

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 252**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.1997 E 10181900 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2322669**

54 Título: **Procedimiento para tipar y detectar el VHB**

30 Prioridad:

**19.04.1996 EP 96870053**

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

**16.06.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MAERTENS, GEERT;  
ROSSAU, RUDI y  
STUYVER, LIEVEN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 574 252 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

Procedimiento para tipar y detectar el VHB

La presente invención se refiere al campo del diagnóstico del virus de la hepatitis B (VHB). Más particularmente, la presente invención se refiere al campo del genotipado del VHB y/o la determinación de la presencia de mutantes del VHB en muestras de prueba.

La presente invención se refiere particularmente a un procedimiento para la detección rápida y fiable de genotipos y/o mutantes del VHB que se producen en una muestra de prueba usando conjuntos específicos de sondas optimizadas para actuar conjuntamente en un ensayo de hibridación inversa. El procedimiento y el kit de la presente invención se definen en las reivindicaciones 1 y 2 adjuntas.

El virus de la hepatitis B es un pequeño virus ADN con envoltura de aproximadamente 3200 pb de longitud. Históricamente se ha caracterizado en base a la reacción inmunológica del HBsAg con conjuntos de anticuerpos monoclonales. Las cepas aisladas se han descrito como a, lo que indica el determinante común para todos los diferentes subtipos, seguido de combinaciones específicas de subtipos: *dw*, *dr*, *yw* o *yr*. Los últimos son pares mutuamente excluyentes de determinantes, que abarcan los aminoácidos 122 (*d*=lys, *y*=arg) y 160 (*w*=lys, *r*= arg) de HBsAg. Existen diversos subdeterminantes para *w* y se pueden atribuir a la aparición de determinadas variantes de aminoácidos en el codón 127. Más recientemente se ha propuesto una clasificación genética, en base al análisis molecular del virus. Esta clase de análisis demostró que existen seis genotipos diferentes en total, indicados desde A a F, con una divergencia genética máxima de un 8 % al comparar los genomas completos (revisado por Magnius y Norder, 1995).

La variabilidad genética del VHB puede ser clínicamente importante. De hecho, la variabilidad genómica puede incluir algunos mecanismos mediante los que el VHB evita la depuración inmunitaria, y de ahí que induzca una infección crónica. Un marcador de proteínas importante en la inducción de la tolerancia inmunitaria, la eliminación del virus y la infección crónica es HBeAg. La expresión de esta proteína se controla estrictamente tanto a nivel transcripcional como traduccional (Li *et al.*, 1993; Okamoto *et al.*, 1990; Yuan *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1995). Por lo tanto, en la evolución natural de la infección por VHB se indica una etapa bien caracterizada de la enfermedad como hepatitis B crónica con HBe negativo (revisado por Hadziyannis S.J., 1995). Esta fase se debe principalmente a la aparición de mutaciones precoces de codones finalizadores traduccionales. La variabilidad genética global determina la frecuencia y localización física en el genoma vírico donde aparecen estas mutaciones de codones finalizadores traduccionales. Se propuso la regulación transcripcional como el mecanismo para el genotipo A (y posiblemente también F), mientras que más probablemente se encontró el control traduccional en los demás genotipos (Li *et al.*; 1993; Sato *et al.*, 1995). A diferencia de la regulación traduccional, se demostró que la regulación transcripcional no podía bloquear completamente la expresión del HBeAg y, por lo tanto, se propuso para categorizar el fenotipo de este mutante como HBe suprimido, en lugar de como HBe negativo (Takahashi *et al.*, 1995). En cualquier caso, estos mutantes precoces darían lugar a una destrucción del equilibrio preexistente entre HBeAg en circulación y los péptidos derivados de HBeC presentados por moléculas HLA clase I en la superficie de hepatocitos infectados, disminuyendo así el efecto supresor de HBeAg sobre los linfocitos T, dando como resultado finalmente la liberación parcial de LTC específicos del core y dando lugar a apoptosis de los hepatocitos infectados. En general, después del surgimiento de las variantes de HBe menos, la evolución de la infección vírica se caracteriza por el curso de hepatitis crónica, que puede dar lugar al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular (Hadziyannis, 1995). La detección de mutaciones precoces del VHB se divulga, por ejemplo, en Li *et al.* (1990).

Otra cuestión para la que la variabilidad genética o el genotipado del virus puede ser pertinente es en el desarrollo de vacunas donde la respuesta se puede mediar por el tipo de virus. La protección frente a infección por VHB de todos los subtipos se confiere por los anticuerpos al determinante 'a' común del antígeno de superficie de la HB (HBsAg). Se ha demostrado que este determinante 'a' presenta un número de epitopos, y que su estructura terciaria es lo más importante para su antigenicidad. La región más importante se encuentra entre los aminoácidos 124 y 147, pero se puede extender desde el aminoácido 114 al 150. Una respuesta anti-HBs adecuada, aumentada después de la vacunación, es, en principio, totalmente protectora. La infección con una cepa del VHB que alberga mutaciones en la región determinante 'a' puede dar como resultado un fallo vacunal, a causa de que la respuesta inmunitaria humoral inducida por vacuna no reconoce el HBsAg mutante. Los mutantes de escape asociados a vacunas más comunes son las sustituciones de una glicina en la posición 145 con una arginina (G145R), K141E y T126N. Pero también se han encontrado una inserción de 2 aa entre la posición de los aa 122 y 123, y una inserción de 8 aa entre los aa 123 y 124 (Carman *et al.*, 1990, 1995; Crawford, 1990; Waters *et al.*, 1992).

La lamivudina es un enantiómero (-) de 3'-tiacitidina, un análogo de 2',3'-didesoxinucleósido, y se sabe que es un potente inhibidor de la replicación del VHB a través de la inhibición de la actividad transcriptasa inversa (RT) de la polimerasa del VHB. El tratamiento con lamivudina puede dar como resultado mejoras histológicas en pacientes con hepatitis crónica, y cuando se administra antes y después de un trasplante de hígado, puede prevenir la reinfección del injerto (Honkoop *et al.*, 1995; Naoumov *et al.*, 1995). Sin embargo, después del tratamiento, se puede observar una exacerbación de la hepatitis en la mayoría de los pacientes, con elevaciones de ALT y ADN del VHB que se vuelve detectable de nuevo. Este rebote del ADN del VHB se asocia con un nuevo equilibrio de cuasiespecies. En unos pocos casos, se observó progresión del virus durante la terapia, debido a la selección de cepas del VHB resistentes a

- lamivudina. La naturaleza exacta de esta progresión se ha atribuido a la acumulación de mutaciones en la parte RT de la polimerasa. Se ha encontrado un mecanismo similar en la RT polimerasa del VIH, donde tras el tratamiento con lamivudina, las mutaciones se acumulan en el motivo YMDD (Gao *et al.*, 1993). Este motivo YMDD también está presente en la parte RT de la polimerasa del VHB, y se han encontrado mutaciones seleccionadas por lamivudina en VHB en esta región (Tipples *et al.*, 1996), así como en otras regiones de la parte RT de la polimerasa (Ling *et al.*, 1996). Penciclovir es otro fármaco que ha demostrado inhibir la actividad transcryptasa inversa de la polimerasa del VHB (Shaw *et al.*, 1996), y las mutaciones en la polimerasa del VHB también se pueden detectar tras el tratamiento con este fármaco.
- De todo esto se puede deducir que la información sobre las siguientes cuestiones es fundamental para el diagnóstico apropiado *in vitro*, supervisión y seguimiento de infecciones por VHB:
- genotipo;
  - mutaciones precore;
  - mutaciones de escape vacunal;
  - mutaciones del gen RT seleccionadas mediante tratamiento con fármacos, tales como lamivudina y penciclovir.
- Obtener toda esta información usando las tecnologías existentes es complicado, lleva tiempo y requiere personal altamente cualificado y experimentado.
- De esta manera, un objetivo de la presente divulgación es desarrollar un procedimiento de detección rápida y fiable para la determinación de la presencia o ausencia de uno o más genotipos del VHB posiblemente presentes en una muestra biológica.
- Más particularmente, un objetivo de la presente divulgación es desarrollar un procedimiento de detección rápida y fiable para la determinación de la presencia o ausencia de una o más variaciones en la región preS1 del VHB y/o en la región HBsAg lo que representa uno o más genotipos del VHB posiblemente presentes en una muestra biológica en un único experimento. Más particularmente, un objetivo de la presente divulgación es desarrollar un procedimiento de detección rápida y fiable para la determinación de la presencia o ausencia de uno o más mutantes del VHB posiblemente presentes en una muestra biológica en un único experimento.
- Más particularmente, un objetivo de la presente invención es desarrollar un procedimiento de detección rápida y fiable para la determinación de mutaciones particulares en la región precore del VHB posiblemente presentes en una muestra biológica en un único experimento.
- Más particularmente, un objetivo de la presente divulgación es desarrollar un procedimiento de detección rápida y fiable para la determinación de una o más mutaciones en la región HBsAg del VHB posiblemente presentes en una muestra biológica en un único experimento.
- Más particularmente, un objetivo de la presente divulgación es desarrollar un procedimiento de detección rápida y fiable para la determinación de una o más mutaciones en la región del gen de la polimerasa (pol) del VHB posiblemente presentes en una muestra biológica en un único experimento.
- Más particularmente, un objetivo de la presente divulgación es desarrollar un procedimiento de detección rápida y fiable para la determinación simultánea de uno o diversos genotipos del VHB en combinación con uno o diversos mutantes del VHB posiblemente presentes en una muestra biológica en un único experimento.
- Un objetivo de la presente divulgación también es proporcionar un ensayo de genotipado o procedimiento que permita inferir la secuencia de nucleótidos en los codones de interés y/o los mutantes del VHB de interés, y/o inferir el genotipo del VHB posiblemente presente en una muestra biológica.
- Incluso más particularmente, un objetivo de la presente divulgación también es proporcionar un ensayo de genotipado que permita la detección de los genotipos y mutantes del VHB diferentes en una única disposición experimental.
- Otro objetivo de la presente divulgación es seleccionar sondas particulares que puedan discriminar una o más mutaciones del VHB en una de las regiones mencionadas anteriormente del genoma del VHB y/o que puedan discriminar uno o más genotipos del VHB.
- Más particularmente, un objetivo de la presente divulgación es seleccionar sondas particulares que puedan discriminar VHB natural de secuencias del VHB mutante.
- Un objetivo de la presente divulgación también es seleccionar sondas particulares que puedan discriminar variantes naturales y y polimórficas del VHB de secuencias del VHB mutante.
- Un objetivo de la presente divulgación también es seleccionar sondas particulares que puedan discriminar secuencias del genotipo del VHB.

Además, un objetivo de la presente divulgación es combinar un conjunto de sondas seleccionadas que puedan genotipar el VHB y/o discriminar mutantes del VHB diferentes posiblemente presentes en una muestra biológica, pudiéndose usar de este modo todas las sondas en las mismas condiciones de hibridación y lavado.

5 Un objetivo de la presente divulgación también es seleccionar cebadores que posibiliten la amplificación del(de los) fragmento(s) génico(s) que determina(n) las mutaciones genómicas del VHB o variaciones de interés como se analiza anteriormente.

La presente divulgación también tiene como objetivo kits de diagnóstico que comprendan dichas sondas útiles para desarrollar dicho ensayo y/o ensayos de genotipado para detectar, supervisar o realizar un seguimiento de la infección por VHB y/o ensayos para detectar mutaciones del VHB.

