

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 531 098**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
G01N 33/576 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2008 E 08869063 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2220493**

(54) Título: **Nuevos mutantes de proteína de superficie del antígeno de superficie del virus HVB de Hepatitis B (HBsAg).**

(30) Prioridad:

21.12.2007 DE 102007062962

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

10.03.2015

(73) Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS
PRODUCTS GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

(72) Inventor/es:

**BUSSFELD, DELIA;
ENDRES, ANNE-SOPHIE;
MEISEL, HELGA y
WEIK, MICHAEL**

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 531 098 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

Nuevos mutantes de proteína de superficie del antígeno de superficie del virus HVB de Hepatitis B (HBsAg).

La invención se refiere a secuencias de un nuevo mutante o variante del antígeno de superficie (HBsAg) de la hepatitis B, a métodos para detectar esta variante de genoma y de proteína así como a anticuerpos dirigidos contra la misma en muestras de pacientes.

Las nuevas secuencias conducen a 7 intercambios (sustituciones) de aminoácidos aún no conocidas en esta combinación en el antígeno HBsAg de superficie de hepatitis B en el rango de las posiciones de aminoácidos 100 a 180 de la secuencia de aminoácidos del antígeno de superficie, en cuyo caso se encuentran seis sustituciones en la región del a-determinante (aa 101 hasta aa 180) así como a una sustitución en la vecindad inmediata de la misma (aa 100).

La invención se refiere también a métodos de detección inmunoquímicos para la detección simultánea de esta nueva variante de HBV conjuntamente con variantes/subtipos conocidos, así como al uso de las nuevas secuencias en conexión con secuencias conocidas para detectar simultáneamente anticuerpos específicos de HBV. Las determinaciones de antígeno y de anticuerpos pueden realizarse respectivamente en un lote de muestras de manera diferenciada o no diferenciada.

Finalmente, la invención también se refiere a la detección de los ácidos nucleicos correspondientes con ayuda del llamado ensayo de ácido nucleico (por ejemplo, Polymerase Chain Reaction, PCR o Reacción en Cadena de Polimerasa) con ayuda de cebadores adecuados, así como al uso de las nuevas secuencias de aminoácidos para producir vacunas.

20 Se sabe que el virus de la hepatitis B (HBV por Hepatitis B Virus) induce una cantidad de desórdenes, desde infecciones suaves no aparentes hasta inflamaciones hepáticas crónicamente activas y de curso fulminante (hepatitis viral).

La infección crónica con HBV representa un problema de salud global con cálculos de 400 millones de personas afectadas (Lee, N. Engl. J. Med. 337; 1733-1745 (1997))

25 Las medidas profilácticas más adecuadas para la infección con HBV que puede encontrarse frecuentemente en todo el mundo, se consideran la inmunización activa (estimulación de la respuesta de anticuerpos mediante administración de antígeno) y también la inmunización pasiva (mediante inyección de anticuerpos preformados).

30 El HBV pertenece a los virus Hepadna y representa una partícula de virus con un diámetro de 42 nm la cual está compuesto de un núcleo y una envoltura. El genoma del virus es una secuencia de ADN parcialmente bicatenario, anular de aproximadamente 3200 nucleótidos, que codifican al menos seis genes virales diferentes (Tiollais et al., Nature 317: 489-495 (1985)). Existen cuatro marcos abiertos de lectura para la formación de las proteínas virales.

35 En el gen S se encuentra la información para el antígeno (HBsAg) de superficie (surface) de HBV, que también se llama proteína pequeña (small protein, S). Además, existen formas más grandes que se designan como proteína grande (large protein, L) y proteína media (middle protein, M). Todas las tres proteínas tienen en común la secuencia de S-HBsAg que comprende 226 aminoácidos (Gerlich et al., Viral Hepatitis and Liver Disease (Hepatitis y enfermedad hepática), Hollinger et al., William-Wilkens, Baltimore, MD, pages 121-134 (1991)).

40 Las regiones de proteína antes de la small HBs se denominan también Pre-S1 y Pre-S2. El dominio de Pre-S1 comprende, independientemente del genotipo, 108 o 119 aminoácidos, mientras que el dominio Pre-S2 se compone de 55 aminoácidos. Ambos dominios están contenidos en la proteína L (389 o 400 aminoácidos, según el genotipo) mientras que la proteína M solamente comprende la Pre-S2 altamente con el antígeno S (281 aminoácidos). Las proteínas Pre-S presentan diferentes grados de glicosilación y portan los receptores para reconocer las células hepáticas.

45 El gen C porta la información para la proteína de nucleocápside, antígeno-núcleo de hepatitis B (HBcAg). La traducción de esta proteína puede iniciar ya en la región Pre-C y conducir a la formación de antígeno de hepatitis Be (HBeAg). El HBeAg presenta frente a HBcAg otro plegamiento e inmunogenicidad. HBeAg, en contraste con HBcAg, aparece libre en el suero y en caso de detección positiva se considera un indicador de la formación de HBcAg y por lo tanto de la formación de partículas infecciosas de virus.

50 Las transcripciones inversas de polimerasa-ADN contenidas en las partículas de virus se codifican por el gen P y para el gen X transactivador se discute un papel causal en la generación de carcinomas primarios de células hepáticas asociados con HBV.

- El ciclo de replicación viral de HBV comprende un ARN pre-genómico intracelular que se transcribe al ADN en la nucleocápside viral. Puesto que la polimerasa de ADN de transcriptasa inversa propia de HBV no dispone de exactitud-legibilidad (proof-reading capability), con relativamente alta frecuencia se incorporan nucleótidos equivocados. Como consecuencia el HBV tiene una tasa de mutación, la cual con aproximadamente 1 nucleótido/10000 bases/año de infección corresponde aproximadamente a un múltiplo de 10 de la que tienen otros virus ADN (Blum, Digestion 56: 85-95 (1995); Okamoto et al., Jpn. J. Exp. Med. 57: 231-236 (1987)). Además, también aparecen supresiones e inserciones con bastante frecuencia (Carman et al., Lancet 341: 349-353 (1993)).
- La variabilidad resultante de HBV se manifiesta entre otros en la aparición de 9 subtipos definidos serológicamente (Courouce et al., Biblioteca Haematologica 42: 1 (1976)) y en total de al menos 8 diferentes fenotipos que se denominan A hasta H (figura 1) y tienen una distribución geográfica. (Norder et al., J. Gen. Virol. 73: 3141-3145 (1992), Norder et al., Virology 198: 489-503 (1994), Norder et al.; Intervirology 47:289-309 (2004)). Además, se describe una serie de mutantes en los que un aminoácido o más se presentan intercambiados, faltan o sobran.
- Además de las mutaciones que tienen lugar de modo natural (Cooreman et al., Hepatology 30: 1287-1292 (1999)) una adición de inmunoglobulina de HBV y/o una terapia antiviral (por ejemplo, con lamivudina) puede ejercer una presión de selección la cual conduce a la aparición multiplicada de los llamados "mutantes de escape" y puede incrementarse ostensiblemente la probabilidad de aparición de mutantes HBV (Terrault et al., Hepatology 28: 555-561 (1998); Tillmann et al., Hepatology 30: 244-256 (1999); Hunt et al., Hepatology 31: 1037-1044 (2000)).
- No todas las mutaciones de HBV conducen a virus capaces de replicación y con frecuencia existe una coexistencia con un virus capaz de replicación, lo cual también limita la exactitud de secuenciación de ADN aislado puede conducir incluso a no reconocer secuencias modificadas por PCR, trabajos de clonación con secuenciación posterior, si esta constituye cuantitativamente < 10 % de todo el ADN (Cooreman et al., J. Biomed. Sci. 8: 237-247 (2001)).
- Por lo tanto, el aislamiento de mutantes es ventajoso, en cuyo caso la identificación y caracterización posteriores de mutantes individuales conduce posiblemente a vacunas y/o diagnósticos mejorados.
- La respuesta inmune después de una infección con HBV está dirigida principalmente contra el llamado a-determinante como una región de la proteína S, común a todos los virus de hepatitis B, el cual se encuentra en la superficie de la partícula de virus (Gerlich et al., supra) y representa la parte más heterogénea del epítopo B de célula del gen S.
- Como lugares de enlace para anticuerpos, de acuerdo con el estado del conocimiento actual, se aceptan al menos 5 epítopos que se solapan parcialmente sobre el a-determinante en la posición de aminoácido 101 y 180 (figuras 1 y 2) tal como ha podido mostrarse mediante la aplicación de anticuerpos monoclonales (Peterson et al., J. Immunol. 132: 920-927 (1984)). Éstos son principalmente epítopos complejos de conformación, estabilizados por una pluralidad de puentes de disulfuro. En algunos casos también se presentan epítopos secuenciales que pueden producirse con la ayuda de estructuras peptídicas cíclicas, preparadas sintéticamente.
- Los llamados "cuerpos protectores", que circulan en el suero después de una infección natural con HBV, están dirigidos en un 99% contra el a-determinante muy inmunogénico del HBV (Jilg, Vaccine 16: 65-68 (1998)). En este hecho se apoya la aplicación amplia de la inmunización con vacunas, las cuales han sido aisladas del suero humano, o bien han sido producidas mediante ingeniería genética y la administración de inmunoglobulinas de hepatitis B que contienen los anticuerpos específicos de HBV humano. Ambas estrategias profilácticas se basan en el efecto neutralizante desplegado por los anticuerpos específicos de HBs después de enlazarse al "a-loop-epítopo" (Carman et al., Hepatology 24: 489-493 (1996), Muller et al., J. Hepatol. 13: 90-96 (1991) und Samuel et al., N. Engl. J. Med. 329: 1842-1847 (1993)).
- De manera similar, las ayudas diagnósticas actualmente de amplio uso se basan en el enlazamiento de anticuerpos específicos de a-determinante con epítopos del a-determinante. De esta manera, en la determinación de HBsAg aplicada mundialmente en el sector de donación de sangre, el antígeno de superficie de HBV que circula en el suero de los donantes se detecta con métodos de determinación Inmuno químicos usando anticuerpos contra el a-determinante (de origen polyclonal o monoclonal) y, en caso de resultado positivo, se descarta la correspondiente donación de sangre a fin de evitar infecciones con HBV iatrogénico por sangre contaminada con HBV. Otra aplicación de la determinación de HBsAg está en la detección de una presencia de infección aguda con HBV.
- A la inversa, con la determinación de anticuerpos específicos de HBs en la sangre de sujetos con un resultado positivo de la determinación de anticuerpos específicos de HBsAg (anti-HBs) se detecta que una infección natural ha seguido su curso, o que una vacunación realizada ha tenido lugar de manera exitosa.

Finalmente, los ensayos de ácido nucleico, por ejemplo con la ayuda de la reacción en cadena de polimerasa (PCR, polymerase chain reaction), también se basan en el uso de cebadores (iniciadores) que son específicos para nucleótidos de HBV.

Debido al papel central del a-determinante en la inmunización activa (vacunación con antígeno de HBV), inmunización pasiva (protección por inmunoglobulinas específicas de HBV), demostración del éxito de la vacunación o que ha tenido lugar un infección con HBV (ambas mediante la determinación de anticuerpos específicos de HBsAg, anti-HBs) y finalmente seguridad en el sector de donación de sangre (determinación de HBsAg y PCR), es entendible porque se presta una gran atención en círculos de especialistas a la ocurrencia de mutantes y también a variantes novedosas, especialmente en la región del a determinante.

- 5 Los mutantes y/o variantes novedosas que han sido modificados en el a-determinante de HBV, pero son capaces de replicación pueden infringir tanto el concepto profiláctico como el diagnóstico (Brind et al., J. Hepatol. 26: 228-235 (1997), Fischer et al., Transplant Proc. 31: 492-493 (1999), Ghany et al., Hepatology 27: 213-222 (1998), Protzer-Knolle et al., Hepatology 27: 254-263 (1998), Carman et al., Gastroenterology 102: 711-719 (1992) und Coleman et al., WO 02/079217 A1, (2002)). WO 03/087351 describe variantes del virus de hepatitis B con reactividad reducida 10 frente a anticuerpos específicos de HBsAg. WO 2004/113370 divultan secuencias de una variante de HBsAg, así 15 como métodos para su detección en muestras de pacientes.

