

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 527**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/36 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 14/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2000 E 05076547 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 1609865**

54 Título: **Variante de virus de la hepatitis B (VHB)**

30 Prioridad:

09.04.1999 AU PP967999

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

11.09.2015

73 Titular/es:

**ABL SA (100.0%)
2, Rue des Dahlias
1411 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**BARTHOLOMEUSZ, ANGELINE;
LITTLEJOHN, MARGARET;
AYRES, ANNA y
LOCARNINI, STEPHEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 545 527 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

Variante de virus de la hepatitis B (VHB)

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a variantes virales que muestran sensibilidad reducida a agentes particulares y/o capacidad de interacción reducida con reactivos inmunológicos. Más particularmente, la presente invención se refiere a variantes del virus de la hepatitis B que muestran resistencia completa o parcial a análogos de nucleósidos y/o capacidad de interacción reducida con anticuerpos para componentes de la superficie viral incluyendo sensibilidad reducida. La presente invención contempla además ensayos para detectar dichas variantes virales siendo dichos ensayos útiles en el control de los regímenes terapéuticos antivirales y el desarrollo de vacunas nuevas o modificadas dirigidas contra agentes virales y en particular variantes del virus de la hepatitis B.

15 Antecedentes de la invención

Se recogen al final de la descripción detalles bibliográficos de las publicaciones indicadas numéricamente en la presente memoria descriptiva.

20 Las mutaciones específicas en una secuencia de aminoácidos se representan en el presente documento como "Xaa₁nXaa₂" en la que Xaa₁ es el resto de aminoácido original antes de la mutación, n es el número de resto y Xaa₂ es el aminoácido mutante. La abreviatura "Xaa" puede ser el código de tres letras o de una letra (es decir "X"). Los restos de aminoácidos para ADN polimerasa de virus de la Hepatitis B se numeran siendo el resto de metionina en el motivo Tyr Met Asp Asp (YMDD) el número de resto 550.

25 El virus de la Hepatitis B (VHB) puede provocar enfermedades debilitantes y puede conducir a insuficiencia hepática aguda. El VHB es un virus de ADN que se replica mediante un intermedio de ARN y utiliza transcripción inversa en su estrategia de replicación (1). El genoma del VHB es de naturaleza compleja que tiene una estructura de ADN parcialmente bicatenario con fases abiertas de lectura solapantes que codifican genes de superficie, núcleo, polimerasa y X. La naturaleza compleja del genoma del VHB está representada en la Figura 1.

30 La presencia de una ADN polimerasa de VHB ha conducido a la propuesta de que los análogos de nucleósidos podrían actuar como agente antivirales eficaces. Son ejemplos de análogos de nucleósidos que se ensayan en la actualidad penciclovir y su forma oral famciclovir (2, 3, 4, 5), lamivudina (6,7). Se ha mostrado que adefovir tiene actividad anti VHB eficaz *in vitro*. En general, dichos análogos de nucleótidos se usan junto con terapia de inmunoglobulina de Hepatitis B (HBIG). Existe potencial para que dichos agentes se usen en el tratamiento de infección por VHB crónica.

35 Se ha mostrado que el penciclovir tiene actividad inhibitora potente contra la síntesis de ADN de VHB de pato *in vitro* y se ha mostrado que inhibe la actividad de ADN polimerasa-transcriptasa inversa de VHB *in vitro* (8, 9). De forma similar, se ha demostrado que el famciclovir oral inhibe la replicación interhepática de virus VHB de pato *in vivo* (10). En el hombre, se ha mostrado que el famciclovir reduce la replicación de ADN de VHB en un paciente con hepatitis B grave después de trasplante de hígado ortotópico (OLT) (11).

40 De Man *et al.* (De Man R. A. *et al.* (1998) *J. Hepatol.* 29: 669-75) presenta un estudio sobre los acontecimientos clínicos, histológicos y virológicos en un receptor de trasplante de hígado ortotópico (OLT) con infección por hepatitis B recurrente. Pichoud *et al.* (Pichoud C. *et al.* (1999) *Hepatology* 29: 230-7) describe la selección transitoria de un mutante de gen de polimerasa de VHB que se asoció con la persistencia viral en un paciente inmunocompetente tratado con famciclovir. El documento WO 1999/066047 se refiere a una cepa viral de Hepatitis B inducida por vacuna y usos de la misma. El documento WO 2000/028009 se refiere a un virus de la Hepatitis B aislado con un componente de superficie que muestra un perfil inmunológico alterado en relación con un virus de la Hepatitis B de referencia. El documento WO 1998/021317 se refiere a variantes virales que muestran sensibilidad reducida a agentes particulares y/o capacidad de interacción reducida con reactivos inmunológicos. Bartholomeusz *et al.* (Bartholomeusz A. *et al.* (1997) *Intervirology* 40: 337-42) revisa el resultado del tratamiento con FCV en la prevención de VHB recurrente en pacientes después del trasplante.

45 En los trabajos que conducen a la presente invención, se usó terapia antiviral de análogos de nucleósidos para controlar la reaparición post OLT grave de infección por VHB (12). La terapia a largo plazo es obligatoria cuando los pacientes estén inmunosuprimidos y la tasa de replicación del VHB sea muy alta. Sin embargo, en dichas condiciones, como en cualquier quimioterapia a largo plazo de agentes infecciosos, existe el potencial de desarrollar resistencia o sensibilidad reducida a los agentes terapéuticos empleados. Además, algunos pacientes no responden al famciclovir pre-OLT. Esto puede deberse a que los pacientes no metabolizan famciclovir o que los pacientes están infectados con una variante de VHB resistente a famciclovir.

60 De acuerdo con la presente invención, los inventores han identificado variantes del VHB con mutaciones en el gen de la ADN polimerasa de VHB que en diversos grados reducen la sensibilidad del VHB a análogos de nucleósidos.

La identificación de estas variantes del VHB es importante para el desarrollo de ensayos para controlar los regímenes terapéuticos con análogos de nucleósidos y para explorar con respecto a agentes que pueden enmascarar los efectos de la mutación, es decir en el desarrollo de nuevas vacunas. Además, ya que el genoma de VHB comprende una serie de fases abiertas de lectura solapantes, una mutación de nucleótidos en una fase abierta de lectura puede afectar a productos de traducción en otra fase abierta de lectura. De acuerdo adicionalmente con la presente invención, los inventores han observado mutaciones que reducen la capacidad de interacción de reactivos inmunológicos, tales como anticuerpos y células inmunitarias, con componentes de superficie viral. Dichas variantes virales se denominan en el presente documento "mutantes de escape" ya que potencialmente escapan de la memoria inmunológica existente.

Sumario de la invención

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a no ser que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento indicado o número entero o grupos de elementos o números enteros pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se denominan por un identificador de secuencia, es decir <400>1, <400>2, etc. Después de las reivindicaciones se proporciona un listado de secuencias.

En un aspecto, la presente invención proporciona una variante de un virus VHB aislado, en el que la variante comprende una mutación en la ADN polimerasa seleccionada de N/S/H584K, K587R y R588K en la que dicha variante muestra sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar el potencial para que un VHB muestre sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido, comprendiendo dicho método aislar ADN o ARNm correspondiente de dicho VHB y explorar con respecto a una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica la ADN polimerasa dando como resultado al menos una sustitución, deleción y/o adición de aminoácidos en el dominio D de dicha ADN polimerasa en el que la presencia de dicha mutación es una indicación de la probabilidad de resistencia a dicho análogo de nucleósido, en el que el método determina una o más de las siguientes mutaciones en la ADN polimerasa: N584K, K587R y R588K.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una variante de un virus VHB aislado en el que la variante comprende una mutación en la ADN polimerasa seleccionada de N/S/H584K, K587R y R588K en el que dicha variante muestra sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido en la exploración con respecto a un agente antiviral capaz de inhibir dicho virus.

Se describe en el presente documento una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en un gen que codifica una ADN polimerasa dando como resultado al menos una adición, sustitución y/o deleción de aminoácidos en dicha ADN polimerasa.

También se describe una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en un gen que codifica un componente de superficie viral dando como resultado al menos una adición, sustitución y/o deleción de aminoácidos en dicho componente de superficie viral.

También se describe una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN al menos en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en una parte solapante de al menos dos fases de lectura abiertas dando como resultado una adición, sustitución y/o deleción de aminoácidos para productos de traducción de dichas fases abiertas de lectura.

También se describe una variante de VHB que comprende una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica una ADN polimerasa dando como resultado una adición, sustitución y/o deleción de aminoácidos en dicha ADN polimerasa en uno o más aminoácidos como se expone en Fórmula I:

FÓRMULA I

S Z₁ L S W L S L D V S A A F Y H Z₂ P L H P A A M P H L L Z₃ G S S G L Z₄ R Y V A R L S S Z₅ S Z₆ Z₇ X N Z₈ Q Z₉
 Z₁₀ X X X Z₁₁ L H Z₁₂ Z₁₃ C S R Z₁₄ L Y V S L Z₁₅ L L Y Z₁₆ T Z₁₇ G Z₁₈ K L H L Z₁₉ Z₂₀ H P I Z₂₁ L G F R K Z₂₂ P M G
 Z₂₃ G L S P F L L A Q F T S A I Z₂₄ Z₂₅ Z₂₆ Z₂₇ Z₂₈ R A F Z₂₉ H C Z₃₀ Z₃₁ F Z₃₂ Y M* D D Z₃₃ V L G A Z₃₄ Z₃₅ Z₃₆ Z₃₇ H
 Z₃₈ E Z₃₉ L Z₄₀ Z₄₁ Z₄₂ Z₄₃ Z₄₄ Z₄₅ Z₄₆ L L Z₄₇ Z₄₈ G I H L N P Z₄₉ K T K R W G Y S L N F M G Y Z₅₀ I G

en la que:

X es cualquier aminoácido;

Z₁ es N o D;
 Z₂ es I o P;
 Z₃ es I o V;
 Z₄ es S o D;
 Z₅ es T o N;
 Z₆ es R o N;
 Z₇ es N o I;
 Z₈ es N o Y o H;
 Z₉ es H o Y;
 Z₁₀ es G o R;
 Z₁₁ es D o N;
 Z₁₂ es D o N;
 Z₁₃ es S o Y;
 Z₁₄ es N o Q;
 Z₁₅ es L o M;
 Z₁₆ es K o Q;
 Z₁₇ es Y o F;
 Z₁₈ es R o W;
 Z₁₉ es Y o L;
 Z₂₀ es S o A;
 Z₂₁ es I o V;
 Z₂₂ es I o L;
 Z₂₃ es V o G;
 Z₂₄ es C o L;
 Z₂₅ es A o S;
 Z₂₆ es V o M;
 Z₂₇ Es V o T;
 Z₂₈ es R o C;
 Z₂₉ es F o P;
 Z₃₀ es L o V;
 Z₃₁ es A o V;
 Z₃₂ es S o A;
 Z₃₃ es V o L o M;
 Z₃₄ es K o R;
 Z₃₅ es S o T;
 Z₃₆ es V o G;
 Z₃₇ es Q o E;
 Z₃₈ es L o S o R;
 Z₃₉ es S o F;
 Z₄₀ es F o Y;
 Z₄₁ es T o A;
 Z₄₂ es A o S;
 Z₄₃ es V o I;
 Z₄₄ es T o C;
 Z₄₅ es N o S;
 Z₄₆ es F o V;
 Z₄₇ es S o D;
 Z₄₈ es L o V;
 Z₄₉ es N o Q;
 Z₅₀ es V o I; y
 M* es el aminoácido 550

siempre que dicha mutación no esté en el motivo YMDD del dominio C solo, y en el que dicha variante muestra sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido.

5 También se describe una variante de VHB que comprende una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica un componente de superficie viral dando como resultado una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en dicho componente de superficie viral en una región correspondiente a la secuencia de aminoácidos expuesta en la Fórmula I en el que dicha variante muestra capacidad de interacción reducida de reactivos inmunológicos con dicho componente de superficie viral.

10 También se describe una variante de VHB que comprende una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica un componente de superficie viral dando como resultado una adición, sustitución y/o adición de aminoácidos en dicho componente de superficie viral en una región definida por los aminoácidos 67-226 del antígeno de superficie del VHB o región funcionalmente equivalente en la que dicha variante muestra capacidad de interacción reducida de reactivos inmunológicos con dicho componente de superficie viral.

15

5 También se describe una variante del VHB que comprende una mutación en una fase abierta de lectura solapante en su genoma en la que dicha mutación está en una región definida por uno o más de los dominios F y A a E de la ADN polimerasa del VHB siempre que no esté en el motivo YMDD del dominio C solamente; y en la región solapante correspondiente a los aminoácidos 67-226 del antígeno de superficie del VHB; y en la que dicha variante muestra sensibilidad reducida a un análogo de nucleótido y muestra capacidad de interacción reducida con reactivos inmunológicos específicos para antígenos de superficie del VHB.

10 También se describe un método para determinar el potencial para que un VHB muestre sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido, comprendiendo dicho método aislar ADN o ARNm correspondiente de dicho VHB y explorar con respecto a una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica ADN polimerasa del VHB dando como resultado al menos una sustitución, deleción y/o adición de aminoácidos en uno cualquiera o más de los dominios F y A a E o una región próxima a los mismos de dicha ADN polimerasa en la que la presencia de dicha mutación es una indicación de la probabilidad de resistencia de dicho análogo de nucleósido.

