

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 481**

51 Int. Cl.:
C07K 14/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04739975 .3**
- 96 Fecha de presentación: **17.06.2004**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1638994**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **Nueva variante de proteína de superficie (HbsAg) del virus de hepatitis B**

30 Prioridad:
20.06.2003 DE 10328080

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.07.2012

73 Titular/es:
**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH
GÖRZHÄUSER HOF EMIL-VON-BEHRING-
STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:
KRUPKA, Udo

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 385 481 T3

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

DESCRIPCIÓN

Nueva variante de proteína de superficie (HbsAg) del virus de hepatitis B.

5 La invención se refiere a secuencias de un nuevo mutante o una variante de Hepatitis B *surface Antigens* (HBsAg) y a métodos para detectar esta variante de genoma y de proteína así como anticuerpos, de muestras de pacientes, dirigidos hacia la misma.

Las nuevas secuencias conducen a 5 sustituciones de aminoácidos aún desconocidas en el antígeno de superficie de la hepatitis B (Hepatitis B *surface Antigen*, HbsAg) en las posiciones de aminoácido 115 a 181 de la secuencia de aminoácido del *surface Antigens*, en cuyo caso se encuentran 4 sustituciones en la región del a-determinante (aa 101 hasta aa 180) así como 1 sustitución en la inmediata vecindad de la misma (aa 181).

10 La invención también se refiere a métodos de detección inmuno-químicos para la detección simultánea de esta nueva variante de HBV junto con variantes/subtipos conocidos así como al uso de las nuevas secuencias para la detección simultánea de anticuerpos específicos de HBV. Las determinaciones de antígeno o de anticuerpos pueden realizarse respectivamente en un método de ensayo de manera diferencial o no diferencial.

15 Finalmente, la invención también se refiere a la detección de los ácidos nucleicos correspondientes con ayuda de los llamados ensayos de ácido nucleico (por ejemplo, *Polymerase Chain Reaction*, PCR) con ayuda de cebadores (primer) adecuados así como al uso de las nuevas secuencias de aminoácidos para generar vacunas.

20 Como se sabe, el virus de la hepatitis B es el responsable de una gran cantidad de desarrollos patológicos desde infecciones suaves no aparentes hasta inflamaciones del hígado (hepatitis viral) causadas por infecciones virales, que son activas de manera crónica y tienen un desarrollo fulminante. La infección crónica con HBV representa un problema de salud global con un estimado de 400 millones de personas afectadas (Lee, N. Engl. J. Med. 337; 1733-1745 (1997)).

La inmunización activa (estimulando la respuesta de anticuerpo mediante administración de un antígeno) y la inmunización pasiva (producida inyectando anticuerpos preformados) se consideran como la profilaxis más adecuada para la infección con HBV que puede encontrarse frecuentemente a nivel mundial.

25 El HBV pertenece a los virus Hepadna y representa una partícula de virus con un diámetro de 42 nm que consiste en un núcleo y una envoltura. El genoma del virus es una secuencia de ADN anular, bicatenaria de aproximadamente 3200 nucleótidos que codifican al menos seis diferentes genes virales (Tiollais et al., Nature 317: 489-495 (1985)).

Se presentan cuatro marcos de lectura abiertos para la formación de la proteína viral.

30 En el gen S se encuentra la información para el HBV surface Antigen (HBsAg), el cual también se llama small protein (S). Además, también hay formas más grandes que se denominan proteína grande (*large protein* (L)) y una proteína mediana (*middle protein* (M)). Todas las tres proteínas tienen en común la secuencia S-HbsAg que comprende 226 aminoácidos (Gerlich et al., Viral Hepatitis and Liver Disease, Hollinger et al., William-Wilkens, Baltimore, MD, páginas 121-134 (1991)). Las regiones de proteína de la small HBs también se denominan Pre-S1 y Pre-S2, comprenden 108 o 55 aminoácidos y están comprendidas ambas en la proteína L (389 aminoácidos), mientras que 35 la proteína M solo comprende Pre-S2 junto con el antígeno A (281 aminoácidos). Las proteínas Pre-S tienen diferentes grados de glicosilación y llevan los receptores para el reconocimiento de las células hepáticas. A menos que se indique algo diferente, las posiciones de aminoácido en esta solicitud se refieren al antígeno S (226 aa) sin región Pre-S1 y sin región Pre-S2.

40 El gen C lleva la información para la proteína de nucleocápsida, Hepatitis B *Core Antigen* (HBcAg). La traducción de esta proteína puede comenzar ya en la región pre-C y conduce a la formación de antígeno Be de hepatitis (HBeAg). El HBeAg, en comparación con HbcAg, tiene un plegado y una inmunogenicidad diferentes. En contraste con HbcAg, HBeAg tiene lugar en forma libre en el suero y, al detectarse de manera positiva, se considera como un indicador de la formación de HBcAg y, por consiguiente, de la formación de partículas virales infecciosas.

45 La polimerasa de ADN de transcripción inversa que está presente en la partícula de virus se codifica por el gen P y se discute la posibilidad de que el gen transactivador X tenga un papel causal en la aparición de carcinomas de células hepáticas primarias, asociadas con HBV.

50 El ciclo de replicación viral de HBV incluyen ARN pre-genómico intracelular que se transcribe inversamente en la nucleocápsida viral, al ADN. Puesto que la polimerasa de ADN que es intrínseca al HBV no posee ninguna capacidad de lectura de corrección (*proof-reading capability*), se incorporan nucleótidos incorrectos a una frecuencia relativamente alta. Como consecuencia, HBV exhibe una tasa de mutación que, a aproximadamente 1 nucleótido /10

000 bases /año de infección, corresponde a cerca de 10 veces la tasa exhibida por otros virus ADN (Blum, Digestion 56: 85-95 (1995); Okamoto et al., Jpn. J. Exp. Med. 57: 231-236 (1987)).

Además, también ocurren muy frecuentemente deleciones e inserciones (Carman et al., Lancet 341: 349-353 (1993)).

5 La variabilidad resultante de HBV se expresa, entre otras, en la ocurrencia de 9 subtipos serológicamente definidos (Courouce et al., Bibliotheca Haematologica 42: 1 (1976) y un total de al menos 6 genotipos diferentes que se denominan como A hasta F (Fig. 1) y presentan una dispersión geográfica. (Norder et al., J. Gen. Virol. 73: 3141-3145 (1992), Norder et al., Virology 198: 489-503 (1994)).

10 Además, se ha descrito una serie de mutantes en los que se encuentran sustituidos, faltan o sobran 1 aminoácido o varios.

15 Aparte de las mutaciones que tienen lugar de manera natural (Cooreman et al., Hepatology 30: 1287-1292 (1999), una administración de inmunoglobulinas de HBV y/o una terapia antiviral (por ejemplo, con lamivudina) puede ejercer una llamada presión de selección que conduce a un incremento en la ocurrencia de lo los llamados "escape mutantes" y puede incrementar de manera ostensible la probabilidad de aparición de mutantes de HBV (Terrault et al., Hepatology 28: 555-561 (1998); Tillmann et al., Hepatology 30: 244-256 (1999); Hunt et al., Hepatology 31: 1037-1044 (2000)).

20 No todas la mutaciones de HBV conducen a virus capaces de replicación y frecuentemente hay coexistencia con virus capaces de replicación, una situación que también limita la precisión de la secuenciación de ADN aislado o incluso conduce a un no reconocimiento de secuencias modificadas por PCR, trabajos de clonación con secuenciación subsiguiente, cuando éstas constituyen cuantitativamente < 10 % del ADN total (Cooreman et al., J. Biomed. Sci. 8: 237-247 (2001)).

Por consiguiente es ventajoso aislar mutantes con la identificación y caracterización subsiguientes de mutantes individuales que conducen a vacunas y agentes de diagnóstico mejorados.

25 La respuesta inmune después de una infección con HBV se dirige principalmente contra el llamado a-determinante, como una región de la proteína S que es común a todos los virus de hepatitis B y dicha región se localiza sobre la superficie de las partículas de virus (Gerlich et al., supra) y representa la parte más heterogénea del epítope de célula B del gen S.

30 De acuerdo con el actual estado del conocimiento, un total de al menos 5 epítopes que se solapan parcialmente en el a-determinante entre posiciones de aminoácido 101 y 180 se suponen sitios de enlace para anticuerpos (Fig. 1 y 2) tal como se ha podido mostrar usando anticuerpos monoclonales (Peterson et al., J. Immunol. 132: 920-927 (1984)).

Estos epítopes son principalmente epítopes de conformación compleja que se estabilizan mediante varios puentes de disulfuro. También se presentan algunos epítopes de secuencia que pueden producirse usando estructuras peptídicas cíclicas preparadas sintéticamente.

35 99 % de los llamados "anticuerpos protectores" que circulan en el suero después de una infección natural con HBV, se dirigen contra el a-determinante muy inmunogénico del HBV (Jilg, Vaccine 16: 65-68 (1998)).

40 En este hecho se fundamenta el uso difundido de la inmunización con vacunas que hayan sido aisladas de suero humano o preparado de manera recombinante (por ingeniería genética), y la administración de inmunoglobulinas de hepatitis B que contienen anticuerpos humanos específicos para HBV. Ambas estrategias profilácticas se basan en el efecto neutralizante que despliegan los anticuerpos específicos de HBs después de enlazarse al "a-Loop-Epitope" (Carman et al., Hepatology 24: 489-493 (1996), Muller et al., J. Hepatol. 13: 90-96 (1991) y Samuel et al., N. Engl. J. Med. 329: 1842-1847 (1993)).

De manera similar, los agentes de diagnóstico que se usan ampliamente hoy en día se basan en el enlazamiento de anticuerpos específicos para a-determinante con epítopes del a-determinante.

45 De esta manera, en el caso de la determinación de HbsAg, usando métodos de determinación inmuno-químicos, que se emplea mundialmente en el campo de la donación de sangre, el antígeno de superficie de HBV que circula en el suero del donante se detecta usando anticuerpos (de origen policlonal o monoclonal) que se dirigen contra el a-determinante y, si el resultado es positivo, se descarta la sangre donada correspondiente para prevenir infecciones con HBV iatrogénicas debido a sangre contaminada con HBV. Otra aplicación en la determinación de HbsAg se encuentra en la detección de una infección con HBV aguda existente. A la inversa, un resultado positivo al

50

determinar anticuerpos específicos de HBs (anti-HBs) en la sangre de los sujetos a prueba demuestra que o bien una infección natural ha tomado su curso o que una vacunación llevada a cabo ha sido exitosa.

5 Finalmente, los ensayos de ácido nucleico, es decir, por medio de la reacción de cadena de polimerasa (*Polymerase-Chain* (PCR)) también se basa en el uso de cebadores (*primers* o *starters*) que son específicos para los nucleótidos de HBV.

10 Debido al rol central que el a-determinante desempeña en la inmunización activa (vacunación con antígeno de HBV), inmunización pasiva (protección por medio de inmunoglobulinas específicas de HBV), detección del éxito de una vacunación o de una infección con HBV que haya tenido lugar (ambas por medio de anticuerpos específicos de HBsAg determinantes, es decir anti-HBs) y, finalmente, la seguridad en el campo de la donación de sangre (determinación de HBsAg y PCR) es entendible que la aparición de mutantes y también de nuevas variantes, se siga con gran atención en los círculos especialistas.