10 Todos los objetivos de la presente divulgación se han cumplido mediante los siguientes modos de realización específicos.

15 Como solución al problema mencionado anteriormente, que es fundamental para el diagnóstico apropiado, supervisión y seguimiento de la infección por VHB es tener información sobre el genotipo del VHB presente, la presente divulgación proporciona una manera elegante de abordar los problemas de dicha complejidad que implica recurrir a un enfoque de hibridación inversa (particularmente sobre tiras de ensayo con sondas en línea, como se describe por Stuyver *et al.*, 1993). Usando esta tecnología es posible obtener convenientemente todos los datos fundamentales en una serie de pruebas. Para lograr este propósito, se necesita diseñar y ensamblar un conjunto de sondas que puedan detectar todos los polimorfismos pertinentes en las regiones del gen del VHB de interés.

20 De esta manera, la presente divulgación se refiere particularmente a un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de uno o más genotipos del VHB en una muestra biológica, que comprende:

- (i) si es necesario, liberar, aislar o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en la muestra;
- (ii) si es necesario, amplificar la parte pertinente de un gen del VHB adecuado presente en dicha muestra con al menos un par de cebadores adecuados;
- 25 (iii) hibridar los ácidos polinucleicos de la etapa (i) o (ii) con al menos dos sondas de nucleótidos que se hibridan específicamente a una secuencia diana específica del genotipo del VHB elegida de la figura 1; estando aplicadas dichas sondas en localizaciones conocidas sobre un soporte sólido y pudiéndose hibridar dichas sondas a ácidos polinucleicos de la etapa (i) o (ii) en las mismas condiciones de hibridación y lavado o hibridándose dichas sondas específicamente con una secuencia complementaria a cualquiera de dichas secuencias diana, o una secuencia en la que T de dicha secuencia diana se reemplaza por U;
- 30 (iv) detectar los híbridos formados en la etapa (iii);
- (v) inferir el genotipo del VHB presente en dicha muestra a partir de la(s) señal(es) de hibridación diferencial(es) obtenida(s) en la etapa (iv).

35 Las secuencias diana específicas del genotipo pueden ser cualquier variación de nucleótidos que aparezca tras la alineación de los genomas del VHB diferentes que permita la clasificación de una cepa aislada del VHB determinada como un genotipo determinado (véase la figura 1).

La expresión "parte pertinente de un gen del VHB adecuado" se refiere a la parte del gen del VHB que engloba la secuencia diana específica del genotipo del VHB elegida de la figura 1 que se va a detectar.

40 De acuerdo con un aspecto preferente de la presente divulgación, se realiza la etapa (iii) usando un conjunto de al menos 2, preferentemente al menos 3, más preferentemente al menos 4 y lo más preferentemente al menos 5 sondas, todas meticulosamente diseñadas de tal manera que muestren los resultados de hibridación deseados, cuando se usan en un formato de ensayo de hibridación inversa, más particularmente en las mismas condiciones de hibridación y lavado, lo que implica que cada una de dichas sondas puede formar un complejo tras la hibridación con su secuencia diana presente en los ácidos polinucleicos de la muestra obtenida después de la etapa (i) o (ii).

45 La numeración de los nucleótidos y aminoácidos codificados por el gen del VHB es como se acepta generalmente en la literatura.

Más particularmente, la presente divulgación se refiere a un conjunto de al menos 2 sondas que permiten la detección de una variación específica del genotipo, incluyendo también posiblemente una o más sondas que permiten la detección de una secuencia natural, una secuencia mutada o una polimórfica en una cualquiera de las posiciones de nucleótidos que muestran una diversidad de secuencias tras la alineación de todas las secuencias del VHB conocidas o todavía por descubrir como se representa en la figura 1 para todos los genomas del VHB completos encontrados en el EMBL/NCBI/DDBJ/Genbank.

50 Los conjuntos de sondas de acuerdo con la presente divulgación tienen como característica común que todas las sondas en dicho conjunto están diseñadas de modo que se puedan usar conjuntamente en un ensayo de hibridación inversa, más particularmente en las mismas o idénticas condiciones de hibridación y lavado como se indica anteriormente y a continuación.

Los conjuntos seleccionados de sondas de acuerdo con la presente divulgación incluyen sondas que permiten diferenciar cualquiera de los cambios de nucleótidos específicos del genotipo del VHB representados en la figura 1, preferentemente en la región preS1 o HBsAg del VHB. Dichas sondas se caracterizan por que pueden actuar en un procedimiento como se expone anteriormente.

- 5 A fin de resolver el problema mencionado anteriormente de obtener información sobre la posible presencia de mutantes del VHB en una muestra dada, la presente divulgación proporciona una manera elegante de abordar este problema que implica recurrir a un enfoque de hibridación inversa (particularmente sobre tiras de ensayo con sondas en línea, como se describe por Stuyver *et al.*, 1993). Usando esta tecnología es posible obtener convenientemente todos los datos fundamentales en una serie de pruebas. Para lograr este propósito, se necesita diseñar y ensamblar un conjunto de sondas que puedan detectar todas las mutaciones pertinentes y posiblemente también polimorfismos o secuencias naturales en las regiones del gen del VHB de interés.

De esta manera, otro aspecto particularmente preferente de la presente divulgación es un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de uno o más mutantes del VHB en una muestra biológica, que comprende:

- 15 (i) si es necesario, liberar, aislar o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en la muestra;  
 (ii) si es necesario, amplificar la parte pertinente de un gen del VHB adecuado presente en dicha muestra con al menos un par de cebadores adecuados;  
 (iii) hibridar los ácidos polinucleicos de la etapa (i) o (ii) con al menos dos sondas de nucleótidos que se hibridan específicamente a una secuencia diana mutante del VHB elegida de la figura 1; estando aplicadas dichas sondas en localizaciones conocidas sobre un soporte sólido y pudiéndose hibridar dichas sondas a los ácidos polinucleicos de la etapa (i) o (ii) en las mismas condiciones de hibridación y lavado, o hibridándose dichas sondas específicamente con una secuencia complementaria a cualquiera de dichas secuencias diana, o una secuencia en la que T de dicha secuencia diana se reemplaza por U y posiblemente también comprendiendo dicho conjunto o sondas una o más sondas del VHB natural correspondientes a la secuencia diana del VHB mutada respectiva;  
 20 (iv) detectar los híbridos formados en la etapa (iii);  
 (v) inferir el(los) mutante(s) del VHB presente(s) en dicha muestra a partir de la(s) señal(es) de hibridación diferencial(es) obtenida(s) en la etapa (iv).

30 Se ha de entender que el término "secuencia diana mutante" no abarca únicamente la secuencia que contiene una mutación, sino también la secuencia natural correspondiente. La secuencia diana mutante del VHB de acuerdo con la presente divulgación puede ser cualquier secuencia que incluya un codón mutado del VHB conocido en la técnica o todavía por descubrir. Las regiones diana mutantes del VHB particularmente preferentes se exponen a continuación.

A fin de resolver el problema al que se hace referencia anteriormente de obtener información sobre las cuestiones fundamentales para el diagnóstico apropiado del VHB (en concreto, genotipo y mutaciones diferentes, particularmente mutaciones en la región precore, mutaciones de escape vacunal y mutaciones del gen RT seleccionadas mediante tratamiento con fármacos, tales como lamivudina y penciclovir), la presente divulgación proporciona una manera particularmente elegante de obtener dicha información compleja.

40 Además, un cuidadoso análisis de los datos obtenidos por los autores de la presente invención reveló claramente que la combinación de información relativa a los mutantes de escape y precore con los datos sobre el genotipo es fundamental para permitir la interpretación adecuada de los resultados. De ahí que sea altamente ventajoso poder producir simultáneamente todos los datos pertinentes.

En el presente procedimiento para diagnosticar mutantes del VHB, preferentemente en combinación con el genotipado del VHB, se puede usar un conjunto de sondas seleccionadas como se define anteriormente, en el que dicho conjunto de sondas se caracteriza por ser elegido de tal manera que para una mutación del VHB dada se incluyen las siguientes sondas en dicho conjunto:

- 45 - al menos una sonda para detectar la presencia del(de los) nucleótido(s) mutado(s) en dicha posición;  
 - al menos una sonda para detectar la presencia del(de los) nucleótido(s) natural(es) en dicha posición;  
 - posiblemente también (una) sonda(s) adicional(es) para detectar polimorfismos naturales en posiciones que rodean la posición de la mutación.

50 La inclusión de los dos últimos tipos de sondas contribuye en gran medida a incrementar la sensibilidad de dichos ensayos demostrados en la sección de ejemplos.

Los conjuntos seleccionados de sondas de acuerdo con la presente divulgación incluyen al menos una sonda, preferentemente al menos dos sondas, que caracteriza la presencia de una mutación del VHB en las posiciones de nucleótidos elegidas de la región precore del VHB, más particularmente de la siguiente lista de codones susceptibles a mutaciones en la región precore del VHB, tales como el codón 15 en el genotipo A, y para todos los genotipos: codón 28, codón 29 y codón 28 y 29, o en la región de promotor de precore (véase la figura 1).

Dichas sondas se caracterizan por que pueden actuar en un procedimiento como se expone anteriormente.

Un aspecto adicional de la presente divulgación incluye al menos una sonda, preferentemente al menos dos sondas, que caracteriza la presencia de una mutación de escape vacunal en posiciones del codón elegidas de la región HBsAg del VHB, más particularmente de la lista de codones susceptibles a mutaciones en la región HBsAg del VHB, tal como en los codones 122, 126, 141, 143, 144 o 145 (véase la figura 1).

5 Un aspecto adicional de la presente divulgación incluye al menos una sonda, preferentemente al menos dos sondas, que caracteriza la presencia de una mutación en la región del gen pol RT del VHB, que provoca resistencia a fármacos, tales como lamivudina y penciclovir, por ejemplo, la mutación de M a V o a I en la posición 552 (en el motivo YMDD), la mutación de V a I en la posición 555, la mutación de F a L en la posición 514, la mutación de V a L en la posición 521, la mutación de P a L en posición 525 y la mutación de L a M en la posición 528 (véase la figura 1).

10 En un aspecto seleccionado, se usa una combinación de al menos dos sondas de oligonucleótidos y dicha combinación de sondas se hibrida específicamente a al menos dos de los siguientes grupos de secuencias diana:

15 una secuencia diana mutante escogida de la región del gen pol RT del VHB,  
una secuencia diana mutante escogida de la región precore del VHB,  
una secuencia diana mutante escogida de la región HBsAg del VHB,  
una secuencia diana específica del genotipo del VHB.

Por ejemplo, un aspecto implica la hibridación con al menos una sonda de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del genotipo elegida de la figura 1 y al menos una sonda de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante del VHB escogida de la figura 1.

20 Otro aspecto seleccionado, por ejemplo, implica la hibridación con al menos una sonda de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del genotipo elegida de la figura 1 y al menos una sonda de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante del VHB escogida de la región del gen pol RT como se representa en la figura 1.

25 Otro aspecto seleccionado, por ejemplo, implica la hibridación con al menos una sonda de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del genotipo elegida de la figura 1 y al menos una sonda de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante del VHB escogida de la región precore como se representa en la figura 1.

30 Otro aspecto seleccionado, por ejemplo, implica la hibridación con al menos una sonda de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del genotipo elegida de la figura 1 y al menos una sonda de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante de escape vacunal del VHB en la región HBsAg como se representa en la figura 1.