15 También se describe un método para determinar el potencial para que un VHB muestre capacidad de integración reducida con el anticuerpo para el antígeno de superficie del VHB, comprendiendo dicho método aislar ADN o ARNm correspondiente de dicho VHB y explorar con respecto a una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica antígeno de superficie del VHB dando como resultado al menos una sustitución, deleción y/o adición de aminoácidos en los aminoácidos 67 a 226 de dicho antígeno de superficie o una región próxima a los mismos de dicho antígeno de superficie en el que la presencia de dicha mutación es una indicación de la probabilidad de reducir la capacidad de interacción de dichos anticuerpos con dicho antígeno de superficie mutado.

25 También se describe un método para determinar si un aislado del VHB codifica un ADN polimerasa variante, comprendiendo dicho método determinar la secuencia de aminoácidos de su ADN polimerasa directamente o mediante una secuencia de nucleótidos y compararlas con la secuencia de aminoácidos posterior:

FÓRMULA I

30 S Z₁ L S W L S L D V S A A F Y H Z₂ P L H P A A M P H L L Z₃ G S S G L Z₄ R Y V A R L S S Z₅ S Z₆ Z₇ X N Z₈ Q Z₉
 Z₁₀ X X X Z₁₁ L H Z₁₂ Z₁₃ C S R Z₁₄ L Y V S L Z₁₅ L L Y Z₁₆ T Z₁₇ G Z₁₈ K L H L Z₁₉ Z₂₀ H P I Z₂₁ L G F R K Z₂₂ P M G
 Z₂₃ G L S P F L L A Q F T S A I Z₂₄ Z₂₅ Z₂₆ Z₂₇ Z₂₈ R A F Z₂₉ H C Z₃₀ Z₃₁ F Z₃₂ Y M* D D Z₃₃ V L G A Z₃₄ Z₃₅ Z₃₆ Z₃₇ H
 Z₃₈ E Z₃₉ L Z₄₀ Z₄₁ Z₄₂ Z₄₃ Z₄₄ Z₄₅ Z₄₆ L L Z₄₇ Z₄₈ G I H L N P Z₄₉ K T K R W G Y S L N F M G Y Z₅₀ I G

35 en la que:

- X es cualquier aminoácido;
- Z₁ es N o D;
- Z₂ es I o P;
- Z₃ es I o V;
- Z₄ es S o D;
- Z₅ es T o N;
- Z₆ es R o N;
- Z₇ es N o I;
- Z₈ es N o Y o H;
- Z₉ es H o Y;
- Z₁₀ es G o R;
- Z₁₁ es D o N;
- Z₁₂ es D o N;
- Z₁₃ es S o Y;
- Z₁₄ es N o Q;
- Z₁₅ es L o M;
- Z₁₆ es K o Q;
- Z₁₇ es Y o F;
- Z₁₈ es R o W;
- Z₁₉ es Y o L;
- Z₂₀ es S o A;
- Z₂₁ es I o V;
- Z₂₂ es I o L;
- Z₂₃ es V o G;
- Z₂₄ es C o L;
- Z₂₅ es A o S;
- Z₂₆ es V o M;
- Z₂₇ es V o T;
- Z₂₈ es R o C;
- Z₂₉ es F o P;
- Z₃₀ es L o V;

Z₃₁ es A o V;
 Z₃₂ es S o A;
 Z₃₃ es V o L o M;
 Z₃₄ es K o R;
 Z₃₅ es S o T;
 Z₃₆ es V o G;
 Z₃₇ es Q o E;
 Z₃₈ es L o S o R;
 Z₃₉ es S o F;
 Z₄₀ es F o Y;
 Z₄₁ es T o A;
 Z₄₂ es A o S;
 Z₄₃ es V o I;
 Z₄₄ es T o C;
 Z₄₅ es N o S;
 Z₄₆ es F o V;
 Z₄₇ es S o D;
 Z₄₈ es L o V;
 Z₄₉ es N o Q;
 Z₅₀ es V o I; y
 M* es el aminoácido 550.

5 También se describe un antígeno de superficie del VHB variante aislado o una forma recombinante o derivada del mismo o un equivalente químico del mismo en el que dicho antígeno de superficie o su forma recombinante o derivada o su equivalente químico muestra un perfil inmunológico alterado en comparación con un antígeno de superficie de un VHB de referencia.

También se describe una vacuna del VHB que contiene una o más variantes del VHB que portan mutaciones que alteran el antígeno de superficie (sin incluir G145R).

10 También se describe una composición que comprende un VHB variante o un antígeno de superficie del VHB de dicho VHB variante o una forma recombinante o derivada del mismo o su equivalente químico y uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

15 También se describe un uso de una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en un gen que codifica una ADN polimerasa que da como resultado al menos una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en dicha ADN polimerasa en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de la hepatitis.

20 También se describe un uso de una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en un gen que codifica un componente de superficie viral dando como resultado al menos una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en dicho componente de superficie viral en la fabricación de un medicamento para tratamiento y/o profilaxis de la hepatitis.

25 También se describe un uso de una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en una parte solapante de al menos dos fases abiertas de lectura dando como resultado una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en productos de traducción de dichas fases abiertas de lectura en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la hepatitis.

30 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación esquemática que muestra el genoma del VHB de ADN parcialmente bicatenario que muestra las fases abiertas de lectura solapantes que codifican el gen de superficie (S), núcleo (C), polimerasa (P) y X.

35 La Figura 2 es una representación que muestra regiones conservadas del dominio A a E (subrayado) del VHB. M en YMDD es el número de aminoácido designado 550. * indica más de tres posibilidades de aminoácidos en esta posición de la secuencia consenso.

40 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

En consecuencia, se describe una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en un gen que codifica una ADN polimerasa dando como resultado al menos una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en dicha ADN polimerasa.

45

También se describe una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en un gen que codifica un componente de superficie viral dando como resultado al menos una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en dicho componente de superficie viral.

5 También se describe una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN al menos en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en una parte solapante de al menos dos fases abiertas de lectura dando como resultado una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en productos de traducción de dichas fases abiertas de lectura.

10 Preferentemente, el virus de ADN es un virus de la hepatitis o un virus relacionado y es más preferentemente VHB.

Un "virus relacionado" de acuerdo con la presente invención es uno relacionado a los niveles genético, inmunológico, epidemiológico y/o bioquímico.

15 Preferentemente, la mutación en la ADN polimerasa da como resultado sensibilidad reducida del VHB por un análogo de nucleósido.

20 Preferentemente, la mutación en el componente de superficie viral traduce la capacidad de interacción de reactivos inmunológicos tales como anticuerpos y células inmunitarias con el componente de superficie viral. Más preferentemente, el componente de superficie viral es un antígeno de superficie viral. La reducción en la capacidad de interacción de reactivos inmunológicos con un componente de superficie viral incluye en general la ausencia de memoria inmunológica para reconocer o reconocer sustancialmente el componente de superficie viral.

25 Una variante viral puede portar una mutación solamente en la ADN polimerasa o el antígeno de superficie o puede portar una mutación en ambas moléculas. El término "mutación" debe entenderse en su contexto más amplio e incluye una mutación silenciosa que no afecta sustancialmente a la función normal de la ADN polimerasa o antígeno de superficie o puede ser un mutación activa que tiene el efecto de selección de resistencia a análogo de nucleósidos o un fenotipo de mutante de escape. Cuando aparezcan múltiples mutaciones de acuerdo con la
30 presente invención o cuando resulten múltiples fenotipos de una única mutación, al menos una mutación debe estar activa o el virus debe mostrar al menos un fenotipo alterado tal como resistencia a análogos de nucleósidos o capacidad de interacción inmunológica reducida con el antígeno de superficie.

35 Las regiones de la polimerasa de VHB muestran similitud de aminoácidos con otras ADN polimerasas dependientes de ARN y polimerasas dependientes de ARN (13). La presente invención se extiende a todos los dominios de la ADN polimerasa de VHB y en regiones particulares F y A a E. En la presente memoria descriptiva, se hace referencia particularmente a las regiones conservadas definidas en Poch *et al.* (13) como dominios A a E (véase también referencia 18). Las regiones A a E se definen por la secuencia de aminoácidos expuesta en Fórmula I a continuación:

40 FÓRMULA I

45 S Z₁ L S W L S L D V S A A F Y H Z₂ P L H P A A M P H L L Z₃ G S S G L Z₄ R Y V A R L S S Z₅ S Z₆ Z₇ X N Z₈ Q Z₉
Z₁₀ X X X Z₁₁ L H Z₁₂ Z₁₃ C S R Z₁₄ L Y V S L Z₁₅ L L Y Z₁₆ T Z₁₇ G Z₁₈ K L H L Z₁₉ Z₂₀ H P I Z₂₁ L G F R K Z₂₂ P M G
Z₂₃ G L S P F L L A Q F T S A I Z₂₄ Z₂₅ Z₂₆ Z₂₇ Z₂₈ R A F Z₂₉ H C Z₃₀ Z₃₁ F Z₃₂ Y M* D D Z₃₃ V L G A Z₃₄ Z₃₅ Z₃₆ Z₃₇ H
Z₃₈ E Z₃₉ L Z₄₀ Z₄₁ Z₄₂ Z₄₃ Z₄₄ Z₄₅ Z₄₆ L L Z₄₇ Z₄₈ G I H L N P Z₄₉ K T K R W G Y S L N F M G Y Z₅₀ I G

en la que:

- X es cualquier aminoácido;
- Z₁ es N o D;
- Z₂ es I o P;
- Z₃ es I o V;
- Z₄ es S o D;
- Z₅ es T o N;
- Z₆ es R o N;
- Z₇ es N o I;
- Z₈ es N o Y o H;
- Z₉ es H o Y;
- Z₁₀ es G o R;
- Z₁₁ es D o N;
- Z₁₂ es D o N;
- Z₁₃ es S o Y;
- Z₁₄ es N o Q;
- Z₁₅ es L o M;
- Z₁₆ es K o Q;

Z₁₇ es Y o F;
 Z₁₈ es R o W;
 Z₁₉ es Y o L;
 Z₂₀ es S o A;
 Z₂₁ es I o V;
 Z₂₂ es I o L;
 Z₂₃ es V o G;
 Z₂₄ es C o L;
 Z₂₅ es A o S;
 Z₂₆ es V o M;
 Z₂₇ Es V o T;
 Z₂₈ es R o C;
 Z₂₉ es F o P;
 Z₃₀ es L o V;
 Z₃₁ es A o V;
 Z₃₂ es S o A;
 Z₃₃ es V o L o M;
 Z₃₄ es K o R;
 Z₃₅ es S o T;
 Z₃₆ es V o G;
 Z₃₇ es Q o E;
 Z₃₈ es L o S o R;
 Z₃₉ es S o F;
 Z₄₀ es F o Y;
 Z₄₁ es T o A;
 Z₄₂ es A o S;
 Z₄₃ es V o I;
 Z₄₄ es T o C;
 Z₄₅ es N o S;
 Z₄₆ es F o V;
 Z₄₇ es S o D;
 Z₄₈ es L o V;
 Z₄₉ es N o Q;
 Z₅₀ es V o I; y
 M* es el aminoácido 550.

5 Preferentemente, la mutación da como resultado una secuencia de aminoácidos alterada en uno cualquiera o más de los dominios F y A a E o regiones próximas a los mismos de la ADN polimerasa del VHB. La presente invención no se extiende a una mutación solamente en el motivo YMDD del dominio C de la ADN polimerasa del VHB aunque dicha mutación se contempla por la presente invención si aparece en combinación con una o más mutaciones en otra localización.

10 La mutación en el componente de superficie viral está preferentemente en uno o más restos de aminoácidos dentro de las regiones hidrófilas principales de la proteína, y en particular dentro de la secuencia de aminoácidos 67-226 del antígeno de superficie viral del VHB.

15 Se describe una variante del VHB que comprende una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica una ADN polimerasa dando como resultado una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en dicha ADN polimerasa en uno o más aminoácidos como se expone en Fórmula I:

FÓRMULA I

20 S Z₁ L S W L S L D V S A A F Y H Z₂ P L H P A A M P H L L Z₃ G S S G L Z₄ R Y V A R L S S Z₅ S Z₆ Z₇ X N Z₈ Q Z₉
 Z₁₀ X X X Z₁₁ L H Z₁₂ Z₁₃ C S R Z₁₄ L Y V S L Z₁₅ L L Y Z₁₆ T Z₁₇ G Z₁₈ K L H L Z₁₉ Z₂₀ H P I Z₂₁ L G F R K Z₂₂ P M G
 Z₂₃ G L S P F L L A Q F T S A I Z₂₄ Z₂₅ Z₂₆ Z₂₇ Z₂₈ R A F Z₂₉ H C Z₃₀ Z₃₁ F Z₃₂ Y M* D D Z₃₃ V L G A Z₃₄ Z₃₅ Z₃₆ Z₃₇ H
 Z₃₈ E Z₃₉ L Z₄₀ Z₄₁ Z₄₂ Z₄₃ Z₄₄ Z₄₅ Z₄₆ L L Z₄₇ Z₄₈ G I H L N P Z₄₉ K T K R W G Y S L N F M G Y Z₅₀ I G

en la que:

X es cualquier aminoácido;
 Z₁ es N o D;
 Z₂ es I o P;
 Z₃ es I o V;
 Z₄ es S o D;
 Z₅ es T o N;
 Z₆ es R o N;

Z₇ es N o I;
 Z₈ es N o Y o H;
 Z₉ es H o Y;
 Z₁₀ es G o R;
 Z₁₁ es D o N;
 Z₁₂ es D o N;
 Z₁₃ es S o Y;
 Z₁₄ es N o Q;
 Z₁₅ es L o M;
 Z₁₆ es K o Q;
 Z₁₇ es Y o F;
 Z₁₈ es R o W;
 Z₁₉ es Y o L;
 Z₂₀ es S o A;
 Z₂₁ es I o V;
 Z₂₂ es I o L;
 Z₂₃ es V o G;
 Z₂₄ es C o L;
 Z₂₅ es A o S;
 Z₂₆ es V o M;
 Z₂₇ Es V o T;
 Z₂₈ es R o C;
 Z₂₉ es F o P;
 Z₃₀ es L o V;
 Z₃₁ es A o V;
 Z₃₂ es S o A;
 Z₃₃ es V o L o M;
 Z₃₄ es K o R;
 Z₃₅ es S o T;
 Z₃₆ es V o G;
 Z₃₇ es Q o E;
 Z₃₈ es L o S o R;
 Z₃₉ es S o F;
 Z₄₀ es F o Y;
 Z₄₁ es T o A;
 Z₄₂ es A o S;
 Z₄₃ es V o I;
 Z₄₄ es T o C;
 Z₄₅ es N o S;
 Z₄₆ es F o V;
 Z₄₇ es S o D;
 Z₄₈ es L o V;
 Z₄₉ es N o Q;
 Z₅₀ es V o I; y
 M* es el aminoácido 550

siempre que dicha mutación no esté en el motivo YMDD del dominio C solamente, y en el que dicha variante muestre sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido.

