)
 GIP3-probe: TAGTGGCCACGCTGCAGAGC (SEQ ID NO: 79)
 CEB1-probe: TCCTACTCTGAATGAAGGGACTGTAA (SEQ ID NO: 80)
 ATF5-probe: AACGAGGCCGGGCAGGAGGA (SEQ ID NO: 81)
 GIP2-probe: TCTGGCTGTCCACCCGAGCG (SEQ ID NO: 82)
 OAS3-probe: TCAACAGTGGCTGCCAAGGG (SEQ ID NO: 83)
 RPLP2-probe: TGCTGCTGGTTCTGCCCTG (SEQ ID NO: 84)
 STXBP5-probe: AACTCACCCTTAAACAGTCTCCAGG (SEQ ID NO: 85)
 Viperin-probe: TGGTCCCGCTGTTCTGCTGG (SEQ ID NO: 86)
 RPS28-probe: TTCTCAGGGACAGTGCACGCAG (SEQ ID NO: 87)
 PI3KAP1-probe: AGGCTGCTCTGCGGCGTGCG (SEQ ID NO: 88)
 MX1-probe: ATCCTGGGATTTTGGGGCTTTC (SEQ ID NO: 89)
 DUSP1-probe: AGCATCCCTGTGGAGGACAACC (SEQ ID NO: 90)
 ETEF1-probe: AGGAGGAGATGGATGAATGTGAGCA (SEQ ID NO: 91)
 β -actin-probe: CCGACAGGATGCAGAAGGAGATCAC (SEQ ID NO: 92)

具体实施方式

现参照下列意在举例说明本发明（而非限定本发明）的实施例来描述本发明。除非特别指明，否则基本上按照本领域内熟知的以及在各种参考文献中描述的常规方法进行

实施例中描述的实验和方法(例如, 分子生物学实验方法和免疫检测法)。参见, 例如, Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); 和 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), 其全部通过引用合并入本文。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市购获得的常规产品。本领域技术人员知晓, 实施例以举例方式描述本发明, 且不意欲限制本发明所要求保护的范 围。本文中提及的全部公开案和其他参考资料以其全文通过引用合并入本文。

实施例 1. 外周血 PBMC 分离和体外诱导培养

1.1 外周血 PBMC 分离

- (1) 将全血在 4000 rpm 条件下离心 10 min。
- (2) 将血清吸出, 加等量的 PBS 稀释余下的全血。
- (3) 准备 15 mL 的离心管, 加入与全血等量的淋巴细胞分离液 (Ficoll-page Tm PLUS, GE Helathcare Life Sciences)。
- (4) 将稀释后的全血沿管壁缓慢加在淋巴细胞分离液之上, 保持分层状态。
- (5) 将上述液体在 1000 g 条件下离心 22 min, 并将升速和降速的速率调到最小。
- (6) 小心吸取白色云雾状淋巴细胞层, 至另一离心管中, 加入 PBS 稀释后离心, 600 g×7 min, 弃上清。再加入 PBS 稀释, 离心 400 g×7 min, 弃上清。用 1 ml 的培养液重悬细胞。
- (7) 在 1.5ml 离心管中加入 10 μ l 已制备样品细胞悬液和 40 μ l 的 0.4%台盼蓝, 制备 1: 5 细胞稀释液。取 10 μ l 台盼蓝/细胞混合悬液加入血细胞计数板并进行活细胞计数, 其中每毫升细胞数量=细胞计数×稀释倍数×10⁴。

1.2 IFN α 和/或刺激物对 PBMC 的体外诱导培养

将上述 PBMC 细胞接种于 24 孔板内, 每孔加入 5×10^5 个细胞, 并添加 1ml 含 10%胎牛血清的 RPM1640 培养基。每份标本共设置四个孔, 其中第一孔不添加诱导物质(所述诱导物质包括 IFN α 和 HBcAg 多肽库)标记为 N, 第二孔添加 IFN α (安达芬, 安徽安科生物工程(集团)股份有限公司) (1×10^4 IU/mL), 第三孔添加含有 35 条 HBcAg 抗原性片段 (SEQ ID NO: 3-37) 的多肽库(由上海生物工程股份有限公司合成) (1 μ g/条/mL, 共 35 条), 第四孔添加上述 IFN α 和 HBcAg 多肽库。将培养板置于 37℃二氧化碳培养箱

中诱导培养 24h 后，收集细胞。

实施例 2. 荧光定量 PCR 法检测基因的 mRNA 水平

本发明对包括 USP18、OAS2、LGP1、LAP3、GIP3、CEB1、ATF5、GIP2、OAS3、RPLP2、STXBP5、Viperin、RPS28、PI3KAP1、MX1、DUSP1、ETEF1 等 17 种基因和内参 β -actin 建立了的荧光定量 PCR 检测体系。

2.1 PBMC 中 RNA 的提取

(1) 离心收集实施例 1 中所获得 PBMC 细胞，弃去上清；每孔添加 250 μ l RPMI1640 培养基和 750 μ l Tripure，并混合均匀；每 1ml 细胞中添加 200 μ l 氯仿，上下颠倒混匀，4 $^{\circ}$ C 静置 10min。

(2) 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 15 min。

(3) 经上述处理后，每管内样品共分为三层，吸取最上面一层（注意不要吸到蛋白层）转移到一个新的用 DEPC 处理过的 EP 管中，加等体积异丙醇，上下颠倒混匀，-20 $^{\circ}$ C 静置 15 min。

(4) 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 10min, 弃上清。

(5) 加入 1 mL 75%乙醇洗两遍，12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 5 min。

(6) 弃去乙醇，空气风干 5-10 min, 用 55-60 $^{\circ}$ C 预热好的 DEPC 水 35 μ L 溶解 RNA, 提取好的 RNA 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

2.2 RNA 反转录

采用分光光度计测定 RNA 样品的浓度和纯度。取 2 μ L RNA 样在 2 μ L RNase-free water 校准仪器中测定 A260 与 A280 吸光值，检测 A260 与 A280 比值从而评价 RNA 样品的纯度，经检测，RNA 纯度：A260/280 \geq 1.80。