En un aspecto seleccionado, se usa una combinación de al menos tres sondas de oligonucleótidos y dicha combinación de sondas se hibrida específicamente a al menos tres de los siguientes grupos de secuencias diana:

35 una secuencia diana mutante escogida de la región del gen pol RT del VHB,  
una secuencia diana mutante escogida de la región precore del VHB,  
una secuencia diana mutante escogida de la región HBsAg del VHB,  
una secuencia diana específica del genotipo del VHB.

40 Por ejemplo, un aspecto implica la hibridación con al menos una sonda de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del genotipo elegida de la figura 1, y al menos una sonda de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante del VHB escogida de la región precore como se representa en la figura 1 y al menos una sonda de nucleótidos que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante de escape vacunal del VHB escogida de la región HBsAg como se representa en la figura 1.

45 Por ejemplo, otro aspecto implica la hibridación con al menos una sonda que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante de la región del gen pol RT del VHB del VHB, y al menos una sonda que se hibrida específicamente a una secuencia diana mutante de la región HBsAg del VHB, y al menos una sonda que se hibrida específicamente a una secuencia diana específica del genotipo de la región HBsAg del VHB. De acuerdo con este modo de realización, se puede amplificar la parte pertinente del genoma del VHB mediante el uso de un par de cebadores, por ejemplo, HBPr 75 y HBPr 94.

En un aspecto seleccionado, se usa una combinación de al menos cuatro sondas de oligonucleótidos y dicha combinación de sondas se hibrida específicamente a todos los siguientes grupos de secuencias diana:

50 una secuencia diana mutante escogida de la región del gen pol RT del VHB,  
una secuencia diana mutante escogida de la región precore del VHB,  
una secuencia diana mutante escogida de la región HBsAg del VHB,  
una secuencia diana específica del genotipo del VHB.

De esta manera, un aspecto particularmente preferente de la divulgación incluye un conjunto de sondas expuestas anteriormente que comprende al menos una, preferentemente al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o más sondas para seleccionar como diana uno, preferentemente dos, tres o más cambios de nucleótidos que aparecen en la alineación de los genomas del VHB como se representa en la figura 1.

- 5 Incluso los conjuntos seleccionados más preferentes de sondas de acuerdo con la presente divulgación incluyen sondas procedentes de las mismas o diferentes regiones del VHB que portan nucleótidos mutados del VHB, o, además, también un tercer conjunto de sondas que caracterizan la presencia de una tercera mutación del VHB en cualquiera de las posiciones mostradas en la figura 1, o combinaciones particulares de las mismas.

- 10 También es particularmente preferente un conjunto de sondas que permita la detección simultánea de mutaciones del VHB en los codones 15, 28 y 29 en la región precore, posiblemente en combinación con mutaciones en las regiones de promotor de precore, en combinación con mutaciones en los codones 122, 126, 141, 143, 144, 145 en la región HBsAg, posiblemente también en combinación con mutaciones en el gen pol del VHB en los codones 514, 521, 525, 528, 552 o 555.

- 15 En los casos en los que se hace referencia a la alineación de los genomas del VHB de la figura 1 en la presente invención, se debe interpretar como que hace referencia a una alineación de todos los genomas del VHB existentes y futuros. Se pueden deducir las secuencias del genoma del VHB existente a partir de cualquier base de datos, tal como la base de datos EMBL/NCBI/DDBJ/GENBANK.

Un conjunto preferente de sondas del gen pol RT, HBsAg, preS1 y precore de la presente divulgación son las sondas con SEQ ID NO 1 a 278 de la tabla 1 (véase también la figura 1).

- 20 Los conjuntos particularmente preferentes de sondas en este sentido se muestran en la figura 2 y en la figura 4. Las sondas en la figura 2 y en la figura 4 se retuvieron después de una primera selección de sondas pol RT, HBsAg, preS1 y precore.

- 25 Las sondas de la divulgación están diseñadas para obtener un rendimiento óptimo en las mismas condiciones de hibridación de modo que se puedan usar en conjuntos de al menos 2 sondas para la hibridación simultánea. Esto incrementa altamente la utilidad de estas sondas y da como resultado una ganancia significativa en tiempo y esfuerzo. Evidentemente, si se prefieren otras condiciones de hibridación, se deben adaptar, por consiguiente, todas las sondas añadiendo o eliminando un número de nucleótidos en sus extremos. Se debe entender que estas adaptaciones concomitantes deben provocar fundamentalmente el mismo resultado, en concreto, que las sondas respectivas todavía se hibriden específicamente con la diana definida. También pueden ser necesarias dichas adaptaciones si el material amplificado es ARN en la naturaleza y no ADN como en el caso del sistema de NASBA.
- 30

- La selección de las sondas preferentes de la presente divulgación se basa en un formato de ensayo de hibridación inversa que usa sondas de oligonucleótidos inmovilizadas presentes en distintas localizaciones sobre un soporte sólido. Más particularmente, la selección de sondas preferentes de la presente divulgación se basa en el uso del principio del ensayo con sondas en línea (LiPA) que es un ensayo de hibridación inversa que usa sondas de oligonucleótidos inmovilizadas como líneas paralelas sobre una tira de soporte sólido (Stuyver *et al.* 1993; solicitud internacional WO 94/12670). Este enfoque es particularmente ventajoso, puesto que es rápido y simple de realizar. El formato de hibridación inversa y, más particularmente, el enfoque del LiPA tiene muchas ventajas prácticas en comparación con otras técnicas de ADN o formatos de hibridación, especialmente cuando el uso de una combinación de sondas es preferente o inevitable para obtener la información pertinente buscada.
- 35

- 40 Sin embargo, se ha de entender que cualquier otro tipo de formato o ensayo de hibridación que use cualquiera de las sondas seleccionadas, como se describe adicionalmente en la divulgación, también está abarcado por la presente divulgación.

El enfoque de hibridación inversa supone que las sondas se inmovilicen con respecto a determinadas localizaciones sobre un soporte sólido y que el ADN diana se marque a fin de posibilitar la detección de los híbridos formados.

- 45 Las siguientes definiciones sirven para ilustrar los términos y expresiones usados en la presente invención.

El término "análisis genético" se refiere al estudio de la secuencia de nucleótidos del genoma del VHB mediante cualquier técnica apropiada.

El término "mutante del VHB" se refiere a cualquier cepa del VHB que albergue variaciones genómicas con consecuencias clínicas, genéticas o serológicas.

- 50 El término "mutante de escape vacunal" se revisa en la sección de introducción y en el ejemplo 7. La región más importante se encuentra entre los aminoácidos 124 y 147 de la región HBsAg, pero se puede extender desde el aminoácido 114 al 150. El término "mutante resistente a fármacos, tales como lamivudina y penciclovir" se revisa en la sección de introducción y en el ejemplo 8.

El término "genotipo del VHB" se refiere a las cepas del VHB con una variación intergenotípica de un 8 % o más en base a una comparación de genomas completos.

5 El material diana en las muestras que se van a analizar puede ser bien ADN o ARN, por ejemplo, ADN genómico, ARN mensajero, ARN vírico o versiones amplificadas de los mismos. Estas moléculas también se denominan ácidos polinucleicos.

Es posible usar moléculas de ADN o ARN genómico de muestras susceptibles de contener VHB en los procedimientos de acuerdo con la presente invención.

10 Están disponibles procedimientos de extracción y purificación bien conocidos para el aislamiento de ARN o ADN de una muestra (por ejemplo, en Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.º edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)).

El término "sonda" se refiere a oligonucleótidos específicos de secuencia monocatenarios que tienen una secuencia que es complementaria a la secuencia diana que se va a detectar.

15 El término "secuencia diana", como se hace referencia en la presente invención, describe la secuencia de nucleótidos de una parte de la secuencia gen del VHB mutante, polimórfica o mutante que se va a detectar específicamente mediante una sonda de acuerdo con la presente invención. La secuencia polimórfica puede englobar uno o más nucleótidos polimórficos; la secuencia mutante puede englobar uno o más nucleótidos que son diferentes de la secuencia natural. Se ha de entender que el término "secuencia diana mutante" no abarca únicamente la secuencia que contiene una mutación, sino también la secuencia natural correspondiente. Las secuencias diana generalmente se pueden referir a posiciones de nucleótidos individuales, posiciones de codones, nucleótidos que codifican aminoácidos o a secuencias que integran cualquiera de las posiciones anteriores. En la presente invención, dicha secuencia diana a menudo incluye una, dos o más posiciones de nucleótidos variables. En la presente invención, los ácidos polinucleicos detectados mediante las sondas de la invención comprenden la secuencia diana frente a la que se detecta la sonda.

25 Se ha de entender que el complemento de dicha secuencia diana también es una secuencia diana adecuada en algunos casos. Las secuencias diana como se definen en la presente invención proporcionan secuencias que al menos deben ser complementarias a la parte central de la sonda que está diseñada para hibridarse específicamente a dicha región diana. En la mayoría de los casos, la secuencia diana es completamente complementaria a la secuencia de la sonda.

30 El término "complementario(a/os/as)" como se usa en el presente documento quiere decir que la secuencia de la sonda monocatenaria es exactamente el complemento (inverso) de la secuencia de la diana monocatenaria, estando definida adicionalmente la diana como la secuencia donde se localiza la mutación que se va a detectar.

35 Puesto que la aplicación actual requiere la detección de desemparejamientos de pares de bases individuales, se requieren condiciones restrictivas para la hibridación, permitiendo, en principio, únicamente la hibridación de secuencias exactamente complementarias. Sin embargo, son posibles variaciones en la longitud de las sondas (véase a continuación). También se debe advertir que, puesto que la parte central de la sonda es fundamental para sus características de hibridación, se pueden permitir posibles desviaciones de la secuencia de sonda frente a la secuencia diana hacia la cabeza y cola de la sonda cuando se usan secuencias de la sonda más largas. Estas variaciones, que se pueden concebir a partir del conocimiento común en la técnica, sin embargo, siempre se deben evaluar experimentalmente a fin de comprobar si dan como resultado características de hibridación equivalentes que las sondas exactamente complementarias.

45 Preferentemente, las sondas de la divulgación son aproximadamente de 5 a 50 nucleótidos de longitud, más preferentemente aproximadamente de 10 a 25 nucleótidos. Las longitudes preferentes de las sondas incluyen 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos. Los nucleótidos usados en la presente divulgación pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados, tales como inosina o nucleótidos que contienen grupos modificados que no alteran fundamentalmente sus características de hibridación.

Las secuencias de la sonda se representan a lo largo de la memoria descriptiva como oligonucleótidos de ADN monocatenario desde el extremo 5' al 3'. Es obvio para el experto en la técnica que se pueden usar cualquiera de las sondas especificadas a continuación como tales, o en su forma complementaria, o en su forma de ARN (en la que T se reemplaza por U).

50 Las sondas de acuerdo con la invención se pueden preparar clonando plásmidos recombinantes que contienen insertos que incluyen las secuencias de nucleótidos correspondientes, si es necesario escindiendo los últimos de los plásmidos clonados tras usar las nucleasas adecuadas y recuperándolos, por ejemplo, mediante fraccionamiento de acuerdo con el peso molecular. Las sondas de acuerdo con la presente invención también se pueden sintetizar químicamente, por ejemplo, mediante el procedimiento de fosfotriester convencional.

