

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 193**

51 Int. Cl.:
C12N 15/34 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C07K 14/02 (2006.01)
C07K 16/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08799489 .3**
96 Fecha de presentación: **12.09.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2198026**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54 Título: **Ácido nucleico pre-S2 de hepatitis B**

30 Prioridad:
13.09.2007 US 972142 P
11.09.2008 US 209093

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2012

73 Titular/es:
ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 ABBOTT PARK ROAD
ABBOTT PARK, ILLINOIS 60064, US

72 Inventor/es:
COLEMAN, PAUL F. y
PEARCE, SANDRA K.

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 389 193 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

Ácido nucleico pre-S2 de hepatitis B

5 **Campo de la invención**

La presente se refiere a ácidos nucleicos del virus de la hepatitis B y kits relacionados con los mismos

10 **Antecedentes de la invención**

10 El virus de la hepatitis B (VHB) ha infectado más de 2 mil millones de personas en todo el mundo. Provoca una diversidad de enfermedades en seres humanos que varían de infección subclínica leve a hepatitis fulminante y activa crónica. Más de 400 millones de personas especialmente niños y ancianos, están infectados de forma crónica con VHB. El virus de la hepatitis B es 100 veces más infeccioso que el virus del SIDA, pero puede prevenirse, con
15 acción. Por tanto, el punto central del combate contra VHB incluye vacunación. Una vacuna no es útil para los que ya están infectados con hepatitis B. Si el virus se detecta suficientemente pronto, sin embargo, están disponibles opciones de tratamiento para los infectados de forma crónica. En consecuencia, los ensayos de diagnóstico se han centrado en la identificación de antígenos diana del virus VHB para detección suficientemente temprana.

20 El genoma del VHB es un ADN circular, parcialmente bicatenario de aproximadamente 3.200 pares de bases de longitud y codifica siete proteínas virales. La envoltura del VHB consiste en tres proteínas glucosiladas (proteínas superficiales de VHB grandes, medianas y pequeñas o LHB, MHB y SHB respectivamente), que se codifican por el mismo gen, pero se producen a partir de tres sitios de inicio diferentes y comparten el mismo sitio de terminación. Las tres regiones diferentes del gen de proteína de la envoltura, preS1, preS2 y S, codifican LHB, MHB y SHB,
25 respectivamente (Véase Fig. 1 y Fig. 2). Estas tres proteínas se expresan en diferentes relaciones y se ensamblan para formar la cápsida exterior del virión de VHB y también forman una partícula viral incompleta. Los ensayos de antígeno de superficie de VHB detectan ambas formas de productos de expresión, viriones y partículas.

30 Las regiones de las proteínas de VHB se exponen en superficies de la partícula de VHB y pueden ser las dianas de vigilancia inmune. Sin embargo, VHB muestra una alta tasa de mutación debido a su dependencia esencial de la transcriptasa inversa (RT) en replicación, y la escasa capacidad de corrección de RT. En consecuencia, VHB es capaz de evadir la vigilancia inmune y los regímenes de vacunación mediante mutaciones en las proteínas de la envoltura, incluyendo SHB. Además, debido a que algunos métodos de detección de VHB dependen de controlar los epítomos dentro de las proteínas de la envoltura usando anticuerpos anti-SHB, VHB altamente mutable puede
35 también escapar a la detección. Existe por lo tanto una necesidad continuada en la técnica de métodos y composiciones para detectar VHB.

Sumario de la invención

40 Se proporciona en este documento una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una MHB, en la que la secuencia de ácido nucleico de la misma comprende una secuencia de inicio de preS2 que comprende SEC ID N° 4. SEC ID N° 4 es 5'-RNNATGG-3', en la que N es A, T, G o C y R es A o G.

45 La molécula de ácido nucleico puede comprender adicionalmente una secuencia de nucleótidos que codifica una SHB, o una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a la misma.

También se proporciona en este documento un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la presente invención y una célula huésped que comprende el vector.

50 También se proporciona en este documento un kit que comprende el vector, o la célula huésped que comprende dicho vector.

Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 es una representación esquemática de un virión de VHB, incluyendo la mezcla de constituyentes proteicos de la envoltura de VHB LHB, MHB y SHB que se han ensamblado para formar la cápsida exterior. Un ensamblaje similar de estas proteínas forma la partícula incompleta (no mostrada).

60 La Figura 2 muestra una representación esquemática de la fase abierta de lectura preS1 de VHB y sus regiones preS2 y S. La Figura 2 también muestra un esquema de las proteínas de superficie de VHB (LHB, MHB y SHB) codificadas por el ácido nucleico preS1.

La Figura 3 es esquema de mutantes de fase abierta de lectura preS1 y su expresión proteica resultante.

La Figura 4 muestra mapeo de epítomos de antígenos se superficie de VHB de origen natural AdA y un control positivo que usa diversos anticuerpos anti-proteína de superficie de VHB.

65 La Figura 5 (comparativa) muestra la antigenicidad de una proteína codificada por preS2 producida a partir de las secuencias preS2 mutantes como se mide usando diversos anticuerpos anti-proteína de superficie de VHB.

La Figura 6 (comparativa) muestra los resultados de muestra a punto de corte (S/CO) medios usando los inmunoensayos de diagnóstico de Abbott en el mercado Auszyme Monoclonal de ARCHITECT HBsAg.

Descripción detallada

5 La detección y cuantificación apropiada de VHB en muestras clínicas usando un enfoque basado en anticuerpos puede depender de un control de proteínas positivo o calibrador que comprende una mezcla óptima tanto de SHB recombinante como de MHB recombinante. Un sistema de expresión que utiliza un sitio de inicio preS2 no de Kozak y un sitio de inicio S de Kozak de tipo silvestre para expresar proteínas de superficie de VHB, MHB y SHB, da como resultado niveles sub-óptimos de MHB. Los inventores han realizado el descubrimiento de que la alteración del sitio de inicio preS2 de una secuencia no de Kozak a una secuencia de Kozak parcial da como resultado un ácido nucleico capaz de expresar una mezcla de proteínas de superficie de VHB, MHB y SHB con una relación de antigenicidad mejorada entre estas dos proteínas. Resulta sorprendente que la expresión de proteína de superficie de VHB usando un sitio de inicio preS2 Kozak parcial introducido por mutación parece reflejar de forma más precisa la relación de los antígenos SHB y MHB vistos en muestras clínicas. Puede usarse MHB expresado usando una secuencia modificada tal solo, o con SHB a una concentración o relación conocida como un control positivo para ensayar la reactividad de anticuerpos anti-proteínas de VHB.

1. Definiciones.

20 La terminología usada en este documento es para el fin de describir realizaciones particulares solamente y no se pretende que sea limitante. Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un” y “el” incluyen referentes plurales a no ser que el contexto claramente indique otra cosa.

25 Para enumeración de intervalos numéricos en este documento, cada número intermedio entre ellos con el mismo grado de precisión se contempla de forma explícita. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo 6,0-7,0, se contemplan de forma explícita los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

30 a. anticuerpo

“Anticuerpo” como se usa en el presente documento puede significar un anticuerpo de las clases IgG, IgM, IgA, IgD o IgE, o fragmentos o derivados del mismo, incluyendo Fab, F(ab')₂, Fd y anticuerpos de cadena sencilla, diacuerpos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos bifuncionales y derivados de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, anticuerpo purificado por afinidad, o mezcla de los mismos que muestra suficiente especificidad de unión por un epítipo deseado o una secuencia derivada del mismo. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo quimérico. El anticuerpo puede derivatizarse mediante la unión de uno o más restos químicos, peptídicos o polipeptídicos conocidos en la técnica. El anticuerpo puede conjugarse con un resto químico.

40 b. unido

“Unido” o “inmovilizado” como se usa en el presente documento para referirse a un polipéptido y un soporte sólido puede significar que la unión entre el polipéptido y el soporte sólido es suficiente para ser estable en condiciones de unión, lavado, análisis y retirada. La unión puede ser covalente o no covalente. Pueden formarse enlaces covalentes directamente entre el polipéptido y el soporte sólido o pueden formarse por un reticulador o por inclusión de un grupo reactivo específico en el soporte sólido o la sonda o ambas moléculas. La unión no covalente puede ser una o más de interacciones electrostáticas, hidrófilas e hidrófobas. Se incluye en la unión no covalente la unión covalente de una molécula, tal como estreptavidina, al soporte y la unión no covalente de un polipéptido biotinilado a la estreptavidina. La inmovilización también puede implicar una combinación de interacciones covalentes y no covalentes.

c. secuencia codificante

55 “Secuencia codificante” como se usa en este documento puede significar una secuencia polinucleotídica que se transcribe a ARNm o se traduce a un polipéptido cuando se sitúa bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante pueden determinarse por un codón de inicio de la traducción en el extremo 5' y un codón de parada de la traducción en el extremo 3'. Una secuencia codificante puede incluir un ARNm o secuencias polipeptídicas recombinantes.

60 d. complemento

65 “Complemento” o “complementario” como se usa en este documento para referirse a un ácido nucleico puede significar formación de pares de bases de Watson-Crick (por ejemplo, A-T/U y C-G) o de Hoogsteen entre nucleótidos o análogos de nucleótidos de moléculas de ácido nucleico.

e. epítopo

“Epítopo” o “antígeno” como se usa en este documento puede significar un determinante antigénico de un polipéptido. Un epítopo puede comprender 3 aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítopo. Un epítopo también puede comprender al menos 4-10 aminoácidos. Se conocen en la técnica métodos para examinar la conformación espacial e incluyen cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional.

f. gen

“Gen” como se usa en este documento puede ser un gen natural (por ejemplo, genómico) o sintético que comprende secuencias reguladoras de la transcripción y/o de la traducción, una región codificante y/o secuencias no traducidas (por ejemplo, intrones, secuencias no traducidas 5' y 3'). La región codificante del gen puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos. Un gen también puede ser un ARNm o ADNc que corresponde a las regiones codificantes (por ejemplo, exones y ARNmi) que comprenden opcionalmente secuencias no traducidas 5' o 3' unidas a las mismas. Un gen también puede ser una molécula de ácido nucleico amplificada producida *in vitro* que comprende toda o una parte de la región codificante y/o secuencias no traducidas 5' o 3' unidas a la misma.

g. célula hospedadora

“Célula hospedadora” como se usa en este documento puede ser una célula de origen natural o una célula transformada que puede contener un vector y puede soportar la replicación del vector. Las células hospedadoras pueden ser células cultivadas, explantes, células *in vivo* y similares. Las células hospedadoras pueden ser células procariontas tales como *E. coli*, o células eucariontas tales como células de levadura, de insectos, de anfibios o de mamíferos, tales como COS-7, CHO y HeLa.