5 También se describe una variante del VHB que comprende una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica un componente de superficie viral dando como resultado una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en dicho componente de superficie viral en una región correspondiente a la secuencia de aminoácidos expuesta en Fórmula I en la que dicha variante muestra capacidad de interacción reducida de reactivos inmunológicos con dicho componente de superficie viral.

10 También se describe una variante del VHB que comprende una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica un componente de superficie viral dando como resultado una adición, sustitución y/o adición de aminoácidos en dicho componente de superficie viral en una región definida por los aminoácidos 67-226 del antígeno de superficie del VHB o región funcionalmente equivalente en la que dicha variante muestra capacidad de interacción reducida de reactivos inmunológicos con dicho componente de superficie viral.

15 También se describe una variante del VHB que comprende una mutación en una fase abierta de lectura solapante en su genoma en la que dicha mutación está en una región definida por uno o más de los dominios F y A a E de la ADN polimerasa del VHB siempre que no esté en el motivo YMDD del dominio de C solamente; y en la región solapante correspondiente a los aminoácidos 67 a 226 del antígeno de superficie del VHB; y en la que dicha variante

muestra sensibilidad reducida a un análogo de nucleótido y muestra capacidad de interacción reducida con reactivos inmunológicos específicos para antígenos de superficie del VHB.

5 Un mutante particular es M550I/V que se ha descrito previamente después del tratamiento con lamivudina. La presente invención no se extiende a este mutante en la medida en que surge después del tratamiento con lamivudina solamente. Un mutante M550V se selecciona junto con la mutación L526M y esto tampoco está dentro del alcance de la presente invención.

10 La presente invención no se extiende a las siguientes mutaciones de resistencia a lamivudina cuando se seleccionan por tratamiento con lamivudina solamente, sin embargo, sí se extiende a estas mutaciones cuando se seleccionan durante el tratamiento con famciclovir (FCV):

15 L428M, T481C, T496A, L497F, V509I, V519L, L526M, T530S, A546V, F548V, M550I, V553I, S559T, Q561H, S565A, A568T, I570S, L575M, L581I y N584S (16, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 40, 41, 42, 45).

Además, la presente invención no se extiende a las siguientes mutaciones seleccionadas de famciclovir publicadas:

20 S424T, Del 462-468, 1509V, V519L, P523L, L526M, L526V, A528T, T530S, V553I, S565A, I570V y N594H (38, 39, 41, 43, 44, 46).

25 La variante viral que muestra capacidad de interacción reducida con reactivos inmunológicos es un mutante de escape ya que los anticuerpos u otra respuesta inmunológica a VHB de una exposición anterior al virus o después de la vacunación ya no son eficaces en la dirección a un componente de superficie viral ya que la mutación ha alterado un epítipo de linfocitos B y/o T en el antígeno de superficie.

La sensibilidad reducida o disminuida a nucleótidos, análogos o agentes inmunológicos también está abarcada por el término "resistencia". El término "resistencia" se usa en su sentido más general e incluye resistencia total o resistencia parcial o sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido.

30 Preferentemente, las variantes están en forma aislada de modo que se han sometido a al menos una etapa de purificación fuera de fluido corporal de origen natural. Como alternativa, las variantes pueden mantenerse en fluido corporal aislado o pueden estar en forma de ADN. La presente invención también contempla clones moleculares infecciosos que comprenden el genoma o partes del mismo de un VHB variante.

35 Las mutaciones preferidas en la ADN polimerasa y/o antígeno de superficie del VHB incluyen variantes seleccionadas de pacientes después de reaparición del VHB después de tratamiento con famciclovir y HBIG, y pacientes que no respondieron al tratamiento con famciclovir como se indica por una reducción del ADN y/o proteína viral del VHB.

40 Las mutaciones preferidas en la ADN polimerasa del VHB junto con mutación correspondiente en el antígeno de superficie (mostrado entre paréntesis) incluyen una o más de las L423L/M/V (I68I/M), L423L/F (C69F/L), H436H/Y, H436Y, DEL 471-474 (DEL 117-120), S438T, W499E (D144E, G145R), I508V, V519L (E164D), L526M, S565A (S210R), N584S, N/S/H584N/K, R588R/K y N594H tales como las seleccionadas en pacientes con reaparición del VHB después de tratamiento con famciclovir y HBIG; y H436N/H, S463S/Y (L109I/L), V537V/I (C/W182Y/TERMINACIÓN), V/G560E (Y206N), S/F 565A/S (S210R/S), S/F 565A (S210R), N/Q 584H, K587R y N594H, tal como las seleccionadas en pacientes que no respondieron a famciclovir. Las mutaciones preferidas en el antígeno de superficie incluyen una o más de las siguientes V96A, C138R, P142T/P, K160K/N y A194G/A después de tratamiento solamente con inmunoglobulina del virus de la hepatitis B (HBIG). El término "DEL" significa "deleción" y "TERMINACIÓN" significa un codón de terminación.

50 La presente invención no se extiende a una mutación en el antígeno de superficie de la Hepatitis B en G145R solamente o en combinación con D144E (23) cuando estas mutaciones se seleccionan sin tratamiento con famciclovir.

55 Las mutaciones particularmente preferidas en la ADN polimerasa del VHB junto con mutaciones correspondientes en el antígeno de superficie (mostrado entre paréntesis) incluyen una o más de L423L/MV [I68I/M], H436H/Y, H436Y, DEL471-474 [DEL117-120], W499E [D144E y G145R], V519L [E164D], N/S/H 584 N/K y R588 R/K tales como las seleccionadas en pacientes con reaparición del VHB después del tratamiento con famciclovir y HBIG; y H436N/H, S463 S/Y [L109I/L], V537 V/I [C/W 182 Y/TERMINACIÓN] y K587R, tales como las seleccionadas en pacientes no sensibles después de tratamiento con famciclovir.

60 La identificación de las variantes de la presente invención permite la generación de una serie de ensayos para detectar dichas variantes. La detección de dichas variantes puede ser importante en la identificación de variantes resistentes para determinar la forma apropiada de quimioterapia y/o para controlar los protocolos de vacunación, desarrollar preparaciones de vacuna nuevas o modificadas.

65

En consecuencia, se describe un método para determinar el potencial de que un VHB muestre sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido, comprendiendo dicho método aislar ADN o ARNm correspondiente de dicho VHB y explorar con respecto a una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica la ADN polimerasa de VHB dando como resultado al menos una sustitución, delección y/o adición de aminoácidos en uno o más de los dominios A a E o una región próxima a los mismos de dicha ADN polimerasa en el que la presencia de dicha mutación es una indicación de la probabilidad de la resistencia a dicho análogo de nucleósido.

También se describe un método para determinar el potencial de que un VHB muestre capacidad de interacción reducida con el anticuerpo para antígeno de superficie del VHB, comprendiendo dicho método aislar ADN o ARNm correspondiente de dicho VHB y explorar con respecto a una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno de superficie del VHB dando como resultado al menos una sustitución, delección y/o adición de aminoácidos en los aminoácidos 67 a 226 de dicho antígeno de superficie o una región próxima a los mismos de dicho antígeno de superficie en el que la presencia de dicha mutación es una indicación de la probabilidad de reducir la capacidad de interacción de dichos anticuerpos con dicho antígeno de superficie mutado.

Preferentemente, el ensayo detecta una o más de las siguientes mutaciones en la ADN polimerasa del VHB (con la mutación correspondiente en el antígeno de superficie mostrada entre paréntesis): L423L/M/V (I68I/M), L423L/F (C69F/L), H436H/Y, H436Y, DEL 471-474 (DEL 117-120), S438T, W499E (D144E, G145R), I508V, V519L (E164D), L526M, S565A(S210R), N584S, N/S/H584N/K, R588R/K y N594H tal como se selecciona en pacientes con reaparición del VHB después de tratamiento con famciclovir y HBIG; y H436N/H, S463S/Y (L109I/L), V537V/I (C/W182Y/TERMINACIÓN), V/G560E (Y206N), S/F 565A/S (S210R/S), S/F 565A (S210R), N/Q 584H, K587R y N594H, tal como se selecciona en pacientes que no respondieron a famciclovir. Las mutaciones también pueden detectarse en el antígeno de superficie incluyendo uno o más de: V96A, C138R, P142T/P, K160K/N y A194G/A tal como después del tratamiento con inmunoglobulina del virus de la Hepatitis B (HBIG).

Más particularmente, el ensayo detecta una o más de las siguientes mutaciones en la ADN polimerasa del VHB (con mutaciones correspondientes en el antígeno de superficie mostradas entre paréntesis): L423L/MV [I68I/M], H436H/Y, H436Y, DEL471-474 [DEL117-120], W499E [D144E y G145R], V519L [E164D], N/S/H 584 N/K y R588 R/K tal como se selecciona en pacientes con reaparición del VHB después del tratamiento con famciclovir y HBIG; y H436H/N, S463 S/Y [L109I/L], V537 V/I [C/W 182 Y/TERMINACIÓN] y K587R, tal como se selecciona en pacientes no sensibles después del tratamiento con famciclovir.

El ADN o ARN correspondiente pueden ensayarse o como alternativa pueden explorarse la ADN polimerasa o el antígeno de superficie con respecto a la mutación.

La detección puede ser cualquier medio de detección basado en ácido nucleico, por ejemplo técnicas de hibridación de ácido nucleico o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). También se contempla el uso de diferentes formatos de ensayo de dichos medios de detección basados en ácido nucleico, incluyendo polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismo de cadena monocatenaria (SSCP), amplificación y detección de desapareamientos (AMD), reacción en cadena de la polimerasa de secuencia repetitiva intercalada (IRS-PCR), reacción en cadena de la polimerasa inversa (iPCR) y reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), entre otros.

También se describe una serie de ensayos basados en inmunología para detectar ADN polimerasa o antígeno de superficie del VHB variante. Estos ensayos se basan en anticuerpos dirigidos a ADN polimerasa o antígeno de superficie del VHB de origen natural que no, o sustancialmente no, interaccionan con la ADN polimerasa o antígeno de superficie del VHB variante. Como alternativa, se usan anticuerpos para una ADN polimerasa o antígeno de superficie del VHB variante que no, o sustancialmente no, interaccionan con ADN polimerasa o antígeno de superficie del VHB de origen natural.

Pueden usarse anticuerpos monoclonales o policlonales aunque se prefieren anticuerpos monoclonales ya que pueden producirse en gran cantidad y en una forma homogénea. Está disponible una amplia serie de técnicas de inmunoensayo tal como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653.

La detección de las variantes de aminoácidos de ADN polimerasa se consigue convenientemente por referencia a la secuencia de aminoácidos consenso mostrada en la Figura 2. Los polimorfismos mostrados representan las variaciones mostradas en diversas bases de datos para cepas del VHB patógenas. Cuando una variante del VHB comprende un aminoácido diferente al representado, entonces dicho aislado se considera una variante del VHB potencial que tiene una actividad ADN polimerasa alterada.