55 El término "soporte sólido" se puede referir a cualquier sustrato al que se puede acoplar una sonda de oligonucleótidos, con tal de que retenga sus características de hibridación y con tal de que el nivel de fondo de



- 5 hibridación se mantenga bajo. Habitualmente, el sustrato sólido es una placa de microvaloración, una membrana (por ejemplo, nailon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla) o un chip. Antes de la aplicación a la membrana o fijación puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico a fin de facilitar la fijación o mejorar la eficiencia de la hibridación. Dichas modificaciones pueden englobar prolongación con homopolímeros, acoplamiento con diferentes grupos reactivos, tales como grupos alifáticos, grupos NH<sub>2</sub>, grupos SH, grupos carboxílicos, o acoplamiento con biotina, haptenos o proteínas.
- 10 El término "marcado" se refiere al uso de ácidos nucleicos marcados. El marcaje se puede llevar a cabo mediante el uso de nucleótidos marcados incorporados durante la etapa de la polimerasa de la amplificación, tal como se ilustra por Saiki *et al.* (1988) o Bej *et al.* (1990) o cebadores marcados, o por cualquier otro procedimiento conocido por la persona experta en la técnica. La naturaleza del marcador puede ser isotópica (<sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, etc.) o no isotópica (biotina, digoxigenina, etc.).
- 15 El término "cebador" se refiere a una secuencia de oligonucleótidos monocatenarios que puede actuar como punto de inicio para la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a la cadena de ácido nucleico que se va a copiar. La longitud y la secuencia del cebador deben ser tales que permitan cebar la síntesis de los productos de extensión. Preferentemente, el cebador es aproximadamente de 5 a 50 nucleótidos de largo. La longitud y secuencia específicas dependen de la complejidad de las dianas de ADN o ARN requeridas, así como de las condiciones de uso del cebador, tales como temperatura y fuerza iónica.
- 20 La expresión "par de cebadores adecuados" en la presente invención se refiere a un par de cebadores que permiten la amplificación de parte o todo el gen del VHB para el que se inmovilizan las sondas.
- El hecho de que los cebadores de amplificación no tengan que coincidir exactamente con la secuencia molde correspondiente para garantizar la amplificación apropiada está ampliamente documentado en la literatura (Kwok *et al.*, 1990).
- 25 El procedimiento de amplificación usado puede ser tanto la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki *et al.*, 1988), reacción en cadena de la ligasa (LCR; Landgren *et al.*, 1988; Wu & Wallace, 1989; Barany, 1991), amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA; Guatelli *et al.*, 1990; Compton, 1991), sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS; Kwok *et al.*, 1989), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA; Duck, 1990; Walker *et al.*, 1992) o amplificación por medio de replicasa Q $\beta$  (Lizardi *et al.*, 1988; Lomeli *et al.*, 1989) o cualquier otro procedimiento adecuado para amplificar moléculas de ácido nucleico conocido en la técnica.
- 30 Los oligonucleótidos usados como cebadores o sondas también pueden comprender análogos de nucleótidos, tales como fosforotiatos (Matsukura *et al.*, 1987), alquifosforotiatos (Miller *et al.*, 1979) o ácidos peptidonucleicos (Nielsen *et al.*, 1991; Nielsen *et al.*, 1993) o pueden contener agentes de intercalación (Asseline *et al.*, 1984).
- 35 Como la mayoría de las demás variaciones o modificaciones introducidas en las secuencias de ADN originales de la divulgación, estas variaciones necesitan adaptaciones con respecto a las condiciones en las que el oligonucleótido se debe usar para obtener la especificidad y la sensibilidad requeridas. Sin embargo, los resultados definitivos de la hibridación son fundamentalmente los mismos que los obtenidos con los oligonucleótidos no modificados.
- La introducción de estas modificaciones puede ser ventajosa a fin de influir positivamente en características, tales como cinética de hibridación, reversibilidad de la formación de híbridos, estabilidad biológica de las moléculas de oligonucleótidos, etc.
- 40 La "muestra" puede ser cualquier material biológico tomado bien directamente a partir del ser humano infectado (o animal) o después del cultivo (enriquecimiento). El material biológico pueden ser, por ejemplo, esputos de cualquier clase, lavado bronquial, sangre, tejido cutáneo, biopsias, esperma, material de cultivo de linfocitos en sangre, colonias, cultivos líquidos, muestras de heces, orina, etc.
- 45 Los conjuntos de sondas de la presente divulgación incluyen, al menos, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más sondas. Dichas sondas se pueden aplicar en dos o más (posiblemente tantas como sondas hay) posiciones distintas y conocidas sobre un sustrato sólido. A menudo es preferente aplicar conjuntamente dos o más sondas en una y la misma posición de dicho soporte sólido.
- Para diseñar sondas con características deseadas, se pueden aplicar las siguientes directrices útiles conocidas por la persona experta en la técnica.
- 50 A causa de que la extensión y especificidad de las reacciones de hibridación, tales como las descritas en el presente documento, están afectadas por una serie de factores, la manipulación de uno o más de los factores determina la sensibilidad y especificidad exactas de una sonda particular, ya sea perfectamente complementaria a su diana o no. La importancia y efecto de varias condiciones de ensayo, explicados adicionalmente en el presente documento, son conocidas por los expertos en la técnica.
- 55 La estabilidad del híbrido de ácido nucleico [sonda: diana] se debe elegir para que sea compatible con las condiciones de ensayo. Esto se puede conseguir evitando largas secuencias ricas en AT, terminando los híbridos con pares de

bases G:C, y diseñando la sonda con una Tf apropiada. Los puntos de comienzo y fin de la sonda se deben elegir de modo que la longitud y el resultado del % de GC en una Tf de aproximadamente 2-10 °C más alta que la temperatura a la que se realiza el ensayo final. La composición base de la sonda es significativa a causa de que los pares de bases G-C presentan mayor estabilidad térmica en comparación con los pares de bases A-T debido los enlaces de hidrógeno adicionales. De esta manera, la hibridación que implica ácidos nucleicos complementarios de un contenido de GC más alto es estable a temperaturas más altas.

También se deben tener en cuenta las condiciones, tales como la fuerza iónica y la temperatura de incubación, en las que se usa una sonda cuando se diseña una sonda. Se sabe que la hibridación se incrementa a medida que se incrementa la fuerza iónica de la mezcla de reacción, y que la estabilidad térmica de los híbridos se incrementa con el incremento de la fuerza iónica. Por otro lado, los reactivos químicos, tales como formamida, urea, DMSO y alcoholes, que rompen los enlaces de hidrógeno, incrementan la restricción de la hibridación. La desestabilización de los enlaces de hidrógeno por dichos reactivos puede reducir en gran medida la Tf. En general, la hibridación óptima para sondas de oligonucleótidos sintéticos de aproximadamente 10-50 bases de longitud se produce aproximadamente a 5 °C por debajo de la temperatura de fusión para un dúplex dado. La incubación a temperaturas por debajo de la óptima puede permitir que se hibriden las secuencias de bases desparejadas y, por lo tanto, puedan dar como resultado una especificidad reducida.

Es deseable tener sondas que se hibriden únicamente en condiciones de alta restricción. En condiciones de alta restricción, únicamente se forman híbridos de ácidos nucleicos altamente complementarios; no se forman híbridos sin un grado suficiente de complementariedad. Por consiguiente, la restricción de las condiciones de ensayo determina la cantidad de complementariedad necesaria entre dos cadenas de ácido nucleico que forman un híbrido. El grado de restricción se elige de tal manera que se maximice la diferencia en estabilidad entre el híbrido formado con la diana y el ácido nucleico distinto de diana. En el presente caso, se necesitan detectar cambios en pares de bases individuales, lo que requiere condiciones de restricción muy alta.

También puede ser importante la longitud de la secuencia de ácido nucleico diana y, por consiguiente, la longitud de la secuencia de la sonda. En algunos casos, puede haber diversas secuencias de una región particular, que varían en localización y longitud, que producen sondas con las características de hibridación deseadas. En otros casos, una secuencia puede ser significativamente mejor que otra que solamente difiere en una única base. Mientras que es posible que se hibriden ácidos nucleicos que no son perfectamente complementarios, el tramo más largo de la secuencia de bases perfectamente complementarias normalmente determina primordialmente la estabilidad del híbrido. Aunque se pueden usar sondas de oligonucleótidos de diferentes longitudes y composición de bases, las sondas de oligonucleótidos preferentes de la presente invención son de entre aproximadamente 5 a 50 (más particularmente 10-25) bases de longitud y tienen un tramo suficiente en la secuencia que es perfectamente complementario a la secuencia de ácido nucleico diana.

Son menos preferentes las regiones en el ADN o ARN diana que se sabe que forman estructuras internas fuertes inhibitorias de la hibridación. Igualmente, se deben evitar las sondas con una extensa autocomplementariedad. Como se explica anteriormente, la hibridación es la asociación de dos cadenas individuales de ácidos nucleicos complementarios para formar una doble cadena unida por hidrógenos. Está implícito que si una de las dos cadenas está total o parcialmente implicada en un híbrido, puede participar menos en la formación de un nuevo híbrido. Puede haber híbridos intramoleculares e intermoleculares formados en las moléculas de un tipo de sonda si hay suficiente autocomplementariedad. Se pueden evitar dichas estructuras a través del diseño cuidadoso de la sonda. Al diseñar una sonda de modo que una porción sustancial de la secuencia de interés sea monocatenaria, se pueden incrementar en gran medida la velocidad y grado de la hibridación. Los programas informáticos están disponibles para buscar este tipo de interacción. Sin embargo, en determinados casos, puede no ser posible evitar este tipo de interacción.

Las condiciones de hibridación y lavado estándares se divulgan en la sección de materiales y procedimientos de los ejemplos. Por ejemplo, otras condiciones son 3X SSC (solución salina de citrato de sodio), FA (formamida) desionizada al 20 % a 50 °C.

También se pueden usar otras soluciones (SSPE (solución salina de fosfato de sodio EDTA), TMACI (cloruro de tetraetilamonio), etc.) y temperaturas con tal de que se mantenga la especificidad y sensibilidad de las sondas. Si es necesario, se tienen que llevar a cabo ligeras modificaciones de las sondas en longitud o en secuencia para mantener la especificidad y sensibilidad requeridas en las circunstancias dadas.

En un modo de realización más preferente, los ácidos polinucleicos mencionados anteriormente de la etapa (i) o (ii) se hibridan con al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más de las sondas específicas de la región diana, preferentemente con 5 o 6 sondas, que, tomadas conjuntamente, abarcan la "región de mutación" del gen del VHB pertinente.

El término "región de mutación" quiere decir la región en la secuencia del gen del VHB pertinente donde al menos una mutación que codifica un mutante del VHB está localizada en una parte preferente de esta región de mutación está representada en la figura 1.

Aparte de las regiones de mutación como se define anteriormente, los genomas mutantes o naturales del VHB también pueden mostrar variaciones de nucleótidos polimórficos en posiciones distintas a las que se hace referencia como posiciones variadas específicas mutantes o específicas genotípicas como se muestra en la figura 1.

5 Puesto que algunas mutaciones se pueden producir más frecuentemente que otras, por ejemplo, en determinadas áreas geográficas o en circunstancias específicas (por ejemplo, comunidades bastante cerradas) puede ser apropiado cribar únicamente mutaciones específicas, usando un conjunto seleccionado de sondas como se indica anteriormente. Esto daría como resultado una prueba más simple, que abarcaría las necesidades en determinadas circunstancias.