h. idénticas

“Idénticas” o “identidad” como se usan en este documento en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas, pueden significar que las secuencias tienen un porcentaje específico de restos que son el mismo en una región específica. El porcentaje puede calcularse alineando de forma óptima las dos secuencias, comparando las dos secuencias sobre la región específica, determinando el número de posiciones en las que aparece el resto idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidente, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la región específica, y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. En casos en los que las dos secuencias son de diferentes longitudes o el alineamiento que produce uno o más extremos escalonados y la región específica de comparación incluye solamente una secuencia sencilla, los restos de secuencia sencilla se incluyen en el denominador pero no el numerador del cálculo.

i. marcador

“Marcador” o “marcador detectable” como se usa en este documento puede significar un resto capaz de generar una señal que permita la medición cuantitativa o relativa directa o indirecta de una molécula a la que se une. El marcador puede ser un sólido tal como una placa de microtitulación, partícula, micropartícula o portaobjetos de microscopio; una enzima; un sustrato enzimático; un inhibidor de enzima; coenzima; precursor enzimático; apoenzima; sustancia fluorescente; pigmento; compuesto quimioluminiscente; sustancia luminiscente; sustancia colorante; sustancia magnética; o una partícula metálica tal como coloide de oro; una sustancia radiactiva tal como ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^3H , ^{35}S , o ^{14}C ; un derivado de fenol fosforilado tal como nitrofenil fosfato, derivado de luciferina o derivado de dioxetano; o similares. La enzima puede ser una deshidrogenasa; una oxidoreductasa tal como una reductasa u oxidasa; una transferasa que cataliza la transferencia de grupos funcionales, tales como un grupo amino; carboxilo, metilo, acilo, o fosfato; una hidrolasa que puede hidrolizar un enlace tal como éster, glucósido, éter o enlace peptídico; una liasa; una isomerasa; o una ligasa. La enzima también puede conjugarse con otra enzima.

La enzima puede detectarse por realización de ciclo enzimático. Por ejemplo, cuando el marcador detectable es una fosfatasa alcalina, pueden hacerse mediciones observando la fluorescencia o luminiscencia generada a partir de un sustrato adecuado, tal como un derivado de umbeliferona. El derivado de umbeliferona puede comprender 4-metilumbeliferil fosfato.

El marcador fluorescente o quimioluminiscente puede ser un isotiocianato de fluoresceína; un derivado de rodamina tal como isotiocianato de rodamina B o isotiocianato de tetrametil rodamina; un cloruro de dancilo (cloruro de 5-(dimetilamino)-1-naftalenosulfonilo); un fluoruro de dancilo; una fluorescamina (4-fenilespiro[furan-2(3H); 1 γ -(3 γ H)-isobenzofurano]-3;3 γ -diona); una ficobiliproteína tal como una ficocianina o fisoeritrina; una sal de acridinio; un compuesto de luminol tal como lumiferina, luciferasa o aequorina; imidazoles; un éster de ácido oxálico; un compuesto quelado de elementos de tierras raras tales como europio (Eu), terbio (Tb) o samario (Sm); o un derivado de coumarina tal como 7-amino-4-metilcoumarina.

El marcador también puede ser un hapteno, tal como adamantina, isotiocianato de fluoresceína o carbazol. El hapteno puede permitir la formación de un agregado cuando se pone en contacto con un anticuerpo multivalente o un resto que contiene (estrept)avidina. El hapteno también puede permitir unión fácil de una molécula con la que se une a un sustrato sólido.

El marcador puede detectarse cuantificando el nivel de una molécula unida a un marcador detectable, tal como mediante el uso de electrodos; medición espectrofotométrica del color, luz o absorbancia; o inspección visual.

j. ácido nucleico

“Molécula de ácido nucleico” u “oligonucleótido” o “polinucleótido” usadas en este documento puede significar al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. La representación de una cadena sencilla también define la secuencia de la hebra complementaria. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico también abarca la hebra complementaria de una hebra sencilla representada. Muchas variantes de una molécula de ácido nucleico pueden usarse para el mismo fin que un ácido nucleico dado. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico también abarca moléculas de ácido nucleico sustancialmente idénticas y complementos de las mismas. Una hebra sencilla proporciona una sonda que puede hibridar con una secuencia diana en condiciones de hibridación rigurosas. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico también abarca una sonda que hibrida en condiciones de hibridación rigurosas.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser monocatenarias o bicatenarias, o pueden contener partes de secuencia tanto monocatenaria como bicatenaria. La molécula de ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN o un híbrido, en el que la molécula de ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo y ribonucleótidos, y combinaciones de bases que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina e isoguanina. Pueden obtenerse moléculas de ácido nucleico por métodos de síntesis química o por métodos recombinantes.

Una molécula de ácido nucleico generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque pueden incluirse análogos de moléculas de ácido nucleico que pueden tener al menos un enlace diferente, por ejemplo, enlaces de fosforamidoato, fosforotioato, fosforoditioato u O-metilfosforoamidoato y cadenas principales y enlaces de ácido péptido nucleico. Otras moléculas análogas de ácidos nucleicos incluyen las de cadenas principales positivas, cadenas principales no iónicas y cadenas principales sin ribosa, incluyendo las descritas en las Patentes de Estados Unidos N° 5.235.033 y 5.034.506, que se incorporan por referencia. Las moléculas de ácido nucleico que contienen uno o más nucleótidos modificados o de origen no natural también se incluyen dentro de una definición de ácidos nucleicos. El análogo de nucleótido modificado puede localizarse por ejemplo en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la molécula de ácido nucleico. Los ejemplos representativos de análogos de nucleótidos pueden seleccionarse de ribonucleótidos modificados en su cadena principal o azúcar. Debería observarse, sin embargo, que también son adecuados ribonucleótidos con nucleobases modificadas, es decir ribonucleótidos, que contienen una nucleobase de origen no natural en lugar de una nucleobase de origen natural tales como uridinas o citidinas modificadas en la posición 5, por ejemplo 5-(2-amino)propil uridina, 5-bromo uridina; adenosinas y guanosinas modificadas en la posición 8, por ejemplo 8-bromo guanosina; desaza nucleótidos, por ejemplo 7-desaza-adenosina; nucleótidos O y N-alquilados, por ejemplo N6-metil adenosina. El grupo 2'OH puede reemplazarse por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH2, NHR, NR2 o CN, en el que R es C1-C6 alquilo, alqueno o alquínilo y halo es F, Cl, Br o I. Los nucleótidos modificados también incluyen nucleótidos conjugados con colesterol a través de, por ejemplo, un enlace de hidroxiprolinol como se describen en Krutzfeldt *et al.*, Nature (30 de Oct., 2005), Soutschek *et al.*, Nature 432: 173-178 (2004), y Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20050107325, que se incorpora en este documento por referencia. Las moléculas de ácido nucleico y nucleótidos modificados también pueden incluir ácidos nucleicos bloqueados (LNA), como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 20020115080, que se incorpora en este documento por referencia. Se describen moléculas de ácido nucleico y nucleótidos modificados adicionales en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20050182005, que se incorpora en este documento por referencia. Pueden realizarse modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato por una diversidad de razones, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y semi-vida de tales moléculas en ambientes fisiológicos, para potenciar la difusión a través de membranas celulares o como sondas en un biochip. Pueden realizarse mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos. Como alternativa, pueden realizarse mezclas de diferentes análogos de moléculas de ácido nucleico y mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos.

k. fase abierta de lectura

“Fase abierta de lectura” u “ORF” como se usa en este documento puede referirse a una región de una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido. La ORF puede representar una parte de una secuencia codificante o una secuencia codificante total.

l. ligado operativamente

“Ligado operativamente” usado en este documento puede significar que la expresión de un gen está bajo el control de un promotor con el que está conectado espacialmente. Un promotor puede situarse 5' (corriente arriba) o 3'

(corriente abajo) de un gen bajo su control. La distancia entre el promotor y un gen puede ser aproximadamente la misma que la distancia entre ese promotor y el gen que controla en el gen del que deriva el promotor. Como se conoce en la técnica, la variación en esta distancia puede acomodarse sin pérdida de función promotora. El promotor puede comprender un promotor T7, TP1, lactasa o metalotionina.

5

m. péptido

Un “péptido” o “polipéptido” como se usa en este documento puede significar una secuencia unida de aminoácidos y puede ser natural, sintético o una modificación o combinación natural o sintética.

10

n. promotor

“Promotor” como se usa en el presente documento puede significar una molécula derivada de forma natural o sintética que es capaz de conferir, activar o potenciar la expresión de un ácido nucleico en una célula. Un promotor puede comprender una o más secuencias reguladoras transcripcionales específicas para potenciar adicionalmente la expresión y/o para alterar la expresión espacial y/o expresión temporal de las mismas. Un promotor también puede comprender elementos represores o potenciadores distales, que pueden localizarse hasta a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor puede derivar de fuentes que incluyen viral, bacteriana, fúngica, plantas, insectos y animales. Un promotor puede regular la expresión de un componente génico de forma constitutiva, o diferencialmente con respecto a la célula, el tejido u órgano en el que se produce la expresión o, con respecto a la etapa de desarrollo en la que se produce la expresión, o en respuesta a estímulos externos tales como estreses fisiológicos, patógenos, iones metálicos o agentes inductores. Los ejemplos representativos de promotores incluyen el promotor de bacteriófago T7, promotor de bacteriófago T3, promotor SP6, promotor-operador lac, promotor tac, promotor tardío de SV40, promotor temprano de SV40, promotor de RSV-LTR, promotor IE de CMV, promotor temprano de SV40 o promotor tardío de SV40 y el promotor IE de CMV.

15

20

25

o. polipéptido recombinante

Un “polipéptido recombinante” o “proteína recombinante” como se usa en este documento puede significar al menos un polipéptido de origen genómico, semisintético o sintético que en virtud de su origen o manipulación no está asociado con toda o una parte del polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza o en forma de una biblioteca, o está unido a un polinucleótido distinto de al que se une en la naturaleza. El polipéptido recombinante puede no traducirse necesariamente de una secuencia de ácido nucleico designada de VHB. El polipéptido recombinante también puede generarse de cualquier manera, incluyendo síntesis química o expresión de un sistema de expresión recombinante, o aislarse de VHB.

30

35

p. marcador seleccionable

“Marcador seleccionable” como se usa en este documento puede significar cualquier gen que confiera un fenotipo en una célula hospedadora en la que se expresa para facilitar la identificación y/o selección de células que se transfectan o transforman con una construcción genética. Los ejemplos representativos de marcadores seleccionables incluyen el gen de resistencia a ampicilina (Ampr), gen de resistencia a tetraciclina (Tcr), gen de resistencia a kanamicina bacteriana (Kannr), gen de resistencia a zeocina, el gen AURI-C que confiere resistencia al antibiótico aureobasidina A, gen de resistencia a fosfotricina, gen de neomicina fosfotransferasa (nptII), gen de resistencia a higromicina, gen de beta-glucuronidasa (GUS), gen de cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) y gen de luciferasa.

