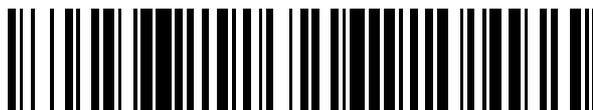


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 470 318**

51 Int. Cl.:

C07K 14/02 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01)
C12N 15/36 (2006.01)
C12N 15/51 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2006 E 06723428 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 1858915**

54 Título: **Variantes del virus de la hepatitis B resistentes a ciertos análogos nucleósidos, pero sensibles a otros, y usos de las mismas**

30 Prioridad:

15.03.2005 US 661483 P
15.03.2005 EP 05102014

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2014

73 Titular/es:

**RHEINISCHE FRIEDRICH-WILHELMS-
UNIVERSITÄT BONN (33.3%)**
Regina-Pacis-Weg 3
53113 Bonn, DE;
UNIVERSITÄT ZU KÖLN (33.3%) y
JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN (33.3%)

72 Inventor/es:

SCHILDGEN, OLIVER;
VOGEL, MARTIN;
MATZ, BERTFRIED;
ROCKSTROH, JUERGEN;
KAISER, ROLF;
DAEUMER, MARTIN;
HELM, MARTIN;
WEITNER, LUTWIN;
SCHEWE, CARL KNUD y
GERLICH, WOLFRAM

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 470 318 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

Variantes del virus de la hepatitis B resistentes a ciertos análogos nucleósidos, pero sensibles a otros, y usos de las mismas.

- 5 La presente invención versa sobre el campo de variantes del virus de la hepatitis B (VHB, también denotado como virus VHB) que presentan una sensibilidad reducida a agentes particulares. Más en particular, la presente invención versa sobre el campo de la diagnosis de la susceptibilidad de una muestra del VHB a fármacos antivirales usados para tratar una infección del VHB y sobre un procedimiento y/o un ensayo para la detección rápida y fiable de mutaciones inducidas por fármacos en los genes del VHB que permiten la caracterización simultánea de una gama de codones implicados en la resistencia a los fármacos.
- 10 El VHB es un virus ADN de envoltura pequeña con una longitud de aproximadamente 3200 pb perteneciente a la familia de los *Hepadnaviridae*. El virus se replica mediante un intermediario de ARN y utiliza la transcripción inversa en su estrategia de replicación (Summers, 1982). El genoma del VHB es de naturaleza compleja, teniendo una estructura de ADN parcialmente bicatenaria con marcos de lectura abiertos (ORF) solapados que son (i) el ORF *preC/C*, que codifica el antígeno e secretado (HBeAg) y la proteína central de la nucleocápside (HBcAg),
15 respectivamente; (ii) el ORF *P*, que codifica la polimerasa viral/transcriptasa inversa; (iii) el ORF *preS1/preS2/S*, que codifica las proteínas de la envoltura viral, y el antígeno s grande, mediano y pequeño (HBsAg), respectivamente; y (iv) el ORF *X*, que codifica la proteína transactivadora transcripcional que codifica polimerasa de superficie, central y genes *X*.
- 20 Los virus de la hepatitis B muestran una gran variabilidad genética en sus genomas, reconociéndose en la actualidad siete genotipos de VHB (A a G) (Stuyver y otros, 2001; Stuyver y otros, 2000). El virus, que se propaga mediante contacto con sangre infectada, puede causar un estado de enfermedad debilitante y puede conducir a insuficiencia hepática aguda. Aunque la mayoría de los adultos puede repeler la infección sin tratamiento, la infección de hepatitis B puede desarrollarse adquiriendo una forma crónica. En realidad, aproximadamente 400 millones de personas en el mundo entero están infectadas de forma crónica con el VHB y se prevé que
25 aproximadamente del 15 al 40% de los portadores crónicos de VHB desarrollarán cirrosis y hepatopatía terminal. Sin tratamiento, el pronóstico de estos pacientes es malo; en consecuencia, el desarrollo de terapia antiviral efectiva para el VHB sigue siendo una meta importante. El objetivo principal de la terapia es controlar la replicación del VHB e inducir la remisión de la hepatopatía para detener la evolución hacia la cirrosis y el cáncer hepático. El tratamiento está indicado para pacientes con inflamación activa, niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT) debidos a la destrucción de células hepáticas, y niveles de ADN del VHB (niveles de replicación viral) superiores a 100.000 copias/ml.
- 30 Los fármacos actuales autorizados para el tratamiento de la hepatitis B crónica son los interferones alfa y los análogos nucleósidos o combinaciones de los fármacos. Un análogo nucleósido es un nucleótido modificado químicamente que actúa como bloque funcional sustituto en el proceso de replicación viral que inhibe la replicación del VHB.
35
- Se ha demostrado que la terapia con interferón (IFN) es parcialmente efectiva únicamente en un grupo pequeño de portadores (Lok, 1994) y que también está limitada debido a graves efectos secundarios. Este fracaso relativo del IFN- α para el tratamiento de la infección crónica del VHB ha llevado a la búsqueda de agentes y regímenes terapéuticos adicionales. En particular, se ha demostrado que varios análogos nucleósidos inhiben la replicación de los *Hepadnaviridae* por medio de la inhibición de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de los *Hepadnaviridae*.
40 Algunos de estos compuestos ya han sido retirados del uso clínico debido a su toxicidad (Ibucavir) o su falta de eficacia (famciclovir) (De Clercq, 1999; Schinazi, 1997; Luscombe y otros, 1996). En este momento, el análogo nucleósido de más éxito para el tratamiento de la hepatitis B crónica es, sin duda, el enantiómero (-), médicamente autorizado, de la 3'-tiacitidina (3TC o lamivudina (LMV)) (Jarvis y otros, 1999). El fármaco tiene una potente actividad antiviral contra el virus, se tolera bien y tiene pocos efectos adversos. Sin embargo, la terapia a largo plazo con lamivudina se asocia frecuentemente con la aparición de resistencia viral. Una de las mutaciones comunes que confieren resistencia a la lamivudina y reducen la eficiencia de replicación *in vitro* del virus es una sustitución de metionina por isoleucina o de metionina por valina en el codón 204 del ADN del VHB dependiente del ARN (Ling R. y otros, 1996; Bartholomew M. y otros, 1997; Tipples G.A. y otros, 1996). Además de la alteración de esta sustitución de los aminoácidos Met por Val o por Ile (rtM204V/I) en el motivo YMDD conservado, se han asociado con la resistencia a la lamivudina patrones genotípicos mutados en otros sitios del gen de la transcriptasa inversa. En particular, se ha documentado que la mutación de leucina a metionina en el codón 180 (rtL180M) en el dominio B de la polimerasa restaura parcialmente la aptitud para la replicación, y que aumenta la resistencia a los fármacos *in vitro*. En pacientes coinfectados con VHB/VIH, el desarrollo de la resistencia a la lamivudina es más frecuente que
45 en los pacientes mono infectados con VHB, lo que hace indispensable la creación de una terapia alternativa a la aplicación de lamivudina (Benhamou y otros, 2001; Benhamou y otros, 2003; Benhamou y otros, 2004; Dore G.J. y otros, 2004).
50
- Otro análogo nucleósido aplicable para el tratamiento de la hepatitis B crónica es el adefovir dipivoxil, profármaco del adefovir (ADF). Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que este fármaco es capaz de inhibir cepas de
55

- referencia del VHB, así como las que muestran resistencias a la lamivudina. Por lo tanto, el ADF puede servir como terapia alternativa para el tratamiento de la infección crónica del VHB en casos en los que se ha dado la resistencia a la lamivudina. Hasta el momento, el ADF ha superado con éxito los estudios clínicos de fase III (Westland CE y otros, 2003). Ya se han descrito dos mutaciones que median la resistencia al ADF. Estas mutaciones están situadas en el codón 181 (dominio B) y en el codón 236 (dominio D) del gen de la transcriptasa inversa y dan como resultado una sustitución de aminoácidos de Ala a Val (rtA181V) y Asn a Thr (rtN236T), respectivamente (Angus P. y otros, 2003; Yang H. y otros, 2003; WO 2003/087352; WO 2004/031224). La frecuencia de la mutación rtA181V es de aproximadamente el 2,5%, con una relevancia clínica hasta ahora desconocida, mientras que 1,7-2,5% de los pacientes tratados con adefovir revelan la mutación de resistencia rtN236T.
- Estudios publicados recientemente por Perrillo y otros (2004), así como por Peters y otros (2004), demuestran que aproximadamente del 85% al 92% de los pacientes con resistencia a la lamivudina tendrán una disminución en su nivel de ADN del VHB igual o mayor que dos magnitudes logarítmicas mientras reciban ADF. Esto implica que un 8-15% de los pacientes no logran una reducción significativa en los niveles de ADN del VHB cuando se añade ADF a la terapia. Por lo tanto, existe un precedente de un subgrupo de pacientes con VHB resistente a la lamivudina que no lograrán una respuesta virológica con terapia de ADF. La razón de la falta de respuesta al ADF sigue estando poco clara.

Por lo anterior, parece que existe la necesidad de monitorizar la aparición o la presencia de variantes del VHB que muestren una sensibilidad reducida a agentes particulares, para buscar y/o desarrollar y/o diseñar otros agentes que tengan propiedades adecuadas para hacerlos útiles en nuevos regímenes terapéuticos. Según la presente invención, los inventores han identificado variantes del VHB con mutaciones en el gen de la ADN polimerasa del VHB que reducen la sensibilidad del VHB a los análogos nucleósidos pero que son sensibles a uno o más análogos nucleósidos distintos.

Sumario de la invención

La presente invención se propone resolver el problema de la monitorización inadecuada de la aparición o la presencia de variantes del VHB que muestran una sensibilidad reducida a los análogos nucleósidos.

La presente invención versa acerca de variantes aisladas del VHB, según se define en las reivindicaciones, que comprenden al menos una mutación de nucleótidos en el gen de la ADN polimerasa, resultando dichas mutaciones de nucleótidos en al menos una sustitución de aminoácidos en la polimerasa del VHB y presentando dicha variante una menor sensibilidad al análogo nucleósido ADF y/o a la LMV y/o a su combinación.

La presente invención versa, además, acerca de ácidos polinucleicos aislados a partir de estas variantes del VHB, ácidos polinucleicos aislados que comprenden una mutación de nucleótidos que da como resultado al menos una sustitución y/o una delección de aminoácidos en el gen de la polimerasa, mutación de nucleótidos que lleva a una sensibilidad reducida al análogo nucleósido ADF y/o a la LMV y/o a su combinación; y acerca de un fragmento de dicho ácido polinucleico del VHB que comprende dicha mutación de nucleótidos.

La presente invención versa, además, acerca de productos de expresión derivados de estos ácidos polinucleicos aislados y acerca de un fragmento de los mismos.

Aspectos adicionales de la invención versan acerca de composiciones que comprenden variantes o ácidos polinucleicos del VHB o productos de expresión de la presente invención, que preferentemente encuentran su aplicación en la monitorización y/o la identificación de variantes del VHB.

Otro aspecto de la invención versa acerca del uso de las variantes aisladas del VHB y/o sus ácidos polinucleicos y/o productos de expresión y/o composiciones según se ha descrito más arriba en la toma de decisiones clínicas. En particular, las variantes del VHB o los ácidos polinucleicos o los productos de expresión o las composiciones de la presente invención se usan en un procedimiento para la selección de al menos un fármaco contra el VHB sin resistencia cruzada. En particular, las variantes del VHB o los ácidos polinucleicos o los productos de expresión o las composiciones se usan en un procedimiento para la detección del ácido polinucleico de una variante del VHB.

La presente invención da a conocer, además, un procedimiento para el tratamiento de la infección del VHB que comprende administrar un análogo nucleósido a un sujeto infectado con VHB, determinar si el sujeto está infectado con una variante del VHB según se ha descrito y, en tal caso, administrar al sujeto al menos un fármaco contra el VHB sin resistencia cruzada.

También están incluidos en la invención procedimientos que buscan detectar en una muestra biológica la presencia de las variantes del VHB según la invención. Dicho procedimiento comprende la etapa de detección en la misma de la presencia de un ácido polinucleico del VHB o de un fragmento del mismo.

Por último, la presente invención versa acerca de un *kit* de diagnóstico que detecta la presencia de una variante del VHB en una muestra biológica y/o para detectar la resistencia a un fármaco antiviral de un VHB presente en una

muestra biológica. Además, se ha proporcionado un procedimiento para buscar fármacos activos contra un VHB que comprende un ácido polinucleico según se ha indicado más arriba.

Además, se ha proporcionado un oligonucleótido capaz de discriminar, en un ácido polinucleico del VHB o en un fragmento del mismo, entre un nuevo codón 233 que codifica una valina y un codón 233 que codifica una isoleucina.

5 Leyendas de las figuras

Figura 1: Presentaciones esquemáticas del historial de los pacientes 1, 2 y 3.

10 El eje X representa la escala de tiempo en semanas, comenzando en la semana 10. Encima de los esquemas, paralelos con el eje X, se indican los sucesivos tratamientos de los pacientes 1, 2 y 3, infectados con VHB. En el eje Y, se representa de forma logarítmica la carga de ADN viral en ge/ml. Se cuantificó la carga de VHB usando el ensayo Versant (Bayer).

Figura 2 (2a, 2b, 2c, 2d y 2e): Alineamiento de secuencias de ADN polimerasa del VHB de los pacientes 1, 2 y 3.

15 Fragmentos de las secuencias de nucleótidos de ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB, indicados por ID SEC nº 1 (directa) y 2 (inversa) del paciente 1 (iguales antes y después del tratamiento con ADF), indicados por ID SEC nº 3 (directa) y 4 (inversa) del paciente 2 antes de la terapia con ADF (bADF) y por ID SEC nº 5 (directa) y 6 (inversa) del paciente nº 2 después de la terapia con ADF (pADF), indicados por ID SEC nº 7 (directa) y 8 (inversa) del paciente nº 3 antes de la terapia con ADF (bADF) y por ID SEC nº 9 (directa) y 10 (inversa) del paciente nº 3 después de la terapia con ADF (pADF). Las correspondientes secuencias de aminoácidos han sido indicadas con 20 11, 12, 13, 14 y 15, respectivamente.

Figura 3: Alineamiento de secuencias de ADN polimerasa del VHB.

25 Se alinean fragmentos del wt de la secuencia de aminoácidos de ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB D, indicado por id sec 21 (nº de acceso EMBL: Y07587) con secuencias de aminoácidos de ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB descritas en la Figura 2 (ID SEC 16, 17 y 19), y también fragmentos de secuencias de aminoácidos de ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB D procedentes de los mismos pacientes después de la terapia con adefovir (pADF), denotados como ID SEC 16, 18 y 20.

Figura 4: Inhibición de la síntesis intracelular de ADN del VHB *in vitro*.

30 Inhibición de la síntesis intracelular de ADN del VHB *in vitro* aumentando las concentraciones de adefovir (ADF), tenofovir (TNF) y lamivudina (3TC). Transferencias de Southern de extractos obtenidos 6 días después de la transfección fueron evaluadas cuantitativamente mediante formación de imágenes en placa de fósforo fotoestimulable y relacionadas con controles no tratados. wt de VHB de genotipo D (♦) y la variante rtI233V (●).

Figura 5: ADN del VHB en presencia de concentraciones crecientes de adefovir.

35 ADN del VHB del tipo de referencia (wt) o de la variante secretado al sobrenadante de células transfectadas en presencia de concentraciones crecientes de adefovir. El ADN fue extraído, amplificado por PCR y cuantificado contra un control plasmídico estándar.

Descripción detallada de la invención

40 Según la presente invención, los inventores han identificado variantes del VHB en pacientes crónicamente infectados con el VHB que no respondían virológicamente al ADF o a una terapia que comprendía ADF ni/o a la LMV o a una terapia que comprendía LMV ni/o a una combinación de estos agentes contra el VHB. En particular, la sensibilidad a otros análogos nucleósidos, como, por ejemplo, tenofovir (TDF), no disminuyó. El análisis de 45 secuencias de ADN aislado del VHB reveló la aparición de polimorfismos novedosos de ácidos nucleicos en la polimerasa del VHB.

Más en particular, la presente invención proporciona un diagnóstico mejorado de la susceptibilidad de una muestra del VHB a fármacos antivirales usados para tratar la infección del VHB y un procedimiento y/o un ensayo mejorado para la detección rápida y fiable de mutaciones inducidas por fármacos en los genes del VHB que permiten la 50 caracterización simultánea de una gama de codones implicados en la resistencia a los fármacos, codones que incluyen los polimorfismos novedosos de ácidos nucleicos.

En toda la invención descrita más abajo se hace referencia a diversas publicaciones. Se entiende que dichas publicaciones describen más plenamente la técnica que atañe a la presente invención.

Un primer aspecto de la invención está relacionado con variantes aisladas del VHB que comprenden al menos una 55 mutación de un nucleótido en el gen de la ADN polimerasa en la posición codónica 233 según el esquema de numeración independiente del genotipo para la polimerasa del HBV, lo que da como resultado una sustitución de

una isoleucina por valina, I233V. Dicha variante presenta en particular una sensibilidad disminuida a un análogo nucleósido y/o a otros fármacos antivirales contra el VHB, salvo tenofovir. Preferentemente, la variante aislada del VHB según la invención presenta una sensibilidad disminuida al análogo nucleósido adefovir y/o a la lamivudina.

5 La presente invención también cubre variantes aisladas del VHB que comprenden, además de un codón 233 mutado, especialmente rI233V, patrones genotípicos adicionales mutados en otros sitios de la polimerasa del VHB. Preferentemente, la mutación adicional da como resultado una secuencia alterada de aminoácidos en cualquiera de los diferentes dominios del gen de la polimerasa. Estos incluyen alteraciones conocidas de aminoácidos asociadas en la resistencia a los fármacos. Así, la presente invención se extiende a variantes aisladas del VHB que comprenden una sustitución rI233X, especialmente rI233V, en el dominio D del gen de la polimerasa junto con al menos una mutación adicional que comprende una o más mutaciones adicionales de nucleótidos en el gen de la ADN polimerasa escogidos del grupo constituido de un nucleótido en el codón 173, en el codón 204 y en el codón 219 en la que dicha mutación adicional de nucleótidos en la posición codónica 173 del gen de la polimerasa da como resultado la sustitución del aminoácido valina por cualquier aminoácido distinto de la valina; en la posición codónica 204 del gen de la polimerasa da como resultado la sustitución del aminoácido metionina por cualquier aminoácido distinto de la metionina; y en la posición codónica 219 del gen de la polimerasa da como resultado la sustitución del aminoácido serina por cualquier aminoácido distinto de la serina. Preferentemente, dicha mutación adicional de nucleótidos en el codón 204 da como resultado la sustitución del aminoácido metionina por isoleucina; en el codón 173 da como resultado la sustitución del aminoácido valina por leucina; y en el codón 219 da como resultado la sustitución del aminoácido serina por alanina.

20 Tiene que leerse el término "mutación" en su contexto más amplio, e incluye las mutaciones múltiples. Ha de entenderse que la presente invención se extiende a variantes aisladas del VHB que comprenden al menos una y/o dos y/o tres y/o cuatro y/o cinco y/o seis mutaciones de nucleótidos en el gen de la ADN polimerasa, resultando dichas mutaciones de nucleótidos en al menos una y/o dos y/o tres y/o cuatro y/o cinco y/o seis sustituciones de aminoácidos, siendo una sustitución la isoleucina en la posición codónica 233 en el dominio D del gen de la polimerasa a cualquier aminoácido distinto de la isoleucina, preferentemente la sustitución de isoleucina por valina.

25 Cuando se usa en referencia a las variantes del VHB y/o a ácidos polinucleicos del VHB y/o a productos de expresión de esta invención, "aislado" significa que la variante o el ácido polinucleico han experimentado al menos una etapa de purificación fuera del fluido y/o del tejido en el que se encuentran de forma natural o no estando presentes en su entorno nativo. Alternativamente, las variantes pueden mantenerse en un fluido y/o un tejido corporales aislados o pueden estar en forma de ácido polinucleico. Normalmente, esto significa que la variante o ácido polinucleico del virus está libre de al menos una de las proteínas anfitrionas y/o de los ácidos nucleicos anfitriones. En general, la variante o ácido polinucleico del virus aislada está presente en un entorno *in vitro*. "Aislado" no significa que la variante o ácido polinucleico del virus deba ser purificada o ser homogénea, aunque tales preparaciones sí se encuentran dentro del alcance del término. "Aislado" simplemente significa elevado a un grado de pureza, hasta el extremo requerido, excluyendo del alcance de las reivindicaciones el producto de las previsiones naturales y accidentales. Se contempla que "aislado" incluya cualquier material biológico tomado directamente de un ser humano o un animal infectados, o bien tras cultivo (enriquecimiento). "Material biológico" puede ser, por ejemplo, expectoraciones de cualquier tipo, lavados bronquiales, sangre, tejido cutáneo, biopsias, esperma, material de cultivo de linfocitos sanguíneos, colonias, cultivos líquidos, muestras fecales, orina, etc. "Material biológico" también pueden ser cultivos celulares infectados artificialmente o la fase líquida de los mismos.