反转录体系：

10 mM dNTP	1 μ L
5 \times AMV buffer	4 μ L
Random Primers	1 μ L
AMV 反转录酶	0.2 μ L
RNA	1 μ g
Total	20 μ L

通过上述反转录体系，在 42℃ 反转录 30 min。获得的 cDNA 即为荧光定量 PCR 检测体系中的模板，保存于 -20℃。

2.3 荧光定量 PCR 体系建立

(1) RT-PCR 体系：

2× Premix Ex Taq	10 μ L
Forward Primer	0.4 μ L
Reverse Primer	0.4 μ L
Probe	0.2 μ L
模板 (cDNA)	2 μ L
Total	20 μ L

扩增反应过程：

95℃ 3 min, 然后 95℃ 10 sec, 55℃ 45 sec, 共 39 个循环。

应用 primer 软件设计用于 RT-PCR 的检测引物及探针，并由英骏生物技术有限公司合成，具体序列见下表 2：

表 2. 用于荧光定量 PCR 反应的引物和探针

基因	GenBank 登录号		序列	SEQ ID NO:
USP18	CR45721 6.1	Forward	5' -CAGACCCCTGACAATCCACCT-3'	39
		Reverse	5' -AGCTCATACTGCCCTCCAGA-3'	40
		Taqman probe	5' -FAM-TCTGCCACTCCCTGTACTTCCCC-BQH1-3'	75
OAS2	NM_0168 17.2	Forward	5' -TCAGCGAGGCCAGTAATCTT-3'	41
		Reverse	5' -GCAGAACATTCCAAGATGGT-3'	42
		Taqman probe	5' -FAM-AAAATATGCTGGCAATGGCTGAA-BQH1-3'	76
LGP1	CH47115 2.1	Forward	5' -GCAGGAAGACAGTGGAGAGC-3'	43
		Reverse	5' -GAGCCAGCACTTCTGGGTAG-3'	44
		Taqman probe	5' -FAM-CTTGGGGAGGCCTCTCTGCAG-BQH1-3'	77
LAP3	CR45712 8.1	Forward	5' -GGTGCCATGGATGTAGCTTT-3'	45
		Reverse	5' -AGAGAGGCATCCTCCAGACA-3'	46
		Taqman probe	5' -FAM-AATTCATCCTGGCTCTGGAACAA-BQH1-3'	78
GIP3	NM_0011 83951.1	Forward	5' -CTCGCTGATGAGCTGGTCT-3'	47
		Reverse	5' -ATACTTGTGGGTGGCGTAGC-3'	48
		Taqman	5' -FAM-TAGTGGCCACGCTGCAGAGC-BQH1-3'	79

		probe		
CEB1	NM_0163 23.3	Forward	5'-GATTGCTGGAGGGAATCAAA-3'	49
		Reverse	5'-TTGGATTTCCTTTTTTGTGC-3'	50
		Taqman probe	5'-FAM-TCCTACTCTGAATGAAGGGACTGTAA-BQH1-3'	80
ATF5	NM_0011 93646.1	Forward	5'-AGCCCCCTGTCTTGGATACT-3'	51
		Reverse	5'-CGAGAAGGTTGAGGTGGAGA-3'	52
		Taqman probe	5'-FAM-AACGAGGCCGGCAGGAGGA-BQH1-3'	81
GIP2	AF32360 9.1	Forward	5'-CGCAGATCACCCAGAAGATC-3'	53
		Reverse	5'-GCCCTGTTATTCCTCACCA-3'	54
		Taqman probe	5'-FAM-TCTGGCTGTCCACCCGAGCG-BQH1-3'	82
OAS3	NM_0061 87.3	Forward	5'-GTCAAACCCAAGCCACAAGT-3'	55
		Reverse	5'-GGGCGAATGTTACAAAAGTT-3'	56
		Taqman probe	5'-FAM-TCAACAGTGGCTGCCAAGGG-BQH1-3'	83
RPLP2	CR54221 2.1	Forward	5'-GCTGTAGCCGTCTCTGCTG-3'	57
		Reverse	5'-AAAAAGGCCAAATCCCATGT-3'	58
		Taqman probe	5'-FAM-TGCTGCTGGTTCTGCCCTG-BQH1-3'	84
STXBP5	NM_1392 44.4	Forward	5'-GTTCATCTGATGGGCTTCGT-3'	59
		Reverse	5'-TTTGTGTGGTGGTTCTCCA-3'	60
		Taqman probe	5'-FAM-AACTCACCCTTAAACAGTCTCCAGG-BQH1-3'	85
Viperin	AF44215 1.1	Forward	5'-CTTTTGCTGGGAAGCTCTTG-3'	61
		Reverse	5'-CAGCTGCTGCTTCTCCTCT-3'	62
		Taqman probe	5'-FAM-TGGTCCCGCTGTTCTGCTGG-BQH1-3'	86
RPS28	CR45705 5.1	Forward	5'-CCGTGTGCAGCCTATCAAG-3'	63
		Reverse	5'-TTTACATTGCGGATGATGGA-3'	64
		Taqman probe	5'-FAM-TTCTCAGGGACAGTGCACGCAG-BQH1-3'	87
PI3KAP1	CH47106 6.2	Forward	5'-CTGCAGAGAGCTTCCATCC-3'	65
		Reverse	5'-GTCTCTGGCTCATCGTCACA-3'	66
		Taqman probe	5'-FAM-AGGCTGCTCTGCGGCGTGCG-BQH1-3'	88
MX1	NM_0011 78046.2	Forward	5'-GTGCATTGCAGAAGGTCAGA-3'	67
		Reverse	5'-CTGGTGATAGGCCATCAGGT-3'	68
		Taqman probe	5'-FAM-ATCCTGGGATTTTGGGGCTTTC-BQH1-3'	89
DUSP1	NM_0044 17.3	Forward	5'-CCAACCATTTTGAGGGTCAC-3'	69
		Reverse	5'-ACCCTTCCTCCAGCATTCTT-3'	70
		Taqman	5'-FAM-AGCATCCCTGTGGAGGACAACC-BQH1-3'	90

		probe		
ETEF1	CH47107 6.1	Forward	5'-AGCGGAAGGAGGAGAAAAAG-3'	71
		Reverse	5'-GTACTCTTGGGCAGGTGAGC-3'	72
		Taqman probe	5'-FAM-AGCAGGAGATGGATGAATGTGAGCA-BQH1-3'	91
β -actin	HQ15407 4.1	Forward	5'-CAAAGACCTGTACGCCAACACA-3'	73
		Reverse	5'-GGAGTACTTGCGCTCAGGAGG-3'	74
		Taqman probe	5'-FAM-CCGACAGGATGCAGAAGGAGATCAC-BQH1-3'	92