15 Como consecuencia, los nuevos mutantes y/o las variantes que fueron modificadas en el a-determinante del HBV, pero que eran capaces de replicación, podrían menoscabar tanto el concepto de la profilaxis como también el concepto diagnóstico (Brind et al., *J. Hepatol.* 26: 228-235 (1997), Fischer et al., *Transplant Proc.* 31: 492-493 (1999), Ghany et al., *Hepatology* 27: 213-222 (1998), Protzer-Knolle et al., *Hepatology* 27: 254-263 (1998), Carman et al., *Gastroenterology* 102: 711-719 (1992) y Coleman et al., WO 02/079217 A1, (2002)). La EP- 1 142 906 A1 describe una variante de HBsAg que en la posición 120 tiene glutamina en lugar de prolina. Cooreman MP et al., *Hepatology* 30: 1287-1292 (1999) divulgan anticuerpos que se enlazan a los mutantes de HBsAg y también a HBsAg de tipo silvestre. Además, se ha encontrado una publicación sobre el gen activador plasminógeno de tipo uroquinasa murínica en el que se revela un polipéptido que corresponde aleatoriamente a un segmento corto de la secuencia de HBsAg mutada, divulgada en la presente (Degen SJ et al., *Biochemistry* 26: 8270-8279 (1987)).

20 La diferenciación de variantes y mutantes del HBV no es nítida, en cuyo caso una propuesta a este respecto encuentra amplia aplicación (Carman, *J. Viral Hepat.* 4 (suppl.1): 11-20 (1997).

25 De acuerdo con esta propuesta, la denominación "variante" debe usarse para subtipos de ocurrencia natural que aparecen sin ninguna interferencia conocida debido a la presión de selección (terapia antiviral y/o administración de inmunoglobulina) y exhiben un patrón de dispersión geográfica.

30 La caracterización y la subsiguiente clasificación de los subtipos se efectúan usando anticuerpos monoclonales y se basan en un cambio en los patrones de reacción debido a uno o a varios aminoácidos que se sustituyen. Las posiciones de aminoácido 122 y 160 de la secuencia de HBV más ampliamente difundida: aa 122 y aa 160 = lisina, K, constituyen la base para la clasificación.

35 Todos los serotipos contienen el a-determinante específico del grupo mientras que el aa 122 y adicionalmente el 133 y el 134 determinan el subtipo d o r y el aa 160 determina la membrecía del subtipo w o r. Con base en esto, los subtipos de HBV pueden dividirse de manera gruesa en adr, adw, ayr o ayw, los cuales pueden diferenciarse además en al menos 9 subtipos: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adwr2, adw4, adrq+ y adrq- (Swenson et al., *J. Virol. Meth.* 33: 27-28 (1991), Blitz et al. *J. Clin. Microbiol.* 36: 648-651, Ashton-Rickardt et al., *J. Med. Virol.* 29: 204-214 (1989)).

Puesto que esta clasificación se basa en reactividad serológica, cada tipificación no tiene que significar necesariamente variabilidad al nivel del aminoácido, razón por la cual se prefiere la genotipificación al nivel de gen S (Ohba et al., *Virus Res.* 39: 25-34 (1995).

40 Por razones aún no conocidas, aparecen subtipos en determinados patrones geográficos y étnicos.

La denominación mutación debe reservarse, según Carman, para variantes que surgen exclusivamente bajo presión de selección tales como vacunación o terapia antiviral. Ya se han descrito muchas mutaciones de las cuales algunas han conducido a hallazgos diagnósticamente incorrectos (Carman et al., *Lancet* 345: 1406-1407) y de los cuales se citan las siguientes aa-sustituciones mencionadas a continuación a manera de ejemplo:

45

Consenso:	aa-Posición	Mutante:
I	110	V
P	111	T
T	114	S
T	116	S
P	120	T/S
T	123	A/N
I/T	126	A/S
Q	129	H/R
K/M	133	L
T	143	M/L
D	144	H/A/E
G	145	R/A
A	157	R

5 y también sustituciones de cisteína en aa posiciones 107, 124, 137, 147 & 149. (Coleman, ver arriba; Okamoto et al., *Pediatr. Res.* 32: 264-268 (1992); Zhang et al., *Scand. J. Infect. Dis.* 28: 9-15 (1996); Zuckermann et al., *Lancet* 343: 737-738 (1994)).

De manera sorprendente, un patrón de reacción atípico de los marcadores de hepatitis ha sido encontrado en una muestra tomada de un paciente de Francia (número interno: 119617) que había contraído inflamación del hígado.

10 Aparte del cuadro clínico con un incremento en los valores hepáticos típicos para una infección de este tipo, los anticuerpos de hepatitis core detectados de la clase IgM también indicaban una infección por HBV aguda sin, no obstante, haber detectado HBsAg al usar un ELISA HBsAg aprobado de alto rendimiento.

Una PCR realizada dio como resultado de manera sorprendente un resultado positivo con la muestra y el resultado de secuenciación condujo de manera completamente sorprendente a la secuencia de nucleótidos representada en las Figs. 3 y 4 y a la secuencia de aminoácido representada en las Figs. 5 y 6, las cuales condujeron ambas de manera inesperada al patrón de sustitución descrito.

15 De estas secuencias es claro que, de manera totalmente sorprendente, no se trata de una mutación puntual, es decir de una sustitución de algunos pocos nucleótidos, ni tampoco de un subtipo que de manera posible se caracteriza serológicamente, puesto que un total de n=5 aminoácidos se sustituyen en la región desde aa 115 hasta 181 en comparación con el genotipo A. En vista de la frecuencia de las sustituciones de aminoácidos debe
20 concluirse que, de manera inesperada, se trata de un nuevo mutante o de que las mutaciones son tan pronunciadas que la consecuencia tiene que describirse más como una nueva variante que en lo sucesivo se denomina variante HDB 05.

25 El análisis de la mejor concordancia de la secuencia de aminoácido del a-determinante con secuencias conocidas señala un genotipo A (Fig. 1), subtipo adw (Fig. 2) del cual, sin embargo, se diferencia sorprendentemente la nueva variante en posiciones 4 aa. La característica más prominente son las 2 sustituciones adyacentes en la región entre aa 115 y 120 y entre aa 154 y 164, así como la posición aa # 181 en vecindad directa del a-determinante según las Figs. 1, 5 y 6.

Puesto que se conoce que los epítopes en el a-determinante están condicionados estructuralmente, es decir que pueden estar presentes como los llamados epítopes de conformación, parece probable que la inmunogenicidad y también la habilidad de los anticuerpos de enlazarse al a-determinante pueden influenciarse por la sustitución de aminoácido en posición #181.

5 Finalmente, y de manera completamente sorprendente, se observó identidad entre las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la muestra de suero # 119617 y los resultados analíticos correspondientes de otra muestra de suero independiente proveniente de Austria (número interno: 118457), que también proviene de un paciente que había contraído inflamación de hígado. Puede concluirse de esto que la HDB 05 es un mutante o variante de HBV capaz de replicación e infeccioso que puede haber encontrado cierta difusión.

10 La presente invención se refiere por lo tanto a un oligo- o polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos, que es una secuencia parcial de SEQ ID NO:12 con al menos 70 aminoácidos sucesivos de SEQ ID NO:12, en cuyo caso la secuencia parcial incluye las posiciones 73, 78, 112, 122 y 139 de SEQ ID NO:12. Estas posiciones de aminoácido corresponden a las posiciones 115, 120, 154, 164 y 181 del antígeno S de HBV. En otras formas de realización, la secuencia parcial comprende al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95 o al
15 menos 100 de aminoácidos sucesivos de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:12.

El polipéptido de la invención también puede comprender un fragmento de un antígeno de HBs de un virus de hepatitis B, en cuyo caso el antígeno HBs tiene en posición 115 arginina, en posición 120 glutamina, en posición 154 leucina, en posición 164 valina y en posición 181 arginina, y el fragmento comprende arginina 115, glutamina 120, leucina 154, valina 164 y arginina 181.

20 La longitud total del oligo- o polipéptido por lo regular corresponde hasta 1000 aminoácidos, preferentemente hasta 500 aminoácidos, más preferible hasta 300 aminoácidos, lo más preferible hasta 200 aminoácidos. Los oligo- o polipéptidos también pueden contener aminoácidos ajenos que no se codifican por el genoma de un virus de hepatitis B. De esta manera pueden estar contenidos aminoácidos que facilitan el acoplamiento a fases sólidas o hacen posible el acoplamiento a sustancias de marcación. Pueden estar contenidos aminoácidos que surgen debido
25 a la clonación y se expresaron en la expresión recombinante. Finalmente, el oligo- o polipéptido de la invención puede ser una proteína de fusión que contiene, además de aminoácidos derivados de HBV, un componente de fusión, por ejemplo una secuencia "tag" que facilita la purificación o una parte de proteína que incrementa la solubilidad y/o el rendimiento en la expresión recombinante. Tales componentes de fusión son conocidos per se para el experto en la materia.

30 En otra forma de realización, los oligo- o polipéptidos no contienen aminoácidos ajenos que no se codifiquen por el genoma de HBV. De manera correspondiente, estos oligo- o polipéptidos se componen de una de las secuencias de aminoácidos descritas arriba y/o en las reivindicaciones.

El oligo- o polipéptido de la invención es preferentemente inmunogénico, es decir, puede inducir una respuesta de anticuerpos en un organismo de mamífero. Usualmente, el oligo- o polipéptido contiene al menos un determinante antigénico o al menos un epítipo. En una modalidad particular el oligo- o polipéptido contiene un epítipo que no
35 está contenido en otras variantes de HBV, por ejemplo en el genotipo A; subtipo adw.

El oligo- o polipéptido contiene preferentemente una de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13.

40 Otro aspecto de la invención es un péptido inmunogénico o una mezcla de péptidos inmunogénicos que contiene uno o más de los oligo- o polipéptidos descritos en esta solicitud. El péptido inmunogénico o la mezcla inmunogénica puede contener el/los oligo- o polipéptido(s) solo(s) o en conexión con inmunogenes de HBV conocidos.

También son objeto de la presente invención las moléculas de ácido nucleico que se derivan del genoma de la nueva variante de HBV HDB 05, principalmente moléculas de ácido nucleico que se derivan del gen que codifica HBsAg.

45 Por lo tanto, la invención se refiere además a un oligo- o polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos la cual es secuencia parcial de SEQ ID NO:1 con al menos 200 nucleótidos sucesivos de la SEQ ID NO:1, en cuyo caso la secuencia parcial incluye las posiciones 218, 233, 335, 365 y 416 de SEQ ID NO:1. En otras formas de realización, la secuencia parcial comprende al menos 250 o al menos 300 nucleótidos sucesivos de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1.

50 En otra modalidad, el oligo- o polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos, que se hibrida en condiciones severas, preferentemente de manera específica con un polinucleótido complementario a la secuencia SEQ ID NO:1. Los métodos para determinar si un oligo- o polinucleótido dado se hibridan con otro polinucleótido son conocidos per se para el experto en la materia. Un ejemplo especial de "condiciones severas" son las siguientes condiciones: a)

incubación de 16 horas a 42 °C en una solución que contiene formamida de 50 %, 5xSSC (NaCl de 150 mM, citrato trisódico de 15 mM), fosfato de sodio de 50 mM, pH 7,6, solución de 5xDenhardt, sulfato de dextrano de 10% y ADN de esperma de salmón cizallado, desnaturalizado de 20 µg/ml; b) lavar a continuación en 0,1xSSC a aproximadamente 65°C. Las condiciones de hibridación y de lavado son conocidas per se para el experto en la materia y se indican a manera de ejemplo en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989). Una secuencia de nucleótidos hibrida de manera específica con un polinucleótido dado, cuando no hibrida o hibrida de manera esencialmente más débil con otras secuencias de nucleótidos. En el presente caso puede significar que la secuencia de nucleótido no hibrida o hibrida solo débilmente con los polinucleótidos que codifican HBsAg de variantes de HBV convencionales (por ejemplo, genotipo A, subtipo adw).