30 La referencia a la sensibilidad "disminuida" o "reducida" en relación con un análogo nucleósido incluye y abarca una resistencia completa o sustancial al análogo nucleósido, así como la resistencia parcial, e incluye una tasa de replicación o eficiencia de replicación que es mayor que la de un tipo de referencia en presencia de un análogo nucleósido. En un aspecto, esto se mide convencionalmente mediante un aumento en la carga viral durante el tratamiento o, alternativamente, no hay, durante el tratamiento, disminución sustancial alguna en la carga viral de ADN del VHB con respecto a los niveles de ADN del VHB previos al tratamiento (es decir, no responde al tratamiento). En particular, la "sensibilidad disminuida" es con respecto al ADF. Alternativamente, la "sensibilidad disminuida" es con respecto a la LMV. Alternativamente, la "sensibilidad disminuida" es con respecto tanto a la LMV como al ADF. Alternativamente, la "sensibilidad disminuida" es con respecto al ADF y/o a la LMV y/o a otros análogos nucleósidos y/o a otros fármacos antivirales contra el VHB.

35 Se conocen muchos fármacos antivirales contra el VHB (fármacos antivirales del VHB) e incluyen: lobucavir, penciclovir o famciclovir, lamivudina (3TC; β -L(-)-2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina), interferón- α , adefovir dipivoxil (Bis-POM-PMEA) o adefovir (PMEA; 9-(2-fosfonil-metoxietil)-adenina), entecavir (BMS 200475), emtricitabina [(-)FTC; (-)- β -L-2',3'-didesoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina], DXG [(-)- β -D-2,6-diaminopurina dioxolano], DAPD (diaminopurina dioxolano), clevudina (L-FMAU; 2'-fluoro-5-metil- β -L-arabinofuranosiluracil), L-dT (β -L-timidina), L-Fd4C (2',3'-didesoxi-2',3'-dihidro- β -L(-)-5 fluorocitidina), foscarnet, carbovir, racivir, tenofovir, ganciclovir, nevirapina, (-)BCH189 (Ono y otros, 2001), QYL865 (Fu y otros, 2000), timosina- α y HBlg, el anticuerpo contra HBsAg. También pueden usarse en combinación dos o más fármacos antivirales contra el VHB.

40 No todos los genomas del VHB tienen exactamente la misma longitud, y la polimerasa es asimismo desigual, debido a la presencia de inserciones o deleciones dentro del dominio conector o espaciador entre la proteína terminal y los

componentes catalíticos de la proteína. Para superar esta confusión, un grupo de investigadores desarrolló un esquema de numeración para la polimerasa independiente del genotipo. Una posible manera de indicar codones mutados en el gen de la polimerasa del VHB es, según Stuyver y otros, 2001, cuando la metionina (M) en el locus YMDD del dominio catalítico C de la polimerasa recibe la numeración rM204 en vez de 539, 549, 550 o 552. En la presente solicitud de patente se usará este sistema de numeración. En consecuencia, las mutaciones en el gen de la ADN polimerasa del VHB asociado con el tratamiento de la hepatitis B crónica con análogos nucleósidos han sido descritas en el dominio B como rV173L, rL180M, rA181V, en el dominio C como rM204I rM204V, rM204S, rL217R, rS219A y en el dominio D como rN236T.

Otro aspecto de la presente invención versa acerca de ácidos polinucleicos aislados que codifican las variantes del VHB de la presente invención. Estos ácidos polinucleicos aislados comprenden una mutación de nucleótidos que da como resultado al menos una sustitución de aminoácidos que comprende al menos una mutación de nucleótidos que da como resultado una sustitución de isoleucina por valina en el codón 233, rI233V.

La presente invención también cubre ácidos polinucleicos aislados que comprenden, además de rI233V, patrones genotípicos mutados adicionales en otros sitios de la polimerasa del VHB. Preferentemente, la mutación adicional da como resultado una secuencia alterada de aminoácidos en cualquiera de los diferentes dominios del gen de la polimerasa. Estas mutaciones incluyen alteraciones conocidas de aminoácidos asociadas con la resistencia a los fármacos. Así, la presente invención se extiende a ácidos polinucleicos aislados que comprenden una mutación que codifica la sustitución rI233V en el dominio D del gen de la polimerasa y al menos una mutación adicional que codifica una o más sustituciones de aminoácidos escogidas del grupo que consiste en rV173L, rL180M, rA181V, rI204I o rM204V o rM204S, rL217R, rS219A y rN236T.

La presente invención también cubre ácidos polinucleicos aislados que comprenden, además de una mutación que codifica rI233X, especialmente rI233V, patrones genotípicos mutados adicionales situados en el dominio C del gen de la polimerasa. Más preferentemente, la mutación adicional de nucleótidos da como resultado la sustitución de la metionina en la posición codónica 204 en el dominio C del gen de la polimerasa.

En particular, se cubren variantes aisladas del VHB que comprenden al menos dos mutaciones de nucleótidos en el gen de la ADN polimerasa, dando como resultado dichas mutaciones de nucleótidos al menos dos sustituciones de aminoácidos: una sustitución de la isoleucina en la posición codónica 233 en el dominio D del gen de la polimerasa y una sustitución de la metionina en la posición codónica 204 en el dominio C del gen de la polimerasa. Se entiende que la sustitución de la metionina en la posición codónica 204 incluye cualquier aminoácido distinto de la metionina; preferentemente, la sustitución es por una isoleucina y/o una valina y/o una serina.

Los ácidos polinucleicos ejemplares comprenden mutaciones de nucleótidos en el gen de la ADN polimerasa que codifican la sustitución rI233V en el dominio D del gen de la polimerasa y especialmente la sustitución rM204I en el dominio C del gen de la polimerasa. En una realización específica, dicho ácido polinucleico aislado del VHB comprende una secuencia escogida del grupo que consiste en las ID SEC nº 1, ID SEC nº 2, ID SEC nº 3, ID SEC nº 4, ID SEC nº 5, ID SEC nº 6, ID SEC nº 7, ID SEC nº 8, ID SEC nº 9 e ID SEC nº 10. Más específicamente, dicho ácido polinucleico aislado del VHB está definido por una secuencia escogida del grupo consistente en las ID SEC nº 1, ID SEC nº 2, ID SEC nº 3, ID SEC nº 4, ID SEC nº 5, ID SEC nº 6, ID SEC nº 7, ID SEC nº 8, ID SEC nº 9 e ID SEC nº 10.

Otro aspecto de la invención versa sobre fragmentos del ácido polinucleico aislado mencionado anteriormente, fragmentos que comprenden las mutaciones de nucleótidos descritas conducentes a una sensibilidad reducida al análogo nucleósido y/o a otros agentes contrarios al VHB. Estos fragmentos comprenden al menos el patrón genotípico que da como resultado la sustitución rI233V.

En una realización adicional, dicho ácido polinucleico del VHB aislado del mismo puede ser ADN o ARN, en el que T se sustituye por U, o puede ser un ácido polinucleico sintético.

Los ácidos polinucleicos que codifican las variantes de esta invención varían en longitud y pueden variar en la selección de las bases que flanquean al codón de residuos mutante. La longitud del ácido polinucleico no es vital, siempre que se reconozca que forma parte de una secuencia del virus de la hepatitis B para el fin deseado. Existe una considerable variación de secuencias dentro del genoma del virus y, así, las secuencias de ácidos nucleicos que flanquean los sitios variantes pueden variar considerablemente incluso en las secuencias que se dan de forma natural. Solo es preciso que haya presente suficiente ácido polinucleico para proporcionar novedad y utilidad a la secuencia que codifica la variante, pero, si no, la longitud de la secuencia que flanquea al codón seleccionado no es importante. Normalmente, la longitud de la secuencia (incluyendo el codón variante) será cualquier entre dentro del intervalo de 9 a 200 pb, habitualmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 pb. También se incluyen secuencias suficientemente largas como para codificar todas las variantes y los fragmentos descritos adicionalmente más abajo.

Se entiende que el "ácido polinucleico aislado o un fragmento del mismo" según la invención comprende ácidos polinucleicos monocatenarios, ácidos polinucleicos bicatenarios o ácidos polinucleicos formadores de tripletes obtenidos directamente de una muestra u obtenidos después de la duplicación, la multiplicación o la amplificación.

Se entiende que "obtenido", en el presente contexto, incluye aislamiento y/o purificación y/o amplificación de dichos ácidos polinucleicos a partir de una muestra biológica. La "muestra" puede ser cualquier material biológico tomado ya sea directamente de un ser humano o un animal infectados, o después de su cultivo (enriquecimiento). Se entiende que "duplicación, multiplicación o amplificación" incluyen cualquier ácido nucleico producido usando cualquier procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo cualquier técnica de secuenciación. Así, ha de entenderse que cualquier técnica de secuenciación que produzca una molécula de ácido nucleico que comprenda cualquiera de dichos polimorfismos de ácidos nucleicos, o una combinación de los mismos, está comprendida en la expresión "duplicación, multiplicación o amplificación".

Se entiende que la expresión "ácido polinucleico sintético", según la referencia de la que es objeto aquí, es un ácido polinucleico monocatenario, un ácido polinucleico bicatenario o un ácido polinucleico formador de tripletes. Los ácidos polinucleicos pueden ser creados *in vitro* por medio de un procedimiento de amplificación de secuencias de nucleótidos. Si tal ácido polinucleico amplificado es bicatenario, la conversión en una molécula monocatenaria puede lograrse mediante una exonucleasa adecuada, dado que el ácido polinucleico monocatenario deseado está protegido contra dicha actividad de la exonucleasa. Alternativamente, los ácidos polinucleicos se derivan de plásmidos recombinantes que contienen insertos que incluyen las correspondientes secuencias de polinucleótidos, si es necesario escindiendo estas de los plásmidos clonados tras usar las nucleasas adecuadas y recuperándolas, por ejemplo, por fraccionamiento según el peso molecular. Otro medio de crear un ácido polinucleico sintético *in vitro* está comprendido dentro de cualquier procedimiento de secuenciación de ácidos nucleicos. Los productos de una reacción de secuenciación están, así, claramente cubiertos por la expresión "ácido polinucleico sintético". Los ácidos polinucleicos según la presente invención también pueden ser sintetizados químicamente; por ejemplo, aplicando química convencional de fosfotriéster o fosforamida.

Se entiende que la "amplificación de secuencias (ADN o ARN) de nucleótidos" incluye todos los procedimientos que resultan en la multiplicación del número de copias de las secuencias de nucleótidos diana. Los procedimientos de amplificación de secuencias de nucleótidos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; amplificación de ADN), amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA; amplificación de ADN), sistema de amplificación basado en transcripción (TAS; amplificación de ARN), replicación de secuencia autosostenida (3SR; amplificación de ARN), amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA; amplificación de ARN), amplificación mediada por transcripción (TMA; amplificación de ARN), amplificación mediada por Q β -replicasa y transcripción por corrimiento.

Cuando se usan en el presente documento, las expresiones "polinucleótido", "ácido polinucleico", "secuencia de ácidos nucleicos", "secuencia de nucleótidos", "molécula de ácido nucleico", "oligonucleótido", "sonda" o "cebador" se refieren a nucleótidos, ya sean ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos peptídicos o nucleótidos bloqueados, o una combinación de los mismos, en una forma polimérica de cualquier longitud o cualquier forma (por ejemplo, ADN ramificado). Además, dichos términos incluyen polinucleótidos bicatenarios (ds) y monocatenarios (ss), así como polinucleótidos tricatenarios. Dichas expresiones también incluyen modificaciones conocidas de nucleótidos tal como la metilación, la ciclización y "cofias" y la sustitución de uno o más de los nucleótidos que se dan de forma natural con un análogo tal como inosina o con monómeros no amplificables, tal como HEG (hexaetilenglicol).

Los ribonucleótidos se denotan como NTP, los desoxirribonucleótidos como dNTP y los didesoxirribonucleótidos como ddNTP.

Generalmente, los nucleótidos pueden ser marcados radiactivamente, de forma quimioluminiscente, de forma fluorescente, de forma fosforescente o con tinciones infrarrojas o con una marca Raman de superficie mejorada o partículas resonantes de plasmón (PRP).

Las modificaciones de nucleótidos incluyen la adición de acridina y derivados de la misma, Acrydite®, amina, biotina, BHQ-1®, BHQ-2®, BHQ-3®, dNTP de borano, espaciadores de carbono (por ejemplo, C₃, C₆, C₇, C₉, C₁₂ o C₁₈), Cascade Blue®, colesterol, cumarina o derivados de la misma, Cy3®, Cy3.5®, Cy5®, Cy5.5®, Cy7®, DABCYL, cloruro de dansilo, digoxigenina, dinitrofenilo, biotina dual, EDANS, 6-FAM, fluoresceína, 3'-glicerilo, HEX, IAEDANS, dA inverso, dG inverso, dC inverso, dT inverso, IRD-700, IRD-800, JOE, La Jolla Blue®, agrupaciones metálicas tales como nanopartículas de oro, ácido fenilborónico, fosfato de psoraleno, fosforilación 3'- o 5'-, pireno, 3' riboadenosina, 3' riboguanosina, 3' ribocitidina, (LC)Red640, (LC)Red705, rodamina, ROX, tiol (SH), espaciadores, TAMRA, TET, AMCAS®, SE, BODIPY®, Marina Blue®, Oregon Green®, Pacific Blue®, QSY7®, Rhodamine Green®, Rhodamine Red®, Rhodol Green®, tetrametilrodamina, Texas Red®; modificador NH₂ Uni-Link, radiomarcadores (por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³H) y nanopartículas.

Las modificaciones de la cadena principal y las bases de polinucleótidos incluyen, además, 2'-desoxiaristeromecina, metilfosfonato, 2'-OMe-metilfosfonato ARN, 2'-O-(2-metoxietil), fosforotiorato, alquilfosforotiato, fosforamida ARN, 2'-Ome ARN, 2-amino-dA, 2-aminopurina, 3'-(ddA), 3'dA(cordicepina), 7-deaza-dA, 8-Br-dA, 8-oxo-dA, N⁶-Me-dA, sitio abásico (dEspaciador), biotina dT, 2'-Ome-5Me-C, 2'-Ome-propinil-C, 3'-(5-Me-dC), 3'-(ddC), 5-Br-dC, 5-1-dC, 5-Me-dC, 5-F-dC, carboxi-dT, dA convertible, dC convertible, dG convertible, dT convertible, dU convertible, 7-deaza-dG, 8-Br-dG, 8-oxo-dG, O⁶-Me-dG, S6-DNP-dG, 4-metil-indol, 5-nitroindol, 2'-Ome-inosina, 2'-

dl, O⁶-fenil-dl, 4-metilindol, 2'-desoxinebularina, 5-nitroindol, 2-aminopurina, dP(análogo de la purina), dK(análogo de la pirimidina), 3-nitropirrol, 2-tio-dT, 4-tio-dT, biotina-dT, carboxi-dT, O⁴-Me-dT, O4-triazol dT, 2'-OMe-propinil-U, 5-Br-dU, 2'-dU, 5-F-dU, 5-I-dU, O4-triazol dU.

5 Modificaciones adicionales de los polinucleótidos incluyen la marcación con haptenos o proteínas. Las haptenos incluyen, por ejemplo, la biotina y la digoxigenina, mientras que las proteínas incluyen encima tales como la peroxidasa de soja o rábano picante, la β -galactosidasa, la luciferasa, la fosfatasa alcalina, la glutatión S-transferasa o la dihidrofolato reductasa o pueden constituir epítopos heterólogos tales como la etiqueta de (histidina)₆, la proteína A, la proteína de unión a la maltosa, el epítipo de etiqueta•100 (EETARFQPGYRS; ID SEC n° 22), el epítipo c-myc (EQKLISEEDL; ID SEC n° 23), el epítipo FLAG® (DYKDDDK; ID SEC n° 24), lacZ, CMP (péptido de unión a la calmodulina), epítipo HA (YPYDVPDYA; ID SEC n° 25), epítipo de la proteína C (EDQVDPRLIDGK; ID SEC n° 26) y epítipo VSV (YTDIEMNRLGK; ID SEC n° 27). Otras proteínas incluyen las histonas, la proteína monocatenaria de unión (ssB) y proteínas fluorescentes nativas y de diseño, tales como proteínas fluorescentes verdes, rojas, azules, amarillas y turquesa. También pueden incorporarse restos reticulantes, como las cumarinas, las furocumarinas o las benzodipironas, o derivados de cualquiera de las mismas.

15 En una realización adicional, dichas expresiones, "polinucleótido", "ácido polinucleico", "secuencia de ácidos nucleicos", "secuencia de nucleótidos", "molécula de ácido nucleico", "oligonucleótido", "sonda" o "cebador" también abarcan ácidos peptidonucleicos (APN), análogo de ADN en el que la cadena principal es un pseudopéptido que consiste en unidades de N-(2-aminoetil)-glicina en lugar de un azúcar. Los APN imitan el comportamiento del ADN y unen cadenas complementarias de ácidos nucleicos. La cadena neutral del APN da como resultado una unión más fuerte y mayor especificidad de la lograda normalmente. Además, se han explotado las propiedades químicas, físicas y biológicas excepcionales del APN para producir potentes herramientas biomoleculares, agentes no codificantes y antigénicos, sondas moleculares y biosensores. Generalmente, las sondas de APN pueden ser más cortas que las sondas de ADN y tienen generalmente una longitud de 6 a 20 bases y, más óptimamente, una longitud de 12 a 18 bases (Nielsen, 2001).

25 En una realización adicional, dichas expresiones abarcan, además, ácidos nucleicos bloqueados (ANB), que son derivados del ARN en los que el anillo de ribosa está contenido por un enlace de metileno entre el 2'-oxígeno y el 4'-carbono. Los ANB presentan una afinidad de unión sin precedentes hacia las secuencias diana de ADN o ARN. Los nucleótidos de ANB pueden estar oligomerizados y pueden incorporarse en moléculas quiméricas o quiméricas mezcladas de ANB/ADN o ANB/ARN. Los ANB parecen ser no tóxicos para las células cultivadas (Orum y otros, 2001; Wahlestedt y otros, 2000). En general, se consideran las quimeras o las quimeras de mezcla de cualesquiera de ADN, ARN, APN y ANB, así como cualquiera de estos en los que la timina esté sustituida por uracilo.

30 Se entiende que la expresión "polimorfismo de ácido nucleico" o "polimorfismo de una secuencia de nucleótidos" incluye cualquier diferencia en la secuencia primaria de nucleótidos del ácido nucleico objeto de investigación con respecto a la secuencia primaria de nucleótidos de uno o más ácidos nucleicos de referencia. El polimorfismo más simple de ácidos nucleicos es un polimorfismo que afecta a un único nucleótido, es decir, un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP. Los polimorfismos de ácidos nucleicos incluyen, además, cualquier número de diferencias contiguas o no contiguas en la secuencia primaria de nucleótidos del ácido nucleico objeto de investigación con respecto a la secuencia primaria de nucleótidos de uno o más ácidos nucleicos de referencia. La anterior explicación también aclara expresiones como "variante polimórfica".

40 Es importante una evaluación de una variante viral potencial para la selección de un protocolo terapéutico apropiado. Tal evaluación se facilita adecuadamente con la asistencia de un ordenador programado con un soporte lógico. Así, en otra realización adicional, tales secuencias de ácido polinucleico aislado del VHB o fragmentos de las mismas, o las secuencias de aminoácidos derivadas de las mismas, pueden estar en código ASCII, hexadecimal o UNICODE, en un juego de caracteres de un único byte, de dos bytes o de múltiples bytes o en un código binario. En una realización adicional, dichas secuencias en código ASCII, hexadecimal o UNICODE, en un juego de caracteres de un único byte, de dos bytes o de múltiples bytes o en un código binario son grabables en un soporte legible por ordenador o son incorporables a una base de datos legible por ordenador. En otra realización adicional se cubren soportes legibles por ordenador que comprenden dichas secuencias en código ASCII, hexadecimal o UNICODE, en un juego de caracteres de un único byte, de dos bytes o de múltiples bytes o en un código binario. En otra realización adicional de la invención se contempla una base de datos legible por ordenador que comprende dichas secuencias en código ASCII, hexadecimal o UNICODE, en un juego de caracteres de un único byte, de dos bytes o de múltiples bytes o en un código binario. En otra realización adicional, dichas secuencias en código ASCII, hexadecimal o UNICODE, en un juego de caracteres de un único byte, de dos bytes o de múltiples bytes o en un código binario son usadas en algoritmos capaces de comparar secuencias o capaces de alinear secuencias.