(2) 引物预实验

对用 primer 软件设计的 18 套引物（上文表 2）进行预实验，随机选取两份来自 CHB 患者的模板（分别标记为 CHB 1、CHB 2），通过荧光定量 PCR 检测待测基因及内参引物的 Ct 值。鉴定结果如表 3 所示，17 套待测基因的引物和内参 β -actin 引物 Ct 值均在 15-35 之间，表明其均能进行有效扩增；同时 Neg 组（不含模板）未检测到有效扩增，进一步表明上文表 2 中所列举的 18 套引物可用于相应的待测基因的荧光定量 PCR 检测。

表 3. 荧光定量 PCR 检测体系中引物的预实验

Gene Name	Ct(CHB 1)	Ct(CHB 2)	Neg
β -actin	20.97	22.83	NA
USP18	28.02	27.51	NA
OAS2	33.67	29.30	NA
LGP1	30.66	32.52	NA
LAP3	27.62	28.74	NA
GIP3	27.89	26.09	NA
CEB1	24.63	23.30	NA
ATF5	28.03	27.26	NA
GIP2	29.35	22.79	NA
OAS3	30.26	27.92	NA
RPLP2	30.30	28.99	NA
STXBP5	27.84	29.16	NA
Viperin	29.33	28.21	NA
RPS28	27.42	28.96	NA
PI3KAP1	28.37	29.03	NA
MX1	29.37	29.80	NA
DUSP1	29.50	29.34	NA
ETEF1	27.10	28.59	NA

实施例 3. OAS2、USP18 在对 IFN α 治疗应答和无应答的 CHB 患者中的表达差异

本发明共临床追踪了 150 例慢性乙肝标本，其中接受 IFN α 治疗的且有 24 周治疗结果的共 66 例；其中对 IFN α 治疗无应答共 47 例，对 IFN α 治疗应答共 19 例。表 4 显示

了本实施例所入选研究样本的特征数据，结果显示，应答组（Rs）和无应答组（NRs）在年龄、性别上没有显著差异，治疗前 ALT、AST 和 HBsAg、HBV DNA、HBeAg 结果也没有显著差异。

表 4. 入选研究标本特征

	Rs (n=19)	NRs (n=47)	P value
年龄(年)	31.40±2.768	32.33±1.443	0.7750
ALT (IU/L)	261.6±62.42	305.0±58.31	0.6142
AST (IU/L)	190.6±85.35	135.7±28.71	0.5748
HBV DNA log ₁₀ (copies/mL)	6.637±0.4398	7.280±0.1914	0.1937
HBsAg log ₁₀ (IU/mL)	3.691±0.3076	4.159±0.0949	0.1622
HBeAg (IU/mL)	575.4±152.2	865.3±80.71	0.1032

对还未接受 IFN α 治疗的慢性乙肝患者采集外周血，按照上述实施例 1 的方法提取 PBMC 并对 PBMC 进行处理和实施例 2 的方法提取 RNA，进行荧光定量 PCR 以检测计算 17 个待测基因（USP18、OAS2、LGP1、LAP3、GIP3、CEB1、ATF5、GIP2、OAS3、RPLP2、STXBP5、Viperin、RPS28、PI3KAP1、MX1、DUSP1、ETEF1）的 mRNA 水平，所述 mRNA 水平通过相对定量法（比较 Ct 法）计算得到，其计算方式为：将测得的每个目的基因的 Ct 值减去各自内参 β -actin 的 Ct 值，得到每个目的基因的 Δ Ct 值（ Δ Ct=Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因}），计算 $2^{-\Delta$ Ct 值，其所表示的是待测样本中该基因的表达量相对于内参基因的表达量的变化倍数（即，该基因相对于内参基因的归一化 mRNA 水平）；然后将待测样本中该基因的 Δ Ct 值与对照样本中该基因的 Δ Ct 值相减，得到 $\Delta\Delta$ Ct 值（ $\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct_{待测样本}- Δ Ct_{对照样本}），最后计算 $2^{-\Delta\Delta$ Ct 值，其所表示的是待测样本该基因的表达量相对于对照样本该基因的表达量的变化倍数（即，待测样本中该基因相对于对照样本中该基因的 mRNA 相对表达水平）。

通过比较应答组和无应答组中上述各个基因的 mRNA 水平的差异，发现其中 OAS2 和 USP18 的 mRNA 水平在应答组和无应答组之间存在明显差异。结果如图 1 和图 2 所示，其中 OAS2 N 组的 PBMC 细胞未经任何体外诱导，该组所表示的是待测样本中 OAS2 相对于内参基因的归一化 mRNA 水平；OAS2 (IFN α +N-N) 组、USP18 (IFN α +N-N) 组和 USP18 (IFN α +HBcAg-HBcAg) 组的 PBMC 体外诱导条件如表 5 所示，其体外诱导培养的具体步骤参照实施例 1.2 进行，其中，OAS2 (IFN α +N-N) 组所表示的是待测样本中 OAS2 相对于对照样本中 OAS2 的 mRNA 相对表达水平；USP18 (IFN α +N-N) 组和 USP18 (IFN α +HBcAg-HBcAg) 组所分别表示的是待测样本中 USP18 相对于各自对照样本中 USP18 的 mRNA 相对表达水平。

表 5. 不同组别内待测样本及对照样本的体外诱导条件

组别名称	待测样本体外诱导条件		对照样本体外诱导条件	
	IFN α	刺激物	IFN α	刺激物
OAS2 (IFN α +N-N)	有	无	无	无
USP18 (IFN α +N-N)	有	无	无	无
USP18 (IFN α +HBcAg-HBcAg)	有	HBcAg 多肽库	无	HBcAg 多肽库