La delimitación de variantes y mutantes del HBV no es nítida, en cuyo caso una propuesta en este sentido encuentra 20 una amplia aplicación (Carman, J. Viral Hepat. 4 (suppl.1): 11-20 (1997). Por consiguiente, la denominación "variante" debe usarse para subtipos de ocurrencia natural que se presentan sin una interferencia conocida, por 25 ejemplo presión de selección por medio de terapia antiviral y/o administración de inmunoglobulina, y exhiben un modelo de distribución geográfica.

La caracterización y subsiguiente clasificación de subtipos tienen lugar con la ayuda de anticuerpos monoclonales y 25 se basa en un patrón de reacción modificado debido al intercambio de uno o de varios aminoácidos. La base de la clasificación representa las posiciones de aminoácidos 122 o 160 de la secuencia de HBV más difundida: aa 122 y aa 160 = lisina, K.

Todos los serotipos contienen el a-determinante específico del grupo, mientras que aa 122 y adicionalmente 133 y 30 134 determinan los tipos d e y; aa 160 determina la pertenencia al subtipo w o r. Sobre esta base pueden clasificarse de manera gruesa los subtipos de HBV en adr, adw, ayr o ayw, los cuales pueden diferenciarse aún más en al menos 9 sub-subtipos: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adwr2, adw4, adrq+ y adrq- (Swenson et al., J. Virol. Meth. 33: 27-28 (1991), Blitz et al. J. Clin. Microbiol. 36: 648-651, Ashton-Rickardt et al., J. Med. Virol. 29: 204-214 (1989)).

Puesto que esta clasificación se basa en una reactividad serológica, cada tipificación no tiene que significar necesariamente una variabilidad a nivel de aminoácido, por lo que se prefiere genotipado a nivel de gen S (Ohba et al., Virus Res. 39: 25-34 (1995)).

Los subtipos se presentan en patrones geográficos y étnicos determinados, por razones aún desconocidas.

35 La denominación mutación debe reservarse, según Carman, para aquellas variantes que surgen exclusivamente por presión de selección como vacunación o terapia antiviral. Muchas mutaciones ya han sido descritas, algunas de las cuales han conducido a hallazgos incorrectos desde el punto de vista diagnóstico (Carman et al., Lancet 345: 1406-1407) y de las cuales se citan a manera de ejemplo los intercambios aa mencionados a continuación:

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

e
Intercambio de cisteína en las aa-posiciones 107, 124, 137, 147 & 149.

(Coleman, supra; Okamoto et al., Pediatr. Res. 32: 264-268 (1992); Zhang et al., Scand. J. Infect. Dis. 28: 9-15 (1996); Zuckermann et al., Lancet 343: 737-738 (1994)).

De manera sorprendente, en una muestra (suero/plasma) de un paciente que sufre de inflamación hepática en Berlín (número de identificación interno: 126734/305024817) se ha encontrado un patrón de reacción atípico de los marcadores de hepatitis.

Además del cuadro clínico, el ADN del virus B de hepatitis detectado también indica una infección con HBV, sin que en realidad la detección de HBsAg se logre con un ensayo ELISA de HBsAg eficiente, aprobado.

Una secuenciación realizada condujo de manera completamente sorprendente a la secuencia de nucleótidos representada en las figuras 3 y 4 y a la secuencia de aminoácidos ilustrada en las figuras 5 y 6, las cuales, ambas, condujeron de manera inesperada al patrón de sustitución descrito.

Es claro a partir de estas secuencias que, de manera totalmente sorprendente, no se trata de una mutación puntual, es decir de un intercambio de unos pocos nucleótidos, puesto que se presentan en total n=7 aminoácidos sustituidos en la región de aa 100 hasta 181 en comparación con la secuencia de aminoácidos de los fenotipos representativos (figura 1). En vista de la frecuencia de las sustituciones de aminoácidos, es de suponer de manera sorprendente que se trata de un nuevo mutante o que las mutaciones son tan pronunciadas que la consecuencia debe describirse más bien como una variante novedosa, la cual se denomina en lo sucesivo variante HDB 07.

El análisis de la mejor coincidencia de la secuencia de aminoácidos del a-determinante con secuencias conocidas hace referencia al genotipo D (figura 1), al subtipo Subtyp ayw2 (figura 2), del cual difiere sorprendentemente, no obstante, la variante novedosa en las posiciones aa 8 (figura 6). La característica más prominente son las sustituciones en las posiciones 122 y 160. Si bien se logra la mejor coincidencia con el genotipo D, subtipo ayw2, el aminoácido que determina el subtipo en la posición 122 se sustituye sorprendentemente en relación con el genotipo D, subtipo ayw2 (sustitución de R por K), de modo que el subtipo de la variante HDB-07 debe denominarse correctamente como ad. Sin embargo, todas las secuencias de comparación del subtipo ad conducirían a una coincidencia total peor que el genotipo D, subtipo ayw 2. Fue completamente sorprendente encontrar sustitución de K por N en la posición 160. Puesto que la posición 160 es decisiva para la pertenencia al subtipo w (K en la posición 160) o al subtipo r (R en posición 160), la nueva variante HDB-07 pierde mediante esta sustitución esta pertenencia a subtipo. Aunque esta pérdida de pertenencia a un subtipo ya había sido descrita en la literatura como un fenómeno muy raro (Okamoto et al., Mol Immunol. 26(2):197-205 (1989)), hasta ahora aún no se ha podido encontrar hasta ahora en la literatura una ocurrencia de un fenotipo de este tipo con un cambio de subtipo causado por la sustitución.

Puesto que se conoce que los epítopos sobre el a-determinante están relacionados estructuralmente, es decir que pueden estar presentes como los llamados epítopos de conformación, es probable que la inmunogenidad y también la capacidad de enlace de los anticuerpos en el a-determinante puedan verse influenciados por el intercambio de aminoácidos en posición # 100.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un oligo- o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:5, de manera correspondiente a las posiciones de aminoácidos 100 a 180 del antígeno S del virus de hepatitis B el cual presenta una longitud total de 226 aminoácidos.

La presente invención también se refiere a un oligo- o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:3. La secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:3 corresponde al antígeno S del virus de hepatitis B.

La determinación de la identidad entre dos secuencias de aminoácidos es conocida per se por el experto en la materia y puede llevarse a cabo con programas habituales de ordenador. La determinación de la identidad se realiza preferiblemente con el programa de ordenador "Bestfit" del Genetics Computer Group (Madison, WI). Los parámetros se usan en las configuraciones estándar (default). Preferiblemente se usa la versión del programa que estaba actualizada para el día de prioridad de la presente solicitud. Un alto valor porcentual de la identidad significa una correspondencia, igualdad o equivalencia de dos secuencias.

Un oligo- o polipéptido también puede comprender una secuencia de aminoácidos en la que se encuentran sustituidos, suprimidos o insertados de cero a siete aminoácidos en comparación con la SEQ ID NO:5. En la secuencia de aminoácidos también pueden estar sustituidos, suprimidos o insertados 0 a 6, 0 a 5, 0 a 4, 0 a 3, 0 a 2 aminoácidos o un aminoácido en comparación con SEQ ID NO:5. Las sustituciones también pueden referirse a posiciones de aminoácidos que corresponden a las posiciones 100, 105, 110, 118, 120, 142, 116 y 173 del antígeno S de HBV.

Un oligo- o polipéptido también pueden comprender una secuencia de aminoácidos en la cual están sustituidos, suprimidos o insertados cero a seis aminoácidos en comparación con SEQ ID NO:3. En la secuencia de

aminoácidos también pueden estar sustituidos, suprimidos o insertados 0 a 6, 0 a 5, 0 a 4, 0 a 3, 0 a 2 aminoácidos o 1 aminoácido en comparación con SEQ ID NO:3.

El oligo- o polipéptido de la invención también puede comprender una secuencia de aminoácidos que es una secuencia parcial de SEQ ID NO:3 con al menos 75 o al menos 80 o al menos 85 o al menos 90 o al menos 95 o al menos 100 aminoácidos sucesivos de la SEQ ID NO:3, en cuyo caso esta secuencia parcial incluye al menos todas las ocho posiciones 100, 105, 110, 118, 120, 142, 160 y 173 de SEQ ID NO:3.

El polipéptido de la invención también puede comprender un fragmento de un antígeno HBs de un virus de hepatitis B, en cuyo caso el fragmento tiene una longitud de al menos 15 aminoácidos, el antígeno HBs tiene cisteína en la posición 100, arginina en la posición 105, leucina en la posición 110, arginina en la posición 118, leucina en la posición 120, leucina en la posición 142, asparagina en la posición 160 y prolina en la posición 173, y el fragmento comprende cisteína 100, arginina 105, arginina 118, leucina 120, leucina 142, asparagina 160 y/o prolina 173. El oligo- o polipéptido incluye siete de estos residuos específicos de aminoácidos.

La longitud total de oligo- o polipéptidos por lo regular es de 5 a 1000 aminoácidos, preferentemente 6 a 500 aminoácidos, más preferible 7 a 300 aminoácidos, de la manera más preferida 8 a 200 aminoácidos. Los oligo- o polipéptidos también pueden contener aminoácidos extraños que no están codificados por el genoma de un virus de hepatitis B. De esta manera, pueden estar contenidos aminoácidos que facilitan el acoplamiento a fases sólidas o que hacen posible el acoplamiento a sustancias de etiquetado. Pueden estar contenidos aminoácidos que surgen a causa de la clonación y se expresan en la expresión recombinante. Finalmente, el oligo- o polipéptido de la invención puede ser una proteína de fusión que además de aminoácidos derivados de HBV contiene un participante en la fusión, por ejemplo una secuencia "tag", que facilitan la purificación, o una porción de proteína que incrementa la solubilidad y/o el rendimiento durante la expresión recombinante. Este tipo de participantes en la fusión son conocidos per se por el experto en la materia.

En otra modalidad los oligo- o polipéptidos no contienen aminoácidos extraños que no están codificados por el genoma de un HBV. Por consiguiente, estos oligo- o polipéptidos consisten en una de las secuencias de aminoácidos descritas arriba y/o en las reivindicaciones.

El oligo- o polipéptido de la invención es preferiblemente inmunogénico, es decir puede inducir una respuesta de anticuerpos en el organismo de un mamífero. El oligo- o polipéptido habitualmente contiene al menos un determinante antigenógeno o al menos un epítopo. En una modalidad particular, el oligo- o polipéptido contiene un epítopo que no está presente en otras variantes de HBV, por ejemplo en el subtipo ayw2.

30 Preferentemente, el oligo- o polipéptido comprende una de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5.

Otro aspecto de la invención es un péptido inmunogénico una mezcla de péptidos inmunogénicos, que contiene uno o varios de los oligo- o polipéptidos descritos en esta solicitud. El péptido inmunogénico o la mezcla inmunogénica pueden contener el/los oligo- o polipéptido(s) solo(s) o en combinación con inmunógenos de HBV.

35 También son objeto de la presente invención moléculas de ácido nucleico que se derivan del genoma de la variante novedosa de HBV HDB 07 uno mutantes de la misma, principalmente moléculas de ácido nucleico que se derivan del gen que codifica HBsAg.

Por lo tanto, la invención se refiere, por ejemplo, a un oligo- o polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótido SEQ ID NO:2. La secuencia de nucleótido SEQ ID NO:2 codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5.

También es objeto de la invención un oligo- o polipéptido que comprende la secuencia de nucleótido SEQ ID NO:1. La secuencia de nucleótido SEQ ID NO:1 codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3.

Identidad se define aquí como el grado de igualdad entre dos hebras de dos segmentos de ADN. La identidad se expresa como valor porcentual dividiendo el número de bases idénticas de dos secuencias que van a compararse por la longitud de la secuencia más corta y se multiplica por 100 (Smith et al., Adv. Appl. Mathem. 2: 482-489 (1981)).