En consecuencia, se describe un método para determinar si un aislado de VHB codifica una ADN polimerasa variante, comprendiendo dicho método determinar la secuencia de aminoácidos de su ADN polimerasa directamente o mediante una secuencia de nucleótidos y comparando la misma con la secuencia de aminoácidos a continuación:

FÓRMULA I

5 S Z₁ L S W L S L D V S A A F Y H Z₂ P L H P A A M P H L L Z₃ G S S G L Z₄ R Y V A R L S S Z₅ S Z₆ Z₇ X N Z₈ Q Z₉
 Z₁₀ X X X Z₁₁ L H Z₁₂ Z₁₃ C S R Z₁₄ L Y V S L Z₁₅ L L Y Z₁₆ T Z₁₇ G Z₁₈ K L H L Z₁₉ Z₂₀ H P I Z₂₁ L G F R K Z₂₂ P M G
 Z₂₃ G L S P F L L A Q F T S A I Z₂₄ Z₂₅ Z₂₆ Z₂₇ Z₂₈ R A F Z₂₉ H C Z₃₀ Z₃₁ F Z₃₂ Y M* D D Z₃₃ V L G A Z₃₄ Z₃₅ Z₃₆ Z₃₇ H
 Z₃₈ E Z₃₉ L Z₄₀ Z₄₁ Z₄₂ Z₄₃ Z₄₄ Z₄₅ Z₄₆ L L Z₄₇ Z₄₈ G I H L N P Z₄₉ K T K R W G Y S L N F M G Y Z₅₀ I G

en la que:

X es cualquiera aminoácido;

Z₁ es N o D;

Z₂ es I o P;

Z₃ es I o V;

Z₄ es S o D;

Z₅ es T o N;

Z₆ es R o N;

Z₇ es N o I;

Z₈ es N o Y o H;

Z₉ es H o Y;

Z₁₀ es G o R;

Z₁₁ es D o N;

Z₁₂ es D o N;

Z₁₃ es S o Y;

Z₁₄ es N o Q;

Z₁₅ es L o M;

Z₁₆ es K o Q;

Z₁₇ es Y o F;

Z₁₈ es R o W;

Z₁₉ es Y o L;

Z₂₀ es S o A;

Z₂₁ es I o V;

Z₂₂ es I o L;

Z₂₃ es V o G;

Z₂₄ es C o L;

Z₂₅ es A o S;

Z₂₆ es V o M;

Z₂₇ Es V o T;

Z₂₈ es R o C;

Z₂₉ es F o P;

Z₃₀ es L o V;

Z₃₁ es A o V;

Z₃₂ es S o A;

Z₃₃ es V o L o M;

Z₃₄ es K o R;

Z₃₅ es S o T;

Z₃₆ es V o G;

Z₃₇ es Q o E;

Z₃₈ es L o S o R;

Z₃₉ es S o F;

Z₄₀ es F o Y;

Z₄₁ es T o A;

Z₄₂ es A o S;

Z₄₃ es V o I;

Z₄₄ es T o C;

Z₄₅ es N o S;

Z₄₆ es F o V;

Z₄₇ es S o D;

Z₄₈ es L o V;

Z₄₉ es N o Q;

Z₅₀ es V o I; y

M* es el aminoácido 550

10

La presente invención contempla además agentes que enmascaran la mutación de resistencia a análogos de nucleósidos. Dichos agentes serán particularmente útiles en tratamiento a largo plazo por análogos de nucleósidos. Los agentes pueden ser ADN o ARN o moléculas químicas proteicas o no proteicas. También se contempla la exploración de productos naturales tal como de plantas, coral y microorganismos como una fuente potencial útil de

agentes de enmascaramiento. Los agentes pueden estar en forma aislada o en forma de una composición farmacéutica y pueden administrarse secuencialmente o simultáneamente con el análogo de nucleósido.

5 También se describe un componente de superficie aislado de las variantes del VHB descritas en el presente documento. Más particularmente, se describe un antígeno de superficie aislado o una forma recombinante del mismo o derivado o equivalente químico del mismo. El componente de superficie aislado y, más particularmente, antígeno de superficie aislado o sus equivalentes recombinantes, derivados o químicos son útiles en el desarrollo de composiciones biológicas tales como formulaciones de vacuna.

10 En consecuencia, se describe un antígeno de superficie del VHB variante aislado o una forma recombinante o derivada del mismo o un equivalente químico del mismo en el que dicho antígeno de superficie o su forma recombinante o derivada o su equivalente químico muestra un perfil inmunológico alterado en comparación con un antígeno de superficie de un VHB de referencia.

15 Más particularmente, se describe un antígeno de superficie del VHB variante aislado o una forma recombinante o derivada del mismo o un equivalente químico del mismo en el que dicho antígeno de superficie del VHB o su forma recombinante o derivada o su equivalente químico comprende una secuencia de aminoácidos con una única o múltiples sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos o un truncamiento en comparación con un antígeno de superficie del VHB de un VHB de referencia y en el que un anticuerpo neutralizante dirigido a un VHB de referencia no muestra actividad neutralizante o muestra actividad neutralizante reducida para un VHB que porta dicho antígeno de superficie del VHB variante.

20 También se describe una vacuna del VHB que contiene una o más de las mutaciones que alteran el antígeno de superficie (sin incluir G145R). Las mutaciones preferidas en el antígeno de superficie y la vacuna de VHB incluyen uno o más de I68I/M, C69F/L, H436Y, DEL 117-120, D144E, E164D, S210R, tal como se selecciona en pacientes con reaparición del VHB después del tratamiento con famciclovir y HBIG; y L109I/L, C/W182Y/TERMINACIÓN, Y206N, S210R/S y S210R; tal como se selecciona en pacientes que no responden a famciclovir. Se prefieren particularmente variantes que portan mutaciones en el antígeno de superficie en V96A, C138R, P142T/P, K160K/N y/o A194G/A.

30 El término "aislado" significa lo mismo que en relación con una variante del VHB aislada.

35 Como se ha indicado anteriormente, se describen derivados y equivalentes químicos (es decir análogos) del componente de superficie del VHB. Los derivados incluyen sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos individuales o múltiples en el antígeno de superficie del VHB. Las "adiciones" a secuencias de aminoácidos incluyendo fusiones con otros péptidos, polipéptidos o proteínas o fusiones con secuencias de nucleótidos incluyendo fusiones con otros componentes virales.

40 Los análogos del antígeno de superficie del VHB variante contemplado en el presente documento incluyen, pero sin limitación, modificación de cadenas laterales, incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante la síntesis de péptidos, polipéptidos o proteínas y el uso de agentes de reticulación y otros métodos que imponen restricciones conformacionales sobre la molécula proteica o sus análogos. Estos tipos de modificaciones son útiles en la estabilización de las moléculas inmunointeractivas para su uso en ensayos de diagnóstico o en protocolos terapéuticos.

45 Los ejemplos de modificaciones de cadenas laterales contempladas por la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tales como por alquilación reductora mediante reacción con un aldehído seguido de reducción con NaBH_4 ; amidación con metilacetimidato; acilación con anhídrido acético; carbamoilación de grupos amino con cianato; trinitrobencilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido de reducción con NaBH_4 .

50 El grupo de guanidina de los restos de arginina puede modificarse mediante la formación de productos de condensación heterocíclicos con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilgloxal y gloxal.

55 El grupo carboxilo puede modificarse por activación de carbodiimida mediante la formación de O-acilisourea seguido de posterior derivatización, por ejemplo a una amida correspondiente.

60 Los grupos sulfhidrilo pueden modificarse por métodos tales como carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; oxidación de ácido per fórmico a ácido cisteico; formación de un disulfuro mixto con otros compuestos de tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; formación de derivados de mercurio usando 4-cloromercuribenzoato, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro de fenilmercurio, 2-cloromercurio-4-nitrofenol y otros compuestos de mercurio; carbamoilación con cianato a pH alcalino.

Los restos de triptófano pueden modificarse, por ejemplo, mediante oxidación con N-bromosuccinimida o alquilación del anillo de indol con 2-hidroxi-5-nitrobenzil bromuro o sulfenil haluros. Los restos de tirosina por otro lado, pueden alterarse mediante nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina.

- 5 Puede conseguirse modificación del anillo de imidazol de un resto de histidina mediante alquilación con derivados de ácido yodoacético o *N*-carboxilación con dietilpirocarbonato.

10 Los ejemplos de aminoácidos y derivados no naturales que se incorporan durante la síntesis peptídica incluyen, pero sin limitación, uso de norleucina, ácido 4-amino butírico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 6-aminohexanoico, *t*-butilglicina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, 2-tienil alanina y/o D-isómeros de aminoácidos. Se muestra posteriormente en la Tabla 1 una lista de aminoácidos no naturales, contemplados en el presente documento. La inclusión de dichos aminoácidos no naturales u otras derivaciones descritas en el presente documento pueden ayudar a estabilizar la molécula en una composición de vacuna.

15

TABLA 1

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
ácido α -aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
α -amino- α -metilbutirato	Mgab	L-N-metilarginina	Nmarg
aminociclopropano-carboxilato	Cpro	L-N-metilasparagina	Nmasn
		L-N-ácido metilaspártico	Nmasp
ácido aminoisobutírico	Aib	L-N-metilcisteína	Nmcys
aminonorbornil-carboxilato	Norb	L-N-metilglutamina	Nmgln
		L-N-ácido metilglutámico	Nmglu
ciclohexilalanina	Chexa	L-N-metilhistidina	Nmhis
ciclopentilalanina	Cpen	L-N-metilisoleucina	Nmile
D-alanina	Dal	L-N-metilleucina	Nmleu
D-arginina	Darg	L-N-metillisina	Nmlys
D-ácido aspártico	Dasp	L-N-metilmetionina	Nmmet
D-cisteína	Dcys	L-N-metilnorleucina	Nmnle
D-glutamina	Dgln	L-N-metilnorvalina	Nmnva
D-ácido glutámico	Dglu	L-N-metilornitina	Nmorn
D-histidina	Dhis	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-isoleucina	Dile	L-N-metilprolina	Nmpro
D-leucina	Dleu	L-N-metilserina	Nmser
D-lisina	Dlys	L-N-metiltreonina	Nmthr
D-metionina	Dmet	L-N-metiltryptófano	Nmtrp
D-ornitina	Dorn	L-N-metil tirosina	Nmtyr
D-fenilalanina	Dphe	L-N-metilvalina	Nmval
D-prolina	Dpro	L-N-metiletilglicina	Nmetg
D-serina	Dser	L-N-metil- <i>t</i> -butilglicina	Nmtbutg
D-treonina	Dthr	L-norleucina	Nle
D-triptófano	Dtrp	L-norvalina	Nva
D-tirosina	Dtyr	α -metil-aminoisobutirato	Maib
D-valina	Dval	α -metil- γ -aminobutirato	Mgab
D- α -metilalanina	Dmala	α -metilciclohexilalanina	Mchexa
D- α -metilarginina	Dmarg	α -metilciclopentilalanina	Mcpen
D- α -metilasparagina	Dmasn	α -metil- α -naftilalanina	Manap
D- α -metilaspártico	Dmasp	α -metilpenicilamina	Mpen
D- α -metilcisteína	Dmcys	N-(4-aminobutil)glicina	Nglu
D- α -metilglutamina	Dmgln	N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
D- α -metilhistidina	Dmhis	N-(3-aminopropil)glicina	Norn
D- α -metilisoleucina	Dmile	N-amino- α -metilbutirato	Nmaabu
D- α -metilleucina	Dmleu	α -naftilalanina	Anap
D- α -metillisina	Dmlys	N-bencilglicina	Nphe
D- α -metilmetionina	Dmmet	N-(2-carbamiletíl)glicina	Ngln
D- α -metilornitina	Dmorn	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
D- α -metilfenilalanina	Dmphe	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
D- α -metilprolina	Dmpro	N-(carboximetil)glicina	Nasp
D- α -metilserina	Dmser	N-ciclobutilglicina	Ncbut
D- α -metiltreonina	Dmthr	N-cicloheptilglicina	Nchep
D- α -metiltryptófano	Dmtrp	N-ciclohexilglicina	Nchex
D- α -metil tirosina	Dmtyr	N-ciclodecilglicina	Ncdec
D- α -metilvalina	Dmval	N-cilcododecilglicina	Ncdod

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
D-N-metilalanina	Dnmala	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D-N-metilarginina	Dnmarg	N-ciclopropilglicina	Ncpro
D-N-metilasparagina	Dnmasn	N-cicoundecilglicina	Ncund
D-N-metilaspartato	Dnmasp	N-(2,2-difeniletil)glicina	Nbhrn
D-N-metilcisteína	Dnmcys	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
D-N-metilglutamina	Dnmglu	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
D-N-metilglutamato	Dnmglu	N-(1-hidroxietyl)glicina	Nthr
D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(hidroxietyl)glicina	Nser
D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(imidazoliletily)glicina	Nhis
D-N-metilleucina	Dnmleu	N-(3-indoliletily)glicina	Nhtrp
D-N-metilisina	Dnmlys	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmet
D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metilriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletily)glicina	Nval
D-N-metilrosina	Dnmtyr	N-metila-naftilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
γ -ácido aminobutírico	Gabu	N-(<i>p</i> -hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L- <i>t</i> -butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilarginina	Marg	L- α -metilasparagina	Masn
L- α -metilaspartato	Masp	L- α -metil- <i>t</i> -butilglicina	Mtbug
L- α -metilcisteína	Mcys	L-metiletilglicina	Metg
L- α -metilglutamina	Mglu	L- α -metilglutamato	Mglu
L- α -metilhistidina	Mhis	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- α -metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltoetyl)glicina	Nmet
L- α -metilleucina	Mleu	L- α -metilisina	Mlys
L- α -metilmetionina	Mmet	L- α -metilnorleucina	Mnle
L- α -metilnorvalina	Mnva	L- α -metilornitina	Moni
L- α -metilfenilalanina	Mphe	L- α -metilprolina	Mpro
L- α -metilserina	Mser	L- α -metiltreonina	Mthr
L- α -metilriptófano	Mtrp	L- α -metilrosina	Mtyr
L- α -metilvalina	Mval	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhph
N-(N-(2,2-difeniletily)carbamilmetil)glicina	Nnbhm	N-(N-(3,3-difenilpropil)carbamilmetil)glicina	Nnbhe
1-carboxi-1-(2,2-difeniletily)etilamino)ciclopropano	Nmbc		

5 Pueden usarse agentes de reticulación, por ejemplo, para estabilizar conformaciones tridimensionales, usando agentes de reticulación homobifuncionales tales como los imido ésteres bifuncionales que tienen grupos espaciadores (CH₂)_n con n=1 a n=6, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida y reactivos heterobifuncionales que habitualmente contienen un resto aminorreactivo tal como N-hidroxisuccinimida y otro resto sensible a grupo específico tal como resto de maleimido o ditio (SH) o carbodiimida (COOH). Además, los péptidos pueden estar restringidos conformacionalmente, por ejemplo, mediante la incorporación de C α y N α -metilaminoácidos, la introducción de dobles enlaces entre átomos C α y C β de aminoácidos y la formación de péptidos cíclicos o análogos introduciendo enlaces covalentes tal como formando un enlace amida entre los extremos N y C terminales, entre dos cadenas laterales o entre una cadena lateral y el extremo N o C terminal.

