

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 343**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/51 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

A61K 39/29 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01937883 .5**

96 Fecha de presentación: **08.06.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1297109**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54 Título: **Variantes de la ADN polimerasa y del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y métodos para usarlos**

30 Prioridad:
09.06.2000 AU PQ810900

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.07.2012

73 Titular/es:
**MELBOURNE HEALTH
CONNIBERE BUILDING, 10TH FLOOR, ROYAL
MELBOURNE HOSPITAL, FLEMINGTON ROAD
PARKVILLE, VIC 3050, AU;
AUSTIN AND REPATRIATION MEDICAL CENTRE
y
CENTRAL SYDNEY AREA HEALTH SERVICE**

72 Inventor/es:
**BARTHOLOMEUSZ, Angeline Ingrid;
LOCARNINI, Stephen Alister;
AYRES, Anna;
LITTLEJOHN, Margaret Rose;
MCCAUGHAN, Geoffrey William y
ANGUS, Peter William**

74 Agente/Representante:
Linage González, Rafael

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).

ES 2 384 343 T3

DESCRIPCIÓN

Variantes de la ADN polimerasa y del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y métodos para usarlos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a variantes virales que tienen una sensibilidad reducida a los agentes y en particular a los análogos nucleosídicos. Más particularmente, la presente invención apunta a variantes del virus de la hepatitis B que tienen una resistencia parcial o completa a los análogos nucleosídicos. Las variantes también pueden comprender las mutaciones correspondientes que afectan la interactividad inmunológica con los componentes de superficie virales. La presente invención contempla además ensayos para detectar dichas variantes virales los cuales son útiles para controlar regímenes terapéuticos antivirales y para desarrollar vacunas nuevas o modificadas dirigidas contra agentes virales y en particular contra variantes del virus de la hepatitis B. La presente invención también contempla el uso de las variantes virales para detectar selectivamente agentes capaces de inhibir la infección, replicación y/o liberación del virus.

Antecedentes de la invención

Los detalles bibliográficos de las publicaciones referidas numéricamente en esta especificación se reúnen al final de la descripción.

Las mutaciones específicas en una secuencia de aminoácidos se representan en este documento como "Xaa₁nXaa₂" donde Xaa₁ es el residuo de aminoácido original antes de la mutación, n es el número del residuo y Xaa₂ es el aminoácido mutante. La abreviatura "Xaa" puede ser el código de tres letras o de una sola letra (es decir, "X"). Los residuos de aminoácidos para la ADN polimerasa del virus de la hepatitis B se numeran adjudicando al residuo de metionina del motivo Tyr Met Asp Asp (YMDD) el número 550.

El virus de la hepatitis B (VHB) puede causar una enfermedad debilitante que puede derivar en insuficiencia hepática aguda. El VHB es un virus de ADN que se replica a través de un intermediario de ARN y utiliza la transcripción inversa en su estrategia de replicación (1). El genoma del VHB es de naturaleza compleja y tiene una estructura de ADN parcialmente bicatenaria con una superficie que codifica los marcos de lectura abiertos superpuestos, núcleo, polimerasa y genes X. La naturaleza compleja del genoma del VHB se representa en la Figura 1.

La presencia de una ADN polimerasa del VHB condujo a la propuesta de que los análogos nucleosídicos podrían actuar como agentes antivirales eficaces. Los ejemplos de análogos nucleosídicos que se han probado en la actualidad son penciclovir y su forma oral famciclovir [FAM] (2,3,4,5) y lamivudina [LAM] (6,7). Adefovir también ha demostrado tener una actividad eficaz anti-VHB in vitro.

La hepatitis, debido a la reactivación del virus de la hepatitis B (VHB), es una causa principal de morbimortalidad en pacientes positivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg+) que son sometidos a trasplante de médula ósea (TMO) (8-10). La patogenia subyacente está relacionada a la intensa inmunosupresión, durante el tratamiento citotóxico o inmunosupresor, que potencia la replicación viral con el consecuente aumento en la infección de los hepatocitos. La reconstitución subsiguiente con células madre de donantes, junto con la disminución de los inmunosupresores anti-injerto-contrahuésped, restauran la función inmunitaria. Esto resulta en una rápida destrucción de los hepatocitos infectados (11). El resultado del alotrasplante de médula ósea también es afectado por el estado del VHB del donante (11). De hecho, se ha demostrado que la depuración serológica de HBsAg en receptores HBsAg+ después del alotrasplante de médula ósea se asoció a injerto de médula positiva al anticuerpo de superficie de la hepatitis B (anti-HBs) y al anticuerpo del núcleo de la hepatitis B (anti-HBc) (12-17).

Como se indicó antes, FAM es el profármaco oral de penciclovir [9-(4-hidroxi-3-hidroximetilbut-1-il)guanina; BRL 39123], que se demostró que inhibe la replicación del hepadnavirus tanto en estudios in vitro como in vivo (18-22). Recientemente, FAM y LAM ((-)-β-2'-desoxi-3'-tiacitidina o 3TC) se han utilizado con éxito para prevenir/tratar la hepatitis relacionada con la reactivación del VHB al suspender la quimioterapia/inmunosupresión (23, 24) y para prevenir la recidiva del VHB luego del trasplante hepático ortotópico [THO] (25-28).

Al igual que con LAM, se identificó resistencia a FAM en el escenario post THO tanto en sujetos inmunodeprimidos como inmunocompetentes. Las mutaciones FAM reportadas de la polimerasa asociadas a "recaída" incluyen G518E (29), V519L (30), G520C (29), P523L (30), L526M (30), L526V (31), T530S (29) y V553I (32). Puesto que el gen de la polimerasa del VHB se superpone al gen de la envoltura, las mutaciones en el dominio catalítico de la polimerasa pueden afectar la secuencia de aminoácidos de la proteína de la envoltura y viceversa. En particular, la secuencia genética para el dominio de neutralización del VHB conocida como el determinante "a", que se encuentra en HBsAg y está ubicada entre los aminoácidos 99 y 169, en realidad se superpone a las regiones catalíticas principales de la proteína polimerasa viral y en particular a los dominios A y B (33). De hecho, V519L, V553I, G518E se asocian a cambios en el HBsAg de E164D, el codón de parada en 199 y E164K, respectivamente (30,32,33). A la inversa, el

5 uso de IgHB para la profilaxia contra la recidiva del VHB después de un THO se asoció a variantes en el HBsAg, que podrían tener cambios concomitantes en el gen de la polimerasa (34-36). En el trabajo que condujo a la presente invención, los inventores identificaron la selección de variantes del VHB en receptores positivos para HBsAg tratados con FAM y/o LAM luego del alotrasplante de médula ósea y post-THO. Además de las mutaciones exclusivas en la polimerasa del VHB y el HBsAg seleccionadas durante el tratamiento, hubo una cantidad de cambios en los aminoácidos en algunas cepas del VHB aisladas, que fueron compatibles con un cambio de genotipo del VHB en la población del virus predominante.