40

45

q. soporte sólido

“Soporte sólido” o “fase sólida” como se usa en este documento puede ser las paredes de pocillos de una bandeja de reacción, tubos de ensayo, perlas de poliestireno, perlas magnéticas, tiras de nitrocelulosa, membranas, micropartículas tales como partículas de látex y otras. El soporte sólido no es crítico y puede seleccionarse por un experto en la materia. Por lo tanto, las partículas de látex, micropartículas, perlas magnéticas o no magnéticas, membranas, tubos de plástico, paredes de pocillos de microtitulación, microplacas de vidrio o silicio y glóbulos rojos de ovejas son todos ejemplos adecuados. Los métodos adecuados para inmovilizar péptidos en soportes sólidos incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. El soporte sólido también puede ser cualquier material que sea insoluble, o puede hacerse insoluble por una reacción posterior. El soporte sólido puede seleccionarse por su capacidad intrínseca para atraer e inmovilizar el reactivo de captura. Como alternativa, el soporte sólido puede conservar un receptor adicional que tiene la capacidad de atraer e inmovilizar el reactivo de captura. El receptor adicional puede incluir una sustancia cargada que se carga en sentido opuesto al reactivo de captura en sí mismo o a una sustancia cargada conjugada con el reactivo de captura. Como otra alternativa más, la molécula receptora puede ser cualquier miembro de unión específico que se inmovilice en (unido a) el soporte sólido y que tenga la capacidad de inmovilizar el reactivo de captura a través de una reacción de unión específica. La molécula receptora permite la unión indirecta del reactivo de captura con un material de soporte sólido antes de la realización del ensayo o durante la realización del ensayo. El soporte sólido puede ser un plástico, plástico derivatizado, metal magnético o no magnético, superficie de vidrio o silicio de un tubo de ensayo, pocillo de

50

55

60

65

microtitulación, lámina, perla, micropartícula, microplaca y otras configuraciones conocidas por los expertos habituales en la materia.

5 Se contempla que el soporte sólido también puede comprender cualquier material poroso adecuado con suficiente porosidad para permitir el acceso por anticuerpos de detección y una afinidad de superficie adecuada para unir antígenos. Generalmente se prefieren estructuras microporosas, pero también pueden usarse materiales con estructura de gel en estado hidratado. Tales soportes sólidos útiles incluyen: carbohidratos poliméricos naturales y sus derivados modificados de forma sintética, reticulados o sustituidos, tales como agar, agarosa, ácido alginico reticulado, goma guar sustituida y reticulada, ésteres de celulosa, especialmente con ácido nítrico y ácidos carboxílicos, ésteres de celulosa mixta y éteres de celulosa; polímeros naturales que contienen nitrógeno, tales como proteínas y derivados, incluyendo gelatinas reticuladas o modificadas; polímeros de hidrocarburos naturales, tales como látex y goma; polímeros sintéticos que pueden prepararse con estructuras adecuadamente porosas, tales como polímeros de vinilo, incluyendo polietileno, polipropileno, poliestireno, polivinil cloruro, polivinilacetato y sus derivados parcialmente hidrolizados, poli(acrilamidas, polimetacrilatos, copolímeros y terpolímeros de los policondensados anteriores, tales como poliésteres, poliamidas y otros polímeros, tales como poliuretanos o poliepóxidos; materiales inorgánicos porosos tales como sulfatos o carbonatos de metales alcalinotérreos y magnesio, incluyendo sulfato de bario, sulfato de calcio, carbonato de calcio, silicatos de metales alcalinos y alcalinotérreos, aluminio y magnesio; y óxidos o hidratos de aluminio o silicio, tales como arcillas, alúmina, talco, caolín, zeolita, gel de sílice o vidrio (estos materiales pueden usarse como filtros con los materiales poliméricos anteriores); y mezclas o copolímeros de las clases anteriores, tales como copolímeros de injerto obtenidos iniciando la polimerización de polímeros sintéticos en un polímero natural preexistente. Todos estos materiales pueden usarse en formas adecuadas, tales como películas, láminas o placas, o pueden usarse para recubrir, o unirse con o laminar vehículos inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas plásticas o telas.

25 La estructura porosa de nitrocelulosa tiene excelentes cualidades de absorción y adsorción para una amplia diversidad de reactivos incluyendo anticuerpos monoclonales. El nylon también posee características similares y también es adecuado. Se contempla que tales soportes sólidos porosos descritos anteriormente en este documento están preferiblemente en forma de láminas de grosor de aproximadamente 0,01 a 0,5 mm, preferiblemente aproximadamente 0,1 mm. El tamaño de poro puede variar dentro de límites amplios, y es preferiblemente de aproximadamente 0,025 a 15 micrómetros, especialmente de aproximadamente 0,15 a 15 micrómetros. Las superficies de tales soportes pueden activarse por procesos químicos que causan enlaces covalentes del antígeno o anticuerpo con el soporte. La unión irreversible del antígeno o anticuerpo se obtiene, sin embargo, en general, por adsorción en el material poroso por fuerzas hidrófobas escasamente entendidas. También se describen soportes sólidos adecuados en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de serie 227.272, que se incorpora en este documento por referencia.

r. condiciones de hibridación rigurosas

40 Las "condiciones de hibridación rigurosas" como se usa en este documento pueden significar condiciones en las que una primera secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, sonda) se hibridará con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, diana), tal como en una mezcla compleja de ácidos nucleicos. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las condiciones rigurosas pueden seleccionarse para que sean de aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T_m puede ser la temperatura (en fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidos) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (puesto que las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m, el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas pueden ser en las que la concentración salina es menor de aproximadamente 1,0 M de ión sodio, tal como aproximadamente 0,01-1,0 M de concentración de ión sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, aproximadamente 10-50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, más de aproximadamente 50 nucleótidos). También pueden conseguirse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva puede ser al menos 2 a 10 veces la hibridación de fondo. Las condiciones de hibridación rigurosas ejemplares incluyen las siguientes: formamida 50%, SSC 5x y SDS 1%, incubando a 42 °C, o SSC 5x, SDS 1%, incubando a 65 °C, con lavado en SSC 0,2x y SDS 0,1% a 65 °C.

Las condiciones de rigurosidad moderada pueden significar prelavado en una solución de SSC 5x, SDS 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridación a 50 °C o 65 °C, SSC 5x, durante una noche; seguido de lavado dos veces a 65 °C durante 20 minutos con cada uno de SSC 2x, 0,5x y 0,2x que contiene SDS 0,1%.

60 Condiciones de rigurosidad baja pueden significar lavado en una solución de SSC 2-5x a 50-55 °C. Las condiciones de rigurosidad baja también pueden comprender lavado en SSC 2x, SDS 0,1% a 50-55 °C, o prelavado e hibridación durante 4 y 12 h, respectivamente, a 50 °C en SSPE 5x (NaH₂PO₄ 0,2 M, pH 7,4, NaCl 3 M, EDTA 20 mM), que puede contener solución de Denhardt 2,5x, SDS 0,1% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 0,1 mg/ml.

65

s. sustancialmente idéntica

“Sustancialmente idéntica” como se usa en este documento puede significar que una primera y segunda secuencia son al menos 50% - 99% idénticas sobre una región de 8-100 o más nucleótidos o aminoácidos

t. variante

“Variante” como se usa en este documento en referencia a un ácido nucleico puede significar (i) una parte de una secuencia de nucleótidos referida; (ii) el complemento de una secuencia de nucleótidos referida o parte del mismo; (iii) un ácido nucleico que es sustancialmente idéntico a un ácido nucleico referido o el complemento del mismo; o (iv) un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas con el ácido nucleico referido, complemento del mismo, o una secuencia sustancialmente idéntica al mismo; y como se usa en referencia a un polipéptido puede significar (i) una parte de una secuencia polipeptídica referida; o (ii) una proteína que es sustancialmente idéntica a una proteína referida. Una variante también puede ser una proteína procesada de forma diferencial, tal como por proteólisis, fosforilación u otra modificación post-traducciona.

u. vector

“Vector” usado en este documento puede significar una secuencia de ácido nucleico que contiene un origen de replicación. Un vector puede ser un plásmido, bacteriófago, cromosoma artificial bacteriano o cromosoma artificial de levadura. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. Un vector puede ser un vector extracromosómico autorreplicativo o un vector que se integra en un genoma hospedador. Se conoce una gran variedad de vectores y promotores adecuados por los expertos en la materia y están disponibles en el mercado. Los siguientes vectores se proporcionan como ejemplo. Bacterianos: pINCY (Incyte Pharmaceuticals Inc., Palo Alto, Calif.), pSPORT1 (Life Technologies, Gaithersburg, Md.), pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen) pBs, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223 3, pKK233 3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia); Eucariotas: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia).

2. Ácido nucleico de VHB

Se proporciona en este documento un ácido nucleico relacionado con VHB y variantes del mismo, que pueden derivar del genoma de un VHB. El ácido nucleico también puede ser recombinante. El ácido nucleico puede comprender una fase abierta de lectura, que puede codificar una proteína de superficie de VHB o una variante de la misma.

a. región PreS2

El ácido nucleico puede comprender una región preS2. La región preS2 puede codificar una proteína de superficie de VHB media (MHB), pudiendo comprender dicha MHB la secuencia como se expone en la Tabla 1.

Tabla 1

SEC ID N°	Proteína de superficie de VHB media
1	1 mqwNSTafhq alqdprvrgl yfpaggsssg tvnpapnias hissisartg dpvtmnenit 61 sgflgp11vl qagf11tri ltipqslsdw wtslnflggs pvc1gqnsqs ptsnhsptsc 121 ppicpgyrwm clrrfiiflf i111clif11 v1ldyqgmlp vcplipggtt tstgpkctct 181 tpaqgnsmfp scctkptdg nctcipipss wafakylwew asvrfswlsl lvpfvqwfvg 241 lsptvwl sai wmmwywgpsl ysvspfipl lpiffclwvy i

La región preS2 puede comprender una secuencia como se expone en la Tabla 2. Debido a la degeneración del código genético, la secuencia del ácido nucleico puede diferir de la secuencia que se expone en la Tabla 2, pero codificar una secuencia de aminoácidos idéntica a la expuesta en la Tabla 1.