10 Como se ha indicado anteriormente, estos tipos de modificaciones pueden ser importantes para estabilizar la molécula de HBsAg variante si se administran a un individuo o para su uso como un reactivo de diagnóstico.

15 Otros derivados contemplados por la presente invención incluyen una serie de variantes de glucosilación de una molécula completamente desglucosilada a una molécula glucosilada modificada. Pueden resultar patrones de glucosilación alterados de la expresión de moléculas recombinantes en diferentes células hospedadoras.

20 También se describe una molécula de antígeno de superficie del VHB variante o su forma recombinante, derivada o química o un VHB variante que comprende dicho antígeno de superficie del VHB en forma de composición. Dichas composiciones son particularmente útiles como composiciones terapéuticas y pueden indicarse en el presente documento indistintamente como composiciones biológicas, de vacuna o farmacéuticas. Las composiciones

biológicas son particularmente útiles en la inducción de memoria inmunológica contra infección por una variante del VHB tal como un mutante de escape del VHB controlando mediante la administración de un antígeno de superficie del VHB variante o una forma recombinante, derivada o química del mismo o un VHB que lo comprende capaz de inducir una respuesta inmunitaria incluyendo agentes de memoria inmunológicos.

5 En consecuencia, también se describe una composición que comprende un VHB variante o un antígeno de superficie del VHB de dicho VHB variante o una forma recombinante o derivada del mismo o su equivalente químico. La composición puede considerarse una composición biológica.

10 En general, si se usa un VHB, este primero se atenúa. La composición biológica de acuerdo con este aspecto de la presente invención comprende en general además uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

15 La composición biológica puede comprender un antígeno de superficie del VHB o molécula similar de una variante del VHB o la composición puede ser un cóctel de HBsAg o moléculas similares de una serie de variantes del VHB incluyendo el VHB al que se ha hecho referencia. Se aplican inclusiones similares cuando la composición comprende un VHB.

20 Las formas de composición biológica adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando sean solubles en agua) o polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o diluyente que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Las prevenciones de la acción de microorganismos pueden proporcionarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. Puede proporcionarse absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante el uso en las composiciones de agentes que retarden la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

30 Se preparan soluciones inyectables estériles incorporando el HBsAg o molecular similar o variante de VHB o cepa de referencia en la cantidad requerida en el disolvente o diluyente apropiado seguido de esterilización tal como por esterilización por filtración. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y la técnica de liofilización que produce un polvo de la molécula inmunointeractiva más cualquier ingrediente deseado adicional de solución previamente esterilizada por filtración del mismo. Las vías de administración contempladas por la presente invención incluyen intravenosa, intraperitoneal, intratelia, subcutánea e intracerebral.

40 La composición biológica descrita también puede proporcionarse en forma oral, bucal, de pulverización nasal, de inhalación, de parche, de gota o de supositorio.

45 Los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con la molécula inmunointeractiva, se contempla el uso del mismo en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse en las composiciones principios activos complementarios.

50 El antígeno de superficie del VHB o molécula similar o variante del VHB o cepa de referencia se añadirá en una concentración eficaz para inducir una respuesta inmunitaria de interacción contra la misma molécula o un VHB que la porta o una molécula inmunológicamente similar. Por ejemplo, una cantidad eficaz de antígeno de superficie del VHB puede variar de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 2000 ng, o de 50 ng a aproximadamente 1000 mg o de 100 ng a aproximadamente 500 mg u otra cantidad eficaz adecuada. En ocasiones es más conveniente expresar las cantidades de dosificación con respecto al peso corporal. En consecuencia, las cantidades eficaces pueden ser de, por ejemplo, aproximadamente 0,5 ng/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal o una cantidad intermedia.

60 También se describen kits para ensayos para VHB variante. Dichos kits pueden, por ejemplo, contener los reactivos de PCR u otra tecnología de hibridación de ácidos nucleicos o reactivos para técnicas de detección de base inmunológica.

65 También se describe una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en un gen que codifica una ADN polimerasa dando como resultado al menos una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en dicha ADN polimerasa en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la hepatitis.

También se describe un uso de una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en un gen que codifica un componente de superficie viral dando como resultado al menos una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en dicho componente de superficie viral en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la hepatitis.

También se describe un uso de una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en una parte solapante de al menos dos fases abiertas de lectura dando como resultado adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en productos de traducción de dichas fases abiertas de lectura en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la hepatitis.

La presente invención también posibilidad el uso de las variantes del VHB objeto para explorar con respecto a agentes antivirales. Estos agentes antivirales inhiben el virus. El término "inhibir" incluye antagonizar o de otro modo prevenir la infección, replicación, ensamblaje y/o liberación o cualquier etapa intermedia. Los agentes antivirales preferidos incluyen análogos de nucleósidos, sin embargo, la presente invención se extiende a moléculas no nucleosídicas.

En consecuencia, se describe el uso de una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en un gen que codifica una ADN polimerasa dando como resultado al menos una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en dicha ADN polimerasa en la exploración con respecto a un agente antiviral capaz de inhibir dicho virus.

También se describe el uso de una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en un gen que codifica un componente de superficie viral dando como resultado al menos una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en dicho componente de superficie viral en la exploración con respecto a un agente antiviral capaz de inhibir dicho virus.

También se describe el uso de una variante de un virus de ADN aislado que se replica mediante un intermedio de ARN en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en una parte solapante de al menos dos fases abiertas de lectura dando como resultado una adición, sustitución y/o delección de aminoácidos en productos de traducción de dichas fases abiertas de lectura en la exploración con respecto a una agente antiviral capaz de inhibir dicho virus.

La presente invención se describe además por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Para identificar qué otras mutaciones pueden seleccionarse durante la terapia de FCV en el entorno de OLT, los inventores secuenciaron y analizaron la ADN polimerasa del VHB que abarcaba los dominios catalíticos de 26 pacientes con altos niveles del VHB (más de 90 pg/ml de ADN del VHB) que se sometían a terapia de FCV y 10 pacientes con bajos niveles de VHB (menos de 90 pg/ml de ADN del VHB). Se analizaron múltiples muestras en serie, incluyendo antes de la terapia y pre OLT, durante la fase de respuesta a FCV post OLT, y durante la reaparición de VHB post OLT. Los métodos y resultados se muestran en los Ejemplos 1 a 7.

Ejemplo 1

Pacientes y métodos

Protocolo de tratamiento

Los detalles clínicos del protocolo de trasplante de hígado profiláctico de FCV como se ha descrito previamente (19). Brevemente, el objetivo del estudio fue comparar la seguridad y eficacia de FCV oral y penciclovir IV en la reducción del riesgo de la reinfección por hepatitis B post OLT en pacientes con trasplante de hígado. El diseño del estudio fue un ensayo controlado multicentro, aleatorio, parcialmente doble ciego, parcialmente de placebo en pacientes con enfermedad hepática de estadio final que requerían OLT. Se trataron pacientes con niveles de ADN del VHB mayores de 90 pg/ml en el momento de entrada en el estudio (por hibridación) [con alta replicación] tanto con FCV como con HBIG post OLT. Estos pacientes con alta replicación se trataron con FCV (500 mg tds) para reducir los niveles de ADN del VHB pre OLT. El tratamiento con famciclovir se continuó durante 12 meses post OLT. Se trató a un grupo de control no tratado de pacientes con niveles de ADN del VHB menores de 90 pg/ml [con baja replicación] en el momento de entrada en el estudio con HBIG solamente post OLT. En el estudio original, treinta y seis pacientes se sometieron a OLT, y de estos el resultado clínico y virológico de veintidós de los pacientes tratados con FCV se ha presentado recientemente (17 Mann). Esencialmente, los de alta replicación tratados con FCV que se convirtieron en ADN del VHB indetectable pre OLT tuvieron reapariciones del VHB con frecuencia similar a los de replicación baja tratados con HBIG solamente.

Ejemplo 2

Pacientes

5 Se trataron veintiséis pacientes que habían tenido niveles del VHB de más de 90 pg/ml en el momento de entrada en el estudio (con alta replicación de VHB [HR]) con FCV pre OLT y los pacientes que respondieron se trataron después con HBIG más FCV post OLT. De los 19 pacientes que respondieron al FCV y posteriormente pasaron a OLT, 9 no tuvieron reaparición del VHB 0-12 meses post OLT y 10 tuvieron reaparición del VHB a los 12 meses post OLT. De los 26 pacientes iniciales, 6 no respondieron inicialmente a FCV y 1 se retiró del estudio debido a
10 tratamiento con lamivudina. Diez pacientes que tenían niveles de VHB de menos de 90 pg/ml en el momento de entrada en el estudio (baja replicación de VHB [LR]) se trataron solamente con HBIG post OLT. Seis de estos pacientes no tuvieron reaparición del VHB a los 12 meses post OLT y 4 pacientes tuvieron reaparición del VHB durante los 12 meses post OLT.

15 Ejemplo 3

Extracción de ADN del VHB de suero de pacientes

20 Se extrajo ADN del VHB de un total de 90 muestras de 36 pacientes. Se mezclaron alícuotas de 50 ml de sueros con 150 ml de TE (Tris HCl 10 mmol/l (pH 7,5), EDTA 2 mmol/l), dodecil sulfato sódico 1 % p/v y proteinasa K 1 mg/ml, y se incubó a 55 °C durante 30 minutos. El ADN se desproteinizó por extracción de fenol/cloroformo, se precipitó con isopropanol y se disolvió en 40 ml de agua sin nucleasa.

25 Ejemplo 4

Amplificación por PCR

30 Se usaron dos cebadores oligonucleotídicos (Bresatec, Adelaida, Australia) para amplificar un fragmento que abarcaba el dominio catalítico de la proteína polimerasa y el determinante "a" de la proteína de superficie. Se usaron en la amplificación el cebador con sentido (5'-GCC TCA TTT TGT GGG TCA CCA TA-3' <400>1), y el cebador antisentido (5'-TCT CTG ACA TAC TTT CCA AT-3' <400>2) de primer ciclo. Cada reacción se llevó a cabo usando 5 ml del ADN extraído como molde, 1,5 U de Taq polimerasa (Qiagen, Melbourne Australia), 1 mmol/l de cebadores con sentido y antisentido, 200 mmol/l de cada uno de los desoxinucleósido trifosfatos, KCl 50 mmol/l, MgCl 3,5 mmol/l, Tris HCl 10 mmol/l (pH 8,3) y gelatina 0,01 % p/v. Se realizó PCR por 40 ciclos de desnaturalización (94 °C
35 durante 45 segundos), hibridación (55 °C durante 45 segundos) y extensión (72 °C durante 1,5 minutos), seguido de una extensión final de 7 minutos (Perkin-Elmer 2400, Cetus, Norwalk, CT). Si fue necesario, se realizó un ciclo de amplificación semianidado adicional usando 2 ml del producto de primer ciclo como molde y el cebador 5' TTG GGG TGG AGC CCT CAG GTC 3' <400>3 como el cebador con sentido. Las condiciones de amplificación fueron iguales que en el ciclo inicial excepto con solamente 25 rondas de ciclación.

40 Ejemplo 5

Secuenciación de los genes de polimerasa/envoltura de ADN del VHB

45 Se purificaron en gel productos amplificados usando Geneclean II (BIO 101 Inc., La Jolla, CA) y se secuenciaron directamente usando el Kit de Reacción Lista para Secuenciación en Ciclos de Terminador Big Dye ABI Prism de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes (Perkin Elmer, Cetus Norwalk, CT). Se llevó a cabo electroforesis por la Instalación de Investigación del Genoma Australiana (Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne). Los cebadores de PCR se usaron como cebadores de secuenciación así como varios cebadores adicionales (5'-AAA TTC GCA GTC CCC AAC-3' <400>4, 5'-GAA AAT TGG TAA CAG CGG-3' <400>5, y 5'-GTA TCC CTC CTG TTG CTG T-3' <400>6) requeridos para secuenciar las regiones internas de los productos de PCR. Se usaron MacVector y AssemblyLIGN (Mac Vector versión 6.0 y AssemblyLIGN, Oxford Molecular, Reino Unido) para analizar todos los datos de secuencias automáticos. Las secuencias de aminoácidos deducidas se compararon usando el subprograma ClustalW.

55 Ejemplo 6

Análisis de secuencia

60 Las secuencias se analizaron por comparación de la secuencia de aminoácidos deducida dentro del gen de polimerasa con la secuencia consenso de polimerasa publicada (Figura 2; Fórmula I; ref. 18). Se definió un cambio de un único aminoácido como un cambio en un aminoácido que no está presente en la secuencia consenso de polimerasa del VHB. Se compararon cambios únicos en los aislados de VHB con el aislado de pretratamiento individual y cuando fue apropiado, se compararon secuencias con otras muestras de pretratamiento. Se indicó cualquier cambio dentro de los dominios de polimerasa conservados A a E (en los que el dominio A incluye los aminoácidos 421-436, el Dominio B incluye 505-529, el Dominio C incluye 546-555, el Dominio D incluye 576-586 y

el Dominio E incluye 592-601). Debido a las fases abiertas de lectura solapantes para los genes que codifican la polimerasa y envoltura (HBsAg), se indicaron cambios únicos en el gen de polimerasa que alteran el HBsAg.

Las secuencias de aminoácidos deducidas para el antígeno de superficie en la fase de lectura solapante se compararon con las 88 secuencias publicadas, genotipos A a F de Norder *et al* (20). Un cambio de aminoácido único se definió como un cambio que no está presente en las secuencias publicadas (20). Además, Se compararon cambios únicos con cambios de aminoácidos publicados detectados después de tratamiento con HBIG y/o vacunación (21, 22, 23, 24, 25, 26). Debido a las fases abiertas de lectura solapantes para los genes de polimerasa y envoltura, se indicaron cambios únicos en el gen de envoltura que alteran la polimerasa.