10 De conformidad con la presente invención, los inventores identificaron variantes del VHB, seleccionadas luego del tratamiento con FAM y/o LAM, con mutaciones en el gen de la ADN polimerasa del VHB que reducen la sensibilidad del VHB a este análogo nucleosídico. También se producen mutaciones correspondientes en el antígeno de superficie. La identificación de esas variantes del VHB es importante para el desarrollo de ensayos para controlar la resistencia a FAM y/o LAM y/o la resistencia a otros regímenes terapéuticos con análogos nucleosídicos y para detectar selectivamente agentes que sean útiles como agentes terapéuticos alternativos.

15 Resumen de la invención

20 En toda esta especificación, a menos que el contexto requiera algo diferente, la palabra "comprender" o variaciones como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros declarados, pero no la exclusión de ningún otro elemento ni número entero ni grupo de elementos o números enteros.

25 Se hace referencia a las secuencias de aminoácidos y nucleótidos mediante un número identificador de la secuencia (SEC, ID N°). Las SEC. ID N°: corresponden numéricamente a los identificadores de secuencias <400>1, <400>2, etc. Se proporciona un listado de secuencias después de las reivindicaciones.

30 Un aspecto de la presente invención apunta a una variante del VHB aislada que contiene una mutación en la ADN polimerasa del VHB seleccionada entre S548G y S548C donde dicha variante tiene una sensibilidad disminuida a un análogo nucleosídico.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una variante del VHB.

Aún otro aspecto de la presente invención proporciona

35 Otro aspecto de la presente invención contempla un método para determinar la posibilidad de que un VHB presente una sensibilidad reducida a un análogo nucleosídico, donde dicho método comprende aislar el ADN, o el ARNm correspondiente, de dicho VHB y someterlo a una detección selectiva de una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica a la ADN polimerasa del VHB lo que resulta en al menos una sustitución de un aminoácido seleccionado entre S548G y S548C donde la presencia de dicha mutación es una indicación de la probabilidad de resistencia a dicho análogo nucleosídico.

40 Otro aspecto de la presente descripción proporciona una composición que contiene una variante del VHB resistente a FAM y/o LAM y opcionalmente a otros análogos nucleosídicos de acuerdo con la invención o un antígeno de superficie del VHB de dicha variante del VHB o una de sus formas recombinantes o derivadas o su equivalente químico, y uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

45 Todavía otro aspecto de la presente descripción proporciona un uso de una variante del VHB de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxia de la hepatitis.

50 Aún en otro aspecto, la descripción contempla un producto de un programa informático para evaluar la probable utilidad de una variante viral o de una muestra biológica que la contenga, para determinar un protocolo terapéutico adecuado en un sujeto, donde dicho producto comprende:

(1) un código que recibe como entrada los I_v para al menos dos características asociadas a dichos agentes virales o muestra biológica que los contiene, donde dichas características se seleccionan entre:

- 55 (a) la capacidad para presentar resistencia debido a la sensibilidad reducida a un compuesto o agente inmunológico particular;
- (b) una ADN polimerasa del VHB de tipo nativo alterada;
- (c) un antígeno de superficie del VHB de tipo nativo alterado; o
- 60 (d) la morbilidad o la posible recuperación de un paciente;

(2) un código que suma dichos I_v para proporcionar una suma correspondiente a un P_v de dichas variantes virales o muestras biológicas; y

(3) un medio leíble por una computadora que almacena los códigos.

En un aspecto relacionado, la invención se extiende a una computadora para evaluar la posible utilidad de una variante viral o de una muestra biológica que la contenga en un sujeto, donde dicha computadora comprende:

5 (1) un medio para almacenamiento de datos leíbles por una máquina que contiene un material de almacenamiento de datos codificado con datos leíbles por una máquina, donde dichos datos leíbles por una máquina comprenden los I_v para al menos dos características asociadas a dicha variante viral o muestra biológica; donde dichas características se seleccionan entre:

10 (a) la capacidad para presentar resistencia debido a la sensibilidad reducida a un compuesto o agente inmunológico particular;
 (b) una ADN polimerasa del VHB de tipo nativo alterada;
 (c) un antígeno de superficie del VHB de tipo nativo alterado; o
 (d) la morbilidad o la posible recuperación de un paciente;

15 (2) una memoria de trabajo para almacenar instrucciones para procesar dichos datos leíbles por una máquina;

(3) una unidad de procesamiento central acoplada a dicha memoria de trabajo y a dicho medio de almacenamiento de datos leíbles por una máquina, para el procesamiento de dichos datos leíbles por una máquina para proporcionar la suma de dichos I_v correspondientes a un P_v para dicho(s) compuesto(s); y

20 (4) un equipo de computación de salida acoplado a dicha unidad procesadora central, para recibir dicho P_v .

Breve descripción de las figuras

25 La figura 1 es una representación diagramática que muestra el ADN parcialmente bicatenario del genoma del VHB que muestra la superficie (S) que codifica los marcos de lectura abiertos superpuestos, el núcleo (C), la polimerasa (P) y el gen X.

30 La figura 2 es una representación que muestra las regiones conservadas de los dominios A a E (subrayados) del VHB. M en YMDD es el aminoácido designado número 550. El símbolo "*" indica más de tres posibilidades de aminoácido en esa posición de la secuencia de consenso. La secuencia de consenso que define el dominio A se muestra en la fórmula I de la especificación del título.

35 La figura 3 es una representación diagramática de un sistema utilizado para llevar a cabo las instrucciones codificadas por el medio de almacenamiento.

La figura 4 es una representación diagramática de un corte transversal de un medio de almacenamiento magnético

40 La figura 5 es una representación diagramática de un corte transversal de un sistema de almacenamiento de datos leíbles ópticamente.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

45 La presente descripción se basa en parte en la identificación y el aislamiento de variantes del VHB resistentes a análogos nucleosídicos luego del tratamiento de pacientes con FAM y/o LAM y opcionalmente otros análogos nucleosídicos. En particular, los pacientes tratados con FAM y/o LAM generan variantes del VHB que tienen una sensibilidad disminuida o reducida a FAM y/o LAM. En este documento cuando se hace referencia a "disminuida" o "reducida" en relación con la sensibilidad a FAM y/o LAM incluye y abarca una resistencia completa o sustancial al análogo nucleosídico así como una resistencia parcial, e incluye una velocidad de replicación o una eficiencia de replicación que es más que la del tipo nativo en presencia de un análogo nucleosídico. En un aspecto, esto se mide convenientemente mediante el aumento en la carga viral hasta un nivel similar o mayor que los niveles pretratamiento.

55 Concordantemente, un aspecto de la presente invención apunta a una variante del VHB aislada, donde dicha variante comprende una mutación de un nucleótido en un gen que codifica una ADN polimerasa que resulta en al menos una adición, sustitución y/o delección de un aminoácido en dicha ADN polimerasa y donde dicha variante tiene sensibilidad disminuida a FAM y/o LAM y opcionalmente a otros análogos nucleosídicos.