55 En un aspecto adicional de la presente invención hay comprendido un vector que comprende el ácido polinucleico aislado del VHB o un fragmento del mismo según la invención. En una realización específica, dicho vector es un vector de expresión. En otra realización específica, dicho vector es un vector viral o retroviral.

En una realización adicional, dicho vector es un vector de clonación universal, tal como los vectores de la serie pUC o la serie pEMBL o vectores de clonación tales como los vectores de clonación que requieren una reacción de

topoisomerasa de ADN para la clonación, vectores de clonación TA y vectores de clonación basados en recombinaciones, tales como los usados en el sistema Gateway (InVitrogen). Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, cósmidos o bácmidos (vectores de *Baculoviridae*). Un vector puede funcionar meramente como herramienta y/o vehículo de clonación o puede, además, comprender secuencias reguladoras tales como promotores, potenciadores y terminadores o señales de poliadenilación. Dichas secuencias reguladoras pueden permitir la expresión de la información contenida dentro del fragmento de interés de ADN clonado en un vector que comprenda dichas secuencias reguladoras. La expresión puede ser la producción de moléculas de ARN o moléculas de ARNm y, opcionalmente, la producción de moléculas proteínicas del mismo. La expresión puede ser la producción de una molécula de ARN por medio de un promotor viral de polimerasa (por ejemplo, un promotor SP6, T7 o T3) introducido en los extremos 5'- o 3'- del ADN de interés.

Además, la expresión puede ser una expresión transitoria o una expresión estable o, alternativamente, una expresión controlable. La expresión controlable comprende la expresión inducible; por ejemplo, usando un promotor regulable por tetraciclina, un promotor inducible por estrés (por ejemplo, el gen humano *hsp70*), un promotor de la metalotioneína, un promotor de glucocorticoides o un promotor de la progesterona. Los promotores incluyen, además, promotores del VHB, tales como el promotor mínimo y los promotores heterólogos tales como el promotor inmediato temprano (IE) del citomegalovirus (CMV).

Preferentemente, un promotor también puede llevar a la expresión en células tumorales hepáticas; por ejemplo, el promotor y potenciador del gen de la α -fetoproteína. En la técnica se conocen vectores de expresión que median la expresión en bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, especies de *Streptomyces*), hongos (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, especies de *Aspergillus*, *Hansenula polymorpha*, *Neurospora crassa*), células de insectos (células de *Spodoptera frugiperda*, células Sf9), células de plantas (por ejemplo, vectores de expresión basados en el virus X de la patata; véanse, por ejemplo, Vance y otros 1998, en la Publicación de Patente Internacional nº WO 98/44097) y células de mamífero (por ejemplo, células CHO o COS, células Vero, células de la línea celular HeLa). Células anfitrionas particularmente aptas en el contexto de la presente invención son las de mamífero, por ejemplo humanas, hepatocitos primarios, líneas celulares de hepatomas (por ejemplo, HepG2, HepT1, HepT3, Huh6, Huh7), células hepáticas de Chang, células hepáticas de roedores, células hepáticas de primates, células hepáticas de homínidos o cualesquiera células o una línea celular de otros mamíferos, por ejemplo, de seres humanos.

Un vector o un vector de expresión pueden ser capaces, además, de replicación autónoma en una célula anfitriona o pueden ser un vector integrativo, es decir, un vector que se integra completa o parcialmente, y de manera estable, en el genoma de una célula anfitriona. La integración de cualquier primer fragmento de ADN, por ejemplo un vector o un fragmento del mismo, en cualquier otro segundo fragmento de ADN, por ejemplo el genoma de una célula anfitriona, puede ser invertida si dicho primer fragmento de ADN está flanqueado, por ejemplo, por sitios de recombinaciones específicas al sitio o por secuencias de repetición típicas para los transposones. Alternativamente, dichos sitios de recombinaciones específicas al sitio o dichas secuencias de repetición de transposones están comprendidos en dicho segundo fragmento de ADN y están flanqueando a dicho primer fragmento de ADN. En otra alternativa adicional, dicho primer fragmento de ADN puede ser introducido, posiblemente, en un segundo fragmento de ADN adecuado para ello mediante recombinación homóloga, y puede usarse el mismo procedimiento para intercambiar dicho primer fragmento de ADN con otro fragmento ADN adecuado para ello.

La introducción de un vector, o de un vector de expresión, en una célula anfitriona, puede efectuarse mediante cualquier técnica de transformación o transfección disponible aplicable a dicha célula anfitriona, según se conoce en la técnica. Tales técnicas de transformación o transfección comprenden la transformación mediada por choque térmico (por ejemplo, de *E. coli*), la transferencia de ADN conjugativo, la electroporación, la captación de ADN mediada por PEG, la captación de ADN mediada por liposomas, la lipofección, la coprecipitación de fosfato de calcio y ADN, la transfección mediada por DEAE-dextrano, la introducción directa, por ejemplo, mediante microinyección o bombardeo de partículas, o la introducción por medio de un virus, un virión o una partícula viral.

La infección de, por ejemplo, cultivos de células HepG2 por los virus VHB (derivados, por ejemplo, del suero o de un cultivo celular de un paciente) no ocurre normalmente, pero puede ser estimulada mediante el pretratamiento de las células anfitrionas con dimetilsulfóxido (DMSO; (Paran y otros, 2001)). Alternativamente, la digestión del VHB con proteasa V8 da como resultado virus VHB infecciosos (Lu y otros, 1996). Una modificación similar de proteasas de al menos otro *Hepadnavirus*, el virus de la hepatitis de la marmota (WHV), da asimismo como resultado virus de WHV que son infecciosos para las células de hepatoblastoma humano (Lu y otros, 2001). Se documentó que la expresión de genes del VHB en células de hepatoblastoma aumentaba significativamente disminuyendo la temperatura de incubación de 37°C a 32°C (Kosovsky y otros).

Los vectores aptos para evaluar la eficiencia de la replicación viral, más en particular para evaluar la eficiencia de la replicación del VHB, incluyen los vectores virales o los vectores que comprenden al menos 1 unidad (longitud completa) del genoma del VHB, preferentemente más de 1 unidad del genoma del VHB; por ejemplo 1,1 - 4, en particular 1,1, 1,2, 1,28, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 3,0 o 4,0 veces el genoma del VHB. Un ejemplo de un sistema de vectores virales que permite la replicación viral del VHB es un sistema de baculovirus, por ejemplo como el descrito por Isom y Harriet en la Publicación de Patente Internacional nº WO99/37821 o por Delaney y otros

(Delaney y otros, 1999). El grado de replicación viral puede ser monitorizado midiendo o detectando ya sean una o más de (i) la secreción de un antígeno del VHB (HBsAg o HBeAg), (ii) la expresión de transcritos del VHB (transcritos de 3,5 kb, 2,4 kb, 2,1 kb, 0,7 kb), (iii) la cantidad de intermediarios replicativos del VHB (ADN circular relajado, ADN bicatenario o ADN monocatenario), (iv) la cantidad de ADN circular superenrollado (ccc) del VHB, (v) la cantidad de ADN extracelular secretado del VHB, (vi) la cantidad de partículas del VHB producidas extracelularmente, (vii) la cantidad de proteína HBcAg producida, (viii) la cantidad de proteína producida de ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB, y (ix) la cantidad de proteína X del VHB producida. Otro ejemplo de un sistema de vectores virales que permite la replicación viral del VHB es un sistema de vectores que incluye un gen indicador (por ejemplo, un gen marcador seleccionable o un gen marcador detectable, según describen, por ejemplo, Capon y Petropoulos en la patente estadounidense nº 6242187) cuya expresión es indicativa del grado de replicación viral.

Los sistemas de vectores virales que permiten la replicación viral del VHB son aptos para comparar la eficiencia de la replicación de los virus VHB de referencia con la eficiencia de la replicación de virus VHB mutantes. Se entiende que los virus VHB mutantes son virus VHB que comprenden una mutación o un polimorfismo de ácidos polinucleicos ya sea en uno o más de los ORF del VHB y/o de las secuencias reguladoras del VHB (por ejemplo, promotor, potenciador, terminador o señal de poliadenilación, bucle épsilon, señal de encapsidación, secuencia de repetición, señal de empaquetamiento, sitio interno de entrada al ribosoma).

Un aspecto adicional de la invención está relacionado con una célula anfitriona que comprende un ácido polinucleico del VHB o un fragmento del mismo según la invención, o que comprende una proteína de ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB o un fragmento de la misma según la invención, o que comprende una variante del VHB según la invención, o que comprende un vector según la invención. En una realización específica, dicha célula anfitriona es una célula hepática de mamífero o una célula de hepatoma de mamífero según se ha descrito *supra*.

La presente invención versa, además, sobre productos de expresión provenientes de los ácidos polinucleicos aislados. Estos productos de expresión resultan de la expresión de cualesquiera de los ácidos polinucleicos y/o los fragmentos descritos *supra*.

Dichos productos de expresión comprenden proteínas, péptidos, oligopéptidos, ARN o ARNm. Cuando se usan en el presente documento, los términos "proteína", "péptido" u "oligopéptido" se refieren a aminoácidos en una forma polimérica de cualquier longitud. Dichos términos también incluyen modificaciones conocidas de aminoácidos tales como la formación de enlaces disulfuro, cisteinilación, oxidación, glutationilación, metilación, acetilación, famesilación, biotinilación, estearoilación, formilación, adición de ácido lipico, fosforilación, sulfación, ubiquitinación, miristoilación, palmitoilación, geranilgeranilación, ciclización (por ejemplo, formación de ácido piroglutámico), oxidación, desamidación, deshidratación, glicosilación (por ejemplo, pentosas, hexosaminas, N-acetilhexosaminas, desoxihexosas, hexosas, ácido siálico, etc.) y acilación, así como residuos de aminoácidos que no se dan en la naturaleza, residuos de L-aminoácidos y residuos de D-aminoácidos. Como reconocerá un experto en la técnica, pueden ocurrir varias de dichas modificaciones de aminoácidos como consecuencia de una modificación postraduccional. Otras modificaciones incluyen la adición de un grupo químico a uno o más aminoácidos de una proteína, un péptido o un oligopéptido. Dichos grupos químicos incluyen, por ejemplo, biotina. Además, generalmente las proteínas, los péptidos o los oligopéptidos pueden ser marcadas de forma radiactiva, quimioluminiscente, fluorescente, fosforescente, con tinciones infrarrojas o con una marca Raman de superficie mejorada o partículas resonantes de plasmón.

La presente invención se extiende a productos de expresión que comprenden al menos una sustitución y/o una delección de aminoácidos en el gen de la polimerasa. En particular la invención versa sobre productos de expresión que comprenden una sustitución de aminoácidos en el codón 233 del gen de la polimerasa de una isoleucina por cualquier otro aminoácido. Más en particular, el producto de expresión comprende la sustitución del aminoácido isoleucina por valina, rtI233V.

La presente invención también cubre productos de expresión que comprenden, además de rtI233V, sustituciones adicionales de aminoácidos de la polimerasa; más en particular, la sustitución de la metionina en la posición codónica 204 en el dominio C de la polimerasa. Están cubiertos en particular productos de expresión que comprenden al menos dos sustituciones de aminoácidos en la ADN polimerasa, una sustitución de la isoleucina por valina en la posición codónica 233 en el dominio D del gen de la polimerasa y una sustitución de la metionina en la posición codónica 204 en el dominio C del gen de la polimerasa. Se entiende que la sustitución de la metionina en la posición codónica 204 incluye cualquier aminoácido distinto de la metionina, preferentemente la sustitución es por una isoleucina, una valina o una serina.

La presente invención también cubre productos de expresión que comprenden, además de rtI233V, sustituciones adicionales de aminoácidos en otros sitios de la polimerasa del VHB, preferentemente una o más sustituciones de aminoácidos escogidas del grupo que consiste en rtV173L, rtM204I o rtM204V o rtM204S, rt S219A, rL180M, rA181V, L217R y rN236T. Las diferentes mutaciones en el codón 204 han sido indicadas poniendo "o" dos veces.

Productos de expresión ejemplares comprenden la sustitución r1233V en el dominio B de la polimerasa opcionalmente con la sustitución r1204I en el dominio C de la polimerasa. En una realización específica, dichos productos aislados de expresión del VHB comprenden una secuencia escogida del grupo que consiste en las ID SEC nº 11, ID SEC nº 12, ID SEC nº 13, ID SEC nº 14, ID SEC nº 15, ID SEC nº 16, ID SEC nº 17, ID SEC nº 18, ID SEC nº 19 e ID SEC nº 20.

Otro aspecto de la invención versa sobre fragmentos de los productos de expresión mencionados anteriormente, fragmentos que comprenden las sustituciones de aminoácidos descritas que llevan a una sensibilidad reducida a un análogo nucleósido y/o a otros agentes contrarios al VHB. Estos fragmentos comprenden al menos la sustitución r1233V.

Los productos de expresión comprenden polipéptidos que incluyen hepatitis B polimerasa de longitud completa y/o transcriptasa inversa y fragmentos de la misma que comprenden al menos residuo mutante o el sitio, y/o cualquiera de estos fusionado con un polipéptido heterólogo.

La expresión incluye la producción de moléculas de ARN o moléculas de ARNm que comprenden los patrones genotípicos mutados dados a conocer. Cuando "heterólogo" se usa con referencia a secuencias de ácidos polinucleicos o proteínas no significa lo mismo que las secuencias nativas o las flanqueantes conocidas. Las secuencias heterólogas incluyen otras secuencias de VHB, humanas, animales o microbianas, polyHis u otras etiquetas de afinidad, o secuencias fabricadas por entero. Normalmente, los fragmentos incluirán el residuo variante más al menos aproximadamente 4 residuos flanqueantes totales asignados a cualquiera de los dos flancos, o a ambos, del residuo mutante, habitualmente de 10 a 20 residuos en total.

La presente invención abarca además el aspecto de los oligonucleótidos que tienen secuencias de nucleótidos complementarias sustancialmente homólogas capaces de discriminar, en función de la hibridación, en un ácido polinucleico del VHB o un fragmento del mismo según la invención, un codón 233 codificador de valina en el dominio de la transcriptasa inversa del VHB a partir de un codón 233 codificador de isoleucina en el dominio de la transcriptasa inversa del VHB.

Se entiende que el término "oligonucleótido", al que se hace referencia en el presente documento, es un cebador o una sonda, y que puede ser monocatenario o bicatenario o que puede formar parte de un ácido polinucleico formador de tripletes. Los oligonucleótidos pueden ser creados *in vitro* por medio de un procedimiento de amplificación de secuencias de nucleótidos. Si tal oligonucleótido amplificado es bicatenario, puede lograrse la conversión a una molécula monocatenaria por medio de una exonucleasa adecuada, dado que el oligonucleótido monocatenario deseado está protegido contra dicha actividad de la exonucleasa. Alternativamente, se derivan oligonucleótidos a partir de plásmidos recombinantes que contienen insertos que incluyen las correspondientes secuencias de nucleótidos, si es necesario escindiendo estas de los plásmidos clonados tras usar las nucleasas adecuadas y recuperándolas, por ejemplo, por fraccionamiento según el peso molecular. Los oligonucleótidos según la presente invención también pueden ser sintéticos, es decir, ser sintetizados químicamente; por ejemplo, aplicando química convencional de fosfotriéster o fosforamidita. Además, pueden sintetizarse oligonucleótidos *in situ* sobre un portaobjetos de vidrio mediante síntesis de oligonucleótidos en fase sólida o mediante síntesis fotolitográfica (Beaucage, 2001).

En otra realización específica, el oligonucleótido según la presente invención comprende, además, una modificación para unir dicho oligonucleótido a un soporte sólido. Dicha modificación puede ser, por ejemplo, una modificación del oligonucleótido con aminas, tioles, 3'-propanolamina o Acrydite®, o puede comprender la adición de una cola homopolimérica (por ejemplo, una cola oligo(dT) añadida enzimáticamente mediante una enzima transferasa terminal o añadida sintéticamente) al oligonucleótido. Si dicha cola homopolimérica está situada en el terminal 3'- del oligonucleótido o si se incorpora en el oligonucleótido cualquier otra modificación del terminal 3'- que impida la extensión enzimática, puede disminuirse o eliminarse la capacidad cebadora del oligonucleótido. Se describen otras modificaciones, por ejemplo, en Beaucage, 2001. Está claro que los oligonucleótidos según la presente invención que son ADN, ARN, APN o ANB, o que son cualquier quimera de los mismos están implementados en la invención. También están implementadas las composiciones que comprenden al menos un oligonucleótido según la invención.

"Hibridación" es el procedimiento en el que se aparean entre sí secuencias de nucleótidos complementarias sustancialmente homólogas. El procedimiento de hibridación puede ocurrir por entero en solución; es decir, ambos ácidos nucleicos complementarios se encuentran en solución. Herramientas de biología molecular que se valen de tal procedimiento incluyen la PCR, la hibridación sustractiva y la determinación de secuencias de ADN. El procedimiento de hibridación también puede ocurrir con uno de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizado en una matriz tal como perlas magnéticas, perlas de sefarosa o cualquier otra resina o cualquier otro tipo de perlas. Herramientas de biología molecular que se valen de tal procedimiento incluyen el aislamiento de ARNm poli (A⁺). El procedimiento de hibridación puede ocurrir, además, con uno de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizado en un soporte sólido tal como una membrana de nitrocelulosa o nailon, un portaobjetos de vidrio o un portaobjetos de sílice fundida (cuarzo) (conocido este como matrices o micromatrices de ácidos nucleicos o como segmentos de ácido nucleico), una película de oro, una película de polipirrol, una fibra óptica o, por ejemplo, en un gel de poliacrilamida o un pocillo de microplaca. Herramientas de biología molecular que se valen de tal procedimiento

incluyen el análisis de ARN y ADN por transferencia en gel, hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación inversa e hibridación de micromatrices. Para permitir que ocurra la hibridación, generalmente se desnaturalizan las moléculas de ácido nucleico térmica, química (por ejemplo, mediante NaOH) o electroquímicamente para fundir una doble cadena en dos cadenas simples y/o para eliminar horquillas o sondas de "balizas moleculares" (monocatenarias con marcación doble) u otras estructuras secundarias de ácidos nucleicos monocatenarios.

Además, las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden estar ligadas a una secuencia guía externa (EGS) o a una secuencia guía corta externa (SEGS). Dichas secuencias guía ligadas a una secuencia diana proporcionan una estructura mínima que es reconocida como un sustrato por las enzimas de RNasa P (Werner y George en la patente estadounidense nº 5.877.162). Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención ligadas a una EGS o una SEGS pueden encontrar aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de pacientes infectados con el VHB.

Son aspectos adicionales de la presente invención procedimientos para detectar la presencia de un virus VHB en una muestra biológica y/o para detectar la resistencia a un fármaco antiviral de un virus VHB presente en una muestra biológica y/o para detectar la presencia de un codón 233 codificador de valina, opcionalmente junto con la presencia de uno o más codones escogidos del grupo que consiste en un codón 173 codificador de leucina, un codón 204 codificador de isoleucina o un codón 204 codificador de valina o un codón 204 codificador de serina, un codón 219 codificador de alanina, un codón 180 codificador de metionina, un codón 181 codificador de valina, un codón 217 codificador de arginina y un codón 236 codificador de treonina en el dominio de la transcriptasa inversa del VHB de un virus VHB presente en una muestra biológica.

Con "codón" se quiere decir una combinación de 3 nucleótidos contiguos que codifican un aminoácido según el código genético. Además, en la presente invención, un "codón" puede estar comprendido en un ácido poli(nucleico) monocatenario (codificante o no codificante) o bicatenario. Para derivar la secuencia de aminoácidos de una cadena no codificante, es preciso usar la correspondiente cadena codificante (el complemento invertido) para su traducción a la correspondiente secuencia de aminoácidos.

En la actualidad hay disponible un gran número de ensayos capaces de detectar secuencias de nucleótidos y polimorfismos de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, una mutación). Algunos de estos ensayos se basan en procedimientos físicos, mientras que otros usan enfoques enzimáticos.

Con "procedimientos físicos de detección" se quiere decir, en el presente contexto, procedimientos de detección de polimorfismos de secuencias de nucleótidos que requieren uno o más procedimientos físicos para la detección, aunque no excluyendo el procedimiento enzimático de la amplificación previa por PCR de la secuencia diana de ADN que comprende uno o más polimorfismos de secuencias de nucleótidos. Dichos procedimientos físicos incluyen electroforesis, cromatografía, espectrometría, detección de señales ópticas y espectroscopia.