Ejemplo 7

Resultados

Análisis de los efectos

En este estudio, se proporcionó famciclovir (FCV) de forma profiláctica pre OLT a pacientes con insuficiencia hepática de estadio final debido a infección por VHB crónica con niveles de ADN del VHB en suero mayores de 90 pg/ml [alta replicación (HR)]. Los pacientes se trataron posteriormente con HBIG y FCV post OLT. Se tomaron muestras para pretratamiento de secuenciación con FCV, pre OLT, durante la fase de respuesta a FCV post OLT y después en los casos con viremia creciente durante la reaparición del VHB. Se examinó la secuencia de ADN del VHB de 36 pacientes. Estos pacientes incluían 26 con alta replicación [ADN de VHB mayor de 90 pg/ml en el momento de entrada en el estudio (HR)] que se trataron tanto con FCV como con HBIG. De estos pacientes, 19 respondieron pre OLT, seis no respondieron inicialmente y un paciente se retiró debido al tratamiento con lamivudina. Los 19 pacientes que respondieron se sometieron a OLT y 9 de estos pacientes no tuvieron reaparición del VHB a los 12 meses post OLT y estuvieron disponibles sueros post OLT para 7 de estos pacientes. Los 10 restantes de estos pacientes tuvieron reaparición del VHB. Estuvieron disponibles muestras de suero para el estudio de siete de estos pacientes después de reaparición del VHB post OLT. Los 10 pacientes tratados con HBIG solamente tuvieron niveles de ADN del VHB en suero pre OLT de menos de 90 pg/ml [baja replicación (LR)]. De estos, 4 pacientes tuvieron reaparición del VHB en los 12 meses post OLT. Estuvieron disponibles sueros de tres de estos pacientes pre OLT y de dos pacientes después de reaparición del VHB. Seis pacientes no tuvieron reaparición del VHB a los 12 meses post OLT y estaba disponible suero de cinco de estos pacientes post OLT.

Análisis de secuencia

(A) Pacientes con ADN del VHB mayor de 90 pg/ml (grupo HR)

Fase Pre OLT

(i) Pacientes que responden a FCV

Diecinueve de los 26 pacientes HR originales respondieron a FCV (un paciente adicional respondió pero se retiró del análisis adicional debido a tratamiento posterior con lamivudina). Hubo 28 cambios de aminoácidos únicos en toda la región que abarcaban la región catalítica de la polimerasa en comparación con las secuencias publicadas (Tabla 2). Esto incluye 9 mutaciones únicas dentro de los dominios funcionales en 8 pacientes que respondieron a FCV. Estas fueron en L423F (dominio A), I508V (dominio B), V/L/M553I/M (dominio C), N/Q584S (dominio D), N/Q584H (dominio D), S592H (dominio E), N594H (dominio E), N594H/Y (dominio E) y M596T/M (dominio E).

Hubo también 28 cambios únicos en el HBsAg en estos aislados pretratamiento en comparación con las secuencias publicadas en Norder *et al.*, (20) [Tabla 2]. De estas mutaciones, 8 aminoácidos se han observado previamente en la misma posición o son el aminoácido idéntico indicado asociado con escape de vacuna o selección después de tratamiento con HBIG post OLT. Tres de estos estuvieron en la posición de aminoácido 120 (P/S/A120S/A/T/P, P/S/A120T y P/S/A120T/P) y cuatro estuvieron en la posición de aminoácido 134 (F/Y/I134V, F/Y/I134N/Y, F/Y/I134S y F/Y/I134N). El otro cambio fue en D/A144E/N.

(ii) Pacientes que no responden a FCV

Seis pacientes con altos niveles de ADN del VHB [HR] antes del trasplante no respondieron al tratamiento con FCV. Hubo 10 cambios de aminoácidos únicos del VHB aislados de los seis pacientes en comparación con el consenso de polimerasa previamente publicado (Tabla 4). De estos, hubo 4 aminoácidos H436N/H, S463S/Y, V537V/I y K587R que no estaban presentes en los 19 pacientes que respondieron a FCV (Tabla 1). Los cambios detectados en el gen de polimerasa en la posición 463, 537, 560 y 565 (en 2 aislados) dieron como resultado todos un HBsAg alterado en la fase de lectura solapante (Tabla 4).

Hubo 8 diferencias de aminoácidos únicas en el HBsAg en comparación con las secuencias en Norder *et al* (20) en 5/6 pacientes. Estas incluyen los 5 cambios indicados anteriormente que también dieron como resultado una

mutación única en el gen de polimerasa, P/S/A120Y/S y S204R, que dio como resultado un cambio en el gen de polimerasa que aparece en la secuencia consenso de la polimerasa (es decir no único) y P217L, que no dio como resultado un cambio en el gen de la polimerasa. Uno de estos aminoácidos se localiza en la misma posición que una variante seleccionada de HBIG conocida (P120Q) en P/S/A120Y/S.

5

Fase post OLT

(i) Reparación del VHB

Diez de los diecinueve pacientes con altos niveles de ADN del VHB en el momento de entrada en el estudio [HR] tuvieron reparación post OLT durante los primeros 12 meses. De estos pacientes, estuvieron disponibles sueros después de la reparación para análisis de secuencia de 7 pacientes. Hubo 15 cambios únicos en 5/7 pacientes en comparación con la secuencia consenso previamente publicada, o en las secuencias pretratamiento individuales de estos pacientes, incluyendo 10 dentro de los dominios conservados (Tabla 5). Ocho de estas 15 diferencias de aminoácidos únicas (detectadas en 4/7 pacientes) tampoco se detectaron en ninguna muestra pretratamiento de los 19 pacientes que respondieron a FCV pre OLT, ni en las muestras post OLT de los 9 pacientes tratados con FCV sin reparación. Estas fueron L423L/M/V (dominio A), H436H/Y (dominio A), H436Y (dominio A), una delección de aminoácidos 471-474, W499E, V519L (dominio B), N584N/K (dominio D) y R588R/K (Tabla 5). El cambio en V519L es el mismo que se ha indicado previamente después de terapia de FCV a largo plazo (27). La mutación L526M que se ha indicado previamente después de terapia de FCV a largo plazo (27), también se detectó en este estudio en una muestra de un paciente que respondió a FCV (Tabla 5) pero no se detectó en muestras posteriores del mismo paciente. La mutación H436Y se vio en aislados de dos pacientes diferentes con reparación, y en ambos casos se vio como un cambio transitorio (es decir se había revertido a la secuencia original en la siguiente muestra). También se vio un cambio en esta posición de aminoácido en un resto diferente en un paciente que no respondía (véase anteriormente).

25

Los 15 cambios únicos en la polimerasa del VHB se examinaron después para determinar si hubo alguna alteración en el HBsAg en la fase de lectura solapante (Tabla 5). Se descubrió que la delección en los restos 471-474 daba como resultado una delección en fase correspondiente en el gen de envoltura (aa 117-120). Las mutaciones H436Y, H436H/Y, S483T, I508V y L526M no dieron como resultado ningún cambio en la secuencia del gen de envoltura. El L423L/M/V alteró la secuencia de HBsAg a I68I/M, la mutación en L423F/L alteró el HBsAg a C69F/L, la V519L dio como resultado E164D en la secuencia de HBsAg y S565A alteró el HBsAg en S210R. La mutación en W499E (debido a 2 cambios de nucleótidos) dio como resultado un cambio tanto en D144E como en G145R en la secuencia de HBsAg (un mutante de escape de vacuna conocido) y los cambios N584N/K, N584S, R588R/K y el N594H se localizaron después del final del gen de HBsAg. El codón de terminación de HBsAg en la posición 226 solapa con el codón que codifica el aminoácido 582 en el gen de polimerasa.

30

35

Hubo un total de 11 cambios de aminoácidos únicos en HBsAg en comparación con las secuencias publicadas de Norder *et al.* (20) y las secuencias de pretratamiento individuales. Esto incluye las siete mutaciones enumeradas anteriormente que cambiaron la polimerasa del VHB y P67P/Q, P67Q, R73P y M133T que no alteraron la polimerasa del VHB. De estos 11 cambios, dos en un paciente se habían indicado previamente como escape de vacuna o HBIG (D144E y G145R). Los 5 cambios únicos en el HBsAg post OLT en pacientes con reparación del VHB no detectada en ninguna muestra pretratamiento se enumeran en la Tabla 6.

40

45

(i) No reparación del VHB

Nueve de los pacientes HR tratados con FCV y HBIG no tuvieron reparación del VHB en los 12 meses después de OLT y estuvieron disponibles sueros de 7 pacientes para análisis de secuencia. Hubo 12 cambios únicos en tres pacientes en comparación con la secuencia consenso de polimerasa del VHB previamente publicada que no estaban presentes en la muestra pretratamiento del individuo. Estos incluyeron 5 cambios en los dominios funcionales y estaban en L423L/F (dominio A), A432V (dominio A), R466K, N477T, N485N/K, G498E, L526M (dominio B), T530S, N572K, F573Y, L577L/M/V (dominio D) y L593G/V/L/TERMINACIÓN (dominio E). La mutación L526M se detectó solamente durante un pico de ADN del VHB inmediatamente después del trasplante y no se detectó en aislados posteriores de este paciente. Nueve de las 12 mutaciones de polimerasa únicas dieron como resultado un HBsAg alterado en la fase de lectura solapante como se muestra entre paréntesis, L423L/F (C69C/F/S/Y), A432V (R78L), R466K (G112R), N477T (T123P), N485N/K (N131N/I/T/S), G498E (D144N), T530S (L176V), N572K (I218N) y F573Y (F219I).

50

55

Hubo 11 cambios únicos en el HBsAg después de tratamiento en comparación con las secuencias enumeradas en Norder *et al.* (20) y el aislado de pretratamiento del individuo. Estos fueron C69C/S/F7Y, R78L, T123P, T131N/I/T/S, D144N, C147S/Y, S167L, L173R, L176V, I218N y F219L. Los cambios en C147S/Y, S167L y L173R no dieron como resultado un cambio en la fase de lectura de polimerasa solapante, mientras que las otras mutaciones de HBsAg únicas dieron como resultado todas un cambio en la polimerasa (enumerada anteriormente). La mutación T131N/I/T/S se ha detectado previamente después de tratamiento con HBIG y los cambios en T123P y D144N están en la misma posición que otros cambios asociados con HBIG previamente indicados. Estos pacientes no tenían reparación del VHB incluso en presencia de estas variantes asociadas con HBIG previamente indicadas. No se

65

observó ninguna secuencia de aminoácidos en este grupo de pacientes que era común para todos los pacientes sin reaparición que no estuviera presente en aislados del VHB de pacientes con reaparición ni pacientes que no responden al FCV.

5 (B) Pacientes con ADN del VHB menor de 90 pg/ml (grupo LR)

Fase Pre OLT

10 Se secuenciaron múltiples aislados de VHB de pacientes de trasplante tratados con HBIG solamente y no FCV para determinar la variación de secuencia de fondo sobre un intervalo temporal comparable en la situación de trasplante.

15 De los 10 pacientes con bajos niveles de viremia, estuvieron disponibles muestras de suero de 9 pacientes pre OLT. La secuenciación de estos aislados demostró que había 12 cambios únicos aislados de cinco pacientes en comparación con la secuencia consenso de polimerasa del VHB publicada. Estos estuvieron en S/D455P, N469D, Y494F, Y/F497L, S/F565A/S, F/V573F/L, P583T (dominio D), N/Q584S 5 (dominio D), K585K/G (dominio D), S592N (dominio E), L593L/I/V (dominio E) y N594H (dominio E).

20 En el HBsAg de estos aislados pretratamiento, se detectaron cinco variantes de aminoácidos en 4 pacientes en comparación con las secuencias publicadas en Norder *et al.* (20). Estas variantes estuvieron en P/S/A120Q P/S/A120T, S/N210A/S, S/N210R/S y F219Y/F. Los primeros dos de estos cambios de HBsAg se han asociado previamente con cambios seleccionados de HBIG post OLT (23).

Fase post OLT

25 (i) *Reaparición del VHB*

30 Estuvieron disponibles muestras de suero adecuadas para secuenciación de solamente dos pacientes que tenían reaparición del VHB durante el tratamiento con HBIG. La secuencia del VHB caracterizada a partir de estos dos pacientes reveló que hubo 6 cambios únicos en comparación con el consenso publicado y la muestra pretratamiento del individuo. Estos fueron N469D, L492S, Y494F, T496T/N, Y497L y S548S/R (dominio C). El L492S, el T496T/N y el S548S/R también cambiaron el HBsAg en C138R, T142T/P y A194G/A, respectivamente. Los otros cambios no alteraron el HBsAg. El dominio A es la única región de dominio conservado en la que no hubo ningún cambio único seleccionado en aislados de VHB de pacientes LR post OLT mientras que se seleccionaron varios cambios en este dominio durante el tratamiento con FCV en aislados de VHB HR (véase Sección A anterior).

35 Dentro del HBsAg hubo 6 cambios únicos en dos pacientes en comparación con las secuencias publicadas (20) y la muestra pretratamiento del individuo. Estos fueron V96A, P120Q, C138R, P142T/P, K160K/N y A194G/A. La mutación K160K/N dio como resultado un cambio de la polimerasa del VHB en I515I/L. Los otros cambios que afectaron a ambas fases de lectura solapantes se han enumerado anteriormente. Cinco de estos cambios no se detectaron en ninguna muestra pretratamiento (Tabla 5). La mutación en P120Q se detectó pretratamiento, y se ha indicado previamente que se selecciona después del tratamiento con HBIG (23).