La invención también se refiere a un oligo- o polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un oligo- o polipéptido de la invención, tal como se describe en esta solicitud. Otro aspecto de la invención es un oligo- o polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a las secuencias de nucleótidos descritas arriba.

La longitud total del oligo- o polinucleótido corresponde por lo regular hasta 3000 nucleótidos, preferentemente hasta 1500 nucleótidos, más preferible hasta 900 nucleótidos, lo más preferible hasta 600 nucleótidos. Los oligo- o polinucleótidos también pueden contener nucleótidos que no provienen del genoma de un virus de hepatitis B. De esta manera pueden estar contenidos nucleótidos que codifican determinados aminoácidos que deben cumplir funciones deseadas, tal como se describe arriba. Pueden estar contenidos nucleótidos que surgen debido a la clonación con el fin de introducir determinados sitios de corte, por ejemplo. Finalmente, el oligo- o polinucleótido de la invención puede codificar una proteína de fusión que, además de aminoácidos derivados de HBV, contiene un componente de fusión (*fusion partner*) por ejemplo una secuencia "tag" que facilita la purificación, o una parte de proteína que incrementa la solubilidad y/o el rendimiento durante la expresión recombinante. Componentes de fusión de este tipo y el ADN que los codifica son conocidos per se para el experto en la materia.

Oligo- o polinucleótidos preferidos de la presente invención comprenden una secuencia de nucleótidos, que se selecciona del grupo que se compone de SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2.

Los polinucleótidos de la invención también pueden marcarse, por ejemplo mediante una marcación de fluorescencia o una marcación radioactiva. Polinucleótidos de este tipo pueden emplearse ventajosamente en una reacción de hibridación o una reacción de cadena de polimerasa (PCR).

La invención también se refiere a un vector o a un plásmido que contiene un oligo- o polinucleótido según la invención. El plásmido puede ser, por ejemplo, un vector de clonación que sirve para multiplicar el ácido nucleico en células huésped o para proporcionar determinados sitios de corte de restricción. Los vectores de expresión son vectores que permiten la expresión de ácido nucleico clonado en células huéspedes. Las células huéspedes pueden ser diversas células procariontas o eucariotas. Células huéspedes procariontas son, por ejemplo, células bacterianas como las células de *E. Coli*. Los vectores de expresión de la invención pueden contener determinados elementos de control como, por ejemplo, promotores o sitios de enlace para factores de represión. En otra forma de realización los vectores de expresión contienen un segmento de ácido nucleico que codifica una parte de una proteína de fusión.

La invención se refiere asimismo a una célula, por ejemplo, una célula huésped, que contiene un polinucleótido de la invención, un plásmido o un vector de la invención. Las células huéspedes pueden cultivarse en condiciones adecuadas de tal modo que tenga lugar una transcripción del ácido nucleico contenido y una traducción a continuación. La invención también se refiere a un método para la preparación de un polipéptido en el cual se introduce un polinucleótido, un plásmido o un vector de expresión del polipéptido de la invención a las células huéspedes y las células huéspedes se cultivan en condiciones que conducen a la expresión del polipéptido. Opcionalmente, a continuación puede recuperarse el polipéptido de las células huéspedes. La preparación del polipéptido tiene lugar preferentemente en bacterias, lo más preferiblemente en células de *E. coli*. Los medios y condiciones adecuados para el cultivo se describen, por ejemplo, en Ausubel et al. (1993) "*Current Protocols in Molecular Biology*". La recuperación del polipéptido expresado ocurre de acuerdo con métodos conocidos per se por el experto en la materia. Diversos métodos para la purificación de proteína se describen, por ejemplo, en Scopes R. (1994) "*Protein Purification: Principles and Practice*" (3rd edition), editorial Springer.

Los polipéptidos y péptidos de la presente invención también pueden, sin embargo, prepararse químicamente mediante métodos conocidos como, por ejemplo, síntesis en fase sólida. Asimismo, los polinucleótidos de la invención pueden prepararse mediante métodos conocidos de la síntesis química. Los fragmentos de polinucleótidos obtenidos mediante síntesis química también pueden conectarse enzimáticamente mediante ligasas. Los oligo- o polinucleótidos de la invención también pueden prepararse mediante "*site-directed mutagenesis*" (mutagénesis dirigida al sitio) a partir de secuencias conocidas, introduciendo mutaciones puntuales en determinadas posiciones. Métodos de este tipo son conocidos per se para el experto en la materia.

Otro objeto de la invención es un anticuerpo anti-idiotípico que representa una secuencia de aminoácidos de un oligo- o polipéptido de la invención. Los métodos para la preparación de anticuerpos anti-idiotípicos son conocidos per se para el experto en la materia.

5 La invención también se refiere a un kit de ensayo para detectar virus de hepatitis B, el cual contiene un oligo- o polipéptido de la invención, un oligo- o polinucleótido de la invención.

La invención también se refiere a un péptido inmunogénico o a una mezcla de péptidos inmunogénicos, que contiene uno o varios oligo- o polipéptidos de la invención, solos o en conexión con inmunogenes de HBV conocidos.

10 Una modalidad especial de un ensayo de inmunidad representa el así llamado ensayo de inmunoenzimático, del cual se describe a continuación, por ejemplo, un posible principio de prueba, aunque sin restringir la idea de la invención al mismo:

15 En el llamado principio Sandwich, muy ampliamente difundido, anticuerpos o fragmentos de los mismos inmovilizados en un soporte adecuado (por ejemplo, micropartículas o superficie de los pozuelos de una placa de microtitulación) se incuban con la muestra de investigación. El HBsAg enlazado al anticuerpo se detecta después de retirar el exceso de la muestra, efectuando una incubación más con anticuerpos anti-HBs (monoclonales o policlonales o fragmentos o mezclas de estos fragmentos) que están provistos con una sonda . Como sonda se emplea con frecuencia una enzima cuya conversión catalítica (después de retirar el reactivo en exceso) de un sustrato adecuado conduce a una reacción con color que se mide fotométricamente y cuya intensidad es proporcional al contenido de HBsAg presente en la muestra.

20 Aparte de esta modalidad especial también se conocen métodos que son de naturaleza homogénea (es decir que no requieren separación *bound/free* (enlazado/libre)), la cual puede manejarse sin sonda (por ejemplo, método de aglutinación), que son evaluables a simple vista (por ejemplo, inmunodifusión radial) o se sirven de otras sondas (por ejemplo, isótopos radioactivos o quimioluminiscencia) o de varias sondas (como, por ejemplo, el sistema biotina/estreptavidina).

25 Todas estas modalidades corresponden al estado de la técnica de tal modo que por "determinación de HBsAg de la nueva variante de HBV" en la presente se entienden todos los métodos que son adecuados para la detección de secuencias de polipéptidos o antígenos de la nueva variante de HBV, independientemente de si se determina el HBsAg solo de la nueva variante o en conexión con HBsAg de a-determinantes conocidos y/o mutaciones conocidas en la a-región.

30 Asimismo es posible, por razones económicas, combinar una determinación de HBsAg con un método de detección frente a otro analito (por ejemplo, antígeno de VIH o la determinación simultánea de HBsAg de la variante de HBV y de anticuerpos específicos dirigidos contra el mismo) en un método de prueba (que diferencia o no diferencia).

35 La invención también se refiere a un método para detectar anticuerpos que están dirigidos contra un antígeno de hepatitis B, caracterizado porque (a) se incuba una muestra con un oligo- o polipéptido de la invención en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo; y (b) se detecta el complejo anticuerpo-antígeno que contiene el oligo- o polipéptido.

Una modalidad especial representa el llamado ensayo de inmunoenzimático del cual puede describirse a continuación, a manera de ejemplo, un principio de prueba, aunque sin restringir la idea de la invención al mismo:

40 En el principio de Sandwich muy ampliamente difundido, secuencias de polipéptido o de proteína que llevan epítotope, inmovilizadas sobre un soporte adecuado (por ejemplo, micropartículas o superficie de los pozuelos de una placa de microtitulación) se incuban con la muestra de investigación. Los anticuerpos enlazados con el epítotope se detectan después de retirar el exceso de la muestra efectuando una incubación más con secuencias de polipéptidos o de proteína que llevan epítotope, las cuales están provistas con una sonda. Como sonda con frecuencia se emplea una enzima cuya conversión catalítica (después de retirar el exceso de reactivo) de un sustrato adecuado conduce a una reacción con color, la cual se mide fotométricamente y cuya intensidad es proporcional al contenido de anticuerpos presente en la muestra.

45 Además de esta modalidad especial también se conocen métodos que son de naturaleza homogénea (es decir que no requieren separación *bound/free*), que se manejan completamente sin sonda (por ejemplo, método de aglutinación), son evaluables a simple vista (por ejemplo, inmunodifusión radial) o se sirven de otras ondas (por ejemplo, isótopos radiactivos o quimioluminiscencia) de varias sondas (como, por ejemplo, el sistema biotina/estreptavidina).

5 Las estructuras de polipéptido de la variante de HBV también pueden representarse mediante anticuerpos anti-idiotípicos o mediante selección de un principio de prueba adecuado también pueden usarse anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de la variante para determinar anticuerpos anti-HBs (por ejemplo, en un formato de prueba competitivo). También se conoce que mediante la elección del principio de prueba también puede efectuarse una diferenciación de las clases de inmunoglobulina (por ejemplo, mediante el método "indirecto" con un segundo anticuerpo específico de clase (por ejemplo, específico de IgG o IgM) con sonda o con ayuda del llamado principio anti-P (específico de IgM). Naturalmente, los métodos y los materiales (incluyendo sonda y secuencias de polipéptidos) tienen que adaptarse al objetivo respectivo.

10 Todas estas formas de realización corresponden al estado de la técnica de tal modo que por "determinación de anticuerpos que son específicos para los a-determinantes de la nueva variante HDB 05" se entienden en la presente invención todos los métodos que son adecuados para detectar inmunoglobulinas y/o clases de inmunoglobulina frente a la nueva variante de HBV, independientemente de si el anticuerpo se busca solo frente a la nueva variante o en conexión con anticuerpos frente a a-determinantes conocidos y/o mutaciones conocidas en la a-región.

15 En otro método puede detectarse un ácido nucleico de hepatitis B. Este método está caracterizado porque (a) se incubaba una muestra con un oligo- o polinucleótido de la invención en condiciones que permiten la hibridación selectiva del oligo- o polinucleótidos con un ácido nucleico de hepatitis B en la muestra; y (b) se determina si se han formado dúplices de polinucleótido que comprenden el oligo- o polinucleótido.

20 El ácido nucleico de hepatitis B también pueden detectarse (a) incubando una muestra con al menos un oligo- o polinucleótido de la invención en condiciones que permiten la hibridación selectiva del oligo- o polinucleótido con un ácido nucleico de hepatitis B en la muestra; (b) realizando una reacción en cadena de polimerasa; y (c) determinando si se ha amplificado un ácido nucleico.