Tabla 2

SEC ID N°	Región PreS2 de VHB						
2	1	ATGCAGTGG	ATTCCACTGC	CTTCCACCAA	GCTCTGCAAG	ATCCCAGAGT	CAGGGGTCTG
	61	TATTTTCCTG	CTGGTGGCTC	CAGTTCAGGA	ACAGTAAACC	CTGCTCCGAA	TATTGCCTCT
	121	CACATCTCGT	CAATCTCCGC	GAGGACTGGG	GACCTGTGA	CGAACATGGA	GAACATCACA
	181	TCAGGATTC	TAGGACCCCT	GCTCGTGTTA	CAGGCGGGGT	TTTTCTTGTT	GACAAGAATC
	241	CTCACAATAC	CGCAGAGTCT	AGACTCGTGG	TGGACTTCTC	TCAATTTTCT	AGGGGATCA
	301	CCCGTGTGTC	TTGGCCAAAA	TTCGCAGTCC	CCAACCTCCA	ATCACTCACC	AACCTCCTGT
	361	CCTCCAATTT	GTCTGGTTA	TCGCTGGATG	TGTCTGCGGC	GTTTTATCAT	ATTCCPTTC
	421	ATCCTGCTGC	TATGCCTCAT	CTTCTTATTG	GTTCTTCTGG	ATTATCAAGG	TATGTTGCC
	481	GTTTGTCTC	TAATCCAGG	ATCAACAACA	ACCAGTACGG	GACCATGCAA	AACCTGCACG
	541	ACTCCTGCTC	AAGGCAACTC	TATGTTTCCC	TCATGTTGCT	GTACAAAACC	TACGGATGGA
	601	AATTGCACCT	GTATTCCCAT	CCCATCGTCC	TGGGCTTTCG	CAAAATACCT	ATGGGAGTGG
	661	GCCTCAGTCC	GTTCCTCTTG	GCTCAGTTTA	CTAGTGCCAT	TGTTCAGTG	GTTCGTAGGG
	721	CTTTCCCCA	CTGTTTGGCT	TTCAGCTATA	TGGATGATGT	GGTATTGGGG	GCCAAGTCTG
	781	TACAGCATCG	TGAGTCCCTT	TATACCGCTG	TTACCAATTT	TCMTTGTCT	CTGGGTATAC
	841	ATTAA					

(1) Secuencia de inicio PreS2

5 La región preS2 puede comprender una secuencia de inicio preS2, a partir de la que puede iniciarse la traducción de la MHB. La secuencia de inicio preS2 puede comprender la secuencia 5'-CTTATGCAG- 3' (SEC ID N°: 3). La secuencia de inicio preS2 puede alterarse, lo que puede afectar a la relación de MHB y proteína de superficie de VHB pequeña (SHB) expresada a partir del ácido nucleico. La secuencia de inicio preS2 también puede comprender una secuencia Kozak parcial o una secuencia Kozak.

10

(a) Secuencia Kozak

La secuencia Kozak puede ser capaz de aumentar la traducción a partir de la secuencia de inicio preS2 mutante. La traducción aumentada puede aumentar el nivel de MHB producido a partir de la región preS2. El nivel aumentado de MHB puede ser relativo al nivel de SHB traducida a partir de una región S contenida en el ácido nucleico. Como alternativa, aunque sin quedar ligado a la teoría, la traducción aumentada de MHB puede afectar a la antigenicidad de la mezcla proteica resultante de SHB y MHB a través de ensamblaje de partículas o plegamiento proteico que refleja de forma más cercana el visto en material de fuentes clínicas.

15

(b) Secuencia Kozak parcial

La secuencia Kozak parcial puede ser capaz de aumentar la traducción a partir de la secuencia de inicio preS2. La traducción aumentada puede aumentar el nivel de MHB producido a partir de la región preS2. El nivel aumentado de MHB puede ser relativo al nivel de SHB traducido a partir de una región S contenida en el ácido nucleico. Como alternativa, la traducción aumentada de MHB puede afectar a la antigenicidad de la mezcla proteica resultante de SHB y MHB a través de ensamblaje de partículas o plegamiento proteico que refleja de forma más cercana el visto en el material de fuentes clínicas.

25

b. Región S

30

El ácido nucleico puede también comprender una región S, que puede codificar una proteína de superficie de VHB pequeña (SHB), pudiendo comprender SHB la secuencia que se expone en la Tabla 4.

Tabla 4

SEC ID N°	Proteína de Superficie de VHB pequeña						
9	1	menitsgflg	pllvlgagff	lltriltipq	sldswtsln	flggspvcig	qnsqsptsnh
	61	sptscppicp	gyrwmclrrf	iiflfilllc	lifllvlldy	qgmlpvcpli	pgstttstgp
	21	cktcttpagg	nsmfpscct	kptdgnctci	pipsswafak	ylwewasvrf	swlsllvpfv
	181	qwfvglsptv	wlsaiwmmwy	wgpslysivs	pfiplpiff	clwvyi	

35

La región S también puede comprender la secuencia que se expone en la Tabla 5.

Tabla 5

SEC ID Nº	Proteína de Superficie de VHB Pequeña						
10	1	ATGGAGAACA	TCACATCAGG	ATTCCTAGGA	CCCTGCTCG	TGTTACAGGC	GGGGTTTTTC
	61	TTGTTGACAA	GAATCCTCAC	AATACCGCAG	AGTCTAGACT	CGTGGTGGAC	TTCTCTCAAT
	121	TTTCTAGGGG	GATCACCCGT	GTGCTTGGC	CAAAATTCGC	AGTCCCAAC	CTCCAATCAC
	181	TCACCAACCT	CCTGTCTCCT	AATTTGTCT	GGTTATCGCT	GGATGTGTCT	GCGGCGTTTT
	241	ATCATATTCC	TCTTCATCCT	GCTGCTATGC	CTCATCTTCT	TATTGGTTCT	TCTGGATTAT
	301	CAAGGTATGT	TGCCCGTTTG	TCCTCTAATT	CCAGGATCAA	CAACAACCCAG	TACGGGACCA
	361	TGCAAAACCT	GCACGACTCC	TGCTCAAGGC	AACTCTATGT	TTCCCTCATG	TTGCTGTACA
	421	AAACCTACGG	ATGGAAATG	CACCTGTATT	CCCATCCCAT	CGTCTGGGC	TTTCGCAAAA
	481	TACCTATGGG	AGTGGGCTTC	AGTCCGTTTC	TCTTGGCTCA	GTTTACTAGT	GCCATTTGTT
	541	CAGTGGTTCC	TAGGGCTTTC	CCCCACTGTT	TGGCTTTCAG	CTATATGGAT	GATGTGGTAT
	601	TGGGGCCAA	GTCTGTACAG	CATCGTGAAT	CCCTTTATAC	CGTGTACC	AATTTTCTTT
	661	TGTTCTGGG	TATACATTTA	A			

(1) Secuencia de inicio S

5 La región S también puede comprender una secuencia de inicio S, a partir de la que puede iniciarse la traducción de la SHB. La secuencia de inicio S puede comprender la secuencia 5'-AACATGG-3' (SEC ID Nº 11) y puede comprender una secuencia Kozak como se ha descrito en este documento.

(a) Secuencia de inicio S mutante

10 La secuencia de inicio S puede comprender una secuencia de inicio S mutante. La secuencia de inicio S mutante también puede comprender una secuencia que puede no ser una secuencia Kozak o secuencia Kozak parcial. La secuencia de inicio S mutante puede reducir la traducción de la SHB a partir de la secuencia de inicio S mutante. La secuencia de inicio S mutante puede no afectar a la traducción de MHB a partir de la secuencia de inicio preS2 o

15 secuencia de inicio preS2 mutante. La secuencia de inicio S mutante también puede no afectar a la antigenicidad de la MHB. La secuencia de inicio S mutante puede comprender un ácido nucleico que codifica una mutación de metionina a cualquier otro aminoácido, que puede ser una leucina. La secuencia de inicio S mutante puede comprender la secuencia 5'-AACTTGG-3' (SEC ID Nº 12) o 5'-AACCTGG-3' (SEC ID Nº 13).

20 La región preS2 que comprende la secuencia de inicio S mutante puede comprender una secuencia como se expone en la Tabla 6.

Tabla 6

SEC ID Nº	Secuencia de Inicio de Mutante que Comprende Región S
14	AACTTGGAGAACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCGGGTTTTTCTTGTGACAAGAATCCTCA CAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATTTTCTAGGGGGATCACCCGTGTGTCTTGGCCAAAATTCGCA GTCCCCAACCTCCAATCACTACCAACCTCCTGTCTCCAAATTTGTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCA TATTCTCTTCACTCCTGTGCTATGCCTCATCTTCTTATTGGTTCTTCTGGATTATCAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCTCTA ATTCCAGGATCAACAACAACCCAGTACGGGACCATGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGCAACTCTATGTTTCCCTCATG TTGCTGTACAAAACCTACGGATGGAAATGCACTGTATTCCCATCCCATCGTCTGGGCTTTCGCAAAAATACCTATGGGAGT GGGCTCAGTCCGTTTCTTGGCTCAGTTTACTAGTCCCATTTGTTTCAGTGGTTCTGAGGGCTTTCGCCACTGTTTGGCTT TCAGCTATATGGATGATGTGGTATTGGGGCCAAAGTCTGTACAGCATCGTGAATCCCTTTATACCGCTGTTACCAATTTTCTT TTGTTCTCTGGGTATACATTTAA

25 c. Región PreS1

El ácido nucleico también puede comprender una región preS1, que puede codificar una proteína de superficie de VHB grande (LHB). La LHB puede ser de aproximadamente 389 aminoácidos de longitud y puede ser capaz de formar parte de una envoltura de VHB.

30 La región preS1 también puede comprender una secuencia de inicio, a partir de la que puede iniciarse la traducción de la LHB. La secuencia preS1 puede comprender una secuencia como se expone en la Tabla 7.

