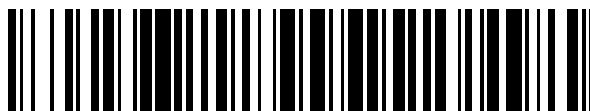


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 494 840**

51 Int. Cl.:

C07K 14/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2006** **E 06723429 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014** **EP 1858916**

54 Título: **Variantes víricas de la hepatitis B con susceptibilidad reducida a análogos de nucleósidos y usos de las mismas**

30 Prioridad:

15.03.2005 EP 05101997
15.03.2005 US 661484 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2014

73 Titular/es:

FUJIREBIO EUROPE N.V. (100.0%)
Technologiepark 6
9052 Gent, BE

72 Inventor/es:

BOZDAYI, MITHAT

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 494 840 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 víricas de la hepatitis B con susceptibilidad reducida a análogos de nucleósidos y usos de las mismas

La presente se refiere al campo de las variantes del virus de la hepatitis B (VHB, también indicado con virus VHB) que muestran una sensibilidad reducida a agentes particulares. Más particularmente, la presente invención se refiere al campo de diagnosticar la susceptibilidad de una muestra de VHB a fármacos antivirales usados para tratar la infección por VHB y a un método /o 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 fármacos.

El VHB es un virus de ADN pequeño con envuelta de aproximadamente 3200 pb de longitud que pertenece a la familia de los hepadnavirus. El virus se replica a través de un intermedio de ARN y utiliza la transcripción inversa en su estrategia de replicación (Summers, 1982). El genoma del HVB es de una naturaleza compleja que tiene una estructura de ADN parcialmente bicatenario con marcos de lectura abiertos (ORF) solapantes que son (i) el ORF *preC/C* que codifica el antígeno e secretado (HBeAg) y la proteína nuclear de la nucleocápside (HBcAg), respectivamente; (ii) el ORF *P* que codifica la polimerasa/transcriptasa inversa vírica; (iii) el ORF *preS1/preS2/S* que codifica las proteínas de la envuelta vírica, el antígeno s (HBsAg) grande, mediano y pequeño, respectivamente; y (iv) el ORF *X* que codifica una proteína transactivadora transcripcional que codifica genes de superficie, núcleo, polimerasa y X.

Los virus de la hepatitis B muestran una gran variabilidad genética en sus genomas, siendo reconocidos actualmente siete genotipos de VHB (de A a G) (Stuyver *et al.*, 2001; Stuyver *et al.*, 2000). El virus, que se propaga por contacto con sangre infectada, puede causar estados de enfermedad debilitantes y puede producir insuficiencia hepática aguda. Aunque la mayoría de los adultos pueden rechazar una infección sin tratamiento, la infección por hepatitis B se puede desarrollar a una forma crónica. Realmente, aproximadamente 400 millones de personas en el mundo están crónicamente infectadas con VHB y se espera que aproximadamente del 15 al 40% de los portadores crónicos del VHB evolucione a cirrosis y enfermedad hepática terminal. Sin tratamiento el pronóstico para estos pacientes es malo, consecuentemente el desarrollo de terapia antiviral eficaz para VHB permanece un fin importante. El principal objetivo de la terapia es controlar la replicación del VHB e inducir la remisión de la enfermedad hepática para parar la evolución a cirrosis y cáncer hepático. El tratamiento está indicado para pacientes con inflamación activa, niveles de alanina aminotransferasa (ALT) elevados debido a la destrucción de las células hepáticas, y niveles del ADN de VHB (niveles de replicación vírica) mayores de 1000.000 copias/ml.

Los fármacos actuales aprobados para el tratamiento de hepatitis B crónica son los alfa-interferones, y análogos de nucleósidos o combinaciones de estos fármacos. Un análogo de nucleósido es un nucleótido químicamente manipulado que actúa como un bloque constructor sustituto en el proceso de replicación vírica, inhibiendo la replicación del VHB.

Se ha mostrado que la terapia con interferón (IFN) es parcialmente eficaz solo en un grupo pequeño de portadores (Lock, 1994) y también está limitada debido a los graves efectos secundarios. Este fracaso relativo de IFN- α para el tratamiento de infección crónica de VHB ha provocado la búsqueda de agentes y pautas terapéuticos adicionales. En particular, se ha mostrado que un número de análogos de nucleósidos inhiben la replicación de hepadnavirus a través de la inhibición de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa hepadnavírica. Algunos de estos compuestos ya se han retirado del uso clínico debido a la toxicidad (lobucavir) o falta de eficacia (famciclovir) (De Clercq, 1999; Schinazi, 1997; Luscombe *et al.*, 1996). En este momento, el análogo de nucleósido con más éxito para el tratamiento de hepatitis B crónica es sin duda el enantiómero (-) médicamente aprobado de 3'-tiacitidina (3TC o lamivudina (LAM)), (Jarvis *et al.*, 1999). El fármaco tiene una potente actividad antivírica contra el virus, se tolera bien y tiene pocos efectos adversos. Sin embargo, la terapia a largo plazo con lamivudina frecuentemente se asocia con la aparición de resistencia vírica. Una de las mutaciones comunes que confiere resistencia de lamivudina y reduce la eficacia de la replicación *in vitro* del virus es una sustitución de metionina a isoleucina o metionina a valina en el codón 204 de ADN dependiente de ARN de VHB (Ling R. *et al.*, 1996; Bartholomew M. *et al.*, 1997; Tipples G.A. *et al.*, 1996). Además de la alteración de esta sustitución de aminoácido de Met a Val o a Ile (rtM204V/I) en el motivo conservado YMDD, patrones genotípicos mutados en otros sitios del gen de la transcriptasa inversa se han asociado con resistencia a lamivudina. En particular, se describió que la mutación de leucina a metionina en el codón 180 (rtL180M) en el dominio B de la polimerasa restablece parcialmente la capacidad de replicación así como que aumenta la resistencia al fármaco *in vitro*. En pacientes coinfectados con VHB/VIH el desarrollo de resistencia a lamivudina es más frecuente que en pacientes mono infectados con VHB, lo que hace una terapia alternativa a la aplicación de lamivudina indispensable (Benhamou *et al.*, 2001; Benhamou *et al.*, 2003; Benhamou *et al.*, 2004; Dore *et al.*, 2004).

Otro análogo de nucleósido aplicable para el tratamiento de hepatitis B crónica es adefovir dipivoxilo, el profármaco de adefovir (ADF). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que este fármaco es capaz de inhibir cepas de VHB de tipo salvaje así como las que muestran resistencias de lamivudina. Por tanto, ADF puede servir como una terapia alternativa para el tratamiento de infección crónica por VHB en casos donde se ha producido la resistencia a lamivudina. Hasta ahora, ADF pasó con éxito estudios clínicos de fase III (Westland CE *et al.*, 2003). Ya se han

descrito dos mutaciones que median la resistencia a ADF. Estas mutaciones están localizadas en el codón 181 (dominio B) y en el codón 236 (dominio D) del gen de la transcriptasa inversa y producen una sustitución de aminoácido de Ala a Val (rtA181V) y de Asn a Thr (rtN236T), respectivamente (Angus P. *et al.*, 2003; Yang H. *et al.*, 2003; documento WO 2003/087351; documento WO 2004/031224). La frecuencia de la mutación rtA181V es aproximadamente del 2,5% con una relevancia clínica hasta ahora desconocida, mientras que del 1,7-2,5% de los pacientes tratados con adefovir revelan la mutación de resistencia rtN236T.

Estudios recientemente publicados por Perrillo *et al.* (2004) así como por Peter *et al.* (2004) demuestran que aproximadamente del 85% al 92% de los pacientes con resistencia a lamivudina tendrán una disminución en su nivel de ADN de VHB en más de o igual a dos logs mientras reciben ADF. Esto implica que del 8-15% de los pacientes no alcanzan una reducción significativa en los niveles de ADN de VHB cuando se añade ADF a la terapia. Por tanto, hay un precedente para un subgrupo de pacientes con VHB resistente a lamivudina que no alcanzarán una respuesta virológica con terapia de ADF. La razón para la no sensibilidad a ADF permanece poco clara.

Por tanto, aunque lamivudina y adefovir tienen efectos antivíricos fuertes, el desarrollo de mutantes que producen resistencia a fármacos presenta un problema importante en el tratamiento de infecciones crónicas de VHB. Además, la existencia de patrones de mutaciones en VHB con un perfil de resistencia cruzada plantea una preocupación principal debido a la posibilidad de fracaso de las terapias de combinación. Aunque se han descritos estudios que ensayan la resistencia cruzada de diferentes fármacos antivirales sobre mutantes de VHB (Delaney *et al.*, (2001), Xiong *et al.*, (2001)) no se ha documentado hasta ahora ningún patrón de mutación que sea responsable para la resistencia *in vivo* e *in vitro* tanto a adefovir como lamivudina.

De lo anterior, parece que hay una necesidad de verificar la aparición o presencia de variantes de VHB que muestran una sensibilidad reducida a agentes particulares, para cribar y/o desarrollar y/o diseñar otros agentes que tienen propiedades adecuadas para hacerlos útiles en nuevas pautas terapéuticas. Según la presente invención, los inventores han identificado variantes del VHB con mutaciones en el gen de la ADN polimerasa de VHB que reducen la sensibilidad de VHB a análogos de nucleósidos.

Compendio de la invención

La presente invención se dirige a resolver el problema de seguimiento inadecuado de la aparición o presencia de variantes del VHB que muestran una sensibilidad reducida a análogos de nucleósidos.

La presente invención se refiere a ácidos polinucleicos aislados de estas variantes del VHB, ácidos polinucleicos aislados que comprenden una mutación nucleotídica que produce la sustitución de aminoácido rtA181S en el gen de la polimerasa y mutación nucleotídica que produce una sensibilidad reducida al análogo de nucleótido ADF y/o LAM y/o a su combinación.

La presente invención se refiere además a productos de expresión de estos ácidos polinucleicos aislados.

Aspectos adicionales de la invención se refieren a composiciones que comprenden el ácido polinucleico o los productos de expresión de la presente invención, que preferiblemente encuentran su aplicación en el seguimiento y/o la identificación de variantes de VHB.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de los ácidos polinucleicos aislados y/o productos de expresión y/o composiciones como se han descrito anteriormente en la toma de decisiones clínicas. En particular, los ácidos polinucleicos o productos de expresión o composiciones de la presente invención se usan en un proceso para la selección de al menos un fármaco anti-VHB sin resistencia cruzada. En particular, los ácidos polinucleicos o productos de expresión o composiciones se usan en un proceso para la detección de un ácido polinucleico de variante de VHB.

La presente invención se refiere además a un proceso para el tratamiento de infección por VHB que comprende administrar un análogo de nucleósido a un sujeto infectado con VHB, determinar si el sujeto está infectado con una variante de VHB como se describe, y si es así, administrar al sujeto al menos un fármaco anti-VHB sin resistencia cruzada.

También se incluyen en la invención métodos destinados a detectar la presencia de las variantes de VHB según la invención en una muestra biológica. Dicho método comprende el paso de detectar en la misma la presencia de un ácido polinucleico de VHB o un fragmento del mismo.

Por último, la presente invención se refiere a un kit diagnóstico que detecta la presencia de una variante de VHB en una muestra biológica y/o para detectar resistencia a un fármaco antiviral de un VHB presente en una muestra biológica. Además, se ha proporcionado un método para el cribado de fármacos activos contra un VHB que comprende una ácido polinucleico como se ha indicado anteriormente.

Además, se ha proporcionado un oligonucleótido capaz de distinguir, en un ácido polinucleico de VHB o un fragmento del mismo, un nuevo codón 181 que codifica una serina diferentes de los codones 181 conocidos que codifican una alanina o una valina.

5 Leyenda de las figuras

Figura 1. Presentación esquemática de la anamnesis del paciente

El eje X representa la línea del tiempo. Debajo del eje X se indican los tratamientos sucesivos del paciente AA infectado con VHB en meses (MU/TVS representa millón de unidades de interferón tres veces a la semana). En el eje Y izquierdo, se da la carga de ADN vírico (en pg de ADN de HVB/ml de suero determinado usando el ensayo de hibridación líquida de Digene, EE UU). Los niveles de ADN de VHB en muestras de suero del paciente AA se indican por la línea sólida negra. En el eje Y derecho, se dan los niveles de ALT (alanina amino-transferasa; en 100 UI/ml, 100 unidades internacionales/ml). La flecha vertical en la parte superior de la figura indica la exacerbación de ALT que coincide con el inicio de la reaparición del virus.

Figura 2 (2a y 2b): Alineamiento de las secuencias de ADN polimerasa de VHB en diferentes intervalos de tiempo desde el inicio del tratamiento antiviral.

Se alinean fragmentos de la secuencia de nucleótidos de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB D, indicada por SEQ ID NO 1 y la secuencia de aminoácidos correspondiente, indicada por SEQ ID NO 9 derivada del no. de acceso de Genbank X02496, y seis secuencias de nucleótidos de ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB y las secuencias de aminoácidos correspondientes obtenidas del paciente AA en diferentes intervalos de tiempo desde el inicio del tratamiento antiviral. Estas seis secuencias de nucleótidos se indican por SEQ ID 2 y 3, las secuencias de aminoácidos correspondientes por SEQ ID 10 y 11, respectivamente. Las fechas en que se sacó suero se indican por XX/YY en donde XX indica el mes e YY indica el año en que se sacó. El periodo desde el inicio del tratamiento antiviral se indica por MZZ, en meses.

Figura 3 (3a, 3b y 3c): Alineamiento de secuencias de ADN polimerasa de VHB.

Se alinean fragmentos de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa del VHB como se describe en la figura 2 de siete secuencias de nucleótidos de ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB y las secuencias de aminoácidos correspondientes obtenidas del paciente AA el mes 42. La fecha en que se sacó suero es 06/02. Estas siete secuencias de nucleótidos se indican por SEQ ID 4 a 8, las secuencias de aminoácidos correspondientes por SEQ ID 12 a 14.

Figura 4: Producción de VHB en sobrenadante de cultivo celular de la línea celular Huh7 transfectada transitoriamente

El número de copias log de la producción de VHB en el eje Y se representa según los días en el eje X en medio de ensayo después de la transfección con el genoma de VHB de longitud completa en el clon que tiene el patrón de mutación A181S + M204I. Día 0 se refiere al día anterior a la transfección de la línea celular Huh7.

40 Descripción detallada de la invención

Según la presente invención, los inventores han identificado variantes de VHB en pacientes crónicamente infectados con VHB que eran biológicamente no sensibles a ADF o terapia que comprende ADF y/o LAM o terapia que comprende LAM y/o una combinación de estos agentes anti-VHB. El análisis de secuencia del ADN de VHB aislado reveló la aparición de polimorfismos de ácidos nucleicos novedosos en la polimerasa de VHB. La aparición de dichos polimorfismos coincidía con la persistencia de la reaparición vírica durante la terapia de análogos de nucleótidos, una indicación fuerte para la aparición/existencia de variantes de VHB resistentes a adefovir. Los descubrimientos *in vitro* confirmaron que estos mutantes de VHB son resistentes tanto a adefovir como lamivudina incluso cuando se trataban con altas concentraciones de los análogos de nucleósidos.

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

La invención se refiere a ácidos polinucleicos aislados que codifican variantes de VHB que comprenden al menos una mutación nucleotídica en el gen de la ADN polimerasa, en donde dicha mutación nucleotídica produce al menos una sustitución de aminoácidos en el dominio B del gen de la polimerasa y en donde dicha variante muestra una sensibilidad disminuida a análogos de nucleósidos y/o otros fármacos antivirales contra VHB. Las variantes del VHB preferidas comprenden al menos una mutación nucleotídica que produce al menos una sustitución de aminoácidos de la alanina en el codón en la posición 181 del gen de la polimerasa, más en particular al menos una mutación nucleotídica que produce una sustitución de aminoácidos de alanina a serina en el codón 181 del gen de la polimerasa, también indicada por rtA181S. La variante del VHB aislada según la invención preferiblemente muestra una sensibilidad disminuida a un análogo de nucleósido, particularmente el análogo de nucleósido es adefovir y/o lamivudina.

La presente invención también cubre ácidos polinucleicos aislados que codifican variantes del VHB que comprenden además de rtA181S patrones genotípicos mutados adicionalmente en otros sitios de la polimerasa de VHB. Preferiblemente, la mutación adicional produce una secuencia de aminoácidos alterada en cualquiera de los diferentes dominios del gen de la polimerasa. Estas incluyen alteraciones conocidas de aminoácidos asociadas con resistencia a fármacos. Por tanto, la presente invención se extiende a variantes de VHB aisladas que comprenden una sustitución rtA181S en el dominio B del gen de la polimerasa y al menos una mutación adicional que codifica una sustitución de aminoácidos elegida del grupo que consiste en sustituciones de leucina en la posición 180, metionina en la posición 204 y asparragina en la posición 236. Especialmente, las variantes aisladas comprenden el resultado de sustitución rtA181S y rtM204I, o rtA181S y rtM204V, o rtA181S y rtM204S, o rtA181S y rtL180M, o rtA181S y rtN236T.