(i) *No reaparición del VHB*

45 Estuvo disponible suero de cinco de los seis pacientes post OLT sin reaparición del VHB. En dos de estos pacientes hubo 5 cambios en el gen de polimerasa en comparación con el consenso publicado y el aislado pretratamiento del individuo. Estos estuvieron en L/S/R563R/C, L581L/F (dominio D), L581L/Terminación (dominio D) y P583P/R (dominio D) y L593L/I (dominio E). Solamente la mutación L/S/R563R/C alteró el HBsAg en la fase de lectura solapante en I208I/M.

50 El I208I/M fue el único cambio exclusivo detectado en las secuencias de HBsAg en comparación con los enumerados en Norder *et al* (20) y la muestra pretratamiento del individuo. Este cambio no se ha observado previamente con escape de vacuna o HBIG. La variante de aminoácido (P/S/A120T, una variante seleccionada de HBIG conocida) se detectó en el aislado pretratamiento de un paciente. Esta no se detectó en los aislados post tratamiento de este paciente y el paciente no tuvo ninguna reaparición.

TABLA 2 Cambios de polimerasa del VHB únicos en los aislados pretratamiento de pacientes que responden a FCV

Diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia consenso de polimerasa del VHB publicada	Cambio de HBsAg correspondiente
L423F	C69S
S452A	sin cambios
S/D455P	sin cambios

ES 2 545 527 T3

Diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia consenso de polimerasa del VHB publicada	Cambio de HBsAg correspondiente
L461V	sin cambios
S462A	C107W
Q471L	S117C
H/Y472R	sin cambios
H479H/Q	T/M125M/T/K/R
S483T	sin cambios
V488E	F/Y/I134S
V488E/V	F/Y/I/134N/Y
V488G	F/Y/I134V, M/K/L133T
R/W499G/W	D/A144G
I508V	sin cambios
I533L	sin cambios
V/L/M533I/M	Después del codón de terminación
V/G560E	Y/F/H/C206N
V/G560P	K/N/S204R
Q/E561S	S/G/H/N/D/T207R
Q/E561 Q/Terminación	sin cambios
S/F565A	S/N210R
T/A568S	I/L/M213F
N/Q584S	Después de Terminación de HBsAG
N/Q584H	Después de Terminación de HBsAG
S592H	Después de Terminación de HBsAG
N594H	Después de Terminación de HBsAG
N594H/Y	Después de Terminación de HBsAG
M596T/M	Después de Terminación de HBsAG

TABLA 3 Cambios de HBsAg del VHB únicos en los aislados pretratamiento de pacientes que responden a FCV

Diferencias de aminoácidos en comparación con las secuencias de HBsAg del VHB publicadas	Cambio de polimerasa del VHB correspondiente
P67Q	sin cambios
C69S	L423F

ES 2 545 527 T3

Diferencias de aminoácidos en comparación con las secuencias de HBsAg del VHB publicadas	Cambio de polimerasa del VHB correspondiente
R73P	sin cambios
R79H	sin cambios
L94TERMINACIÓN	sin cambios
V96A	sin cambios
Q101R	sin cambios
C107W	S462A
S117C	Q417L
P/S/A120S/A/T/P	T/P/N/I474I/T/N/S
P/S/A120T	sin cambios
P/S/A120T/P	sin cambios
T/M125M/T/K/R	H479Q
M/K/L133T	V488G
F/Y/I134N/Y	V488V/E
F/V/I134V	V488G
F/Y/I134S	V488E
F/Y/I134N	V488E
S/T143M	sin cambios
D/A144E/N	R/W499G/W
A/G166V	sin cambios
K/N/S204R	sin cambios
Y/F/H206N	V/G560E
S/G/H/N/D/T207R	Q/E561S
S/N210R	S/F565A
I/M/L213F	T/A568S
P214L	sin cambios
P217L	sin cambios

TABLA 4 Sumario de cambios de aminoácidos en variantes del VHB aisladas de pacientes que no responden a FCV en comparación con la secuencia consenso publicada (18)

Diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia consenso de polimerasa del VHB publicada	Cambio de HbsAg correspondiente	Cambio de aminoácido en otros grupos de pacientes
H436N/H	sin cambios	H436H/Y (3-6 ^a , 27-3 ^a)
S463S/Y	L109I/L	no detectado
V537V/I	C/W182Y/Terminación	no detectado
V/G560E	Y206N	V560E(15-1 ^b)
S/F565A/S S/F 565 A	S210R/S	S/F 565A (4-1 ^b , 10-1 ^b , 18-1 ^b)
N/Q584H	Después del final de HbsAg	N/Q584H (15-1 ^b) N/Q584 S (2-3 ^a , 3-1 ^b , 26-1 ^c) N/S/H 584N/K (3-3 ^a)
K587R	Después del final de HBsAg	no detectado
N594H	Después del final de HbsAg	N594H (2-3 ^a , 14-1 ^b , 15-1 ^b , 17-1 ^b , 26-1 ^c , 31-1 ^c) N594N/Y (2-1 ^b)

Los cambios de aminoácidos en negrita no se detectaron en pacientes que respondieron a FCV

^a = VHB aislado de pacientes con reaparición del VHB durante tratamiento con FCV

^b = VHB aislado de un aislado de pretratamiento de un paciente que responde tratado con FCV

^c = VHB aislado de un aislado de pretratamiento de un paciente con baja replicación del VHB no tratado con FCV

5 TABLA 5 Sumario de diferencias de aminoácidos en variantes del VHB aisladas durante la reaparición del VHB de pacientes tratados con FCV en comparación con el consenso publicado

Diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia consenso de polimerasa del VHB publicada	Cambio de HbsAg correspondiente	Cambio de aminoácido en otros grupos de pacientes
L423L/M/V	I68I/M	L423F/L (15-2 ^a) L423F (12-1 ^e)
L423L/F	C69F/L	L423F/L (15-2 ^a) L423F (12-1 ^e)
H436H/Y H436Y	sin cambios	H436N (32-2 ^b)
DEL 471-474	117-120	no detectado
S483T	sin cambios	S483T (2-1 ^e)
W499E	D144E/G145R	R499K(1-2 ^c)
I508V	sin cambios	I508V (2-1 ^e)
V519L	E164D	V519L (1-3 ^c)
L526M	sin cambios	L526M (1-3 ^c , 6.2 ^{a-g})
S565A	S210R	S565A (4-1 ^e , 10-1 ^e , 18-1 ^e)
N584S	después de terminación de HBsAg	N/Q584S (3-1 ^e , 26-1 ^c) N584H (15-1 ^f , 32-1 ^b)
N/S/H584N/K	después de terminación de HBsAg	N/Q584S (3-1 ^e , 26-1 ^c) N584H (15-1 ^f , 32-1 ^b)
R588R/K	después de terminación de HBsAg	no detectado

N594H	después de terminación de HBsAg	N594H (14-1 ^e ,15-1 ^e , 17-1 ^e , 24-1 ^b ,25-1 ^b ,26-1 ^f ,31-1 ^e) N594N/Y (2-1 ^e)
<p>Los cambios de aminoácidos en negrita no se detectaron en pacientes que respondieron a FCV, ni en pacientes con VHB HR que no tenían reaparición de VHB post OLT</p> <p>^a paciente que responde a FCV HR pre OLT, sin reaparición post OLT</p> <p>^b paciente que no responde a HR</p> <p>^c LR con reaparición post OLT, tratado con FCV post reaparición</p> <p>^d HR sin reaparición</p> <p>^e paciente que responde a FCV HR pre OLT</p> <p>^f LR pre OLT</p> <p>^g cambio transitorio</p>		

TABLA 6 Cambios únicos en HBsAg en pacientes con reaparición del VHB en comparación con Norder *et al.* (20) y todas las secuencias pretratamiento de HBsAg

Cambio de HBsAg	Aislado	Tratamiento con FCV	Equivalente de polimerasa del VHB
I68I/M	5-2	FCV + HBIG	L423L/M/V
DEL 117-120	4-3	FCV + HBIG	DEL 471-474
D144E	4-3	FCV + HBIG	W499E
G145R	4-3	FCV + HBIG	W499E
E164D	27-3, 4, 5	FCV + HBIG	V/G519L
V96A	26-3	HBIG	sin cambios
C138R	26-3	HBIG	L492S
P142TVP	28-4	HBIG	T496T/N
K160K/N	26-4	HBIG	I515I/L
A194G/A	26-3	HBIG	S/A548S/R

5 Bibliografía

1. Summers J, Mason W. *Cell* (1982) 29: 403-415.
2. Vere Hodge R. A. *Antiviral Chem Chemother* (1993) 4: 67-84.
3. Boyd MR *et al Antiviral Chem Chemother.* (1987) 32: 358-363.
- 10 4. Kruger T *et al Hepatology* (1994) 22: 219A.
5. Main J *et al. J. Viral Hepatitis* (1996) 3: 211-215.
6. Severini A *et al Antimicrobial Agents Chemother* (1995) 39: 1430-1435.
7. Dienstag JL *et al New England J Med* (1995) 333: 1657-1661.
8. Shaw T, *et al. Antimicrobiol Agents Chemother* (1994) 38: 719-723.
- 15 9. Shaw T, *et al. Hepatology* (1996) 24: *en prensa*.
10. Tsiquaye KN, *et al. J. Med Virol* (1994) 42: 306-310.
11. Boker KHW, *et al. Transplantation* (1994) 57: 1706-1708.
12. Angus P, *et al. J. Gastroenterol Hepatol* (1993) 8: 353-357.
13. Poch O, *et al. EMBO J.* (1989) 8: 3867-3874.
- 20 14. Delarue M, *et al. Protein Engineering* (1990) 3: 461-467'.
15. Chiou HC, *et al. Antiviral Chem Chemother* (1995) 6: 281-288.
16. Ling R, *et al. Hepatology* (1996) 24: 711-713.
17. Price PM, *et al. Hepatology* 1992 16: 8-13.
18. Bartholomeusz *et al.*, *Intervirol* 1997
- 25 19. Manns M, *et al, Hepatology* 1998 28 (4 parte2) 260A.
20. Norder H, *et al, J. Gen Virol* 1993 74: 1341 -1348.
21. Wallace L A y Carman W F, *Viral Hepatitis Reviews* 1997 3: 5-16.
22. Protzer-Knolle U *et al, Hepatology* 1998 27: 254-263.

23. Carman W F, Thomas H C. *Gastroenterology* 1992 102: 711 -719.
 24. Moriyama K, *et al. Lancet* 1991 337: 125.
 25. Ghany MG *et al, Hepatology* 1998 27: 213-222.
 5 26. Cariani E, *et al, Journal of Medical Virology* 1995 47: 410-415.
 27. Aye TT, *et al., Journal of Hepatology* 1997 26: 1148-1153.
 28. Xiong, *et al, Hepatology* 1998 28 1669-1673
 29. Allen MI, *et al, Hepatology* 1998 27: 1670-1677.
 30. Niesters HGM, *et al, Journal of Infectious Diseases* 1998 177: 1382-5,
 31. Chayama K, *et al, Hepatology* 1998 1711 -1716.
 10 32. Ladner SK, *et al, Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 1998 9: 65-72.
 33. Tipples GA, *et al, Hepatology* 1996 24: 714-717.
 35. Bartholomew MM, *et al, Lancet* 1997 349: 20-22.
 36. Cane PA, *et al, Presentado en* 1998.
 37. Wolters LMM, *et al., Journal of Hepatology* 1998 28: 909-911.
 15 38. Naoumov NV, *et al., Hepatology* 1996 24: 282A
 39. Zoulim F, *et al, Hepatology* 1997; Res. 1200.
 40. Xiong X, *et al, 11th International Conference on Antiviral Research, San Diego, abril* 1998.
 41. Melegari M, *et al, Hepatology* 1998 2: 628-633.
 42. Ono-Nita SK, *et al, Antiviral Therapy* 1997; Res. 017. Second International Conference on Therapies for
 20 Viral Hepatitis. Hawái.
 43. Batholomeusz AI, *et al, Antiviral Therapy* 1997; Res. P72. Second International Conference on Therapies
 for Viral Hepatitis. Hawái
 44. Tillman HL, *et al, Hepatology* 1997 26: 4. Res. 1202.
 45. Fu L, *et al, Biochemical Pharmacology* 1998 55: 1567-1572.
 25 46. Pillay D, *et al, International Antiviral News* 1998.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Innogenetics N.V.
 <120> Variantes virales
 <130> 130 EP
 35 <160> 8
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 40 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B
 <400> 1
 45 gcctcatttt gtgggtcacc ata 23
 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Virus de la hepatitis B
 <400> 2
 tctctgacat actttccaat 20
 55 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B
 60 <400> 3
 ttgggtgga gcctcaggt c 21
 <210> 4
 <211> 18
 65 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 4
 aaattcgag tccccaac 18

5 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B

10 <400> 5
 gaaaattggt aacagcgg 18

15 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 6
 gtatccctcc tgtgctgt 19

20 <210> 7
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis B

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (48)..(48)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Glx es Asn o Asp

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es Ile o Pro

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es Ile o Val

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa es Ser o Asp

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (44)..(44)
 <223> Xaa es Thr o Asn

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (46)..(46)
 <223> Xaa es Arg o Asn

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (47)..(47)
 <223> Z es Asn o Ile