Los ensayos de detección física de polimorfismos de secuencias de nucleótidos incluyen procedimientos electroforéticos tales como el polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP), la electroforesis capilar desnaturizante constante (CDCE) y la electroforesis en gel desnaturizante constante (CDGE) —véase, por ejemplo, Kristensen y otros, 2001—; la electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE), la electroforesis capilar de doble gradiente (DGCE); la electroforesis capilar en zona (CZE) también se denomina electroforesis capilar en solución libre (FSCE); la CZE no isocrática, o la electroforesis capilar de gradiente térmico (TGCE), el barrido génico bidimensional (TDGS), la electroforesis en gel sensible a la conformación (CSGE) —véase, por ejemplo, Korkko y otros, 1998—, la electroforesis diagonal en gel en matrices de microplacas (MADGE) —véase, por ejemplo, Day y otros, 1998 —, y el análisis de conformación bicatenaria (DSCA) —véase, por ejemplo, Arguello y otros, 1998—. Se denomina HMA (ensayo de movilidad de heteroduplos) a una técnica similar, pero la detección de duplos de ADN se vale de la tinción de gel del ADN (Delwart y otros, 1993). En el HTA (ensayo de rastreo de heteroduplos), se aparea una sonda radiomarcada con un producto de PCR y se separan mediante electroforesis en gel los heteroduplos de producto sonda-PCR. Se ha descrito un HTA específico a sitios múltiples (Resch y otros, 2001; Delwart y otros, 1994).

Los procedimientos cromatográficos de análisis de conformación bicatenaria incluyen la cromatografía líquida desnaturizante de alto rendimiento (DHPLC). Los ensayos de detección física de polimorfismos de secuencias de nucleótidos pueden ser efectivos para la identificación de mutaciones conocidas o nuevas y pueden requerir confirmación mediante secuenciación directa de ADN, dando como resultado la separación de moléculas diana de homo y heteroduplos de ADN mediante electroforesis desnaturizante. También puede llevarse a cabo dicha separación mediante cromatografía líquida desnaturizante, en la que la temperatura determina la sensibilidad. Además, la DHPLC puede llevarse a cabo en columnas capilares monolíticas que permitan la creación de un sistema matricial. Es posible la detección basada en la fluorescencia, así como el acoplamiento en línea con un espectrómetro de masas. La eficiencia de la detección de polimorfismos de nucleótidos mediante DHPLC puede aumentar añadiendo un anclaje GC al extremo del fragmento diana de ADN (Huber y otros, 2001; Narayanaswami y otros, 2001; Xiao y otros, 2001).

- Se ha usado con éxito la MALDI-TOF MS (espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción-ionización láser asistidas por matriz) como herramienta de secuenciación directa del ADN para fragmentos de ADN de menos de 100 pb y como herramienta de detección de polimorfismos de un solo nucleótido. Se ha demostrado que la hibridación de oligómeros de APN (ácido peptidonucleico) específicos de un alelo con ADN diana monocatenario es muy compatible con un análisis de MALDI-TOF MS (Griffin y otros, 2000, y las referencias en el mismo).
- La secuenciación directa del ADN, tal como fue diseñada, por ejemplo, por Maxam y Gilbert (Maxam y otros, 1977), es considerada aún el "patrón oro" para la determinación de polimorfismos de secuencias de nucleótidos. El procedimiento más común y generalizado de secuenciación de ADN se basa en la reacción de Sanger o reacción de terminación de la cadena didesoxinucleótida (Sanger y otros, 1977). Pueden marcarse cebadores de secuenciación para la detección de las cadenas terminadas, o es posible el marcado interno del producto de extensión. Otros procedimientos de secuenciación del ADN son la pirosecuenciación (véase, por ejemplo, Williams, 2000) y la secuenciación cíclica (Yager y otros, 1999; Ruano y otros, 1991).
- En el futuro cercano, también podría disponerse de la secuenciación de nanoporos (Meller y otros, 2000). Otros procedimientos de secuenciación del ADN incluyen la secuenciación por resonancia molecular y la secuenciación diagnóstica combinando una escisión específica del ADN seguida por análisis de espectrometría de masas de los fragmentos (véanse, por ejemplo, Stanssens y Zabeau 2000 - WO00/66771).
- Otro procedimiento de determinación de las variaciones de las secuencias de nucleótidos comprende la secuenciación de didesoxinucleótidos (reacción de Sanger), en la que los dNTP regulares son sustituidos por dNTP modificados (tales como α -tio dNTP) y otras variantes (Dahlhauser 2000 - US 6150105).
- Una metodología adicional de secuenciación de ADN se denomina SBH o secuenciación por hibridación, que usa una matriz de todos los posibles oligómeros de n nucleótidos (n-meros) para identificar los n-meros comprendidos en una muestra de ADN desconocido (Drmanac y otros, 1993).
- Dichas matrices de oligonucleótidos de alta densidad y dichos segmentos de ADN eliminan la necesidad de diseño de un conjunto de oligonucleótidos que se hibriden específicamente en las mismas condiciones que un conjunto de secuencias polimórficas de nucleótidos. Se aplica este enfoque en ensayos convencionales de transferencia inversa ajustando cuidadosamente la longitud, la polaridad y la posición del o de los nucleótidos desaparejados en la sonda de oligonucleótidos (Saiki y otros, 1989). Sin embargo, se han comercializado con éxito ensayos convencionales de hibridación de transferencia inversa para la genotipificación y la detección de polimorfismos de secuencias de nucleótidos; por ejemplo, en el formato LiPA (ensayo de sonda lineal) (Innogenetics, Gante, Bélgica) (Stuyver y otros, 1997; Stuyver y otros, 1996).
- Estará claro para el experto que pueden realizarse muchas variaciones y combinaciones en los procedimientos de detección de secuencias de nucleótidos y de polimorfismos de las secuencias de nucleótidos descritos *supra*. Estos son incorporados por la presente memoria en la presente invención.
- Los oligonucleótidos según la invención descritos *supra* pueden ser adaptados de tal modo que puedan ser usados en cualquiera de los procedimientos para la detección de secuencias de nucleótidos o de polimorfismos en las mismas, según se ha descrito *supra*.
- Así, en una realización adicional de la presente invención, el oligonucleótido según la invención comprende, además, una extensión terminal y/o una estructura de sonda en horquilla o de "balizas moleculares", incorporándose dicha extensión y/o dicha estructura en horquilla en cualquiera de los dos extremos o en ambos extremos de dicho oligonucleótido. Dicha extensión terminal es útil, por ejemplo, para hibridarse específicamente con otra molécula de ácido nucleico, y/o para facilitar la unión de dicho oligonucleótido a un soporte sólido, y/o para la modificación de dicho oligonucleótido de cola por parte de una enzima, una ribozima o una ADNzima.
- En una realización adicional de la presente invención, el oligonucleótido según la invención está comprendido dentro de una sonda candado que incorpora en ambos extremos cebadores que, tras aparearse con un ADN diana, pueden estar ligados, o dentro de una estructura de horquilla.
- En otra realización, el oligonucleótido de la presente invención tiene una modificación que permite la detección y/o la captura de dicho oligonucleótido. La detección y/o la captura de dicho oligonucleótido permite, además, la detección y/o la captura del ácido nucleico diana hibridado con el mismo. La interacción entre dicho oligonucleótido y dicho ácido nucleico diana puede ser estabilizada mediante reticulación tanto a través de la introducción de una modificación reticulante en dicho oligonucleótido como en dicho ácido nucleico diana.
- En otra realización adicional, el oligonucleótido de la invención comprende un nucleótido discordante en el terminal 3'- y, opcionalmente, un nucleótido discordante en el proximal 3'-. Dichos oligonucleótidos son particularmente útiles para llevar a cabo PCR y LCR (reacción en cadena de la ligasa) o GAP-LCR específicas al polimorfismo.
- También está comprendida en la presente invención una composición que comprende al menos un oligonucleótido según la descripción dada *supra*.

5 Estará claro para el experto que cualquier de los procedimientos descritos *supra* para la detección de secuencias de nucleótidos y de polimorfismos en las mismas pueden ser utilizados para procedimientos de detección de la presencia de un virus VHB en una muestra biológica; y/o para la detección de la presencia de un codón 233 codificador de valina, opcionalmente junto con la presencia de uno o más codones escogidos del grupo que consiste en un codón 173 codificador de leucina, un codón 204 codificador de isoleucina o un codón 204 codificador de valina o un codón 204 codificador de serina, un codón 219 codificador de alanina, un codón 180 codificador de metionina, un codón 181 codificador de valina, un codón 217 codificador de arginina y un codón 236 codificador de treonina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB de un virus VHB presente en una muestra biológica.

10 Por lo tanto, los siguientes aspectos, que cubren tales procedimientos de detección y tales *kits* de diagnóstico, por ejemplo, ensayos de sonda lineal, basados en tales procedimientos de detección, también están incluidos en la presente invención.

15 Un aspecto de la invención está relacionado con un procedimiento para la detección de la presencia de un virus VHB en una muestra biológica y/o con un procedimiento para la detección de la resistencia a un fármaco antiviral de un virus VHB presente en una muestra biológica, comprendiendo dichos procedimientos la etapa de detección de la presencia de la mutación que da como resultado una sustitución de aminoácido en la posición codónica 233 de isoleucina a valina en un ácido polinucleico del VHB o un fragmento del mismo según la invención. Una realización específica de la misma incluye el procedimiento que comprende las etapas de:

20 a. obtener un ácido polinucleico del VHB diana a partir de dicha muestra biológica, sospechándose que dicho ácido polinucleico del VHB diana comprende un codón 233 codificador de valina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, y consistiendo opcionalmente uno o más de los codones escogidos del grupo consistente en un codón 173 codificador de leucina, un codón 204 codificador de isoleucina o un codón 204 codificador de valina o un codón 204 codificador de serina, un codón 219 codificador de alanina, un codón 180 codificador de metionina, un codón 181 codificador de valina, un codón 217 codificador de arginina y un codón 236 codificador de treonina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB de un virus VHB;

25 b. obtener la secuencia de ácidos nucleicos del ácido polinucleico del VHB diana de (a);

30 c. inferir, a partir de la secuencia de ácidos nucleicos obtenida en (b), la presencia de dicho codón 233 codificador de valina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, y opcionalmente uno o más codones escogidos del grupo mencionado en (a) y, a partir de ello, la presencia de dicho virus VHB en dicha muestra biológica y/o dicha resistencia a un fármaco antiviral de un virus VHB presente en dicha muestra biológica.

Otra realización específica de la misma incluye los procedimientos que comprenden:

35 a. obtener un ácido polinucleico del VHB diana presente en dicha muestra biológica y/u obtener la secuencia de nucleótidos del mismo;

b. cuando sea apropiado, desnaturizar parcial o completamente, o modificar enzimáticamente los ácidos polinucleicos obtenidos en la etapa (a);

40 c. cuando sea apropiado, renaturalizar los ácidos polinucleicos desnaturizados obtenidos en la etapa (b), preferentemente en presencia de al menos un oligonucleótido que tiene secuencias de nucleótidos complementarias sustancialmente homólogas capaces de discriminar, en función de la hibridación, en un ácido polinucleico del VHB o un fragmento del mismo, entre un codón 233 codificador de valina en el dominio de la transcriptasa inversa del VHB y un codón 233 que codifica una isoleucina en el dominio de la transcriptasa inversa del VHB, y, si hace falta, incluir la etapa de modificación enzimática, incluyendo la extensión, de dicho oligonucleótido;

45 d. cuando sea apropiado, detectar los ácidos polinucleicos del VHB parcial o completamente desnaturizados obtenidos en la etapa (b), y/o de los híbridos formados en la etapa (c), y/o de las modificaciones obtenidas en las etapas (b) y/o (c).

50 e. inferir, a partir de uno o más de los datos de los grupos siguientes: los ácidos polinucleicos parcial o completamente desnaturizados, los híbridos, las modificaciones enzimáticas, todos detectados en la etapa (d), y de la secuencia de nucleótidos obtenida en (a), la presencia de dicho VHB en dicha muestra biológica y/o dicha resistencia a un fármaco antiviral de un VHB presente en dicha muestra biológica.

55 En otra realización específica de la misma, dicho procedimiento comprende:

a. obtener un ácido polinucleico del VHB diana a partir de dicha muestra biológica, sospechándose que dicho ácido polinucleico del VHB diana comprende un codón 233 codificador de valina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, y opcionalmente con uno o más de los codones escogidos del grupo consistente en un codón 173 codificador de leucina, un codón 204 codificador de isoleucina o un codón 204 codificador de valina o un codón 204

codificador de serina, un codón 219 codificador de alanina, un codón 180 codificador de metionina, un codón 181 codificador de valina, un codón 217 codificador de arginina y un codón 236 codificador de treonina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB de un VHB;

5 b. poner en contacto el ácido polinucleico del VHB diana de (a) con un oligonucleótido que tenga secuencias de nucleótidos complementarias sustancialmente homólogas capaces de discriminar, en función de la hibridación, entre un codón 233 que codifica una isoleucina y un codón 233 que codifica una alanina o una valina, y
10 opcionalmente también capaz de discriminar, en uno o más codones escogidos del grupo, entre un codón 173 que codifica una valina y un codón 173 que codifica una leucina, entre un codón 204 que codifica una metionina y un
15 codón 204 que codifica un aminoácido escogido del grupo que consiste en isoleucina, valina y serina, entre un codón 219 que codifica una serina y un codón 219 que codifica una alanina, entre un codón 180 que codifica una leucina y un codón 180 que codifica una metionina, entre un codón 181 que codifica una alanina y un codón 181 que codifica una valina, entre un codón 217 que codifica una leucina y un codón 217 que codifica una arginina y
entre un codón 236 que codifica una asparagina y un codón 236 que codifica una treonina;

15 c. inferir, a partir de la señal discriminatoria obtenida en (b), la presencia de dicho codón 233 codificador de valina de la transcriptasa inversa del VHB, opcionalmente junto con dicho codón 173 codificador de leucina o dicho codón 219 codificador de alanina o dicho codón 180 codificador de metionina, o dicho codón 181 codificador de valina o
20 dicho codón 204 codificador de isoleucina o dicho codón 204 codificador de valina o dicho codón 204 codificador de serina, o dicho codón 217 codificador de arginina o dicho codón 236 codificador de treonina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB de un VHB;

y, a partir de ello, la presencia de dicho VHB en dicha muestra biológica y/o dicha resistencia a un fármaco antiviral de un virus VHB presente en dicha muestra biológica.

25 En estos procedimientos, dicha discriminación en (b) se basa generalmente en la hibridación y dicha señal discriminatoria en (c) es una señal de hibridación.

Con un "oligonucleótido capaz de discriminar, en un ácido (poli)nucleico, entre un codón que codifica el aminoácido X1 (cualquier aminoácido) y un codón que codifica el aminoácido X2 (cualquier aminoácido diferente de X1)" se quiere decir un oligonucleótido que da una señal cuando es puesto en contacto con un ácido (poli)nucleico que
30 comprende dicho codón que codifica el aminoácido X1 pero no da una señal cuando es puesto en contacto con un ácido (poli)nucleico que comprende un codón que codifica el aminoácido X2. Dicha señal, también denominada "señal discriminatoria", puede ser cualquier señal obtenible usando dicho oligonucleótido en cualquiera de los ensayos capaces de detectar secuencias de nucleótidos y polimorfismos de secuencias de nucleótidos, según se ha descrito *supra*. Dichas señales incluyen, por ejemplo, señales fluorescentes, señales (químio)luminiscentes, señales radiactivas, señales lumínicas, señales de hibridación, señales espectrométricas de masas, señales
35 espectrométricas, señales cromatográficas, señales eléctricas, señales electrónicas, señales electroforéticas, señales de PCR en tiempo real, señales de PCR, señales de LCR, señales del ensayo de CFLP y señales del ensayo invasor.

Con "poner en contacto un oligonucleótido con un ácido (poli)nucleico" o viceversa generalmente se quiere decir el apareamiento de dicho oligonucleótido con dicho ácido (poli)nucleico o la hibridación de dicho oligonucleótido con
40 dicho ácido (poli)nucleico. "Poner en contacto un oligonucleótido con un ácido (poli)nucleico" no excluye y, por ello, puede comprender además la modificación enzimática de dicho oligonucleótido, pudiendo ocurrir dicha modificación en los extremos de dicho oligonucleótido y/o internamente en la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido. Se dan ejemplos de modificaciones enzimáticas de oligonucleótidos, por ejemplo, en los ensayos capaces de detectar secuencias de nucleótidos y polimorfismos de secuencias de nucleótidos descritos en el presente documento.
45

En otra realización de la invención, dichos procedimientos comprenden, además, cuando sea aplicable, alinear y/o comparar la secuencia de ácidos nucleicos obtenida con un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos del VHB contenidas en una base de datos.

50 Con "base de datos" se quiere decir, en el presente contexto, una colección de secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, más específicamente de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos del VHB. Ha de entenderse que una base de datos comprende al menos un ácido nucleico o al menos una secuencia de aminoácidos. Puede grabarse una base de datos en diversos soportes. Tales soportes incluyen soportes legibles por ordenador.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con un *kit* de diagnóstico para detectar la presencia de un virus VHB en una muestra biológica y/o para detectar la resistencia a un fármaco antiviral de un virus VHB presente
55 en una muestra biológica, comprendiendo dicho *kit* al menos un medio para detectar la presencia de la mutación resultante en una sustitución en la posición codónica 233 del aminoácido isoleucina por valina en un ácido polinucleico del VHB según la invención.

Preferentemente, dicho *kit* de diagnóstico comprende:

- 5 a. un medio para inferir —a partir de la secuencia de ácidos nucleicos de un ácido polinucleico diana que se sospecha que comprende un codón 233 codificador de valina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, opcionalmente junto con uno o más de los codones escogidos del grupo consistente en un codón 173 codificador de leucina, un codón 204 que codifica un aminoácido escogido del grupo que consiste en isoleucina, valina y serina, un codón 219 codificador de alanina, un codón 180 codificador de metionina, un codón 181 codificador de valina, un codón 217 codificador de arginina y un codón 236 codificador de treonina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB— la presencia de dicho codón 233 codificador de valina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, opcionalmente junto con uno o más codones del grupo que consiste en dicho codón 173 codificador de leucina, dicho codón 204 codificador de isoleucina o dicho codón 204 codificador de valina o dicho codón 204 codificador de serina, dicho codón 219 codificador de alanina, dicho codón 180 codificador de metionina, dicho codón 181 codificador de valina, un codón 217 codificador de arginina y un codón 236 codificador de treonina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB; y, a partir de ello, la presencia en dicha muestra biológica de dicho virus VHB y, opcionalmente,
- 15 b. un medio para obtener la secuencia de ácidos nucleicos del ácido polinucleico diana. En otra realización, dicho *kit* de diagnóstico comprende, además, un medio para detectar la señal discriminadora obtenida al poner en contacto dicho ácido polinucleico del VHB con dicho oligonucleótido o dichos oligonucleótidos.

También están implementados los *kits* de diagnóstico en los que dicho oligonucleótido o dichos oligonucleótidos están unidos a un soporte sólido o inmovilizados en el mismo.

20 Otra realización específica de la misma incluye *kits* de diagnóstico que comprenden:

- a. un medio para obtener un ácido polinucleico del VHB diana presente en dicha muestra biológica y/o para obtener la secuencia de nucleótidos del mismo;
- 25 b. cuando sea apropiado, al menos un par de oligonucleótidos adecuados para la amplificación de un ácido polinucleico del VHB diana según la invención;
- c. cuando sea apropiado, un medio para desnaturalizar ácidos nucleicos;
- 30 d. cuando sea apropiado, al menos un oligonucleótido según la invención;
- e. cuando sea apropiado, una enzima capaz de modificar una molécula de ácido nucleico bicatenaria o monocatenaria;
- 35 f. cuando sea apropiado, un tampón de hibridación, o componentes necesarios para la producción de dicho tampón;
- g. cuando sea apropiado, una solución de lavado, o componentes necesarios para la producción de dicha solución;
- 40 h. cuando sea apropiado, un medio para detectar ácidos polinucleicos desnaturalizados parcial o completamente y/o un medio para detectar híbridos formados en la hibridación precedente y/o un medio para detectar modificaciones enzimáticas de ácidos nucleicos;
- i. cuando sea apropiado, un medio para unir un oligonucleótido con una ubicación conocida en un soporte sólido;
- 45 j. un medio para inferir, a partir de los ácidos polinucleicos desnaturalizados parcial o completamente y/o de los híbridos y/o de las modificaciones enzimáticas, detectados todos en (h), y/o de la secuencia de nucleótidos obtenida en (a), la presencia de dicho virus VHB en dicha muestra biológica.