La presente invención también cubre ácidos polinucleicos aislados que codifican variantes de VHB que comprenden además de rtA181S patrones genotípicos mutados adicionalmente localizados en el dominio C del gen de la polimerasa. Más preferiblemente, la sustitución de nucleótidos produce la sustitución de la metionina en el codón en posición 204 en el dominio C en el gen de la polimerasa. En particular, se cubren variantes del VHB aisladas que comprenden al menos dos mutaciones nucleotídicas en el gen de la ADN polimerasa, en donde dichas mutaciones nucleotídicas producen al menos dos sustituciones de aminoácidos, una sustitución de la alanina en el codón en posición 181 en el dominio B de la polimerasa y una sustitución de la metionina en el codón en posición 204 en el dominio C de la polimerasa. La sustitución de la metionina en el codón en posición 204 se pretende que incluya cualquier aminoácido diferente de metionina, preferiblemente la sustitución es a un aminoácido elegido del grupo que consiste en isoleucina y valina y serina.

Las variantes del VHB ejemplares comprenden una sustitución rtA181S en el dominio B de la polimerasa del VHB y una sustitución rtM204I en el dominio C de la polimerasa del VHB. Las variantes del VHB aisladas de la presente invención muestran una sensibilidad disminuida a fármacos antivirales contra VHB, preferiblemente a análogos de nucleósidos.

El término "mutación" se tiene que leer en su contexto más amplio e incluye mutaciones múltiples. Se debe entender que la presente invención se extiende a variantes del VHB aisladas que comprenden al menos una y/o dos y/o tres y/o cuatro y/o cinco y/o seis mutaciones nucleotídicas en el gen de la ADN polimerasa, en donde dichas mutaciones nucleotídicas producen al menos una y/o dos y/o tres y/o cuatro y/o cinco y/o seis sustituciones de aminoácidos, una sustitución es la alanina en el codón en posición 181 en el dominio B del gen de la polimerasa a cualquier aminoácido diferente de alanina, preferiblemente la sustitución de alanina a una serina.

"Aislado" cuando se usa en referencia a las variantes del VHB y/o ácidos polinucleicos de VHB y/o productos de expresión de esta invención significa que la variante o ácido polinucleico ha experimentado al menos un paso de purificación lejos del líquido corporal y/o tejido natural o que no está presente en su entorno nativo. Alternativamente, las variantes se pueden mantener en líquido corporal y/o tejido aislado o pueden estar en forma de ácido polinucleico. Típicamente, esto significa que la variante del virus o ácido polinucleico está libre de al menos una de las proteínas del huésped y/o ácidos nucleicos del huésped. En general, la variante o ácido polinucleico del virus aislado está presente en un entorno *in vitro*. "Aislado" no significa que la variante del virus o ácido polinucleico debe estar purificada u homogénea, aunque tales preparaciones están en el ámbito del término. "Aislado" significa simplemente elevado a un grado de pureza, al nivel requerido excluyendo el producto de la naturaleza y anticipaciones accidentales del ámbito de las reivindicaciones. Se pretende que "aislado" incluya cualquier material biológico tomado bien directamente de un ser humano o animal infectado, o después de cultivo (enriquecimiento). "Material biológico" puede ser, por ejemplo, expectoraciones de cualquier tipo, lavados bronquiales, sangre, tejido de piel, biopsias, semen, material de cultivo de sangre con linfocitos, colonias, cultivos líquidos, muestras fecales, orina, etc. "Material biológico" también puede ser cultivos celulares artificialmente infectados o la fase líquida de los mismos.

La referencia a sensibilidad "disminuida" o "reducida" en relación a un análogo de nucleósido incluye y abarca una resistencia completa o sustancial al análogo de nucleósido así como la resistencia parcial e incluye una tasa de replicación o eficacia de replicación que es más que la de un tipo salvaje en presencia de un análogo de nucleósido. En un aspecto, esto se mide convenientemente por un aumento en la carga vírica durante el tratamiento, o alternativamente, no hay disminución sustancial en la carga vírica de ADN de VHB de los niveles de ADN de VHB pretratamiento durante el tratamiento (es decir, no respuesta al tratamiento). Preferiblemente, la "sensibilidad disminuida" es respecto a ADF. Alternativamente, al "sensibilidad disminuida" es respecto a LAM. Alternativamente, la "sensibilidad disminuida" es respecto tanto a LAM como a ADF. Alternativamente, la "sensibilidad disminuida" es respecto a ADF y/o LAM y/o otros análogos de nucleósidos y/o otros fármacos antivirales contra VHB. Muchos fármacos antivirales contra VHB (fármacos antivirales de VHB) se conocen e incluyen: lobucavir, penciclovir o famciclovir, lamivudina (3TC; β -L-(-)-2',3'-dideoxi-3'-tiacitidina), interferón- α , adefovir dipivoxilo (Bis-POM-PMEA) o adefovir (PMEA; 9-(2-fosfonil-metoxietil)-adenina), entecavir (BMS 200475), emtricitabina [(-)FTC; (-)- β -L-2',3'-dideoxi-5-fluoro-3'-tiacitidina], DXG [(-)- β -D-2,6-diaminopurina dioxolano], DAPD (diaminopurina dioxolano), clevudina (L-FMAU; 2'-fluoro-5-metil- β -L-arabinofuranosiluracilo), L-dT (β -L-timidina), L-Fd4C (2',3'-dideoxi-2',3'-didehidro- β -L-(-)-5 fluorocitidina), foscarnet, carbovir, racivir, ganciclovir, tenofovir, nevirapina, (-)BCH189 (Ono et al.,

2001), QYL865 (Fu et al., 2000), timosina- α , y HBIG, el anticuerpo contra HBsAg. Se pueden usar también dos o más fármacos antivirales de VHB en combinación.

No todos los genomas de VHB tienen exactamente la misma longitud y la polimerasa es asimismo desigual, debido a la presencia de inserciones o deleciones en el dominio enlazador 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 independiente del genotipo para la polimerasa. Una forma posible de indicar los codones mutados en el gen de la polimerasa del VHB es según Stuyver et al., 2001, donde la metionina (M) en el locus YMDD de dominio C catalítico de la polimerasa se numera rtM204 más que 539, 549, 550 o 552. Este sistema de numeración se usará en la presente solicitud de patente. Según esto, las mutaciones en el gen de la ADN polimerasa de VHB asociadas con el tratamiento de análogos de nucleósidos de hepatitis B crónica se han descrito en el dominio B como rtL180M y rtA181V, en el dominio C como rtM204I y rtM204V y en el dominio D como rtN236T.

En un primer aspecto la presente invención se refiere a ácidos polinucleicos aislados que codifican las variantes del VHB de la presente invención. Estos ácidos polinucleicos aislados comprenden una mutación nucleotídica que produce al menos una sustitución y/o delección de aminoácidos en la polimerasa del VHB. En particular la invención se refiere a ácidos polinucleicos aislados que comprenden una mutación nucleotídica en el codón 181 del gen de la polimerasa, más en particular que comprende la menos una mutación nucleotídica que produce una sustitución de alanina en el codón 181 de la polimerasa. Más en particular, los ácidos polinucleicos aislados comprenden una mutación nucleotídica que produce la sustitución de aminoácidos rtA181S.

La presente invención también cubre ácidos polinucleicos aislados que comprenden además de rtA181S patrones genotípicos mutados adicionales en otros sitios de la polimerasa de VHB. Preferiblemente, la mutación adicional produce una secuencia de aminoácidos alterada en cualquiera de los diferentes dominios del gen de la polimerasa. Estas mutaciones incluyen alteraciones conocidas de aminoácidos asociadas con resistencia a fármacos. Por tanto, la presente invención se extiende a ácidos polinucleicos aislados que comprenden una mutación que codifica la sustitución rtA181S en el dominio B del gen de la polimerasa y al menos una mutación adicional que codifica una sustitución de aminoácidos elegida del grupo que consiste en rtL180M, rtM204I, o rtM204V o rtM204S y rtN236T.

La presente invención también cubre ácidos polinucleicos aislados que comprenden además de rtA181S patrones genotípicos mutados adicionalmente localizados en el dominio C del gen de la polimerasa. Más preferiblemente, la mutación nucleotídica adicional produce la sustitución de la metionina en el codón en posición 204 en el dominio C en el gen de la polimerasa. En particular, se cubren variantes del VHB aisladas que comprenden al menos dos mutaciones nucleotídicas en el gen de la ADN polimerasa, en donde dichas mutaciones nucleotídicas producen al menos dos sustituciones de aminoácidos, una sustitución de la alanina en el codón en posición 181 en el dominio B de la polimerasa y una sustitución de la metionina en el codón en posición 204 en el dominio C de la polimerasa. La sustitución de la metionina en el codón en posición 204 se pretende que incluya cualquier aminoácido diferente de metionina, preferiblemente la sustitución es a una isoleucina y/o una valina y/o una serina.

Los ácidos polinucleicos ejemplares comprenden mutaciones nucleotídicas en el gen de la ADN polimerasa que codifican la sustitución rtA181S en el dominio B del gen de la polimerasa y por ejemplo la sustitución rtM204I en el dominio C del gen de la polimerasa. En una forma de realización específica, dicho ácido polinucleico de VHB aislado comprende una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7. Más específicamente, dicho ácido polinucleico de VHB aislado se define por una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7.

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

Los ácidos polinucleicos que codifican las variantes de esta invención pueden variar en longitud y pueden variar en la selección de bases que flanquean el codón del residuo mutante. La longitud de los ácidos polinucleicos no es crítica siempre que se reconozca que es parte de la secuencia del virus de la hepatitis B para el fin deseado. Existe considerable variación de secuencia en el genoma del virus, y por tanto las secuencias de ácido nucleico que flanquean los sitios variantes pueden variar considerablemente incluso en las secuencias naturales. Solo necesita estar presente ácido polinucleico suficiente para proporcionar novedad y utilidad para la secuencia que codifica la variante, pero de otra manera la longitud de la secuencia que flanquea el codón seleccionado no es importante. Típicamente, la longitud de la secuencia (incluyendo el codón variante) será cualquier número entero desde el intervalo de 9 a 200 pb, habitualmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pb. También se incluyen secuencias lo suficientemente largas para codificar las variantes enteras y fragmentos descritos más adelante.

El "ácido polinucleico aislado o fragmento del mismo" según la invención se pretende que comprenda ácidos polinucleicos monocatenarios, ácidos polinucleicos bicatenarios o ácidos polinucleicos que forman triplex obtenidos directamente de una muestra u obtenidos después de duplicación, multiplicación o amplificación. "Obtenido", en el presente contexto, se pretende que incluya aislamiento y/o purificación y/o amplificación de dichos ácidos polinucleicos de una muestra biológica. La "muestra" puede ser cualquier material biológico tomado bien directamente de un ser humano o animal infectado, o después de cultivo (enriquecimiento). "Duplicación,

multiplicación o amplificación” se pretende que incluya cualquier ácido nucleico producido usando cualquier método de amplificación de ácidos nucleicos incluyendo cualquier técnica de secuenciación. Por tanto, cualquier técnica de secuenciación que produce una molécula de ácido nucleico que comprende cualquiera de dichos, o una combinación de dichos polimorfismos de ácidos nucleicos se debe entender que está comprendida en el término “duplicación, multiplicación o amplificación”.

El término “ácido polinucleico sintético” como se denomina aquí se pretende que sea un ácido polinucleico monocatenario, ácido polinucleico bicatenario o ácido polinucleico que forma triplex. Los ácidos polinucleicos se pueden hacer *in vitro* por medio de un método de amplificación de una secuencia de nucleótidos. Si tal ácido polinucleico amplificado es bicatenario, la conversión a una molécula monocatenaria se puede alcanzar mediante una exonucleasa adecuada dado que el ácido polinucleico monocatenario deseado está protegido contra dicha actividad exonucleasa. Alternativamente, los ácidos polinucleicos derivan de plásmidos recombinantes que contienen insertos que incluyen las secuencias polinucleotídicas correspondientes, si es necesario cortando las últimas fuera de los plásmidos clonados tras usar las nucleasas adecuadas y recuperarlos, por ejemplo, por fraccionamiento según el peso molecular. Otro medio de hacer un ácido polinucleico sintético *in vitro* está comprendido en cualquier método de secuenciación de ácidos nucleicos. Los productos de una reacción de secuenciación están, por tanto, claramente cubiertos por el término “ácido polinucleico sintético”. Los ácidos polinucleicos según la presente invención también se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo, aplicando la química de fosfotriéster o fosfaramidita convencional.

“Amplificación de la secuencia de nucleótidos (ADN o ARN)” se pretende que incluya todos los métodos que producen la multiplicación del número de copias de la secuencia de nucleótidos diana. Los métodos de amplificación de la secuencia de nucleótidos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; amplificación de ADN), amplificación por desplazamiento de la hebra (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 ácido nucleico (NASBA; amplificación de ARN); amplificación mediada por transcripción (TMA; amplificación de ARN), amplificación mediada por Q β -replicasa y transcripción hasta el extremo.

Los términos “polinucleótido”, “ácido polinucleico”, “secuencia de ácido nucleico”, “secuencia de nucleótidos”, “molécula de ácido nucleico”, “oligonucleótido”, “sonda” o “cebador”, cuando se usan en el presente documento se refieren a nucleótidos, bien ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, peptidonucleótidos 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 (bc) y monocatenarios (mc) así como polinucleótidos tricatenarios. Dichos términos también incluyen modificaciones de nucleótidos conocidas tal como metilación, ciclación y ‘grupos protectores’ y sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo tal como inosina o con monómeros no amplificables tal como HEG (hexetilenglicol).

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

Los nucleótidos generalmente se pueden marcar radiactivamente, quimioluminiscentemente, fluorescentemente, fosforescentemente o con tintes infrarrojos o con un marcador de Raman aumentado por superficie o partícula resonante de plasmón (PRP).

Las modificaciones de nucleótidos incluyen la adición de acridina o 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), azul cascada, 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 invertida, dG invertida, dC invertida, dG invertida, IRD-700, IRD-800, JOE, La Jolla Blue, grupos metálicos tales como nanopartículas de oro, ácido fenilborónico, fosfato psoraleno, fosforilación en 3' o 5', pireno, 3' ribo-adenosina, 3' ribo-guanosina, 3' ribo-citidina, (LC)Red640, (LC)Red705, rodamina, ROX, espaciadores de tiol (SH), TAMRA, TET, AMCA-S®, SE, BODIPY®, Marina Blue®, Oregon Green®, Pacific Blue®, QSY7™, Rodamina Green®, Rodamina Red®, Rhodol Green®, tetrametilrodamina, Texas Red®, modificador Uni-Link NH₂, radiomarcadores (por ejemplo, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³H) y nanopartículas.

El esqueleto polinucleotídico y las modificaciones de bases incluyen además 2'-desoxiaristeromecina, metilfosfonato, 2'-OMe-metilfosfonato ARN, 2'-O-(2-metoxietil), fosforotiorato, alquilfosforotiato, fosforamidita, ARN, 2'-OMeARN, 2-amino-dA, 2-aminopurina, 3'-(ddA), 3'dA(cordicepina), 7-deaza-dA, 8-Br-dA, 8-oxo-dA, N⁶-Me-dA, sitio abásico (dSpacer), biotina dT, 2'-OMe-5Me-C, 2'-OMe-propinil-C, 3'-(5-Me-dC), 3'-(ddC), 5-Br-dC, 5-I-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'-dI, O⁶-fenil-dI, 4-metil-indol, 2'-deoxinebularina, 5-nitroindol, 2-aminopurina, dP (análogo de purina), dK (análogo de 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-IdU, O⁴-triazol dU.

Las modificaciones adicionales de polinucleótidos incluyen marcaje con hapteno o proteína. Los haptenos incluyen, por ejemplo, biotina y digoxigenina mientras que las proteínas incluyen enzimas tales como peroxidasa de soja o rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glutatión S-transferasa o dihidrofolato reductasa o pueden constituir epítomos heterólogos tales como etiqueta de (histidina)₆, proteína A, proteína de unión a maltosa, epítomo Tag-100 (EETARFQPGYRS; SEQ ID NO:15), epítomo c-myc (EQKLISEEDL; SEQ ID NO:16), epítomo FLAG[®] (DYKDDDK; SEQ ID NO:17), lacZ, CMP (péptido de unión a calmodulina), epítomo HA (YPYDVPDYA; SEQ ID NO:18), epítomo de proteína C (EDQVDPRLIDGK; SEQ ID NO:19) y epítomo VSV (YTDIEMNRLGK; SEQ ID NO:20). Otras proteínas incluyen histonas, proteína de unión monocatenaria (ssB) y proteínas fluorescentes nativas y manipuladas tales como las proteínas fluorescentes verde, roja, azul, amarilla, cian. También se pueden incorporar fracciones de entrecruzamiento tales como cumarinas, furocumarinas o benzopironas o derivados de cualquiera de las mismas.

En una forma de realización adicional dichos términos “polinucleótido”, “ácido polinucleico”, “secuencia de ácido nucleico”, “secuencia de nucleótidos”, “molécula de ácido nucleico”, “oligonucleótido”, “sonda” o “cebador” también abarcan ácidos peptidonucleicos (APN), un análogo de ADN en el que el esqueleto es un pseudopéptido que consiste en unidades de N(2-aminoetil)glicina más que un azúcar. Los APN mimetizan el comportamiento del ADN y se unen a hebras de ácido nucleico complementario. El esqueleto neutro del APN produce unión más fuerte y mayor especificidad de la normalmente alcanzada. Además, las propiedades químicas, físicas y biológicas únicas del APN se han explotado para producir herramientas biomoleculares poderosas, agentes antisentido y antígenos, sondas moleculares y biosensores. Las sondas de APN generalmente pueden ser más cortas que las sondas de ADN y generalmente tienen de 6 a 20 bases de longitud y más óptimamente de 12 a 18 bases de longitud (Nielsen, 2001).