50 La determinación de la entidad entre dos secuencias de aminoácidos es conocida per se para el experto en la materia y puede realizarse con programas habituales para ordenador. La determinación de la identidad se realiza preferentemente con el programa de ordenador "Bestfit" de Genetics Computer Group (Madison, WI). Los parámetros se usan en las configuraciones estándar (default). Preferiblemente se usa la versión del programa actualizada a la fecha de prioridad de la presente solicitud. Un valor porcentual alto de la identidad significa una alta correspondencia, igualdad o equivalencia de las dos secuencias.

Esta evaluación también puede aplicarse a secuencias de aminoácidos de péptidos y proteínas (Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure (Atlas de secuencias y estructura de proteína), M.O Dayhoff ed. 5 Suppl. 3: 353-358, Nat. Biom. Res. Foy., Washington D.C., USA, Gribskov, Nucl. Acids Res. 14 (6): 6745-66763 (1986).

Un oligo- o polinucleótido puede comprender una secuencia de nucleótidos en la cual cero a 10 nucleótidos están sustituidos, suprimidos o adicionados en comparación con SEQ ID NO:2. En la secuencia de nucleótidos también pueden estar excluidos, suprimidos o insertados 0 a 9, 0 a 8, 0 a 7, 0 a 6, 0 a 5, 0 a 4, 0 a 3, 0 a 2 nucleótidos o 1 nucleótido en comparación con SEQ ID NO:2.

Un oligo- o polinucleótido también puede comprender una secuencia de nucleótidos que es una secuencia parcial de SEQ ID NO:1 con al menos 8 nucleótidos sucesivos de SEQ ID NO:1, en cuyo caso la secuencia parcial incluye al menos una de las posiciones 298, 299, 300, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 328, 329, 330, 343, 344, 345, 352, 353, 354, 358, 359, 360, 364, 365, 366, 424, 425, 426, 478, 479, 480, 517, 518 y 519 de SEQ ID NO:1. La secuencia parcial pueden comprender al menos 9, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 11, lo más preferiblemente al menos 12 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1. En otras modalidades, la secuencia parcial comprende al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 120, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 250 o al menos 300 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1.

La secuencia parcial puede incluir dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o todas las 30 posiciones 298, 299, 300, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 328, 329, 330, 343, 344, 345, 352, 353, 354, 359, 360, 364, 365, 424, 425, 426, 478, 479, 480, 517, 518 y 519 de SEQ ID NO:1.

En otra modalidad, el oligo- o polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que se híbrida en condiciones severas, preferiblemente de modo específico con un polinucleótido complementario a la secuencia SEQ ID NO:1 o a la SEQ ID NO:2.

Se conocen per se por parte del experto en la materia métodos para determinar si un oligo- o polinucleótido se híbrida con otro polinucleótido. Un ejemplo especial para "condiciones severas" son las siguientes condiciones: a) incubación por 16 horas a 42 °C en una solución que comprende formamida al 50%, 5xSSC (NaCl de 150 mM, citrato trisódico de 15 mM), fosfato de sodio de 50 mM pH 7,6, 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 % y ADN de esperma de salmón, desnaturalizado, cortado, de 20 µg/ml; b) lavar a continuación en 0,1 x SSC a aproximadamente 65 °C. Las condiciones de hibridización y lavado son conocidas per se por el experto en la materia y se indican, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación molecular: un manual de laboratorio), segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989). Una secuencia de nucleótidos se híbrida específicamente en un polinucleótido dado sino se híbrida, o se híbrida de modo sustancialmente más débil, en otras secuencias de nucleótidos. En el presente caso esto puede significar que la secuencia de nucleótidos no se híbrida, o se híbrida solamente de modo débil, en polinucleótidos que codifican HBsAg a partir de variantes de HBV convencionales (por ejemplo, genotipo D, subtipo ayw2).

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

La longitud mínima de los oligo- o polinucleótidos es de 6, preferentemente 8, más preferiblemente 10, de modo más preferido 12 nucleótidos. La longitud total del oligo- o polinucleótido por lo regular es de 6 a 3000 nucleótidos, preferentemente 6 a 1500 nucleótidos, más preferiblemente 8 a 900 nucleótidos, de modo más preferido 8 a 600 nucleótidos. Los oligo- o polinucleótidos también pueden contener nucleótidos que no provienen del genoma de un virus de hepatitis B. De esta manera pueden estar contenidos nucleótidos que codifican determinados aminoácidos que deben cumplir funciones deseadas, tales como ha descrito arriba. Pueden estar contenidos nucleótidos que se generan debido a la clonación, por ejemplo para introducir determinados sitios de escisión (clivaje). Finalmente, el oligo- o polinucleótido de la invención puede codificar una proteína de fusión, que además de aminoácidos derivados de HBV, contiene un participante de fusión, por ejemplo una secuencia "tag", la cual facilita la purificación, o una porción de proteína que incrementa la solubilidad y/o el rendimiento en la expresión recombinante. Los participantes de fusión de estos tipos y el ADN que los codifica son conocidos per se por el experto en la materia.

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

Los polinucleótidos de la invención también pueden etiquetarse, por ejemplo, con una etiqueta fluorescente o una etiqueta radioactiva. Los polinucleótidos de estos tipos pueden emplearse ventajosamente en una reacción de hibridación o una reacción en cadena de polimerasa (PCR).

5 La invención también se refiere a un vector o un plásmido que contiene un oligo- o polinucleótido de acuerdo con la presente invención. El plásmido puede ser, por ejemplo, un vector de clonación que sirve para replicar el ácido nucleico en células hospederas o para proporcionar ciertos sitios de clivaje de restricción. Los vectores de expresión son vectores que permiten la expresión del ácido nucleico clonado en células hospederas. Células hospederas pueden ser diversas células procariotas o eucariotas. Las células hospederas procariotas son, por ejemplo, células bacterianas tales como células de *E. coli*. Los vectores de expresión según la invención pueden contener determinados elementos de control como, por ejemplo, promotores o sitios de enlazamiento para factores de represión. En otra modalidad, los vectores de expresión contienen un segmento de ácido nucleico que codifica una parte de una proteína de fusión.

10 Asimismo, la invención se refiere a una célula, por ejemplo una célula hospedera, que contiene un polinucleótido, un plásmido o un vector de la invención. Las células hospederas pueden cultivarse en condiciones adecuadas tales que tengan lugar una transcripción del ácido nucleico contenido y su subsiguiente traducción. La invención también se refiere a un método para producir un polipéptido en el cual se introduce un polinucleótido, un plásmido o un vector de expresión de la invención a células hospederas y las células hospederas se cultivan en condiciones que conducen a la expresión del polipéptido. Opcionalmente, el polipéptido puede obtenerse a continuación de las células hospederas. La producción del polipéptido tiene lugar preferiblemente en bacterias, de la manera más preferida en células de *E. coli*. Los medios y condiciones adecuadas para cultivar se describen, por ejemplo, en Ausubel et al. (1993) "Current Protocols in Molecular Biology" (Protocolos actuales en biología molecular). La obtención del polipéptido expresado ocurre de acuerdo con métodos conocidos per se por el experto en la materia. En Scopes R. (1994) "Protein Purification: Principles and Practice" (Purificación de proteína: principios y práctica) (tercera edición), editorial Springer Verlag, se describen, por ejemplo, diferentes métodos para la purificación de proteína.

15 Los polipéptidos y péptidos de la presente invención también pueden, no obstante, prepararse de manera química mediante métodos conocidos tales como, por ejemplo, síntesis en fase sólida. Asimismo es posible que los polinucleótidos de la invención se preparen mediante métodos conocidos de la síntesis química. Fragmento de polinucleótido obtenidos mediante síntesis química también pueden enlazarse luego enzimáticamente mediante 20 ligasas. Los oligo- o polinucleótidos de la invención también pueden prepararse por mutagénesis dirigida al sitio ("site-directed mutagenesis") a partir de secuencias conocidas, introduciendo mutaciones puntuales en posiciones particulares. Los métodos de este tipo también son conocidos per se por el experto en la materia.

25 Un anticuerpo que se enlaza a un oligo- o polipéptido de la invención puede producirse de manera conocida ya sea mediante un oligo- o polipéptido de la invención o un fragmento del mismo (Harlow y Lane (1988) "Antibodies: A Laboratory Manual" (Anticuerpos: un manual de laboratorio); Cold Spring Harbor Laboratory). También pueden ser 30 anticuerpos policlonales o monoclonales, aunque se prefieren anticuerpos monoclonales. Preferiblemente son anticuerpos específicos que están dirigidos contra el HBsAg de la nueva variante de HBV, pero que no reconocen HBsAg de otras variantes de HBV, por ejemplo genotipo D, subtipo ayw2. Tales anticuerpos pueden obtenerse, con base en una comparación de secuencias de las secuencias de aminoácidos del HBsAg novedoso y HBsAg de cepas 35 conocidas, determinando péptidos que son específicos para el HBsAg novedoso y usando estos péptidos para preparar los anticuerpos. También es posible preparar una mezcla de anticuerpos policlonales agotar los mediante 40 incubación con HBsAg conocido. En otra modalidad, el anticuerpo reconoce no solamente el nuevo HBsAg, sino también variantes conocidas de HBsAg. De esta manera es posible detectar simultáneamente diferentes variantes de HBsAg.

45 El anticuerpo puede enlazarse a un oligo- o polipéptido que está compuesto de una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo consistente en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:17. De manera particularmente preferida, el anticuerpo se enlaza a un oligo- o polipéptido que se compone de una secuencia de aminoácidos que se selecciona del grupo consistente en 50 SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:17. En una modalidad particular, el anticuerpo no se enlaza a los a-determinantes de los genotipos conocidos de HBV A, B, C, D, E y F (véase figura 1). En una modalidad particular, el anticuerpo no se enlaza al a-determinante del genotipo D, subtipo ayw2, de HBV.

Los anticuerpos pueden ser policlónicos o monoclonales, de origen animal o humano.

55 La invención también se refiere a un kit de ensayo para detectar virus de hepatitis B, que contiene un oligo- o polipéptido de la invención y/o un oligo- o polinucleótido de la invención.

La invención también se refiere a un péptido inmunogénico o a una mezcla de péptidos inmunogénicos que contienen uno o más oligo- o polipéptidos de la invención, solos o en combinación con inmunógenos de HBV conocidos.

5 Un método para detectar un antígeno de hepatitis B se caracteriza porque (a) se incuba una muestra con un anticuerpo en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo; y (b) se detecta un complejo antígeno-anticuerpo que contiene el anticuerpo.

Pueden usarse anticuerpos monoclonales o policlonales (o mezclas o fragmentos de los mismos o mezclas de fragmentos) que reaccionan con epítopos del a nueva variante de HBV para determinar el a-determinante de la variante de HBV según la invención en forma de la secuencia completa de polipéptidos o de partes de la misma en 10 muestras para investigación: HBsAg de la variante HDB 07.

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

15 Una modalidad especial representa el llamado inmunoensayo de encima, del cual se describe a manera de ejemplo un posible principio de ensayo a continuación, aunque la idea de la invención no se limita a la misma:

En el principio llamado sandwich, muy ampliamente difundido, se incuban anticuerpos, o fragmentos de los mismos, inmovilizados sobre un soporte adecuado (por ejemplo, micropartículas o superficies de pozos de una placa de microtitulación), con la muestra investigada. Después de retirar el exceso de muestra, efectuando una incubación 20 adicional con anticuerpos anti-HBs (fragmentos monoclonales o policlonales o mezclas de estos fragmentos), que están provistos con una sonda, se detecta el HBsAg enlazado a los anticuerpos. En calidad de sonda se emplea con frecuencia una enzima cuya conversión catalítica (después de retirar el exceso de reactivo) de un sustrato adecuado conduce a una reacción de color la cual se mide mediante fotometría y cuya intensidad es proporcional al contenido de HBsAg presente en la muestra.