10 A fin de detectar genotipos del VHB y/o mutantes del VHB con el conjunto seleccionado de sondas de oligonucleótidos, se puede usar cualquier procedimiento de hibridación conocido en la técnica (inmunotransferencia por puntos convencional, transferencia Southern, sándwich, etc.).

Sin embargo, a fin de obtener resultados rápidos y fáciles, si está implicada una multitud de sondas, puede ser más conveniente un formato de hibridación inversa.

15 En un modo de realización preferente, el conjunto seleccionado de sondas se inmoviliza en un soporte sólido en distintas localizaciones conocidas (puntos, líneas u otras figuras). En otro modo de realización preferente, el conjunto seleccionado de sondas se inmoviliza en una tira de membrana en forma de líneas. Dichas sondas se pueden inmovilizar individualmente o como mezclas en las localizaciones delineadas en el soporte sólido.

Un modo de realización específico y muy fácil de usar del procedimiento preferente mencionado anteriormente es el procedimiento LiPA, donde se inmoviliza el conjunto de sondas mencionado anteriormente en líneas paralelas sobre una membrana, como se describe adicionalmente en los ejemplos.

20 La divulgación también proporciona un conjunto de cebadores que permiten la amplificación de la región del gen del VHB respectivo que se va a detectar por medio de sondas. Los ejemplos de dichos cebadores de la invención se dan en la tabla 1 y figura 1.

25 Los cebadores se pueden marcar con un marcador de elección (por ejemplo, biotina). Se pueden usar diferentes sistemas de amplificación de diana a base de cebadores, y, preferentemente, la amplificación por PCR, como se expone en los ejemplos. Se puede usar PCR anidada o de única tanda.

La divulgación también proporciona un kit para la detección y/o el análisis genético de los genotipos del VHB y/o mutantes del VHB presentes en una muestra biológica, que comprende los siguientes componentes:

- 30 (i) cuando sea apropiado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en dicha muestra;
- (ii) cuando sea apropiado, al menos un par de cebadores adecuados;
- (iii) al menos dos de las sondas como se define anteriormente, posiblemente fijadas a un soporte sólido;
- (iv) un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón;
- (v) una solución de lavado, o componentes necesarios para producir dicha solución;
- 35 (vi) cuando sea apropiado, un medio para detectar los híbridos resultantes de la hibridación precedente.
- (vii) cuando sea apropiado, un medio para unir dicha sonda a una localización conocida sobre soporte sólido.

El término "tampón de hibridación" quiere decir un tampón que posibilita que se produzca una reacción de hibridación entre las sondas y los ácidos polinucleicos presentes en la muestra, o los productos amplificados, en las condiciones de restricción apropiadas.

40 El término "solución de lavado" quiere decir una solución que posibilite el lavado de los híbridos formados en las condiciones de restricción apropiadas.

Como se ilustra en la sección de ejemplos, se diseñó un ensayo con sondas en línea (LiPA) para cribar genotipos del VHB y/o mutantes del VHB. El principio del ensayo se basa en la hibridación inversa de un fragmento de ácido polinucleico amplificado, tal como un fragmento de PCR biotinilado del gen del VHB en oligonucleótidos cortos. Entonces, se puede detectar el último híbrido a través de un acoplamiento biotina-estreptavidina con un sistema de desarrollo de color no radioactivo.

Los siguientes ejemplos sirven únicamente para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

### Figuras y leyendas de las tablas

50 Figura 1: alineación de 35 genomas del VHB completos. Las cepas aisladas que pertenecen al genotipo A son: HBVXCPS, HBVADW, HVHEPB, S50225, HPBADWZCG; genotipo B: HPBADW3, HPBADWZ, HPBADW1, HPBADW2; genotipo C: HPBCGADR, HBVADRM, HPBADRA, HPBCG, HEHBVAYR, HBVADR, HBVADR4, HPBADR1C, HPBADRC, HBVPREX, HPBETNC, HHVBC, HHVCCHA; genotipo D: HBVAYWMCG, HBVAYWC, HBVAYWCI, HBVAYWE, HBVDNA, HPBHBVAA, XXHEPAV, HBVORFS; genotipo E: HHVBE4, HHVBBAS; y genotipo F: HHBF, HH-VBFFOU, HBVADW4A. Para conservar la alineación, se crearon diversos huecos en la

alineación y se indican con /. Las posiciones de inicio y fin de los genes codificados por VHB diferentes se indican: HBsAg: antígeno de superficie de la hepatitis B (antígeno de superficie pequeño); HBx: proteína X de la hepatitis B; Pol de HB: proteína polimerasa de la hepatitis B, que codifica una proteína terminal, un espaciador, una región ADN polimerasa/RT, y una actividad ribonucleasa H; HBcAg: antígeno del core de la hepatitis B; HBpreS1Ag: antígeno preS1 de la hepatitis B (antígeno de superficie grande); HBpreS2Ag: antígeno preS2 de la hepatitis B (antígeno de superficie mediano). La posición de los cebadores de PCR se indica con un recuadro grande sobre todas las 35 secuencias. La polaridad del cebador de PCR se puede deducir a partir de la posición del nombre encima de estos recuadros: izquierda = cebador antisentido; derecha = cebador sentido. Las sondas del LiPA se indican con recuadros pequeños, los números de las sondas se indican junto a las sondas o a la derecha de la alineación, y se corresponden con los números de sondas en la tabla 1.

Figura 2: diseño con VHB de LiPA. Se detalla el contenido de una tira del LiPA para VHB. Para cada número de línea, se indica la región en el genoma vírico, conjuntamente con el genotipo que se detecta, el número de sonda que se corresponde con los recuadros de la alineación en la figura 1, y la secuencia de la sonda.

Figura 3: resultado combinado de la determinación del genotipo en la región preS1 y barrido en precore en 24 muestras. La interpretación de cada muestra se da debajo de cada tira. Las reactividades de sonda en las líneas 3 a 14 se obtienen a partir del fragmento de PCR preS1, las reactividades de sonda en las líneas 15 a 27 se deben al fragmento de PCR precore. Los genotipos están indicados desde A a F. La interpretación para la región precore es como sigue: W = natural; M = mutante; I = indeterminado, lo que quiere decir que no se observa reactividad, que se debe a mutaciones que todavía no se pudieron detectar con las sondas seleccionadas; mix = mezcla natural y mutante; la interpretación del codón 15 únicamente es pertinente para el genotipo A, la ausencia de reactividad en HBPr 45 para los genotipos B a F no es de utilidad como se indica con - (no aplicable). Puesto que la presencia o ausencia de mutaciones precore tiene efecto sobre el estado de HBeAg serológico, esto también se indica.

Figura 4: sondas usadas en LiPA para VHB. Se diseñaron sondas para genotipar en la región HBsAg y para la detección de mutaciones con resistencia a fármacos en el motivo YMDD (véase también la figura 5), así como para la detección de mutaciones en la región precore (véase también la figura 6).

Figura 5: ejemplo de un ensayo LiPA que combina genotipar VHB en la región HBsAg y la detección de mutaciones con resistencia a fármacos en el motivo YMDD. Los genotipos están indicados desde A a F. El diseño de la tira se muestra a la derecha, con los números de las sondas correspondientes a los números en la tabla 1 y en la figura 4.

Los genotipos y motivos mutantes a los que hibrida cada sonda están escritos en la parte externa derecha. La combinación de sondas reactivas permite la determinación de un genotipo único.

Figura 6: ejemplo de la determinación de mutaciones precore mediante la técnica LiPA. El diseño de la tira se muestra a la derecha, con los números de las sondas correspondientes a los números en la tabla 1. Las secuencias diana mutantes a las que que hibridan las sondas están indicadas en la parte externa derecha. El motivo M2 se corresponde a una mutación en el codón 28, M4 se corresponde a una mutación en el codón 29. M2/M4 tiene mutaciones tanto en 28 como 29.

Figura 7: detección de una mutación en el motivo YMDD de pol del VHB tras el tratamiento con lamivudina. El gráfico muestra una evolución temporal de la carga vírica durante el tratamiento con lamivudina. Se muestran a la derecha las tiras del LiPA, correspondientes a ensayos al comienzo del tratamiento (5/95), 10 meses de tratamiento (2/96) y 14 meses de tratamiento (6/96). El ensayo muestra que durante el tratamiento el motivo YMDD muta a YVDD.

Tabla 1: visión general de todos los cebadores y sondas a los que se hace referencia en las figuras con una indicación de sus respectivas SEQ ID NO y la región del genoma del VHB para la que están diseñados. Los cebadores de la región PreS1 incluyen 1, 106, 2 (cebadores sentido) y 4, 107 y 3 (cebadores antisentido). Los cebadores de la región HBsAg incluyen 75 y 104 (cebadores sentido) y 76, 94 y 105 (cebadores antisentido). Los cebadores de la región precore incluyen 5, 6, 69, 70, 84, 86, 87 y 108 (cebadores sentido) y 7, 8, 85 y 109 (cebadores antisentido). Los oligonucleótidos restantes son sondas de las regiones del gen pol RT, HBsAg, PreS1 y precore del VHB como se indica. El motivo YMDDV y sus mutantes consisten en los aminoácidos 551 a 555 de la proteína pol RT; la secuencia MGVGL y su mutante consisten en los aminoácidos 519 a 523 de la proteína pol RT; la secuencia SPFLL y sus mutantes y variantes genotípicas consisten en los aminoácidos 524 a 528 de la proteína pol RT.

Tabla 1: diseño de cebadores y sondas del HBV

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO	Región
HBPr1	GGGTCACCATATTCTTGGG	1	cebador sentido de preS1
HBPr2	GAACAAGAGCTACAGCATGGG	2	cebador sentido de preS1
HBPr3	CCACTGCATGGCCTGAGGATG	3	cebador antisentido de preS1