En una forma de realización adicional dichos términos abarcan además ácido nucleicos bloqueados (LNA) que son derivados de ARN en los que el anillo de ribosa está constreñido por un enlace metileno entre el oxígeno en 2' y el carbono en 4'. Los LNA muestran afinidad de unión sin precedentes hacia secuencias diana de ADN o ARN. Los nucleótidos de LNA pueden oligomerizar y se pueden incorporar en moléculas quiméricas o mixméricas LNA/ADN o LNA/ARN. Parece que los LNA son no tóxicos para células cultivadas (Orum *et al.*, 2001; Wahlestedt *et al.*, 2000). En general, se consideran las quimeras o mixmeros de cualquiera de ADN, ARN, APN y LNA así como cualquiera de estos en donde la timina se sustituye por uracilo.

El término “polimorfismo de ácido nucleico” o “polimorfismo de la secuencia de nucleótidos” se pretende que incluya cualquier diferencia en la secuencia primaria de nucleótidos del ácido nucleico en investigación relativo a la secuencia primaria de nucleótidos de uno o más ácidos nucleicos de referencia. El polimorfismo de ácido nucleico más sencillo es un polimorfismo que afecta a un único nucleótido, es decir, un polimorfismo de nucleótido único o SNP. Los polimorfismos de ácido nucleico incluyen además cualquier número de diferencias contiguas y/o no contiguas en la secuencia primaria de nucleótidos del ácido nucleico en investigación relativo a la secuencia primaria de nucleótidos de uno o más ácidos nucleicos de referencia. La explicación anterior también clarifica términos como “variante polimórfica”.

Una evaluación de una potencial variante vírica es importante para la selección de un protocolo terapéutico apropiado. Tal evaluación se facilita adecuadamente con la asistencia de un ordenador programado con software. Por tanto, en aún otra forma de realización, dichas secuencias de ácidos polinucleicos de VHB aisladas o fragmentos de las mismas, o las secuencias de aminoácidos derivadas de las mismas, pueden estar en código ASCII, hexadecimal o UNICODE, en un conjunto de caracteres de byte único, de byte doble, de byte múltiple, o en un código binario. En una forma de realización adicional, dichas secuencias en código ASCII, hexadecimal o UNICODE, en un conjunto de caracteres de byte único, de byte doble, de byte múltiple, o en un código binario son legibles por un ordenador. En una forma de realización más, dichas secuencias en código ASCII, hexadecimal o UNICODE, en un conjunto de caracteres de byte único, de byte doble, de byte múltiple, o en un código binario son registrables en un soporte legible por ordenador o son incorporables en bases de datos legibles por ordenador. En aún otra forma de realización se cubren soportes legibles por ordenador que comprenden dichas secuencias en código ASCII, hexadecimal o UNICODE, en un conjunto de caracteres de byte único, de byte doble, de byte múltiple, o en un código binario. En aún otra forma de realización más de la invención se prevé una base de datos legible por ordenador que comprende dichas secuencias en código ASCII, hexadecimal o UNICODE, en un conjunto de caracteres de byte único, de byte doble, de byte múltiple, o en un código binario. En aún otra forma de realización más, dichas secuencias en código ASCII, hexadecimal o UNICODE, en un conjunto de caracteres de byte único, de byte doble de byte múltiple, o en un código binario se usan en algoritmos capaces de comparar secuencias o capaces de alinear secuencias.

En un aspecto adicional de la presente invención se comprende un vector que comprende el ácido polinucleico de VHB aislado o fragmento del mismo según la invención. En una forma de realización específica, dicho vector es un vector de expresión. En otra forma de realización específica, dicho vector es un vector vírico o retrovírico.

En una forma de 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 tal como los vectores de clonación que requieren una reacción de ADN topoisomerasa para la clonación, vectores de clonación TA y vectores de clonación basados en recombinación tales como los usados en el sistema Getaway (Invitrogen). Los vectores comprenden plásmidos,

fagémidos, cósmidos o bácmidos (vectores baculovirus). Un vector puede funcionar simplemente como una herramienta y/o vehículo de clonación o puede comprender además secuencias reguladoras tal como promotores, potenciadores y terminadores o señales de poliadenilación. Dichas secuencias reguladoras pueden permitir la expresión de la información contenida en el fragmento de ADN de interés clonado en un vector que comprende dichas secuencias reguladoras. Expresión puede ser la producción de moléculas de ARN o moléculas de ARNm y, opcionalmente, la producción de moléculas de proteína de las mismas. La expresión puede ser la producción de una molécula de ARN por medio de un promotor de polimerasa vírica (por ejemplo, promotor de SP6, T7 o T3) introducido en el extremo 5' o 3' del ADN de interés.

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

Un promotor también puede preferiblemente dirigir 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 insecto (células de *Spodoptera frugiperda*, células Sf9), células vegetales (por ejemplo, vectores de expresión basados en el virus X de la patata, véase, por ejemplo, Vance et al. 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 huéspedes particularmente adecuadas en el contexto de la presente invención son líneas de células o células huésped de mamífero, por ejemplo, humanas, hepatocitos primarios, líneas de células de hepatoma (por ejemplo, HepG2, HepT1, HepT3, Huh6, Huh7), células de hígado Chang, células de hígado de roedor, células de hígado de primate, células de hígado de homínido, o de cualquier otro mamífero, por ejemplo ser humano.

Un vector, o un vector de expresión, puede además ser capaz de replicación autónoma en una célula huésped o puede ser un vector integrativo, es decir, un vector que se integra completa o parcialmente, y establemente, en el genoma de una célula huésped. 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 huésped, se puede revertir si dicho primer fragmento de ADN está flanqueado, por ejemplo, por sitios de recombinación específicos de sitio o por secuencias repetidas típicas para transposones. Alternativamente, dichos sitios de recombinación específicos de sitio o secuencias repetidas de transposones están comprendidas en dicho segundo fragmento de ADN y están flanqueando dicho primer fragmento de ADN. En aún otra alternativa, dicho primer fragmento de ADN se puede introducir posiblemente en un segundo fragmento de ADN adecuado para ello, por recombinación homóloga y el mismo proceso se puede usar para intercambiar dicho primer fragmento de ADN con otro fragmento de ADN adecuado para ello.

La introducción de un vector, o un vector de expresión, en una célula huésped se puede efectuar por cualquier técnica de transformación o transfección disponible aplicable a dicha célula huésped como se sabe en la técnica. Tales técnicas de transformación o transfección comprenden transformación mediada por choque térmico (por ejemplo, de *E. coli*), transferencia de ADN conjugativo, electroporación, absorción de ADN mediada por PEG, absorción de ADN mediada por liposomas, lipofección, coprecipitación de ADN con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, introducción directa, por ejemplo, por microinyección o bombardeo de partículas, o introducción por medio de un virus, virión o partícula vírica.

La infección de, por ejemplo, cultivos de células HepG2 por virus VHB (por ejemplo, derivados del suero de un paciente o de un cultivo celular) normalmente no se produce pero se puede estimular por pretratamiento de las células huésped con dimetilsulfóxido (DMSO; (Paran et al., 2001)). Alternativamente, la digestión de VHB con proteasa V8 produce virus VHB infecciosos (Lu et al., 1996). Una modificación con proteasa similar de al menos otro hepadnavirus, el virus de la hepatitis de la marmota (WHV), produce también virus WHV que son infecciosos para células de hepatoblastoma humano (Lu et al., 2001). Se describió que la expresión de genes de VHB en células de hepatoblastoma aumenta significativamente bajando la temperatura de incubación de 37°C a 32°C (Kosovsky et al., 2000).

Los vectores adecuados para ensayar la eficacia de la replicación vírica, más particularmente, para ensayar la eficacia de la replicación de VHB, incluyen vectores víricos o vectores que comprenden al menos 1 unidad de genoma de VHB (longitud completa), preferiblemente más de 1 unidad de genoma de 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 de VHB. Un ejemplo de un sistema de vector vírico que permite la replicación vírica de VHB es un sistema de baculovirus, por ejemplo, como se describe por Isom y Harriet en la publicación de patente internacional No WO99/37821 o por Delaney et al., (Delaney et al., 1999). El nivel de replicación vírica se puede seguir midiendo o detectando uno o más de (i) secreción de un antígeno de VHB (HBsAg o HBeAg), (ii) expresión de transcritos de VHB (transcritos de 3,5 kb, 2,4 kb, 2,1 kb, 0,7

kb), (iii) la cantidad de intermedios replicativos de VHB (ADN circular relajado, ADN bicatenario o ADN monocatenario), (iv) la cantidad de ADN circular superenrollado (ccc) de VHB, (v) la cantidad de ADN de VHB extracelular secretado, (vi) la cantidad de partículas de VHB extracelularmente producidas, (vii) la cantidad de proteína HBcAg producida, (viii) la cantidad de proteína ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB producida, y (ix) la cantidad de proteína X de VHB producida. Otro ejemplo de un sistema de vector vírico que permite la replicación vírica de VHB es un sistema de vector que incluye un gen indicador (por ejemplo, un gen marcador seleccionable o un gen marcador cribable; por ejemplo, como se describe por Capon y Petropoulos en la patente en EE UU No 6242187), cuya expresión es indicativa del grado de replicación vírica.

Los sistemas de vectores víricos que permiten la replicación vírica de VHB son adecuados para comparar la eficacia de replicación de virus VHB de tipo salvaje con la eficacia de replicación de virus VHB mutantes. Se entiende que virus VHB mutantes son virus VHB que comprenden una mutación o un polimorfismo de ácido polinucleico bien en uno o más de los ORF de VHB y/o las secuencias reguladoras de VHB (por ejemplo, promotor, potenciador, terminador o señal de poliadenilación, bucle épsilon, señal de encapsulación, secuencia repetida, señal de empaquetamiento, sitio interno de entrada al ribosoma).

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una célula huésped que comprende un ácido polinucleico de VHB o un fragmento del mismo según la invención, o que comprende una proteína ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB o un fragmento de la misma según la invención, o que comprende una variante de VHB según la invención, o que comprende un vector según la invención. En una forma de realización específica, dicha célula huésped es una célula hepática de mamífero o una célula de hepatoma de mamífero como se ha descrito anteriormente.

La presente invención se refiere además a los productos de expresión de los ácidos polinucleicos aislados. Estos productos de expresión resultan de la expresión de cualquiera de los ácidos polinucleicos y/o fragmentos descritos anteriormente.

Dichos productos de expresión comprenden proteínas, péptidos, oligopéptidos, ARN o ARNm. Los términos "proteína", "péptido" u "oligopéptido", cuando se usan en el presente documento se refieren a aminoácidos en una forma polimérica de cualquier longitud. Dichos términos también incluyen modificaciones conocidas de aminoácidos tales como la formación de enlace disulfuro, cisteinilación, oxidación, glutationilación, metilación, acetilación, farnesilación, biotinilación, estearoilación, formilación, adición de ácido lipoico, fosforilación, sulfatación, ubiquitinación, miristoilación, palmitoilación, geranilgeranilación, ciclación (por ejemplo, formación de ácido piroglutámico), oxidación, desaminación, deshidratación, glicosilación (por ejemplo, pentosas, hexosaminas, N-acetilhexosaminas, desoxihexosas, hexosas, ácido siálico, etc.) y acilación así como residuos de aminoácidos no naturales, residuos de L-aminoácidos, y residuos de D-aminoácidos. Se puede producir un número de tales modificaciones de aminoácidos como resultado de modificación postraduccional como reconocerá el experto en la materia. Otras modificaciones incluyen la adición de un grupo químico a uno o más aminoácidos de una proteína, péptido u oligopéptido. Dichos grupos químicos incluyen, por ejemplo, biotina. Las proteínas, péptidos u oligopéptidos generalmente se pueden marcar además radiactivamente, quimioluminiscentemente, fluorescentemente, fosforescentemente o con tintes infrarrojos o con un marcador de Raman aumentado por superficie o partícula resonante de plasmón.

La presente invención se extiende a productos de expresión que comprenden al menos una sustitución y/o delección de aminoácidos en el gen de la polimerasa. En particular, la invención se refiere a productos de expresión que comprenden una sustitución de aminoácidos en el codón 181 del gen de la polimerasa, más en particular al que produce una sustitución de aminoácidos de alanina a serina en el codón 181 del gen de la polimerasa. Más en particular el producto de expresión comprende la sustitución de aminoácido rtA181S.

La presente invención también cubre productos de expresión que comprenden además de rtA181S sustituciones de aminoácidos adicionales situados en el dominio C de la polimerasa. Más preferiblemente, la sustitución de la metionina en el codón en posición 204 en el dominio C de la polimerasa. En particular se cubren los productos de expresión que comprenden al menos dos sustituciones de aminoácidos en la ADN polimerasa, una sustitución de la alanina a serina en el codón en posición 181 en el dominio B del gen de la polimerasa y una sustitución de la metionina en el codón en posición 204 en el dominio C de la polimerasa. La sustitución de la metionina en el codón en posición 204 se pretende que incluya cualquier otro aminoácidos diferente de metionina, preferiblemente la sustitución es a una isoleucina o una valina o una serina.

La presente invención también cubre productos de expresión que comprenden además de rtA181S sustituciones adicionales de aminoácidos en otros sitios de la polimerasa de VHB, preferiblemente al menos una sustitución de aminoácidos elegida del grupo de rtL180M, rtM204I o rtM204V o rtM204S y rtN236T. Las diferentes mutaciones en el codón 204 en un grupo se ha indicado por dos veces "o".

Los productos de expresión ejemplares comprenden la sustitución rtA181S en el dominio B de la polimerasa opcionalmente con la sustitución rtM204I en el dominio C de la polimerasa. En una forma de realización específica, dichos productos de expresión de VHB aislados comprenden una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14. Más específicamente, dicho ácido polinucleico de VHB

aislado se define por una secuencia elegida del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14.

Otro aspecto de la invención se refiere a fragmentos de los productos de expresión anteriormente mencionados, fragmentos que comprenden las sustituciones de aminoácidos descritas que producen una sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido y/o otros agentes anti-VHB. Estos fragmentos comprenden al menos la sustitución rtA181S.

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

Expresión incluye la producción de moléculas de ARN o moléculas de ARNm que comprenden los patrones genotípicos mutados divulgados. "Heterólogo" cuando se usa en referencia a secuencias de ácido polinucleico o proteína no significa lo mismo que nativo o secuencias flanqueantes conocidas. Las secuencias heterólogas incluyen otras secuencias del VHB, humanas, animales o microbianas, poliHis u otras etiquetas de afinidad, o secuencias completamente fabricadas. Los fragmentos típicamente incluirán el residuo variante más al menos 4 residuos flanqueantes totales repartidos a uno o ambos flancos del residuo mutante, habitualmente de 10 a 20 residuos en total.

La presente invención abarca además el aspecto de oligonucleótidos que son capaces de distinguir, en un ácido polinucleico de VHB o fragmento del mismo según la invención, un codón 181 que codifica serina en el dominio de la transcriptasa inversa de VHB de un codón 181 que codifica una alanina o una valina en el dominio de la transcriptasa inversa de VHB.

El término "oligonucleótido" como se denomina en el presente documento se pretende que sea un cebador o una sonda y puede ser monocatenario o bicatenario o puede ser parte de un ácido polinucleico que forma un triplex. Los oligonucleótidos se pueden hacer *in vitro* por medio de un método de amplificación de secuencia de nucleótidos. Si tal oligonucleótido amplificado es bicatenario, la conversión a una molécula monocatenaria se puede lograr por una exonucleasa adecuada dado que el oligonucleótido monocatenario deseado está protegido contra dicha actividad exonucleasa. Alternativamente, los oligonucleótidos derivan de plásmidos recombinantes que tienen insertos que incluyen las secuencias de nucleótidos correspondientes, si se necesita cortando el último fuera de los plásmidos clonados usando las nucleasas adecuadas y recuperándolos, por ejemplo, por fraccionamiento según el peso molecular. Los oligonucleótidos según la presente invención también pueden ser sintéticos, es decir, estar sintetizados químicamente, por ejemplo aplicando la química fosfo-triéster o fosforamidita convencional o a través de síntesis fotolitográfica (Beaucage, 2001).

En otra forma de realización específica, el oligonucleótido según la presente invención comprende además una modificación para unir dicho oligonucleótido a un soporte sólido.

Dicha modificación, por ejemplo, puede ser, una modificación de amina, tiol, 3'-propanolamina o Acrydite del oligonucleótido o puede comprender la adición de una cola homopolimérica (por ejemplo, una cola de oligo(dT) añadida enzimáticamente a través de una enzima transferasa terminal o añadida sintéticamente) al oligonucleótido. Si dicha cola homopolimérica se coloca en el extremo 3' del oligonucleótido o si se incorpora cualquier otra modificación 3'-terminal que previene la extensión enzimática en el oligonucleótido, la capacidad cebadora del oligonucleótido se puede disminuir o suprimir. Se describen otras modificaciones, por ejemplo, en (Beaucage, 2001).

Claramente, los oligonucleótidos según la presente invención que son ADN, ARN, APN o LNA, o que son cualquier quimera de los mismos están incorporados en la invención. Además se incorporan composiciones que comprenden al menos un oligonucleótido según la invención.