25 Además de esta modalidad específica, también son conocidos métodos que son de naturaleza homogénea (es decir que no requieren separación enlazada/libre), que pueden pasar sin una sonda (por ejemplo, método de aglutinación), que pueden evaluarse a simple vista (por ejemplo, inmunodifusión radial) o hacen uso de otras ondas (por ejemplo, isótopos radioactivos o quimioluminiscencia) o una pluralidad de sondas (tales como por ejemplo, el sistema de biotina/estreptavidina).

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

35 Asimismo es posible, por razones económicas, combinar una determinación de HBsAg con un método de detección para otro analito (por ejemplo, antígenos de VIH o determinación simultánea de la variante de HBV HBsAg y anticuerpos específicos de seleccionados contra la misma) en un lote de ensayos (de diferenciación o no diferenciación).

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

Una modalidad especial representa el llamado inmunoensayo de enzima, del cual se describe, a manera de ejemplo, un posible principio de ensayo a continuación, aunque no se restrinja la idea inventiva al mismo:

45 En el llamado principio sandwich, ampliamente difundido, secuencias de polipéptido o de proteína que portan un epítopo, inmovilizadas sobre un soporte adecuado (por ejemplo, micropartículas o superficies de pozos de una placa de microtitulación), se incuban con la muestra a investigar. Se detectan anticuerpos enlazados a los epítopos después de retirar el exceso de muestra efectuando una incubación adicional con secuencias de polipéptido o de proteína que portan epítopo y las cuales están provistas con una sonda. En calidad de sonda se emplea con 50 frecuencia una enzima cuya conversión catalítica (después de retirar el exceso de reactivo) de un sustrato adecuado conduce a una reacción de color que se mide mediante fotometría y cuya intensidad es proporcional al contenido de anticuerpos presente en la muestra.

Además de esta modalidad especial también se conocen métodos que son de naturaleza homogénea (es decir que no requieren de separación enlazada/libre), que pasan enteramente sin una sonda (por ejemplo, método de aglutinación), pueden evaluarse a simple vista (por ejemplo, inmunodifusión radial) o hacen uso de otras ondas (por ejemplo, isótopos radioactivos o quimioluminiscencia) o de una pluralidad de sondas (tales como, por ejemplo, el sistema de biotina/estreptavidina).

5 Las estructuras de polipéptido de la variante de HBV pueden asimismo representarse mediante anticuerpos anti-idiotípicos o mediante selección de un principio adecuado de ensayo, incluso pueden emplearse anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de las variantes para determinar anticuerpos anti-HBs (por ejemplo, en un formato de ensayo competitivo). Asimismo se conoce que eligiendo el principio de ensayo también puede efectuarse una diferenciación de las clases de inmunoglobulina (por ejemplo, mediante el método "indirecto" con un segundo anticuerpo específico de clase (por ejemplo, específico de IgG o IgM) con sonda o con la ayuda del principio llamado anti- μ (específico de IgM). Por supuesto los métodos y materiales (incluida la sonda y la secuencia de polipéptido) tienen que adaptarse a la diana respectiva.

10 Todas estas modalidades corresponden al estado de la técnica de modo que por "determinación de anticuerpos que son específicos para el a-determinante de la nueva variante de HDB 07" con la presente invención se entienden todos los métodos que son adecuados para detectar inmunoglobulinas y/o clases de inmunoglobulina frente a la nueva variante de HBV, independientemente si se busca el anticuerpo solo frente a la nueva variante o en conexión con anticuerpos frente a a-determinantes conocidos y/o mutaciones conocidas en la a-región.

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

20 El ácido nucleico de hepatitis B también pueden detectarse (a) incubando una muestra con al menos un oligo- o polinucleótido en condiciones que permiten la hibridación selectiva del oligo- o polinucleótido con un ácido nucleico de hepatitis B en la muestra; (b) determinando si fue amplificado un ácido nucleico.

25 La invención también se refiere al uso de un oligo- o polinucleótido de la invención en calidad de cebador y/o de sonda. Las presentes secuencias de nucleótidos pueden utilizarse para producir un cebador y/o sondas de gen, por lo cual también son objeto de la invención kits que contienen cebadores y/o sondas para detectar en las muestras a investigar un ácido nucleico específico de las variantes de HBV, ya sea solo o en enlace con secuencias de nucleótidos de HBV conocidas.

30 Sobre la base de las presentes secuencias de nucleótidos pueden desarrollarse cebadores que se usan en la llamada "reacción en cadena de polimerasa" (PCR). La PCR representa un método para amplificar una secuencia deseada de nucleótidos de un ácido nucleico o de una mezcla de ácidos nucleicos. En este caso, los cebadores se extienden respectivamente de manera específica mediante una polimerasa con el ácido nucleico deseado como marco de lectura. Después de la disociación de la hebra original se hibridan nuevos cebadores y se extienden nuevamente por la polimerasa. La repetición de estos ciclos logra un enriquecimiento de las moléculas de secuencia diana.

35 En relación con los ensayos de ácido nucleico (EAN) es posible usar secuencias de nucleótidos de la presente invención a fin de preparar oligómeros de ADN de 6-8 nucleótidos o más grandes los cuales son adecuados como sondas de hibridación para detectar el genoma viral de la variante de HBV descrita en la presente en personas que posiblemente portan la variante del virus, o por ejemplo, en el sector de donación de sangre para cribar sangre almacenada para la presencia de genoma variante, ya sea específicamente o en combinación con la detección de secuencias de nucleótidos de variantes de HBV y/o mutantes de HBV conocidos.

40 Asimismo es posible sobre la base de las secuencias de nucleótidos encontradas de la variante novedosa de HBV desarrollar cebadores apropiados que son específicos para la variante novedosa o son capaces de detectar tanto la variante novedosa como las variantes conocidas en el estado de la técnica.

45 Otro objeto de la presente invención es un virus aislado de hepatitis B que comprende un antígeno de Bs, el cual comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5. Finalmente, la invención también comprende cultivos de células tisulares que se infectan con una variante de HBV según la invención, así como la variante misma aislada de HBV. También es objeto de la invención la preparación inmunogénica que contiene la variante de HDB 07 atenuada o desactivada de HBV.

50 La invención también se refiere al uso de un oligo- o polinucleótido según la invención, o de un oligo- o polipéptido según la invención para producir un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección con HBV. Los

oligo- o polinucleótidos, o bien los oligo- o polipéptidos, de acuerdo con la invención pueden emplearse principalmente para producir una vacuna contra HBV.

La invención también incluye además una vacuna que comprende un polipéptido de la presente invención y un adyuvante convencional (por ejemplo, adyuvante de Freund, solución salina amortiguada con fosfato o similares).

5 Una vacuna de este tipo puede usarse para inducir la formación de anticuerpos en mamíferos. De manera similar, la invención incluye una partícula que contiene una secuencia de aminoácidos no específica para variante, la cual induce la formación de partícula conjuntamente con un polipéptido que contiene epítopo, el cual es específico para una variante de HBV de la invención.

10 Las secuencias de nucleótidos de la invención también pueden usarse para producir los llamados polinucleótidos antisentido (antisense) (opcionalmente para propósitos terapéuticos).

Otros aspectos de la presente invención son los siguientes objetos (1) a (15):

(1) Un oligo- o polinucleótido aislado con una de las secuencias seleccionadas del grupo de SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:2:

SEQ ID NO:1

1 ATGGAGAACATCACATCAGGATTCTAGGACCCCTGCTCGTGTACAGGCAGGGTTTC
 TTGTTGACAAGAATCCTCACAAATACCGCAGAGTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAAT
 TTTCTAGGGGAACCTACCGTGTCTGGCAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATCAC
 TCACCAACCTCCTGCTCCAACTTGCTCTGGTTATCGCTGGATGTGTCTGCCGGCTTT
 ATCATCTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTGGTTCTTCTGGACTGT
 CAAGGTATGTTACCGCTTGTCTACTTCCAGGATCTCAACCACCAAGCAGGGACTA
 TGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGTACC
 AAAACTTCGGACGGAATTGCACCTGTATTCCCATCCATCATCCTGGGCTTCGGAAAC
 TTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCCTTCCTGGCCAGTTACTAGTGCCATTGTT
 CAGTGGTTCGTAGGGCTTCCCCACTGTTGGCTTCAGTTATATGGATGATGTGGTAT
 TGGGGCCAAGTCTGTACAGCATCTGAGTCCCTTTACCGCTGTTACCAATTCTTT
 15 TGTCTTGGTATACATT **678**

SEQ ID NO:2

1 TGTCAAGGTATGTTACCGCTTGTCTACTTCCAGGATCTCAACCACCAAGCAGGGGA
 CTATGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTGTTGCTGT
 ACCAAACTTCGGACGGAATTGCACCTGTATTCCCATCCATCATCCTGGGCTTCGGAA
 AACTTCCTATGGGAGTGGGCCTCAGCCCCTTCCTGGCCAGTTACTAGTGCCATT

GTT 242

SEQ ID NO:18

20 AGCAGGGGACTA

SEQ ID NO:19

AGCAGGGGACTATGCAAA

SEQ ID NO:20

AGCAGGGGACTATGCAAAACCTGC

25 SEQ ID NO:21

AGCAGGGACTATGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACC

SEQ ID NO:22

AGCAGGGACTATGCAAAACCTGCACGACTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTATCCCTCCTG
TTGCTGTACCAAACCTTCG

SEQ ID NO:23

5 TTCGGAAACTTC

SEQ ID NO:24

TGGGCTTCGGAAACTTC

SEQ ID NO:25

CCATCATCCTGGGCTTCGGAAACTTC

10 SEQ ID NO:26

AATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCCTGGGCTTCGGAAACTTC

SEQ ID NO:27

CCCTCCTGTTGCTGTACCAAACCTTCGGACGGAAATTGCACCTGTATTCCCATCCCATCATC
CTGGGCTTCGGAAACTTC

15 (2) Un oligo- o polinucleótido según (1), el cual se híbrida con un oligo- o polinucleótido que tiene secuencia complementaria a una de las secuencias seleccionadas del grupo de SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:2, en condiciones severas.

(3) Un oligo- o polinucleótido aislado que codifica antígeno de HBs del virus de hepatitis B y un oligo- o polinucleótido según (1) o (2).

20 (4) Un fragmento de un oligo- o polinucleótido que codifica antígeno de HBs del virus de la hepatitis B, caracterizado porque el fragmento contiene un oligo- o polipéptido según (1) o (2).

(5) Un oligo- o polinucleótido que codifica el a-determinante del antígeno de HBs del virus de hepatitis B y contiene un oligo- o polinucleótido según (1) o (2).

(6) Un cebador que es específico para un oligo- o polinucleótido según uno de los objetos (1) a (5).

(7) Un vector que contiene al menos un oligo- o polinucleótido según uno de los objetos (1) a (4).

25 (8) una célula hospedera que contiene un vector según (7).

(9) Un oligo- o polipéptido que se codifica mediante un oligo- o polinucleótido según uno de los objetos (1) a (4).