60 Además de una mutación en el gen que codifica la ADN polimerasa, debido a la naturaleza solapante del genoma del VHB (Figura 1), puede producirse una mutación correspondiente en el gen que codifica al antígeno de superficie (HBsAg) resultando en una interactividad reducida de los reactivos inmunológicos como los anticuerpos y las células inmunitarias con HBsAg. La reducción en la interactividad de los reactivos inmunológicos con un componente de superficie viral incluye generalmente la ausencia de memoria inmunológica para reconocer o reconocer

sustancialmente al componente de superficie viral. La presente invención se extiende, por consiguiente, a una variante del VHB que tiene la sensibilidad disminuida a FAM y/o LAM e interactividad reducida de un reactivo inmunológico con HBsAg donde la variante se selecciona para después del tratamiento con FAM y/o LAM:

- 5 Una variante viral puede, por lo tanto, acarrear una mutación sólo en la ADN polimerasa o en la ADN polimerasa y el HBsAg. El término "mutación" se debe entender en su contexto más amplio e incluye múltiples mutaciones.

10 Preferentemente, las variantes de acuerdo con la invención están en forma aislada de modo que tienen que pasar por al menos un paso de purificación fuera del líquido corporal de origen natural. Alternativamente, las variantes pueden ser mantenidas en líquidos corporales aislados o pueden estar en forma de ADN. La presente invención también contempla clones moleculares infecciosos que contienen el genoma o partes de éste de una variante del VHB.

15 Las mutaciones en la ADN polimerasa del VHB incluyen por ejemplo variantes seleccionadas de pacientes con recidiva del VHB luego del tratamiento con FAM y/o LAM. El tratamiento con análogos nucleosídicos puede ocurrir en relación con un procedimiento de trasplante (p. ej. trasplante de médula ósea (TMO) o THO) o luego del tratamiento de pacientes con diagnóstico de hepatitis. Luego de la selección de las variantes, se pueden obtener cargas virales a niveles superiores que los niveles pretratamiento.

20 Las mutaciones en la ADN polimerasa del VHB incluyen por ejemplo una o más de Q471K, Q471N, Y472Q, T474A, L478L/M, N485H, Y487Y/PARADA, V/G/E488L, L493L/W, F524F/L, I5331/V, V537I, S548G, S548S/C, N/S/H584T, N/S/H584A, H584S/I, R588R/S e I599A. El término "PARADA" significa un codón de parada. También pueden existir mutaciones correspondientes en el antígeno de superficie (es decir, HBsAg). Los HbsAg preferidos incluyen uno o más de T118R, N131T, M133K/M, M133I, C139C/G y W182/PARADA.

25 Las mutaciones en la ADN polimerasa del VHB de acuerdo con la presente invención se seleccionan entre S548G y S548C.

30 La identificación de las variantes de la presente invención permite la generación de un rango de ensayos para detectar dichas variantes. La detección de dichas variantes puede ser importante para identificar variantes resistentes a fin de determinar la forma adecuada de quimioterapia y/o para controlar los protocolos de vacunación o desarrollar vacunas nuevas o modificadas.

35 Concordantemente, otro aspecto de la presente descripción contempla un método para determinar la posibilidad de que un VHB tenga sensibilidad reducida a FAM y/o LAM y opcionalmente a otros análogos nucleosídicos, donde dicho método comprende aislar el ADN, o el ARNm correspondiente, de dicho VHB y detectar selectivamente una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica a la ADN polimerasa del VHB que resulta en al menos una sustitución, delección y/o adición de un aminoácido en uno o más de los dominios F y A a través de E o una región próxima a ella de dicha ADN polimerasa, y asociada a la resistencia o sensibilidad disminuida a FAM y/o LAM, donde la presencia de dicha mutación es una indicación de la probabilidad de resistencia a dicha FAM y/o LAM y opcionalmente a otros análogos nucleosídicos.

45 De acuerdo con la invención, el ensayo detecta una o más de las mutaciones siguientes en la ADN polimerasa del VHB: S548G y S548C.

50 La detección del VHB o sus componentes en las células, los lisados de células, el líquido sobrenadante de cultivos y el líquido corporal, se puede llevar a cabo por cualquier medio conveniente, incluidos medios de detección basados en ácidos nucleicos, por ejemplo, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos o a través de una o más reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). La expresión "líquido corporal" incluye cualquier líquido derivado de la sangre, la linfa o los sistemas de tejidos u órganos que incluyen suero, sangre entera, biopsia y líquidos de biopsia, explantes de órganos y suspensión de un órgano como suspensiones de hígado. La invención abarca además el uso de diferentes formatos de ensayo de dichos medios de detección basados en ácidos nucleicos, incluidos polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFPL) polimorfismo conformacional de cadena monocatenaria (SSCP), amplificación y detección de bases mal apareadas (AMD) secuencia repetitiva intercalada-reacción en cadena de la polimerasa (IRS-PCR), reacción en cadena inversa de la polimerasa (iPCR) y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), entre otras. Otras formas de detección incluyen transferencias tipo Northern, transferencias tipo Southern, secuenciación por PCR, procedimiento con anticuerpos como ELISA, transferencias tipo Western e inmunohistoquímica. Un ensayo particularmente útil incluye los reactivos y componentes necesarios para sistemas de detección mediados por oligonucleótidos u oligopéptidos inmovilizados.

60 Las variantes también se pueden detectar con referencia al HBsAg. Las mutaciones preferidas de HbsAg incluyen una o más de T118R, N131T, M133K/M, M133I, C139C/G y W182/PARADA.

La presente descripción contempla además agentes que inhiben variantes del VHB resistentes a FAM y/o LAM. Dichos agentes serán particularmente útiles si el médico considera un tratamiento a largo plazo con FAM y/o LAM y/u opcionalmente otros análogos nucleosídicos. Los agentes pueden ser ADN o ARN o moléculas químicas proteicas o no proteicas. La detección sistemática de productos naturales como de plantas, coral y microorganismos también es contemplada como una posible fuente útil de agentes de enmascaramiento. Los agentes pueden estar en forma aislada o en forma de una composición farmacéutica y se pueden administrar secuencialmente o simultáneamente con el análogo nucleosídico.

La presente descripción contempla un método para detectar un agente que presente actividad inhibitora de un VHB con sensibilidad reducida a FAM y/o LAM y opcionalmente otros análogos nucleosídicos, donde dicho método comprende:

generar un constructo genético que contenga una cantidad eficaz competente para la replicación del genoma de dicho VHB resistente a famciclovir contenido en, o fusionado con, una cantidad del genoma de un baculovirus eficaz para infectar células, y después infectar dichas células con dicho constructo;

poner en contacto dichas células, antes, durante y/o después de la infección, con el agente que se va a probar;

cultivar dichas células durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el VHB y opcionalmente el otro VHB se repliquen, expresen secuencias genéticas y/o se ensamblen y/o liberen virus o partículas semejantes a virus si son resistentes a dicho agente; y

someter las células, los lisados de células o el líquido sobrenadante del cultivo a medios de detección de virus o de componentes virales para determinar si el virus se ha replicado, expresado material genético y/o ensamblado y/o ha sido liberado, o no, en presencia de FAM y/o LAM.