"Hibridación" es el proceso en donde secuencias de nucleótidos complementarios sustancialmente homólogas hibridan entre sí. El proceso de hibridación se puede producir enteramente en solución, es decir, ambos ácidos nucleicos complementarios están en solución. Las herramientas en biología molecular que se basan en tal proceso incluyen PCR, hibridación sustractiva y determinación de la secuencia de ADN. El proceso de hibridación también se puede producir con uno de los ácidos nucleicos complementarios inmovilizado a una matriz tal como bolas magnéticas, bolas de Sepharosa o cualquier otra resina o tipo de bolas. Las herramientas en biología molecular que se basan en tal proceso incluyen el aislamiento de ARNm poli (A+). El proceso de hibridación además se puede producir 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 portaobjetos de sílice fusionado (cuarzo) (el último conocido como matrices o micromatrices de ácidos nucleicos o como chips de ácidos nucleicos), una película de oro, una película de polipirrol, una fibra óptica o en, por ejemplo, un gel de poliacrilamida o un pocillo de microplaca. Las herramientas en biología molecular que se basan en tal proceso incluyen análisis de transferencia de geles de ARN y ADN, hibridación en colonia, hibridación en placa, hibridación inversa e hibridación de micromatrices. Para dejar que la hibridación se produzca, las moléculas de ácido nucleico generalmente se desnaturalizan de forma térmica, química (por ejemplo, mediante NaOH) o electroquímica para fundir una doble hebra en dos hebras

sencillas y/o eliminar horquillas o sondas 'balizas moleculares' (marcaje dual único) u otras estructuras secundarias de ácidos nucleicos monocatenarios.

Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención además pueden estar unidas a una secuencia guía externa (EGS) o una secuencia guía externa corta (SEGS). Dichas secuencias guías unidas a una secuencia diana proporcionan una estructura mínima que es reconocida como un sustrato por enzimas RNasa P (Werner y George en la patente en EE UU No. 5.877.162). Las secuencias de ácido nucleico de la invención unidas a una EGS o SEGS pueden encontrar aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de pacientes infectados con VHB.

Aspectos adicionales de la presente invención son métodos para detectar la presencia de un virus VHB en una muestra biológica; y/o para detectar resistencia a un fármaco antiviral de un virus VHB presente en una muestra biológica; y/o para detectar la presencia de un codón 181 que codifica serina o de un codón 181 que codifica serina y un codón elegido del grupo que consiste en un codón 180 que codifica metionina, un codón 204 que codifica isoleucina, un codón 204 que codifica valina, un codón 204 que codifica serina, y un codón 236 que codifica treonina en el dominio de la transcriptasa inversa de 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. Un "codón" en la presente invención puede además estar comprendido en un ácido (poli)nucleico monocatenario (sentido o antisentido) o bicatenario. Para derivar la secuencia de aminoácidos de una hebra antisentido, se necesita usar la correspondiente hebra sentido (el complemento invertido) para la traducción en la correspondiente secuencia de aminoácidos.

Actualmente está disponible un gran número de ensayos capaz de detectar secuencias de nucleótidos y polimorfismos de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, una mutación). Algunos de estos ensayos se basan en métodos físicos mientras que otros usan enfoques enzimáticos.

Con "métodos de detección física" se quiere decir en el presente contexto métodos de detección de polimorfismos de secuencia de nucleótidos que requieren uno o más procesos físicos para la detección aunque sin excluir el proceso enzimático de amplificación por PCR anterior de la secuencia de ADN diana que comprende uno o más polimorfismos de secuencia de nucleótidos. Dichos procesos físicos incluyen electroforesis, cromatografía, espectrometría, percepción de señal óptica y espectroscopía.

Los ensayos de detección de polimorfismos de secuencia de nucleótidos físicos incluyen métodos electroforéticos tales como polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP), electroforesis capilar desnaturizante constante (CDCE) y electroforesis en gel desnaturizante constante (CDGE) véase, por ejemplo Kristensen et al., 2001; electroforesis en gel en gradiente desnaturizante (DGGE), electroforesis en gel en gradiente doble (DGCE), electroforesis de zona capilar (CZE) también conocida como electroforesis capilar en solución libre (FSCE), CZE no isocrática, o electroforesis capilar en gradiente térmico (TGCE), barrido génico bidimensional (TDGS), electroforesis en gel sensible a conformación (CSGE), véase, por ejemplo Korkko et al., 1998, electroforesis en gel diagonal de matriz en microplaca (MADGE), véase, por ejemplo, Day et al., 1998 y análisis de conformación bicatenaria (DSCA), véase, por ejemplo, (Arguello et al., 1998). Una técnica similar se llama HMA (ensayo de movilidad de heteroduplex) pero la detección de dúplex de ADN se basa en tinción en el gel del ADN (Delwart et al., 1993). En HTA (ensayo de seguimiento de heteroduplex), una sonda radiomarcada se hibrida con un producto de PCR y los heteroduplex sonda-producto de PCR se separan por electroforesis en gel. Se ha descrito un HTA específico de sitio múltiple (Resch et al., 2001; Delwart et al., 1994).

Los métodos cromatográficos de análisis de conformación bicatenaria incluyen cromatografía líquida de alta resolución desnaturizante (DHPLC). Los ensayos de detección de polimorfismos de secuencia de nucleótidos físicos pueden ser eficaces para la identificación de mutaciones conocidas o nuevas y puede requerir confirmación por secuenciación directa de ADN lo que produce la separación de moléculas de ADN diana homo y heteroduplex por electroforesis desnaturizante. Dicha separación también se puede realizar por cromatografía líquida desnaturizante en donde la temperatura determina la sensibilidad. La DHPLC además se puede realizar en columnas capilares monolíticas que permiten la creación de sistema de matrices. La detección basada en fluorescencia es posible, así como el acoplamiento en serie a un espectrómetro de masas. La eficacia de la detección de polimorfismos de nucleótidos por DHPLC se puede aumentar añadiendo una pinza de CG al final del fragmento de ADN diana (Huber et al., 2001; Narayanaswami et al., 2001; Xiao et al., 2001).

Se ha usado con éxito MALDI-TOF MS (espectrometría de masas de desorción-ionización por laser asistida por matriz tiempo de vuelo) tanto como una herramienta de secuenciación directa de ADN para fragmentos de ADN de menos de 100 pb y como una herramienta para la detección de polimorfismos de nucleótido único. La hibridación de oligómeros de APN (ácido peptidonucleico) específicos de alelo con ADN diana monocatenario ha demostrado ser altamente compatible con análisis por MALDI-TOF MS ((Griffin et al., 2000) y referencias en el mismo).

Aún considerado como el 'método de referencia' para la determinación de los polimorfismos de secuencia de nucleótidos es la secuenciación directa de ADN como por ejemplo diseñada por Maxam y Gilbert (Maxam et al., 1977). El método más común y extendido de secuenciación de ADN se basa en la reacción de Sanger o reacción de

terminación de cadena por dideoxinucleótido (Sanger et al., 1977). Los cebadores de secuenciación se pueden marcar para la detección de las cadenas terminadas o el marcaje interno del producto de extensión es posible. Otros métodos de secuenciación de ADN son pirosecuenciación (véase, por ejemplo, Williams 2000) y secuenciación de ciclo (Yager et al., 1999; Ruano et al., 1991).

En el futuro cercano, la secuenciación de nanoporo también podría estar disponible (Meller et al., 2000). Otros métodos de secuenciación de ADN incluyen secuenciación por resonancia molecular y secuenciación diagnóstica combinando corte específico de ADN seguido por análisis espectrométrico de masas de los fragmentos (véase, por ejemplo, Stanssens y Zabeau 2000 - documento WO00/66771).

Otro método para determinar variaciones en la secuencia de nucleótidos comprende secuenciación por dideoxinucleótido (método de Sanger) en donde los dNTP regulares se sustituyen por dNTP modificados (tal como α -tio dNTP) y otras variantes (Dahlhauser 2000 - documento US 6150105).

Aún se conoce otra metodología de secuenciación de ADN como 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 desconocida (Drmanac et al., 1993).

Dichas matrices de oligonucleótidos de alta densidad o chips de ADN eliminan la necesidad de diseñar un conjunto de oligonucleótidos que hibridan específicamente en las mismas condiciones que un conjunto de secuencias de nucleótidos polimórficos. El último enfoque se aplica en ensayos de transferencia inversa convencional ajustando cuidadosamente la longitud, polaridad y posición del/de los oligonucleótido(s) mal emparejado(s) en la sonda de oligonucleótidos (Saiki et al., 1989). Los ensayos de hibridación de transferencia inversa convencional para el genotipado y detección de polimorfismos de secuencia de nucleótidos, sin embargo, se han comercializado con éxito, por ejemplo, en el formato LiPA (Ensayo de sonda en tira) (Innogenetics, Gante, Bélgica). (Stuyver et al., 1997; Stuyver et al., 1996).

Estará claro para el experto en la materia que se pueden hacer muchas variaciones y combinaciones a la secuencia de nucleótidos y métodos de detección de polimorfismos de secuencia de nucleótidos descritos anteriormente. Estos se incorporan por este medio a la presente invención.

Los oligonucleótidos según la invención como se han descrito anteriormente se pueden adaptar de modo que se pueden usar en cualquiera de los métodos para la detección de secuencias de nucleótidos o polimorfismos en las mismas como se ha descrito anteriormente.

Por tanto, en una forma de realización adicional de la presente invención, el oligonucleótido según la invención comprende además una extensión terminal y/o una horquilla o estructura de sonda de 'baliza molecular', en donde dicha extensión y/o estructura en horquilla se incorpora en cualquier extremo o en ambos extremos de dicho oligonucleótido. Dicha extensión terminal es útil para, por ejemplo, hibridar 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 con cola mediante una enzima, ribozima o ADNzima.

En una forma de realización adicional de la presente invención, el oligonucleótido según la invención está comprendido en una sonda candado que incorpora en cualquier cebador extremo que, después de hibridar con un ADN diana, se pueden ligar, o con una estructura de horquilla.

En otra forma de realización, el oligonucleótido de la presente invención tiene una modificación que permite la detección y/o captura de dicho oligonucleótido. La detección y/o captura de dicho oligonucleótido permite además la detección y/o captura del ácido nucleico diana hibridado con el mismo. La interacción entre dicho oligonucleótido y dicho ácido nucleico diana se puede estabilizar entrecruzando ambos mediante la introducción de una modificación de entrecruzamiento en dicho oligonucleótido y/o dicho ácido nucleico diana.

En aún otra forma de realización, el oligonucleótido de la invención comprende un nucleótido mal emparejado 3'-terminal y, opcionalmente, un nucleótido mal emparejado 3'-proximal. Dichos oligonucleótidos son particularmente útiles para realizar PCR específica de polimorfismo y LCR (reacción en cadena de la ligasa) o GAP-LCR.

Además en la presente invención está comprendida una composición que comprende al menos un oligonucleótido según la descripción dada anteriormente.

Estará claro para el experto en la materia que cualquiera de los métodos descritos anteriormente para detectar secuencias de nucleótidos y polimorfismos en las mismas se puede utilizar para métodos para detectar la presencia de un virus VHB en una muestra biológica; y/o para detectar resistencia a un fármaco antiviral de un virus VHB presente en una muestra biológica; y/o para detectar la presencia de un codón 181 que codifica serina, o de un codón 181 que codifica serina y un codón elegido del grupo que consiste en un codón 180 que codifica metionina, un codón 204 que codifica isoleucina, un codón 204 que codifica valina, un codón 204 que codifica serina, y un

codón 236 que codifica treonina en el dominio de la transcriptasa inversa de VHB de un virus VHB presente en una muestra biológica.

Por tanto, los siguientes aspectos que cubren tales métodos de detección y kits diagnósticos, por ejemplo, ensayos de sondas en tira, basados en tales métodos de detección se incluyen además en la presente invención.

Un aspecto de la invención se refiere a un método para detectar la presencia de un virus VHB en una muestra biológica y/o a un método para detectar la resistencia a un fármacos antiviral de un virus VHB presente en una muestra biológica, dichos métodos comprenden el paso de detectar la presencia de un ácido polinucleico de VHB o un fragmento del mismo según la invención. Una forma de realización específica al mismo incluye dicho método que comprende los pasos de:

- a. obtener un ácido polinucleico de VHB diana de dicha muestra biológica en donde dicho ácido polinucleico de VHB diana se sospecha que comprende un codón 181 que codifica serina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, y opcionalmente uno o más codones elegidos del grupo que consiste en un codón 180 que codifica metionina, un codón 204 que codifica isoleucina, o un codón 204 que codifica valina, o un codón 204 que codifica serina, y un codón 236 que codifica treonina en el dominio de la transcriptasa inversa de VHB de un virus VHB;
- b. obtener la secuencia del ácido nucleico del ácido polinucleico de VHB diana de (a);
- c. inferir, de la secuencia del ácido nucleico obtenida en (b), la presencia de dicho codón 181 que codifica serina del dominio de la transcriptasa inversa de VHB, y opcionalmente uno o más codones elegidos del grupo mencionado en (a),

y, 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 forma de realización específica al mismo incluye dichos métodos que comprenden:

- a. obtener un ácido polinucleico de VHB diana presente en dicha muestra biológica y/o obtener la secuencia de nucleótidos del mismo;
- b. cuando sea apropiado, desnaturizar parcial o completamente, o modificar enzimáticamente los ácidos polinucleicos obtenidos en el paso (a);
- c. cuando sea apropiado, renaturalizar los ácidos polinucleicos desnaturizados obtenidos en el paso (b), preferiblemente en presencia de al menos un oligonucleótido capaz de distinguir, en un ácido polinucleico de VHB o un fragmento del mismo un codón 181 que codifica serina en el dominio de la transcriptasa inversa de VHB de un codón 181 que codifica una alanina o una valina en el dominio de la transcriptasa inversa de VHB y, si es necesario, incluir el paso de modificar enzimáticamente, incluyendo extender, dicho oligonucleótido;
- d. cuando sea apropiado, detección de los ácidos polinucleicos de VHB parcial o completamente desnaturizados obtenidos en el paso (b), y/o de los híbridos formados en el paso (c), y/o de las modificaciones enzimáticas obtenidas en el paso (b) y/o (c);
- e. inferir de uno o más de los datos de los siguientes grupos: los ácidos polinucleicos de VHB parcial o completamente desnaturizados, los híbridos, las modificaciones enzimáticas, todos detectados en el paso (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.

En aún otra forma de realización específica al mismo, dicho método comprende:

- a. obtener un ácido polinucleico de VHB diana de dicha muestra biológica en donde dicho ácido polinucleico de VHB diana se sospecha que comprende un codón 181 que codifica serina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, opcionalmente junto con uno o más codones elegidos del grupo que consiste en un codón 180 que codifica metionina, un codón 204 que codifica isoleucina o un codón 204 que codifica valina o un codón 204 que codifica serina, y un codón 236 que codifica treonina en el dominio de la transcriptasa inversa de VHB de un VHB;
- b. poner en contacto el ácido polinucleico de VHB diana de (a) con un oligonucleótido capaz de distinguir un codón 181 que codifica una serina de un codón 181 que codifica una alanina o valina, y opcionalmente también capaz de distinguir uno o más codones elegidos del grupo que consiste en un codón 180 que codifica una leucina de un codón 180 que codifica una metionina, un codón 204 que codifica una isoleucina de un codón 204 que codifica una metionina, valina o serina, y un codón 236 que codifica una asparragina de un codón 236 que codifica una treonina;
- c. inferir, de la señal distinguidora obtenida en (b), la presencia de dicho codón 181 que codifica serina de la transcriptasa inversa del VHB, opcionalmente junto con dicho codón 180 que codifica metionina o dicho codón 204 que codifica isoleucina o dicho codón 236 que codifica asparragina del dominio de la transcriptasa inversa de VHB y, 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.

En los últimos métodos, dicha distinción en (b) generalmente se basa en hibridación y dicha señal distinguidora en (c) es una señal de hibridación.

Con un "oligonucleótido capaz de distinguir, en un ácido (poli)nucleico, un codón que codifica un aminoácido X1 (cualquier aminoácido) de un codón que codifica un aminoácido X2 (cualquier aminoácido diferente de X1)" se quiere decir un oligonucleótido que produce una señal cuando se pone en contacto con un ácido (poli)nucleico que comprende dicho codón que codifica el aminoácido X1 pero que no produce señal cuando se pone en contacto con un ácido (poli)nucleico que comprende dicho codón que codifica el aminoácido X2. Dicha señal, también denominada "señal distinguidora", 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 como se ha descrito anteriormente. Dichas señales incluyen, por ejemplo, señales fluorescentes, señales (químio)luminiscentes, señales radioactivas, señales lumínicas, señales de hibridación, señales espectrométricas de masa, señales espectrométricas, señales cromatográficas, señales eléctricas, señales electrónicas, señales electroforéticas, señales de PCR en tiempo real, señales de PCR, señales de LCR, señales de ensayos CFP y señales de ensayo Invader.

Con "poner en contacto un oligonucleótido con un ácido (poli)nucleico" o viceversa generalmente se quiere decir hibridación de dicho oligonucleótido con dicho ácido (poli)nucleico o hibridar dicho oligonucleótido con dicho ácido (poli)nucleico. "Poner en contacto un oligonucleótido con un ácido (poli)nucleico" no excluye y por tanto puede comprender además la modificación enzimática de dicho oligonucleótido en donde dicha modificación se puede producir en las extremidades de dicho oligonucleótido y/o internamente en la secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido. Los ejemplos de modificaciones enzimáticas de oligonucleótidos se dan en, por ejemplo, los ensayos capaces de detectar secuencias de nucleótidos y polimorfismos de secuencias de nucleótidos descritos en el presente documento.

En otra forma de realización de la invención dichos métodos comprenden además, donde sea aplicable, alinear y/o comparar la secuencia de ácido nucleico obtenida con un conjunto de secuencias de ácido nucleico de VHB contenidas en una base de datos.