(10) Oligo- o polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo de SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:5:

SEQ ID NO:3

1 M E N I T S G F L G P L L V L Q A G F F
 L L T R I L T I P Q S L D S W W T S L N
 F L G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H
 S P T S C P P T C P G Y R W M C L R R F
 I I F L F I L L L C L I F L L V L L D C
 Q G M L R V C P L L P G S S T T S R G L
 C K T C T T P A Q G T S M Y P S C C C T
 K L S D G N C T C I P I P S S W A F G N
 F L W E W A S A R F S W P S L L V P F V
 Q W F V G L S P T V W L S V I W M M W Y
 W G P S L Y S I L S P F L P L L P I F F

CLWVYI226

SEQ ID NO:4

1 C Q G M L R V C P L L P G S S T T S R G
 L C K T C T T P A Q G T S M Y P S C C C
 T K L S D G N C T C I P I P S S W A F G
 N F L W E W A S A R F S W P S L L V P F
 V Q W F V G L S P T V **91**

5 SEQ ID NO:5

1 C Q G M L R V C P L L P G S S T T S R G
 L C K T C T T P A Q G T S M Y P S C C C
 T K L S D G N C T C I P I P S S W A F G
 N F L W E W A S A R F S W P S L L V P F
 V **81**

SEQ ID NO:6

STTSR

SEQ ID NO:7

10 TTSRG

SEQ ID NO:8

TSRGL

SEQ ID NO:9

SRGLC

15 SEQ ID NO:10

RGLCK

SEQ ID NO:11

G L C K T

SEQ ID NO:12

L C K T C

5 SEQ ID NO:13

W A F G N

SEQID NO:14

A F G N F

SEQ ID NO:15

10 F G N F L

SEQ ID NO:16

G N F L W

N F L W E

15 (11) Polipéptido aislado correspondiente a la secuencia del antígeno de HBs del virus de hepatitis B, caracterizado porque contiene un oligo- o polipéptido según uno de los objetos (9) a (10).

(12) Fragmento de un polipéptido que corresponde a la secuencia del antígeno HBs del virus de hepatitis B, caracterizado porque el fragmento contiene un oligo- o polipéptido según uno de los objetos (9) a (10).

(13) Polipéptido aislado que codifica el a-determinante del antígeno HBs del virus de hepatitis B, caracterizado porque contiene un oligo- o polipéptido según uno de los objetos (9) a (10).

20 (14) Kit de ensayo para detectar o determinar, por medio de una reacción de hibridación, un ácido nucleico que es específico para una variante o mutante del virus de hepatitis B usando al menos un oligo- o polinucleótido según uno o varios de los objetos (1) a (6).

25 (15) Kit de ensayo para la detección inmunoquímica o para la determinación inmunoquímica de un anticuerpo dirigido contra una variante o mutante del virus de hepatitis B, usando al menos un oligo- o polipéptido según uno de los objetos (9) a (13).

Adicionalmente, la presente invención incluye una secuencia aislada de nucleótidos que codifica la presente variante según la invención del a-determinante del antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) en las posiciones de aminoácidos entre aa 1 y 226 o conduce a un producto de péptido que coincide en la aa-secuencia con la SEQ. ID NO:4 representado en la figura 6.

30 Además, la presente invención incluye un vector que comprende una o varias de las secuencias de nucleótidos mencionadas, como también una célula hospedera que contiene este vector y un método para la representación de un polipéptido correspondiente a partir del a-determinante, que comprende la incubación de las células hospederas arriba mencionadas durante los tiempos y en las condiciones que se requieren para la expresión del polipéptido.

35 Una variante de HBV aislada también es objeto de la invención, en cuyo caso el virus presenta un a-determinante que corresponde a las secuencias de aa al menos entre aproximadamente la posición 100 y 160.

También es objeto de la presente invención una mezcla inmunogénica para generar anticuerpos policlonales o monoclonales, que comprende el HBV aislado descrito o uno o varios de los polipéptidos descritos.

40 La invención también contiene una sonda de polinucleótido que contiene una secuencia del genoma de HBV la cual conduce a un a-determinante modificado mediante sustitución de aminoácidos, el cual es idéntico a la secuencia de aa de la nueva variante de HBV.

Asimismo son objeto de la invención los kits para detección de polinucleótidos de la variante de HBV con ayuda de la sonda mencionada, así como también kits para detectar anticuerpos que son específicos para la variante o epítopos de la misma, como los métodos de detección de polinucleótidos y anticuerpos que comprenden una incubación para formar complejos correspondientes y la detección de estos complejos mediante métodos adecuados conocidos por el experto en la materia.

Las modalidades de estos kits y métodos de detección pueden diseñarse para la detección específica y única de nucleótidos y anticuerpos dirigidos contra el antígeno de la variante de HBV o poseer suplementarios, es decir permitir la detección de los analitos variantes de la invención adicionalmente a los nucleótidos, antígenos o anticuerpos de HBV conocidos en la actualidad.

10 De manera análoga, una mezcla inmunogénica de secuencias de polipéptidos de la invención también puede aplicarse en conexión con antígenos conocidos, por ejemplo, para el mejoramiento de la efectividad de una vacuna.

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

de HDB 07	aa-Posición	aa de ayw2/Genotipo D
R	105	P
L	110	I
R	118	T
L	120	P
K	122	R
L	142	P
N	160	K
P	173	L

15

Además, en la posición de aa 100 de HDB 07 se presenta cisteína (C) en lugar de tirosina (Y):

C. 100 Y.

Estas sustituciones de aa pueden atribuirse a reemplazos correspondientes de nucleótidos en los codones correspondientes.

20 La presente invención se refiere a una secuencia aislada de nucleótidos que codifica el a-determinante del virus (figura 3 y SEQ ID No: 1).

La invención también comprende nucleótidos con al menos 65% de coincidencia, preferiblemente de al menos 75% de coincidencia y particularmente preferible con al menos 90% de coincidencia con la secuencia de nucleótidos de la presente invención o fragmentos de la misma, así como secuencias complementarias a la misma.

25 La invención también comprende polipéptidos que son codificados por la secuencia de nucleótidos arriba descritas, principalmente en aquellas secuencias de aminoácidos que determinan el a-determinante del HBsAg.

Por un fragmento de nucleótido se entiende una secuencia consecutiva de al menos 9, preferiblemente 9-15 particularmente preferible 15-21 e incluso muy particularmente preferible 21-60 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la nueva variante de HBV, en cuyo caso las mezclas de fragmentos de nucleótidos de este tipo.

Se entiende que un fragmento de polipéptido es una secuencia de al menos 3, preferiblemente 3-5, particularmente preferible 5-7 e incluso muy particularmente preferible 7-20 aminoácidos del a-determinante de la nueva variante de HBV, en cuyo caso las mezclas de fragmentos de polipéptidos de este tipo también se abarcan en esta invención.

35 Bajo la presente invención también se abarca una secuencia aislada de nucleótidos que puede hibridarse y conduce a secuencias de nucleótidos que corresponden a la secuencia de nucleótidos de la nueva variante de HBV o a partes del a-determinante de la nueva variante de HBV, son complementarias de las mismas o pueden atribuirse como subtipo o mutación al HDB 07.

40 El experto en la materia sabe que después de su aislamiento según métodos del estado de la técnica una secuencia de nucleótidos puede introducirse en células hospederas procariotas (por ejemplo, *E. coli*), eucariotas (por ejemplo, Chinese Hamster Ovary Cell (células de ovario de hámster chino)) o levaduras (por ejemplo, *S. Cerevisiae*) con ayuda de un vector o constructo (con métodos conocidos por el experto en la materia tales como, por ejemplo,

transfección, transformación o electroporación: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Vol. 1-3, ed Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), en cuyo caso pueden aplicarse cultivos transitorios o permanentes.

Por consiguiente, la presente invención comprende secuencias aisladas de nucleótidos del a-determinante de la nueva variante de HBV, polipéptidos que se codifican por estos nucleótidos, vectores que contienen secuencias de nucleótidos del a-determinante de la nueva variante de HBV, como también la célula hospedera a la cual se lleva un vector. Además de la representación de polipéptidos con ayuda de un sistema de expresión (recombinante o por ingeniería genética), el experto en la materia sabe que las estructuras de polipéptido análogas también se preparan de modo completamente sintético o directamente mediante purificación de la variante de virus.

5 10 Es posible usar los polipéptidos o las proteínas de la variante novedosa de HBV para generar anticuerpos monoclonales y/o policlonales que se enlazan de modo inmunológico a los sitios de enlazamiento (epítopos) del a-determinante de la variante novedosa de HBV. Los métodos para preparar anticuerpos son conocidos por el experto en la materia (por ejemplo, Koehler et al., Nature 256:494 (1975), Mimms et al., Vi. 176: 604-619 (1990).

15 Además, es posible usar el a-determinante de la variante HDB 07 de acuerdo con la invención en forma de la secuencia completa de polipéptidos o partes de la misma para la determinación de anticuerpos dirigidos contra la variante de HBV (anticuerpos anti-HBsAg) (véase arriba).

Para el experto en la materia son corrientes una cantidad de métodos de determinación en los cuales se forman inmunocomplejos, o se inhibe su formación, con polipéptidos del a-determinante de la variante de HBV y anticuerpos de origen animal o humano.

20 25 Una modalidad especial representa el llamado inmunoensayo de enzima, del cual se describe a continuación un posible principio de ensayo a manera de ejemplo, aunque las enseñanzas de la invención no se limitan a éste:

En el llamado principio de sandwich, muy ampliamente difundido, las secuencias de polipéptido o de proteína que portan el epítope, inmovilizadas sobre un soporte adecuado (por ejemplo, micropartículas o superficie de pozos de una placa de microtitulación) se incuban con la muestra a investigar. Se detectan anticuerpos enlazados a los epítopos después de retirar el exceso de muestra efectuando una incubación adicional con secuencias de polipéptido o de proteína que portan epítopo y las cuales están provistas con una sonda. En calidad de sonda se emplea con frecuencia una enzima cuya conversión catalítica de un sustrato adecuado, después de retirar el exceso de reactivo, conduce a una reacción de color que se mide mediante fotometría y cuya intensidad es proporcional al contenido de anticuerpos presente en la muestra.

30 40 Además de esta modalidad especial, también se conocen métodos que son de naturaleza homogénea (es decir, que no requieren separación enlazada/libre), los cuales pasan sin sonda (por ejemplo, métodos de aglutinación), son capaces de evaluarse a simple vista (por ejemplo, inmunodifusión radial) o hacen uso de otras ondas (por ejemplo, isótopos radioactivos o quimioluminiscencia) o de varias sondas (como por ejemplo, el sistema de biotina/estreptavidina).

45 50 Asimismo, las estructuras de polipéptido de la variante HBV HDB 07 pueden representarse mediante anticuerpos anti-idiotípicos o, seleccionando un principio de ensayo adecuado, los anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de la variante también pueden usarse para determinar anticuerpos anti-HBs (por ejemplo, en un formato de ensayo competitivo). Igualmente se conoce que la diferenciación de las clases de inmunoglobulina también puede efectuarse seleccionando el principio de ensayo (por ejemplo, mediante el método "indirecto" con un segundo anticuerpo específico de clase (por ejemplo, específico de IgG o IgM) con una muestra o con la ayuda del llamado principio anti- μ (específico de IgM). Por supuesto es necesario que los métodos y materiales (incluyendo muestra y secuencias de polipéptidos) se adapten a la diana particular.

Todas estas modalidades son conocidas por el experto en la materia de modo que por "determinación de anticuerpos que son específicos para el a-determinante de la nueva variante HDB 07" de acuerdo con la presente invención se entienden todos los métodos adecuados para detectar inmunoglobulinas y/o clases de inmunoglobulina dirigidas contra la variante novedosa de HBV HDB 07, independientemente de si el anticuerpo contra la variante novedosa se busca solo o en conexión con anticuerpos contra a-determinantes conocidos y/o mutaciones conocidas en la a-región.

Finalmente, el experto en la materia también sabe usar anticuerpos monoclonales o policlonales o mezclas de los mismos o fragmentos de tales anticuerpos o mezclas de los mismos que reaccionen con epítopos de la variante novedosa de HBV HDB 07, para determinar el a-determinante de la variante de HBV de acuerdo con la invención (HBsAg de la HDB 07-Variante) en forma de la secuencia completa de polipéptidos o partes de la misma en las muestras a investigar.