图 1a 显示了 OAS2 N 组的检测结果，结果显示，未经任何体外诱导的 CHB 患者接受 IFN α 治疗之前的 PBMC 样品中，应答组患者的 OAS2 归一化 mRNA 水平显著高于无应答组患者。图 1b 显示了 OAS2 (IFN α +N-N) 组的检测结果，结果显示，经 IFN α 体外诱导培养的 CHB 患者接受 IFN α 治疗之前的 PBMC 样品中，应答组患者的 OAS2 的 mRNA 相对表达水平显著低于无应答组患者。

图 2a 显示了 USP18 (IFN α +N-N) 组的检测结果，结果显示，经 IFN α 体外诱导培养的 CHB 患者接受 IFN α 治疗之前的 PBMC 样品中，应答组患者的 USP18 的 mRNA 相对表达水平显著低于无应答组患者。图 2b 显示了 USP18 (IFN α +HBcAg-HBcAg) 组的检测结果，结果显示，经 IFN α 和 HBcAg 多肽库（含有 SEQ ID NO: 3-37 所示的 HBcAg 抗原性片段）体外诱导培养的 CHB 患者接受 IFN α 治疗之前的 PBMC 样品中，应答组患者的 USP18 的 mRNA 相对表达水平显著低于无应答组患者。

上述结果表明，对 IFN α 治疗应答患者的治疗前 PBMC 样品中 OAS2 水平相比于对 IFN α 治疗无应答患者显著升高；同时，对 IFN α 治疗应答患者的治疗前 PBMC 样本经 IFN α 和/或 HBcAg 体外诱导后其中 OAS2 和/或 UPS18 水平相比于对 IFN α 治疗无应答患者显著降低。因此 OAS2 和/或 UPS18 可以用于预测 CHB 患者对 IFN α 治疗应答。

实施例 4. OAS2 N 检测法、OAS2 (IFN α +N-N) 检测法的 ROC 曲线分析

根据实施例 3 中 OAS2 N 组和 OAS2 (IFN α +N-N) 组的实验条件，分别建立了相应的 OAS2 N 检测法和 OAS2 (IFN α +N-N) 检测法，表 6 记载了上述两种方法的主要步骤。本实施例采用了如上所述的两种方法分别对实施例 3 中所记载的 CHB 患者样本进行了检测，分别获得样本的两个诊断指标：OAS2 归一化 mRNA 水平和 OAS2 的 mRNA 相对表达水平；然后使用 SPSS 17.0 软件以 OAS2 归一化 mRNA 水平和 OAS2 的 mRNA 相对表达水平为诊断指标，绘制 ROC 曲线以检验单独使用 OAS2 N 检测法或 OAS2 (IFN α +N-N) 检测法在预测 IFN α 对 CHB 患

者的治疗效果或 CHB 患者对 IFN α 治疗的应答方面的性能。ROC 曲线分析结果如图 3 及表 7 所示, 结果显示, OAS2 N 检测法和 OAS2 (IFN α +N-N) 检测法的 ROC 曲线下面积 (AUC) 分别为 0.774、0.814; 灵敏度分别为 72%、71%; 特异性分别为 80%、83%。

上述结果表明, 2 种检测方法均具有较高的灵敏度和特异性, 单独使用 OAS2 N 检测法或 OAS2 (IFN α +N-N) 检测法可以用于预测 IFN α 对 CHB 患者的治疗效果或 CHB 患者对 IFN α 治疗的应答, 具有较高的灵敏度和特异性。

表 6. OAS2 N 检测法和 OAS2 (IFN α +N-N) 检测法的主要步骤

检测方法的主要步骤	OAS2 N 检测法	OAS2 (IFN α +N-N) 检测法
采集样品	对还未接受 IFN α 治疗的 CHB 患者采集外周血	
提取 PBMC	按照实施例 1.1 进行	
PBMC 体外诱导培养	无	按照表 5 及实施例 1.2 进行
荧光定量 PCR	按照实施例 2 进行	
计算 mRNA 水平	按照实施例 3 中的比较 Ct 法进行	按照实施例 3 中的比较 Ct 法进行

表 7. OAS2 N 检测法、OAS2 (IFN α +N-N) 检测法的 ROC 分析

检测方法	AUC	灵敏度	特异性
OAS2 N	0.774	72%	80%
OAS2 (IFN α +N-N)	0.814	71%	83%

实施例 5. OAS2 (IFN α +N-N) 检测法、USP18 (IFN α +N-N) 检测法及两者联合检测的 ROC 曲线分析

根据实施例 3 中 OAS2 (IFN α +N-N) 组和 USP18 (IFN α +N-N) 组的实验条件, 分别建立了相应的 OAS2 (IFN α +N-N) 检测法和 USP18 (IFN α +N-N) 检测法, 表 8 记载了上述两种方法的主要步骤。本实施例采用了如上所述的两种方法分别对实施例 3 中所记载的 CHB 患者样本进行了检测, 分别获得两个诊断指标: OAS2 的 mRNA 相对表达水平和 USP18 的 mRNA 相对表达水平; 然后使用 SPSS 17.0 软件以 OAS2 的 mRNA 相对表达水平或 USP18 的 mRNA 相对表达水平为诊断指标, 绘制 ROC 曲线以检验单独使用 OAS2 (IFN α +N-N) 检测法或 USP18 (IFN α +N-N) 检测法在预测 IFN α 对 CHB 患者的治疗效果或 CHB 患者对 IFN α 治疗的应答方面的性能; 并且将上述指标作为联合检测指标, 通过 Logistic 回归模型, 获得统计分析值, 以该值再次绘制 ROC 曲线, 评价两者联合检测的预测性能。ROC 曲线分析结果

如图 4 及表 9 所示, 结果显示, 2 种方法的 ROC 曲线下面积 (AUC) 分别为 0.814、0.823; 灵敏度分别为 71%、60%; 特异性分别为 83%、95%。2 种方法联合检测的 AUC 可以达到 0.861, 灵敏度和特异性分别为 74%、89%。上述结果表明 OAS2 (IFN α +N-N) 检测法和 USP18 (IFN α +N-N) 检测法及联合检测均具有良好的灵敏度和特异性, 进一步无论是表明单独使用 OAS2 N 检测法或 OAS2 (IFN α +N-N) 检测法, 还是两者联合检测, 均对预测 IFN α 对 CHB 患者的治疗效果或 CHB 患者对 IFN α 治疗的应答具有很好的灵敏度和特异性。