25 La invención también se refiere al uso de un oligo- o polinucleótido de la invención como cebador (primer) y/o como sonda. Las presentes secuencias de nucleótidos pueden utilizarse con el fin de preparar cebadores y/o sondas génicas por lo cual los kits que contienen cebadores y/o sondas para detectar ácido nucleico específico de la variante de HBV, ya sea solo o en conexión con secuencias de nucleótido de HBV conocidas, también son objeto de la invención.

30 A base de las presentes secuencias de nucleótidos pueden desarrollarse cebadores que encuentran aplicación en la llamada "Polimerase Chain Reaction" (PCR). La PCR representa un método para una amplificar secuencia de nucleótido deseada de un ácido nucleico o de una mezcla de ácido nucleico. En tal caso los cebadores se extienden respectivamente de manera específica mediante una polimerasa con el ácido nucleico deseado como marco de lectura. Después de la disociación de la cadena original se hibridan nuevos cebadores y se extienden a su vez mediante la polimerasa. Repitiendo estos ciclos se logra un enriquecimiento de la molécula de la secuencia diana buscada.

35 Con referencia a los ensayos de ácido nucleico (NAT) es posible usar secuencias de nucleótido de la presente invención para producir oligómeros de ADN a partir de 6-8 nucleótidos o más, los cuales son adecuados, como sondas de hibridación, de detectar el genoma viral de la variante de HBV aquí descrita en personas que portan posiblemente la variante de virus o, por ejemplo, en el campo de la donación de sangre, para analizar seleccionando (*screen*) sangre almacenada para la presencia del genoma de la variante, ya sea de manera selectiva o en combinación con la detección de secuencias de nucleótidos de variantes de HBV conocidas y/o mutantes de HBV.

40 Asimismo es posible, a base de las secuencias de nucleótidos de la nueva variante de HBV que se ha encontrado, desarrollar los cebadores correspondientes que son específicos para la nueva variante o que son capaces de detectar tanto la nueva variante como también las variantes que se conocen del estado de la técnica.

45 Otro objeto de la presente invención es un virus aislado de hepatitis B que tiene un antígeno HBs el cual comprende la SEQ ID NO:12. Finalmente, la invención también se refiere a cultivos de células de tejidos que se han infectado con la variante de HBV de la invención. Una preparación inmunogénica que contiene la variante de HBV de la invención, atenuada o inactiva, también es objeto de la invención.

50 La invención también se refiere al uso de un oligo- o polinucleótido de la invención o de un oligo- o polipéptido de la invención para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una infección con HBV. Los oligo- o polinucleótidos, o bien los oligo- o polipéptidos, de la invención pueden usarse principalmente para la preparación de una vacuna contra HBV.

La invención también incluye una vacuna que comprende un polipéptido de la presente invención y un adyuvante habitual (por ejemplo, adyuvante de Freund, sal amortiguada con fosfato o similares). Una vacuna de este tipo puede usarse para generar la formación de anticuerpos en mamíferos. Similarmente, la invención comprende una partícula que contiene una secuencia de aminoácido específica de una no-variante, la cual induce la formación de

partícula junto con un polipéptido que contiene epítipo, el cual es específico para la variante de HBV de la invención.

Las secuencias de nucleótidos de la invención también pueden usarse para preparar los llamados oligonucleótidos antisentido (opcionalmente para propósitos terapéuticos).

5 Otros aspectos de la presente divulgación son los siguientes objetos (1) a (21):

(1) Oligo- o polinucleótido aislado con una de las secuencias seleccionadas del grupo de Seq id no:1 a Seq id no:11:

SEQ ID NO:1

127 GGGGGATCAC CCGTGTGTCT TGGCCAAAAT TCGCAGTCCC CAACCTCCAA
 TCACTCACCA ACCTCCTGTC CTCCAATTTG TCCTGGTTAT CGCTGGATGT
 GTCTGCGGCG TTTTATCATA TTCCTCTTCA TCCTGCTGCT ATGCCTCATC
 TTCTTATTGG TTCTTCTGGA TTATCAAGGT ATGTTGCCCG TTTGTCCTCT
 AATTCCAGGA TCAACAAGAA CCAGTACGGG ACAATGCAAA ACCTGCACGA
 CTCCTGCTCA AGGCAACTCT ATGTTTCCCT CATGTTGCTG TACAAAACCT
 ACGGATGGAA ATTGCACCTG TATTCCCATC CCATTGTCCT GGGCTTTCGC
 AAAATACCTA TGGGTGTGGG CCTCAGTCCG TTTCTCTTGG CTCAGTTTAC
 TAGTGCCATT TGTTTCGGTGG TTCGTAGGGC TTTCCCCCAC TGTTTGGCTT
 TCAGCTATAT GG **588**

SEQ ID NO:2

331 CCAGGATCAA CAAGAACCAG TACGGGACAA TGCAAAACCT GCACGACTCCT
 GCTCAAGGCA ACTCTATGTT TCCCTCATGT TGCTGTACAA AACCTACGGA
 TGGAAATTGC ACCTGTATTC CCATCCCATT GTCCTGGGCT TTCGCAAAAT
 ACCTATGGGT GTGGGCCTCA GTCCGTTTCT CTTGGCTCAG TTTACTAGTG
 CCATTTGTTT GGTGGTTCGT AGGG **555**

SEQ ID NO:3

331 CCAGGATCAA CAAGAACCAG TACGGGACAA TGCAAAACCT GCACGACTCC
 TGCTCAAGGC AACTCTATGT TTCCCTCATG TTGCTGTACA AAACCTACGG
 ATGGAAATTG ACCTGTATT CCCATCCCAT TGTCCTGGGC TTTTCGCAAAA
 TACCTATGGG TGTGGGCCTC AGTCCGTTTC **510**

SEQ ID NO:4

331 CCAGGATCAA CAAGAACCAG TACGGGACAA TGCAAAACCT GCACGACTCC
 TGCTCAAGGC AACTCTATGT TTCCCTCATG TTGCTGTACA AAACCTACGG
 ATGGAAATTG CACCTGTATT CCCATCCCAT TGTCCTGGGC TTTTCGCAAAA
 TACCTATGGG
 TGTGG **495**

10

SEQ ID NO:5

331 CCAGGATCAA CAAGAACCAG TACGGGACAA TGCAAAACCT GCACGACTCC
 TGCTCAAGGC **390**

SEQ ID NO:6

331 CCAGGATCAA CAAGAACCAG TACGGGACAA 360

SEQ ID NO:7

343 AGAACCAGTA CGGGACAATG CAAAACCTGC ACGACTCCTG CTC AAGGCAA
 CTCTATGTTT CCCTCATGTT GCTGTACAAA ACCTACGGAT GGAAATTGCA
 CCTGTATTCC CATCCCATTTG TCCTGGGCTT TCGCAAATA CCTATGGGTG
 TGG **495**

SEQ ID NO:8

343 AGAACCAGTA CGGGACAA 360

SEQ ID NO:9

460 TTGTCCTGGG CTTTCGCAA ATACCTATGG GTGTGGGCCT CAGTCCGTTT
 CTCTTGGCTC AGTTTACTAG TGCCATTTGT TCGGTGGTTC GTAGGG **555**

SEQ ID NO:10

460 TTGTCCTGGG CTTTCGCAA ATACCTATGG GTGTGGGCCT CAGTCCGTTT
 C **510**

5

SEQ ID NO:11

462 TTGTCCTGGG CTTTCGCAA ATACCTATGG GTGTGG 495

10 (2) Oligo- o polinucleótido según (1), el cual es respectivamente idéntico en al menos 65% o 66% o 67% o 68% o 69% o 70% o 71% o 72% o 73% o 74% o 75% o 76% o 77% o 78% o 79% o 80% o 81% o 82% o 83% o 84% o 85% o 86% o 87% o 88% o 89% o 90% o 91% o 92% o 93% o 94% o 95% o 99% o 97% o 98% o 99% con una de las secuencias seleccionadas del grupo de Seq id no:1 a Seq id no:11.

(3) Oligo- o polinucleótido según (1) o (2), el cual hibrida con un oligo- o polinucleótido que tiene una secuencia complementaria a una de las secuencias, seleccionadas del grupo de Seq id no:1 a Seq id no:11, en condiciones severas.

15 (4) Oligo- o polinucleótido aislado que codifica antígeno de HBs del virus de hepatitis B y contiene un oligo- o polinucleótido según uno de los objetos (1) a (3).

(5) Fragmento de un oligo- o polinucleótido, que codifica antígeno de HBs del virus de hepatitis B, caracterizado porque el fragmento contiene un oligo- o polipéptido según uno de los objetos (1) a (3).

20 (6) Oligo- o polinucleótido aislado, que codifica a-determinante del antígeno de HBs del virus de la hepatitis B y contiene un oligo- o polinucleótido según uno de los objetos (1) a (3).

(7) Cebador (primer) que es específico para un oligo- o polinucleótido según uno de los objetos (1) a (6).

(8) Vector que contiene al menos un oligo- o polinucleótido según uno de los objetos (1) a (5).

(9) Célula huésped que contiene un vector según (8).

(10) Oligo- o polipéptido que se codifica mediante un oligo- o polinucleótido según uno de los objetos (1) a (5).

25 (11) Oligo- o polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo de Seq id no:12 a Seq id no:22:

Seq id no.: 12

43 G G S P V C L G Q N S Q S P T S N H
 S P T S C P P I C P G Y R W M C L R R F
 I I F L F I L L L C L I F L L V L L D Y
 Q G M L P V C P L I P G S T R T S T G Q
 C K T C T T P A Q G N S M F P S C C C T
 K P T D G N C T C I P I P L S W A F A K
 Y L W V W A S V R F S W L S L L V P F V
 R_ W F V G L S P T V W L S A I W 196

Seq id no.: 13

111 P G S T R T S T G Q C K T C T T P A
 Q G N S M F P S C C C T K P T D G N C T
 C I P I P L S W A F A K Y L W V W A S V
 R F S W L S L L V P F V R_ W F V G 185

Seq id no.: 14

111 P G S T R T S T G Q C K T C T T P A
 Q G N S M F P S C C C T K P T D G N C T
 C I P I P L S W A F A K Y L W V W A S V
 R F 170