En una realización alternativa, la presente invención proporciona un método para detectar un agente para el VHB que presente actividad inhibitora de un VHB con sensibilidad reducida a FAM y/o LAM y opcionalmente a otros análogos nucleosídicos, donde dicho método comprende:

generar un constructo genético que contenga una cantidad eficaz competente para la replicación del genoma de dicho VHB contenido en, o fusionado con, una cantidad de genoma de un baculovirus eficaz para infectar células, y después infectar dichas células con dicho constructo;

poner en contacto dichas células, antes, durante y/o después de la infección, con el agente que se va a probar;

cultivar dichas células durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el VHB se replique, exprese secuencias genéticas y/o se ensamble y/o libere virus o partículas semejantes a virus si son resistentes a dicho agente; y

someter las células, los lisados de células o el líquido sobrenadante del cultivo a medios de detección de virus o de componentes virales para determinar si el virus se ha replicado, expresado material genético y/o ensamblado y/o ha sido liberado, o no, en presencia de dichos FAM y/o LAM.

En otra realización alternativa de la presente invención, se proporciona un método para detectar un agente para el VHB que presente actividad inhibitora de un VHB con sensibilidad reducida a FAM y/o LAM y opcionalmente a otros análogos nucleosídicos, donde dicho método comprende:

generar una línea celular continúa que comprenda una copia infecciosa del genoma de dicho VHB en una cantidad eficaz competente para la replicación de modo que dicho genoma infeccioso del VHB se integre establemente en dicha línea celular continúa como, pero no exclusivamente, en 2.2.15 o AD;

poner en contacto dichas células con el agente que se va a probar;

cultivar dichas células durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el VHB se replique, exprese secuencias genéticas y/o se ensamble y/o libere virus o partículas semejantes a virus si son resistentes a dicho agente; y

someter las células, los lisados de células o el líquido sobrenadante del cultivo a medios de detección de virus o de componentes virales para determinar si el virus se ha replicado, expresado material genético y/o ensamblado y/o ha sido liberado, o no, en presencia de dichos FAM y/o LAM.

La presente descripción describe además un HBsAg aislado de las variantes del VHB descritas en este documento. Más particularmente, la presente descripción proporciona un HBsAg o una de sus formas recombinantes, uno de sus

derivados o de sus equivalentes químicos. El componente de superficie aislado y, más particularmente, el antígeno de superficie aislado o sus equivalentes recombinantes, derivados o químicos son útiles en el desarrollo de composiciones biológicas como formulaciones de vacunas.

5 En consecuencia, la presente descripción contempla una composición que contiene una variante del VHB resistente a famciclovir o un antígeno de superficie del VHB de dicha variante del VHB o una de sus formas recombinantes o derivadas o su equivalente químico. La composición se puede considerar una composición biológica.

10 Generalmente, si se usa un VHB, éste se atenúa primero. La composición biológica de acuerdo con este aspecto de la presente invención comprende además uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

15 La composición biológica puede contener HBsAg o una molécula semejante de una variante del VHB o la composición puede ser un cóctel de varios HBsAg o moléculas semejantes de un rango de variantes de VHB resistentes a FAM y/o LAM. Se aplican inclusiones similares cuando la composición comprende un VHB.

20 La invención en cuestión se extiende a juegos de reactivos para ensayos para variantes del VHB resistentes a FAM y/o LAM de acuerdo con la invención. Dichos juegos de reactivos pueden, por ejemplo, contener los reactivos de PCR u otra tecnología de hibridación de ácidos nucleicos, o reactivos para técnicas de detección basadas en inmunología. Un ensayo particularmente útil incluye los reactivos y componentes necesarios para sistemas de detección mediados por oligonucleótidos u oligopéptidos inmovilizados.

La presente invención contempla además el uso de una variante del VHB de acuerdo con la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxia de la hepatitis.

25 La presente invención también aporta al uso de las variantes del VHB en cuestión para la detección selectiva de agentes antivirales. Esos agentes antivirales inhiben al virus. El término "inhibir" incluye antagonizar o prevenir de otra manera la infección, la replicación, el ensamblaje y/o la liberación o cualquier paso intermedio. Los antivirales preferidos incluyen análogos nucleosídicos, aunque, la presente invención se extiende a moléculas no nucleosídicas.

30 Concordantemente, otro aspecto de la presente invención contempla el uso de una variante del VHB de acuerdo con la invención para detectar selectivamente un antiviral capaz de inhibir dicha variante del VHB.

35 La presente invención se refiere además a una variante del VHB que comprende la mutación S548G o S548C seleccionada luego del tratamiento con LAM de un paciente que fue tratado previamente con FAM/IgHB antes de un trasplante de hígado. La mutación S548G se produjo concomitantemente con las mutaciones L526M, M550V y Y472Q según se detectó mediante secuenciación de los clones derivados del producto amplificado por PCR. Otra mutación, S548S/C se detectó en una cepa de VHB aislada de un paciente tratado con LAM.

40 Una evaluación de una posible variante viral es importante para la selección de un protocolo terapéutico adecuado. Una evaluación de ese tipo es facilitada adecuadamente con la asistencia de una computadora programada con un programa informático que, entre otras cosas, sume valores índices (I_v) para al menos dos características asociadas a las variantes virales para proporcionar un valor de potencia (P_v) correspondiente a la resistencia o sensibilidad de una variante viral a un compuesto químico o un agente inmunológico particular. Los I_v se pueden seleccionar entre
45 (a) la capacidad para presentar resistencia debido a la sensibilidad reducida a un compuesto o agente inmunológico particular; (b) una ADN polimerasa de VHB tipo nativo alterada; (c) un antígeno de superficie de VHB tipo nativo alterado; o (d) la morbilidad o la posible recuperación de un paciente. Por lo tanto, de conformidad con la presente invención, los I_v para dichas características se almacenan en un medio de almacenamiento lisible por una máquina,
50 que sea capaz de procesar los datos para proporcionar una P_v para una variante viral particular o una muestra biológica que la contenga.

Por consiguiente, en otro aspecto, la descripción contempla un producto de un programa informático para evaluar la probable utilidad de un variante viral o muestra biológica que lo contenga para determinar un protocolo terapéutico adecuado en un sujeto, donde dicho producto comprende:

55 (1) un código que recibe como entrada los I_v para al menos dos características asociadas a dichos agentes virales o muestra biológica que los contiene, donde dichas características se seleccionan entre:

60 (a) la capacidad para presentar resistencia debido a la sensibilidad reducida a un compuesto o agente inmunológico particular;
(b) una ADN polimerasa del VHB de tipo nativo alterada;
(c) un antígeno de superficie del VHB de tipo nativo alterado; o
(d) la morbilidad o la posible recuperación de un paciente;

(2) un código que suma dichos I_v para proporcionar una suma correspondiente a un P_v de dichas variantes virales o muestras biológicas; y

(3) un medio leíble por una computadora que almacena los códigos.