Con "base de datos" se quiere decir en el presente contexto una colección de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos, más específicamente de secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos de VHB. Se debe entender que una base de datos comprende al menos una secuencia de ácido nucleico o al menos una de aminoácidos. Una base de datos se puede registrar en una variedad de soportes. Tales soportes incluyen soportes legibles por ordenador.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit 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 en una muestra biológica, dicho kit comprende al menos un medio para detectar la presencia de un ácido polinucleico de VHB según la invención.

Una forma de realización específico al mismo incluye dicho kit diagnóstico que comprende:

- a. un medio para inferir, de la secuencia de ácido nucleico de un ácido polinucleico diana sospechoso de comprender un codón 181 que codifica serina del dominio de la transcriptasa inversa de VHB opcionalmente junto a uno o más codones del grupo que consiste en un codón 180 que codifica metionina, un codón 204 que codifica isoleucina y un codón 236 que codifica asparragina del dominio de la transcriptasa inversa de VHB, la presencia de dicho codón 181 que codifica serina del dominio de la transcriptasa inversa de VHB opcionalmente junto a uno o más codones del grupo que consiste en un codón 180 que codifica metionina, un codón 204 que codifica isoleucina y un codón 236 que codifica asparragina del dominio de la transcriptasa inversa de VHB, y, de ello, la presencia en dicha muestra biológica de dicho VHB y opcionalmente,
- b. un medio para obtener la secuencia de ácido nucleico del ácido polinucleico diana.

En una forma de realización específica adicional, dicho kit diagnóstico comprende un oligonucleótido capaz de distinguir, en dicho ácido polinucleico de VHB, un codón 181 que codifica una serina de un codón 181 que codifica una alanina o valina y un oligonucleótido adicional capaz de distinguir, en dicho ácido polinucleico de VHB, un codón 180 que codifica una metionina de un codón 180 que codifica una leucina.

En una forma de realización particular adicional, dicho kit diagnóstico comprende un oligonucleótido capaz de distinguir, en dicho ácido polinucleico de VHB, un codón 181 que codifica una serina de un codón 181 que codifica una alanina o valina y también un codón 180 que codifica una metionina de un codón 180 que codifica una leucina.

En aún una forma de realización específica adicional, dicho kit diagnóstico comprende un oligonucleótido capaz de distinguir, en dicho ácido polinucleico de VHB, un codón 181 que codifica una serina de un codón 181 que codifica una alanina o valina y al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres

oligonucleótido(s) adicional(es) elegidos del siguiente grupo de oligonucleótidos: un oligonucleótido capaz de distinguir un codón 236 que codifica una treonina de un codón 236 que codifica una asparragina; un oligonucleótido capaz de distinguir, en dicho ácido polinucleico de VHB, un codón 204 que codifica una isoleucina de un codón 204 que codifica una metionina o valina o serina.

5 En aún otra forma de realización, dicho kit diagnóstico comprende además un medio para detectar la señal distinguidora obtenida al poner en contacto dicho ácido polinucleico de VHB con dicho oligonucleótido u oligonucleótidos.

10 Además se incorporan dichos kits diagnósticos en donde dicho oligonucleótido u oligonucleótidos están unidos o inmovilizados en un soporte sólido.

Otra forma de realización específica al mismo incluye dichos kits diagnósticos que comprenden:

- 15 a. un medio para obtener un ácido polinucleico de VHB diana en dicha muestra biológica y/o obtener la secuencia de nucleótidos del mismo;
- b. cuando sea apropiado, al menos un par de oligonucleótidos adecuados para la amplificación de un ácido polinucleico de VHB diana según la invención;
- 20 c. cuando sea apropiado, un medio para desnaturalizar ácidos nucleicos;
- 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;
- f. cuando sea apropiado, un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón;
- 25 g. cuando sea apropiado, una solución de lavado, o componentes necesarios para producir dicha solución;
- h. cuando sea apropiado, un medio para detectar ácidos polinucleicos parcial o completamente desnaturalizados 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 a una localización conocida en un soporte sólido;
- 30 j. un medio para inferir de los ácidos polinucleicos parcial o completamente desnaturalizados y/o de los híbridos y/o de la modificaciones enzimáticas, todos detectados en (h), y/o de la secuencia de nucleótidos obtenida en (a), la presencia de dicho virus VHB en dicha muestra biológica.

35 Con “un medio para inferir, de una secuencia de ácido nucleico, la presencia del codón Y (Y es el número indicado) que codifica el aminoácido X (X es el aminoácido indicado)” se quiere decir cualquier técnica o método para (i) localizar en dicha secuencia de ácido nucleico dicho codón Y, (ii) para traducir dicho codón Y al aminoácido codificado por el codón Y, y (iii) para concluir de (ii) si el aminoácido codificado por dicho codón Y es el mismo o es diferente de dicho aminoácido X. Dicho medio puede incluir métodos en donde de (i) a (iii) se realizan todos manualmente y/o computacionalmente. Dicho medio puede incluir alinear y/o comparar una secuencia de ácido nucleico obtenida con un conjunto de secuencias de ácidos nucleico contenidas en una base de datos. Dicho medio puede incluir además que el resultado de (i) a (iii) se presente en forma de un informe en donde dicho informe puede estar en forma de papel, en forma electrónica o en un soporte o medio legible por ordenador. Dicho medio puede incluir además la búsqueda de 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 se pueden o no incluir en dicho informe.

Una forma de realización adicional cubre cualquiera de los métodos anteriores de la invención caracterizada además en que dichos métodos se basan en determinar la secuencia de ácido nucleico.

50 Una forma de realización adicional cubre cualquiera de los métodos anteriores de la invención caracterizada además en que dichos métodos se basan en un ensayo de hibridación.

Una forma de realización adicional cubre cualquiera de los métodos anteriores de la invención caracterizada además en que dichos métodos se basan en un ensayo de hibridación inversa.

55 Una forma de realización adicional cubre cualquiera de los kits diagnósticos anteriores de la invención caracterizada además en que dichos kits diagnósticos se basan en determinar la secuencia de ácido nucleico.

60 Una forma de realización adicional cubre cualquiera de los kits diagnósticos anteriores de la invención caracterizada además en que dichos kits diagnósticos se basan en un ensayo de hibridación.

Una forma de realización adicional cubre cualquiera de los kits diagnósticos anteriores de la invención caracterizada además en que dichos kit diagnósticos se basan en un ensayo de hibridación inversa.

65 Una forma de realización adicional cubre cualquiera de los kits diagnósticos anteriores de la invención caracterizada además en que dichos kit diagnósticos se basan en un ensayo de sonda en tira.

La invención proporciona además un método para detectar la resistencia a un fármaco antiviral para un virus VHB presente en una muestra biológica, dicho método comprende el paso de detectar la presencia de una proteína ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB o fragmento según la invención. Dicha detección puede incluir los pasos de determinar la secuencia de aminoácidos de la proteína ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB o de una parte de la misma obtenida, por ejemplo, después de digestión proteolítica y separación de los fragmentos proteicos resultantes por medios cromatográficos y/o electroforéticos. Después de la electroforesis, un fragmento proteico se puede cortar y finalmente eluir del gel antes de la secuenciación. Alternativamente, la electroforesis en gel de la proteína se combina con transferencia mediante la cual las proteínas se transfieren a un soporte de membrana (por ejemplo, nitrocelulosa, PVDF, nailon). La proteína o fragmento proteico que se va a secuenciar se puede cortar en el último caso del soporte de membrana. Alternativamente, la proteína ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB según la invención se detecta usando un anticuerpo que específicamente reconoce la serina en la posición 181 del dominio de transcriptasa inversa de VHB. En particular, dicho anticuerpo no debe reconocer una alanina o valina en dicha posición 181. En aún otra alternativa, la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB según la invención se detecta fenotípicamente, es decir, dicha ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB puede mostrar un único patrón de sensibilidad a fármacos antivirales no compartido con ADN polimerasas/transcriptasas inversas de VHB que comprenden un codón 181 que codifica una alanina o valina. La detección fenotípica de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB según la invención incluye por tanto, por ejemplo, los pasos de determinar la sensibilidad de una actividad ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB de un virus VHB presente en una muestra biológica a un panel de fármacos antivirales. Alternativamente, la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB de un virus VHB presente en una muestra biológica y sospechosa de comprender un ácido polinucleico según la invención se produce en un sistema recombinante y se determina la sensibilidad a un panel de fármacos antivirales de una actividad de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB recombinantemente expresada.

Estará claro para el experto en la materia que el sistema de vector que permite la replicación vírica del VHB o que permite la producción de una proteína codificada por VHB, o una parte funcional de la misma, es adecuado para probar o ensayar el efecto de un fármaco antiviral sobre la replicación vírica de VHB o la función de la proteína codificada por VHB (o parte de la misma), respectivamente. En particular, tales ensayos se pueden realizar con un ácido polinucleico de VHB mutante según la presente invención o con una ADN polimerasa de VHB mutante o proteína HBsAg mutante según la presente invención. Los resultados de tales ensayos se pueden comparar con los resultados de ensayos similares realizados con ácidos polinucleicos de VHB de tipo salvaje o proteínas de VHB de tipo salvaje, o partes funcionales de las mismas.

El experto en la materia apreciará que la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB tiene múltiples funciones biológicas/bioquímicas reconocidas incluyendo la actividad primasa, actividad transcriptasa inversa (actividad ADN polimerasa dependiente de ARN), actividad ADN polimerasa (actividad ADN polimerasa dependiente de ADN) y actividad RNasa (RNasa H) y además está implicada en la interacción con la proteína antígeno nuclear (HBcAg) y en la encapsulación del ADN vírico. La ADN polimerasa de VHB de tipo salvaje o mutante se puede aislar de partículas de VHB presentes en el suero de un paciente o se pueden producir, por ejemplo, por una línea celular de hepatoma establemente transfectada. Alternativamente, dicha ADN polimerasa de VHB se expresa y produce en un sistema heterólogo (por ejemplo, *S. cerevisiae*) o usando un sistema de expresión de baculovirus, un sistema de traducción mitocondrial (por ejemplo, como se describe en la patente en EE UU No 6.100.068) o en un sistema sin células, por ejemplo, un sistema de transcripción-traducción acopladas en lisado de reticulocitos de conejo (Li et al., 1999). Se pueden producir secuencias de ADN mutante de la ADN polimerasa de VHB por mutagénesis *in vitro*. Se puede alcanzar la purificación sustancial de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB producida si, por ejemplo, un epítipo heterólogo (por ejemplo, el epítipo FLAG, cfr. anteriormente) se introduce en o se fusiona a dicha ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB. Dicho epítipo permite la purificación de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB, por ejemplo, en una columna de afinidad que contiene anticuerpos anti-epítipo heterólogo inmovilizados (por ejemplo, anticuerpos monoclonales M2 anti-FLAG). Alternativamente, la polimerasa/transcriptasa inversa de VHB recombinante es parte de una proteína de fusión, dicha proteína de fusión comprende además, por ejemplo, una etiqueta de histidina, una fracción de unión a hidratos de carbono (por ejemplo, lectina, proteína de unión a maltosa) o β -galactosidasa. La purificación sustancial de dicha proteína de fusión es alcanzable, por ejemplo, por cromatografía de afinidad en metales (en el que en que una etiqueta de histidina esté presente), cromatografía de afinidad de hidratos de carbono (en el caso de que una fracción de unión a hidratos de carbono esté presente) o cromatografía de inmunoafinidad usando un anticuerpo contra la proteína fusionada a la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB, por ejemplo, β -galactosidasa. Opcionalmente, dicha proteína de fusión es cortable por una proteasa adecuada (por ejemplo, proteasa factor Xa) de modo que la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB es obtenible separada de la otra fracción de la proteína de fusión, por ejemplo, mediante otra ronda de purificación como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, se aíslan partículas víricas de VHB de una muestra muestra biológica por técnicas tales como captura de afinidad (por ejemplo, usando anticuerpos contra el antígeno de superficie vírica de VHB o usando una proteína receptor para dicho antígeno de superficie o anticuerpos anti-idiotípicos para dicha proteína receptor, cfr. posteriormente) o centrifugación en gradiente. Las partículas víricas de VHB obtenibles mediante esta u otras formas son además susceptibles a análisis de, por ejemplo, la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB o de los ácidos nucleicos de VHB.

En aún otra alternativa, el complejo nuclear replicante multiproteico o núcleo replicante intracelular se purifican de células hepáticas infectadas y las preparaciones obtenidas que comprenden la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB se usan para ensayar las funciones y actividades de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB (Urban et al., 2000). Claramente, dicha purificación de partículas víricas o del complejo nuclear replicante se puede aplicar para obtener dichas partículas o complejo nuclear de células infectadas con variantes de VHB que comprenden la mutación o mutaciones de la presente invención.

Se han descrito condiciones mejoradas para ensayar la actividad transcriptasa inversa vírica (Bird y Chang-Yeh en la patente en EE UU No. 5.817.457) e incluyen pH ácido y temperaturas elevadas. Las condiciones de reacción para ensayar la actividad de RNasa H derivada de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB han sido descritas, por ejemplo, por Yoon et al., en la patente en EE UU No. 6.071.734. Las condiciones de ensayo para determinar la actividad primasa, polimerasa y transcriptasa inversa de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB producida *in vitro*, o fragmentos de la misma, han sido descritas por Li et al., (Li et al., 1999). Los ensayos para determinar interacciones proteína-proteína, por ejemplo, interacción entre la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB y HBcAg, incluye ensayos de doble y triple híbrido y análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA). (Bartel et al., 19997 en la patente en EE UU No 5.928.868).

Otro aspecto adicional de la invención comprende un ensayo que determina el efecto de un fármaco antiviral en la función de un HBsAg mutante según la presente invención. El experto en la materia apreciará que el HBsAg de VHB tiene múltiples funciones biológicas/bioquímicas reconocidas incluyendo funciones en unión/entrada vírica en la célula huésped (es decir, un papel en infectividad de VHB), en el ensamblaje de partículas víricas y en la secreción de partículas víricas. HBsAg es además una diana para el sistema inmunitario del huésped y se han descrito mutantes de 'escape'. El anticuerpo contra HBsAg, HBIG, se usa con frecuencia como un medio de inmunización pasivo en pacientes que han experimentado trasplante de hígado. Se puede obtener HBsAg de tipo salvaje o mutante como se ha descrito anteriormente para la ADN polimerasa de VHB. Alternativamente, HBsAg se recupera por interacción de afinidad con anticuerpos contra HBsAg o con una proteína receptor de HBsAg o con un anticuerpo anti-idiotípico contra dicha proteína receptor de HBsAg, dichas proteínas receptor descritas incluyen albúmina humana monomérica y polimérica (Eibl et al., en la patente en EE UU No. 5.576.175 y Machida et al., 1984, respectivamente) y endonexina II/anexina IV (Yap en la patente europea No. EP 0672136). Las partículas víricas de VHB y VHD (virus de la hepatitis delta) se pueden aislar de una muestra biológica por técnicas tales como captura de afinidad, por ejemplo, usando anticuerpos contra el antígeno de superficie vírica de VHB o usando un receptor para el antígeno de superficie vírica de VHB o anticuerpos anti-idiotípicos hacia los mismos.

En un aspecto alternativo de la invención, se ensaya la actividad de una ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB, incluyendo las ADN polimerasas/transcriptasas inversas de VHB mutantes de la invención, o la sensibilidad de las mismas a compuestos antivirales en células huésped que contienen una mutación condicional en la ADN polimerasa endógena. Como tal, la expresión de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB puede posiblemente rescatar el crecimiento de dichas células huésped mutantes en condiciones restrictivas. La sensibilidad de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB a compuestos antivirales se puede ensayar midiendo el nivel de crecimiento de dichas células huéspedes mutantes en condiciones restrictivas y en presencia de un compuesto antiviral. Dicho crecimiento posteriormente se compara al crecimiento de dichas células huéspedes mutantes en condiciones restrictivas y en ausencia de dicho compuesto antiviral.

En un aspecto alternativo más 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 son útiles como un modelo para infección por VHB humano o como un modelo para evaluar compuestos, terapias y profilaxis anti-VHB. Dichos animales no humanos modelo han sido descritos, por ejemplo, por Reisner en las patentes en EE UU No 5.849.897 y 8.585.328. Muchos fármacos antivirales contra el VHB (fármacos antivirales de VHB) se mencionan anteriormente. Un aspecto adicional de la invención por tanto incluye un método *in vitro* para cribar fármacos activos contra un virus VHB que comprende un ácido polinucleico según la invención o que comprende una ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB según la invención, dicho método 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 inhibitor de dicho fármaco en la replicación de dicho VHB.

En una forma de realización específica al mismo, dicho método comprende además realizar los pasos (a), (b) y (c) con un virus VHB de tipo salvaje y comparar el efecto inhibitor de dicho fármaco en la replicación de dicho virus VHB de tipo salvaje con el efecto inhibitor de dicho fármaco en la replicación de dicho virus VHB que comprende un ácido polinucleico según la invención. En aún otra forma de realización más al mismo se incluyen dichos métodos que comprenden obtener dicho virus VHB de una muestra biológica.