Tabla 7

SEC ID Nº	Región PreS 1 de VHB						
15	1	ATGGGAGGTT	GGTCTTCCAA	ACCTCGAAAA	GGCATGGGGA	CAAATCTTTC	TGTCCCAAT
	61	CCCCTGGGAT	TCTTCCCCGA	TCATCAGTTG	GACCCTGCAT	TCAAAGCCAA	CTCAGAAAAAT
	121	CCAGATTGGG	ACCTCAACCC	ACACAAGGAC	AACTGGCCCG	ACGCTCACAA	GGTGGGAGTG
	181	GGAGCATTCC	GGCCAGGGTT	CACCCCTCCC	CATGGGGGAC	TGTTGGGGTG	GAGCCCTCAG
	241	GCTCAGGGCA	TACTCACATC	TGTGCCAGCA	GCTCCTCCTC	CTGCCTCCAC	CAATCGGCAG
	301	TCAGGAAGGC	AGCCTACTCC	CTTATCTCCA	CCTCTAAGGG	ACATCATCC	TCAGGCCATG
	361	CAGTGGAAAT	CCACTGCCTT	CCACCAAGCT	CTGCAAGATC	CCAGAGTCAG	GGGTCTGTAT
	421	TTTCCTGCTG	GTGGCTCCAG	TTCAGGAACA	GTAACCCTG	CTCCGAATAT	TGCCTCTCAC
	481	ATCTCGTCAA	TCTCCGCGAG	GA CTGGGGAC	CCTGTGACGA	ACATGGAGAA	CATCACATCA
	541	GGATTCCTAG	GACCCCTGCT	CGTGTACAG	GCGGGGTTTT	TCTTGTGAC	AAGAATCCTC
	601	ACAATACCGC	AGAGTCTAGA	CTCGTGGTGG	ACTTCTCTCA	ATTTTCTAGG	GGGATCACCC
	661	GTGTGTCTTG	GCCAAAATTC	GCAGTCCCCA	ACCTCCAATC	ACTCACCAAC	CTCCTGTCCCT
	721	CCAATTTGTC	CTGGTTATCG	CTGGATGTGT	CTGCGGCGTT	TTATCATATT	CCTCTTCATC
	781	CTGCTGCTAT	GCCTCATCTT	CTTATTTGGT	CTTCTGGATT	ATCAAGGTAT	GTTGCCCGTT
	841	TGTCCTCTAA	TTCCAGGATC	AACAACAACC	AGTACGGGAC	CATGCAAAAC	CTGCACGACT
	901	CCTGCTCAAG	GCAACTCTAT	GTTCCTCTCA	TGTTGCTGTA	CAAAACCTAC	GGATGGAAAT
	961	TGCACCTGTA	TTCCCATCCC	ATCGTCTTGG	GCTTTCGCAA	AATACCTATG	GGAGTGGGCC
	1021	TCAGTCCGTT	TCTCTTGGCT	CAGTTTACTA	GTGCCATTTG	TTCAGTGGTT	CGTAGGGCTT
	1081	TCCCCCACTG	TTTGGCTTTC	AGCTATATGG	ATGATGTGGT	ATGGGGGCC	AAGTCTGTAC
	1141	AGCATCGTGA	GTCCCTTTAT	ACCGCTGTTA	CCAATTTTCT	TTTGTCTCTG	GGTATACATT
	1201	TAA					

3. Polipéptido de VHB

5 Se proporciona en este documento un polipéptido, que puede codificarse por un ácido nucleico relacionado con VHB. El polipéptido puede ser una proteína de VHB o una variante de la misma. La proteína de VHB puede ser una proteína de superficie de VHB y puede ser recombinante. El polipéptido puede comprender un marcador.

a. Proteína de superficie de virus de hepatitis B media (MHB)

10 La proteína de VHB puede ser una MHB, que puede ser de aproximadamente 281 aminoácidos de longitud. La MHB puede contener 226 aminoácidos de una proteína de superficie de VHB pequeña codificada por la región S, y puede contener 55 aminoácidos adicionales codificados por la región preS2. La MHB puede estar glicosilada. La MHB puede ser capaz de formar parte de una envoltura de VHB, que puede exponer la MHB en la superficie de una partícula de VHB.

15 La MHB puede comprender un epítipo de MHB, que puede ser antigénico o una diana de vigilancia inmune. La MHB puede estar a una concentración detectable, que puede ser entre 1×10^{-12} y 1×10^{-12} g. La MHB puede ser detectable con un anticuerpo anti-MHB tal como un anticuerpo monoclonal, que puede ser 116-34 (depósito de ATCC Nº HB-10122).

b. Proteína de superficie de Hepatitis B pequeña (SHB)

25 La proteína de VHB también puede ser una SHB, que puede ser de aproximadamente 226 aminoácidos de longitud. La SHB también puede estar glucosilada. La SHB puede formar parte de una envoltura de VHB, que puede exponer la SHB en la superficie de una partícula de VHB. La SHB puede comprender un epítipo de SHB, que puede ser antigénico o una diana de vigilancia inmune.

30 El epítipo de SHB puede ser parte de un determinante "a" como se describe en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.925.512 o 7.141.242, los contenidos de las cuales se incorporan en este documento por referencia. El determinante "a" puede comprender al menos cinco epítopos, que pueden ser parcialmente solapantes o no solapantes.

35 El epítipo de SHB puede ser un mutante, que puede afectar a la antigenicidad del epítipo de SHB. El epítipo de SHB mutante puede ser más habitual en ciertas poblaciones humanas. Por ejemplo, el epítipo de SHB mutante puede ser más habitual entre pacientes con trasplante de hígado en terapia de anticuerpos anti-a, o pacientes en Italia o Japón vacunados contra VHB. El epítipo de SHB mutado puede ser un inserto de dos aminoácidos en la posición 122 de la SHB, tal como NT o RA, una inserción de aminoácidos RGA en la posición 123 de la SHB, o una inserción de aminoácidos NSTGPCTT en la posición 124 de la SHB, o una mutación T123A, G145R o P120G, o una combinación de las mismas, como se describe en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.925.512 o 7.141.242, en los contenidos de las cuales se incorporan en este documento por referencia.

40 La antigenicidad del epítipo de SHB puede reducirse, lo que puede permitir que un VHB que comprende el epítipo de SHB mutante escape a la vigilancia inmune. La SHB puede estar a una concentración detectable, que puede ser aproximadamente 1×10^{-12} g. La SHB puede ser detectable por un anticuerpo anti-SHB, que puede ser H166, H57, H53, H40, H35 o anticuerpos similares.

5. Vector

Se proporciona en este documento un vector, que puede comprender un ácido nucleico relacionado con VHB. El ácido nucleico puede unirse operativamente a un promotor, que puede ser capaz de expresar un polipéptido codificado por el ácido nucleico. El vector también puede comprender un marcador seleccionable.

El vector también puede comprender una secuencia de fusión, que puede ser capaz de traducirse en fase con el ácido nucleico relacionado con VHB. La secuencia de fusión puede codificar una parte de una proteína de fusión tal como beta-galactosidasa (B-gal), superóxido dismutasa (9SOD) o CMP-KDO sintetasa (CKS), como se describe en la Publicación de Patente Europea N° 0196056, publicada el 1 de octubre de 1986, Publicación de Patente Europea N° 0331961, publicada el 13 de septiembre de 1989, los contenidos de las cuales se incorporan en este documento por referencia.

1. Célula hospedadora

Se proporciona en este documento una célula hospedadora que puede comprender el vector. La célula hospedadora puede ser capaz de expresar un polipéptido codificado por el vector. El vector puede transfectarse de forma transitoria o transfectarse de forma estable o integrarse en la célula hospedadora. La transfección transitoria puede ser en virtud del vector no replicante y que en pocas ocasiones se integra en la célula hospedadora.

La transfección o integración estable puede ser introduciendo el vector, que puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora o puede replicar de forma autónoma en la célula hospedadora. La integración o transfección estable puede seleccionarse a través del uso de un marcador seleccionable localizado en, o transfectado con, el vector, seguido de selección de una célula hospedadora que exprese el marcador. En integración estable, el sitio de integración del vector puede aparecer de forma aleatoria dentro del genoma de la célula hospedadora o puede dirigirse a través del uso de un vector que comprende una región de homología con el genoma de la célula hospedadora suficiente para dirigirse a recombinación con un locus endógeno en el genoma de la célula hospedadora. Cuando se dirigen construcciones al locus endógeno, todas o algunas de las regiones reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden proporcionarse por el locus endógeno.

El vector puede introducirse en la célula hospedadora por transfección, transformación o electroporación, como se describe en Sambrook *et al.*, (ed.) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983), los contenidos del cual se incorporan en este documento por referencia.

7. Realización del polipéptido

Se proporciona en este documento un método para preparar el polipéptido. El polipéptido puede sintetizarse, o puede expresarse en la célula hospedadora. La expresión de la célula hospedadora puede ser cultivando la célula hospedadora en condiciones adecuadas que permiten la expresión del polipéptido. La expresión puede ser a partir del vector, que puede contener una señal de expresión funcional en la célula hospedadora. La expresión también puede conseguirse induciendo la actividad de un promotor regulable unido operativamente al ácido nucleico. La expresión también puede ser a partir del vector, que puede comprender un ácido nucleico relacionado con VHB y una secuencia de fusión.

El polipéptido expresado, que puede comprender un polipéptido de VHB y una parte de una proteína de fusión, puede aislarse de células lisadas o de un medio de cultivo, y puede purificarse en el grado necesario para el uso pretendido del polipéptido expresado. La purificación puede ser por técnicas conocidas en la materia y puede incluir fraccionamiento salino, cromatografía en una resina de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o centrifugación. El polipéptido expresado puede usarse como un reactivo de diagnóstico. El polipéptido expresado también puede ser útil para aislar y detectar VHB.

8. Kit

Se proporciona en este documento un kit, que puede comprender un reactivo tal como el ácido nucleico relacionado con VHB, el vector o la célula hospedadora.

Por ejemplo, el kit puede usarse para expresar un polipéptido de VHB, que puede comprender el vector, un agente capaz de inducir expresión de la proteína de VHB codificada por el vector.

El kit también puede comprender una célula hospedadora adecuada para transformación con el vector. El kit también puede incluir un anticuerpo capaz de detectar la proteína de VHB para su uso en la confirmación de la expresión de la proteína de VHB del vector.

El kit también puede comprender un sustrato sólido capaz de unirse a un fragmento proteico fusionado con la proteína de VHB para su uso en el aislamiento de la proteína de VHB expresada.

El kit también puede comprender un anticuerpo de detección capaz de unirse al anticuerpo anti-VHB y que comprende un marcador, que puede usarse para medir la unión del anticuerpo de control anti-VHB o anticuerpo candidato con la proteína de VHB. El kit también puede comprender un reactivo de detección que es capaz de inducir que el marcador genere una señal.

5 El kit también puede comprender reactivos adicionales tales como tampones y sales, que pueden requerirse para transformar el vector en la célula hospedadora, inducir expresión de la proteína de VHB desde el vector, promover o evitar las interacciones proteína-proteína, o inducir o bloquear que el marcador genere una señal. El kit puede comprender adicionalmente uno o más recipientes, tales como viales o frascos, conteniendo cada recipiente un reactivo separado. El kit también puede comprender instrucciones escritas, que pueden describir la realización de un método o ensayo descrito en este documento.