Seq id no.: 15

111 P G S T R T S T G Q C K T C T T P A
 Q G N S M F P S C C C T K P T D G N C T
 C I P I P L S W A F A K Y L W V W 165

5

Seq id no.: 16

111 P G S T R T S T G Q C K T C T T P A
 Q G 130

Seq id no.: 17

111 PGSTRTSTGQ 120

Seq id no.: 18

115 R T S T G Q C K T C T T P A Q G N S
 M F P S C C C T K P T D G N C T C I P I
 P L S W A F A K Y L W V W 165

10 Seq id no.: 19

115: RTSTGQ 120

Seq id no.: 20

154 P I P L S W A F A K Y L W V W A S V R
 F S W L S L L V P F V R_ W F V G L 185

Seq id no.: 21

154 P I P L S W A F A K Y L W V W A S V R
F 170

Seq id no.: 22

154: P I P L S W A F A K Y L W V W 165

- 5 (12) Oligo- o polipéptido según (10) o (11), el cual es respectivamente idéntico en al menos 65% o 66% o 67% o 68% o 69% o 70% o 71% o 72% o 73% o 74% o 75% o 76% o 77% o 78% o 79% o 80% o 81% o 82% o 83% o 84% o 85% o 86% o 87% o 88% o 89% o 90% o 91% o 92% o 93% o 94% o 95% o 99% o 97% o 98% o 99% con una de las secuencias seleccionadas del grupo de Seq id no:12 a Seq id no:22.
- (13) Polipéptido aislado que corresponde a la secuencia del antígeno de HBs del virus de la hepatitis B, caracterizado porque contiene un oligo- o polipéptido según uno de los objetos (10) a (12).
- 10 (14) Fragmento de un polipéptido que corresponde a la secuencia del antígeno de HBs del virus de la hepatitis B, caracterizado porque el fragmento contiene un oligo- o polipéptido según uno de los objetos (10) a (12).
- (15) Polipéptido aislado que codifica el a-determinante del antígeno de HBs del virus de la hepatitis B caracterizado porque contiene un oligo- o polipéptido según uno de los objetos (10) a (12).
- 15 (16) Anticuerpo monoclonal o policlonal, que se enlaza a un antígeno de HBs, que contiene un oligo- o polipéptido según uno de los objetos (10) a (15), pero que no se enlaza, o se enlaza significativamente más débil, al antígeno de HBs de un virus de hepatitis B de tipo silvestre.
- (17) Un anticuerpo anti-idiotípico que representa una secuencia de aminoácidos según uno de los objetos (10) a (15).
- 20 (18) Kit de prueba para detectar o determinar por medio de una reacción de hibridación un ácido nucleico que es específico para una variante o mutante del virus de la hepatitis B, usando al menos un oligo- o polinucleótido según uno o varios de los objetos (1) a (7).
- (19) Kit de prueba para detectar de modo inmunoquímico o para determinar de modo inmunoquímico un antígeno que es específico para una variante o mutante del virus de la hepatitis B, usando al menos un anticuerpo monoclonal o policlonal según (16).
- 25 (20) Kit de prueba para la detección inmunoquímica o para la determinación inmunoquímica de un anticuerpo dirigido contra una variante o mutante del virus de la hepatitis B usando al menos un oligo- o polipéptido según uno de los objetos (10) a (15).
- (21) Péptido inmunogénico o mezcla de péptidos inmunogénicos que contiene uno o varios oligo- o polipéptidos según uno o varios de los objetos (3) y (4), solo o en conexión con HBV inmunogénico conocido.
- 30 La presente divulgación comprende una secuencia de nucleótido aislada que es idéntica en al menos 65 % con Seq id no. 1 o con un fragmento de esta secuencia representada en las Figs. 3 y 4, el cual hibrida de manera específica con el complemento de la SEQ ID NO:1 a 11.
- Adicionalmente, la presente divulgación comprende una secuencia de nucleótido aislada que codifica la presente variante de la invención del a-determinante del antígeno de superficie de hepatitis B (Hepatitis B surface Antigens (HBsAg)) en las posiciones de aminoácidos entre aa 101 y 180 o conduce a un producto de péptido, el cual en la aa-secuencia tiene una concordancia de al menos 65 % con la SEQ ID NO:12 representada en la Fig. 5 y 6 o con los fragmentos de la misma según SEQ ID NO:13 a 22.
- 35
- Además, la presente divulgación comprende un vector que abarca una o más de las secuencias de nucleótido mencionadas, como también una célula huésped que contiene este vector y un método para la preparación de un polipéptido correspondiente a partir de la a-determinante, que comprende la incubación de la célula huésped mencionada arriba por los tiempos y en las condiciones que se requieren para la expresión del polipéptido.
- 40
- También son objetos de la divulgación los anticuerpos que reaccionan con la a-determinante descrita en SEQ ID NO:11 a 22, en cuyo caso el enlazamiento se efectúa preferiblemente en la región de aminoácido aa 115 a 120, aa 154 a 164 o aa 154 a 185. Los anticuerpos pueden policlonales o monoclonales de origen animal o humano.

Una variante aislada de HBV también es objeto de la divulgación, en cuyo caso el virus tiene una a-determinante que corresponde a las aa-secuencias al menos entre la posición 115 y 120 y/o aa 154 a164 o aa 154 a 181, de manera ideal a todas las regiones mencionadas entre 115 y 181.

5 También es un objeto de la presente divulgación una mezcla inmunogénica para la generación de anticuerpos monoclonales o policlonales que comprende el HBV aislado descrito o uno o varios de los polipéptidos descritos.

La divulgación también comprende una sonda de poli-nucleótido que contiene una secuencia de genoma HBV, la cual conduce a una a-determinante modificada mediante sustitución de aminoácidos, la cual es idéntica con la aa-secuencia descrita de la nueva variante de HBV o corresponde en al menos 65 %.

10 También son objeto de la divulgación kits para detectar polinucleótidos de la variante de HBV con ayuda de la onda mencionada como también kits para detectar HBsAg de la variante o epítopes individuales de la misma y anticuerpos que son específicos para la variante o epítopes de la misma, así como el método de detección de polinucleótidos, antígeno y anticuerpos, que comprende una incubación para la formación de los complejos correspondientes y la detección de estos complejos mediante métodos adecuados, conocidos por el experto en la materia.

15 Las formas de realización de este kit y los métodos de detección pueden diseñarse para la detección específica y única de los nucleótidos y del antígeno de la variante de HBV o de anticuerpos dirigidos contra éstos, o pueden ser suplementarios, es decir que permiten la detección del analito variante de la invención adicional a los nucleótidos, antígenos o anticuerpos de HBV conocidos en la actualidad.

20 De manera análoga también puede emplearse una mezcla inmunogénica de las secuencias de polipéptido de la invención en conexión con antígenos conocidos, por ejemplo, para el mejoramiento de la efectividad de una vacuna.

La presente invención describe una nueva variante del virus de hepatitis B (HBV), que tiene una a-determinante completamente nueva como resultado de sustituciones de aminoácido en las subsiguientes aa-posiciones de la secuencia S-HBsAg. Para la descripción de los aminoácidos se usa el código de 1 letra:

	aa de HDB 05	aa-Posición	aa de adw/Genotipo A
25	R	115	T
	Q	120	P
	L	154	S
	V	164	E

Además, en la posición aa 181 de HDB 05 se presenta arginina (R) en lugar de Gln (Q):

30	R	181	Q
----	---	-----	---

Estas aa-sustituciones pueden atribuirse a sustituciones de nucleótido correspondientes del codón correspondiente.

La presente invención se refiere a una secuencia de nucleótido aislada que codifica la a-determinante del virus (Fig. 3 y también Seq id no.: 1).

35 La presente divulgación también comprende nucleótidos con una concordancia de al menos 65 %, preferible de al menos 75% de concordancia y particularmente preferible con al menos 90% de concordancia con la secuencia de nucleótidos de la presente invención o fragmentos de la misma, así como secuencias complementarias a las mismas.

40 La divulgación también comprende polipéptidos que se codifican por las secuencias de nucleótidos arriba descritas, principalmente aquellas secuencias de aminoácidos que determinan la a-determinante del HBsAg y los polipéptidos que presentan una similitud de al menos 65%, preferible de 75 % y aún más preferible de 95 % con estas secuencias.

45 Para la descripción de la presente invención por un fragmento de nucleótido se entiende una secuencia consecutiva de al menos 9, preferible de 9-15, particularmente preferible de 15-21 e incluso muy particularmente preferible de 21-60 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la nueva variante de HBV, en cuyo caso también son obvias las mezclas de fragmentos de nucleótidos de este tipo.

Un fragmento de polipéptido se entiende como una secuencia de al menos 3, preferible 3-5, particularmente preferible 5-7 e incluso muy particularmente preferible 7-20 aminoácidos de la a-determinante de la nueva variante de HBV, en cuyo caso las mezclas de fragmentos de polipéptidos de este tipo también caen bajo esta invención.

5 La presente invención también abarca una secuencia de nucleótido aislada que es capaz de hibridarse y conduce a secuencias de nucleótido que corresponden a las secuencias de nucleótidos de la HBsAg de la nueva variante HBV o partes de la a-determinante de la nueva variante de HBV, que son complementarias a estas o pueden atribuirse a HDB 05 como subtipo o mutación.

10 El experto en la materia conoce que una secuencia de nucleótidos después de su aislamiento según métodos del estado de la técnica pueden introducirse en células huéspedes procariontas (por ejemplo E. coli), eucariotas (por ejemplo Chinese Hamster Ovary Cell) o levaduras (por ejemplo S. Cerevisiae) con ayuda de un vector o constructo (con los métodos conocidos para el experto en la materia como, por ejemplo, transfección, transformación o electroporación: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Vol. 1-3, ed Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), en cuyo caso pueden emplearse cultivos transitorios o permanentes. Por consiguiente, la presente invención comprende secuencias de nucleótidos aisladas de la a-determinante de la nueva variante de HBV, polipéptidos que se codifican por estos nucleótidos, vectores que contienen secuencias de nucleótidos de la a-determinante de la nueva variante de HBV como también la célula huésped a la que se introduce un vector.

Además de la preparación de polipéptidos, con ayuda de un sistema de expresión (recombinante o por ingeniería genética) es obvio que también se preparen estructuras de polipéptido análogas de manera totalmente sintéticas o directamente por purificación de la variante del virus.

20 Es posible usar los polipéptidos o proteínas de la nueva variante HBV para generar anticuerpos monoclonales y/o policlonales, que enlazan inmunológicamente a sitios de enlace (epítopes) de la a-determinante de la nueva variante de HBV. Los métodos para preparar anticuerpos son conocidos por la persona técnica en la materia (por ejemplo Koehler et al., Nature 256-494 (1975), Mimms et al., Vi. 176: 604-619 (1990).

25 También es posible usar la a-determinante de la variante HDB 05 de la invención en forma de toda la secuencia de polipéptidos o partes de la misma para determinar los anticuerpos dirigidos contra la variante de HBV: anticuerpos anti-HBs.

Para el experto en la materia es corriente una gran cantidad de métodos de determinación en los que con polipéptidos de la a-determinante de la variante HBV y con anticuerpos se forman inmunocomplejos de origen animal o humano o se inhibe su formación.

30 Finalmente es posible usar anticuerpos monoclonales o policlonales (o mezclas o fragmentos de los mismos o mezclas de fragmentos), los cuales reacciona con epítopes de la nueva variante HBV, para determinar la a-determinante de la variante de HBV de la invención en forma de toda la secuencia de polipéptidos o partes de los mismos en muestras de investigación: HBsAg de la variante HDB 05.

35 Para el experto en la materia es corriente una gran cantidad de métodos de determinación en los que con uno o varios anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales (o mezclas de los mismos o fragmentos o mezclas de fragmentos), que son específicos para la a-determinante de la variante de HBV, se forman inmunocomplejos o se inhibe su formación.

También pueden desarrollarse cebadores correspondientes base de las secuencias de nucleótidos encontradas de la nueva variante de HBV.

40 Finalmente, también son objeto de la invención los reactivos para diagnóstico en calidad de kit, los cuales se basan los arriba descritos métodos de detección de antígeno específico para la variante de HBV (HBsAg) o de anticuerpos dirigidos contra el mismo (anti-HBs), ya sea como determinaciones singulares o bien pueden combinarse entre sí o con otro antígeno de HBV conocido o con anticuerpos que reaccionan de manera específica o también con otros analitos muy diferentes.

45 La presente invención se describe, además, en las reivindicaciones de patente.

Descripción de las figuras:

La Fig. 1 representa una perspectiva general de las secuencias de aminoácido de la a-determinante de 6 genotipos descritos del HBV en comparación con HDB 05.

50 En la Fig. 2 se representan las secuencias de nucleótidos y aminoácido de la a-determinante así como regiones inmediatamente adyacentes del genotipo A, subtipo adw de HBV.