ES 2 574 252 T3

Nombre	Secuencia	SEQ Región ID NO
HBPr4	G TTCCT/GGAACTGGAGCCACCAG	4 cebador antisentido de preS1
HBPr5	TCTTTGTATTAGGAGGCTGTAG	5 cebador sentido de precore
HBPr6	GCTGTAGGCATAAATTGGTCTG	6 cebador sentido de precore
HBPr7	CTCCACAGT/AAGCTCCAAATTC	7 cebador antisentido de precore
HBPr8	GAAGGAAAGAAGTCAGAAGGC	
HBPr9	TGGCTTTGGGGCATGG	8 cebador antisentido de precore
HBPr10	TGGCTTTAGGGCATGG	9 precore
HBPr11	TGGCTTTAGGACATGG	10 precore
HBPr12	AAGTTGCATGGTGCTG	11 precore
HBPr13	CACCTCTGCCTAATCAT	12 precore
HBPr14	TGGGGTGGAGCCCTCAG	13 precore
HBPr15	GCCAGCAGCCAACCAG	14 preS1
HBPr16	CCCATGGGGGACTGT	15 preS1
HBPr17	AACCCCAACAAGGATG	16 preS1
HBPr18	TCCACCAGCAATCCT	17 preS1
HBPr19	TGGGGGAAGAATATTT	18 preS1
HBPr20	AAATTCCAGCAGTCCC	19 preS1
HBPr21	GTTCCCAACCCTCTGG	20 preS1
HBPr22	AACCTCGCAAAGGCAT	21 preS1
HBPr23	TGCATTCAAAGCCAAC	22 preS1
HBPr24	TACTCACAACCTGTGCC	23 preS1
HBPr25	ACCCTGCGTTCGGAGC	24 preS1
HBPr26	CAGGAAGACAGCCTAC	25 preS1
HBPr27	GATCCAGCCTTCAGAG	26 preS1
HBPr28	ATGCTCCAGCTCCTAC	27 preS1
HBPr29	GCTTTCTTGGACGGTC	28 preS1
HBPr30	CTACCCCAATCACTCC	29 preS1
HBPr31	AGCACCTCTCTCAACG	30 preS1
HBPr32	CCAATGGCAAACAAGG	31 preS1
HBPr33	CTGAGGGCTCCACCCCA	32 preS1
HBPr34	ATGCAACTTTTTACC	33 preS1
HBPr35	ATCTCTTGACATGTC	34 precore
HBPr36	ATCTCATGTTGATGTC	35 precore
HBPr37	CAGTGGGACATGTACA	36 precore
HBPr38	CAGTAGGACATGAACA	37 precore
HBPr39	CTGTTCAAGCCTCCAA	38 precore
HBPr40	AGCCTCCAAGCTGTGC	39 precore
HBPr41	AAAGCCACCCAAGGCA	40 precore
HBPr42	TGGCTTTAGGACATGGA	41 precore
HBPr43	GACATGTACAAGAGATGA	42 precore
HBPr44	GACATGAACATGAGATGA	43 precore
HBPr45	TGTACATGTCCCCTGTT	44 precore
HBPr46	TGTTGATGTCCACTGTT	45 precore
HBPr47	ACTGTTCAAGCCTCCAAG	46 precore
HBPr48	GGCACAGGCTTGGAGGCTT	47 precore
HBPr49	AAAGCCACCCAAGGCACA	48 precore
HBPr50	CCCAGAGGGTTGGGAAC	49 precore
HBPr51	CAGCATGGGGCAGAATCT	50 preS1
		51 preS1

ES 2 574 252 T3

Nombre	Secuencia	SEQ Región ID NO
HBPr52	TCCACCAGCAATCCTCTG	52 preS1
HBPr53	GGATCCAGCCTTCAGAGC	53 preS1
HBPr54	TCAGGAAGACAGCCTAC	54 preS1
HBPr55	TTCAACCCCAACAAGGATC	55 preS1
HBPr56	AATGCTCCAGCTCCTAC	56 preS1
HBPr57	CTGCATTCAAAGCCAACT	57 preS1
HBPr58	CCCCATGGGGGACTGTTG	58 preS1
HBPr59	CATACTCACAACCTGTGCCA	59 preS1
HBPr60	GGGCTTTCTTGGACGGTCC	60 preS1
HBPr61	CTCTCGAATGGGGGAAGA	61 preS1
HBPr62	CCTACCCCAATCACTCCA	62 preS1
HBPr63	AGCACCTCTCTCAACGACA	63 preS1
HBPr64	GCAAATTCAGCAGTCCCG	64 preS1
HBPr65	GCCAATGGCAAACAAGGTA	65 preS1
HBPr66	GACATGAACATGAGATG	66 precore
HBPr67	GGACATGAACAAGAGAT	67 precore
HBPr68	GACATGTACAAGAGATG	68 precore
HBPr69	ACATAAGAGGACTCTTGGAC	69 cebador sentido de precore
HBPr70	TACTTCAAAGACTGTGTGTTTA	70 cebador sentido de precore
HBPr71	ACAAAGACCTTTAAC/TCT	71 promotor de precore
HBPr72	ACAAAGATCATTAAC/TCT	72 promotor de precore
HBPr73	TTCCACCAGCAATCCTC	73 preS1
HBPr74	GATCCAGCCTTCAGAGC	74 preS1
HBPr75	CAAGGTATGTTGCCGTTTGTCC	75 cebador sentido de HBsAg
HBPr76	CCAAACAGTGGGGGAAAGCCC	76 cebador antisentido de HBsAg
HBPr77	CTACGGATGGAAATTGC	77 codón 145 natural de HBsAg
HBPr78	TACGGACGGAAACTGC	78 codón 145 natural de HBsAg
HBPr79	TTCGGACGGAAACTGC	79 codón 145 natural de HBsAg
HBPr80	CTTCGGACGGAAATTGC	80 codón 145 natural de HBsAg
HBPr81	CTACGGATAGAAATTGC	81 codón 145 mutante de HBsAg
HBPr82	CTTCGGACAGAAATTGC	82 codón 145 mutante de HBsAg
HBPr83	CTATGGGAGTGGGCCTCAGT/CC	83 Pol de HB
HBPr84	GCTGTAGGCATAAATTGGTCTG	84 cebador sentido de precore
HBPr85	CTCCACAGT/AAGCTCCAAATTC	85 cebador antisentido de precore
HBPr86	ACATAAGAGGACTCTTGGAC	86 cebador sentido de precore
HBPr87	TACTTCAAAGACTGTGTGTTTA	87 cebador sentido de precore
HBPr88	TAGGTTAAAGGTCTTTGT	88 promotor de precore
HBPr89	TAGGTTAATGATCTTTGT	89 promotor de precore
HBPr90	CATGTCCCCTGTTCAA	90 precore
HBPr91	CATGTCCCTACTGTTCAA	91 precore
HBPr92	TTCTGCCCCATGCTGTA	92 preS1
HBPr93	TTCTGCCCCATGCTGTAG	93 preS1
HBPr94	GGTAA/TAAAGGGACTCAC/AGATG	94 cebador antisentido de HBsAg
HBPr95	TCAGCTATATGGATGAT	95 Pol de HB
HBPr96	CAGCTATATGGATGAT	96 Pol de HB
HBPr97	TTCAGCTATATGGATG	97 Pol de HB

ES 2 574 252 T3

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO	Región
HBPr98	TCAGTTATATGGATGAT	98	Pol de HB
HBPr99	TTTCAGTTATATGGATG	99	Pol de HB
HBPr100	TTTAGTTATATGGATGA	100	Pol de HB
HBPr101	TCAGCTATGTGGATGAT	101	Pol de HB
HBPr102	TCAGTTATGTGGATGAT	102	Pol de HB
HBPr103	TTTCAGCTATGTGGATG	103	Pol de HB
HBPr104	CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCC	104	cebador sentido de HBsAg
HBPr105	GGT/CAA/TAAAGGGACTCAC/AGATG	105	cebador antisentido de HBsAg
HBPr106	GGGTCACCATATTCTTGGG	106	cebador sentido de preS1
HBPr107	GTTCCCT/GGAACTGGAGCCACCAG	107	cebador antisentido de preS1
HBPr108	CCGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTTACCTCTGCCTAATC	108	cebador sentido de precore
HBPr109	CCGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGTCTGG	109	cebador antisentido de precore
HBPr110	CCTCTGCCGATCCATACTGCCGAAC	110	cebador sentido de preX
HBPr111	CTGCGAGGCGAGGGAGTTCTTCTTC	111	cebador antisentido de core de HB
HBPr112	TGCCATTTGTTTCAGTGGTTCGTAGGGC	112	cebador sentido de HBsAg
HBPr113	CCGGCAGATGAGAAGGCACAGACGG	113	cebador antisentido de HBX
HBPr114	TTCAGCTATATGGATGAT	114	motivo YMDD
HBPr115	TCAGCTATATGGATGATG	115	motivo YMDD
HBPr116	TTCAGCTATGTGGATGAT	116	motivo YMDD
HBPr117	TCAGCTATGTGGATGATG	117	motivo YMDD
HBPr118	GGCTTTGGGGCATGG	118	codón 28 natural de precore
HBPr119	TGGCTTTGGGGCATG	119	codón 28 natural de precore
HBPr120	GTGGCTTTGGGGCATG	120	codón 28 natural de precore
HBPr121	GGCTTTGGGGCATGGA	121	codón 28 natural de precore
HBPr22	TGGCTTTGGGACATGG	122	codón 29 mutante, codón 28 natural de precore
HBPr123	GGCTTTGGGACATGG	123	codón 29 mutante, codón 28 natural de precore
HBPr124	TGGCTTTGGGACATG	124	codón 29 mutante, codón 28 natural de precore
HBPr125	GTGGCTTTGGGACATG	125	codón 29 mutante, codón 28 natural de precore
HBPr126	GGCTTTGGGACATGGA	126	codón 29 mutante, codón 28 natural de precore
HBPr127	TCAGTTATATGGATGATG	127	codón 29 mutante, codón 28 natural de precore
HBPr128	TTCAGTTATATGGATGAT	128	YMDD genotipo D, natural
HBPr129	TTTCAGTTATATGGATGAT	129	YMDD genotipo D, natural
HBPr130	TCAGTTATGTGGATGATG	130	YMDD genotipo D, mutante
HBPr131	TTCAGTTATGTGGATGAT	131	YMDD genotipo D, mutante
HBPr132	TTTCAGTTATGTGGATGAT	132	YMDD genotipo D, mutante
HBPr133	TTTCAGTTATGTGGATGA	133	YMDD genotipo D, mutante
HBPr134	TGCTGCTATGCCTCATCTTC	134	cebador sentido de HBsAg externo
HBPr135	CA(G/ATAGACAAAAGAAAATTGG	135	cebador antisentido de HBsAg

ES 2 574 252 T3

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO	Región
HBPr136	CTATGGATGGAAATTGC	136	codón 143 mutante de HBsAg
HBPr137	CCTATGGATGGAAATTG	137	codón 143 mutante de HBsAg
HBPr138	ACCTATGGATGGAAATT		
HBPr139	CT CAA GGC AAC TCT ATG TGG	138	codón 143 mutante de HBsAg
HBPr140	CT CAA GGC AAC TCT ATG GG	139	HBsAg, genotipo A
HBPr141	T CAA GGC AAC TCT ATG TTG	140	HBsAg, genotipo A
HBPr142	ATC CCA TCA TCT TGG G	141	HBsAg, genotipo A
HBPr143	ATC CCA TCA TCT TGG GCG G	142	HBsAg, genotipo B
HBPr144	TC CCA TCA TCT TGG GCG G	143	HBsAg, genotipo B
HBPr145	C CCA TCA TCT TGG GCT GG	144	HBsAg, genotipo B
HBPr146	TTC GCA AAA TAC CTA TGG	145	HBsAg, genotipo B
HBPr147	T TTC GCA AAA TAC CTA TG	146	HBsAg, genotipo B
HBPr148	CT TTC GCA AAA TAC CTA TG	147	HBsAg, genotipo B
HBPr149	TC GCA AAA TAC CTA TGG G	148	HBsAg, genotipo B
HBPr150	T CTA CTT CCA GGA ACA T	149	HBsAg, genotipo B
HBPr151	T CTA CTT CCA GGA ACA TC	150	HBsAg, genotipo C
HBPr152	CT CTA CTT CCA GGA ACA T	151	HBsAg, genotipo C
HBPr153	CT CTA CTT CCA GGA ACA G	152	HBsAg, genotipo C
HBPr154	C TGC ACG ATT CCT GCT	153	HBsAg, genotipo C
HBPr155	TGC ACG ATT CCT GCT CA	154	HBsAg, genotipo C
HBPr156	C TGC ACG ATT CCT GCT C	155	HBsAg, genotipo C
HBPr157	TGC ACG ATT CCT GCT CAA	156	HBsAg, genotipo C
HBPr158	TTC GCA AGA TTC CTA TG	157	HBeAg, genotipo C
HBPr159	CT TTC GCA AGA TTC CTA T	158	HBeAg, genotipo C
HBPr160	CT TTC GCA AGA TTC CTA	159	HBsAg, genotipo C
HBPr161	CT TTC GCA AGA TTC CTA TG	160	HBsAg, genotipo C
HBPr162	C TCT ATG TAT CCC TCC T	161	HBsAg, genotipo C
HBPr163	TCT ATG TAT CCC TCC TG	162	HBsAg, genotipo D
HBPr164	C TCT ATG TAT CCC TCC TGG	163	HBsAg, genotipo D
HBPr165	CC TCT ATG TAT CCC TCC T	164	HBsAg, genotipo D
HBPr166	C TGT ACC AAA CCT TCG G	165	HBsAg, genotipo D
HBPr167	C TGT ACC AAA CCT TCG	166	HBsAg, genotipo D
HBPr168	GC TGT ACC AAA CCT TCG G	167	HBsAg, genotipo D
HBPr169	TGT ACC AAA CCT TCG GAG	168	HBsAg, genotipo D
HBPr170	GGA CCC TGC CGA ACC T	169	HBsAg, genotipo D
HBPr171	GGA CCC TGC CGA ACC G	170	HBsAg, genotipo E
HBPr172	G GGA CCC TGC CGA AC	171	HBsAg, genotipo E
HBPr173	GGA CCC TGC CGA AC	172	HBsAg, genotipo E
HBPr174	GT TGC TGT TCA AAA CCT T	173	HBsAg, genotipo E
HBPr175	GT TGC TGT TCA AAA CCT G	174	HBsAg, genotipo E
HBPr176	TGT TGC TGT TCA AAA CCT G	175	HBsAg, genotipo E
HBPr177	A TGT TGC TGT TCA AAA CCT G	176	HBsAg, genotipo E
HBPr178	GA TCC ACG ACC ACC A	177	HBsAg, genotipo E
HBPr179	GGA TCC ACG ACC ACC A	178	HBsAg, genotipo F
HBPr180	GGA TCC ACG ACC ACC	179	HBsAg, genotipo F
HBPr181	GA TCC ACG ACC ACC AGG	180	HBsAg, genotipo F
HBPr182	TGT TCC AAA CCC TCG G	181	HBsAg, genotipo F
		182	HBsAg, genotipo F