Aún otra forma de realización más de la invención incluye un método *in vitro* para cribar fármacos activos contra un virus VHB que comprende un ácido polinucleico según la invención o que comprende una ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB según la invención, dicho método comprende:

- a. medir una actividad ADN polimerasa/transcriptasa inversa de dicho virus VHB en ausencia de dicho fármaco;
- b. medir la misma actividad ADN polimerasa/transcriptasa inversa que en (a) de dicho virus VHB en presencia de dicho fármaco;
- c. inferir de (a) y (b) el efecto inhibidor de dicho fármaco en dicha actividad ADN polimerasa/transcriptasa inversa de dicho virus VHB.

En una forma de realización específica al mismo se incluye dicho método que comprende además realizar los pasos (a), (b) y (c) con un virus VHB de tipo salvaje y comparar el efecto inhibidor de dicho fármaco en una actividad ADN polimerasa/transcriptasa inversa de dicho virus VHB de tipo salvaje con el efecto inhibidor de dicho fármaco en dicha actividad ADN polimerasa/transcriptasa inversa de dicho virus VHB que comprende un ácido polinucleico según la invención. En aún otra forma de realización más específica al mismo, se incluyen dichos métodos que comprenden obtener dicho virus VHB de una muestra biológica. Con "una actividad ADN polimerasa/transcriptasa inversa" se quiere decir cualquiera de las actividades biológicas o bioquímicas de la ADN polimerasa/transcriptasa inversa de VHB como se ha mencionado anteriormente.

La invención incorpora además anticuerpos y anticuerpos anti-idiotípicos contra dichas variantes de VHB aisladas y/o dicho antígeno de superficie vírica pequeño de VHB aislado, o dichas partes del mismo, y/o dichos antígenos víricos medianos y/o grandes de VHB. En una forma de realización específica a la misma, dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En una forma de realización específica adicional, dichos anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanizados.

Además en la invención se incorpora el uso de dichos anticuerpos en métodos inmunológicos para detectar dichas variantes de VHB y/o dicho antígeno de superficie vírica pequeño de VHB, o dichas partes del mismo, y/o dichos antígenos víricos medianos y/o grandes de VHB en una muestra biológica. En una forma de realización específica a la misma, dichos anticuerpos se usan en un método para diagnosticar una infección por VHB. En una forma de realización adicional, dichos anticuerpos son parte de un kit diagnóstico capaz de detectar una infección por VHB.

En otra forma de realización de la invención se cubre el uso de un método de la invención o un kit diagnóstico de la invención para seguir la evolución de una infección por VHB.

Una forma de realización adicional cubre el uso de un método de la invención o un kit diagnóstico de la invención para seguir la aparición de resistencia a un fármaco antiviral.

Otra forma de realización adicional cubre el uso de un método de la invención o un kit diagnóstico de la invención para adaptar una pauta terapéutica contra infección por VHB debido a la aparición de resistencia a un fármaco antiviral.

"Anticuerpos" incluye anticuerpos monoclonales, policlonales, sintéticos o de cadena pesada de camello así como fragmentos de anticuerpo tales como fragmentos Fab, Fv o scFv.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar por técnicas como se describen en, por ejemplo, Liddle et al., (Liddle et al., 1991) que comprenden la fusión de células de mieloma de ratón a células de bazo derivadas de animales inmunizados. Además, se pueden obtener anticuerpos o fragmentos de los mismos hacia moléculas o fragmentos de las mismas usando métodos como se describe en, por ejemplo, Harlow et al. (Harlow et al., 1988). En el caso de anticuerpos dirigidos contra péptidos pequeños tales como fragmentos de una proteína de la invención, dichos péptidos generalmente se acoplan a una proteína soporte antes de la inmunización de los animales. Tales soportes proteicos incluyen hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina bovina (BSA), ovoalbúmina y toxoide tetánico. La proteína soporte aumenta la respuesta inmunitaria del animal y proporciona epítopos para sitios de unión a receptores de células T. El término "anticuerpos" incluye además derivados de los mismos tales como anticuerpos marcados. Los anticuerpos generalmente se pueden marcar radioactiva, quimioluminiscente, fluorescente, fosforescente, con tintes infrarrojos o con un marcador de Raman aumentado por superficie o partícula resonante de plasmón. Los marcadores de anticuerpos incluyen fosfatasa alcalina, PKH2, PKH26, PKH67, fluoresceína (FITC), Hoechst 33258, R-ficoeritrina (PE), rodamina (TRICT), Quantum Red, Texas Red, Cy3, biotina, agarosa, peroxidasa y esferas de oro. Las herramientas en biología molecular que se basan en anticuerpos contra una proteína incluyen análisis de transferencia de geles de proteína, cribado de librerías de expresión que permite la identificación de genes, métodos cuantitativos de proteínas incluyendo ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), RIA (radioinmunoensayo) y LIA (inmunoensayo en tira), purificación de inmuoafinidad de proteínas, inmunoprecipitación de proteínas e inmunolocalización de proteínas.

Según la presente invención, se encontró por primera vez un patrón de mutación novedoso, A181S+M204I, que muestra resistencia cruzada tanto a lamivudina como adefovir. Este patrón de mutación se detectó por secuenciación directa de ADN de VHB extraído de muestras de suero obtenidas tanto antes como después del tratamiento con adefovir lo que implica que este patrón de mutación de resistencia cruzada era principalmente no sensible a adefovir (figura 2).

Aunque lamivudina y adefovir tienen efectos antivirales fuertes, el desarrollo de mutantes que producen resistencia a fármacos presenta un problema importante en el tratamiento de infecciones crónicas de VHB. Además, la existencia de patrones de mutación de VHB con perfil de resistencia cruzada plantea una preocupación principal debido a la posibilidad de fracaso de las terapias de combinación. Adefovir se ha considerado generalmente como una buena opción de tratamiento en el tratamiento de pacientes con fracaso en la terapia de lamivudina debido a VHB resistente al fármaco.

Sin embargo según la presente invención, el uso de adefovir dipivoxilo en combinación con lamivudina durante la terapia ni suprimió la replicación de VHB ni disminuyó los niveles de ALT en suero (véase específicamente la figura 1), lo que sugiere que las variantes A181S y A181S + M204I demuestran resistencia cruzada *in vivo* tanto para adefovir como lamivudina. La mutación A181S se detectó en todas las muestras de suero disponibles empezando desde el mes 28 de comienzo del tratamiento antiviral, es decir, antes de la recaída virológica y bioquímica. La mutación M204I, por otra parte, no se detectó en la primera muestra de suero disponible en el mes 28 pero surgió 3 meses después en el mes 31, es decir, en el momento de la recaída.

Los descubrimientos *in vitro* confirmaron que este mutante de VHB es resistente a adefovir incluso cuando se trata con altas concentraciones, tal como 10 μ M de adefovir dipivoxilo (véase especialmente la tabla 2). Similarmente, se encontró que esta variante era resistente a lamivudina *in vitro* a todas las concentraciones de lamivudina ensayadas, lo que es consistente con el perfil de resistencia previamente descrito de mutaciones en el motivo YMDD (Bozdayi et al., 2003; Seta et al., 2000). En conjunto, los datos anteriores indican que la variante A181S + M204I muestra resistencia cruzada a adefovir y lamivudina tanto *in vivo* como *in vitro*.

Desgraciadamente parece que el uso de la terapia de combinación no es capaz de prevenir, sino retrasar la aparición de mutantes novedosos de resistencia a fármacos. En cualquier caso, la mejor opción para combatir la infección por VHB en la práctica clínica actual todavía es combinar fármacos antivirales con diferente perfil de resistencia.

Los siguientes ejemplos solo sirven para ilustrar la presente invención adicionalmente. Estos ejemplos no pretenden en modo alguno que limiten el ámbito de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Un nuevo patrón de mutación desarrollado en una cepa de VHB durante el tratamiento con 3TC muestra resistencia cruzada al tratamiento con adefovir dipivoxilo

Estudio de caso

En el trabajo que produjo la presente invención, los inventores han identificado un paciente que estaba crónicamente infectado con VHB. El paciente era un hombre blanco de 43 años de edad indicado con paciente AA con infección por VHB conocida desde 1990, diagnosticado durante una revisión de rutina. Una biopsia hepática en 1999 reveló hepatitis activa crónica (HAC) con un índice de actividad histológica de seis según Knodell *et al.* El paciente era positivo para HbeAg, negativo para anti-Hbe así como positivo para ADN de VHB. Los niveles de ADN de VHB se midieron usando un ensayo de hibridación líquido comercial (Digene, Maryland, EE UU), siendo el límite inferior de detección de este ensayo 5 pg/ml de ADN vírico.

Como se representa en la figura 1, se dio terapia de IFN, 9 MU/TVS (millones de unidades/tres veces a la semana), durante 9 meses (en 1999). El paciente no mostró una disminución en ALT o respuesta virológica (el nivel de ADN de VHB era 396 pg/ml al final del tratamiento con IFN). Como fracasó la disminución de la carga vírica en este periodo, el paciente abandonó la terapia de IFN después de nueve meses de tratamiento y empezó tratamiento con lamivudina (LAM), 100 mg/día. Durante el tratamiento con LAM, hubo normalización del nivel de ALT e inhibición de la replicación de VHB. Después de 19 meses de tratamiento con LAM, se produjo la recaída clínica, caracterizada por una exacerbación de ALT y detección de ADN de VHB por un ensayo de hibridación. Se siguió con lamivudina después del desarrollo de la recaída clínica. Se añadió IFN (9 MU/TVS) de nuevo durante 6 meses, cuando un signo de seroconversión (aparición de anti-hbe y desaparición de HbeAg). Sin embargo, la terapia de combinación no produjo la normalización de las enzimas hepáticas y los niveles de ADN de VHB permanecieron altos durante este periodo. Se paró el IFN 6 meses después de su adición y después de que se produjera una seroconversión sostenida. Se añadió Hepsera™ (adefovir dipivoxilo) 10 mg/día a la monoterapia de lamivudina en el mes 44 de la terapia antiviral inicial y 3 meses después de dejar IFN. Se usó Hepsera™ durante un periodo más largo de 14 meses; no se produjo ni la inhibición de la replicación de VHB ni la normalización de ALT.

Efecto de la terapia antiviral

El tratamiento con LAM inicialmente tuvo éxito. Hubo normalización del nivel de ALT e inhibición de la replicación de VHB. En el mes 19 del tratamiento con LAM se produjo la recaída clínica. La adición de Hepsera™ a la monoterapia de lamivudina no produjo la inhibición de la replicación de VHB ni la normalización de ALT. Se hicieron recuentos

sanguíneos y ensayos de funciones hepáticas (alanina y aspartato aminotransferasas) según procedimientos bioquímicos de rutina (autoanalizador Olympus AU 2700, Japón).

Aislamiento y secuenciación del ADN de VHB

Se sacó suero del paciente en intervalos diferentes (meses 28, 31, 42, 51, 57, 61) desde inicio del tratamiento antiviral. Cada vez se aisló el ADN de VHB del suero del paciente con el uso de un minikit de ADN Qiamp (Qiagen, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Se amplificó el gen de la ADN polimerasa de VHB por PCR. Brevemente, 5 microlitros de muestras de ADN se completaron hasta 50 µl con una mezcla de PCR que contenía Tris HCl 10 mM, pH: 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 2 mM, 25 pmol/µl de cebadores sentido y antisentido y 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq (RocheDiagnostic, Penzberg, Alemania). Para amplificar el gen de la polimerasa de VHB, el termociclador (sistema de PCR GeneAmp 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA; EE UU) se programó durante 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 45°C durante 1 minutos, polimerización durante 2 minutos se realizó. Las condiciones para la segunda ronda de PCR fueron las mismas que esas en la primera ronda usando 5 µl de la muestra de la primera ronda de PCR. Además, se usaron dos conjuntos de cebadores anidados para aumentar el gen de la polimerasa de VHB. Los cebadores externos fueron 5'CAC CTG CAG CCT CAT TTT GTG GGT CAC CAT A3' (SEQ ID NO: 21) y 5'CAT AAG CTT CAC AAT TCG TTG ACA TAC TTT CCA AT3' (SEQ ID NO: 22), y los cebadores internos fueron 5'GTG CTG CAG TTT GTG GGT CAC CAT ATT CTT G3' (SEQ ID NO: 23) y 5'GAC AAG CTT TTG ACA TAC TTT CCA ATC AAT AG3' (SEQ ID NO:24) (Ogata *et al.*, 1999; en cada secuencia los nucleótidos 4 a 9 indican sitios de reconocimiento de enzimas para *Pst* I y *Hind* III). Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Se llevó a cabo secuenciación directamente en los productos de PCR amplificados. Los productos de PCR se purificaron mediante el kit comercialmente disponible de limpieza de PCR (Nucleospin Extract kit, Macherey-Nagel, Düren, Alemania), según las instrucciones del fabricante. La secuenciación directa de los productos de PCR se realizó usando cebadores usados para PCR y el kit de secuenciación de terminador de ciclo de big dye (Applied Biosystems, Foster City, CA; EE UU). Para cada reacción de secuenciación, se usó no solo el cebador interno sentido, sino también el cebador interno antisentido, para confirmar las secuencias. Los productos de reacción se corrieron en el secuenciador automatizado ABI 310 (PE, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE UU). Los resultados se muestran en la figura 2.

Los productos de PCR obtenidos del suero sacado en el mes 42 (junio de 2002) también se clonaron posteriormente en un vector TA (kit de clonación Topo TA, Invitrogen, Carlsbad, CA; EE UU) según procedimientos de clonación rutinarios. De nueve clones, se secuenciaron siete. Los resultados se muestran en la figura 3. El patrón de mutación D205G encontrado en el clon 4 se tiene que confirmar de nuevo.

Cambios de nucleótidos

Los resultados de la secuencias de la figura 2 muestran que en todas las muestras tomadas del paciente en intervalos diferentes, estaban presentes mutaciones nucleotídicas que producían la sustitución de aminoácidos rtA181S y rtM204I. Por tanto, la mutación rtM204I junto con la mutación rtA181S se detectó en todas las muestras obtenidas desde el desarrollo de la resistencia a lamivudina. Para rtA181, se mostraron dos patrones de mutación hasta ahora. Sin embargo, rtA181S es un nuevo patrón.

La información de secuencia obtenida del producto de PCR clonado amplificado del suero obtenido en el mes 42 se muestra en la figura 3. Los resultados de la secuencia mostraron que dos de los siete clones comprendían mutaciones nucleotídicas que producían sustituciones de aminoácidos rtL180M y rtM204S. Estas mutaciones se han asociado con resistencia a LAM. Los otros cinco de siete clones comprendían mutaciones de nucleótidos que producían sustituciones de aminoácidos rtA181S y rtM204I. Se encontró que un clon producía mutaciones de nucleótidos que producían sustituciones de aminoácidos rtA181S, rtM204I y rtD205G.

RtA181S es un patrón de mutación comúnmente encontrado entre los resultados secuenciados. Los resultados presentes (no inhibición de la replicación de VHB y fluctuación de los niveles de ALT al final del 14° mes) nos permiten concluir que el patrón de mutación rtA181S que surge con el tratamiento de lamivudina muestra una resistencia cruzada a adefovir dipivoxilo. Más en particular, el patrón de mutación rtA181S en combinación con rtM204I muestra resistencia cruzada a adefovir dipivoxilo.

Se concluye que la cepa con resistencia a fármacos con un nuevo patrón de mutaciones seleccionada con tratamiento de lamivudina también tiene resistencia cruzada al tratamiento con adefovir.

Ejemplo 2: Confirmación in vitro de la resistencia a fármacos de la cepa de VHB recién mutada

Aislamiento de ADN de VHB de muestras de suero y amplificación de genomas de VHB de longitud completa

Se extrajo ADN de muestras de suero de 200 µl usando el kit High Pure Viral Nucleic Acid (Roche, Indianápolis, EE UU) según las instrucciones del fabricante. Se amplificó el genoma de VHB de longitud completa como se ha descrito previamente por Gunther *et al.*, 1995 usando un sistema de PCR que contenía KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM,

Tris-HCl 0,35 mM (pH 8,3), dNTP 200 µM, 5 U de ADN polimerasa Taq y 0,3 µM de los siguientes cebadores: [P1, 5'-CCGGA AAGCTT GAGCTC TTCTTTT CACCTC TGCCT AATCA-3' (nucleótidos 1821-1841; SEQ ID NO 25); P2, 5'-CCGGA AAGCTT GAGCTC TTCAAAAA GTTGC ATGGTG CTGG-3' (nucleótidos 1823-1806; SEQ ID NO 26)] y 2 µl de ADN extraído en un volumen total de 50 µl de reacción de PCR se corrió durante 40 ciclos con desnaturalización a 94°C durante 40 s, hibridación a 60°C durante 1,5 min y elongación a 68°C durante 3 min, con una adición de 2 min después de cada 10 ciclos en "Eppendorf Mastercycler Personal".

Secuenciación directa de los genomas de VHB de longitud completa

La secuenciación directa de ADN se realizó tanto para los productos amplificados directamente extraídos de muestras de suero como para las construcciones de la clonación en TA usando "Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Foster-city, EE UU) según las instrucciones del fabricante en "ABI PRISM 310 Genetic Analyzer" (Perkin Elmer, Foster City, EE UU). Los productos de PCR se purificaron con un kit "Qiaquick PCR Purification" (Qiagen, Hilden, Alemania) antes de la secuenciación. Los cebadores usados en la secuenciación directa se enumeran en la tabla 1.