5 En un aspecto relacionado, la invención se extiende a una computadora para evaluar la posible utilidad de una variante viral o de una muestra biológica que la contiene en un sujeto, donde dicha computadora comprende:

10 (1) un medio para almacenamiento de datos leíbles por una máquina que contiene un material de almacenamiento de datos codificado con datos leíbles por una máquina, donde dichos datos leíbles por una máquina comprenden los I_v para al menos dos características asociadas a dicha variante viral o muestra biológica; donde dichas características se seleccionan entre:

15 (a) la capacidad para presentar resistencia debido a la sensibilidad reducida a un compuesto o agente inmunológico particular;
 (b) una ADN polimerasa del VHB de tipo nativo alterada;
 (c) un antígeno de superficie del VHB de tipo nativo alterado; o
 (d) la morbilidad o la posible recuperación de un paciente;

20 (2) una memoria de trabajo para almacenar instrucciones para procesar dichos datos leíbles por una máquina;

(3) una unidad de procesamiento central acoplada a dicha memoria de trabajo y a dicho medio de almacenamiento de datos leíbles por una máquina, para el procesamiento de dichos datos leíbles por una máquina para obtener la suma de dichos I_v correspondientes a un P_v para dicho(s) compuesto(s); y

25 (4) un equipo de computación de salida acoplado a dicha unidad procesadora central, para recibir dicho P_v .

Una versión de esas realizaciones se presenta en la Figura 3, que muestra un sistema 10 que incluye una computadora 11 que comprende una unidad de procesamiento central (CPU) 20, una memoria de trabajo 22 que puede ser, p. ej. RAM (memoria de acceso aleatorio) o memoria "central", memoria de almacenamiento masivo 24 (como una o más unidades de disco o unidades CD-ROM), una o más terminales con pantalla de tubo de rayos catódicos ("CRT") 26, uno o más teclados 28, una o más líneas de entrada 30 y una o más líneas de salida 40, todas las cuales están interconectadas por un sistema bidireccional bus convencional 50.

35 El equipo de computación de entrada 36, acoplado a una computadora 11 por las líneas de entrada 30, se puede implementar de diversas maneras. Por ejemplo, los datos leíbles por una máquina de esta invención pueden ser ingresados a través del uso de un módem o módems 32 conectados mediante una línea de teléfono o una línea de datos de uso exclusivo 34. Alternativamente o además, el equipo de computación de entrada 36 puede contener un CD. Alternativamente, las unidades ROM o las unidades de disco 24 conjuntamente con la terminal con pantalla 26 y el teclado 28 también se pueden usar como un dispositivo de entrada.

45 El equipo de computación de salida 46, acoplado a la computadora 11 por las líneas de salida 40, puede de manera similar ser implementado mediante dispositivos convencionales. A modo de ejemplo, el equipo de computación de salida 46 puede incluir una terminal con pantalla CRT 26 para mostrar una secuencia de polinucleótidos sintética o una secuencia de polipéptidos sintética como las descritas en este documento. El equipo de computación de salida podría también incluir una impresora 42, para que se pueda producir una salida impresa, o una unidad de disco 24, para almacenar la salida del sistema para un uso posterior.

50 Cuando está funcionando, la CPU 20 coordina el uso de diversos dispositivos de entrada y salida 36, 46 coordina los accesos de los datos del almacenamiento masivo 24 y accede a, y desde, la memoria de trabajo 22, y determina la secuencia de pasos de procesamiento de los datos. Varios programas se pueden usar para procesar los datos leíbles por una máquina de esta invención. Los programas de ejemplo pueden usar, por ejemplo, los pasos siguientes:

55 (1) ingresar los I_v de entrada para al menos dos características asociadas a dicho(s) compuesto(s), donde dichas características se seleccionan entre:

60 (a) la capacidad para presentar resistencia debido a la sensibilidad reducida a un compuesto o agente inmunológico particular;
 (b) una ADN polimerasa del VHB de tipo nativo alterada;
 (c) un antígeno de superficie del VHB de tipo nativo alterado; o
 (d) la morbilidad o la posible recuperación de un paciente;

(2) sumar los I_v para dichas características y proporcionar un P_v para dicho(s) compuesto(s); y

(3) dar como salida dicho P_v.

La Figura 4 muestra un corte transversal de un medio magnético de almacenamiento de datos 100 que puede ser codificado con datos leíbles por una máquina, o un conjunto de instrucciones, para diseñar una molécula sintética de la invención, lo que se puede llevar a cabo mediante un sistema como el sistema 10 de la Figura 3. El medio 100 puede ser convenientemente un disco flexible o un disco duro, que tengo un sustrato adecuado 101, que puede ser convencional, y un recubrimiento adecuado 102, que puede ser convencional, en uno o ambos lados, que contenga dominios magnéticos (no visibles) cuya polaridad u orientación se pueda alterar magnéticamente. El medio 100 también puede tener una abertura (no se muestra) para recibir el eje de una unidad de disco u otro dispositivo de almacenamiento de datos 24. Los dominios magnéticos del recubrimiento 102 del medio 100 se polarizan u orientan de modo decodificar de manera que puede ser convencional, los datos leíbles por una máquina como los descritos en este documento, para la ejecución mediante un sistema como el sistema 10 de la Figura 3.

La Figura 5 muestra un corte transversal de un medio de almacenamiento de datos leíbles ópticamente 110 que también puede ser codificado con dichos datos leíbles por una máquina, o conjunto de instrucciones, para diseñar una molécula sintética de la invención, lo cual se puede llevar a cabo mediante un sistema como el sistema 10 de la Figura 3. El medio 110 puede ser un disco compacto de memoria sólo de lectura (CD-ROM) convencional o un medio que se pueda reescribir como un disco magneto-óptico que se puede leer ópticamente y escribir magneto-ópticamente. El medio 110 tiene preferentemente un sustrato adecuado 111, que puede ser convencional, y un recubrimiento adecuado 112, que puede ser convencional, usualmente de un lado del sustrato 111.

En el caso del CD-ROM, como es bien sabido, el recubrimiento 112 es reflector y está impreso con una cantidad de marcas 113 para codificar los datos leíbles por la máquina. El reordenamiento de las marcas se lee por reflexión de la luz láser desde la superficie de recubrimiento 112. Un recubrimiento protector 114, que preferentemente es sustancialmente transparente, se proporciona por encima del recubrimiento 112.

En el caso de un disco magneto-óptico, como es bien sabido, el recubrimiento 112 no tiene marcas 113, pero tiene muchos dominios magnéticos cuya polaridad u orientación se puede cambiar magnéticamente cuando se calienta por encima de cierta temperatura, como mediante un láser (no se muestra). La orientación de los dominios se puede leer midiendo la polarización de la luz láser reflejada desde el recubrimiento 112. El reordenamiento de los dominios codifica los datos según se describió antes.

La presente invención se describe más a fondo mediante los ejemplos no limitantes siguientes.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

Pacientes y tratamiento

Se estudiaron ocho pacientes que recibieron un alotrasplante de médula ósea en el centro Bone Marrow Transplant Center en Queen Mary Hospital, Hong Kong. Todos fueron tratados con FAM para la profilaxia contra la reactivación del VHB post-TMO, según se informó previamente (23). En resumen, todos los pacientes recibieron 250 mg de FAM oral tres veces al día durante al menos una semana (rango: 1-12 semanas) antes del TMO y continuaron durante 24 semanas después del TMO. Los niveles de FAM se aumentaron a 500 mg tres veces al día en los pacientes que presentaban o bien valores elevados de ADN del VHB o la detección inicial de HBsAg como un marcador de la reactivación del VHB. Dos pacientes se trataron con FAM y/o LAM después de un trasplante de hígado.