表 8. OAS2 (IFN α +N-N) 检测法和 USP18 (IFN α +N-N) 检测法的主要步骤

检测方法的主要步骤	OAS2 (IFN α +N-N) 检测法	USP18 (IFN α +N-N) 检测法
采集样品	对还未接受 IFN α 治疗的 CHB 患者采集外周血	
提取 PBMC	按照实施例 1.1 进行	
PBMC 体外诱导培养	按照表 5 及实施例 1.2 进行	
荧光定量 PCR	按照实施例 2 进行	
计算 mRNA 水平	按照实施例 3 中的比较 Ct 法进行	

表 9. OAS2 (IFN α +N-N) 检测法和 USP18 (IFN α +N-N) 检测法以及两者联合检测的 ROC 分析

检测方法	AUC	灵敏度	特异性
USP18 (IFN α +N-N)	0.823	60%	95%
OAS2 (IFN α +N-N)	0.814	71%	83%
USP18 (IFN α +N-N) + OAS2 (IFN α +N-N)	0.861	74%	89%

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述, 但本领域技术人员将理解: 根据已经公布的所有教导, 可以对细节进行各种修改和变动, 并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部分为由所附权利要求及其任何等同物给出。

权利要求

1. 一种试剂盒,其包括能够检测标志物表达水平的第一试剂,任选地还包括 IFN α 和/或刺激物;其中,所述标志物选自 OAS2 或 USP18,所述刺激物选自 HBV 抗原、HBV 抗原的抗原性片段或其任何组合;

优选地,所述 HBV 抗原为 HBcAg;更优选地,所述 HBcAg 具有如 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列;优选地,所述抗原性片段具有选自下列的氨基酸序列: SEQ ID NO: 3-37;

优选地,所述刺激物包含分别具有如 SEQ ID NO: 3-37 所示的氨基酸序列的抗原性片段;

优选地,所述第一试剂为能够检测所述标志物的 mRNA 水平或蛋白水平的试剂,例如为能够检测所述标志物的 mRNA 水平的试剂。

2. 权利要求 1 所述的试剂盒,其包含能够检测 OAS2 表达水平的第一试剂,任选地还包括 IFN α 和/或刺激物。

3. 权利要求 1 所述的试剂盒,其包含能够检测 USP18 表达水平的第一试剂和 IFN α , 任选地还包括刺激物。

4. 权利要求 1-3 任一项所述的试剂盒,其还包含用于预处理含有 PBMC 的样品的第二试剂,其中所述第二试剂包括选自下列的一种或多种试剂:用于稀释样品的稀释剂(例如,磷酸盐缓冲液或生理盐水);用于阻止血液凝固的抗凝剂(例如,肝素);用于维持 PBMC 活性的试剂(例如,培养基或培养液);和,用于分离 PBMC 的试剂(例如,淋巴细胞分离液,例如聚蔗糖-泛影葡胺溶液);更优选地,所述第二试剂包括用于维持 PBMC 活性的试剂(例如,培养基或培养液),和/或用于分离 PBMC 的试剂(例如,淋巴细胞分离液,例如聚蔗糖-泛影葡胺溶液);

优选地,所述试剂盒还包含采血装置(例如无热原真空采血管)和/或 PBMC 分离装置(例如 PBMC 细胞分离管)。

5. 能够检测标志物表达水平的试剂在制备试剂盒中的用途, 所述试剂盒用于预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答; 其中, 所述标志物选自 OAS2 或 USP18;

优选地, 所述试剂盒还包括 IFN α 和/或刺激物, 所述刺激物选自 HBV 抗原、HBV 抗原的抗原性片段或其任何组合;

优选地, 所述 HBV 抗原为 HBcAg; 更优选地, 所述 HBcAg 具有如 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列; 优选地, 所述抗原性片段具有选自下列的氨基酸序列: SEQ ID NO: 3-37;

优选地, 所述刺激物包含分别具有如 SEQ ID NO: 3-37 所示的氨基酸序列的抗原性片段;

优选地, 所述能够检测标志物表达水平的试剂为能够测定所述标志物的 mRNA 水平或蛋白水平的试剂, 例如为能够测定所述标志物的 mRNA 水平的试剂; 更优选地, 所述能够检测标志物表达水平的试剂通过 PCR 定量测定所述标志物的 mRNA 水平;

优选地, 所述试剂盒还包含一种或多种选自 1) -6) 的试剂或装置:

- 1) 用于稀释样品的稀释剂, 例如磷酸盐缓冲液或生理盐水;
- 2) 用于阻止血液凝固的抗凝剂, 例如肝素;
- 3) 用于维持 PBMC 活性的试剂, 例如培养基或培养液;
- 4) 用于分离 PBMC 的试剂, 例如淋巴细胞分离液, 例如聚蔗糖-泛影葡胺溶液;
- 5) 采血装置, 例如无热原真空采血管; 和
- 6) PBMC 分离装置, 例如 PBMC 细胞分离管;

优选地, 所述试剂盒包括用于维持 PBMC 活性的试剂(例如, 培养基或培养液), 和/或用于分离 PBMC 的试剂(例如, 淋巴细胞分离液, 例如聚蔗糖-泛影葡胺溶液)。

6. 权利要求 5 所述的用途, 其中所述试剂盒通过包括下述步骤的方法来预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答:

(1) 使用能够检测标志物表达水平的试剂测定来自所述受试者的样品中所述标志物的表达水平, 其中所述标志物为 OAS2; 和

(2) 将该表达水平与参考值进行比较, 或对该表达水平进行统计学分析以获得统计分析值, 并将该统计分析值与参考值进行比较, 并判断所述受试者是否会对 IFN α

治疗产生应答；

其中，所述样品包含外周血单个核细胞（PBMC），例如全血（例如抗凝全血）、外周血单个核细胞（PBMC）、或外周血白膜层；

优选地，在步骤（2）中，使用 Logistic 回归模型对所述表达水平进行统计分析；

优选地，在步骤（1）之前，所述方法还包括下列步骤中的一项或多项：（a）使用采血装置从所述受试者获得样品；（b）使用抗凝剂处理采血装置或来自所述受试者的样品；（c）使用用于维持 PBMC 活性的试剂处理来自所述受试者的样品；（d）使用稀释剂稀释来自所述受试者的样品；和（e）使用用于分离 PBMC 的试剂或 PBMC 分离装置从来自所述受试者的样品中分离获得 PBMC。