50 Con “un medio para inferir, a partir de una secuencia de ácidos nucleicos, la presencia del codón Y (Y es el número que se indique) que codifica el aminoácido X (X es el aminoácido que se indique)” se quiere decir cualquier técnica o procedimiento (i) para localizar en dicha secuencia de ácidos nucleicos dicho codón Y, (ii) para traducir dicho codón Y al aminoácido codificado por el codón Y, y (iii) para concluir, a partir de (ii), si el aminoácido codificado por dicho codón Y es igual o diferente de dicho aminoácido X. Dicho medio puede incluir procedimientos en los que (i) a (iii) se llevan a cabo todos manualmente y/o mediante cálculo. Dicho medio puede incluir alinear y/o comparar una secuencia obtenida de ácidos nucleicos con un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos contenidas en una base de datos. Dicho medio puede incluir, además, que el resultado de (i) a (iii) se presente en forma de informe, pudiendo estar dicho informe en forma de papel, en forma electrónica o en un soporte o un medio legible por ordenador. Dicho medio puede incluir, además, la búsqueda en bases de datos de secuencias (de ácidos nucleicos y/o aminoácidos) y/o la creación de alineamientos de secuencias (de ácidos nucleicos y/o aminoácidos), cuyos resultados pueden o no estar incluidos en dicho informe.

60 Una realización adicional cubre cualquiera de los anteriores procedimientos de la invención, caracterizada además por que dichos procedimientos se basan en la determinación de la secuencia de ácidos nucleicos.

Una realización adicional cubre cualquiera de los anteriores procedimientos de la invención, caracterizada además porque dichos procedimientos se basan en un ensayo de hibridación.

Una realización adicional cubre cualquiera de los anteriores procedimientos de la invención, caracterizada además porque dichos procedimientos se basan en un ensayo de hibridación inversa.

- 5 Una realización adicional cubre cualquiera de los anteriores *kits* de diagnóstico de la invención, caracterizada además porque dichos *kits* de diagnóstico se basan en la determinación de la secuencia de ácidos nucleicos.

Una realización adicional cubre cualquiera de los anteriores *kits* de diagnóstico de la invención, caracterizada además porque dichos *kits* de diagnóstico se basan en un ensayo de hibridación.

- 10 Una realización adicional cubre cualquiera de los anteriores *kits* de diagnóstico de la invención, caracterizada además porque dichos *kits* de diagnóstico se basan en un ensayo de hibridación inversa.

Una realización adicional cubre cualquiera de los anteriores *kits* de diagnóstico de la invención, caracterizada además porque dichos *kits* de diagnóstico se basan en un ensayo de sonda lineal.

- 15 La invención proporciona, además, un procedimiento para la detección de resistencia a un fármaco antiviral de un virus VHB presente en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de detectar la presencia de una proteína o un fragmento de ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB según la invención. Dicha detección puede incluir las etapas de determinar la secuencia de aminoácidos de la proteína de ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB o de una parte de la misma, obtenidas, por ejemplo, después de la digestión proteolítica y la separación de los fragmentos proteínicos resultantes a través de medios cromatográficos y/o electroforéticos. Tras la electroforesis, un fragmento de proteína puede ser escindido y acabar siendo eluido del gel antes de la secuenciación. Alternativamente, se combina la electroforesis proteínica en gel con la transferencia, por lo que las proteínas son transferidas a un portamembranas (por ejemplo, de nitrocelulosa, PVDF, nailon). En este caso, la proteína o el fragmento de proteína que han de secuenciarse pueden ser escindidos del portamembranas. Alternativamente, se detecta la proteína de ADN polimerasa/transcriptasa del VHB usando un anticuerpo que reconoce específicamente la valina en la posición 233 del dominio de la transcriptasa inversa del VHB. En particular, dicho anticuerpo no debería reconocer una isoleucina en dicha posición 233. En otra alternativa adicional, la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB según la invención es detectada fenotípicamente; es decir, dicha ADN polimerasa/transcriptasa del VHB puede presentar un patrón singular de sensibilidad antiviral al fármaco no compartido con ADN polimerasas/transcriptasas inversas del VHB que comprenden un codón 233 que codifica una isoleucina.

- 20 Así, la detección fenotípica de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB según la invención incluye, por ejemplo, las etapas de determinar la sensibilidad de una actividad de una ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB proveniente de un virus VHB presente en una muestra biológica a un panel de fármacos antivirales. Alternativamente, la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB proveniente de un virus VHB presente en una muestra biológica y que se sospecha que comprende un ácido polinucleico según la invención es producida en un sistema recombinante y se determina la sensibilidad a un panel de fármacos antivirales de una actividad de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB expresada recombinantemente.

- 25 Estará claro para el experto en la técnica que un sistema de vectores que permita la replicación viral del VHB o que permita la producción de una proteína codificada de VHB, o una parte funcional de la misma, es apto para probar o ensayar el efecto de un fármaco antiviral en la replicación viral del VHB o la función de la proteína codificada de VHB (o de una parte de la misma), respectivamente. En particular, tales ensayos pueden llevarse a cabo con un ácido polinucleico del VHB mutante según la presente invención o con una ADN polimerasa del VHB mutante o una proteína HBsAg mutante según la presente invención. Los resultados de tales ensayos pueden ser comparados con resultados de ensayos similares llevados a cabo con ácidos polinucleicos del VHB de referencia o con proteínas de VHB de referencia o con partes funcionales de las mismas.

- 30 Un experto en la técnica apreciará que la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB tiene múltiples funciones biológicas/bioquímicas reconocidas, incluyendo actividad de la primasa, actividad de la transcriptasa inversa (actividad de la ADN polimerasa dependiente del ARN), actividad de la ADN polimerasa (actividad de la ADN polimerasa dependiente del ADN) y actividad de la RNAsa (RNAsa H), y que, además, está implicada en la interacción con la proteína antigénica central (HBcAg) y en la encapsidación del ADN viral. La ADN polimerasa de referencia o mutante del VHB puede ser aislada a partir de partículas de VHB presentes en el suero de un paciente o pueden ser producidas, por ejemplo, por una línea de células de hepatoma transformadas de forma estable. Alternativamente, dicha ADN polimerasa del VHB es expresada y producida en un sistema heterólogo (por ejemplo, *S. cerevisiae*) o usando un sistema de expresión de *Baculoviridae*, un sistema de traducción mitocondrial (según se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense nº 6.100.068) o en un sistema de células libres; por ejemplo, un lisado de reticulocitos de conejo acoplado a un sistema de transcripción-traducción (Li y otros, 1999). Pueden producirse mediante mutagénesis *in vitro* secuencias de ADN mutante de ADN polimerasa del VHB. Puede lograrse una purificación sustancial de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB producida si, por ejemplo, se introduce o se funde un epítipo heterólogo (por ejemplo, el epítipo FLAG, cf. *supra*) en dicha ADN

5 polimerasa/transcriptasa inversa del VHB. Dicho epítipo permite la purificación de la ADN polimerasa/transcriptasa
 10 inversa del VHB, por ejemplo, en una columna de afinidad que contiene anticuerpos inmovilizados contra epítipos
 15 heterólogos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-FLAG M2). Alternativamente, la polimerasa/transcriptasa
 20 inversa recombinante del VHB forma parte de la proteína de fusión, comprendiendo además dicha proteína de
 25 fusión, por ejemplo, una etiqueta de histidina, un resto de unión con hidratos de carbono (por ejemplo, una proteína
 30 de unión con lectina, maltosa) o β -galactosidasa. Puede lograrse una purificación sustancial de dicha proteína de
 35 fusión, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de metales (en caso de que esté presente una etiqueta de
 40 histidina), cromatografía de afinidad de hidratos de carbono (en caso de que esté presente un resto de unión a
 45 hidratos de carbono) o cromatografía de inmunoafinidad usando un anticuerpo contra la proteína fusionada a la ADN
 50 polimerasa/transcriptasa inversa del VHB; por ejemplo, la β -galactosidasa. Opcionalmente, dicha proteína de fusión
 es escindible mediante una proteasa adecuada (por ejemplo, el factor Xa de la proteasa), de modo que la ADN
 polimerasa/transcriptasa inversa del VHB sea obtenible separada del otro resto de la proteína de fusión; por ejemplo,
 mediante otra ronda de purificación, según se ha descrito *supra*. Alternativamente, se aíslan partículas virales de
 VHB de una muestra biológica mediante técnicas tales como la captura por afinidad (por ejemplo, usando
 anticuerpos contra el antígeno superficial viral del VHB o usando un receptor proteínico de dicho antígeno superficial
 o anticuerpos antiidiotípicos de dicho receptor proteínico; cf. *infra*) o centrifugación en gradiente. Las partículas
 virales del VHB obtenibles mediante estas u otras vías son también susceptibles de análisis, por ejemplo, de la ADN
 polimerasa/transcriptasa inversa del VHB o de los ácidos nucleicos del VHB.

20 En otra alternativa, el complejo central multiproteico de replicación o el núcleo de replicación intracelular son
 25 purificados a partir de células hepáticas infectadas y las preparaciones obtenidas, que comprenden la ADN
 30 polimerasa/transcriptasa inversa del VHB, son usadas para analizar las funciones y las actividades de la ADN
 35 polimerasa/transcriptasa inversa del VHB (Urban y otros, 2000). Está claro que puede aplicarse dicha purificación de
 40 partículas virales o del complejo central de replicación para obtener dichas partículas o el complejo central de células
 infectadas con variantes del VHB que comprenden la mutación o las mutaciones de la presente invención.

25 Se han descrito condiciones mejoradas para analizar la actividad de la transcriptasa inversa viral (Bird y Chang-Yeh
 en la patente estadounidense nº 5.817.457) e incluyen un pH ácido y temperaturas elevadas. Las condiciones de
 reacción para la actividad de análisis de la RNAsa H derivada de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB
 han sido descritas, por ejemplo, por Yoon y otros en la patente estadounidense nº 6.071.734. Las condiciones de
 ensayo para determinar la actividad de la primasa, la polimerasa y la transcriptasa inversa de ADN
 30 polimerasa/transcriptasa inversa del VHB, o fragmentos de la misma, producida *in vitro*, han sido descritas por Li y
 35 otros (Li y otros, 1999). Los ensayos para determinar la interacción entre proteínas, por ejemplo la interacción entre
 40 la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB y HBcAg, incluyen ensayos de doble y triple hibridación y el
 análisis de interacciones biomoleculares en tiempo real (Bartel y otros, 1997 y patente estadounidense nº
 5.928.868).

35 Otro aspecto adicional de la invención comprende un ensayo que determina el efecto de un fármaco antiviral sobre
 la función de una HBsAg mutante según la presente invención. Un experto en la técnica apreciará que la HBsAg del
 VHB tiene múltiples funciones biológicas/bioquímicas reconocidas, incluyendo funciones en la unión/entrada viral a
 la célula anfitriona (es decir, un papel en la infectividad del VHB), en el ensamblaje de partículas virales y en la
 40 secreción de partículas virales. Además, la HBsAg es una diana del sistema inmunológico del anfitrión y se han
 45 documentado mutantes "de escape". A menudo, se usa el anticuerpo contra HBsAg, HBIg, como medio de
 inmunización pasiva en pacientes que han sufrido un trasplante de hígado. Puede obtenerse HBsAg de referencia o
 mutante según se ha descrito *supra* para la ADN polimerasa del VHB. Alternativamente, se recupera la HBsAg
 mediante interacción por afinidad con anticuerpos contra la HBsAg o con una proteína receptora de HBsAg o con un
 anticuerpo antiidiotípico a dicha proteína receptora de HBsAg, incluyendo dichas proteínas receptoras
 50 documentadas albúmina humana monomérica y polimérica (Eibl y otros, en la patente estadounidense nº 5.576.175
 y Machida y otros, 1984, respectivamente) y endonexina II/anexina V (Yap en la patente europea nº EP 0672136).
 Pueden aislarse partículas virales de VHB y VHD (virus de la hepatitis delta) a partir de una muestra biológica
 mediante técnicas tales como la captura por afinidad; por ejemplo, usando anticuerpos contra el antígeno superficial
 viral del VHB o usando un receptor proteínico del antígeno superficial viral del VHB o anticuerpos antiidiotípicos del
 mismo.

55 En un aspecto alternativo de la invención, se estudia la actividad de una ADN polimerasa/transcriptasa inversa del
 VHB, incluyendo las ADN polimerasas/transcriptasas inversas del VHB mutante de la invención, o la sensibilidad de
 la misma a compuestos antivirales en células anfitrionas que contienen una mutación condicional en la ADN
 polimerasa endógena. Como tal, la expresión de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB puede rescatar
 60 posiblemente el crecimiento de dichas células anfitrionas mutantes en condiciones restrictivas. La sensibilidad de la
 ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB a compuestos antivirales puede ser estudiada midiendo el grado de
 crecimiento de dichas células anfitrionas mutantes en condiciones restrictivas y en presencia de un compuesto
 antiviral. Dicho crecimiento es comparado subsiguientemente con el crecimiento de dichas células anfitrionas en
 condiciones restrictivas y en ausencia de dicho compuesto antiviral.

60 En un aspecto alternativo adicional de la invención se incluye el uso de partículas de VHB mutante, incluyendo
 partículas de VHB que comprenden un ADN mutante según la presente invención, para infectar animales no

humanos que sean útiles como modelo para la infección del VHB humano o como modelo para evaluar compuestos, terapias y profilaxis contrarios al VHB. Dichos animales modélicos no humanos han sido descritos, por ejemplo, por Reisner en las patentes estadounidenses n^{os} 5.849.987 y 5.858.328. En lo que antecede se mencionan muchos fármacos antivirales contra el VHB (fármacos antivirales anti VHB).

- 5 Así, un aspecto adicional de la invención incluye un procedimiento para buscar fármacos activos contra un virus VHB que comprende un ácido polinucleico según la invención o que comprende una ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB según la invención, comprendiendo dicho procedimiento:
- a. medir la replicación de dicho VHB en ausencia de dicho fármaco;
 - 10 b. medir la replicación de dicho VHB en presencia de dicho fármaco;
 - c. inferir de (a) y (b) el efecto inhibitorio de dicho fármaco sobre la replicación de dicho VHB.

15 En una realización específica de la misma, dicho procedimiento comprende, además, la realización de las etapas (a), (b) y (c) con un virus VHB de referencia y comparar el efecto inhibitorio de dicho fármaco sobre la replicación de dicho virus VHB de referencia con el efecto inhibitorio de dicho fármaco en la replicación de dicho virus VHB que comprende un ácido polinucleico según la invención. En otra realización adicional de la misma se incluyen los procedimientos que, además, comprenden la obtención de dicho virus VHB a partir de una muestra biológica.

20 Otra realización adicional de la invención incluye un procedimiento para buscar fármacos activos contra un virus VHB que comprende un ácido polinucleico según la invención o que comprende una ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB según la invención, comprendiendo dicho procedimiento:

- a. medir la actividad de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de dicho virus VHB en ausencia de dicho fármaco;
- b. medir, como en (a), la misma actividad de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de dicho virus VHB en presencia de dicho fármaco;
- 25 c. inferir de (a) y (b) el efecto inhibitorio de dicho fármaco sobre dicha actividad de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de dicho virus VHB.

30 En una realización específica de la misma, se incluye el procedimiento que comprende, además, la realización de las etapas (a), (b) y (c) con un virus VHB de referencia y comparar el efecto inhibitorio de dicho fármaco sobre la actividad de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de dicho virus VHB de referencia con el efecto inhibitorio de dicho fármaco en dicha actividad de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de dicho virus VHB que comprende un ácido polinucleico según la invención. En otra realización adicional de la misma se incluyen los procedimientos que, además, comprenden la obtención de dicho virus VHB a partir de una muestra biológica. Con "una actividad de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa" se quiere decir una de las actividades, biológica o bioquímica, de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB, según se ha mencionado *supra*.

35 En una realización particular de la misma, tres pacientes (indicados como 1, 2 y 3) mono infectados con VHB, infectados con cepas del VHB resistentes a la lamivudina, no presentaron reacción virológica alguna al adefovir; un cambio de terapia al tenofovir dio como resultado una caída significativa de la carga viral de HB. Se aisló ADN del VHB y se amplificó el gen de la ADN polimerasa mediante PCR para su secuenciación. La secuenciación se llevó a cabo usando la reacción BigDye terminator. La genotipificación y los ensayos de resistencia a la lamivudina se realizaron con el ensayo INNO-LiPA o mediante secuenciación de productos de PCR según se detalla adicionalmente en los ejemplos.

40 El adefovir fue inútil en los tres pacientes. El análisis de secuenciación todas las cepas de VHB analizadas procedentes de los tres pacientes no reveló ningún intercambio de aminoácidos en las posiciones de resistencia al adefovir, o rt181, rt 217 o rt 236. Estos pacientes con VHB fueron infectados con VHB de genotipo D, acompañado por el inusual patrón del HBsAg de subtipo ayw4, es decir, el aminoácido sP/T127I, que es muy raro en la Europa central. Dichos pacientes con VHB presentaban los tres una mutación singular: rtI233V (véase la Figura 3).

45 Los presentes inventores describieron recientemente a tres pacientes coinfectados con VHB/VIH que no respondieron al adefovir virológicamente en el transcurso de 6 meses de tratamiento con respecto a la carga del VHB (Schildgen y otros, 2004). En estos casos de pacientes infectados de VIH, los presentes inventores identificaron mutaciones en una polimerasa no conservada de la región del VHB (aa rt217) que podría mediar la resistencia al adefovir. En estos casos, el VHB tenía genotipo A. En los 3 casos mono infectados descritos en la presente solicitud de patente, el genotipo del VHB fue el D y, notablemente, los tres pacientes tenían un virus con una mutación rtI233V. No se conoce aún la significación de este intercambio, pero la mutación rtN236T ha sido observada cerca en un caso en el que se desarrolló resistencia al adefovir (Angus y otros, 2003). En cambio, el intercambio rtV233I visto en los pacientes de los presentes inventores existía aun antes de la terapia con adefovir y, obviamente, era independiente de las mutaciones de resistencia a la lamivudina. Los tres casos de resistencia al adefovir documentados previamente por los inventores (Schildgen y otros, 2004) tenían una mutación L217R antes

de la terapia con adefovir. El paciente 1 tenía una mutación S219A cercana, pero los pacientes 2 y 3 tenían el tipo de referencia en esa región (véase la Figura 3).

Otra mutación previamente observada asociada con la resistencia al adefovir es A181V (Yang y otros, 2003), pero los pacientes de los presentes inventores no mostraban mutaciones en esa región.

- 5 Es posible que algunas cepas del VHB sean fundamentalmente resistentes al adefovir sin ninguna presión selectiva por parte del fármaco. La existencia de la mutación rt233V es independiente a la resistencia a la lamivudina, porque en el VHB del paciente 1 no estaba presente tal mutación al inicio de la terapia con adefovir, pero la viremia empezó a aumentar de inmediato con el tratamiento. Además, el HBeAg o el estado inmunológico no parecen ser importantes para la resistencia al adefovir, porque eran diferentes en los 3 pacientes. El rápido e intenso efecto del tenofovir en los tres pacientes sugiere que la falta de conformidad no fue la razón del fracaso de la terapia con adefovir.

- 10 En función de los datos de los presentes inventores, estos extraen las conclusiones de que (a) el dominio aa 215 a aa 236 de la polimerasa/transcriptasa inversa podría mediar la resistencia al adefovir, (b) la combinación de la resistencia a la lamivudina más el VHB, especialmente en el caso de los genotipos A o D, predestina la resistencia al adefovir, y (c) debería considerarse, verdaderamente, un cambio de terapia al tenofovir en caso de cepas del VHB resistentes al adefovir.

- 15 La invención implementa, además, anticuerpos y anticuerpos antiidiotípicos contra dichas variantes aisladas del VHB y/o dicho pequeño antígeno superficial viral del VHB aislado, o dichas partes del mismo, y/o dichos antígenos virales medianos y/o grandes del VHB. En una realización específica de la misma, dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En una realización específica adicional, dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanizados.

- 20 También se implementa en la invención el uso de dichos anticuerpos en procedimientos inmunológicos para detectar dichas variantes del VHB y/o dicho pequeño antígeno superficial viral del VHB, o dichas partes del mismo, y/o dichos antígenos virales medianos y/o grandes del VHB en una muestra biológica. En una realización específica de la misma, dichos anticuerpos se usan en un procedimiento para diagnosticar una infección del VHB. En una realización adicional, dichos anticuerpos forman parte de un *kit* de diagnóstico capaz de detectar una infección del VHB.