La serología de la hepatitis y el ensayo de cuantificación de ADN del VHB sérico, los marcadores serológicos de la hepatitis B, incluidos HBsAg, anti-Hbs, HBeAg, anti-HBe, anti-virus de la hepatitis C (VHC; por EIA II), anti-virus de la hepatitis D y anti-VIH, se analizaron mediante enzimoimmunoensayos comerciales (Abbott Laboratories, Chicago, IL, Estados Unidos). El anticuerpo del núcleo de la hepatitis B (anti-HbC) total se analizó mediante radioinmunoensayo (Corab, Abbott Laboratories, Chicago, IL, Estados Unidos). El ADN del VHB sérico se cuantificó mediante el ensayo de amplificación de la señal de ADNb (bDNA Quantiplex TM HBV DNA, Chiron, Emeryville, CA, Estados Unidos). Se analizaron muestras seriadas del mismo paciente en una misma corrida para minimizar la variación interensayo.

Ejemplo 2

Extracción de ADN del VHB del suero del paciente

Se obtuvieron sueros de 10 pacientes en diferentes momentos y se les extrajo el ADN del VHB. Se mezclaron alícuotas de 50 µl del suero con 150 µl de TE (10 mmol/L de Tris-HCl (pH 7.5), 2 mmol/l de EDTA), dodecilsulfato de sodio al 1% p/v y 1 mg/ml de proteinasa K y se incubaron a 55 °C durante 30 min. El ADN se desproteinizó con fenol/cloroformo, se precipitó con isopropanol y se disolvió en 40 µl de agua exenta de nucleasa.

Ejemplo 3

Amplificación por PCR

5 Se amplificaron el dominio catalítico de la proteína polimerasa y el determinante "a" de la proteína de superficie. Se usaron en la amplificación el cebador sentido (5'-GCC TCA TTT T GTG GGT CAC CAT A-3' [SEC. ID N°:1]) y el cebador antisentido (5'-TCT CTG ACA TAC TTT CCA AT-3' [SEC. ID N°:2]) (Bresatec, Adelaide, Australia) de la primera ronda. Cada reacción se llevó a cabo usando 5 µl del ADN extraído como molde, 1.5 U de polimerasa Taq (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT), 1 µmol/l de cebadores sentido y antisentido, 200 µmol/l de Tris-HCl (pH 8.3) y
 10 gelatina al 0.01% p/v. Se realizó una PCR mediante 40 ciclos de desnaturalización (94 °C durante 45 s), apareamiento (55 °C durante 45 s) y extensión (72 °C durante 1.5 min), seguido de una extensión final de 7 min (Perkin-Elmer 2400, Cetus, Norwalk, CT). Se realizó otra ronda de amplificación hemi-anidada cuando fue necesario, usando 2 µl el producto de la primera ronda como molde y el cebador 5' CAC AAC AAT CCA CCA AGC T3' [SEC. ID N°:3] como cebador sentido. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que para la ronda inicial de
 15 amplificación, con sólo 25 rondas de ciclación.

Ejemplo 4

Secuenciación de la polimerasa/los genes de envoltura del ADN del VHB

20 Los productos amplificados se purificaron en gel usando GeneClean II (BIO 101 Inc., La Jolla, CA) y se secuenciaron directamente usando el juego de reactivos ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction según las especificaciones del fabricante (Perkin Elmer, Cetus Norwalk, CT). Se usaron los cebadores de la PCR como
 25 cebadores de secuenciación así como otros varios cebadores (5'-AAA TTC GCA GTC CCC AAC-3 [SEC. ID N°:4]', 5'-TCT CTG ACA TAC TTT CCA AT-3' [SEC. ID N°:5] y 5'-GAT TCC CTC CTG TTG CTG T-3' [SEC. ID N°:6]) necesarios para secuenciar las regiones internas de los productos de la PCR. Se usaron MacVector y Assembly LIGN (MacVector versión 6.0 y Assembly LIGN, Oxford Molecular, Reino Unido) para analizar todos los datos de secuencia automáticos. Las secuencias de aminoácidos deducidas se compararon con el aislado pretratamiento individual usando el subprograma clustal W y con la secuencia de consenso de la polimerasa del VHB y las
 30 secuencias del HBsAg publicadas (38-40).

Ejemplo 5

Mutaciones de la polimerasa del VHB

35 En este estudio, las variantes del VHB dominantes seleccionadas después del TMO y el tratamiento con FAM se examinaron mediante secuenciación de la región analítica del gen de la polimerasa y el determinante "a" del HBsAg. Se detectaron varios cambios de aminoácidos deducidos en la región catalítica del gen que codifica la polimerasa del VHB, sin embargo, la mayoría de esos cambios fueron compatibles con los cambios que se encuentran
 40 normalmente en los genotipos del VHB. Las mutaciones exclusivas del VHB detectadas durante el tratamiento se listan en la Tabla 1. En seis de los ocho pacientes, se detectó una mutación en la polimerasa en el aminoácido 584, en el cual se detectó una tirosina, o alanina, o serina/isoleucina (población mixta) (Tabla 1). En cuatro de los ocho pacientes, esta mutación se detectó durante el tratamiento con FAM y en los dos pacientes restantes, la mutación se detectó antes del tratamiento. Este cambio de aminoácido se produjo después del codón de terminación del HBsAg
 45 en el marco de lectura superpuesto. Los otros cambios de aminoácidos deducidos que se detectaron en aislados de múltiples pacientes incluyeron cambios en los aminoácidos 471, 474, 485 y 499. Esos cambios se ubicaron en la región entre los dominios A y B y se superponen al determinante "a" del HBsAg. Se detectó un cambio en el dominio B de la polimerasa en F524F/L. No se detectaron mutaciones exclusivas en el dominio C que contiene el motivo "YMDD". Los cambios que no afectan al HBsAg y sólo afectan a la polimerasa incluyen Q471K, T474A, L478L/M,
 50 F524F/L y I533I/V (Tabla 1).

En dos de los dos pacientes con trasplante de hígado, se detectó una mutación en el codón 548. La mutación S548G se produjo concomitantemente con las mutaciones L526M, M550V e Y472Q según se detectó mediante
 55 secuenciación de los clones derivados del producto amplificado por PCR. Otra mutación, G548S/C se detectó en una cepa de VHB aislada de un paciente tratado con LAM.

Ejemplo 6

Mutaciones de HBsAg

60 Se detectaron varios cambios en el gen que codifica al HBsAg, sin embargo, la mayoría de esos cambios fueron compatibles con los cambios en el genotipo del VHB. Las mutaciones exclusivas que alteran tanto al HBsAg como a la polimerasa se listan en la Tabla 1 y otras mutaciones que alteran sólo al HBsAg se listan en la Tabla 2. Los cambios en HBsAg detectados en 133, 139, 145 y 182 son variantes que no se detectan en otros genotipos (39,40).