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

- 5 Una modalidad especial representa el llamado inmunoensayo de enzima, del cual a continuación se describe un posible principio de ensayo a manera de ejemplo, pero sin restringir el concepto de la invención al mismo:

En el llamado principio de sandwich, muy ampliamente difundido, los anticuerpos o fragmentos de los mismos, inmovilizados sobre un soporte adecuado (por ejemplo, micropartículas o superficie de pozos de una placa de microtitulación) se incuban con la muestra a investigar. Se detecta HBsAg enlazado a los anticuerpos después de retirar el exceso de muestra efectuando una incubación adicional con anticuerpos anti-HBs (monoclonales o policlonales o fragmentos o mezclas de estos fragmentos) y los cuales están provistos con una sonda. En calidad de sonda se emplea con frecuencia una enzima cuya conversión catalítica de un sustrato adecuado, después de retirar el exceso de reactivo, conduce a una reacción de color que se mide mediante fotometría y cuya intensidad es proporcional al contenido de anticuerpos presente en la muestra.

- 10 15 Además de esta modalidad especial, también se conocen métodos que son de naturaleza homogénea (es decir que no requieren separación enlazada/libre) y pasan completamente sin sonda (por ejemplo, métodos de aglutinación), pueden evaluarse a simple vista (por ejemplo, inmunodifusión radial) o hacen uso de otras muestras (por ejemplo, isótopos radioactivos o quimioluminiscencia) o de varias sondas (como por ejemplo el sistema de biotina/estreptavidina).

- 20 25 Todas estas modalidades son conocidas por el experto en la materia de modo que por "determinación de HBsAg de la nueva variante de HBV" con la presente invención se entienden todos los métodos que son adecuados para detección de secuencias de polipéptidos o antígenos de la nueva variante de HBV, independientemente de la cuestión si se determina solo el HBsAg de la nueva variante o en conexión con HBsAg de a-determinantes y / o mutaciones conocidos en la a-región.

- 30 35 Asimismo, para el experto en la materia es corriente, por razones económicas, combinar una determinación de HBsAg con un método de detección para detectar otro analito (por ejemplo, antígeno de VIH o determinación simultánea de variantes de HBV - HBsAg y anticuerpos específicos dirigidos contra estos) en un lote de ensayos (de diferenciación o no diferenciación).

- 40 45 En relación con los ensayos de ácidos nucleicos (EAN), el experto en la materia también reconocerá el uso de secuencias de nucleótidos de acuerdo con la presente invención para preparar oligómeros de ADN de 6-8 nucleótidos o más grandes que son adecuados como sondas de hibridación para detectar el genoma viral de la variante de HBV, aquí descrita, en personas que posiblemente porten la variante HDB 07 del virus o, por ejemplo, en el sector de donación de sangre para cribar sangre almacenada para la presencia del genoma de variante, ya sea de manera dirección nada, o con la detección de secuencias de nucleótidos de variantes de HBV y/o mutantes de HBV conocidos. Con base en las secuencias encontradas de nucleótidos de la nueva variante de HBV igualmente pueden desarrollarse cebadores correspondientes.

- 50 Por otra parte, la invención también incluyen una vacuna que comprende un polipéptido de acuerdo con la presente invención y un adyuvante convencional (por ejemplo, el adyuvante de Freund, solución salina amortiguada con fosfato o similares). Una vacuna de este tipo puede usarse para inducir la formación de anticuerpos en mamíferos, incluyendo humanos. De manera similar, la invención comprende una partícula que comprende una secuencia de aminoácidos no específica para variante la cual induce la formación de una partícula conjuntamente con un polipéptido que contiene epítopo el cual es específico para la variante de HBV HDB 07 de la invención.

- Finalmente, también son objeto de la invención reactivos diagnósticos en forma de kit los cuales, con base en los métodos arriba descritos, una detección de anticuerpos (anti-HBs) dirigidos contra antígeno específico de variante de HBV (HBsAg), ya sea como determinaciones singulares, o combinables unos con otros o con otros antígenos de HBV conocidos o anticuerpos reactantes con éstos específicamente, o también con analitos completamente diferentes.

- Adicionalmente, las secuencias de nucleótidos presentes pueden utilizarse para preparar cebadores y/o sondas de gen, por lo cual también son objeto de la invención kits que contienen cebadores y/o sondas para la detección de ácido nucleico específico de variante de HBV, ya sea solo o en conexión con secuencias de nucleótidos de HBV conocidas en las muestras a investigar.

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

Finalmente, con base en las presentes secuencias de nucleótidos también pueden desarrollarse cebadores que se usan en la llamada reacción en cadena de polimerasa (PCR). La PCR representa un método para amplificar una secuencia deseada de nucleótidos de un ácido nucleico o una mezcla de ácidos nucleicos. En tal caso, los cebadores se extienden respectivamente de modo específico por medio de una polimerasa con el ácido nucleico deseado en calidad de marco de lectura. Después de la disociación de la hebra original se hibridan nuevos cebadores y se extienden a su vez mediante la polimerasa. Repitiendo estos ciclos se logra un enriquecimiento de moléculas con la secuencia diana buscada.

Además, la presente invención también comprende cultivos de células tisulares que están infectadas con la variante de HBV de la invención, así como también la misma variante aislada de HBV. También es objeto de la invención una preparación inmunogénica que contiene la variante de HBV HDB 07 de la invención, atenuada o desactivada.

La presente invención se describe además en las reivindicaciones.

Descripción de las ilustraciones:

Figura 1 representa un resumen de las secuencias de aminoácidos del a-determinante de 8 fenotipos descritos del HBV en comparación con la variante de HDB 07.

15 En la Figura 2 se representan las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del gen S del genotipo D, subtipo ayw2 de HBV.

Figura 3 ilustra la secuencia de nucleótidos del antígeno de superficie HBV para el subtipo ayw2 del genotipo D de HBV en comparación con la secuencia de nucleótidos de HDB 07.

Figura 4 compila las desviaciones relevantes de traducción de la secuencia de nucleótidos de HDB 07.

20 En la Figura 5 se representa la secuencia de nucleótidos del gen S de HDB 07 así como la correspondiente secuencia de aminoácidos. El a-determinante se encuentra entre los aminoácidos No. 101 y 180 del HBsAg pequeño (Small, S).

25 Figura 6 muestra la correspondiente secuencia de polipéptidos del a-determinante de HDB 07, así como regiones estrechamente vecinas que se codifican por la secuencia de nucleótidos descrita en la figura 5. Éstas se comparan con regiones análogas del subtipo ayw2 del genotipo D de HBV.

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

Ejemplo 1: determinación de HbsAg por medio de inmunoensayo de encima, EIA

30 Para determinar el antígeno de superficie (HBsAg) de HBV en la sangre de un paciente de Berlín se empleó el inmunoensayo de enzima Enzygnost® HBsAg 5.0 de la empresa Dade Behring Marburg GmbH, Marburg (Alemania).

Este es un ensayo eficiente que está probado en Europa y el cual se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones dadas en el prospecto.

35 El principio de ensayo que sirve de fundamento es un ensayo llamado sandwich en formato de placas de microtitulación:

40 100 µl de la muestra a investigar se ponen en contacto en un método de un solo paso con 25 µl de conjugado 1 (anticuerpos monoclonales de ratón, específicos de HBsAg, los cuales se etiquetaron de modo covalente con biotina) y anticuerpos policlonales de oveja, inmovilizados, específicos de HBsAg. Después de jugar por 60 minutos a 37 °C y retirar el exceso de componentes lavando 4 veces las cavidades de las placas se adicionaron 100 µl de conjugado 2 consistente en estreptavidina a la cual se enlazó la enzima peroxidasa de la sonda. Después de incubar por 30 minutos a 37 °C y retirar el exceso de componentes lavando 4 veces las cavidades de placas se adicionaron 75 µl de regulador de cromogen/solución de sustrato, seguido de una incubación por 30 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo del tinte de tetrametilbencidina, de color azul, se interrumpe adicionando 75 µl de solución de detención (ácido sulfúrico) y la tintura se mide mediante fotometría a 450 nm.

45 La intensidad del desarrollo de color, medida en densidad óptica (O.D.) es directamente proporcional al contenido de HBsAg en la muestra a investigar, en cuyo caso un valor de O.D. (valor de absorción de luz), que sea más bajo que un valor límite, se evalúa como HbsAg negativo. El valor límite se define como el valor medio de O.D. del control

ensayado en paralelo, negativo (presente en el kit de ensayo), al cual se adiciona una cantidad constante de 0.05 O.D.

5 Los límites de detección del lote (# 35214) empleado para la investigación se determinaron usando preparaciones estándar internacionalmente aceptadas del Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Alemania, mediante interpolación de ensayos de diluciones de las preparaciones estándar en suero un negativo a HBsAG como 0,007 ng de subtipo/ ml y 0,005 ng de subtipo/ ml.

10 La investigación de la muestra # 126734 / 305024817, de la cual se aisló ADN, dio resultados, en 2 ensayos independientes en 2 días diferentes, entre 0.02 y 0.03 O.D., que también pueden interpretarse de acuerdo con los criterios del ensayo como HBsAg-negativos. El control realizado conjuntamente, positivo (presente en el kit de ensayo), fue positivo (cumplidos los criterios de validación).

Ejemplo 2: Aislamiento del ADN de HDB 07 de la muestra # 126734 / 305024817

15 Una alícuota de 65 µl de la muestra de Berlín se completó hasta 200 µl con 135 µl de plasma negativo y se aisló el ADN usando el kit QIA amp® Min Elute™ Virus Spin de la empresa Qiagen, Hilden (Alemania). En este caso se siguieron todos los pasos del método descrito en el prospecto y se llevó a cabo la elución en un volumen de 20 µl en cada caso.

Ejemplo 3: Reacción en cadena de polimerasa, PCR

2.1. Cebadores de HBV

Se utilizaron los cuatro siguientes cebadores de HBV:

Cebador 1 con la secuencia 5'> 3':

20 GGGTCACCATATTCTTGGGAAC (SEQ ID NO:28)

Cebador 2 con la secuencia 5'> 3':

TATACCCAAAGACAAAAGAAAAATTGG (SEQ ID NO:29)

Cebador 3 con la secuencia 5'> 3':

GACTCGTGGTGGACTTCTCTC (SEQ ID NO:30)

25 Cebador 4 con la secuencia 5'> 3':

TACAGACTTGCCCCCAATACC (SEQ ID NO:31)

2.2. Amplificación de PCR

30 Se realizó una amplificación de PCR llamada nested (alojada) del antígeno de superficie, en cuyo caso se utilizó el kit de polimerasa de ADN Perkin Elmer Ampli Taq® así como el sistema de PCR Thermocycler Gene Amp ® 9700 de la empresa Perkin Elmer Applied Biosystems, Estados Unidos.

Los nucleótidos se adquirieron de la empresa Amersham Biosciences, Reino Unido.

Para el primer ciclo de amplificación se amplificaron 7 µl del ADN aislado usando los cebadores 1 y 2 mencionados arriba y las siguientes condiciones:

PCR 1 rxn

Cebador 1 (10 µM)	1 µl
Cebador 2 (10 µM)	1 µl
Regulador 10 veces concentrado (incl. 15 mM Mg ₂ Cl ₂)	5 µl
Mezcla de dNTP (10 mM)	1 µl
Agua dest.	34,75 µl
Ampli Taq (5 U/ µl)	0,25 µl

Por tubo	43 µl volumen total
plus	7 µl ADN aislado
	50 µl volumen de reacción

Se amplificó la mezcla de 50 µl usando el termociclador descrito en las siguientes condiciones:

94° C, 1 min. / 94°C, 28 s - 50° C, 28 s - 72 ° C, 60 s (40 ciclos) / 72 ° C, 5 min. / 8 °C impregnado.

En la segunda ronda de amplificación se amplificaron más 7 µl del primer producto de PCR usando los cebadores 3 y 4 y las siguientes condiciones:

PCR 2 rxn

Cebador 3 (10 µM)	1 µl
Cebador 4 (10 µM)	1 µl
Regulador 10 veces concentrado	5 µl
Mezcla de dNTP (10 mM)	1 ml
Agua dest.	34,75 µl
Ampli Taq (5 U/ µl)	0,25 µl
Por tubo	43 µl volumen total
plus	7 µl producto de PCR v.rxn
	50 µl volumen de reacción

Esta mezcla de PCR 2 fue amplificada usando el termociclador descrito arriba, aplicando las siguientes condiciones:

94° C, 1 min. / 94°C, 28 s - 55° C, 28 s - 72 ° C, 38 s (40 ciclos) / 72 ° C, 5 min. / 8 °C impregnado.