9. Determinación de la unión de un anticuerpo (no incluido en la presente invención)

15 Se proporciona en este documento un método para determinar la unión de un anticuerpo, que puede comprender determinar el nivel de un anticuerpo candidato que se une a un polipéptido de VHB. El método puede ser por un formato general que comprende: (1) presentar la composición de VHB en una fase sólida, permitiendo que una muestra de ensayo que contiene el anticuerpo candidato reaccione con la composición de VHB, y detectando el anticuerpo candidato unido a la composición de VHB con un anticuerpo antihumano acoplado a un marcador; o (2) unir un anticuerpo antihumano a la fase sólida, permitiendo que una muestra que comprende el anticuerpo candidato reaccione con el anticuerpo candidato unido, y añadir después la composición de VHB que comprende un marcador para detectar anticuerpo candidato presente en la muestra. En ambos formatos, el reactivo de anticuerpo antihumano puede reconocer todas las clases de anticuerpos o, como alternativa, puede ser específico de una clase o subclase particular de anticuerpo, dependiendo del fin pretendido del ensayo. Se pretende que estos formatos de ensayo así como otros formatos conocidos estén dentro del alcance de la presente invención y se conocen bien por los expertos habituales en la materia.

La determinación de unión de anticuerpos también puede comprender: (a) poner en contacto una muestra de ensayo sospechosa de contener el anticuerpo candidato con la composición de VHB; y (b) detectar la presencia del complejo y por lo tanto de anticuerpo candidato presente en la muestra de ensayo. La medición de anticuerpo candidato también puede comprender: (a) poner en contacto la muestra de ensayo sospechosa de contener el anticuerpo candidato con la composición de VHB durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir la formación de complejos de anticuerpo/antígeno; (b) añadir un conjugado a los complejos de anticuerpo/antígeno resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que el conjugado se una al anticuerpo unido, comprendiendo el conjugado un anticuerpo (dirigido contra la composición de VHB) unido a un marcador; y (c) detectar la presencia del anticuerpo candidato que puede estar presente en la muestra de ensayo detectando la señal generada por el marcador. También puede usarse un control o calibrador que se une a la composición de VHB.

40 La determinación de unión de anticuerpo puede comprender adicionalmente: (a) poner en contacto la muestra de ensayo sospechosa de contener el anticuerpo candidato con anticuerpo específico para el anticuerpo candidato, en tiempo y condiciones suficientes para permitir la formación de complejos anti-anticuerpo/anticuerpo; (b) añadir la composición de VHB a los complejos anti-anticuerpo/anticuerpo resultantes durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que la composición de VHB se una al anticuerpo; (c) añadir un conjugado a los complejos de composición de VHB/anticuerpo/anti-anticuerpo resultantes, comprendiendo el conjugado una composición de VHB que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal unido a un marcador, dirigiéndose el anticuerpo monoclonal o policlonal contra la composición de VHB; y (d) detectar la presencia de anticuerpo candidato que puede estar presente en la muestra de ensayo detectando la señal generada por el marcador. Puede usarse un control o calibrador que comprende anticuerpo para el anti-anticuerpo.

50 La determinación de anticuerpo también puede ser por un método como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 5.925.512 o 7.141.242, el contenido de las cuales se incorpora en este documento por referencia.

a. Anticuerpo candidato (no incluido en la presente invención)

55 El anticuerpo candidato puede ser capaz de unirse a una proteína de VHB. La proteína de VHB puede ser una proteína de VHB de tipo silvestre, o una proteína de VHB variante que puede ser una proteína de VHB mutante.

60 El anticuerpo candidato puede ser capaz de distinguir entre una proteína de VHB de tipo silvestre y una proteína de VHB variante, o entre dos proteínas variantes de VHB diferentes. El anticuerpo candidato también puede ser capaz de unirse a cualquier proteína de VHB. El anticuerpo candidato puede ser un anticuerpo anti-proteína de VHB monoclonal 116-34, H166, H57, H40 o H35 o un anticuerpo de reconocimiento de epítopo similar.

65 El anticuerpo candidato también puede ser capaz de unirse a un epítopo proteico de VHB tal como un epítopo de MHB, un epítopo de MHB mutante, un epítopo de SHB o un epítopo de SHB mutante. El anticuerpo del candidato puede ser capaz de distinguir entre un primer epítopo proteico de VHB y un segundo epítopo proteico de VHB. El

anticuerpo del candidato también puede ser capaz de unirse a un primer epítopo proteico de VHB con avidez más alta en comparación con un segundo epítopo proteico de VHB.

5 El primer y segundo epítomos proteicos de VHB pueden estar en diferentes posiciones relativas dentro de la proteína de VHB. El primer y segundo epítomos proteicos de VHB también pueden ser variantes en la misma posición relativa dentro de una primera y segunda proteína de VHB, respectivamente. Por ejemplo, las variantes pueden ser un epítopo de SHB de tipo silvestre y un epítopo de SHB mutante. Las variantes también pueden ser dos epítomos de SHB mutantes diferentes.

10 El anticuerpo candidato puede ser capaz de unirse a un epítopo de MHB, pero incapaz de unirse a un epítopo de SHB. El anticuerpo candidato también puede ser capaz de unirse a un epítopo de MHB con avidez más alta que a un epítopo de SHB.

b. Sistema de detección (no incluido en la presente invención)

15 El marcador puede detectarse usando un sistema de detección, que puede comprender un soporte sólido adaptado para usarse por un inmunoanalyzer semiautomático o completamente automático. El sistema de detección puede suministrar la muestra y reactivos (que pueden comprender un anticuerpo, un marcador, un tampón o similares) a un recipiente de reacción, realizar incubaciones y opcionalmente separar por lavado un polipéptido marcado no unido de un polipéptido marcado unido, sin intervención del usuario, una vez que la muestra y los reactivos se insertan en el sistema. Un sistema tal puede distinguirse de un sistema manual o menos automático por la capacidad del sistema para realizar al menos 8, 16, 64 o 128 ensayos en un período de 48 horas sin intervención del usuario después de insertar la muestra y los reactivos en el sistema. El sistema también puede ser capaz de calcular la concentración o cantidad de un polipéptido en la muestra automáticamente, sin la necesidad de cálculos o aportación humana una vez que las muestras se cargan en el sistema.

20 El sistema de detección también puede comprender un formato de cartucho o ensayo de tira de prueba. El sistema de detección puede proporcionar reactivos de ensayo que pueden cargarse en dosis unitarias en un instrumento desechable, y la dosis unitaria puede contener todos los reactivos necesarios para ensayar para detectar el polipéptido. El instrumento desechable puede comprender un alojamiento de plástico, que puede comprender una estructura de tipo membrana desechable de nylon, nitrocelulosa u otro material adecuado. La muestra puede procesarse previamente o cargarse directamente en una zona de carga del instrumento desechable. La muestra puede después opcionalmente hacerse fluir a través de la estructura de tipo membrana a través de una pluralidad de zonas contenidas en la membrana. La estructura de tipo membrana puede comprender adicionalmente un detergente o ayuda de flujo lateral, y también puede contener un absorbente para recoger el exceso de fluido y/o potenciar el flujo lateral a través de la membrana. El sistema de detección puede comprender un sistema de paquete múltiple en el que cada paquete puede comprender suficientes reactivos para realizar 1, 2, 4, 8, 10 o 12 ensayos.

30 El sistema de detección también puede comprender un dispositivo microfluídico diseñado para analizar la muestra en un intervalo de microlitros (por ejemplo, menos de 4 μ l, 12 μ l o 50 μ l). El dispositivo microfluídico puede comprender ayudas de flujo, dispositivo de propulsión (que puede comprender un gel de expansión, cera o gas), nanoválvulas o similares para ayudar al transporte de los reactivos de muestra o ensayo o ambos a través del dispositivo microfluídico.

45 Por supuesto, resulta evidente que cualquiera de los formatos ejemplares de este documento, y cualquier ensayo o kit de acuerdo con la invención pueden adaptarse u optimizarse para su uso en sistemas automáticos y semiautomáticos (incluyendo en los que haya una fase sólida que comprenda una micropartícula), como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.089.424 y 5.006.309 y como, por ejemplo, se comercializa en el mercado por Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) incluyendo pero sin limitación las plataformas ARCHITECT® de Abbott, AxSYM, IMX, PRISM y Quantum II, así como otras plataformas.

50 Adicionalmente, los ensayos y kits de la presente invención opcionalmente pueden adaptarse u optimizarse para sistemas de ensayo en el sitio de cuidados, incluyendo sistema de inmunoensayo electroquímico Point of Care (i-STAT™) de Abbott. Se describen inmunosensores y métodos para fabricarlos y manejarlos en dispositivos de ensayo de uso único, por ejemplo en la Patente de Estados Unidos 5.063.081 y Solicitudes de Patente de Estados Unidos publicadas 20030170881, 20040018577, 20050054078 y 20060160164 (incorporadas por referencia en este documento por sus enseñanzas con respecto a los mismos).

10. Determinación de la calidad de un anticuerpo (no incluido en la presente invención)

60 Puede ser deseable ensayar la calidad de un anticuerpo y verificar su capacidad para unirse a su diana, que puede ser una proteína de VHB tal como MHB o SHB. Se proporciona en este documento un método para determinar la calidad del anticuerpo. El anticuerpo de ensayo puede ser de un lote de nueva producción de un anticuerpo anti-VHB previamente conocido, un lote viejo de un anticuerpo anti-VHB previamente conocido o un anticuerpo anti-VHB candidato.

El anticuerpo de ensayo puede ensayarse con respecto a unión del anticuerpo con una composición que comprende MHB o SHB. El MHB o SHB en la composición puede estar a una concentración conocida para su uso como un control para la unión del anticuerpo de ensayo. La unión del anticuerpo de ensayo con la composición puede determinarse, y el nivel de unión puede compararse con un valor predeterminado. El valor predeterminado puede ser una K_d de 1×10^{-12} a 1×10^{-6} M. El valor predeterminado también puede ser el nivel de unión de un anticuerpo de control con la composición.

Un nivel de unión del anticuerpo de ensayo en comparación con el valor predeterminado puede indicar la calidad del anticuerpo de ensayo. Un nivel de unión por encima del valor predeterminado puede indicar que el anticuerpo de ensayo puede ser útil en la detección de una proteína de VHB, y un nivel por debajo del valor predeterminado puede indicar que el anticuerpo de ensayo es de baja calidad y no es tan deseable para su uso en la detección de la proteína de VHB. El método para determinar la calidad del anticuerpo también puede ser útil para determinar la calidad de un kit que comprende un anticuerpo anti-VHB.

La presente invención tiene múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Construcción de un ácido nucleico preS2

Las secuencias MHB o SHB de un plásmido patentado de Abbott (Coleman, *et al.* 1999. J Med Virol. 59:19-24) se transfirieron al plásmido pcDNA3.1 + (Invitrogen) usando sitios de restricción Hind III y Not I para generar los plásmidos de MHB y SHB.