La Fig. 3 muestra la secuencia de nucleótidos de la a-determinante del antígeno de superficie de HBV, HBV surface Antigens, para el subtipo adw del genotipo A de HBV en comparación con la secuencia de nucleótido de HDB 05.

La Fig. 4 resume las desviaciones relevantes de traducción de la secuencia de nucleótidos de HDB 05.

5 En la Fig. 5 se representa la secuencia de nucleótido de HDB 05 en la región del a-determinante así como la correspondiente secuencia de aminoácido. La a-determinante se encuentra entre el aminoácido No. 101 y 180 del pequeño HBsAg (Small, S).

La Fig. 6 muestra la correspondiente secuencia de polipéptido de la a-determinante de HDB 05, que se codifica por la secuencia de nucleótido descrita en la Fig. 5.

10 Los siguientes ejemplos ilustran con mayor detalle la presente invención sin que la invención se restrinja a los ejemplos descritos.

Ejemplo 1: Determinación de HBsAg por medio de ensayo inmunoenzimático, EIA

Para la determinación del *surface Antigens* de HBV, HBsAg en la sangre de los pacientes de Francia y Austria se aplicó en ensayo inmuno-enzimático Enzygnost® HBsAg 5.0 de la empresa Dade Behring GmbH, Marburg, Alemania.

15 Se trata de una prueba de alto rendimiento, autorizada en Europa el cual se realizó según las instrucciones en el anexo del empaque.

El principio fundamental de la prueba es un, así llamado, ensayo de Sandwich en el formato de placa de microtitulación:

20 100 µl de la muestra a investigarse se ponen en contacto, en un método de un solo paso, con 25 µl de conjugado 1 (anticuerpos monoclonales, específicos de HBsAg de ratón que se marcan de manera covalente con biotina) y anticuerpos policlonales específicos de HBsAg de oveja. Después de incubación de 60 minutos a 37°C y de retirar los componentes en exceso, lavando cuatro veces los pozuelos de las placas, se adicionan 100 µl de conjugado 2, el cual se compone de estreptavidina al cual está enlazada covalentemente la enzima sonda peroxidasa.

25 Después de una incubación de 30 minutos a 37°C y de retirar los componentes en exceso lavando 4 veces los pozuelos de las placas se adicionan 75 µl de solución de regulador cromogénico/sustrato, seguido de una incubación por 30 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo del tinte de tetrametilbenzidina azul se interrumpe adicionando 75 µl de solución de detención (ácido sulfúrico) y el colorante se mide fotométricamente a 450 nm.

30 La intensidad del desarrollo de color, medido a la densidad óptica (O.D.) es directamente proporcional al contenido de HBsAg en la muestra investigada, en cuyo caso un valor de O.D. menor al valor umbral se evalúa como negativo para HBsAg. El valor umbral se define como el valor medio de O.D. del control ensayado en paralelo, negativo (contenido en el kit de prueba), al cual se adiciona una cantidad constante de 0,05 O.D..

35 Los límites de detección del lote usado para la investigación (# 32874) se determinaron mediante interpolación gráfica con las preparaciones estándar internacionalmente aceptadas del instituto Paul-Ehrlich-Institutes, Langen Alemania, a 0,012 ng de ad subtipo/ ml o 0,015 ng de ay subtipo / ml en pruebas paralelas de los ensayos de diluciones de las preparaciones estándar en suero negativo para HBsAg.

40 La investigación de la muestras # 119617 y 118234, de la cuales también se efectuó el aislamiento de ADN, en 2 ensayos independientes en dos días diferentes para ambas muestras, dio resultados de entre 0,02 y 0,05 O.D., los cuales deben interpretarse en correspondencia a los criterios del ensayo como negativo para HBsAg. Por lo contrario, el control positivo (contenido en el kit de prueba) que se ensayó conjuntamente, fue positivo también (se cumplieron criterios de validación) como las mencionadas preparación estándar ad y ay.

Ejemplo 2: Aislamiento del ADN de HDB 05 de la muestra # 118234

45 De cada una de una alícuota de 200 µl de las muestras francesas y austriacas se aisló el ADN, habiendo aplicado el mini kit QIA amp® DNA Blood de la empresa Qiagen, Hilden Alemania. En tal caso se siguieron todos los pasos procedimentales tal como se describen en el folleto de información del paquete y la elución se realizó en un volumen de 50 µl en cada caso.

Ejemplo 3: Reacción en cadena de polimerasa, PCR

3.1 Cebadores de HBV

Se usaron los cuatro cebadores de HBV a continuación:

Cebador 1 con la secuencia 5'> 3':

GGGTCACCATATTCTTGGGAAC (SEQ ID NO:23)

5 Cebador 2 con la secuencia 5'> 3':

TATACCCAAAGACAAAAGAAAATTGG (SEQ ID NO:24)

Cebador 3 con la secuencia 5'> 3':

GACTCGTGGTGGACTTCTCTC (SEQ ID NO:25)

Cebador 4 con la secuencia 5'> 3':

10 TACAGACTTGGCCCCCAATACC (SEQ ID NO:26)

3.2 Amplificación de PCR

Se realizó una amplificación PCR llamada "nested" del *surface Antigens*, en cuyo caso se usó el kit de Perkin Elmer Ampli Taq® DNA Polimerase así como el Thermocycler Gene Amp® PCR system 9700 de la empresa Perkin Elmer Applied Biosystems, USA.

15 Los nucleótidos se compraron de la empresa Amersham Biosciences, UK.

Para el primer ciclo de amplificación se amplificaron 5 µl del ADN aislado usando los cebadores 1 y 2 arriba mencionados así como las siguientes condiciones:

PCR 1 rxn

	Cebador 1 (10 µM)	1 µl	
20	Cebador 2 (10 µM)	1 µl	
	Búfer concentrado 10 veces	5 µl	
	(incl. 15 µM de Mg ₂ Cl)		
	dNTP Mezcla (10 µM)	1 µl	
	agua dest.	36,75 µl	
25	Ampli Taq (5 U/ µl)	<u>0,25 µl</u>	
	Por tubo	45 µl	de volumen total
	Más	5 µl	de ADN aislado
		<u>50 µl</u>	de volumen de reacción

La mezcla de 50 µl se amplificó usando el termociclador descrito en las siguientes condiciones:

30 94° C, 1 min. / 94°C, 28 seg. - 50° C, 28 seg. - 72° C, 38 seg. (35 ciclos) / 72° C, 5 min. / 8 °C soak.

ES 2 385 481 T3

En la segunda ronda de amplificación se siguió amplificando 5 µl del primer producto de PCR usando el cebador de HBV 3 y 4 y las siguientes condiciones:

PCR 2 rxn

	Cebador 3 (10 µM)	1 µl	
5	Cebador 4 (10 µM)	1 µl	
	Búfer 10 veces concentr.	5 µl	
	dNTP mezcla (10 µM)	1 µl	
	agua dest.	36,75 µl	
	Ampli Taq (5 U/µl)	0,25 µl	
10	Por tubo	45 µl	de volumen total
	Más	5 µl	de producto de PCR v.rxn
		50 µl	volumen de reacción

Esta mezcla de PCR 2 se amplificó usando el termociclo arriba descrito en cuyo caso se aplicaron las siguientes condiciones:

15 94° C, 1 min. / 94°C, 28 seg. - 55° C, 28 seg. - 72° C, 38 seg. (35 ciclos) / 72 °C, 5 min. / 8 °C soak.

En conclusión el producto de PCR 2 se fraccionó electroforéticamente (agarosa al 1,5 %) incluyendo marcadores de peso molecular adecuados. La banda con cerca de 520 pares de bases se cortó y se aisló con ayuda del QIA quick Gel Extraction Kit de la empresa Qiagen, Hilden, Alemania.

Ejemplo 4: Secuenciación de HDB 05

20 El producto de PCR purificado de la empresa Medigenomix, Martinsried, Alemania se secuenció con ayuda del sistema capilar ABI 3700 en conexión con el ABI BigDye Terminator Chemistry Version 1.1. y el programa de ordenador ABI Sequencing Analysis, versión 3.6. usando los cebadores 3 y 4 descritos en el ejemplo 3.

Resultado de secuenciación

25 Pudo mostrarse que el HBsAg de ambas muestras analizadas coinciden entre sí mostraron dentro de la región secuenciada la mejor concordancia de la secuencia de nucleótido y de aminoácido con el genotipo A, subtipo adw. En la región de la a-determinante las muestras analizadas de Francia y de Austria mostraron en total 4 sustituciones de aminoácido en comparación con el genotipo A, subtipo adw (véase también las Fig. 2 y 5):

	HDB 05:		A, adw:
	1.) Arg (R)	por	115 Thr (T)
30	2.) Gln (Q)	por	120 Pro (P)
	3.) Leu (L)	por	154 Ser (S)
	4.) Val (V)	por	164 Glu (E)

Adicionalmente se presenta una sustitución de aminoácido en la posición # 181:

5.) Arg (R)	por	181 Gln (Q)
-------------	-----	-------------

Estos resultados se reprodujeron en varios análisis independientes de ambas muestras de sangre investigadas de Francia y de Austria con los resultados iguales de secuenciación que además muestran plena concordancia para ambas muestras independientes.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Dade Behring Marburg GmbH
- <120> Nueva variante de proteína de superficie (HBsAg) del virus de hepatitis B
- <130> MA 1252
- <150> DE 10328080.4
- <151> 2003-06-20
- 10 <160> 26
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 462
- <212> DNA
- 15 <213> Virus Hepatitis B
- <400> 1
- ```

gggggatcac ccgtgtgtct tggccaaat tgcagtc ccacctcaa tcactcacca 60
acctcctgtc ctccaatttg tcttggttat cgctggatgt gtctgcgcg tttatcata 120
ttcctcttca tctgtctgct atgcctcacc ttcttattgg ttcttctgga ttatcaaggt 180
atgttgcccg tttgtcctct aattccagga tcaacaagaa ccagtacggg acaatgcaaa 240
acctgcacga ctctgtctca aggcaactct atgtttccct catgttgctg tacaaaacct 300
acggatggaa attgcacctg tattccacc ccattgtcct gggctttcgc aaaataccta 360
tgggtgtggg cctcagtcog tttctcttgg ctcaagttac tagtgccatt tgttcggtgg 420
ttcgtagggc tttccccac tgtttggctt tcagctatat gg 462

```
- <210> 2
- <211> 225
- 20 <212> DNA
- <213> Virus Hepatitis B
- <400> 2

ES 2 385 481 T3

ccaggatcaa caagaaccag tacgggacaa tgcaaacct gcacgactcc tgctcaaggc 60  
aactctatgt ttccctcatg ttgctgtaca aaacctacgg atggaaattg cacctgtatt 120  
cccatcccat tgtcctgggc tttcgcaaaa tacctatggg tgtgggcctc agtccgtttc 180  
tcttggctca gtttactagt gccatttgtt cggtggttcg taggg 225

<210> 3

<211> 180

<212> DNA

5 <213> Virus Hepatitis B

<400> 3

ccaggatcaa caagaaccag tacgggacaa tgcaaacct gcacgactcc tgctcaaggc 60  
aactctatgt ttccctcatg ttgctgtaca aaacctacgg atggaaattg cacctgtatt 120  
cccatcccat tgtcctgggc tttcgcaaaa tacctatggg tgtgggcctc agtccgtttc 180

<210> 4

10 <211> 165

<212> DNA

<213> Virus Hepatitis B

<400> 4

ccaggatcaa caagaaccag tacgggacaa tgcaaacct gcacgactcc tgctcaaggc 60  
aactctatgt ttccctcatg ttgctgtaca aaacctacgg atggaaattg cacctgtatt 120  
cccatcccat tgtcctgggc tttcgcaaaa tacctatggg tgtggg 165