Finalmente, el producto de PCR 2 fue fraccionado mediante electroforesis (1,5 % de agarosa) huyendo marcadores de peso molecular adecuados. El producto de PCR (con aproximadamente 520 pares de bases) fue purificado con ayuda del kit de purificación QIA quick PCR Purification de la empresa Qiagen, Hilden (Alemania).

Ejemplo 4: Secuenciación de HDB 07

El producto de PCR purificado fue secuenciado por la empresa Eurofin Medigenomix GmbH Martinsried (Alemania) con ayuda del sistema ABI 3700 Kapillar en conexión con el ABI BigDye Terminator Chemistry versión 3.1. y el software ABI Sequencing Analysis Software versión 3.7. usando los cebadores 3 y 4 descritos en el ejemplo 3.

Resultado de la secuenciación

Fue posible demostrar que el HBsAg de la muestra analizada dentro de la región secuenciada muestra la mejor coincidencia de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos con el genotipo D, subtipo ayw2. En la región del a-determinante la muestra analizada de Berlín muestra en total 7 sustituciones de aminoácidos en comparación con el genotipo D, subtipo ayw2 (véase también Figura 6):

	HDB 07:	D, ayw2:
1)	Arg (R) en lugar de	105 Pro (P)
2)	Arg (R) en lugar de	118 Thr (T)
3)	Leu (L) en lugar de	120 Pro (P)
4)	Lys (K) en lugar de	122 Arg (R)
5)	Leu (L) en lugar de	142 Pro (P)
6)	Asn (N) en lugar de	160 Lys (K)

ES 2 531 098 T3

- | | | |
|----|---------------------|-------------|
| 7) | Pro (P) en lugar de | 173 Leu (L) |
| 8) | Leu (L) en lugar de | 110 Ile (I) |

Adicionalmente en la posición #100 está presente una sustitución de aminoácido:

- | | | |
|----|---------------------|--------------|
| 9) | Tyr (Y) en lugar de | 100 Cys (C). |
|----|---------------------|--------------|

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH

<120> Nuevo mutante de proteína de superficie del antígeno de superficie de virus de hepatitis B HVB (HBsAg)

<130> 2007/B008 - Ma 1292

<140> DE 10 2007 062 962.3

10 <141> 2007-12-21

<160> 31

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 678

15 <212> DNA

<213> Virus de hepatitis B

<400> 1

atggagaaca tcacatcagg attccttagga cccctgctcg tggcacaggc ggggttttc	60
ttgttgacaa gaatcctcac aataccgcag agtctagact cgtgggtggac ttctctcaat	120
tttctagggg gaactaccgt gtgtcttggc caaaaattcgc agtccccaaac ctccaaatcac	180
tcaccaacct cctgtcctcc aacttgcct ggatatcgct ggatgtgtct gcggcggttt	240
atcatcttcc tcttcatcct gctgctatgc ctcatcttct tgtgggttct tctggactgt	300
caaggtatgt tacgcgtttg tcctctactt ccaggatctt caaccaccag caggggacta	360
tgc当地点> accttgcgttgc tgctcaagga acctctatgt atccctcctg ttgcgtgtacc	420
aaactttcgg acggaaatttgc cacctgtatt cccatccat catcctgggc tttcgaaac	480
ttccttatggg agtgggcctc agcccggtttc tcctggccca gtttactagt gccatgggttt	540
cagtgggttcg tagggcttcc ccccactgtt tggctttcag ttatatggat gatgtggat	600
tgggggccaa gtctgtacag catcttgagt cccttttac cgctgttacc aattttcttt	660
tgtctttggg tatacatt	678

<210> 2

ES 2 531 098 T3

<211> 243

<212> DNA

<213> Virus de hepatitis B

<400> 2

tgtcaaggta ttttacgcgt ttgtcctcta cttccaggat cttcaaccac cagcagggga 60
ctatgcaaaa cctgcacgac tcctgctcaa ggaacctcta tgtatccctc ctgttgctgt 120
accaaacttt cgacggaaa ttgcacctgt attcccatcc catcatcctg ggcttcgga 180
5 aacttcctat gggagtgggc ctcagcccggt ttctcctggc ccagtttact agtgccattt 240

gtt 243

<210> 3

<211> 226

10 <212> PRT

<213> Virus de hepatitis B

<400> 3

ES 2 531 098 T3

Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1 5 10 15

Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
20 25 30

Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys
35 40 45

Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
50 55 60

Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 70 75 80

Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
85 90 95

Leu Leu Asp Cys Gln Gly Met Leu Arg Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly
100 105 110

Ser Ser Thr Thr Ser Arg Gly Leu Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala
115 120 125

Gln Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Leu Ser Asp
130 135 140

Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Asn
145 150 155 160

Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Pro Ser Leu Leu
165 170 175

Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
180 185 190

Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile
195 200 205

ES 2 531 098 T3

Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
210 . . 215 . . 220

Tyr Ile
225

<210> 4

<211> 91

<212> PRT

5 <213> Virus de hepatitis B

<400> 4

Cys Gln Gly Met Leu Arg Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Ser Ser Thr
1 . . 5 . . 10 . . 15

Thr Ser Arg Gly Leu Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr
20 . . 25 . . 30

Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Leu Ser Asp Gly Asn Cys
35 . . 40 . . 45

Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Asn Phe Leu Trp
50 . . 55 . . 60

Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Pro Ser Leu Leu Val Pro Phe
65 . . 70 . . 75 . . 80

Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val
85 . . 90

<210> 5

<211> 81

10 <212> PRT

<213> Virus de hepatitis B

<400> 5

ES 2 531 098 T3

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

Thr Ser Arg Gly Leu Cys Lys Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Thr
20 25 30

Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Leu Ser Asp Gly Asn Cys
35 40 45

Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Asn Phe Leu Trp
50 55 60

Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Pro Ser Leu Leu Val Pro Phe
65 70 75 80

Val

<210> 6

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Virus de hepatitis B

<400> 6

Ser Thr Thr Ser Arg
1 5

10 <210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Virus de hepatitis B

<400> 7

Thr Thr Ser Arg Gly
1 5

15 <210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Virus de hepatitis B

20 <400> 8

	Thr Ser Arg Gly Leu
	1 5
	<210> 9
	<211> 5
	<212> PRT
5	<213> Virus de hepatitis B
	<400> 9
	Ser Arg Gly Leu Cys
	1 5
	<210> 10
	<211> 5
10	<212> PRT
	<213> Virus de hepatitis B
	<400> 10
	Arg Gly Leu Cys Lys
	1 5
	<210> 11
15	<211> 5
	<212> PRT
	<213> Virus de hepatitis B
	<400> 11
	Gly Leu Cys Lys Thr
	1 5
20	<210> 12
	<211> 5
	<212> PRT
	<213> Virus de hepatitis B
	<400> 12
	Leu Cys Lys Thr Cys
25	1 5
	<210> 13
	<211> 5
	<212> PRT

<213> Virus de hepatitis B

<400> 13

Trp	Ala	Phe	Gly	Asn
1				5

<210> 14

5 <211> 5

<212> PRT

<213> Virus de hepatitis B

<400> 14

Ala	Phe	Gly	Asn	Phe
1				5

10 <210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Virus de hepatitis B

<400> 15

Phe	Gly	Asn	Phe	Leu
1				5

15 <210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Virus de hepatitis B

20 <400> 16

Gly	Asn	Phe	Leu	Trp
1				5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

25 <213> Virus de hepatitis B

<400> 17

Asn	Phe	Leu	Trp	Glu
1				5

<210> 18

<211> 12
<212> DNA
<213> Virus de hepatitis B
<400> 18

5 agcaggggac ta 12
 <210> 19
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Virus de hepatitis B

10 <400> 19
 agcaggggac tatgcaaa 18
 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Virus de hepatitis B

15 <400> 20
 agcaggggac tatgcaaaac ctgc 24
 <210> 21
 <211> 45

20 <212> DNA
 <213> Virus de hepatitis B
 <400> 21
 agcaggggac tatgcaaaac ctgcacgact cctgctcaag gaacc 45
 <210> 22

25 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Virus de hepatitis B
 <400> 22
 agcaggggac tatgcaaaac ctgcacgact cctgctcaag gaacccttat gtatccctcc 60
 tgttgctgtta ccaaactttc g 81

30 <210> 23

<211> 12
<212> DNA
<213> Virus de hepatitis B
<400> 23

5 ttccgaaact tc 12
 <210> 24
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Virus de hepatitis B

10 <400> 24
 tgggcttcg gaaacttc 18
 <210> 25
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Virus de hepatitis B

15 <400> 25
 ccatcatcct gggcttcgg aaacttc 27
 <210> 26
 <211> 48

20 <212> DNA
 <213> Virus de hepatitis B
 <400> 26
 aattgcacct gtattccat cccatcatcc tgggcttcg gaaacttc 48
 <210> 27

25 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Virus de hepatitis B
 <400> 27
 ccctcctgtt gctgtaccaa actttcgac ggaaattgca cctgtattcc catccatca
 tcctgggctt tcggaaactt c

30 <210> 28

60
81

<211> 22
<212> DNA
<213> Virus de hepatitis B
<400> 28

5 gggtcaccat attctggga ac 22
 <210> 29
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Virus de hepatitis B

10 <400> 29
 tataccaaa gacaaaagaa aattgg 26
 <210> 30
 <211> 21
 <212> DNA

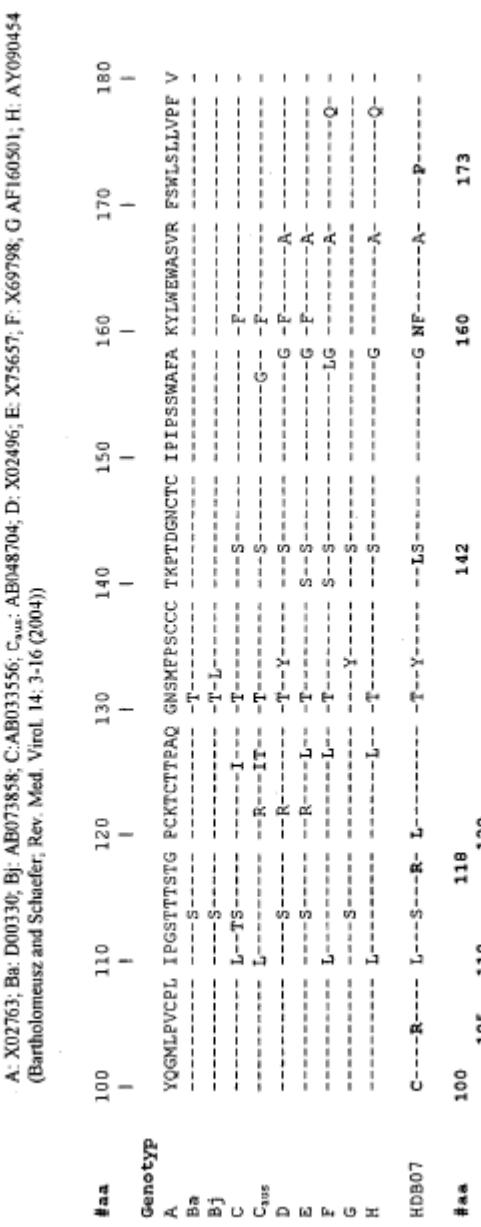
15 <213> Virus de hepatitis B
 <400> 30
 gactcgtggt ggacttctct c 21
 <210> 31
 <211> 22