7. 权利要求 5 所述的用途，其中所述试剂盒通过包括下述步骤的方法来预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答：

（1）使用 IFN α 刺激来自所述受试者的至少一份样品作为待测样品，并将未经 IFN α 刺激的样品作为对照样品；或，使用 IFN α 和刺激物共同刺激来自所述受试者的至少一份样品作为待测样品，并将经所述刺激物刺激但未经 IFN α 刺激的样品作为对照样品；其中，所述刺激物选自 HBV 抗原、HBV 抗原的抗原性片段或其任何组合；

（2）使用能够检测标志物表达水平的试剂测定步骤（1）中各个样品中所述标志物的表达水平，并获得所述待测样品中该标志物的表达水平相比于所述对照样品中该标志物的表达水平的变化倍数，将该变化倍数作为所述待测样品中所述标志物的相对表达水平，其中所述标志物选自 OAS2 或 USP18；和

（3）将该相对表达水平与参考值进行比较，或对该相对表达水平进行统计学分析以获得统计分析值，并将该统计分析值与参考值进行比较，并判断所述受试者是否会

对 IFN α 治疗产生应答；

其中，所述样品包含外周血单个核细胞（PBMC），例如全血（例如抗凝全血）、外周血单个核细胞（PBMC）、或外周血白膜层；

优选地，在步骤（2）中，通过比较 Ct 法获得所述待测样品中该标志物的 mRNA 水平相比于所述对照样品中该标志物的 mRNA 水平的变化倍数，即所述待测样品中所述标志物的 mRNA 相对表达水平；

优选地，在步骤（3）中，使用 Logistic 回归模型对所述相对表达水平进行统计

分析；

优选地，在步骤（1）之前，所述方法还包括下列步骤中的一项或多项：（a）使用采血装置从所述受试者获得样品；（b）使用抗凝剂处理采血装置或来自所述受试者的样品；（c）使用用于维持 PBMC 活性的试剂处理来自所述受试者的样品；（d）使用稀释剂稀释来自所述受试者的样品；和（e）使用用于分离 PBMC 的试剂或 PBMC 分离装置从来自所述受试者的样品中分离获得 PBMC。

8. 用于预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答的方法，或获得诊断分析的结果的方法，其中所述诊断分析用于预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答，其包括下述步骤：

（1）提供来自所述受试者的样品；

（2）测定所述样品中标志物的表达水平，其中所述标志物为 OAS2；和

（3）将该表达水平与参考值进行比较，或对该表达水平进行统计学分析以获得统计分析值，并将该统计分析值与参考值进行比较，并判断所述受试者是否会对 IFN α 治疗产生应答；

其中，所述样品包含外周血单个核细胞（PBMC），例如全血（例如抗凝全血）、外周血单个核细胞（PBMC）、或外周血白膜层；

优选地，在步骤（2）中，测定所述标志物的 mRNA 水平或蛋白水平，例如测定所述标志物的 mRNA 水平；更优选地，在步骤（2）中，通过 PCR 定量测定所述标志物的 mRNA 水平；

优选地，在步骤（3）中，使用 Logistic 回归模型对所述表达水平进行统计分析；

优选地，在步骤（1）之前，还包括下列步骤中的一项或多项：（a）从所述受试者获得样品；（b）向来自所述受试者的样品中加入抗凝剂，例如肝素；（c）从来自所述受试者的样品中获取 PBMC 或含有 PBMC 的血液成分（例如，外周血白膜层）；（d）向来自所述受试者的样品中加入培养液或培养基；和，（e）稀释来自所述受试者的样品。

9. 用于预测 IFN α 对患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答的方法，或获得诊断分析的结果的方法，其中所述诊断分析用于预测 IFN α 对

患有慢性乙肝的受试者的治疗效果或所述受试者对 IFN α 治疗的应答,其包括下述步骤:

(1) 提供来自所述受试者的至少两份样品;

(2) 使用 IFN α 刺激至少一份样品作为待测样品,并将未经 IFN α 刺激的样品作为对照样品;或,使用 IFN α 和刺激物共同刺激来自所述受试者的至少一份样品作为待测样品,并将经所述刺激物刺激但未经 IFN α 刺激的样品作为对照样品;其中,所述刺激物选自 HBV 抗原、HBV 抗原的抗原性片段或其任何组合;

(3) 测定步骤(2)中各个样品中标志物的表达水平,并计算所述待测样品中该标志物的表达水平相比于所述对照样品中该标志物的表达水平的变化倍数,将该变化倍数作为所述待测样品中所述标志物的相对表达水平,其中所述标志物选自 OAS2 或 USP18;和

(4) 将该相对表达水平与参考值进行比较,或对该相对表达水平进行统计学分析以获得统计分析值,并将该统计分析值与参考值进行比较,并判断所述受试者是否会对 IFN α 治疗产生应答;

其中,所述样品包含外周血单个核细胞(PBMC),例如全血(例如抗凝全血)、外周血单个核细胞(PBMC)、或外周血白膜层;

优选地,在步骤(2)中,所述 HBV 抗原为 HBVcAg;更优选地,所述 HBVcAg 具有如 SEQ ID NO: 38 所示的氨基酸序列;优选地,所述抗原性片段具有选自下列的氨基酸序列: SEQ ID NO: 3-37;更优选地,所述刺激物包含分别具有如 SEQ ID NO: 3-37 所示的氨基酸序列的抗原性片段;

优选地,在步骤(3)中,测定所述标志物的 mRNA 水平或蛋白水平;例如测定所述标志物的 mRNA 水平;更优选地,在步骤(3)中,通过 PCR 定量测定所述标志物的 mRNA 水平;