Los mutantes GAG de Kozak, AAG de Kozak y M1L (Figura 3) se generaron usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange II (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores GAG de Kozak (5'-ggA ATT CCA CTg CAT CTC CTT AAg TTT AAA CgC-3' (SEC ID N° 20) y 5'-gCg TTT AAA CTT AAg gAg ATg CAg TCC de AAT TCC-3' (SEC ID N° 21)) y cebadores AAG de Kozak (5'-ggA ATT CCA CTg CAT CTT CTT AAg TTT AAA CgC-3' (SEC ID N° 22) y 5'-gCg TTT AAA CTT AAg AAg ATg CAg Tgg AAT TCC-3' (SEC ID N° 23)) se usaron para realizar mutaciones en el molde de MHB. Los cebadores M1L (5'-gTg ATg TTC TCC AAg TTC gTC ACA gg-3' (SEC ID N° 24) y 5'-gAg CCT gTg TTg gAg AAC AAC ATC AC-3' (SEC ID N° 25)) se usaron para realizar la mutación M1L en el molde de MHB que contenía la mutación GAG de Kozak.

Todos los plásmidos se secuenciaron para verificar la presencia de la mutación y la secuencia de MHB o SHB.

Ejemplo 2

Expresión de MHB y SHB usando un ácido nucleico preS2

Se cultivaron células COS-7 (ATCC) a 37 °C en CO₂ 5% en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) y antibiótico-antimicótico 1x (AbAm, Invitrogen). Para transfección transitoria, las células se sembraron en 2 ml de DMEM sin antibiótico-antimicótico/FBS 10% a una densidad de 350.000 células/pocillo de 35 mm. Al día siguiente, se diluyeron 4 µg de plásmido en 250 µl de medio de suero reducido Opti-MEM I (Invitrogen) y se mezcló suavemente. Se diluyeron 12 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en 250 µl de Opti-MEM, se mezcló suavemente y se incubó durante 5 minutos. El ADN diluido se mezcló con el Lipofectamine 2000 diluido, se incubó durante 20 minutos y se añadió a las células. Después de cuatro a seis horas de incubación a 37 °C, las células se aclararon con 2 ml de DMEM/FBS 10%/AbAm y se añadieron 2 ml adicionales de medio. El sobrenadante de cultivo celular se recogió tres días después de la transfección.

Ejemplo 3 (comparativo)

Detección de MHB y SHB usando anticuerpos anti-VHB

Se produjeron proteínas mutantes y de tipo silvestre en células COS-7 transfectadas con los siguientes plásmidos: MHB, MHB-Kozak GAG, MHB-Kozak GAG, MHB-M1L y SHB de tipo silvestre. Tres días después de la transfección, los sobrenadantes de cultivo celular se recogieron y se diluyeron 1:10 en plasma humano normal para pruebas de ensayo.

Ensayo Monoclonal Auszyme y ensayos de perlas:

Se procesaron muestras y controles positivos/negativos de ensayo usando el procedimiento de ensayo C de acuerdo con el prospecto de Auszyme Monoclonal (Abbott Laboratories). Se procesaron ensayos de perlas adicionales usando un panel de anticuerpos como el reactivo de captura, incluyendo anticuerpos monoclonales, H53, H57, H166 y 116-34. Se usó conjugado anti-HB de cabra como el reactivo de detección. Los datos representan un total de 2-9 repeticiones de 1-3 transfecciones independientes.

Ensayo de HBsAg ARCHITECT:

Se procesaron muestras y controles positivos/negativos de ensayo de acuerdo con el prospecto de HBsAg Architect (Abbott Laboratories). Los datos representan un total de 2-9 repeticiones de 1-3 transfecciones independientes.

5 Como se muestra en la Figura 4, el mapeo de epítomos de AdA de muestras de antígeno de superficie de VHB de origen natural (HBsAg) y el control positivo del kit Auszyme Monoclonal (pos ctl) mostraron unión de anticuerpos con la región SHB (H53, H57 y H166) y con pre-S2 (116-34). La relación de SHB (señal de anticuerpo H166) y preS2 (señal de anticuerpo 116-34) varió de 1,24-1,95 para estas muestras. Como control, las muestras del control negativo (neg ctl) del kit Auszyme Monoclonal, diluyentes, células no transfectadas y la transfección de un plásmido sin inserto de HBsAg no mostraron reactividad a los anticuerpos (datos no mostrados). Como se esperaba, la expresión de la proteína SHB mostró unión de anticuerpos dirigida solamente a la región SHB (H53, H57 y H166). HBsAg recombinante producido por transfección con el plásmido MHB mostró una reducción significativa en reactividad de epítomo preS2 con una relación del 68,09.

15 En un intento de aumentar la reactividad preS2 a niveles equivalentes a muestras de HBsAg de origen natural, los mutantes de secuencia de Kozak MHB-Kozak GAG y MHB-Kozak AAG se produjeron para introducir una secuencia de Kozak parcial en el sitio de inicio preS2. Cuando se realizó una transfección usando estas muestras, la proteína expresada mostró señal mejorada para el anticuerpo preS2 116-34 en comparación con detección de anticuerpo de SHB (H53, H57, H166) pero la antigenicidad global se redujo a aproximadamente 25% de la transfección inicial, como se muestra en la Figura 5. La relación de SHB y preS2 varió de 4,47 a 8,65 para estas proteínas, lo que se acerca a la relación de muestras de origen natural.

20 La introducción de una mutación knock-out (M1L) en el sitio de inicio S en el plásmido MHB-Kozak GAG para producir solamente proteína preS2 dio como resultado una reducción aún menor de la antigenicidad global como se muestra en la Figura 5. Esta reducción podría deberse a la retención o degradación de antígenos intracelulares.

25 Los inmunoensayos de HBsAg en el mercado de Abbott (Auszyme Monoclonal y ARCHITECT HBsAg) detectaron todas las proteínas de tipo silvestre y mutantes (Figura 6). La AdA de muestras de origen natural y el control positivo del kit apropiado (pos ctl) también se detectaron. Los controles negativos incluyendo pcDNA (plásmido sin la secuencia de MHB), células no transfectadas (UTF), el diluyente (plasma) y el control negativo del kit apropiado (neg ctl) no se detectaron por estos ensayos. Estos datos sugieren que la configuración de inmunorreactivos apropiada puede detectar todos los mutantes, incluyendo el mutante M1L.

35

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una proteína de superficie de hepatitis B media (MHB), en la que la secuencia de nucleótidos de dicha molécula comprende una región preS2 que comprende una secuencia de inicio preS2, comprendiendo dicha secuencia de inicio preS2 SEC ID N° 4.
- 5
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en la que la MHB tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N° 1, o una secuencia al menos 90% idéntica a la misma.
- 10
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, comprendiendo adicionalmente la molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de superficie de virus de Hepatitis B pequeña (SHB) o una secuencia de nucleótidos al menos 50% - 99% idéntica sobre una región de 8-100 o más nucleótidos de la misma.
- 15
4. Un kit que comprende:
- (a) un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1; o
 - (b) una célula huésped que comprende el vector de (a).