ES 2 574 252 T3

Nombre	Secuencia	SEQ Región ID NO
HBPr183	C TGT TCC AAA CCC TCG	183 HBsAg, genotipo F
HBPr184	C TGT TCC AAA CCC TCG G	184 HBsAg, genotipo F
HBPr185	GT TCC AAA CCC TCG GAT	185 HBsAg, genotipo F
HBPr186	G CCA AAT CTG TGC AGC	186 HBsAg, genotipo F
HBPr187	CCA AAT CTG TGC AGC AT	187 HBsAg, genotipo F
HBPr188	G CCA AAT CTG TGC AGC AG	188 HBsAg, genotipo F
HBPr189	GG CCA AAT CTG TGC AGC	189 HBsAg, genotipo F
HBPr190	A TCA ACA ACA ACC AGT A	190 HBsAg, genotipo A
HBPr191	GA TCA ACA ACA ACC AGT	191 HBsAg, genotipo A
HBPr192	GA TCA ACA ACA ACC AGT A	192 HBsAg, genotipo A
HBPr193	GGA TCA ACA ACA ACC AGT	193 HBsAg, genotipo A
HBPr194	T CAA GGC AAC TCT ATG TGG	194 HBsAg, genotipo A
HBPr195	AGG TTA AAG GTC TTT GT	195 promotor genotipo A natural
HBPr196	T AGG TTA AAG GTC TTT GG	196 promotor genotipo A natural
HBPr197	TT AGG TTA AAG GTC TTT	197 promotor genotipo A natural
HBPr198	GG TTA AAG GTC TTT GTA GG	198 promotor genotipo A natural
HBPr199	AGG TTA ATG ATC TTT GT	199 promotor genotipo A mutante
HBPr200	T AGG TTA ATG ATC TTT GG	200 promotor genotipo A mutante
HBPr201	CT TTC GCA AGA TTC CTA TGG	201 codón 160 en genotipo C de HBsAg
HBPr202	GCT TTC GCA AGA TTC CTA TG	202 codón 160 en genotipo C de HBsAg
HBPr203	GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG	203 codón 160 en genotipo C de HBsAg
HBPr204	CT TTC GCA AGA TTC CTA TGG G	204 codón 160 en genotipo C de HBsAg
HBPr205	GC TGT ACC AAA CCT TCG GAG	205 codón 140 en genotipo D de HBsAg
HBPr206	TGC TGT ACC AAA CCT TCG G	206 codón 140 en genotipo D de HBsAg
HBPr207	TGC TGT ACC AAA CCT TCG GAG	207 codón 140 en genotipo D de HBsAg
HBPr208	GC TGT ACC AAA CCT TCG GAT	208 codón 140 en genotipo D de HBsAg
HBPr209	TGG TTC GCC GGG GTT T	209 codón 184 en genotipo E de HBsAg
HBPr210	G TGG TTC GCC GGG CTT G	210 codón 184 en genotipo E de HBsAg
HBPr211	GG TTC GCC GGG CTT TC	211 codón 184 en genotipo E de HBsAg
HBPr212	TGG TTC GCC GGG CTT CT	212 codón 184 en genotipo E de HBsAg
HBPr213	AG TGG TTC GCC GGG CTG G	213 codón 184 en genotipo E de HBsAg
HBPr214	A GGA TCC ACG ACC ACC AGG	214 HBsAg genotipo F
HBPr215	A GGA TCC ACG ACC ACC AGT	215 HBsAg genotipo F
HBPr216	CA GGA TCC ACG ACC ACC AGG	216 HBsAg genotipo F

ES 2 574 252 T3

Nombre	Secuencia	SEQ Región ID NO
HBPr217	C TGT TCC AAA CCC TCG GAG	217 HBsAg genotipo F
HBPr218	C TGT TCC AAA CCC TCG GAT	218 HBsAg genotipo F
HBPr219	GC TGT TCC AAA CCC TCG GAG	219 HBsAg genotipo F
HBPr220	CTGAACCTTTACCCCGTTGC	220 cebador potenciador
HBPr221	CTCGCCAACCTTACAAGGCCTTTC	221 cebador potenciador
HBPr222	AGAATGGCTTGCCTGAGTGC	222 cebador antisentido de core
HBPr223	GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG G	223 codón 160 en genotipo C de HBsAg
HBPr224	G GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG	224 codón 160 en genotipo C de HBsAg
HBPr225	G GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG G	225 codón 160 en genotipo C de HBsAg
HBPr226	G GCT TTC GCA AGA TTC CTA TGG GA	226 codón 160 en genotipo C de HBsAg
HBPr227	C AGC TAT ATG GAT GAT GTG	227 motivo YMDDV
HBPr228	AGC TAT ATG GAT GAT GTG GG	228 motivo YMDDV
HBPr229	GC TAT ATG GAT GAT GTG GT	229 motivo YMDDV
HBPr230	AGC TAT ATG GAT GAT GTG GT	230 motivo YMDDV
HBPr231	C AGC TAT ATG GAT GAT ATA	231 MOTIVO YMDDI
HBPr232	AGC TAT ATG GAT GAT ATA GG	232 MOTIVO YMDDI
HBPr233	GC TAT ATG GAT GAT ATA GT	233 MOTIVO YMDDI
HBPr234	AGC TAT ATG GAT GAT ATA GT	234 MOTIVO YMDDI
HBPr235	CCA TCA TCT TGG GCT TG	235 CODÓN 155 EN GENOTIPO B DE HBSAg
HBPr236	CA TCA TCT TGG GCT TT	236 CODÓN 155 EN GENOTIPO B DE HBSAg
HBPr237	CCA TCA TCT TGG GCT TT	237 CODÓN 155 EN GENOTIPO B DE HBSAg
HBPr238	CCA TCA TCT TGG GCT TTC	238 CODÓN 155 EN GENOTIPO B DE HBsAg
HBPr239	CCC ACT GTC TGG CTT TC	239 HBSAg GENOTYPE B CODON 190
HBPr240	CC ACT GTC TGG CTT TC	240 CODÓN 190 EN GENOTIPO B DE HBSAg
HBPr241	CC ACT GTC TGG CTT T	241 CODÓN 190 EN GENOTIPO B DE HBSAg
HBPr242	CCC ACT GTC TGG CTT G	242 CODÓN 190 EN GENOTIPO B DE HBSAg
HBPr293	TAT ATG GAT GAT GTG GTA	243 MOTIVO YMDDV
HBPr244	TAT GTG GAT GAT GTG GTA	244 MOTIVO YVDDV
HBPr245	TAT ATA GAT GAT GTG GTA	245 MOTIVO YIDDV
HBPr246	TAT ATT GAT GAT GTG GTA	246 MOTIVO YIDDV
HBPr247	TAT GTA GAT GAT GTG GTA	247 MOTIVO YVDDV
HBPr248	TAT GTT GAT GAT GTG GTA	248 MOTIVO YVDDV
HBPr249	TAT ATG GAT GTA ATA GTA	249 MOTIVO YMDDI
HBPr250	TAT ATG GAT GAT ATC GTA	250 MOTIVO YMDDI
HBPr251	TAT GTG GAT GAT ATA GTA	251 MOTIVO YVDDI
HBPr252	TAT GTG GAT GAT ATC GTA	252 MOTIVO YVDDI

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO	Región
HBPr253	TAT ATA GAT GAT ATA GTA	253	MOTIVO YIDDI
HBPr254	TAT ATA GAT GAT ATC GTA	254	MOTIVO YIDDI
HBPr255	TAT ATT GAT GAT ATA GTA	255	MOTIVO YIDDI
HBPr256	TAT ATT GAT GAT ATC CTA	256	MOTIVO YIDDI
HBPr257	TAT GTA GAT GAT ATA GTA	257	MOTIVO YVDDI
HBPr258	TAT GTA GAT GAT ATC GTA	258	MOTIVO YVDDI
HBPr259	TAT GTT GAT GAT ATA GTA	259	MOTIVO YVDDI
HBPr260	TAT GTT GAT GAT ATC GTA	260	MOTIVO YVDDI
HBPr261	TAT ATG GAT GAT CTG GTA	261	MOTIVO YMDDL
HBPr262	TAT GTG GAT GAT CTG GTA	262	MOTIVO YVDDL
HBPr263	TAT ATA GAT GAT CTG GTA	263	MOTIVO YIDDL
HBPr264	TAT ATT GAT GAT CTG GTA	264	MOTIVO YIDDL
HBPr265	TAT GTA GAT GAT CTG GTA	265	MOTIVO YVDDL
HBPr266	TAT GTT GAT GAT CTG GTA	266	MOTIVO YVDDL
HBPr267	T ATG GGA GTG GGC CTC AG	267	MGVGL
HBPr268	T ATG GGA TTG GGC CTC AG	268	MGLGL
HBPr269	C AGT CCG TTT CTC TTG GC	269	SPFLL

## Ejemplos

### **Ejemplo 1. Amplificación por PCR y reparación del ADN del VHB**

- 5 Se recogieron muestras de suero a partir de personas con HBsAg positivo y se almacenaron a menos 20 °C hasta su uso en alícuotas de 0,5 ml. Para preparar el genoma vírico, se mezcló 18 µl de suero con 2 µl de NaOH 1 N y se incubó a 37 °C durante 60 minutos. Se detuvo la desnaturalización y se neutralizó añadiendo 20 µl de HCl 0,1 N. Después de una etapa de centrifugación de 15 minutos, se recogió el sobrenadante y se desechó el sedimento. Se llevó a cabo PCR en este lisado como sigue: se mezcló 32 µl H<sub>2</sub>O con 5 µl de 10x tampón de PCR, 1 µl de dXTPs 10 mM, 1 µl de cada cebador biotinilado (10 pmol/µl), 10 µl de lisado de suero y 2 U de enzima Taq. El esquema de amplificación contenía 40 ciclos de 95 °C de 1 min, hibridación a 45 °C durante 1 min, y extensión a 72 °C durante 1 min. Los productos de amplificación se visualizaron sobre gel de agarosa al 3 %.