ES 2 384 343 T3

En dos pacientes, se detectó una mutación G145R después del TMO y el tratamiento con FAM. En uno de esos pacientes, se detectó una población mixta que contenía virus del tipo nativo y virus con un HBsAg truncado debido a un codón de terminación. Dos mutaciones que dieron como resultado un HBsAg truncado se detectaron en otros dos pacientes. Esos codones de terminación se encontraron en el aminoácido 182 y 216 (Tablas 1 y 2).

- 5 Ejemplo 7
- Clonación de los productos de la PCR
- 10 Los productos de la PCR de la primera o de la segunda ronda de amplificación por PCR se purificaron usando GeneClean (Bio 101 Inc., La Jolla, CA) se clonaron en un pCR script (Stratagene) según las especificaciones del fabricante.

15 Tabla 1 Mutaciones de la polimerasa del VHB y cambios en el marco de lectura superpuesto del HBsAg

Mutación de la polimerasa del VHB	Aislado	Cambio de AA en el HBsAg
Q471K	A-3, 4,5; D-1,2,3; F-3	sin cambio
Q471N		
Y472Q	SS	T1184
T474A	C-2; D-1,2; E-5	sin cambio
L478L/M	E-6	sin cambio
N485H	A-3,4,5; B-1,2; D-4	N131T
Y487Y/STOP	C-6	M133K/M
V/G/E488L	B1,2	M133I*
L493L/W	A -4	C139C/G*
F524F/L	E-6	sin cambio
I533I/V	E-5	sin cambio
V537I	E-9	W182/PARADA
S548G	SS	sin cambio
S548S/C	MS	sin cambio
N/S/H584T	A-2; B-3; E-4; H-1,2,3,4,5,6	después de PARADA de HBsAg
N/S/H584A	C-1,3,4,5,6	
H584S/I	D-5	
R588R/S	B-4	después de PARADA de HBsAg
I599A	F-10	después de PARADA de HBsAg

*Cambios que no se detectaron como variantes comunes en otro genotipo del VHB.

Tabla 2 Cambios en el HBsAg que no alteran a la proteína polimerasa del VHB

HBsAg	Cepa aislada
Y225F	A3,4,5; D-4; F-3
Q181E	C-1
Q181G	C-2,3,4,5
Q181Q/G	C-6
S210K	C1,3,4,5
L216STOP	C1,C6
L216L/STOP	C,3,4,5

HBsAg	Cepa aislada
S117T	E-9
L175L/S	E-6

Bibliografía

1. Summers, J. and Mason, W. Cell 29: 403-415, 1982.
- 5 2. Vere Hodge, R.A. Antiviral Chem. Chemother 4: 67-84, 1993.
3. Boyd et al. Antiviral Chem. Chemother 32: 358-363, 1987.
4. Kruger et al. Hepatology 22: 219A, 1994.
5. Main et al. J. Viral Hepatitis 3: 211-215, 1996.
6. Severini et al. Antimicrobiol. Agents Chemother 39: 1430-1435.
- 10 7. Dienstag et al. New England J. Med. 333: 1657-1661, 1995.
8. Lau et al. Bone Marrow Transplant 19: 795-9, 1997.
9. Reed et al. Blood 77: 195-200, 1991.
10. Pariente et al. Dig Dis Sci 33: 1185-91, 1988.
11. Liang et al. J. Clin. Oncol. 1999 (in press).
- 15 12. Chen et al. Transplantation 49: 708-13, 1990.
13. Ilan et al. Gastroenterology 104: 1818-21, 1993.
14. Lok et al. Ann. Intern. Med. 116: 957, 1992.
15. Ustun et al. Hepatology 25: 1497-1501, 1997.
16. Lau et al. Hepatology 25: 1497-1501, 1997.
- 20 17. Lau et al. J. Infect. Dis. 178: 1585-91, 1998.
18. Shaw et al. Antimicrob. Agents Chemother 38: 719-23, 1994.
19. Bartholomeusz et al. Intervirology 40: 337-42, 1997.
20. Tsiquaye et al. J. Med. Virol. 42: 306-10, 1994.
21. Trepo et al. J. Hepatol. 26(1): 74, 1997.
- 25 22. Main et al. Viral Hepat. 3: 211-5, 1996.
23. Lau et al. J. Hepatol. 28: 359-68, 1998.
24. Lau et al. Hepatology 28: 590A, 1998.
25. Kruger et al. Liver Transpl. Surg. 2: 253-62, 1996.
26. Singh et al. Transplantation 63: 1415-9, 1997.
- 30 27. Haller et al. Transpl. Int. 9(1): S210-2, 1996.
28. Boker et al. Transplantation 27: 1706-8, 1994.
29. Lau et al. Hepatology 29: 580A, 1998.
30. Aye et al. J. Hepatol. 26: 1148-53, 1997.
31. Naumov, N.V. J. Hepatol. 24: 282A, 1996.
- 35 32. Pichoud et al. Hepatology 29: 230-37.
33. Locarnini S.A. Hepatology 27: 294-297, 1998.
34. Protzer-Knoll et al. Hepatology 27: 254-63, 1998.
35. Locarnini et al. Hepatology 26: 368A, 1997.
36. De Man et al. Hepatol. 29: 669-75, 1998.
- 40 37. Poch et al. EMBO J 8: 3867-3874, 1989.
38. Bartholomeusz et al. International Antiviral News 5: 123-124, 1997.
39. Norder et al. J Gen Virol 74: 1341-1348, 1993.
40. Norder et al. Virology 198: 489-503, 1994.
41. Lesburgetal. Nature 6: 937-943, 1999.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante del VHB aislada que contiene una mutación en la ADN polimerasa del VHB seleccionada entre S548G y S548C donde dicha variante tiene sensibilidad disminuida a un análogo nucleosídico.
- 10 2. Un método para determinar la posibilidad de que un VHB presente una sensibilidad reducida a un análogo nucleosídico, donde dicho método comprende aislar el ADN, o el ARNm correspondiente, de dicho VHB y someterlo a una detección selectiva de una mutación en la secuencia de nucleósidos que codifica la ADN polimerasa del VHB lo que resulta en al menos una mutación de un aminoácido seleccionado entre S548G y S548C donde la presencia de dicha mutación es una indicación de la probabilidad de resistencia a dicho análogo nucleosídico.