Tabla 1. Cebadores usados en la secuenciación directa de ADN de VHB de longitud completa

Cebadores	Regiones de unión (pb)	Secuencia de ADN	SEQ ID NO
VHB (676-699)	676-699	5'TTTACTAGTGCCATTTGTTTCAGTG3'*	27
VHB (66-90)	66-90	5'GCTCCAGTTCAGGAACAGTAAACCC 3' *	28
VHB (2796-2826)	2796-2826	5'CACCTGCAGCCTCATTTTGTGGGTCACCATA3**	29
VHB (2357-2380)	2357-2380	5'GGCAGGTCCCCTAGAAGAAGAACT3**	30
VHB (2432-2408)	2432-2408	5'ATTGAGATCTTCTGCGACGCGGCGA3**	31
VHBCP11	1694-1717	5' GACCTTGAGGCATATTTCAAAGAC 3' **	32
VHBCP13	2069-2047	5'CTGAGTGCTGTATGGTGAGGTGA3' **	33
* Günther et al., 1995			
** Bozdayi et al., 2001			

Clonación en TA de los genomas de VHB de longitud completa y caracterización de los genomas de VHB por PCR y secuenciación

Los genomas de VHB de longitud completa amplificados se clonaron en un vector TA usando Topo-XL PCR Cloning" (Invitrogen, California, EE UU) según las instrucciones del fabricante. Las construcciones se secuenciaron después. El genoma de VHB de longitud completa en el clon que tenía el patrón de mutación A181S + M204I se amplificó adicionalmente como se ha descrito anteriormente. El mismo procedimiento también se aplicó para el clon que tenía el genoma de VHB de tipo salvaje.

Preparación de ADN de VHB para transfección directa

Los amplicones se purificaron del gel usando el kit "QIAquick Gel Extraction" (QUIAGEN, Basilea, Suiza) según las instrucciones proporcionadas con el kit y se juntaron. La digestión posterior con 5 U de endonucleasa de restricción sapI por µg de ADN liberó genomas de VHB lineales con extremos cohesivos sapI desprovistos de vector y secuencias de cebadores heterólogos.

Transfección y replicación in vitro del ADN de VHB para prueba de susceptibilidad antiviral

La capacidad de replicación *in vitro* del ADN de VHB de genoma completo se midió por transfección transitoria en líneas celulares Huh7. Las placas de 24 pocillos se con plásmido que contenía GFP, que se usó para determinar la eficacia de transfección usando el reactivo de transfección Eugene (Roche Diagnostics). Ocho horas después de la transfección, las células se alimentaron con medio fresco solo para probar la eficacia de replicación o con medio que contenía lamivudina 0,1 µM, 1 µM, 10 µM o adefovir solo para probar las susceptibilidades antivirales. El sobrenadante de las células alimentadas con solo medio fresco se recogió cada día durante 5 días y el sobrenadante de las células alimentadas con medio que contenía antivirales se recogió al final del 5º día. La extracción de ADN vírico se realizó usando "QIAamp DNA Mini Kit" (QUIAGEN, Basilea, Suiza) según las instrucciones del fabricante. El ADN de VHB se midió con el método de PCR a tiempo real usando el kit "Fast Start DNA Hybridization" (Roche Diagnostics, GmbH, Indianápolis, ABD) según el protocolo usado en Bozkaya *et al.*, 2005.

Replicación de VHB en líneas de células Huh7 transfectadas transitoriamente

La capacidad de replicación de los genomas de VHB de longitud completa se analizó *in vitro*. El análisis de PCR a tiempo real realizado con los replicados de VHB extraídos del sobrenadante de cada día demostró que la producción de VHB total medida en el cultivo celular alcanzó un número de copia logarítmico de casi 5 al final del 5º día (figura 4). Este resultado confirma que el ADN de VHB transfectado es competente para replicación *in vitro*.

Análisis de los efectos de lamivudina y adefovir en virus de tipo salvaje y mutantes (A181S + M204I)

Se probó la susceptibilidad a fármacos del patrón de mutación A181S + M204I frente a VHB salvaje usando concentraciones crecientes de lamivudina (0,1 µM, 1 µM, 10 µM) o adefovir (0,1 µM, 1 µM y 10 µM) realizando 3 experimentos independientes, véase la tabla 2.

Tabla 2 Producción de VHB in vitro medida por análisis de PCR en tiempo real

Antivirales	Replicación de VHB en líneas de células Huh7 transfectadas transitoriamente (Media de número de copia log de VHB ± desviación estándar)	
	Salvaje	A181S+M204I
Sin fármaco	4,56 ± 0,73	4,75 ± 0,88
3TC (0,1 µM)	4,1 ± 0,8	4,82 ± 0,19
3TC (1 µM)	2,32 ± 1,62	4,44 ± 1,03
3TC (10 µM)	n.d.	4,68 ± 0,82
Adefovir (0,1 µM)	1,15 ± 1,62	4,71 ± 0,42
Adefovir (1 µM)	0,32 ± 0,58	4,48 ± 0,43
Adefovir (10 µM)	n.d.	4,12 ± 0,98
n.d. no detectable		

Se encontró que el genoma de VHB que tiene el patrón de mutación A181S + M204I era resistente tanto a lamivudina como a adefovir incluso a las mayores concentraciones de antivirales. Mientras que no había ADN de VHB detectable del VHB de tipo salvaje en las muestras tratadas con 10 µM de lamivudina y adefovir, se midieron números de copia log de 4,68 ± 0,82 y 4,12 ± 0,98 para los de mutantes de VHB (tabla 2), respectivamente.

Ejemplo 3: Confirmación del patrón de mutación en la cepa de VHB en otro paciente

Un hombre de 33 años de edad es un paciente con HBsAg (+) y anti-HBe (+). Se encontró que era positivo para HBsAg en 1998. Fue tratado con IFN 9 MIU tres veces a la semana en 2003 durante 12 meses (ALT: 242 UI/L; AST: 155 UI/L y ADN de VHB: 3260 pg/ml por ensayo de hibridación líquido de Digene, EE UU; antes del inicio del tratamiento con IFN. Debido a la respuesta incompleta, se empezó con lamivudina en 2004 (Zeffix, 100 mg/día). Después del tratamiento con lamivudina, se obtuvo la normalización de ALT y los niveles de ADN de VHB eran menores de 5 pg/ml. Sin embargo, en el 20º mes de tratamiento con lam, se produjo una recaída clínica, caracterizada por exacerbación de ALT y restauración de la replicación de VHB (ALT: 199 UI/L, AST: 145 UI/L y ADN de VHB: 6540 pg/ml). Las 2 muestras de suero obtenidas después del inicio del tratamiento con lam y la recaída clínica se extrajeron y el ADN del genoma completo de VHB se amplificó según el método de Gunther *et al.*, 1995 en ambos materiales extraídos. Los productos de PCR se clonaron después en vectores TA y 8 clones de cada uno se secuenciaron por el método de secuenciación de ciclo en 310 ABI (EE UU). Las secuencias de los 4 clones que pertenecen al justo después del inicio del tratamiento con lamivudina representaban secuencias de tipo salvaje. Sin embargo, las secuencias de los 8 clones obtenidos después de la recaída clínica mostraron un patrón A181S + M204I (CGT a TCT en el codón 181 y ATT a ATC en el codón 204).

Referencias

- Angus P. et al. 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. et al. Antiretroviral therapy and HIV/hepatitis B virus coinfection. *Clin. Infect. Dis.* (2004) 38 Supl 2:S98-103.
- Benhamou Y. et al. 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. et al. Tenofovir disoproxil fumarate in patients with HIV and lamivudine-resistant hepatitis B virus. *N. Engl. J. Med.* (2003) 348(2):177-178.
- Bozdayi, A.M., Bozkaya, H., Türkyilmaz, A.R., Sarioglu, M., Çetinkaya, H., Karayalçin, S., Yurdaydin, C., Uzunalimoglu, Ö. (2001): Nucleotide divergences in the core promoter and precore region of genotype D hepatitis B virus in patients with persistently elevated or normal ALT levels. *J Clin Virol.* 21(1): 91-101
- Bozdayi Am, Uzunalimoglu O, Türkyilmaz Ar, Aslan N, Sezgin O, Sahin T, Bozdayi G, Cinar K, Pai Sb, Pai R, Bozkaya H, Karayalcin S, Yurdaydin C, Schinazi Rf. (2003). YSD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J. Viral Hepat.*, 10: 256-65.
- Bozkaya H, Yurdaydin C, Idilman R, Tuzun A, Cinar K, Erkan O, Bozdayi AM, Erden E, Uzun Y, Cetinkaya H & Uzunalimoglu O. (2005) Lamivudine treatment in HBeAg-negative chronic hepatitis B patients with low level viraemia. *Antivir Ther.* 10(2):319-25
- 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
- Delaney W, Yang H, Westland C, Das K, Arnold E, Miller M. (2002). Functional analysis of rtV173L, an HBV polymerase mutation frequently observed in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients. *Hepatology*, 36: 373A
- 5 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
- Dore G.J. et al. Efficacy of tenofovir disoproxil fumarate in antiretroviral therapy-naïve and -experienced patients coinfecting with HIV-1 and hepatitis B virus. *J. Infect. Dis.* (2004) 189 (7):1185-1192.
- 10 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
- Fu, L. & Cheng, Y.C. (2000) *Antimicrob Agents Chemother* 44, 3402-3407
- Griffin, T.J. & Smith, L.M. (2000) *Trends Biotechnol.* 18, 77-84
- Gunther S, Li BC, Miska S, Kruger DH, Meisel H & Will H. (1995) A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed
- 15 Patients. *J Virol* 69, 5437-5444.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Huber, C.G., Premstaller, A., Xiao, W., Oberacher, H., Bonn, G.K. & Oefner, P.J. (2001) *J Biochem Biophys Methods* 47, 5-19
- 20 Jarvis, B. & Faulds, D. (1999) *Drugs* 58, 101-141
- 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
- 25 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
- 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
- Lok, A.S. (1994) *J Viral.Hepat.* 1, 105-124
- 30 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
- 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
- 35 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 U S A* 97, 1079-1084
- Narayanawami, 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.
- 40 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
- Paran, N., Geiger, B. & Shaul, Y. (2001) *EMBO J* 20, 4443-4453
- Perrillo R. et al. Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* (2004) 126(1):81-90.
- 45 Peters M.G. et al. Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Gastroenterology* (2004) 126(1):91-101.
- 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
- 50 Saiki, R.K., Walsh, P.S., Levenson, C.H. & Erlich, H.A. (1989) *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6230-6234
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467
- 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
- Seta, T., O. Yokosuka, F. Imazeki, M. Tagawa, y H. Saisho (2000). Emergence of YMDD motif mutants of hepatitis B virus during lamivudine treatment of immunocompetent type B hepatitis patients *J. Med. Virol.* 60:8-16.
- 55 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) *Anti microb Agents Chemother* 41, 284-291
- 60 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
- Summers J., Mason W. *Cell* (1982) 29: 403-415.
- Urban, S. & Tyrrell, D.L. (2000) *Antiviral Res* 45, 185-197

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 et al. Week 48 resistance surveillance in two phase 3 clinical studies of adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. Hepatology (2003) 38(1): 96-103.

Xiao, W. & Oefner, P.J. (2001) Hum Mutat 17, 439-474

Xiong, X., C. Flores, H. Yang, J. J. Toole, y C. S. Gibbs. (1998). Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro Hepatology 28:1669-1673.

Yager, T.D., Baron, L., Batra, R., Bouevitch, A., Chan, D., Chan, K., Darasch, S., Gilchrist, R., Izmailov, A., Lacroix, J.M., Marchelletta, K., Renfrew, J., Rushlow, D., Steinbach, E., Ton, C., Waterhouse, P., Zaleski, H., Dunn, J.M. & Stevens, J. (1999) Electrophoresis 20, 1280-1300

Yang H. et al. 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

Lista de secuencias

<110> INNOGENETICS N.V.

<120> VARIANTES VÍRICAS DE LA HEPATITIS B CON SUSCEPTIBILIDAD REDUCIDA A ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 171 PCT

<140> PCT/EP2006/002352

<141> 14-03-2006

<150> EP 05101997.4

<151> 15-03-2005

<150> US 60/661.484

<151> 15-03-2005

<160> 33

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 126

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 1

ctcagcccggt ttctcctggc tcagtttact agtgccattt gttcagtggt tcgtagggct 60

ttccccact gtttggcttt cagttatatg gatgatgtgg tattgggggc caagtctgta 120

cagcat 126

<210> 2

<211> 126

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 2

ctcagcccggt ttctcctgtc tcagtttact agtgccattt gttcagtggt tcgtagggct 60

ttccccact gtttggcttt cagttatatg gatgatgtgg tattgggggc caagtctgta 120

cagcat 126

<210> 3

<211> 126

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 3

ctcagcccgt ttctcctgtc tcagtttact agtgccattt gttcagtggc tcgtagggct 60

ttccccact gtttggcttt cagttataty gatgatgtgg tattgggggc caagtctgta 120

cagcat 126

5 <210> 4

<211> 126

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis B

10 <400> 4

ctcagcccgt ttctcatggc tcagtttact agtgccattt gttcagtggc tcgtagggct 60

ttccccact gtttggcttt cagttatagc gatgatgtgg tattgggggc caagtctgta 120

cagcat 126

15 <210> 5

<211> 126

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 5

ctcagcccgt ttctcctgtc tcagtttact agtgccattt gttcagtggc tcgtagggct 60

ttccccact gtttggcttt cagttatatt gatgatgtgg tattgggggc caagtctgta 120

20 cagcat 126

<210> 6

<211> 126

<212> ADN

25 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 6

ctcagcccgt ttctcctgtc tcagtttact agtgccattt gttcagtggc tcgtagggct 60

ttccccact gtttggcttt cagttatata gatgatgtgg tattgggggc caagtctgta 120

cagcat 126

30 <210> 7

<211> 126

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis B

35 <400> 7

ctcagcccgt ttctcctgtc tcagtttact agtgccattt gttcagtggc tcgtagggct 60

ttccccact gtttggcttt cagttatata ggtgatgtgg tattgggggc caagtctgta 120

cagcat 126

<210> 8

<211> 126

<212> ADN

40 <213> Virus de la hepatitis B

<400>8

ES 2 494 840 T3

ctcagcccggt ttctcatggc tcagtttact agtgccattt gttcagtggt tcgtagggct 60
 ttcccccaact gtttggcttt cagttatagc gatgatgtgg tattgcgggc caagtctgta 120

cagcat 126

<210> 9

<211> 42

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 9

Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val
 1 5 10 15

Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Tyr Met Asp Asp
 20 25 30

Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val Gln His
 35 40

<210> 10

<211> 42

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 10

Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ser Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val
 1 5 10 15

Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Tyr Met Asp Asp
 20 25 30

Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val Gln His
 35 40

<210> 11

<211> 42

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 11

Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ser Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val
 1 5 10 15

Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Tyr Ile Asp Asp
 20 25 30

Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val Gln His
 35 40

<210> 12

<211> 42

<212> PRT

<213> Virus de la hepatitis B

<400> 12

ES 2 494 840 T3

Leu Ser Pro Phe Leu Met Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val
1 5 10 15

Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Tyr Ser Asp Asp
20 25 30

Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val Gln His
35 40

<210> 13
<211> 42
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 13
Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ser Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val
1 5 10 15

Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Tyr Ile Gly Asp
20 25 30

Val Val Leu Gly Ala Lys Ser Val Gln His
35 40

<210> 14
<211> 42
<212> PRT
<213> Virus de la hepatitis B

<400> 14
Leu Ser Pro Phe Leu Met Ala Gln Phe Thr Ser Ala Ile Cys Ser Val
1 5 10 15

Val Arg Arg Ala Phe Pro His Cys Leu Ala Phe Ser Tyr Ser Asp Asp
20 25 30

Val Val Leu Arg Ala Lys Ser Val Gln His
35 40

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Epítipo Tag 100

<400> 15
Glu Glu Thr Ala Arg Phe Gln Pro Gly Tyr Arg Ser
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Epitopo c-myc

<400> 16
 Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 1 5 10

5

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Epitopo FLAG

15

<400> 17
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Epitopo HA

25

<400> 18
 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Epitopo de proteína C

35

<400> 19
 Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys
 1 5 10

40

<210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Epitopo VSV

<400> 20
 Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 1 5 10

50

<210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B

55

<400> 21
 cacctgcagc ctcattttgt gggtcaccat 30

<210> 22
 <211> 35
 <212> ADN
 5 <213> Virus de la hepatitis B

 <400> 22
 cataagcttc acaattcgtt gacatacttt ccaat 35

 <210> 23
 10 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B

 <400> 23
 15 gtgctgcagt ttgtgggtca ccatattctt g 31

 <210> 24
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B
 20
 <400> 24
 gacaagcttt tgacatactt tccaatcaat ag 32

 <210> 25
 25 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B

 <400> 25
 30 ccggaaagct tgagctcttc ttttcacct ctgcctaata a 41

 <210> 26
 <211> 40
 <212> ADN
 35 <213> Virus de la hepatitis B

 <400> 26
 ccggaaagct tgagctcttc aaaaagttgc atggtgctgg 40

 <210> 27
 40 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B

 <400> 27
 45 ttactagtg ccatttggtc agtg 24

 <210> 28
 <211> 25
 50 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B

 <400> 28
 gctccagttc aggaacagta aaccc 25
 55
 <210> 29
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B
 60
 <400> 29

	cacctgcagc ctcatttgt gggtcaccaat a	31
	<210> 30	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> Virus de la hepatitis B	
	<400> 30	
	ggcaggtccc ctagaagaag aact	24
10	<210> 31	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Virus de la hepatitis B	
15	<400> 31	
	attgagatct tctgcgacgc ggcga	25
	<210> 32	
	<211> 24	
20	<212> ADN	
	<213> Virus de la hepatitis B	
	<400> 32	
	gaccttgagg catatttcaa agac	24
25	<210> 33	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Virus de la hepatitis B	
30	<400> 33	
	ctgagtgtg tatggtgagg tga	23