En otra realización de la invención se cubre el uso de un procedimiento de la invención o de un *kit* de diagnóstico de la invención para seguir la progresión de una infección del VHB.

- 30 Una realización adicional cubre el uso de un procedimiento de la invención o de un *kit* de diagnóstico de la invención para monitorizar la incidencia de la resistencia a un fármaco antiviral.

Otra realización adicional cubre el uso de un procedimiento de la invención o de un *kit* de diagnóstico de la invención para adaptar un régimen terapéutico contra el VHB, infección debida a la incidencia de resistencia a un fármaco antiviral.

- 35 Los "anticuerpos" incluyen anticuerpos de camello monoclonales, policlonales, sintéticos o de cadena pesada, así como fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos Fab, Fv o scFv. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales mediante técnicas como las descritas, por ejemplo, en Liddle y otros (Liddle y otros, 1991), que comprenden la fusión de células de mieloma murino con células de bazo extraídas de animales inmunizados. Además, los anticuerpos o los fragmentos de los mismos de una molécula o de fragmentos de la misma pueden ser obtenidos usando procedimientos como los descritos, por ejemplo, en Harlow y otros (Harlow y otros, 1988). En el caso de anticuerpos dirigidos contra péptidos pequeños, tales como los fragmentos de una proteína de la invención, dichos péptidos están generalmente acoplados a una proteína portadora antes de la inmunización de los animales. Tales proteínas portadoras incluyen la hemocianina de lapa californiana (KLH), la albúmina de suero bovino (ASB), la ovoalbúmina y el toxoide tetánico. La proteína portadora mejora la respuesta inmunológica del animal y proporciona epítomos para los sitios de unión de receptores de células T. Además, el término "anticuerpos" incluye derivados de los mismos, tales como los anticuerpos marcados. Generalmente, los anticuerpos pueden ser macados de forma radiactiva, quimioluminiscente, fluorescente, fosforescente, con tinciones infrarrojas o con una marca Raman de superficie mejorada o partículas resonantes de plasmón. Las marcas de anticuerpos incluyen fosfatasa alcalina, PKH2, PKH26, PKH67, fluoresceína (FITC), Hoechst 33258, R-ficoeritrina (FE), rodamina (TRITC), Quantum Red®, Texas Red®, Cy3®, biotina, agarosa, peroxidasa y esferas de oro. Herramientas de biología molecular que se valen de anticuerpos contra una proteína incluyen el análisis proteínico por transferencia en gel, la búsqueda de bibliotecas de expresión permitiendo la identificación de genes, procedimientos de cuantificación de proteínas, incluyendo ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo) y LIA (inmunoensayo lineal), purificación de proteínas por afinidad, inmunoprecipitación de proteínas e inmunolocalización de proteínas.

- 55 Los ejemplos siguientes únicamente sirven para ilustrar la presente invención. De ninguna forma se pretende que estos ejemplos limiten el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Material y procedimientos: Aislamiento y secuenciación del ADN del VHB

5 Se aisló ADN del VHB a partir de suero con el *kit* de ADN viral (Qiagen) según la instrucción del fabricante. Se amplificó mediante PCR el gen de la ADN polimerasa para su secuenciación. El protocolo usado fue adoptado de Allen y otros 1998. Los cebadores usados para la amplificación fueron P1F (GGA TGT GTC TGC GGC GTT T, ID SEC 28) y P1R (ACC CCA TCT TTT TGT TTT GTT AGG, ID SEC 29). La PCR se llevó a cabo con la polimerasa *Taq* Qiagen-HotStar usando los reactivos suministrados por el fabricante y siguiente el siguiente perfil de temperaturas: 93°C, 12 min, 95°C, 30 seg, 65°C, 45 seg, 72°C, 3 min, 45× 95°C, 30 seg, 60°C, 45 seg, 72°C, 3 min, 95°C, 30 seg, 55°C, 45 seg, 72°C, 3 min, 72°C, 10 min.

10 La secuenciación se llevó a cabo usando la reacción BigDye terminator (Applied Biosystems) con cebadores P1F y P1R, respectivamente. La genotipificación y los ensayos de resistencia a la lamivudina se realizaron con el ensayo INNO-LiPA (Innogenetics) siguiendo el protocolo incluido.

15 Alternativamente, el ADN del VHB fue extraído del suero y amplificado en la región TI, según se ha descrito (Schaefer y otros, 2003), usando un cebador codificante 374-390 TGGATGTGTCTGCGGC, ID SEC 30 y cebador no codificante 995-973 CKTTGACADACTTTCCAATCAATAG, ID SEC 31. Los productos de la PCR purificados en gel fueron secuenciados por MWG Biotech, Ebersberg, Alemania, en ambas direcciones. Alternativamente, la secuenciación se realizó según describen Schildgen y otros (2004).

Ejemplo 1: Estudio del caso del paciente 1

20 El paciente 1, un varón caucásico de 52 años, llevaba más de 5 años padeciendo hepatitis B crónica. Había recibido una terapia fallida con PegIntron y, después, una terapia inicialmente efectiva con 100 mg/d LMV que suprimió la viremia hasta niveles < 200 genomas/ml. Sin embargo, en menos de tres meses la viremia aumentó hasta $2,5 \times 10^7$ ge/ml (véase la Figura 1). Después de un intervalo sin terapia, se administraron 100 mg/d del inhibidor de la TI y medicación tenofovir (TDF) autorizada contra el VHB como fármaco experimental con el virus de la hepatitis B durante 9 meses y la viremia disminuyó en menos de 3 meses de $5,5 \times 10^7$ ge/ml a 740 ge/ml y permaneció a niveles similares otros 6 meses. La mutación de resistencia a la lamivudina en el dominio de la transcriptasa inversa de la metionina 204 a la isoleucina rtM204V ya había revertido al tipo de referencia (wt) antes de la terapia con tenofovir (véase la Figura 3). Después, se sustituyó el TDF con 10 mg/d de ADF, inhibidor de la TI, porque este fármaco había sido autorizado entre medias para la terapia de la hepatitis B crónica. Sin embargo, con esta terapia la viremia aumentó inmediatamente desde 550 ge/ml y en menos de 7 meses alcanzó $1,5 \times 10^6$ ge/ml. La sustitución de ADF por TDF volvió a dar como resultado una disminución significativa de la viremia hasta 17.000 ge/ml. El paciente tuvo niveles de ALT normales o ligeramente elevados. Era anti-HBe positivo con una secuencia precentral, pero con mutaciones promotoras centrales T1753C, A1762T y G1764A, que se sabe que están asociadas negativamente con el HBeAg.

Ejemplo 2: Estudio de los casos de los pacientes 2 y 3

35 Los pacientes 2 y 3 son un matrimonio. El marido, un varón caucásico de 56 años, había recibido un trasplante de hígado en 1993 por una enfermedad alcohólica hepática y se infectó de VHB durante el seguimiento. Estuvo bajo supresión inmunitaria constante. Se descubrió que su esposa (caucásica, 52 años, paciente 3) se infectó de VHB de forma crónica en 1994. Las secuencias genómicas de sus VHB eran muy similares, pero él tenía un mutante precentral negativo con el codón finalizador mutante G1896A como variante predominante, mientras que ella solo tenía el tipo de referencia; sin embargo, ambos eran HBeAg positivos. Ambos recibieron lamivudina y su viremia cayó inicialmente de $>10^7$ ge/ml hasta niveles $<10^5$ ge/ml, pero al final se desarrolló resistencia y la viremia volvió a aumentar (véase la Figura 1). Ambos tenían la mutación rtM204I asociada con la resistencia a la lamivudina y ella, además, tenía la rtV173L (véase la Figura 3). Se sustituyó la lamivudina con adefovir, pero no fue efectivo. Con el paciente 2 la viremia aumentó con la terapia; con la paciente 3 siguió muy alta. El tenofovir llevó a una rápida disminución de $>5 \times 10^8$ ge/ml a 780 ge/ml para el paciente 2 y de $4,5 \times 10^7$ a 29.000 ge/ml para la paciente 3.

Ejemplo 3: Efecto de la terapia antiviral y secuencias de nucleótidos

50 Después de aproximadamente 18 meses de terapia con lamivudina, la carga viral aumentó debido a las mutaciones de resistencia a la lamivudina (rtM204I para los pacientes 2 y 3). Por lo tanto, se introdujo adefovir en el régimen de fármacos. Sorprendentemente, aunque no se observó ninguna de las mutaciones que hasta ahora se sabía o se sospechaba que mediaban la resistencia al adefovir: rtA181V (Yang y otros, 2003), rtN236T (Angus y otros, 2003), rtL217R (Schildgen y otros, 2004), véase *supra*, los pacientes no presentaron tan siquiera una respuesta inicial a este fármaco. En vez de ello, se identificó una mutación común en la posición codónica 233 (I⇒V), que puede mediar la resistencia al fármaco. La falta de respuesta inicial al adefovir puede estar causada por el hecho de que la mutación ya estuviera presente cuando comenzó la terapia con adefovir (Figura 3).

55 **Ejemplo 4: Ensayo y confirmación *in vitro* de la resistencia al adefovir mediada por rtI233V**

Para determinar si el intercambio de rtI223V por sí solo es necesario y suficiente para mediar la resistencia del VHB al adefovir, se mutó la isoleucina 233 del vector plasmídico pTHBV1.3 para el genotipo D del VHB del tipo de referencia (wt) (Guidotti y otros, 1995) a valina mediante mutagénesis dirigida al sitio usando el par de cebadores codificante 5'-CTT TTG TCT TTG GGT gTA CAT TTA AAC CCT AAC-3" (ID SEC n° 32) y no codificante 5'- GTT AGG GTT TAA ATG TAc ACC CAA AGA CAA AAG-3 (ID SEC n° 33). La introducción de la mutación con éxito fue confirmada mediante secuenciación. Se transfectó la línea celular C3A subclonal de HepG2 (de ATCC, RockvilleUSA) que crecía en placas de cultivo celular de 6 pocillos con una densidad del 50% con 12 µg del plásmido wt o mutado. Al día siguiente, las células fueron transferidas a placas de cultivo celular de 12 pocillos. Para eliminar el ADN introducido, las células fueron tratadas con 100 µg/mL ADNasa I (Roche) a 37°C durante 2 h.

Dos días después de la transfección, las células fueron tratadas con adefovir, tenofovir (Moravek, Brea, California) o lamivudina a concentraciones que oscilaban entre 0,1 µM y 10 µM. Se renovaba diariamente un medio complementado con los fármacos. En el día 6 se recogieron células y los sobrenadantes del cultivo celular. Los intermediarios replicativos del ADN del VHB fueron extraídos según describen Summers y otros, (1990), sometidos a transferencia de Southern (Rang y otros, 2002) e hibridados con una sonda marcada con P³² con el Ready Prime Labelling System (Amersham, Reino Unido) a partir de un fragmento del ADN del VHB de longitud completa. La cantidad de ADN del VHB disminuyó significativamente en las células tratadas (Figura 4). Con el wt, se obtuvo un 50% de inhibición a aproximadamente 0,5 µM de adefovir, lo que es ligeramente más elevado que lo descrito por Yang y otros (2002), pero inferior a los hallazgos de Brunelle y otros (2005). La variante rt233I requirió concentraciones aproximadamente 6 veces mayores de adefovir para una inhibición similar. Esto supera a las variaciones que han sido descritas anteriormente entre cepas que se dan en la naturaleza (Yang y otros (2002)). En cambio, la eficacia del tenofovir y la lamivudina no fue significativamente diferente con el wt o la variante. La lamivudina fue, con mucho, el fármaco más eficaz en este sistema *in vitro*.

El medio de cultivo celular fue digerido con proteinasa K y sometido a PCR usando el siguiente cebador subgenómico: F1 5'-CTC CAG TTC AGG AAC AGT AAA CCC-3' (ID SEC n° 34) y el correspondiente cebador inverso R1 5'-TTG TGA GCT CAG AAA GGC CTT GTA AGT TGG CG-3' (ID SEC n° 35). Diluciones en serie de un genoma clonado del VHB sirvieron para la calibración del ensayo de PCR. Los productos amplificados fueron analizados en un gel de agarosa tincionado con bromuro de etidio (Figura 5) y cuantificados usando el Fluor-S Multilmager (Biorad) y el soporte lógico Quantity One (datos no mostrados). La cantidad de ADN del VHB wt liberado disminuyó intensamente en aproximadamente un 80% con 1 µM de adefovir, mientras que la cantidad de la variante disminuyó en solo un 10%. En este ensayo, la variante requirió una concentración de adefovir aproximadamente 10 veces mayor que el wt para el mismo grado de inhibición. Estos datos *in vitro* sugieren que el intercambio de I a V en la posición rt 233 causó la resistencia al adefovir *in vivo*.

El intercambio rtI233V ya existía antes de que se iniciara la terapia con adefovir. Era independiente de la resistencia a la lamivudina, dado que en el paciente 1 no había presente ninguna mutación de resistencia a la lamivudina al inicio de la terapia con adefovir. Ni el estado HBe ni el estado inmunológico parecen ser importantes para la resistencia al adefovir, dado que eran diferentes en los 3 pacientes. Además, la variante rt233V fue estable durante el periodo de observación de los tres pacientes (es decir, hasta 220 semanas) incluso sin presión selectiva de la terapia con adefovir.

Referencias

- Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DLJ y otros Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine; (1998) *Hepatology* 27(6), 1670-1677.
- Angus P. y otros Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* (2003) 125(2): 292-297.
- Arguello, J.R., Little, A.M., Pay, A.L., Gallardo, D., Rojas, I., Marsh, S.G., Goldman, J.M. & Madrigal, J.A. (1998) *Nat Genet* 18, 192-194.
- Bartel, P.L. & Fields, S. (1997) *The yeast two-hybrid system*. Oxford University Press.
- Beaucage, S.L. (2001) *Curr Med Chem* 8, 1213-1244.
- Benhamou Y. y otros Antiretroviral therapy and HIV/hepatitis B virus coinfection. *Clin. Infect. Dis.* (2004) 38 Suppl 2:S98-103.
- Benhamou Y. y otros Safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients co-infected with HIV-1 and lamivudine-resistant hepatitis B virus: an open-label pilot study. *Lancet* (2001) 358: 718-723.
- Benhamou Y. y otros Tenofovir disoproxil fumarate in patients with HIV and lamivudine-resistant hepatitis B virus. *N. Engl. J. Med.* (2003) 348(2):177-178.

- Brunnelle MN, Jacquard AC, Pichoud C, Durantel D, Carrouée-Durantel S, Villeneuve JP, Trépo C, Zoulim F. (2005) Susceptibility to antiviral of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir. *Hepatology* 41,1391-8.
- 5 Day, I.N., Spanakis, E., Palamand, D., Weavind, G.P. & O'Dell, S.D. (1998) *Trends.Biotechnol.* 16, 287-290
- De Clercq, E. (1999) *Int.J Antimicrob Agents* 12, 81-95.
- Delaney, W.E., Miller, T.G. & Isom, H.C. (1999) *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2017-2026.
- 10 Delwart, E.L., Sheppard, H.W., Walker, B.D., Goudsmit, J. & Mullins, J.I. (1994) *J Virol* 68, 6672-6683.
- Delwart, E.L., Shpaer, E.G., Louwagie, J., McCutchan, F.E., Grez, M., Rubsamen-Waigmann, H. & Mullins, J.I. (1993) *Science* 262, 1257-1261.
- 15 Dore G.J. y otros Efficacy of tenofovir disoproxil fumarate in antiretroviral therapy-naive and - experienced patients coinfectd with HIV-1 and hepatitis B virus. *J. Infect. Dis.* (2004) 189(7):1185-1192.
- Drmanac, R., Drmanac, S., Strezoska, Z., Paunesku, T., Labat, I., Zeremski, M., Snoddy, J., Funkhouser, W.K., Koop, B. & Hood, L. (1993) *Science* 260, 1649-1652.
- 20 Fu, L. & Cheng, Y.C. (2000) *Antimicrob Agents Chemother* 44, 3402-3407.
- Griffin, T.J. & Smith, L.M. (2000) *Trends.Biotechnol.* 18, 77-84.
- 25 Guidotti LG, Matzke B, Schaller H, Chisari FV (1995). High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol.*, 69, 6158-69.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 30 Huber, C.G., Premstaller, A., Xiao, W., Oberacher, H., Bonn, G.K. & Oefner, P.J. (2001) *J Biochem Biophys Methods* 47, 5-19.
- Jarvis, B. & Faulds, D. (1999) *Drugs* 58, 101-141.
- 35 Knodell, R.G., Ishak, K.G., Black, W.C., Chen, T.S., Craig, R., Kaplowitz, N., Kiernan, T.W. & Wollman, J. (1981) *Hepatology* 1, 431-435.
- Korkko, J., Annunen, S., Pihlajamaa, T., Prockop, D.J. & Ala-Kokko, L. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1681-1685.
- 40 Kosovsky, M.J., Khaoustov, V.I., Rushton, M. & Yoffe, B. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1490, 63-73.
- Kristensen, V.N., Kelefiotis, D., Kristensen, T. & Borresen- Dale, A.L. (2001) *Biotechniques* 30, 318-22, 324, 326.
- 45 Li, Z. & Tyrrell, D.L. (1999) *Biochem Cell Biol* 77, 119-126.
- Liddle, J.E. & Cryer, A. (1991) *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies.* Wiley, Nueva York.
- 50 Lok, A.S. (1994) *J Viral.Hepat.* 1, 105-124.
- Lu, X., Block, T.M. & Gerlich, W.H. (1996) *J Virol* 70, 2277-2285.
- Lu, X., Hazboun, T. & Block, T. (2001) *Virus Res* 73, 27-40.
- 55 Luscombe, C.A. & Locarnini, S. (1996) *Viral hepatitis reviews* 2, 1-35.
- Machida, A., Kishimoto, S., Ohnuma, H., Baba, K., Ito, Y., Miyamoto, H., Funatsu, G., Oda, K., Usuda, S. & Togami, S. (1984) *Gastroenterology* 86, 910-918.
- 60 Maxam, A.M. & Gilbert, W. (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 560-564.
- Meller, A., Nivon, L., Brandin, E., Golovchenko, J. & Branton, D. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1079-1084.
- 65 Narayanaswami, G. & Taylor, P.D. (2001) *Genet Test.* 5, 9-16.

- Nielsen, P.E. (2001) *Curr Med Chem* 8, 545-550.
- Ogata N., Fujii K., Takigawa S., Nomoto M., Ichida T. & Asakura H. (1999) *J. Med. Virol.* 59, 270-276.
- 5 Ono, S.K., Kato, N., Shiratori, Y., Kato, J., Goto, T., Schinazi, R.F., Carrilho, F.J. & Omata, M. (2001) *J Clin Invest* 107, 449-455.
- Orum, H. & Wengel, J. (2001) *Curr Opin.Mol.Ther.* 3, 239-243.
- 10 Paran, N., Geiger, B. & Shaul, Y. (2001) *EMBO J* 20, 4443-4453.
- Perrillo R. y otros Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* (2004) 126(1):81-90.
- 15 Peters M.G. y otros Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudineresistant chronic hepatitis B. *Gastroenterology* (2004) 126(1):91-101.
- Rang A, Bruns M, Heise T, Will H. (2002) Antiviral activity of interferon-alpha against hepatitis B virus can be studied in non-hepatic cells and is independent of MxA. *J Biol Chem.* 277, 7645-7.
- 20 Resch, W., Parkin, N., Stuelke, E.L., Watkins, T. & Swanstrom, R. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 176-181.
- Ruano, G. & Kidd, K.K. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2815-2819.
- Saiki, R.K., Walsh, P.S., Levenson, C.H. & Erlich, H.A. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6230-6234.
- 25 Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schaefer y otros (2003) *J Clin Virol* 2003 27, 30-37.
- 30 Schildgen O, Schewe CK, Vogel M y otros (2004) Successful therapy of hepatitis B with tenofovir in HIVinfected patients failing previous adefovir and lamivudine treatment. *AIDS* 18, 2325-2327.
- Schinazi, R. (1997) in *Viral hepatitis and liver disease* (Rizzetto, M., Purcell, R., Gerin, J. & Verme, G., eds.), Impact of nucleosides on hepatitis virus. pp. 736-742, Minerva Medica, Turin.
- 35 Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R.F. & Rossau, R. (2000) *J Gen.Virol* 81 Pt 1, 67-74.
- Stuyver, L., Wyseur, A., Rombout, A., Louwagie, J., Scarcez, T., Verhofstede, C., Rimland, D., Schinazi, R.F. & Rossau, R. (1997) *Antimicrob Agents Chemother* 41, 284-291.
- 40 Stuyver, L., Wyseur, A., van Arnhem, W., Hernandez, F. & Maertens, G. (1996) *J Clin Microbiol* 34, 2259-2266.
- Stuyver, L.J., Locarnini, S.A., Lok, A., Richman, D.D., Carman, W.F., Dienstag, J.L. & Schinazi, R.F. (2001) *Hepatology* 33, 751-757.
- 45 Summers J., Mason W. *Cell* (1982) 29: 403-415.
- Summers J, Smith PM, Horwich AL. (1990) Hepadnavirus envelope proteins regulate covalently closed circular DNA amplification. *J Virol.* 64, 2819-24.
- Urban, S. & Tyrrell, D.L. (2000) *Antiviral Res* 45, 185-197.
- 55 Wahlestedt, C., Salmi, P., Good, L., Kela, J., Johnsson, T., Hokfelt, T., Broberger, C., Porreca, F., Lai, J., Ren, K., Ossipov, M., Koshkin, A., Jakobsen, N., Skouv, J., Oerum, H., Jacobsen, M.H. & Wengel, J. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5633-5638.
- Westland CE y otros Week 48 resistance surveillance in two phase 3 clinical studies of adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *Hepatology* (2003) 38(1): 96-103.
- 60 Xiao, W. & Oefner, P.J. (2001) *Hum Mutat* 17,439-474.
- Yager, T.D., Baron, L., Batra, R., Bouevitch, A., Chan, D., Chan, K., Darasch, S., Gilchrist, R., Izmailov, A., Lacroix, J.M., Marchelleta, K., Renfrew, J., Rushlow, D., Steinbach, E., Ton, C., Waterhouse, P., Zaleski, H., Dunn, J.M. & Stevens, J. (1999) *Electrophoresis* 20, 1280-1300.
- 65

Yang H. y otros Complete Genotypic and Phenotypic Analyses of HBV Mutations Identified in HBeAg-negative Chronic Hepatitis B Patients Receiving 96 Weeks of Adefovir Dipivoxil (ADV). *Hepatology* (2003) 38: 705A, C.T., Chien, R.N., Chu, C.M. & Liaw, Y.F. (2000) *Hepatology* 31, 1318-1326.