优选地,在步骤(3)中,通过比较 Ct 法获得所述待测样品中该标志物的 mRNA 水平相比于所述对照样品中该标志物的 mRNA 水平的变化倍数,即所述待测样品中所述标志物的 mRNA 相对表达水平;

优选地,在步骤(4)中,使用 Logistic 回归模型对所述相对表达水平进行统计分析;

优选地,在步骤(1)之前,还包括下列步骤中的一项或多项:(a)从所述受试者获得样品;(b)向来自所述受试者的样品中加入抗凝剂,例如肝素;(c)从来自

所述受试者的样品中获取 PBMC 或含有 PBMC 的血液成分（例如，外周血白膜层）；（d）向来自所述受试者的样品中加入培养液或培养基；和，（e）稀释来自所述受试者的样品。

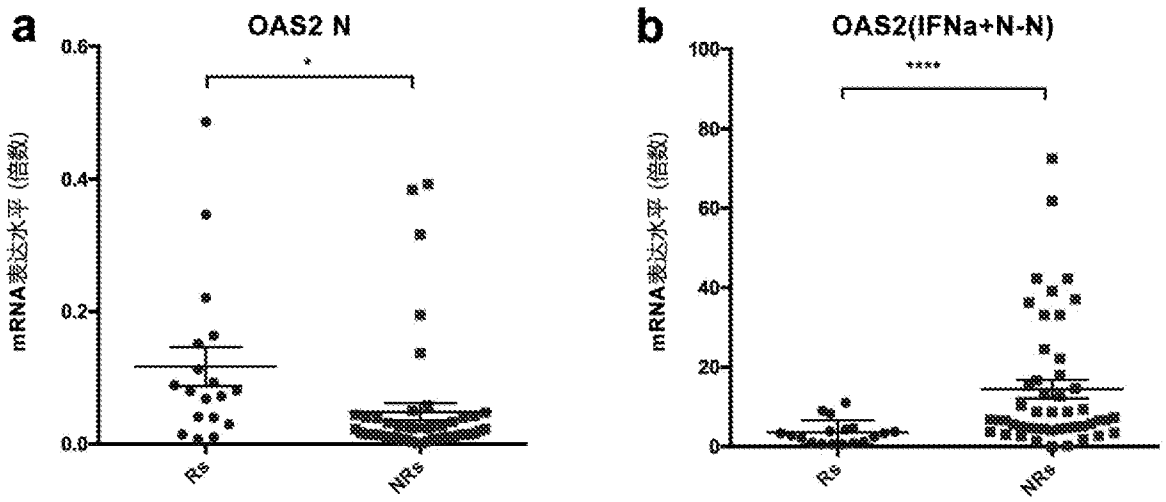


图 1

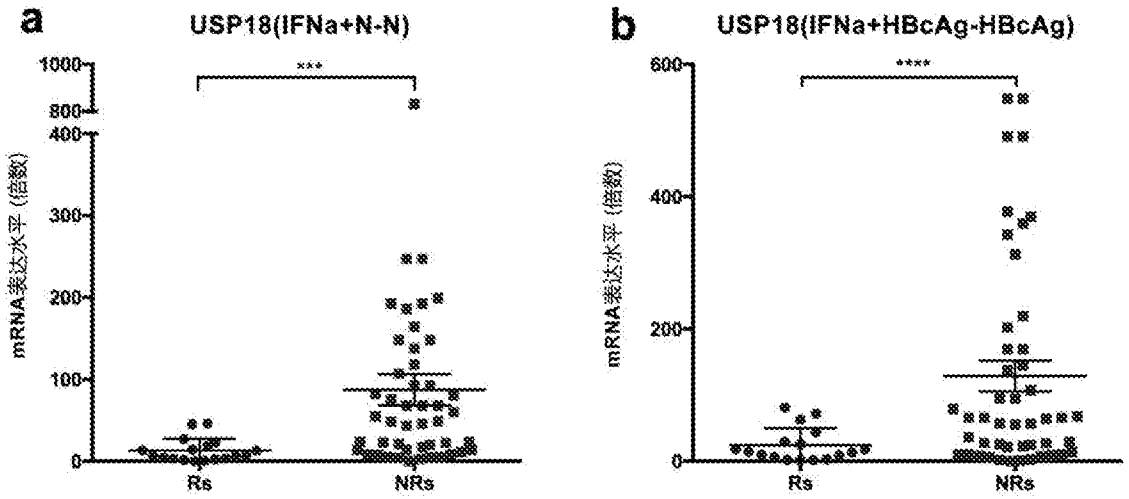


图 2

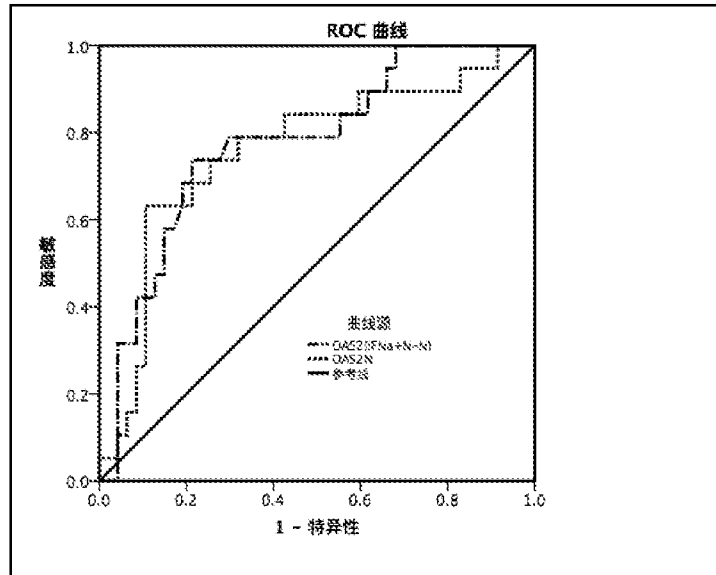


图 3

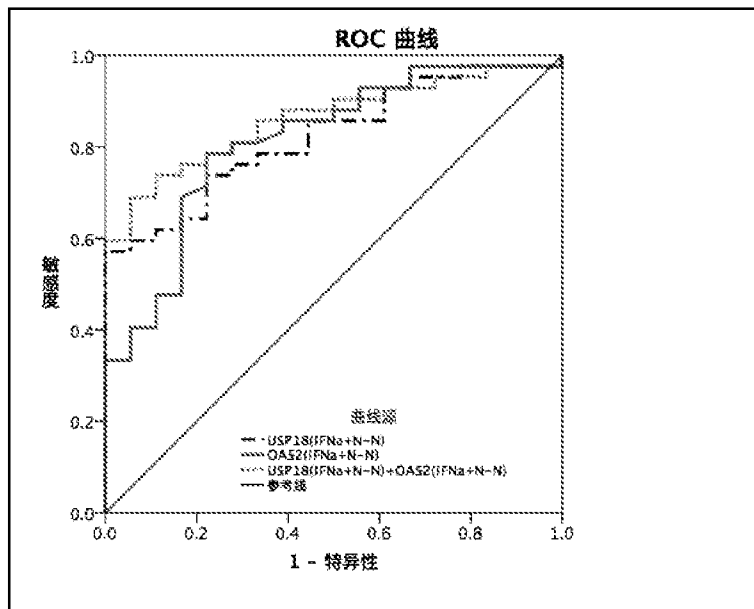


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/075542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68 (2006.01) i; C12N 15/11 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed: OAS2, USP18, HBV, HB??Ab, HB??Ag, marker, IFN, kit, hepatitis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101821629 A (NOVARTIS FORSCHUNGSSTIFTUNG, ZWEIGNIEDERLASSUNG, FRIDRICH MIESCHER INSTITUTE et al.), 01 September 2010 (01.09.2010), claims 1-20, and description, embodiment 1	1, 2, 4-9
X	CN 104603289 A (HARRY, S.), 06 May 2015 (06.05.2015), claims 1-143	3

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
27 May 2017 (27.05.2017)

Date of mailing of the international search report
14 June 2017 (14.06.2017)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
ZHAO, Yanhao
Telephone No.: (86-10) **62411043**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/075542

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101821629 A	01 September 2010	WO 2009034055 A1	19 March 2009
		US 2013059749 A1	07 March 2013
		EP 2191274 A1	02 June 2010
CN 104603289 A	06 May 2015	US 2010167302 A1	01 July 2010
		HK 1209793 A1	08 April 2016
		KR 20150035821 A	07 April 2015
		EP 2861765 A4	16 March 2016
		EA 201590027 A1	29 May 2015
		SG 11201408385T A	29 January 2015
		SG 10201610508V A	27 February 2017
		CA 2876731 A1	19 December 2013
		EP 2861765 A1	22 April 2015
		IL 236181 D0	29 January 2015
		US 2015275298 A1	01 October 2015
		US 2014179805 A1	26 June 2014
		MX 2014015425 A	14 July 2015
		JP 2015522260 A	06 August 2015
		WO 2013188846 A1	19 December 2013
IL 236181 A	29 January 2015		
AU 2013274002 A1	05 February 2015		

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12Q 1/68(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>											
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12Q; C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CPRSABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, CNKI, GOOGLE SCHOLAR, Elsevier Science, PubMed; OAS2, USP18, HBV, HB??Ab, HB??Ag, 标记物, IFN, 试剂盒, 肝炎</p>											