20 <212> DNA
 <213> Virus de hepatitis B
 <400> 31
 tacagacttg gccccaata cc 22

REIVINDICACIONES

1. Un oligo- o polipéptido que comprende
 - (a) una secuencia de aminoácidos que es una secuencia parcial de la SEQ ID No: 3 que tiene al menos 75 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID No: 3, donde esta secuencia parcial incluye todas las ocho posiciones 100, 5 105, 110, 118, 120, 142, 160 y 173 de la SEQ ID No: 3; o
 - (b) un fragmento de un antígeno HBs de un virus de hepatitis B, donde el fragmento tiene una longitud de al menos 15 aminoácidos, el antígeno HBs tiene cisteína en la posición 100, arginina en la posición 105, leucina en la posición 110, arginina en la posición 118, leucina en la posición 120, leucina en la posición 142, asparagina en la posición 160 y prolina en la posición 173, y el fragmento comprende cisteína 100, arginina 105, arginina 118, leucina 120, 10 leucina 142, asparagina 160 y prolina 173.
2. Un oligo- o polipéptido como se reivindica en la reivindicación 1, el cual reacciona con sueros de individuos infectados por la variante de virus de hepatitis B, que comprende una secuencia de nucleótido que codifican una secuencia de aminoácidos la cual incluye SEQ ID No: 4.
3. Un oligo- o polipéptido como se reivindica en la reivindicación 1 o 2, el cual comprende una secuencia de 15 aminoácidos que se selecciona del grupo consistente en SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4 y SEQ ID No: 5.
4. Un oligo- o polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido que codifica un oligo- o polipéptido tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un oligo- o polinucleótido complementario al mismo.
5. Un oligo- o polinucleótido como se reivindica en la reivindicación 4, el cual comprende una secuencia de nucleótido que consiste en la SEQ ID No: 2.
- 20 6. Un vector o plásmido que comprenden un oligo- o polinucleótido como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5.
7. Una célula que ha sido transformada o transfectadas con un vector o plásmido como se reivindican en la reivindicación 6.
- 25 8. Una célula que comprende un oligo- o polinucleótido como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 o un vector o un plásmido como se reivindican en la reivindicación 6.
9. Un método para preparar un oligo- o polipéptido como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el cual comprende cultivar una célula como se reivindica en la reivindicación 7 o 8 en condiciones adecuadas de modo que se exprese el oligo- o polipéptido.
- 30 10. El método como se reivindica en la reivindicación 9, en el cual el oligo- o polipéptido se obtiene de las células y se separan de otros oligo- o polipéptidos.
11. Un kit de ensayo para detectar virus de hepatitis B que comprende un oligo- o polipéptido como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 12. Un péptido inmunogénico o mezcla de péptidos inmunogénicos que comprende uno o más oligo- o polipéptidos como se reivindican en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 solos o en combinación con inmunógenos conocidos de HBV.
13. Un método para detectar anticuerpos dirigidos contra un virus de hepatitis B, caracterizado porque
 - (a) se incuba una muestra con un oligo- o polipéptido como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en condiciones que permiten la formación de un complejo antígeno-anticuerpo; y
 - (b) se detecta el complejo de anticuerpo-antígeno que comprende el oligo- o polipéptido.
- 40 14. Un virus de hepatitis B aislado que incluye un antígeno HBs que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID No: 5.

Figura 1: Secuencia de aminoácidos de a-determinante de HBsAg de los A diferentes genotipos de HBV en comparación con el nuevo HDDB 07 mutante A Para cada genotipo se usó como base y la aa-secuencia derivada de la secuencia de nucleótidos



Las siete sustituciones de aminopacidos que no ocurren en las secuencias representativas usadas como base están en negrita

ES 2 531 098 T3

Figura 2 : Secuencia de nucleótidos del gen S x02496 (genotipo D, subtipo ayw2)
Numeración consecutiva de nucleótidos (nt) que codifican el antígeno de superficie
(excluyendo regiones pre S1 y pre S2)
Numeración consecutiva de aminoácidos (aa)

		(nt)	(aa)
1	ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA CAG CGG GGG TTT TTC	60	
1	Met Glu Asn Ile Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Glu Ala Gly Phe Phe	58	
M E N I T S G F L G P L L V L Q A G F F			
61	TTC TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT	120	
21	Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Glu Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn	46	
L L T R I L T I P Q S L D S W W T S L N			
121	TTC CTA GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GCC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC	180	
41	Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Glu Asn Ser Glu Ser Pro Ile Ser Asn His	60	
F L G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H			
181	TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT	240	
61	Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe	88	
S P T S C P P T C P G Y R W M C L R R F			
241	ATC ATC TTC CTC ATC CTG CTA TGC CTC ATC ATC TTG TTG GTT CTT CTG GAC TAT	300	
91	Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr	100	
I I F L F I L L C L I F L L V L L D Y			
301	CAA GGT ATG TTG CCA GGT TGT CCT CTA ATT CCA GGA TCT TCA ACT ACC AGC ACG GGA CCA	360	
101	Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Ile Phe Gly Ser Ser Thr The Ser Thr Gly Pro	120	
Q G M L P V C P L I P G S S T T S T G P			
361	TGC AGA ACC TGC AUG ACT CCT GCT CAA GGA ACC TCT ATG TAT CCC TCC TGT TGC TGT ACC	420	
121	Cys Arg Thr Cys Thr The Pro Ala Glu Gly Thr Ser Met Tyr Pro Ser Cys Cys Cys Thr	140	
C R T C T T P A Q G T S M Y P S C C C T			
421	AAA CCT TCG GAC GUA AAA IUC AUC IUG IAI ATT CUC ATU CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAA	480	
141	Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys	160	
K P S D G N C T C I P I P S S W A F G K			
481	TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC TCC TGG CTC AGT TTA CTA GUG UCA ATT GTT	540	
161	Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val	180	
F L W E W A S A R F S W L S L L V P F V			
541	CAG TGG TTC GTA QQQ CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG AIG AIG IGG IAI	600	
181	Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr	200	
Q W F V G L S P T V W L S V I W M M W Y			
601	TGG GGG CCA AGT CTG TAC AGC ATC TTG AGT CCC TTT TTA CGG CIG TTA CUA ATT TUC TUC	660	
201	Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Ser Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe	220	
W G P S L Y S I L S P F L P L L P I F F			
661	TGT CTT TGG GTA TAC ATT	678	
221	Cys Leu Trp Val Tyr Ile	226	
C L W V Y I			

ES 2 531 098 T3

Figura 3: Secuencia de nucleótidos del antígeno de superficie de HBV que codifica gen S del HBV de tipo silvestre, genotipo D / ayw2 (X02496) (fila superior de nt 1 a nt 678) en comparación con la secuencia de nucleótidos de la nueva variante HDB 07 (fila inferior, en la cual las diferencias de nucleótidos están resaltadas en negrita y puestas en paréntesis, si las mutaciones no conducen a un intercambio de aminoácidos)

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

ES 2 531 098 T3

Figura 4: Secuencia de nucleótidos (nt 1 a nt 678) del gen S de la nueva variante de HBV HDB 07

En negrilla están marcadas solo las diferencias de nucleótido que conducen a una secuencia modificada de aminoácidos (en comparación con el genotipo D / ayw2; X02496)

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

ES 2 531 098 T3

Figura 5: Secuencia de nucleótidos de gen S (1 a 678) y secuencia correspondiente de aminoácidos (aa 1 a 226) de la nueva variante de HBV HDB 07 (resaltados en negrita y subrayados los aminoácidos que se encuentran sustituidos en comparación con el HBV de tipo silvestre, genotipo D / ayw2 [X02496])

1	ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA TTC CTA GGA CCC CTG CTC GTG TTA CAG GCG GGG TTT TTC	60
1	<u>M</u> E N I T S G F L G P L L V L Q A G F F	20
61	TTG TTG ACA AGA ATC CTC ACA ATA CCG CAG AGT CTA GAC TCG TGG TGG ACT TCT CTC AAT	120
21	<u>L</u> L T R I L T I P Q S L D S N W T S L N	40
121	TTT CTA GGG GGA ACT ACC GTG TGT CTT GGC CAA AAT TCG CAG TCC CCA ACC TCC AAT CAC	180
41	F L G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H	60
181	TCA CCA ACC TCC TGT CCT CCA ACT TGT CCT GGT TAT CGC TGG ATG TGT CTG CGG CGT TTT	240
61	S P T S C P P T C P G Y R W M C L R R F	80
241	ATC ATC TTC CTC TTC ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TTC TTG TTG GTT CTT CTG GAC TGT	300
81	I I F L F I L L C L I F L L V L D <u>G</u>	100
301	CAA GGT ATG TTA CGC GTT TGT CCT CTA CTT CCA GGA TCT TCA ACC ACC AGC AGG GGA CTA	360
101	Q G M L <u>R</u> V C P L <u>L</u> P G S S T T S <u>R</u> G <u>L</u>	120
361	TGC AAA ACC TGC ACG ACT CCT GCT CAA GGA ACC TCT ATG TAT CCC TCC TGT TGC TGT ACC	420
121	C <u>K</u> T C T T P A Q G T S M Y P S C C C T	140
421	AAA CTT TCG GAC GGA AAT TGC ACC TGT ATT CCC ATC CCA TCA TCC TGG GCT TTC GGA AAC	480
141	K <u>L</u> S D G N C T C I P I P S S W A F G <u>N</u>	160
481	TTC CTA TGG GAG TGG GCC TCA GCC CGT TTC TCC TGG CCC AGT TTA CTA GTG CCA TTT GTT	540
161	F L N E W A S A R F S N <u>P</u> S L L V P F V	180
541	CAG TGG TTC GTA GGG CTT TCC CCC ACT GTT TGG CTT TCA GTT ATA TGG ATG ATG TGG TAT	600
181	Q W F V G L S P T V W L S V I W M M W Y	200
601	TGG GGG CCA AGT CTG TAC AGC ATC TTG AGT CCC TTT TTA CGG CTG TTA CCA ATT TTC TTT	660
201	W G P S L Y S I L S P F L P L P I F F	220
661	TGT CTT TGG GTA TAC ATT	678
221	C L N V Y I	226

Los siguientes aa están sustituidos frente al tipo silvestre de HBV (genotipo D / ayw2 en la variante de HDB 07 (X): Y 100 (C), P 105 (R), I 110 (L), R 22 (K) (intercambio del determinante de subtipode ad por ay) P 142 (L), K 160 (N) (pérdida de determinante adicional w), y L 173 (P)

ES 2 531 098 T3

Figura 6: Comparación de las secuencias de aminoácidos del a-determinante (aa 100 hasta aa 180), de la nueva variante HDB 07 (fila inferior) con el tipo silvestre de HBV, genotipo D / ayw2 [X02496] (fila superior)

		aa-secuencia tipo silvestre D / ayw2 [X02496]:																				Y	100
		aa-secuencia variante HDB 07:																				C	
101	Q	G	M	L	P	V	C	P	L	I	P	G	S	S	T	T	S	T	G	P	120		
	Q	G	M	L	<u>R</u>	V	C	P	L	<u>L</u>	P	G	S	S	T	T	S	<u>R</u>	G	<u>L</u>			
121	C	R	T	C	T	T	P	A	Q	G	T	S	M	Y	P	S	C	C	C	T	140		
	C	<u>K</u>	T	C	T	T	P	A	Q	G	T	S	M	Y	P	S	C	C	C	T			
141	K	P	S	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	G	<u>K</u>	160		
	K	<u>L</u>	S	D	G	N	C	T	C	I	P	I	P	S	S	W	A	F	G	<u>N</u>			
161	F	L	W	E	W	A	S	A	R	F	S	W	L	S	L	L	V	P	F	V	180		
	F	L	W	E	W	A	S	A	R	F	S	W	<u>P</u>	S	L	L	V	P	F	V			
181	Q	W	F	V	G	L	S	P	T	V												190	
	Q	W	F	V	G	L	S	P	T	V													

Los siguientes aa están sustituidos frente al tipo silvestre de HBV (genotipo D / ayw2) en la variante de HDB 07 (X):

Y 100 (C), P 105 (R), I 110 (L), T 118 (R), P120 (L), R 122 (K) (intercambio del determinante de subtipo de aa por ay), P 142 (L), K 160 (N) (pérdida de determinante adicional w), y L 173 (P)