- 5 Yang H, Westland C, Xiong S, Delaney IV WE. In vitro antiviral susceptibility of full-length clinical hepatitis B virus isolates cloned with a novel expression vector. *Antivir Res.* (2002) 61, 27-36.

REIVINDICACIONES

1. Una variante aislada del VHB que comprende al menos la mutación de un nucleótido en el gen de la ADN polimerasa en la posición codónica 233 según el esquema de numeración independiente del genotipo para la polimerasa del HBV, lo que da como resultado una sustitución de una isoleucina por valina, I233V.
- 5 2. Una variante aislada del VHB según la reivindicación 1 en la que dicha variante presenta una sensibilidad disminuida a un análogo nucleósido, salvo tenofovir.
3. Una variante aislada del VHB según la reivindicación 2 en la que dicha variante presenta una sensibilidad disminuida al análogo nucleósido adefovir y/o a la lamivudina.
- 10 4. Una variante aislada del VHB según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende una o más mutaciones adicionales de nucleótidos en el gen de la ADN polimerasa escogidos del grupo constituido de un nucleótido en el codón 173, en el codón 204 y en el codón 219 en la que dicha mutación adicional de nucleótidos en la posición codónica 173 del gen de la polimerasa da como resultado la sustitución del aminoácido valina por cualquier aminoácido distinto de la valina; en la posición codónica 204 del gen de la polimerasa da como resultado la sustitución del aminoácido metionina por cualquier aminoácido distinto de la metionina; y en la posición codónica 15 219 del gen de la polimerasa da como resultado la sustitución del aminoácido serina por cualquier aminoácido distinto de la serina.
5. Una variante aislada del VHB según la reivindicación 4 en la que dicha mutación adicional de nucleótidos en el codón 204 da como resultado la sustitución del aminoácido metionina por isoleucina; en el codón 173 da como resultado la sustitución del aminoácido valina por leucina; y en el codón 219 da como resultado la sustitución del aminoácido serina por alanina.
- 20 6. Un ácido polinucleico aislado del VHB obtenido de una variante del VHB según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende una mutación de nucleótidos que da como resultado una sustitución del aminoácido en la posición codónica 233 de isoleucina a valina, I233V, o un fragmento de dicho ácido polinucleico del VHB que comprenda dicha mutación de nucleótidos.
- 25 7. Un ácido polinucleico aislado del VHB según la reivindicación 6 que comprende una mutación adicional de nucleótidos que afecta a la posición codónica 204 del gen de la ADN polimerasa en la variante del VHB y da como resultado la sustitución del aminoácido metionina por cualquier aminoácido distinto de la metionina, o un fragmento de dicho ácido polinucleico del VHB que comprenda las mutaciones de nucleótidos.
- 30 8. Un ácido polinucleico aislado del VHB según la reivindicación 7 que comprende una mutación de nucleótidos que da como resultado la sustitución rI233V en el dominio D del gen de la ADN polimerasa en la variante del VHB, y una mutación de nucleótidos que da como resultado la sustitución rM204I en el dominio C del gen de la ADN polimerasa en la variante del VHB, o un fragmento de dicho ácido polinucleico del VHB que comprenda las mutaciones de nucleótidos.
- 35 9. Un ácido polinucleico aislado del VHB según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 que comprende un ácido polinucleico escogido del grupo que consiste en las ID SEC 1, ID SEC 2, ID SEC 3, ID SEC 4, ID SEC 5, ID SEC 6, ID SEC 7, ID SEC 8, ID SEC 9 e ID SEC 10.
10. Un producto de expresión del VHB proveniente de un ácido polinucleico aislado del VHB o cualquier fragmento del mismo según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
- 40 11. Un producto de expresión del VHB según la reivindicación 10 que comprende un ácido poliámico escogido del grupo que consiste en las ID SEC 11, ID SEC 12, ID SEC 13, ID SEC 14, ID SEC 15, ID SEC 16, ID SEC 17, ID SEC 18, ID SEC 19 e ID SEC 20.
12. Una composición que comprende una variante aislada del VHB según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 45 13. Una composición que comprende un ácido polinucleico aislado del VHB o cualquier fragmento del mismo según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
14. Una composición que comprende un producto de expresión del VHB según se describe en las reivindicaciones 10 u 11.
- 50 15. El uso de una variante aislada del VHB según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un ácido polinucleico aislado del VHB según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o un producto de expresión del VHB según se describe en las reivindicaciones 10 u 11 o una composición según se describe en las reivindicaciones 12 o 13, en un procedimiento para la selección de al menos un fármaco contra el VHB sin resistencia cruzada.

16. El uso de una variante aislada del VHB según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un ácido polinucleico aislado del VHB según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 o un producto de expresión del VHB según se describe en las reivindicaciones 10 u 11 o una composición según se describe en las reivindicaciones 12 o 13, en un procedimiento para la detección de una variante del VHB.
- 5 17. El uso de tenofovir para la fabricación de una composición farmacéutica para curar a un sujeto infectado con una variante aislada del VHB según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, VHB que es resistente a la lamivudina y/o al adefovir.
18. Un procedimiento para detectar la presencia de una variante del VHB según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de detección de la presencia de la mutación que da como resultado una sustitución de aminoácido en la posición codónica 233 de isoleucina a valina en un ácido polinucleico o un fragmento del mismo según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
- 10 19. Un procedimiento según la reivindicación 18 que comprende:
- 15 a. obtener un ácido polinucleico del VHB diana a partir de dicha muestra biológica, sospechándose que dicho ácido polinucleico del VHB diana comprende un codón 233 codificador de valina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, y consistiendo opcionalmente uno o más de los codones escogidos del grupo consistente en un codón 173 codificador de leucina, un codón 204 codificador de isoleucina o un codón 204 codificador de valina o un codón 204 codificador de serina, un codón 219 codificador de alanina, un codón 180 codificador de metionina, un codón 181 codificador de valina, un codón 217 codificador de arginina y un codón 236 codificador de treonina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB de un virus VHB;
- 20 b. obtener la secuencia de ácidos nucleicos del ácido polinucleico del VHB diana de (a);
- 25 c. inferir, a partir de la secuencia de ácidos nucleicos obtenida en (b), la presencia de dicho codón 233 codificador de valina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, y opcionalmente uno o más codones escogidos del grupo mencionado en (a) y, a partir de ello, la presencia de dicho virus VHB en dicha muestra biológica y/o dicha resistencia a un fármaco antiviral de un virus VHB presente en dicha muestra biológica.
20. Un procedimiento según la reivindicación 19 que comprende:
- 30 a. obtener un ácido polinucleico del VHB diana presente en dicha muestra biológica y/u obtener la secuencia de nucleótidos del mismo;
- b. cuando sea apropiado, desnaturalizar parcial o completamente, o modificar enzimáticamente los ácidos polinucleicos obtenidos en la etapa (a);
- 35 c. cuando sea apropiado, renaturalizar los ácidos polinucleicos desnaturalizados obtenidos en la etapa (b), preferentemente en presencia de al menos un oligonucleótido que tiene secuencias de nucleótidos complementarias sustancialmente homólogas capaces de discriminar, en función de la hibridación, en un ácido polinucleico del VHB o un fragmento del mismo, entre un codón 233 codificador de valina en el dominio de la transcriptasa inversa del VHB y un codón 233 que codifica una isoleucina en el dominio de la transcriptasa inversa del VHB, y, si hace falta, incluir la etapa de modificación enzimática, incluyendo la extensión, de dicho oligonucleótido;
- 40 d. cuando sea apropiado, detectar los ácidos polinucleicos del VHB parcial o completamente desnaturalizados obtenidos en la etapa (b), y/o de los híbridos formados en la etapa (c), y/o de las modificaciones enzimáticas obtenidas en las etapas (b) y/o (c);
- 45 e. inferir, a partir de uno o más de los datos de los grupos siguientes: los ácidos polinucleicos parcial o completamente desnaturalizados, los híbridos, las modificaciones enzimáticas, todos detectados en la etapa (d), y de la secuencia de nucleótidos obtenida en (a), la presencia de dicho VHB en dicha muestra biológica y/o dicha resistencia a un fármaco antiviral de un VHB presente en dicha muestra biológica.
- 50 21. El procedimiento de detección de la presencia de una variante del VHB según la reivindicación 18 que comprende:
- 55 a. obtener un ácido polinucleico del VHB diana a partir de dicha muestra biológica, sospechándose que dicho ácido polinucleico del VHB diana comprende un codón 233 codificador de valina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, y opcionalmente con uno o más de los codones escogidos del grupo consistente en un codón 173 codificador de leucina, un codón 204 codificador de isoleucina o un codón 204 codificador de valina o un codón 204 codificador de serina, un codón 219 codificador de alanina, un codón 180 codificador de metionina, un codón 181 codificador de valina, un codón 217 codificador de arginina y un codón 236 codificador de treonina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB de un VHB;

- b. poner en contacto el ácido polinucleico del VHB diana de (a) con un oligonucleótido que tenga secuencias de nucleótidos complementarias sustancialmente homólogas capaces de discriminar, en función de la hibridación, entre un codón 233 que codifica una isoleucina y un codón 233 que codifica una alanina o una valina, y opcionalmente también capaz de discriminar, en uno o más codones escogidos del grupo, entre un codón 173 que codifica una valina y un codón 173 que codifica una leucina, entre un codón 204 que codifica una metionina y un codón 204 que codifica un aminoácido escogido del grupo que consiste en isoleucina, valina y serina, entre un codón 219 que codifica una serina y un codón 219 que codifica una alanina, entre un codón 180 que codifica una leucina y un codón 180 que codifica una metionina, entre un codón 181 que codifica una alanina y un codón 181 que codifica una valina, entre un codón 217 que codifica una leucina y un codón 217 que codifica una arginina y entre un codón 236 que codifica una asparagina y un codón 236 que codifica una treonina;
- c. inferir, a partir de la señal discriminatoria obtenida en (b), la presencia de dicho codón 233 codificador de valina de la transcriptasa inversa del VHB, opcionalmente junto con dicho codón 173 codificador de leucina o dicho codón 219 codificador de alanina o dicho codón 180 codificador de metionina, o dicho codón 181 codificador de valina o dicho codón 204 codificador de isoleucina o dicho codón 204 codificador de valina o dicho codón 204 codificador de serina, o dicho codón 217 codificador de arginina o dicho codón 236 codificador de treonina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB de un VHB; y, a partir de ello, la presencia de dicho VHB en dicha muestra biológica y/o dicha resistencia a un fármaco antiviral de un virus VHB presente en dicha muestra biológica.
22. Un *kit* de diagnóstico para detectar la presencia de una variante del VHB en una muestra biológica y/o para detectar resistencia a un fármaco antiviral de un VHB presente en una muestra biológica, comprendiendo dicho *kit* un medio para detectar la presencia de la mutación resultante en una sustitución en la posición codónica 233 del aminoácido isoleucina por valina en un ácido polinucleico según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9.
23. Un *kit* de diagnóstico según la reivindicación 22 que comprende:
- a. un medio para inferir —a partir de la secuencia de ácidos nucleicos de un ácido polinucleico diana que se sospecha que comprende un codón 233 codificador de valina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, opcionalmente junto con uno o más de los codones escogidos del grupo consistente en un codón 173 codificador de leucina, un codón 204 que codifica un aminoácido escogido del grupo que consiste en isoleucina, valina y serina, un codón 219 codificador de alanina, un codón 180 codificador de metionina, un codón 181 codificador de valina, un codón 217 codificador de arginina y un codón 236 codificador de treonina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB— la presencia de dicho codón 233 codificador de valina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, opcionalmente junto con uno o más codones del grupo que consiste en dicho codón 173 codificador de leucina, dicho codón 204 codificador de isoleucina o dicho codón 204 codificador de valina o dicho codón 204 codificador de serina, dicho codón 219 codificador de alanina, dicho codón 180 codificador de metionina, dicho codón 181 codificador de valina, un codón 217 codificador de arginina y un codón 236 codificador de treonina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB; y, a partir de ello, la presencia en dicha muestra biológica de dicho virus VHB y, opcionalmente,
- b. un medio para obtener la secuencia de ácidos nucleicos del ácido polinucleico diana.
24. Un *kit* de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 22 y 23 que comprende un oligonucleótido capaz de discriminar entre un codón 233 que codifica una valina y un codón 233 que codifica una isoleucina.
25. Un procedimiento para buscar fármacos activos contra un VHB que comprende un ácido polinucleico según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 que comprende:
- a. medir la replicación de dicho VHB en ausencia de dicho fármaco;
- b. medir la replicación de dicho VHB en presencia de dicho fármaco;
- c. inferir de (a) y (b) el efecto inhibitorio de dicho fármaco sobre la replicación de dicho VHB.
26. Un oligonucleótido que tiene secuencias de nucleótidos complementarias sustancialmente homólogas capaces de discriminar, en función de la hibridación, en un ácido polinucleico del VHB o un fragmento del mismo, según se ha descrito en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, entre un codón 233 que codifica una valina y un codón 233 que codifica una isoleucina.

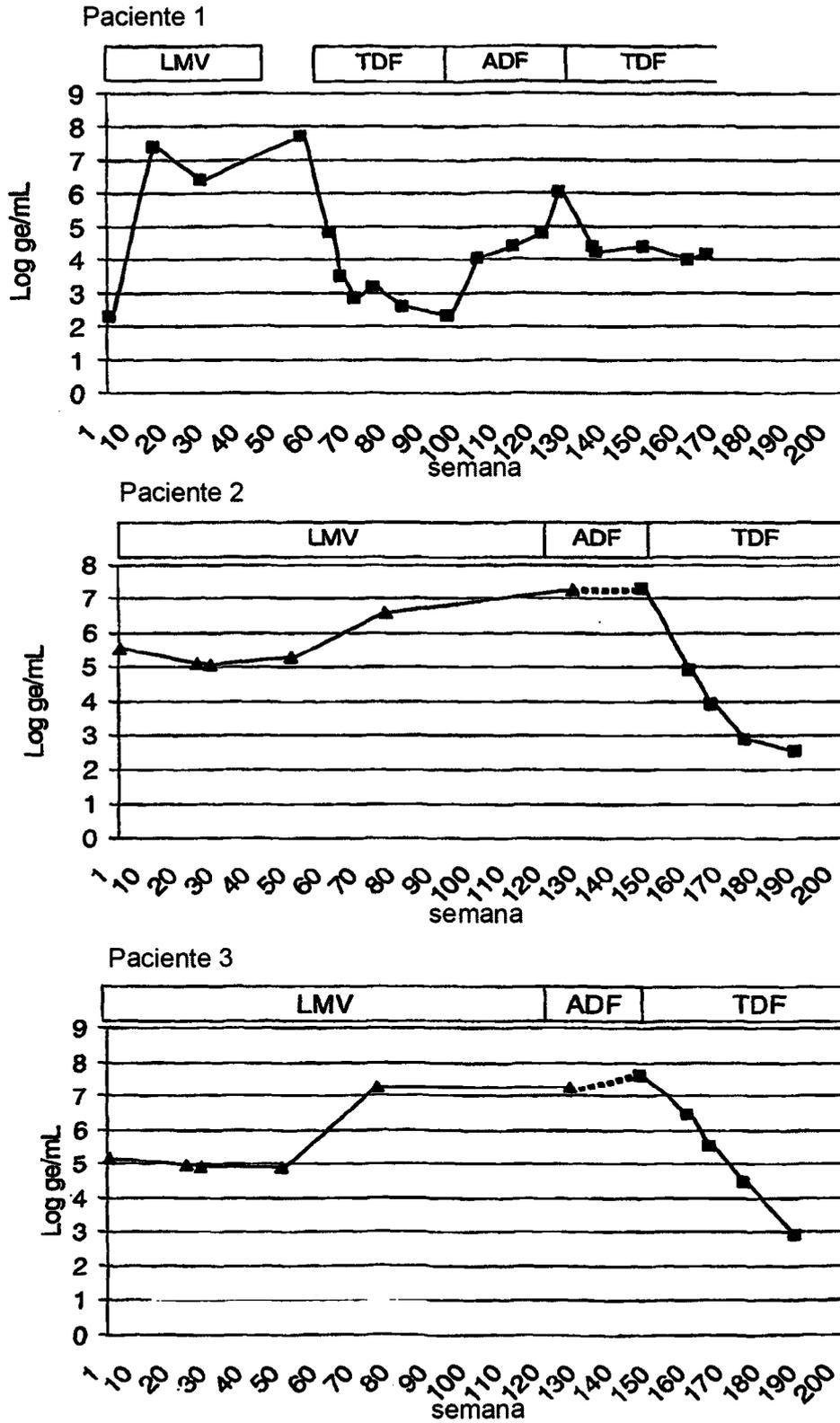


FIGURA 1

Paciente 1

V L S S S S S S C C Y A S S S S C W F F W T I K V C C P C V L * F Q .
 1 GCCTTTATC ATCTTCTCT TCACTCTGCT GCTATGCTTC ATCTTCTTGT TGGTTCTTCT GGACTATCAA GGTATGTTGC CCGTGTGTC TCTATTTCCA
 CGCAAAATAG TAGAAGAGA ACTAGGACCA CCAATACGGAG TAGAAGACA ACCAAGAGA CCTGATAGTT CCATACACAG GGCACACACAGG AGATTAAGGT
 ID SEC 11
 ID SEC 1
 ID SEC 2
 . D L R P P V R D H A E P A R L L L K E P L C I P P V A V P N L R T
 101 GGATCTCCGA CCACCAATAC GGGACCAATGC AGAACCTGCA CCACTATTTGC TCAAGAAC TCTATGTATC CCTCCAGTIG CTGACACAAA CCTTGGACG
 CCTAGAGGCT GGTGGTCAATG CCTTGGTACG TCTTGGACGT CCTGATACG AGTTCTTGG AGATACATAG GGGAGACAAC GACATGGTIT GGAAGCCTGC
 ID SEC 11
 ID SEC 1
 ID SEC 2
 E I A P V P P S I I L G F R K I P M G V G L S P F L L A Q F T S A I .
 201 GMAATTGCAC CTGTATTTCC ATCCATCATC CTGGCTTTC GGAATTTCC TATGGAGTG GGCCTCAGC CGTTTCTCTT GGCTCAGTIT ACTAGTGCCA
 CTTTAACTG GACATAAGG TAGGTATAG GACCCGAAAG CCTTTAAGG ATACCCTCAC CCGGAGTCGG GCATAAGAGGA CCGAGTCAAA TGATCAGGCT
 ID SEC 11
 ID SEC 1
 ID SEC 2
 . C S V V R R A F P H C L A F S Y M D D V V L G A K S V Q H L E A L .
 301 TTTGTTTCACT GGTTCGTAAG CCTTTCCTCC ACTGTTTCC ACTGTTTCC TTTTCACTTAT ATGGATGATG TGGTATTTGG GGCCAACTCT GTACAGCATC TTGAGGCCCT
 AAACAAGTCA CCAAGCATCC CGAAAGGGG TGACAAAACC AAGTCAATA TACCTACTAC ACCATAACCC CCGTTCAGA CATGCTGTAG AACTCCGGGA
 ID SEC 11
 ID SEC 1
 ID SEC 2
 . F T A V T N F L L S L G V H L N P N K T K
 401 TTTTACCCT GTTACCANTT TTTTCTTGT TTTGGGTGA CAFTTAAACC CTACAAAC AAAA
 AAAATGGCGA CAATGGTTAA AAAAAACAG AAACCCACAT GTAAATTTGG GATTTGTTTG TTTTT
 ID SEC 11
 ID SEC 1
 ID SEC 2