15 <210> 5

<211> 60

<212> DNA

<213> Virus Hepatitis B

<400> 5

20 ccaggatcaa caagaaccag tacgggacaa tgcaaacct gcacgactcc tgctcaaggc 60

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

ES 2 385 481 T3

<213> Virus Hepatitis B

<400> 6

ccagatcaa caagaaccag tacgggacaa 30

<210> 7

5 <211> 153

<212> DNA

<213> Virus Hepatitis B

<400> 7

agaaccagta cgggacaatg caaaacctgc acgactcctg ctcaaggcaa ctctatgttt 60

ccctcatgtt gctgtacaaa acctacggat ggaaattgca cctgtattcc catcccattg 120

tcctgggctt tcgcaaaata cctatgggtg tgg 153

10 <210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Virus Hepatitis B

<400> 8

15 agaaccagta cgggacaa 18

<210> 9

<211> 96

<212> DNA

<213> Virus Hepatitis B

20 <400> 9

ttgtcctggg ctttcgcaaa atacctatgg gtgtgggcct cagtccgttt ctcttggtc 60

agtttactag tgccatttgt tcggtgggtc gtaggg 96

<210> 10

<211> 51

25 <212> DNA

<213> Virus Hepatitis B

<400> 10

ttgtcctggg ctttcgcaaa atacctatgg gtgtgggcct cagtccgttt c 51

ES 2 385 481 T3

<210> 11

<211> 36

<212> DNA

<213> Virus Hepatitis B

5 <400> 11

ttgtcctggg ctttcgcaaa atacctatgg gtgtgg 36

<210> 12

<211> 154

<212> PRT

10 <213> Virus Hepatitis B

<400> 12

ES 2 385 481 T3

Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser  
 1 5 10 15

Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp  
 20 25 30

Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys  
 35 40 45

Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val  
 50 55 60

Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Arg Thr Ser Thr Gly Gln Cys Lys  
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys  
 85 90 95

Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Leu  
 100 105 110

Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Val Trp Ala Ser Val Arg Phe  
 115 120 125

Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Arg Trp Phe Val Gly Leu  
 130 135 140

Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp  
 145 150

<210> 13

<211> 75

5 <212> PRT

<213> Virus Hepatitis B

<400> 13

ES 2 385 481 T3

Pro Gly Ser Thr Arg Thr Ser Thr Gly Gln Cys Lys Thr Cys Thr Thr  
1 5 10 15

Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro  
20 25 30

Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Leu Ser Trp Ala Phe  
35 40 45

Ala Lys Tyr Leu Trp Val Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser  
50 55 60

Leu Leu Val Pro Phe Val Arg Trp Phe Val Gly  
65 70 75

<210> 14

<211> 60

<212> PRT

5 <213> Virus Hepatitis B

<400> 14

Pro Gly Ser Thr Arg Thr Ser Thr Gly Gln Cys Lys Thr Cys Thr Thr  
1 5 10 15

Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro  
20 25 30

Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Leu Ser Trp Ala Phe  
35 40 45

Ala Lys Tyr Leu Trp Val Trp Ala Ser Val Arg Phe  
50 55 60

<210> 15

<211> 55

10 <212> PRT

<213> Virus Hepatitis B

ES 2 385 481 T3

<400> 15

Pro Gly Ser Thr Arg Thr Ser Thr Gly Gln Cys Lys Thr Cys Thr Thr  
1 5 10 15

Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro  
20 25 30

Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Leu Ser Trp Ala Phe  
35 40 45

Ala Lys Tyr Leu Trp Val Trp  
50 55

<210> 16

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Virus Hepatitis B

<400> 16

Pro Gly Ser Thr Arg Thr Ser Thr Gly Gln Cys Lys Thr Cys Thr Thr  
1 5 10 15

Pro Ala Gln Gly  
20

<210> 17

10 <211> 10

<212> PRT

<213> Virus Hepatitis B

<400> 17

Pro Gly Ser Thr Arg Thr Ser Thr Gly Gln  
1 5 10

15 <210> 18

<211> 51

<212> PRT

<213> Virus Hepatitis B

ES 2 385 481 T3

<400> 18

Arg Thr Ser Thr Gly Gln Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly  
1 5 10 15

Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Thr Asp Gly Asn  
20 25 30

Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Leu Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu  
35 40 45

Trp Val Trp  
50

<210> 19

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Virus Hepatitis B

<400> 19

Arg Thr Ser Thr Gly Gln  
1 5

<210> 20

10 <211> 36

<212> PRT

<213> Virus Hepatitis B

<400> 20

Pro Ile Pro Leu Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Val Trp Ala  
1 5 10 15

Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Arg Trp  
20 25 30

Phe Val Gly Leu  
35

15 <210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Virus Hepatitis B

<400> 21

Pro Ile Pro Leu Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Val Trp Ala  
1 5 10 15

Ser Val Arg Phe  
20

5 <210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> Virus Hepatitis B

<400> 22

10 Pro Ile Pro Leu Ser Trp Ala Phe Ala Lys Tyr Leu Trp Val Trp  
1 5 10 15

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador 1

<400> 23

gggtcaccaat attcttgga ac 22

<210> 24

20 <211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 2

25 <400> 24

tatacccaa gacaaaagaa aattgg 26

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador 3

<400> 25

gactcgtggg ggacttctct c 21

<210> 26

<211> 22

10 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 4

<400> 26

15 tacagacttg gcccacaata cc 22

**REIVINDICACIONES**

1. Oligo- o polipéptido que comprende
  - (a) una secuencia de aminoácidos que es una secuencia parcial de SEQ ID NO:12 con al menos 70 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO:12, en cuyo caso la secuencia parcial incluye las posiciones 73, 78, 112, 122 y 139 de SEQ ID NO:12; o
  - (b) un fragmento de un antígeno de HBs de un virus de hepatitis B según la figura 2, en cuyo caso el antígeno de HBs tiene en la posición 115 arginina, en posición 120 glutamina, en posición 154 leucina, en posición 164 valina y en posición 181 arginina y el fragmento comprende arginina 115, glutamina 120, leucina 154, valina 164 y arginina 181.
2. Oligo- o polipéptido según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo compuesto por SEQ ID NO:12 y SEQ ID NO:13.
3. Oligo- o polinucleótido que comprenden
  - (a) una secuencia de nucleótidos, que es una secuencia parcial de SEQ ID NO:1 con al menos 200 nucleótidos consecutivos de SEQ ID NO:1, en cuyo caso la secuencia parcial incluye las posiciones 218, 233, 335, 365 y 416 de SEQ ID NO:1,
  - (b) una secuencia de nucleótidos, que hibrida en condiciones severas de manera específica con un polinucleótido complementario a la secuencia SEQ ID NO:1, o
  - (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un oligo- o polipéptido según una de las reivindicaciones 1 a 2; o un oligo- o polinucleótido complementario a la misma.
4. Oligo- o polinucleótido según la reivindicación 3, caracterizado porque comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo compuesto por SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2.
5. Vector o plásmido que contienen un oligo- o polinucleótido según una de las reivindicaciones 3 o 4.
6. Célula que se transforma o se transfecta con un vector o plásmido según la reivindicación 5.
7. Célula que contiene un oligo- o polinucleótido según una de las reivindicaciones 3 a 4 o un vector o un plásmido según la reivindicación 6.
8. Método para la preparación de un oligo- o polipéptido según una de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende cultivar una célula según la reivindicación 6 o 7 en condiciones adecuadas de tal modo que se exprese el oligo- o polipéptido.
9. Método según la reivindicación 8, caracterizado porque se obtiene el oligo- o polipéptido de las células y se separa de otros oligo- o polipéptidos.
10. Anticuerpo anti-idiotípico que representa una secuencia de aminoácidos tal como se define en una de las reivindicaciones 1 o 2.
11. Kit de prueba para detectar virus de hepatitis B, el cual contiene
  - (i) un oligo- o polipéptido según una de las reivindicaciones 1 o 2; o
  - (ii) un oligo- o polinucleótido según una de las reivindicaciones 3 o 4.
12. Péptido inmunogénico o mezcla de péptidos inmunogénicos que contiene uno o varios oligo- o polipéptidos según una de las reivindicaciones 1 o 2, solos o en conexión con inmunogenes de HBV conocidos.
13. Método para detectar anticuerpos, los cuales están dirigidos contra un antígeno de hepatitis B, caracterizado porque
  - (a) se incuba una muestra con un oligo- o polipéptido según una de las reivindicaciones 1 o 2 en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo; y

(b) se detecta el complejo anticuerpo-antígeno que contiene el oligo- o polipéptido.

14. Método para detectar un ácido nucleico de hepatitis B, caracterizado porque

(a) se incuba una muestra con un oligo- o polinucleótido según una de las reivindicaciones 3 o 4 en condiciones que permiten la hibridación selectiva del oligo- o polinucleótidos con un ácido nucleico de hepatitis B en la muestra; y

5 (b) se determina si se han formado complejos de polinucleótido que comprenden el oligo- o polinucleótido.

15. Método para detectar un ácido nucleico de hepatitis B, caracterizado porque

(a) se incuba una muestra con al menos un oligo- o polinucleótido según una de las reivindicaciones 3 o 4 en condiciones que permiten la hibridación selectiva del oligo- o polinucleótido con un ácido nucleico de hepatitis B en la muestra;

10 (b) se realiza una reacción en cadena de polimerasa; y

(c) se determina si se amplificó un ácido nucleico.

16. Uso de un oligo- o polinucleótido según una de las reivindicaciones 3 a 5 como cebador.

17. Uso de un oligo- o polinucleótidos según una de las reivindicaciones 3 o 4 como sonda.

15 18. Virus de hepatitis B aislado que tiene una a-determinante que corresponde a la secuencia de aminoácidos al menos de las posiciones 115 a 181 según la reivindicación 1(b).