<p>C. 相关文件</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%; padding: 5px;">类型*</th> <th style="width:70%; padding: 5px;">引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th style="width:20%; padding: 5px;">相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align:center; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">CN 101821629 A (诺瓦提斯研究基金会弗里德里克 米谢尔生物医学研究所等) 2010年9月 1日 (2010 - 09 - 01) 权利要求1-20, 说明书实施例1</td> <td style="text-align:center; padding: 5px;">1, 2, 4-9</td> </tr> <tr> <td style="text-align:center; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">CN 104603289 A (哈里 斯泰利) 2015年 5月 6日 (2015 - 05 - 06) 权利要求1-143</td> <td style="text-align:center; padding: 5px;">3</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 101821629 A (诺瓦提斯研究基金会弗里德里克 米谢尔生物医学研究所等) 2010年9月 1日 (2010 - 09 - 01) 权利要求1-20, 说明书实施例1	1, 2, 4-9	X	CN 104603289 A (哈里 斯泰利) 2015年 5月 6日 (2015 - 05 - 06) 权利要求1-143	3
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求									
X	CN 101821629 A (诺瓦提斯研究基金会弗里德里克 米谢尔生物医学研究所等) 2010年9月 1日 (2010 - 09 - 01) 权利要求1-20, 说明书实施例1	1, 2, 4-9									
X	CN 104603289 A (哈里 斯泰利) 2015年 5月 6日 (2015 - 05 - 06) 权利要求1-143	3									
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>											
<table style="width:100%;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p> </td> </tr> </table>			<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>	<p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p>	<p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>										
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p style="text-align:center;">2017年 5月 27日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p style="text-align:center;">2017年 6月 14日</p>										
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)</p> <p>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>授权官员</p> <p style="text-align:center;">赵彦豪</p> <p>电话号码 (86-10)62411043</p>										

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/075542

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101821629	A	2010年 9月 1日	WO	2009034055	A1	2009年 3月 19日
				US	2013059749	A1	2013年 3月 7日
				EP	2191274	A1	2010年 6月 2日
				US	2010167302	A1	2010年 7月 1日
CN	104603289	A	2015年 5月 6日	HK	1209793	A1	2016年 4月 8日
				KR	20150035821	A	2015年 4月 7日
				EP	2861765	A4	2016年 3月 16日
				EA	201590027	A1	2015年 5月 29日
				SG	11201408385T	A	2015年 1月 29日
				SG	10201610508V	A	2017年 2月 27日
				CA	2876731	A1	2013年 12月 19日
				EP	2861765	A1	2015年 4月 22日
				IL	236181	D0	2015年 1月 29日
				US	2015275298	A1	2015年 10月 1日
				US	2014179805	A1	2014年 6月 26日
				MX	2014015425	A	2015年 7月 14日
				JP	2015522260	A	2015年 8月 6日
				WO	2013188846	A1	2013年 12月 19日
				IL	236181	A	2015年 1月 29日
AU	2013274002	A1	2015年 2月 5日				