FIGURA 2a

Paciente 2 bADF

A F Y H L P L H P A A M P H L L V G S S G L S R Y V A R L S S N S . ID SEC 12
 1 CGCGTTTTC TCATCTTCT CTTCATCTG CTGCTATGC TCATCTTCT GTTGTCTT CTGACTATC AAGGTATGT GCCCGTTGT CCCTAATTC ID SEC 3
 GCOCGAAAT AGTAGAAGA GAAGTAGGAC GACGATACG AATAGAGA CAACAAGAA GACCTGATAG TTCCHACAA CGGGCAACA GGAGATTAAG ID SEC 4
 . R I F N H Q H G T M Q N L H D Y C S R N L Y V S L L L L L Y Q T F G ID SEC 12
 101 CAGGATCTC AACCCAGC ACGGACONT GCAGAACCTG CAGACTATT GCTCAAGAA CCTATATGA TCCCTCTCT TCGTGTACCA AACCTTCGGA ID SEC 3
 GTCCTAGAAG TTGTTGGTCG TGCCCTGGTA CGTCTGGAC GTCTGATTA CGAGTCTCTT GGAGATACAT AGGGAGACA ACGACATGTT TTGGAGCCT ID SEC 4
 R K L H L Y S H P I I L G F R K I P M G V G L S P F L L A Q F T S A . ID SEC 12
 201 CGGAAATGC ACCTGTATC CATCCCATC ATCCCTGGCT TTGGAAAT TCCTATGGA GTGGCCCTCA GCCCGTTCT CCTGGCTCAG TTACTAGTC ID SEC 3
 GCCTTTAAG TGGACATAG GGTAGGGTAG TAGGACCGA AGCCCTTTA AGGATACCCT CACCGGAGT CGGGCAAGA GGACCGAGTC AANTGATCAC ID SEC 4
 . I C S V V R R A F P H C L A F S Y I D D V V L G A K S V Q H L E S . ID SEC 12
 301 CCATTTGTC AGTGGTGTG AGGCTTTC CCCACTGTT GGCTTTCAGT TATATGATG AATGGTATT GGGGCCAAG TCTGTACAGC ATCTTGAGTC ID SEC 3
 GGTAAACAAAG TCACCAAGCA TCCCGAAGG GGGTACAAA CCGAAATCA ATATACTAC TACACCAATA CCCCCTGTT AGACATGTCG TAGAACTCAG ID SEC 4
 . L F T A V T N F L L S L G V H L N P N K T K R W G Y S L N F M G Y ID SEC 12
 401 CCTTTTACC GGTGTACCA ATTTCTTT GTCTTTGGT GTACATTTAA ACCCTAACAA ACAAAGA TGGGTTACT CTTTAAATTT CATGGCTAT ID SEC 3
 GBAAAATGG CGACAATGGT TAAAGAAA CAGAAACCA CATGTAATTT TGGATGTT TTGTTTTCT ACCCCATGA GAAATTTAAA GTACCCGATA ID SEC 4
 V I G C Y G S L P Q D H I I Q K I K E ID SEC 12
 GTTATGAT GTTATGGTC CTGCCCAG AATCATAA TTCAGAAAT CAAAGAA ID SEC 3
 CAATAACCTA CANTACCCAG GAACGGTGT CTAGTAAAT AAGTCTTTTA GTTTCTT ID SEC 4

FIGURA 2b

Paciente 2 pADF

1 A F Y H L P L H F A A M P H L L V G S S G L S R Y V A R L S S N S . ID SEC 13
 CCGCGTTTAA TCATCTTCTT CTTCTATCCG CTGCTATGCC TCACTCTCTT GTTGGTCTT CTGGACTATC AAGGTATGTT GCCCGTTTGT CCTCTAATTC ID SEC 5
 GCCGCAAAAT AGTAGAAGGA GAAGTAGGAC GACGATACGG AGTAGAAGAA CAACCAAGAA GACCTGATAG TTCCTATACAA CGGGCAAAACA GGAGATTAAAG ID SEC 6
 . R I F N H Q H G T M Q N L H D Y C S R N L Y V S L L L L Y Q T F G ID SEC 13
 101 CAGGATCTTC AACCAACAGC ACGGGACCAAT GCAGAACCTG CACGACTAAT GCTCAAGAA CCTCTATGTA TCCCTCCTGT TGCCTACCA AACCTTCGGA ID SEC 5
 GTCCTAGAAG TTGZTGGTGG TGCCCTGGTA CGTCTTGGAC GTGCTGATAA CGAGTTCCTT GGAGATACAT AGGGAGGACA ACGACATGST TTGGAAAGCCT ID SEC 6
 R K L H L Y S H P I I L G F R K I P M G V G L S P F L L A Q F T S A . ID SEC 13
 201 CGGAAATGGC ACCTGATTC CCATCCNTC ATCTGSGCT TTCCGAAAT TCCTATGGGA GTGGGCTCA GCCCGTTCTT CCTGGCTCAG TTTACTAGTG ID SEC 5
 GCCTTAAACG TGGACATAAG GGTAGGATAG TAGGACCGGA ANGCCTTTTA AGGATACCTT CACCCGGAGT CGGGCAAGA GGACCGAGTC AAATGATCAC ID SEC 6
 . I C S V V R R A F P H C L A F S Y M D D V V L G A K S V Q H L E S . ID SEC 13
 301 CCAFTTGTTC AGTGGTTCGT AGGGCTTTC CCACATGTTT GGCITTCAGT TATATGGATG ATGTGGTATT GGGGGCCAG TCTGTACAGC ATCTTGAGTC ID SEC 5
 GGTAACAG TCACCANGCA TCCCGAAGG GGTGACAAA CCGAAATCA ATATACCTAC TACACATAA CCCCCGTTT ACACATGTGG TAGAATCCAG ID SEC 6
 . L F T A V T N F L L S L G V H L N P N K T K R W G Y S L N F M G Y ID SEC 13
 401 CCTTTTACC GCTGTACCA AFTTTCTTTT GTCTTTGGGT GTACATTTAA ACCATAACAA AACAAAAGA TGGGTTACT CTTTAATTT CATGGGCTAT ID SEC 5
 GGAAAATGG CGACANTGTT TAAAGAAA CAGAAACCA CATGTAAAT TGGATTTTCT ACCCCAATGA GAATTTAAA GTACCCGATA ID SEC 6
 V I G C Y G S L P Q D H I I Q K I K E ID SEC 13
 501 GTATTTGGAT GTTATGGGTC CTTGCCACA GATCACATA TTCAGAAAT CAAAGA ID SEC 5
 CAATAACCTA CAATACCAG GATCGTGT CTAGTGTAAAT ANGCTTTTA GTTCTT ID SEC 6

FIGURA 2c

Paciente 3 bADF

I Y S L X P A A M P H L L V G S S G L S R Y V A R L S S N S R I F N . ID SEC 14
 1 ATATATTCTC TTCNNCCTCG TGCTATGCCCT CATCTTCTTG TTGGTTCTTC TGGACTATCA AGGTATGTTG CCGTTLTGCT CTCTAATTCC AGGATCTTCA ID SEC 7
 TATATAAGAG AAGNNGGACG ACGATACCGA GTAGACCGA ACCAAGAAG ACCGTATAGT TCCATACAAAC GGCCAAACAG GAGATTAAAG TCCTPAGAAGT ID SEC 8

 . H Q H G T M Q N L H D Y C S R N L Y V S L L L L Y Q T F G R K L H . ID SEC 14
 101 ACCACCAGCA CCGGACCATG CAGACCTGC ACGACTATTG CTCRAGGAC CTCATGTTAT CCTTCTGTT GCTGTACCAA ACCTTCGGAC GGAAATTCCA ID SEC 7
 TGGTGTCTGT GCCCTGGTAC GTCTTGGACG TGCATGATAC GAGTTCTTGG GAGATACATA GGGNAGACAA CGACATGGTT TGGNAGCCCTG CCTTTAAGCT ID SEC 8

 . L Y S H P I I L G F R K I P M G L G L S P F L L A Q F T S A I C S ID SEC 14
 201 CCTGTATTCC CATCCCATCA TCCTGGGCTT TCGAAAATT CCTATGGGAC TGGCCCTCAG CCCGTTCTC CTGGCTCAGT TTACTAGTGC CATTTGTCCA ID SEC 7
 GGACATPAAAG GTAGGTTAGT AGGACCCGAA AGCCTTTTAA GGNATCCCTG ACCCGGATC GGGCAAGAG GACCGAGTCA AATGATCAGG GTAAACAAAGT ID SEC 8

 V V R R A F P H C L A F S Y I D D V V L G A K S V Q H L E S L F T A . ID SEC 14
 301 GTGGTTGGTA GGGCTTTCCC CCACGTGTTG GCTTTCAGTT ATATTGATGA TGTGGTATG GGGGCCAAGT CTGTACAGCA TCTTGAGTCC CTTTTACCG ID SEC 7
 CACCAAGCNT CCCGAAGGG GGTGACAAAC CGAAAGTCAA TATTAAGTACT ACACCATAAC CCCCGGTTCA GACATGCTGT AGAATCTCAGG GAAAATGGC ID SEC 8

 . V T N P L L S L G V H L N P N K T K X W G X X X X ID SEC 14
 401 CTGTTACCAA TTTTCTTTTG TCTTTGGGTG TACATTTTAA CCTTACAAA ACAAAGNAT GGGGTANNW NNNNNNNT ID SEC 7
 GACATGGTT AAAGAAAC AGAARCCAC ATGTAAATTT GGGATTGTTT TGTTTCTNTA CCCCATNNN NNNNNNNA ID SEC 8

FIGURA 2d

Paciente 3 pADF

I Y S L X P A A M P H L L V G S S G L S R Y V A R L S S N S R I F N . ID SEC 15
 1 ATATATCTTC TTCNCTGC TCGTATGCCT CATCTCTCTG TTGGTCTTC TGGACTATCA AGGTATGTTG CCGGTTGTC CTTATATCC AGGATCTCA ID SEC 9
 TATATAAGAG AAGNNGGAC ACGATACGGA GTAGAAGAC ACCAAGAAG ACCGATAGT TCCATACAAC GGGCAAACAG GAGATTAAGG TCCTAGAAGT ID SEC 10
 . H Q H G T M Q N L H D Y C S R N L Y V S L L L L L Y Q T F G R K L H . ID SEC 15
 101 ACCACCAGCA CCGGACCATG CAGAACCTGC AGACTATTG CTCAGAAGAC CTCATGATAT CCGTCTGTTT GCTGTACCAA ACCCTCGGAC GGAATGCA ID SEC 9
 TGGTGGTCTG GCCCTGGTAC GTCYTGACG TGCTGATAC GACTTCCTG GAGATACATA GGAAGACAA CGACATGTT TGGAGCCCTG CCTTTAACGT ID SEC 10
 . L Y S H P I I L G F R K I P M G V G L S P F L L A Q F T S A I C S ID SEC 15
 201 CCTGTATCC CATCCATCA TCCGGGCTT TCGGAATTT CCTATGGAG TGGCCCTCAG CCGGTTCTC CTGGCTCAGT TTACTAGTC CATTTGTTCA ID SEC 9
 GGACATAAGG GTAGGGTAGT AGAACCCGAA AGCCITTTAA GGATACCCTC ACCCGGATC GGGCAAGAG GACCGATCA ATGATCAGG GTAAACAGT ID SEC 10
 V V R R A F P H C L A F S Y I D D V V L G A K S V Q H L E S L F T A . ID SEC 15
 301 GTGGTCTGTA GGCTTTCCC CCACTGTTG GCTTTCAGTT ATATTGATGA TGTGGTATTG GGGGCCAAGT CTGTACAGCA TCTGTAGTCC CTTTTACCAG ID SEC 9
 CACCAAGCAT CCGGAAGGG GGTGACAAAC CGAAAGTCAA TATTACTACT ACACCATAAC CCCCAGTTCA GACATCTCGT AGAACTCAGG GAAATGCG ID SEC 10
 . V T N F L L S L G V H L N P N K T K X ID SEC 15
 401 CTGTACCBA TTTTCTTTG TCTTTGGTG TACATTTAAA CCTAACAAA ACAAAAGNAT ID SEC 9
 GACATGTTT AAAGAAAAC AGAAACCAC ATGTAAATTT GGGATGTTT TGTTTTCNTA ID SEC 10

FIGURA 2e

P1 GVGLSPFLLAQFTSAICSVVRRRAFPFHCHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLEALFTAVTNFLLSLGVHLNPNKTK id sec 16
 P2 bADF GVGLSPFLLAQFTSAICSVVRRRAFPFHCHCLAFSYIDDVVLGAKSVQHLESLFTAVTNFLLSLGVHLNPNKTK id sec 17
 P2 pADF GVGLSPFLLAQFTSAICSVVRRRAFPFHCHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLFTAVTNFLLSLGVHLNPNKTK id sec 18
 P3 bADF GLGLSPFLLAQFTSAICSVVRRRAFPFHCHCLAFSYIDDVVLGAKSVQHLESLFTAVTNFLLSLGVHLNPNKTK id sec 19
 P3 pADF GVGLSPFLLAQFTSAICSVVRRRAFPFHCHCLAFSYIDDVVLGAKSVQHLESLFTAVTNFLLSLGVHLNPNKTK id sec 20
 wt D GVGLSPFLLAQFTSAICSVVRRRAFPFHCHCLAFSYMDDVVLGAKSVQHLESLFTAVTNFLLSLGIHLNPNKTK id sec 21

LMV	LMV	ADF?	LMV?	ADF	ADF
173	180	181	204	217	219
					233
					236

FIGURA 3

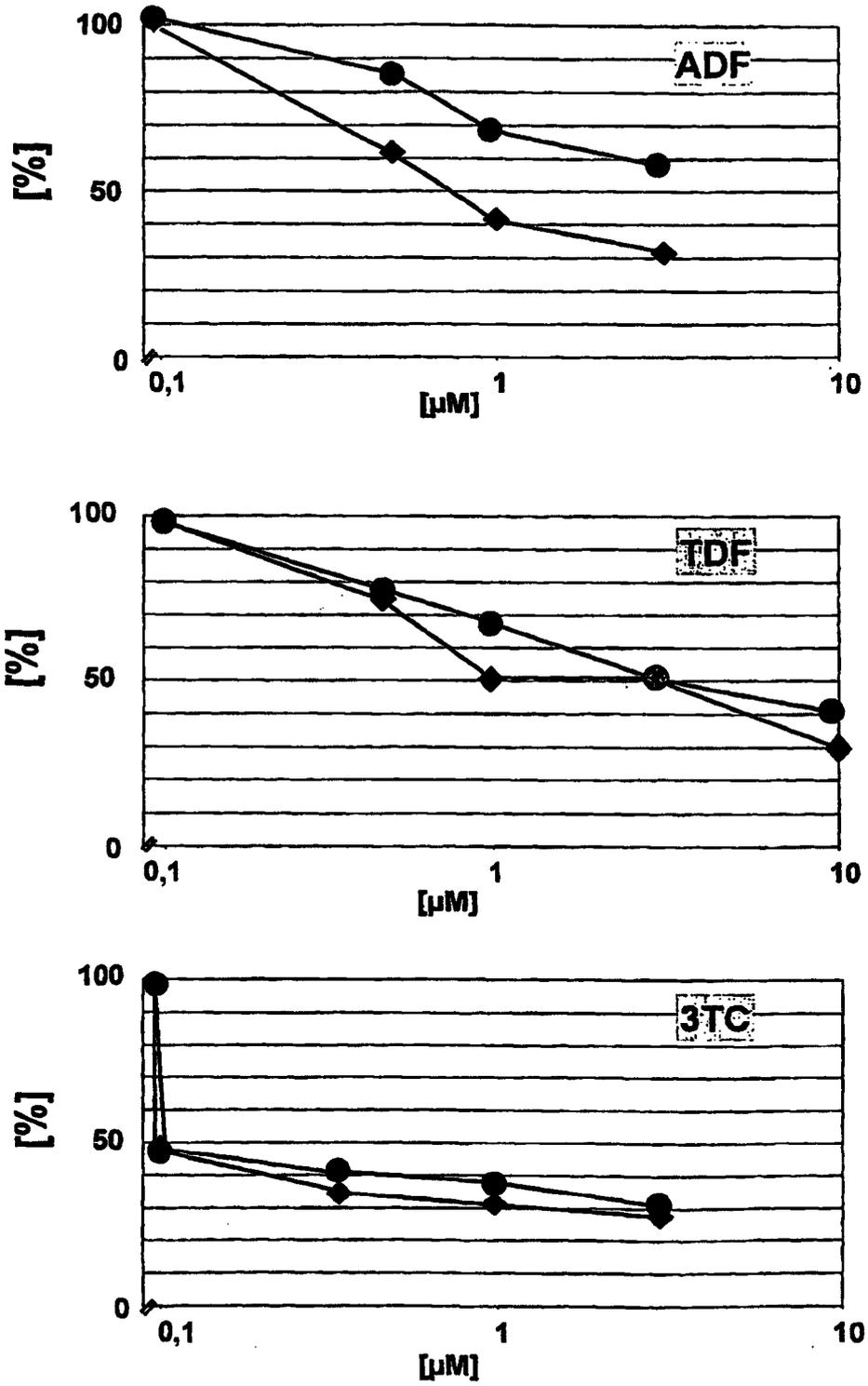


FIGURA 4

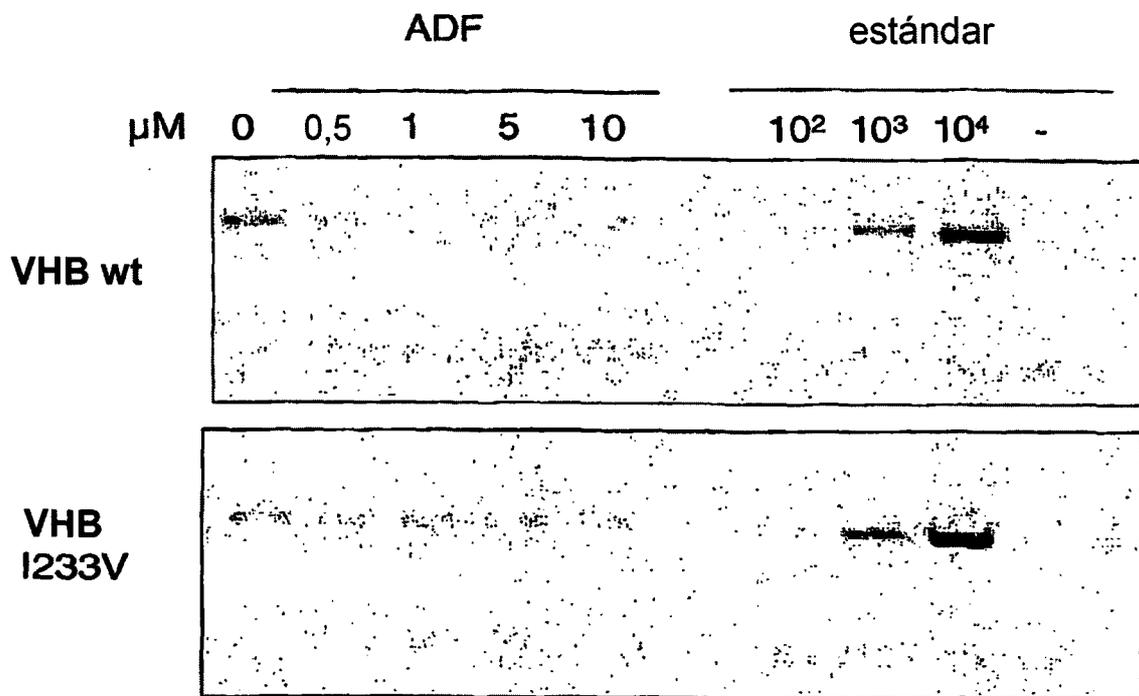


FIGURA 5