Figura 1: Secuencia de aminoácido del a-determinante de HBsAg de los diferentes genotipos de HBV en comparación con el nuevo mutante HDB 05

Para cada genotipo se usó un genoma representativo como base y la aa-secuencia se derivó de la secuencia de nucleótidos

A: X70 185; B: D00331; C: X01587; D: X72702, E: X75664; F: X75663; (Stuyver et al.; J. Gen. Virol. 81: 67-74 (2000); Norder et al.; J. Gen. Virol. 73: 3141-3145 (1992))

| aa #     | 101         | 111          | 121         | 131         | 141         | 151         | 161          | 170 |
|----------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-----|
| Genotipo |             |              |             |             |             |             |              |     |
| A        | QGMLPVCPLI  | PGSTTTSTGP   | CKTCTTPAQG  | NSMFPSCCCT  | KPTDGNCTCI  | PIPSSWAFK   | YLWEWASVRF   |     |
| B        | -----S----- | -----T-----  | -----T----- | -----T----- | -----S----- | -----R----- | F-----G----- |     |
| C        | -----L----- | -----TS----- | -----I----- | -----T----- | -----S----- | -----R----- | F-----G----- |     |
| D        | -----S----- | -----R-----  | -----R----- | -----Y----- | -----S----- | -----G----- | F-----A----- |     |
| E        | -----S----- | -----R-----  | -----M----- | -----L----- | -----S----- | -----G----- | F-----A----- |     |
| F        | -----S----- | -----L-----  | -----L----- | -----L----- | -----S----- | -----L----- | F-----A----- |     |
| HDB 05   | -----R----- | -----Q-----  | -----L----- | -----L----- | -----L----- | -----L----- | -----V-----  |     |
| aa #     |             | 115          | 120         |             | 154         |             | 164          |     |

Resultados en negrilla están las sustituciones de aminoácido que se derivan del HBV adw tipo silvestre

## ES 2 385 481 T3

Fig. 2      Secuencia de nucleótidos del gen s del HBV adw del tipo silvestres conocido  
 La proteína de superficie de HBV que codifica (surface antigen, HBsAg) y secuencia de aminoácidos resultante en código de tres letras o código de una letra (Coleman et al; WO 02/079217 A1)

Numeración consecutiva de nucleótido (nt) el antígeno de superficie codificante (excl. Pre S1 y y Pre S2 – región)  
 Numeración consecutiva de aminoácidos (aa)

|     |                                                                                 | (nt)    |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------|---------|
|     |                                                                                 | (aa)    |
| 1   | ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC | 60      |
| 1   | Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe | 20      |
|     | M E N I T S G F L G P L L V L Q A G F F                                         |         |
| 61  | TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT | 120     |
| 21  | Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn | 40      |
|     | L L T R I L T I P Q S L D S W W T S L N                                         |         |
| 121 | TTT CTA GGG GGA TCA CCC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC | 180     |
| 41  | Phe Leu Gly Gly Ser Pro Val Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His | 60      |
|     | F L G G S P V C L G Q N S Q S P T S N H                                         |         |
| 181 | TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ATT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT | 240     |
| 61  | Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe | 80      |
|     | S P T S C P P I C P G Y R W M C L R R F                                         |         |
| 241 | ATC ATA TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTA TTG GTT CTT CTG GAT TAT | 300     |
| 81  | Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr | 100     |
|     | I I F L F I L L L C L I F L L V L L D Y                                         |         |
| 301 | CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA ACA ACA ACC AGC ACG GGA CCC | 360     |
| 101 | Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro | 120     |
|     | Q G M L P V C P L I P G S T T T S T G P                                         |         |
| 361 | TGC AAA ACC TGC ACG ACT CCT GCT CAA GGA AAC TCT ATG TTT CCC TCC TGT TGC TGT ACA | 420     |
| 121 | Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr | 140     |
|     | C K T C T T P A Q G N S M F P S C C C T                                         |         |
| 421 | AAA CCT ACG GAT GGA AAC TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GCA AAA | 480     |
| 141 | Lys Pro Thr Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Lys | 160     |
|     | K P T D G N C T C I P I P S S W A F A K                                         |         |
| 481 | TAC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC TCT TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT | 540     |
| 161 | Tyr Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val | 180     |
|     | Y L W E W A S V R F S W L S L L V P F V                                         |         |
| 541 | CAA TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GCT ATA TGG ATG ATG TGG TAT | 600     |
| 181 | Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Ala Ile Trp Met Met Trp Tyr | 200     |
|     | Q W F V G L S P T V W L S A I W M M W Y                                         |         |
| 601 | TGG GGG CCA AGA CTG TAC TCC ATC GTT AGT CCC TTT ATC CCG CTG TTA CCA ATT TTC TTT | 660     |
| 201 | Trp Gly Pro Arg Leu Tyr Ser Ile Val Ser Pro Phe Ile Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe | 220     |
|     | W G P R L Y S I V S P F I P L L P I F F                                         |         |
| 661 | TGT CTT TGG GTA TAC ATT                                                         | 678     |
| 221 | Cys Leu Trp Val Tyr Ile                                                         | 226/389 |
|     | C L W V Y I                                                                     |         |

## ES 2 385 481 T3

Figura 3

Secuencia de nucleótido del gen que codifica HBV surface antigen del HBV adw de tipo silvestre (la fila superior de nt 1 a nt 678) en comparación con la secuencia de nucleótido nt 127 a nt 588 secuenciada de la nueva variante HDB 05 (fila inferior, en las desviación de nucleótido resaltado en negrilla y puesto entre paréntesis, si las mutaciones no conduce a una sustitución de aminoácido)

|     |                                                                                                                                                                        |     |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1   | ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC                                                                                        | 60  |
| 61  | TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT                                                                                        | 120 |
| 121 | TTT CTA GGG GGA TCA CCC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC<br>127: GGG GGA TCA CCC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC        | 180 |
| 181 | TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ATT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT<br>TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ATT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT     | 240 |
| 241 | ATC ATA TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTA TTG GTT CTT CTG GAT TAT<br>ATC ATA TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTA TTG GTT CTT CTG GAT TAT     | 300 |
| 301 | CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA ACA ACA ACC AGC ACG GGA CCC<br>CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA ACA AGA ACC (AGT) ACG GGA CAA   | 360 |
| 361 | TGC AAA ACC TGC ACG ACT CCT GCT CAA GGA AAC TCT ATG TTT CCC TCC TGT TGC TGT ACA<br>TGC AAA ACC TGC ACG ACT CCT GCT CAA (GGC) AAC TCT ATG TTT CCC (TCA) TGT TGC TGT ACA | 420 |
| 421 | AAA CCT ACG GAT GGA AAC TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GCA AAA<br>AAA CCT ACG GAT GGA(AAT) TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TTG TCC TGG GCT TTC GCA AAA    | 480 |
| 481 | TAC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GTC CGT TTC TCT TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT<br>TAC CTA TGG GTG TGG GCC TCA GTC CGT TTC TCT TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT     | 540 |
| 541 | CAA TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GCT ATA TGG ATG ATG TGG TAT<br>CGG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GCT ATA TGG 588                 | 600 |
| 601 | TGG GGG CCA AGA CTG TAC TCC ATC GTT AGT CCC TTT ATC CCG CTG TTA CCA ATT TTC TTT                                                                                        | 660 |
| 661 | TGT CTT TGG GTA TAC ATT 678                                                                                                                                            |     |

ES 2 385 481 T3

Figura 4

Secuencia de nucleótido del gen S de la nueva variante de HBV HDB 05 (nt 127 a nt 588) del genoma que codifica HBV surface Antigen. Marcados en negrilla solo las desviaciones de nucleótido que conducen a una secuencia modificada de aminoácido

127 GGG GGA TCA CCC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC 180  
 181 TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ATT TGT CCT GGT FAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT 240  
 241 ATC ATA TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTA TTG GTT CTT CTG GAT TAT 300  
 301 CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA ACA AGA ACC AGT ACG GGA CAA 360  
 361 TGC AAA ACC TGC ACG ACT CCT GCT CAA GGC AAC TCT ATG TTT CCC TCA TGT TGC TGT ACA 420  
 421 AAA CCT ACG GAT GGA AAT TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TTG TCC TGG GCT TTC GCA AAA 480  
 481 TAC CTA TGG GTG TGG GCC TCA GTC CGT TTC TCT TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT 540  
 541 CGG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GCT ATA TGG 588

## ES 2 385 481 T3

Figura 5      Secuencia de nucleótidos de S gen (nt 127 a 588) y secuencia de aminoácidos correspondiente (aa 43 a 196) de la nueva variante de HBV HDB 05 (resaltados en negrilla y subrayados están los aminoácidos que se presentan sustituidos en comparación con el HBV de tipo silvestre adw)

|     |                                                                                        |        |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 127 | GGG GGA TCA CCC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC                | 180    |
|     | aa 43 <u>G G S P V C L G Q N S Q S P T S N H</u>                                       | 60     |
| 181 | TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ATT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT        | 240    |
| 61  | <u>S P T S C P P I C P G Y R W M C L R R F</u>                                         | 80     |
| 241 | ATC ATA TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTA TTG GTT CTT CTG GAT TAT        | 300    |
| 81  | <u>I I F L F I L L L C L I F L L V L L D Y</u>                                         | 100    |
| 301 | CAA GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCA ACA <u>AGA</u> ACC AGT ACG GGA CAA | 360    |
| 101 | <u>Q G M L P V C P L I P G S T R T S T G Q</u>                                         | 120    |
| 361 | TGC AAA ACC TGC ACG ACT CCT GCT CAA GGC AAC TCT ATG TTT CCC TCA TGT TGC TGT ACA        | 420    |
| 121 | <u>C K T C T T P A Q G N S M F P S C C C T</u>                                         | 140    |
| 421 | AAA CCT ACG GAT GGA AAT TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA <u>TTG</u> TCC TGG GCT TTC GCA AAA | 480    |
| 141 | <u>K P T D G N C T C I P I P L S W A F A K</u>                                         | 160    |
| 481 | TAC CTA TGG <u>GTG</u> TGG GCC TCA GTC CGT TTC TCT TGG CTC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT | 540    |
| 161 | <u>Y L W V W A S V R F S W L S L L V P F V</u>                                         | 180    |
| 541 | CGG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GCT ATA TGG                        | 588    |
| 181 | <u>R</u> W F V G L S P T V W L S A I W                                                 | aa 196 |

Los siguientes aa están sustituidos frente al HBV de tipo silvestre adw en la variante HDB 05 (x):  
 T 115(R), P 120 (Q), S 154 (L), E 164 (V) (Todos en la región de la a-determinante) así como Q 181 (R) (no en la región del a-determinante)

ES 2 385 481 T3

Figura 6

Comparación de las secuencias de aminoácidos de la a-determinante (aa 100 hasta aa 180) de la nueva variante HDB 05 (fila inferior) con el HBV de tipo silvestre adw (fila superior)

|     | Secuencia -aa tipo silvestre adw: |   |   |          |   |   |   |   |   |   |     |   |   |          |          | Y 100 |   |   |   |          |     |
|-----|-----------------------------------|---|---|----------|---|---|---|---|---|---|-----|---|---|----------|----------|-------|---|---|---|----------|-----|
|     | Secuencia-aa variante HDB 05      |   |   |          |   |   |   |   |   |   |     |   |   |          |          | Y     |   |   |   |          |     |
| 101 | Q                                 | G | M | L        | P | V | C | P | L | I | P   | G | S | T        | T        | T     | S | T | G | P        | 120 |
|     | Q                                 | G | M | L        | P | V | C | P | L | I | P   | G | S | T        | <u>R</u> | T     | S | T | G | <u>Q</u> |     |
| 121 | C                                 | K | T | C        | T | T | P | A | Q | G | N   | S | M | F        | P        | S     | C | C | C | T        | 140 |
|     | C                                 | K | T | C        | T | T | P | A | Q | G | N   | S | M | F        | P        | S     | C | C | C | T        |     |
| 141 | K                                 | P | T | D        | G | N | C | T | C | I | P   | I | P | S        | S        | W     | A | F | A | K        | 160 |
|     | K                                 | P | T | D        | G | N | C | T | C | I | P   | I | P | <u>L</u> | S        | W     | A | F | A | K        |     |
| 161 | Y                                 | L | W | E        | W | A | S | V | R | F | S   | W | L | S        | L        | L     | V | P | F | V        | 180 |
|     | Y                                 | L | W | <u>V</u> | W | A | S | V | R | F | S   | W | L | S        | L        | L     | V | P | F | V        |     |
| 181 | Q                                 | W | F | V        | G | L | S | P | T | V | 190 |   |   |          |          |       |   |   |   |          |     |
|     | <u>R</u>                          | W | F | V        | G | L | S | P | T | V |     |   |   |          |          |       |   |   |   |          |     |

Los siguientes aa están sustituidos frente al HBV de tipo silvestre adw en la variante HDB 05 (x):  
 T 115(R), P 120 (Q), S 154 (L), E 164 (V) (Todos en la región de la a-determinante) así como Q 181 (R) (no en la región del a-determinante)