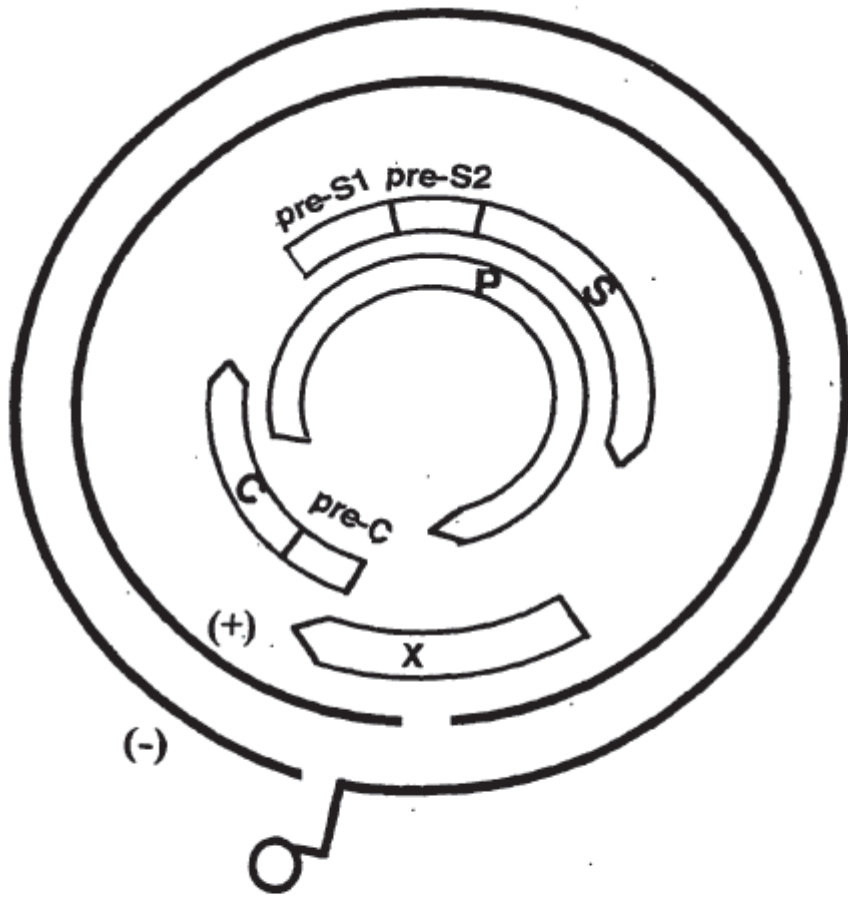


Figura 1

DOMINIO A

421 430 440 450
S^N_DLSWLSLD VSAAFYH^I_PPL HPAAMPHELL^I_V GSSGL^S_DRYVA

460 470 480 490
 RLSS^T_NSR^N_NI^{*}_N NYHQ^H_YR***D^N_NLH D^N_SYCSR^N_QLYVS L^L_MLLY^K_QT^Y_PGR^R_W

DOMINIO B

500 510 520 530
KLHL^V_LSAHPI^I_V LGFRK^I_LPMG^V_G GLSPFLLAQF TSAI^C_LAS^V_MVT^R_{CR}

DOMINIO C

540 550 560
APF^P_HCL^V_AVFS^A_Y MDD^V_LMVLGA^K_RS^T V^G_QEH^L_SRE^S_FLF^T_YA^S

DOMINIO D DOMINIO E

570 580 590 600
V^I_TC^N_SFVLL^S_DL^V_{GI} HLN^P_NQ^R_{TKRW} GYSLNFMGY^V_II^G

Figura 2

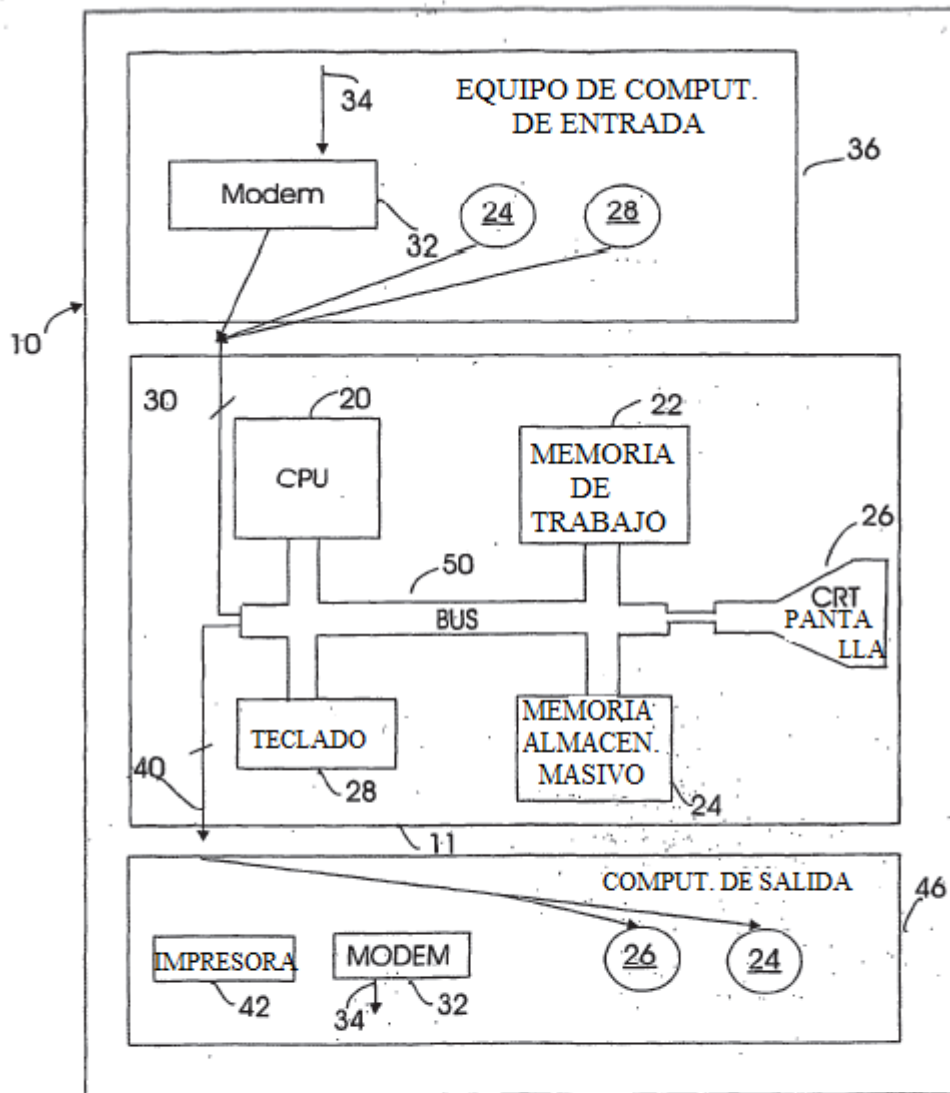


Figura 3

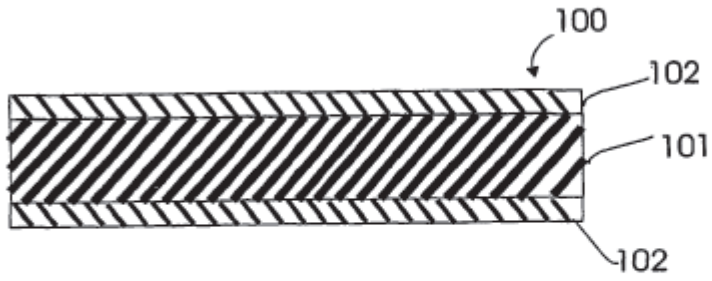


Figura 4

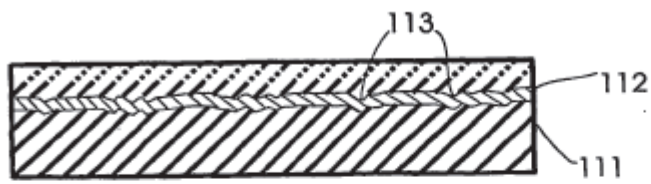


Figura 5