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE

- <222> (50)..(50)
<223> Xaa es Asn o Tyr o His
- 5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (52)..(52)
<223> Xaa es His o Tyr
- 10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (53)..(53)
<223> Xaa es Gly o Arg
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54)..(56)
<223> Xaa es cualquier aminoácido
- 20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> Glx es Asp o Asn
- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (60)..(60)
<223> Glx es Asp o Asn
- 30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
<223> Xaa es Ser o Tyr
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (65)..(65)
<223> Xaa es Asn o Gln
- 40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (71)..(71)
<223> Xaa es Leu o Met
- 45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (75)..(75)
<223> Xaa es Lys o Gln
- 50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> Xaa es Tyr o Phe
- 55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(79)
<223> Xaa es Arg o Trp
- 60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (84)..(84)
<223> Xaa es Tyr o Leu
- 65 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (85)..(85)

<223> Xaa es Ser o Ala
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (89)..(89)
 <223> Xaa es Ile o Val
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (95)..(95)
 <223> Xaa es Ile o Leu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (99)..(99)
 <223> Xaa es Val o Gly
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (114)..(114)
 <223> Xaa es Cys o Leu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (115)..(115)
 <223> Xaa es Ala o Ser
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 30 <222> (116)..(116)
 <223> Xaa es Val o Met
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 35 <222> (117)..(117)
 <223> Xaa es Val o Thr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 40 <222> (118)..(118)
 <223> Xaa es Arg o Cys
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <222> (122)..(122)
 <223> Xaa es Phe o Pro
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (125)..(125)
 <223> Xaa es Leu o Val
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (126)..(126)
 <223> Xaa es Ala o Val
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (128)..(128)
 <223> Xaa es Ser o Ala
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 65 <222> (133)..(133)
 <223> Xaa es Val o Leu o Met

5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (138)..(138)
 <223> Xaa es Lys o Arg

10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (139)..(139)
 <223> Xaa es Ser o Thr

15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (140)..(140)
 <223> Xaa es Val o Gly

20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (141)..(141)
 <223> Xaa es Gln o glu

25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (143)..(143)
 <223> Xaa es Leu o Ser o Arg

30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (145)..(145)
 <223> Xaa es Ser o Phe

35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (147)..(147)
 <223> Xaa es Phe o Tyr

40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (148)..(148)
 <223> Xaa es Thr o Ala

45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (149)..(149)
 <223> Xaa es Ala o Ser

50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (150)..(150)
 <223> Xaa es Val o Ile

55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (151)..(151)
 <223> Xaa es Thr o Cys

60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (152)..(152)
 <223> Xaa es Asn o Ser

65
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (153)..(153)
 <223> Xaa es Phe o Val

5
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (156)..(156)
<223> Xaa es Ser o Asp

10
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (157)..(157)
<223> Xaa es Leu o Val

15
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (164)..(164)
<223> Xaa es Asn o Gln

20
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (179)..(179)
<223> Xaa es Val o Ile

25
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (130)..(130)
<223> M es el aminoácido 550

<400> 7

ES 2 545 527 T3

Ser Glx Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His
 1 5 10 15

Xaa Pro Leu His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Xaa Gly Ser Ser
 20 25 30

Gly Leu Xaa Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Xaa Ser Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Asn Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Glx Leu His Glx Xaa Cys Ser Arg
 50 55 60

Xaa Leu Tyr Val Ser Leu Xaa Leu Leu Tyr Xaa Thr Xaa Gly Xaa Lys
 65 70 75 80

Leu His Leu Xaa Xaa His Pro Ile Xaa Leu Gly Phe Arg Lys Xaa Pro
 85 90 95

Met Gly Xaa Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala
 100 105 110

Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Ala Phe Xaa His Cys Xaa Xaa Phe Xaa
 115 120 125

Tyr Met Asp Asp Xaa Val Leu Gly Ala Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Glu
 130 135 140

Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Leu Xaa Xaa Gly Ile His
 145 150 155 160

Leu Asn Pro Xaa Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser Leu Asn Phe Met
 165 170 175

Gly Tyr Xaa Ile Gly
 180

5 <210> 8
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Virus de la hepatitis B

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es Asn o Asp

<220>
 <221> MISC_FEATURE

- <222> (17)..(17)
<223> Xaa es Ile o Pro
- 5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (29)..(29)
<223> Xaa es Ile o Val
- 10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> Xaa es Ser o Asp
- 15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (44)..(44)
<223> Xaa es Thr o Asn
- 20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (46)..(46)
<223> Xaa es Arg o Asn
- 25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (47)..(47)
<223> Xaa es Asn o Ile
- 30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> Xaa es más de 3 posibles AA diferentes
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(50)
<223> Xaa es Asn o Tyr o His
- 40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (52)..(52)
<223> Xaa es His o Tyr
- 45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (53)..(53)
<223> Xaa es Gly o Arg
- 50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (54)..(56)
<223> Xaa es más de 3 posibles AA diferentes
- 55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (57)..(57)
<223> Xaa es Asp o Asn
- 60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (60)..(60)
<223> Xaa es Asp o Asn
- 65 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)

<223> Xaa es Ser o Tyr
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (65)..(65)
 <223> Xaa es Asn o Gln
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (71)..(71)
 <223> Xaa es Leu o Met
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (75)..(75)
 <223> Xaa es Lys o Gln
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (77)..(77)
 <223> Xaa es Tyr o Phe
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (79)..(79)
 <223> Xaa es Arg o Trp
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (84)..(84)
 <223> Xaa es Tyr o Leu
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (85)..(85)
 <223> Xaa es Ser o Ala
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (89)..(89)
 <223> Xaa es Ile o Val
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (95)..(95)
 <223> Xaa es Ile o Leu
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (99)..(99)
 <223> Xaa es Val o Gly
 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (114)..(114)
 <223> Xaa es Cys o Leu
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (115)..(115)
 <223> Xaa es Ala o Ser
 60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (116)..(116)
 <223> Xaa es Val o Met
 65

5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (117)..(117)
 <223> Xaa es Val o Thr

10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (118)..(118)
 <223> Xaa es Arg o Cys

15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (122)..(122)
 <223> Xaa es Phe o Pro

20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (125)..(125)
 <223> Xaa es Leu o Val

25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (126)..(126)
 <223> Xaa es Ala o Val

30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (128)..(128)
 <223> Xaa es Ser o Ala

35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (133)..(133)
 <223> Xaa es Val o Leu o Met

40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (138)..(138)
 <223> Xaa es Lys o Arg

45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (139)..(139)
 <223> Xaa es Ser o Thr

50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (140)..(140)
 <223> Xaa es Val o Gly

55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (141)..(141)
 <223> Xaa es Gln o Glu

60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (143)..(143)
 <223> Xaa es Leu o Ser o Arg

65
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (145)..(145)
 <223> Xaa es Ser o Phe

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (147)..(147)
 <223> Xaa es Phe o Tyr

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (148)..(148)
 <223> Xaa es Thr o Ala

10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (149)..(149)
 <223> Xaa es Ala o Ser

15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (150)..(150)
 <223> Xaa es Val o Ile

20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (151)..(151)
 <223> Xaa es Thr o Cys

25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (152)..(152)
 <223> Xaa es Asn o Ser

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (153)..(153)
 <223> Xaa es Phe o Val

35

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (156)..(156)
 <223> Xaa es Ser o Asp

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (157)..(157)
 <223> Xaa es Leu o Val

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (164)..(164)
 <223> Xaa es Asn o Gln

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (179)..(179)
 <223> Xaa es Val o Ile

55

<400> 8

ES 2 545 527 T3

Ser Xaa Leu Ser Trp Leu Ser Leu Asp Val Ser Ala Ala Phe Tyr His
 1 5 10 15

Xaa Pro Leu His Pro Ala Ala Met Pro His Leu Leu Xaa Gly Ser Ser
 20 25 30

Gly Leu Xaa Arg Tyr Val Ala Arg Leu Ser Ser Xaa Ser Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Asn Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu His Xaa Xaa Cys Ser Arg
 50 55 60

Xaa Leu Tyr Val Ser Leu Xaa Leu Leu Tyr Xaa Thr Xaa Gly Xaa Lys
 65 70 75 80

Leu His Leu Xaa Xaa His Pro Ile Xaa Leu Gly Phe Arg Lys Xaa Pro
 85 90 95

Met Gly Xaa Gly Leu Ser Pro Phe Leu Leu Ala Gln Phe Thr Ser Ala
 100 105 110

Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Ala Phe Xaa His Cys Xaa Xaa Phe Xaa
 115 120 125

Tyr Met Asp Asp Xaa Val Leu Gly Ala Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Glu
 130 135 140

Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Leu Xaa Xaa Gly Ile His
 145 150 155 160

Leu Asn Pro Xaa Lys Thr Lys Arg Trp Gly Tyr Ser Leu Asn Phe Met
 165 170 175

Gly Tyr Xaa Ile Gly
 180

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante de un virus VHB aislado, en el que la variante comprende una mutación en la ADN polimerasa seleccionada de N/S/H584K, K587R y R588K con referencia a la numeración usada en la Figura 2, en el que dicha variante muestra sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido.
- 10 2. Un método para determinar el potencial para que un VHB muestre sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido, comprendiendo dicho método aislar ADN o ARNm correspondiente de dicho VHB y explorar con respecto a una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica la ADN polimerasa dando como resultado al menos una sustitución, deleción y/o adición de aminoácidos en el dominio D de dicha ADN polimerasa en el que la presencia de dicha mutación es una indicación de la probabilidad de resistencia a dicho análogo de nucleósido, en el que el método determina una o más de las siguientes mutaciones en la ADN polimerasa: N584K, K587R y R588K con referencia a la numeración usada en la Figura 2.
- 15 3. Uso de una variante de un virus VHB aislado en el que la variante comprende una mutación en la ADN polimerasa seleccionada de N/S/H584K, K587R y R588K con referencia a la numeración usada en la Figura 2, en el que dicha variante muestra sensibilidad reducida a un análogo de nucleósido en la exploración con respecto a un agente antiviral capaz de inhibir dicho virus.

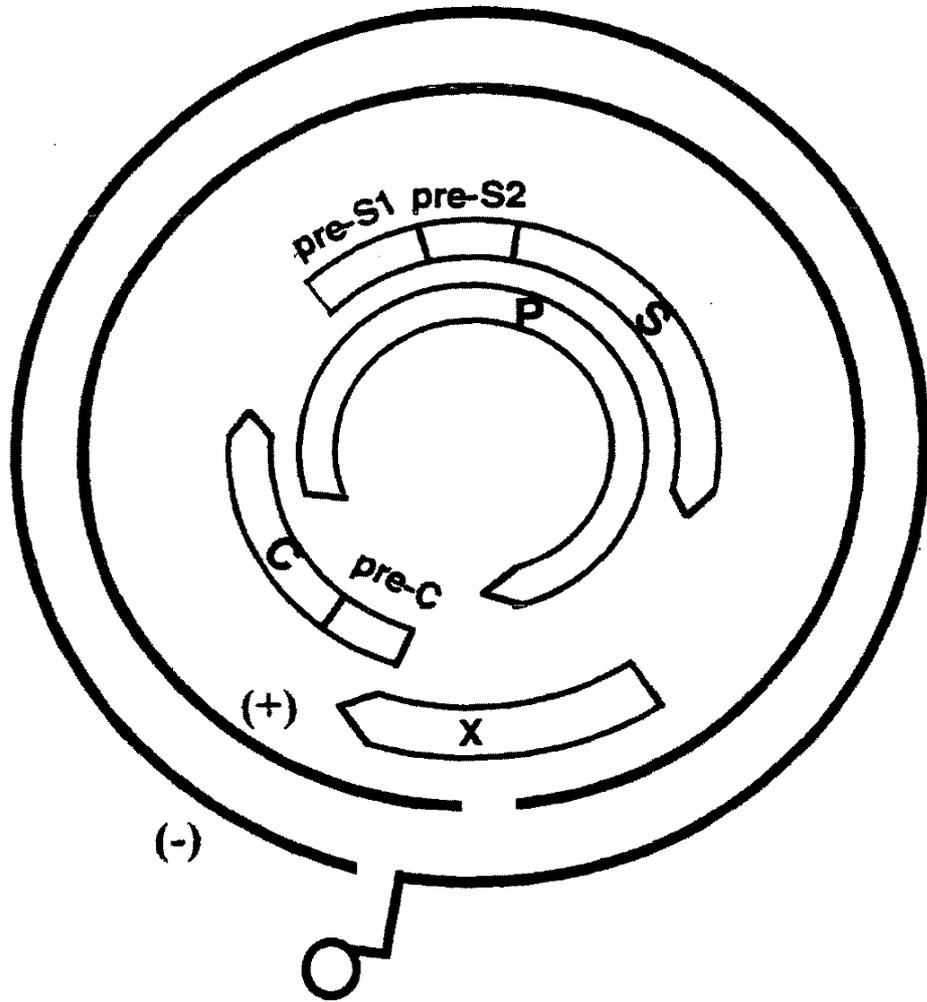


Figura 1

DOMINIO A

421 430 440 450
S^N_DLSWLSLD VSAAFYH^IPPL HPAAMPHELL^I_V GSSGL^S_DRYVA

460 470 480 490
 RLSS^T_NSR^N_NI*^N NY^H_QY^GR***^DNLH D^N_SYCSR^NQLYVS L^L_MLLYK^T_QY^F_{GR}W

DOMINIO B

500 510 520 530
KLHLYLSAHP^I_V LGFRK^I_LPMG^V_G GLSPFLLAQF TSAIC^L_SV^M_VT^R_{CR}

DOMINIO C

540 550 560
AF^FPHCL^V_VFSAY MDD^V_LMVLGAK^R_ST V^G_QEHLSRE^SFL^F_YT^A_S

DOMINIO D DOMINIO E

570 580 590 600
V^I_TC^N_SFVLLS^D_LVGI HLNP^N_QRTKRW GYSLNFMGY^V_II G

Figura 2