REIVINDICACIONES

1. Un ácido polinucleico de VHB aislado que codifica una variante de VHB, dicho ácido polinucleico de VHB comprende una mutación nucleotídica que produce sustitución de aminoácidos rtA181S del gen de la ADN polimerasa en la variante de VHB, en donde dicha mutación nucleotídica produce una sensibilidad disminuida al análogo de nucleósido adefovir y lamivudina, dicho ácido polinucleico de VHB comprende un ácido polinucleico elegido del grupo que consiste en SEQ ID 2, SEQ ID 3, SEQ ID 5, SEQ ID 6 y SEQ ID 7.
2. Un ácido polinucleico de VHB aislado según la reivindicación 1 que comprende una mutación nucleotídica adicional en el codón en posición 204 del gen de la ADN polimerasa en la variante de VHB y produce la sustitución de aminoácido de la metionina a isoleucina, en donde dicha mutación nucleotídica produce una sensibilidad disminuida al análogo de nucleósido adefovir y lamivudina, dicho ácido polinucleico de VHB comprende un ácido polinucleico elegido del grupo que consiste en SEQ ID 3, SEQ ID 5, SEQ ID 6 y SEQ ID 7.
3. Un ácido polinucleico de VHB aislado según las reivindicaciones 1 y 2 que comprende una mutación nucleotídica que produce la sustitución rtA181S en el dominio B del gen de la ADN polimerasa en la variante de VHB, y una mutación nucleotídica que produce la sustitución rtM204I en el dominio C del gen de la ADN polimerasa en la variante de VHB, dicho ácido polinucleico de VHB comprende un ácido polinucleico elegido del grupo que consiste en SEQ ID 3, SEQ ID 5, SEQ ID 6 y SEQ ID 7.
4. Un producto de expresión de VHB de un ácido polinucleico de VHB aislado como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende un poliaminoácido elegido del grupo que consiste en SEQ ID 10, SEQ ID 11 y SEQ ID 13.
5. Una composición que comprende un ácido polinucleico de VHB aislado como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
6. Una composición que comprende un producto de expresión de VHB como se describe en la reivindicación 4.
7. Uso de un ácido polinucleico de VHB aislado como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un producto de expresión de VHB como se describe en la reivindicación 4 o una composición como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en un proceso *in vitro* para la selección de al menos un fármaco anti VHB sin resistencia cruzada.
8. Uso de un ácido polinucleico de VHB aislado como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un producto de expresión de VHB como se describe en la reivindicación 4 o una composición como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en un proceso *in vitro* para la detección de una variante de VHB.
9. Un método para detectar la presencia de un ácido polinucleico como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende:
 - a. obtener un ácido polinucleico de VHB diana de dicha muestra biológica en donde dicho ácido polinucleico de VHB diana se sospecha que comprende un codón 181 que codifica serina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, y opcionalmente uno o más codones elegidos del grupo que consiste en un codón 180 que codifica metionina, un codón 204 que codifica isoleucina o un codón 204 que codifica valina o un codón 204 que codifica serina, y un codón 236 que codifica treonina del dominio de la transcriptasa inversa de VHB de un virus VHB;
 - b. obtener la secuencia del ácido nucleico del ácido polinucleico de VHB diana de (a);
 - c. inferir, de la secuencia del ácido nucleico obtenida en (b), la presencia de dicho codón 181 que codifica serina del dominio de la transcriptasa inversa de VHB, y opcionalmente uno o más codones elegidos del grupo mencionado en (a),
 y, 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.
10. Un método según la reivindicación 9 que comprende:
 - a. obtener un ácido polinucleico de VHB diana presente en dicha muestra biológica y/o obtener la secuencia de nucleótidos del mismo;
 - b. cuando sea apropiado, desnaturalizar parcial o completamente, o modificar enzimáticamente los ácidos polinucleicos obtenidos en el paso (a);
 - c. cuando sea apropiado, renaturalizar los ácidos polinucleicos desnaturalizados obtenidos en el paso (b), preferiblemente en presencia de al menos un oligonucleótido capaz de distinguir, en un ácido polinucleico de VHB un codón 181 que codifica serina en el dominio de la transcriptasa inversa de VHB de un codón

- 181 que codifica una alanina en el dominio de la transcriptasa inversa de VHB y, si es necesario, incluir el paso de modificar enzimáticamente, incluyendo extender, dicho oligonucleótido;
- d. cuando sea apropiado, detección de los ácidos polinucleicos de VHB parcial o completamente desnaturalizados obtenidos en el paso (b), y/o de los híbridos formados en el paso (c), y/o de las modificaciones enzimáticas obtenidas en el paso (b) y/o (c);
- e. inferir de uno o más de los datos de los siguientes grupos: los ácidos polinucleicos de VHB parcial o completamente desnaturalizados, los híbridos, las modificaciones enzimáticas, todos detectados en el paso (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.
11. El método para detectar la presencia de un ácido polinucleico como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende:
- a. obtener un ácido polinucleico de VHB diana de dicha muestra biológica en donde dicho ácido polinucleico de VHB diana se sospecha que comprende un codón 181 que codifica serina del dominio de la transcriptasa inversa del VHB, opcionalmente junto con uno o más codones elegidos del grupo que consiste en un codón 180 que codifica metionina, un codón 204 que codifica isoleucina o un codón 204 que codifica valina o un codón 204 que codifica serina, y un codón 236 que codifica treonina del dominio de la transcriptasa inversa de VHB de un VHB;
- b. poner en contacto el ácido polinucleico de VHB diana de (a) con un oligonucleótido capaz de distinguir un codón 181 que codifica una serina de un codón 181 que codifica una alanina, y opcionalmente también capaz de distinguir uno o más codones elegidos del grupo que consiste en un codón 180 que codifica leucina de un codón 180 que codifica una metionina, un codón 204 que codifica isoleucina de un codón 204 que codifica una metionina, valina o serina, y un codón 236 que codifica una asparragina de un codón 236 que codifica una treonina;
- c. inferir, de la señal distinguidora obtenida en (b), la presencia de dicho codón 181 que codifica serina de la transcriptasa inversa del VHB, opcionalmente junto con dicho codón 180 que codifica metionina o dicho codón 204 que codifica isoleucina o dicho codón 236 que codifica asparragina del dominio de la transcriptasa inversa de VHB y, 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.
12. Un método *in vitro* para cribar fármacos activos contra un VHB que comprende un ácido polinucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 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 inhibitor de dicho fármaco en la replicación de dicho VHB.
13. Un oligonucleótido capaz de distinguir, en un ácido polinucleico de VHB como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, un codón 181 que codifica una serina, de un codón 181 que codifica cualquier otro aminoácido en donde dicho ácido polinucleico muestra una sensibilidad reducida al análogo de nucleósido adefovir y lamivudina.
14. Un oligonucleótido según la reivindicación 13 capaz de distinguir un codón 181 que codifica una serina de un codón 181 que codifica una alanina.
15. Un kit diagnóstico para detectar la presencia de una variante de VHB en una muestra biológica y/o para detectar la resistencia a un fármaco antiviral de un VHB presente en una muestra biológica, dicho kit comprende un oligonucleótido como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 capaz de distinguir un codón 181 que codifica una serina de un codón 181 que codifica una alanina, en donde dicha variante muestra una sensibilidad reducida al análogo de nucleósido adefovir y lamivudina.
16. Un kit diagnóstico según la reivindicación 15, dicho kit comprende un oligonucleótido adicional como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 capaz de distinguir un codón 204 que codifica una isoleucina de un codón 204 que codifica una metionina.

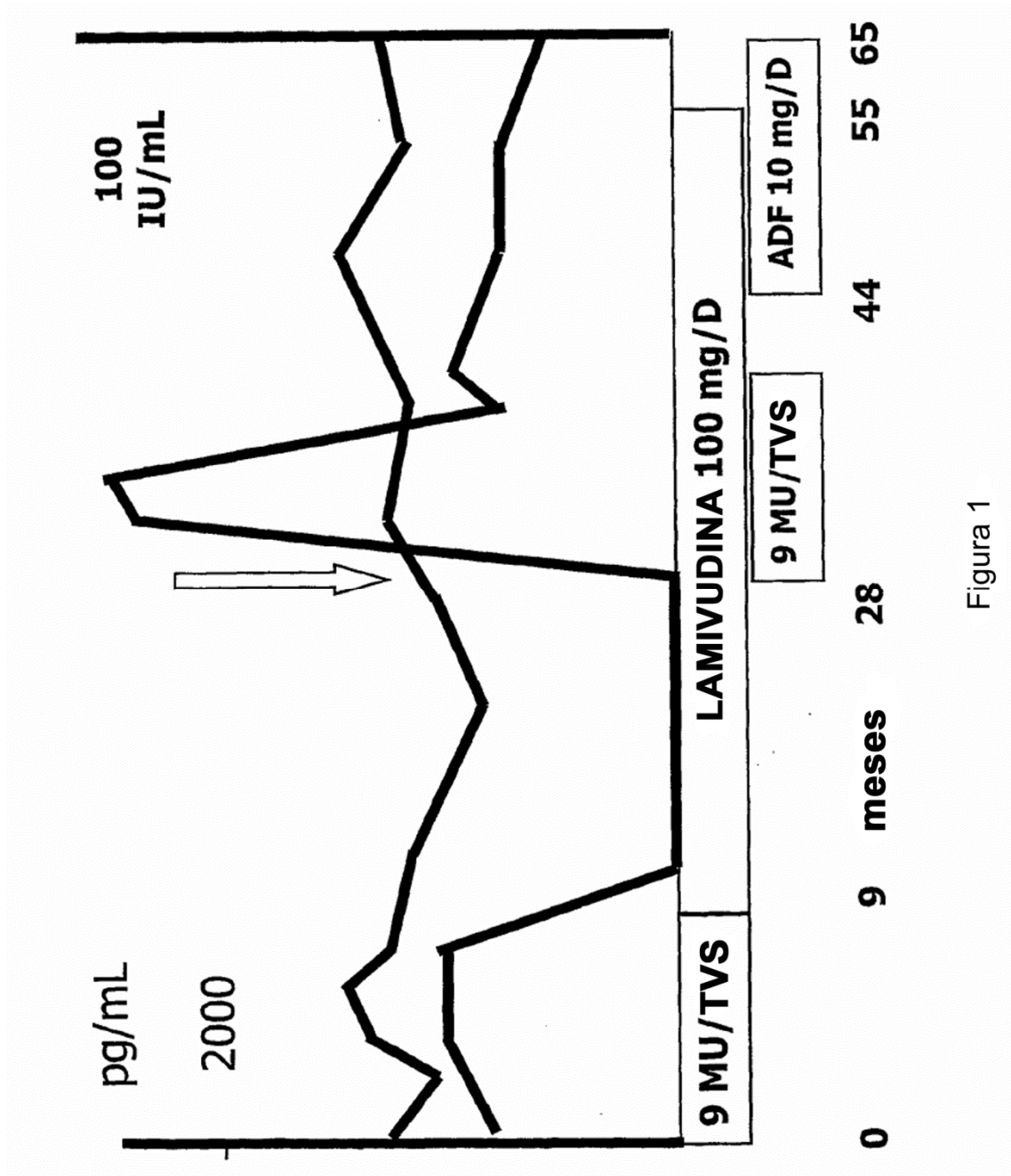


Figura 1

[illegible]

Figura 2a

VHB D	738	Y M	204	D	D	V	V	L	G	A	K	S	V	Q	H	seq id 9
		tat atg		gat gat	gat	gtg	gta	ttg	ggg	gcc	aag	tct	gta	cag	cat	seq id 1
AA-M28 04/01		-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 10
		...		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 2
		I		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11
AA-M31 07/01		...		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 3
		..c/t		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 11
		I		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11
AA-M42 06/02		...		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 3
		..c/t		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 11
		I		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11
AA-M51 03/03		...		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 3
		..c/t...		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 11
		I		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11
AA-M57 09/03		...		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 3
		..t/c		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 11
		I		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11
AA-M61 01/04		...		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 3
		..t/c		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 3

Figura 2b

	175	180			181												
	L	S	P	F	L	L	A	Q	F	T	S	A	I	C	seq id 9		
VHB D	654	ctc	agc	ccg	ttt	ctc	ctg	gct	cag	ttt	act	agt	gcc	att	tgt	seq id 1	
AA-M42 clon 1	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 12	
AA-M42 clon 2	...	...	...	...	...	a..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 4	
AA-M42 clon 3	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11	
AA-M42 clon 4	...	...	...	...	...	...	t..	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 5	
AA-M42 clon 5	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11	
AA-M42 clon 6	...	...	...	...	...	...	t..	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 6	
AA-M42 clon 7	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11	
	...	...	...	...	...	...	t..	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 5	

Figura 3a

Figura 3b

204																
VHB D	738	Y	M	D	D	V	V	L	G	A	K	S	V	Q	H	seq id 9
		tat	atg	gat	gat	gtg	gta	ttg	ggg	gcc	aag	tct	gta	cag	cat	seq id 1
AA-M42 clon1		-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 12
		...	.gc	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 4
AA-M42 clon2		-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11
		...	.t	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 5
AA-M42 clon3		-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11
		...	.c	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 6
AA-M42 clon4		-	I	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 13
		...	.c	.g	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 7
AA-M42 clon5		-	S	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	seq id 14
		...	.gc	...	...	...	...	...	c	...	...	...	...	...	...	seq id 8
AA-M42 clon6		-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11
		...	.c	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 6
AA-M42 clon7		-	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	seq id 11
		...	.t	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	seq id 5

Figure 3c

Figura 3c

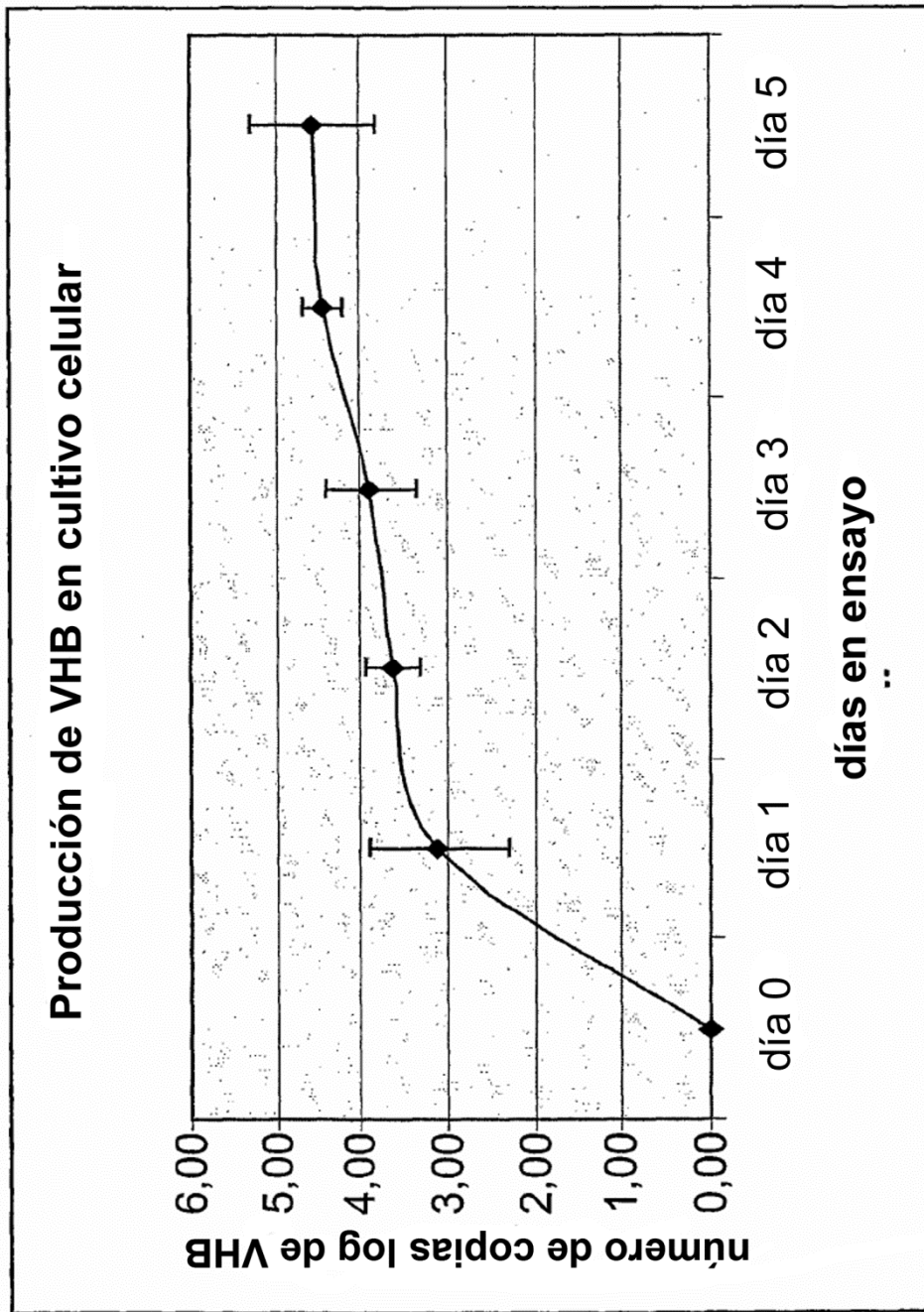


Figura 4