FIGURA 1

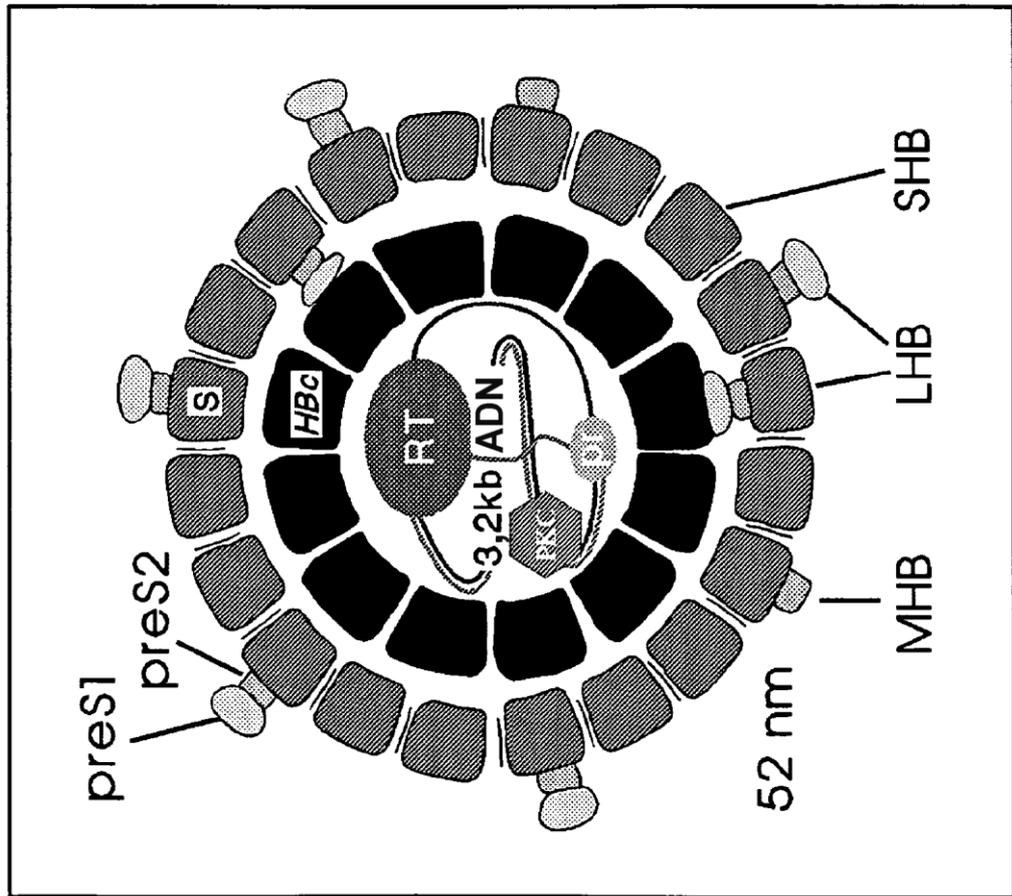


FIGURA 2

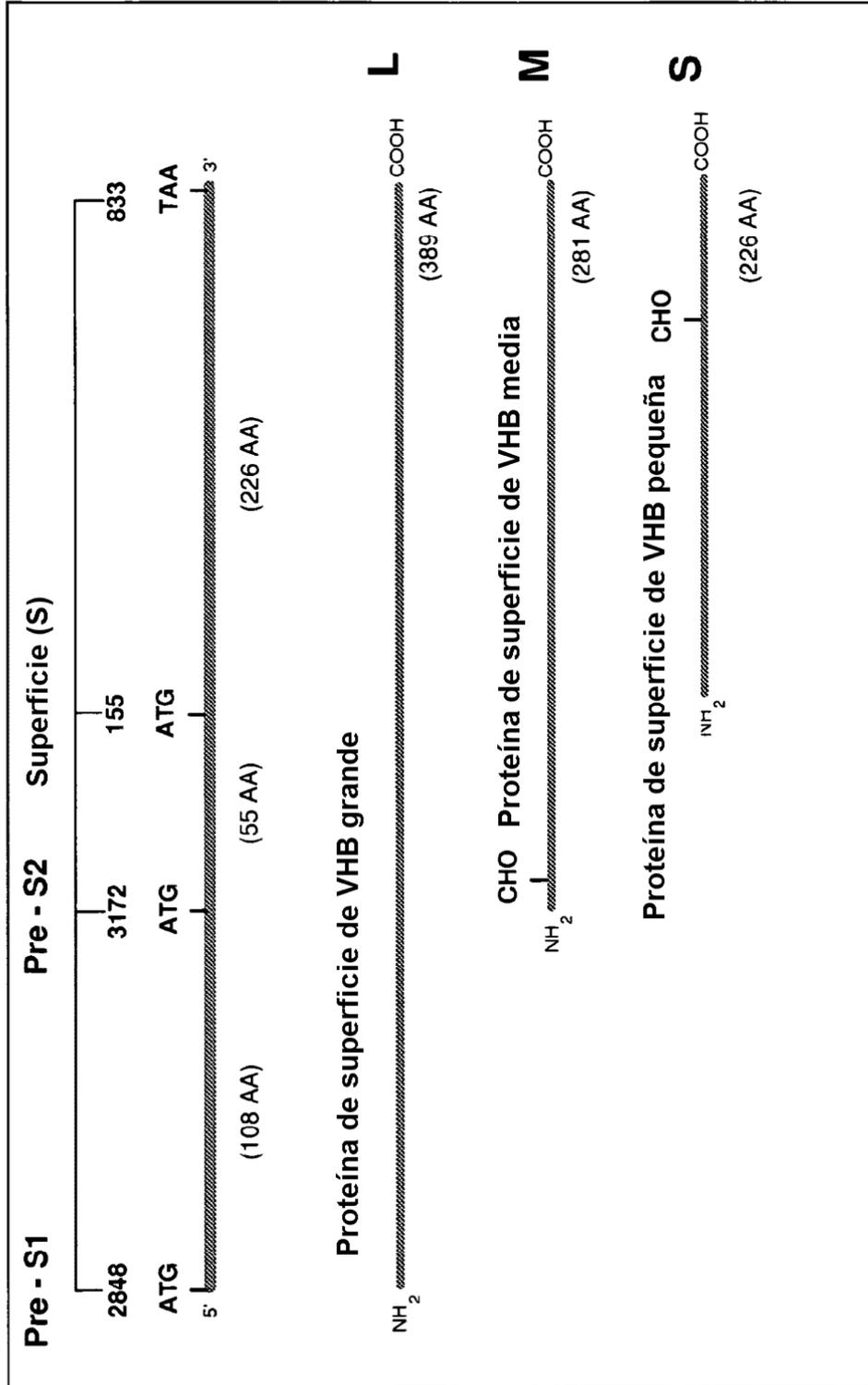


FIGURA 3

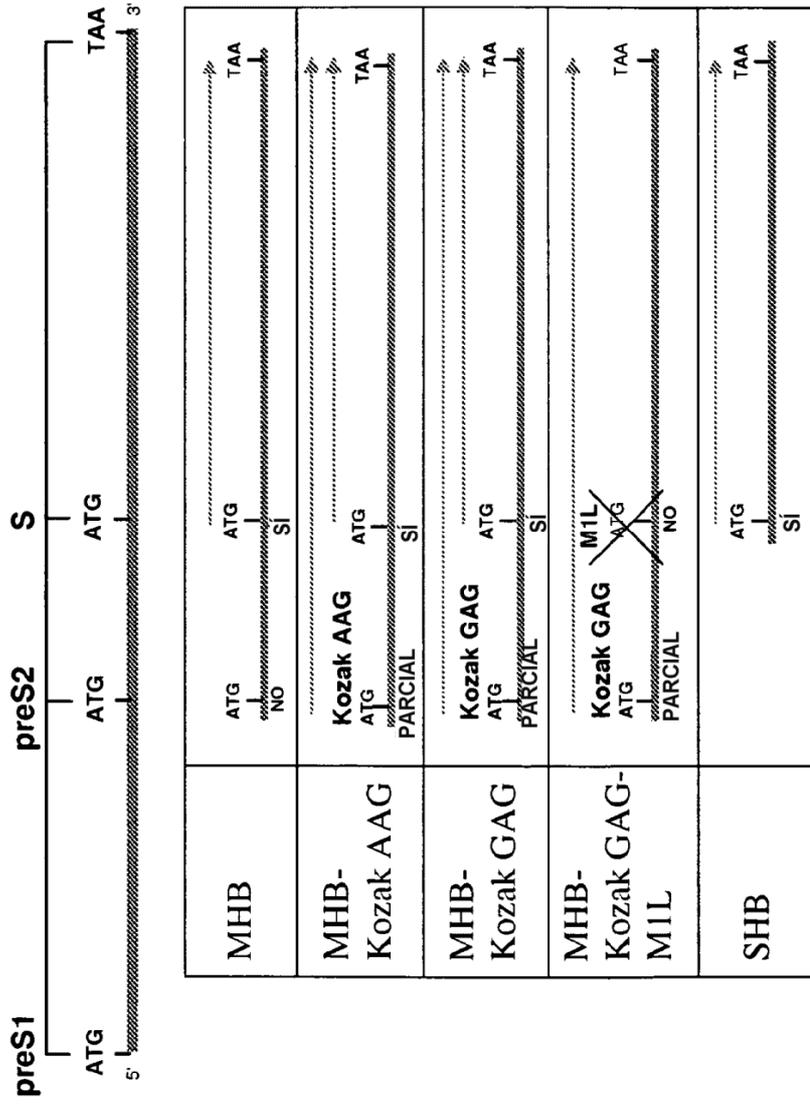


FIGURA 4

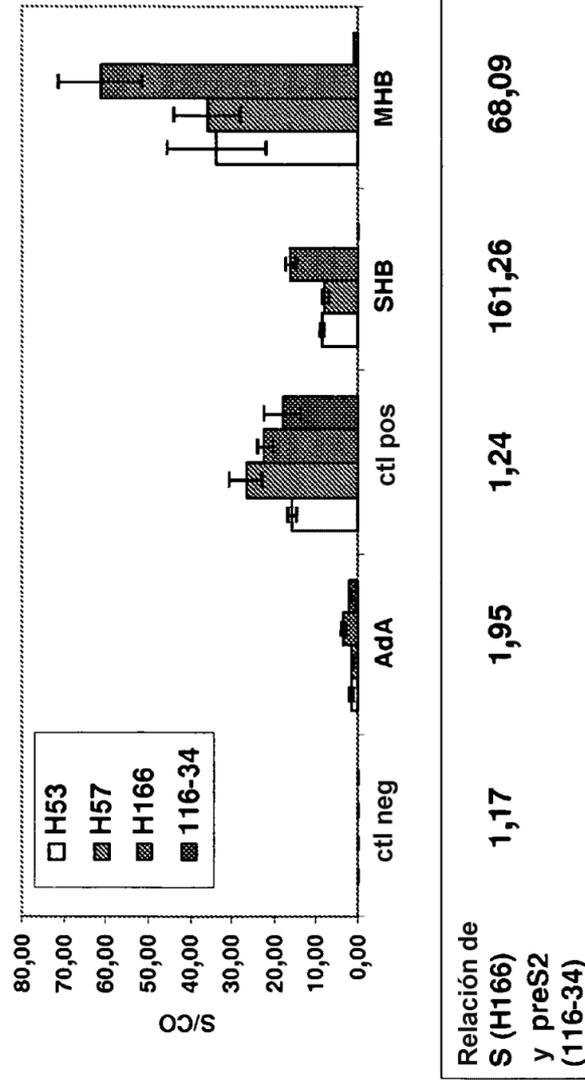


FIGURA 5 (comparativa)

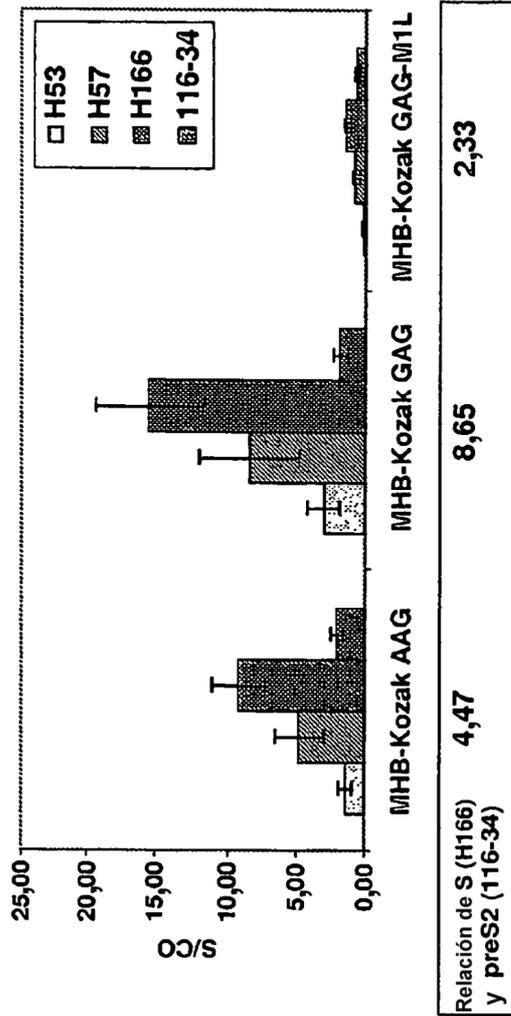


FIGURA 6 (comparativa)

<u>Muestra</u>	<u>Dilución</u>	<u>Auszyme</u> <u>Monoclonal</u> <u>(S/CO)</u>	<u>Architect</u> <u>HBsAg</u> <u>(S/CO)</u>
MHB	1:10	57,27	213,50
MHB-Kozak AAG	1:10	20,16	44,15
MHB-Kozak GAG	1:10	30,40	74,08
MHB-Kozak GAG-M1L	1:10	2,89	5,77
SHB	1:10	14,20	46,28
pcDNA	1:10	0,08	0,66
UTF	1:10	0,11	0,49
plasma	puro	0,10	NE
AdA	puro	5,26	NE
ctl neg	puro	0,15	0,48
ctl pos	puro	18,12	4,32

NE= No ensayado