El cebador externo establecido para preS1 tiene la siguiente secuencia:

sentido externo: HBPr 1: 5'-bio-GGGTCACCATATTCTTGGG-3'

- 15 antisentido externo: HBPr 4: 5'-bio-GTTCC(T/G)GAACTGGAGCCACCAG-3'

El cebador externo establecido para precore tiene la siguiente secuencia:

sentido externo: HBPr 69: 5'-bio-ACATAAGAGGACTCTTGGAC-3'

antisentido externo: HBPr 8: 5'-bio-GAAGGAAAGAAGTCAGAAGGC-3'

El cebador externo establecido para HBsAg tiene la siguiente secuencia:

- 20 sentido externo: HBPr 134: 5'-bio-TGCTGCTATGCCTCATCTTC-3'

antisentido externo: HBPr 135: 5'-bio-CA(G/A)AGACAAAAGAAAATTGG-3'.

- 25 Las muestras que fueron negativas en la PCR de la primera tanda se volvieron a someter a prueba en una reacción anidada compuesta de lo siguiente: µl H<sub>2</sub>O, 5 µl de 10x tampón Taq, 1 µl de dXTPs 10 mM, 1 µl de cada cebador anidado (10 pmol/µl), 1 µl del producto de PCR de la primera tanda y 2 U de Taq polimerasa. El esquema de amplificación fue idéntico que para la PCR de primera tanda. La secuencia de los cebadores anidados fue como sigue, para la región preS1:

sentido anidado HBPr 2: 5'-bio-GAACAAGAGCTACAGCATGGG-3'

antisentido anidado HBPr 3: 5'-bio-CCACTGCATGGCCTGAGGATG-3';

y para la región precore:

sentido anidado HBPr 70: 5'-bio-TACTTCAAAGACTGTGTGTTTA-3'

antisentido anidado HBPr 7: 5'-bio-CTCCACAG(T/A)AGCTCCAAATTC-3'

- 5 En una segunda reacción, se puede amplificar la región HBsAg en un protocolo similar usando los siguientes cebadores: HBPr 75: 5'-bio-CAAGGTATGTTGCCCGTTTGTCC-3' en combinación bien con HBPr 76: 5'-bio-CCAAACAGT-GGGGGAAAGCCC-3'; o con HBPr 94: 5'-bio-GGTA(A/T)AAAGGGACTCA(C/A)GATG-3'.

### **Ejemplo 2. Preparación de los ensayos con sondas en línea**

10 Se diseñaron sondas para abarcar los motivos mutantes, genotípicos y universales. En principio, únicamente se retuvieron sondas que discriminan entre una variación de nucleótidos individual. Sin embargo, para determinados polimorfismos en los extremos finales de la sonda, se toleraba reactividad cruzada. Se alcanzó experimentalmente la especificidad individualmente para cada sonda después de considerar el % (G+C), la longitud de la sonda, la concentración final y la temperatura de hibridación. Se proporcionaron enzimáticamente sondas optimizadas con una cola poli T usando la TdT (Pharmacia) en condiciones de reacción estándar. En resumen, se incubó 400 pmol de sonda a 37 °C en una mezcla de reacción de 30 µl que contenía dTTP 5,3 mM, Tris.HCl 25 mM a pH 7,5, cacodilato de sodio 0,1 M, CoCl<sub>2</sub> 1 mM, DTT 0,1 M y 170 U de desoxinucleotidiltransferasa terminal (Pharmacia). Después de una hora de incubación, se detuvo la reacción y las sondas con cola se precipitaron y se lavaron con etanol helado. Se disolvieron respectivamente las sondas en 6x SSC a sus concentraciones específicas y se aplicaron como líneas horizontales sobre tiras de membrana en concentraciones entre 0,2 y 2,5 pM/ml. Se aplicó ADN biotinilado junto con el control positivo (línea 1 del LiPA). Se fijaron los oligonucleótidos a la membrana horneado a 80 °C durante 12 horas. Entonces, la membrana se cortó en tiras de 4 mm. El diseño de esta tira se indica en la figura 2.

### **Ejemplo 3. Rendimiento de la prueba LiPA**

25 Se mezclaron volúmenes iguales (10 µl de cada uno) del fragmento de PCR biotinilado y de la solución de desnaturalización (DS; NaOH 400 mM/EDTA 10 mM) en cubetas de prueba y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Entonces, se añadió 2 ml de la solución de hibridación precalentada a 37 °C (HS, 3x SSC/SDS al 0,1 %), seguido de la adición de una tira por cubeta de prueba. Se produjo la hibridación durante 1 hora a 50±0,5 °C en un baño cerrado de agua con agitación. Las tiras se lavaron dos veces con 2 ml de solución de lavado restrictivo (3x SSC/SDS al 0,1 %) a temperatura ambiente durante 20 segundos, y una vez a 50 °C durante 30 minutos. Después de este lavado restrictivo, las tiras se aclararon dos veces con 2 ml de la solución de aclarado (RS) estándar de Innogenetics. Se incubaron las tiras en una plataforma giratoria con el conjugado estreptavidina marcada-fosfatasa alcalina, se diluyeron en solución de conjugado estándar durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 25 °C). Entonces, se lavaron dos veces las tiras con 2 ml de RS y una vez con tampón de sustrato (SB) estándar, y se inició la reacción de color añadiendo BCIP y NBT al SB. Después de 30 minutos como máximo a temperatura ambiente, se detuvo la reacción de color reemplazando los compuestos de color con agua destilada. Inmediatamente después del secado, se interpretaron las tiras. Se consideraron positivas las reactividades cuando la reactividad fue más fuerte que la reacción sobre el control negativo. Las tiras se pueden almacenar en un lugar seco y oscuro. También se puede reemplazar el procedimiento completo descrito anteriormente con el dispositivo de automatización de Inno-LiPA estandarizado (auto-LiPA).

### **Ejemplo 4. Selección de material de referencia**

40 Se prepararon fragmentos de PCR, derivados de los miembros de los diferentes genotipos, las diferentes secuencias mutantes y naturales de precore, motivos resistentes a fármacos y mutantes de escape vacunal. Se amplificaron los fragmentos de PCR con cebadores que carecían del grupo biotina en su extremo 5' y se clonaron en el sitio EcoRV pretratado del vector pGEMT (Promega). Se seleccionaron clones recombinantes después del análisis de longitud de fragmentos de restricción y complementación α, y se secuenciaron con cebadores de plásmidos. Se secuenciaron directamente otros fragmentos biotinilados con un protocolo de tinte terminador (Applied Biosystems) usando los cebadores de amplificación. De forma alternativa, se llevó a cabo PCR anidada con análogos de los cebadores, en los que el grupo biotina se reemplazó respectivamente con la secuencia de los cebadores T7 y SP6. Entonces, se secuenciaron estos amplicones con un procedimiento de tinte de cebador SP6 y T7. Haciéndolo así, se preparó un panel de referencia de clones recombinantes, que es necesario para la optimización de sondas del LiPA.

### **Ejemplo 5: Genotipado de muestras de suero infectadas con VHB**

Únicamente después de crear una alineación de secuencia como se muestra en la figura 1, fue evidente que las regiones podían ser útiles para genotipar VHB. La región preS1 parece ser adecuada a causa del alto grado de variabilidad. Por lo tanto, se diseñaron sondas para abarcar la mayoría de estas regiones variables como se muestra en la tabla 1. Únicamente se retuvo una selección limitada de sondas a causa de su reacción específica con el panel de

referencia. Las más importantes se indican como regiones de recuadro en la figura 1. Entonces, estas sondas seleccionadas se aplicaron en un formato del LiPA indicado en la figura 2, como número de línea 2 a 14. Algunas de las sondas se pudieron aplicar conjuntamente en una línea, a causa de su carácter universal, mientras que otras se necesitan aplicar por separado. Con la selección de sondas obtenida de esta manera, se sometieron a prueba las muestras de suero recogidas en diferentes partes del mundo (Europa, América del Sur, África, Oriente Medio). La parte superior de la figura 3 muestra la reactividad de una selección de muestras de estas sondas. El genotipado de estas muestras es sencillo, con las muestras 2 a 8, que pertenecen al genotipo A, las muestras 9 y 10, que pertenecen al genotipo B, las muestras 11 y 12, que pertenecen al genotipo C, las muestras 13 a 19, que pertenecen al genotipo D, las muestras 20 a 23, que pertenecen al genotipo E y la muestra 24, que pertenece al genotipo F.

También se puede realizar el genotipado en la región HBsAg. De nuevo, se diseñaron las sondas para abarcar la mayoría de las regiones variables mostradas en la fig. 1. Únicamente se retuvo una selección limitada de sondas. Estas sondas están encuadradas en la fig. 1 y están enumeradas en la figura 4. Se preparó una tira del LiPA que llevaba estas sondas y se caracterizaron muestras que pertenecían a los diferentes genotipos, como se muestra en la fig. 5.

### 15 **Ejemplo 6. Barrido de la región precore frente a mutaciones**

Se puede regular la expresión del HBeAg a nivel transcripcional y traduccional. Se ha postulado que existe una regulación transcripcional debida a la presencia de una variación de dinucleótidos en la región promotora del ARNm precore. Se seleccionaron las sondas que abarcan el motivo natural (por ejemplo, sonda HBPr 88) y el mutante (por ejemplo, HBPr 89) y sus posiciones se indican en la alineación mostrada en la figura 1, y se aplican sobre la tira del LiPA, como la línea 15 y 16 (figura 2). Al nivel traduccional, pueden surgir muchas más mutaciones, posiblemente todas dando como resultado la anulación de la expresión del HBeAg: cualquier mutación en el codón 1 (ATG) que destruye la iniciación de la traducción, codón 2 (CAA a TAA), codón 7 (TGC a TGA), codón 12 (TGT a TGA), codón 13 en el genotipo B, C, D, E, F (TCA a TGA o TAA), codón 14 (TGT a TGA), codón 18 (CAA a TAA), codón 21 (AAG a TAG), codón 23 (TGC a TGA), codón 26 (TGG a TAG o TGA), codón 28 (TGG a TAG o TGA). Sin embargo, debido a la restricción secundaria de la señal de encapsidación, la mayoría de las mutaciones se producen en el codón 28 (TGG a TAG). Junto con la mutación en el codón 28, a menudo se observa una segunda mutación en el codón 29 (GGC a GAC). En el caso del genotipo A y, de nuevo, como consecuencia de la restricción secundaria, únicamente es probable que se produzcan mutaciones de codones finalizadores en el codón 28 después de la selección de una mutación en el codón 15 (CCC a CCT). De ahí que la interpretación correcta de las mutaciones precore sea dependiente del genotipo. Además de los codones finalizadores mencionados anteriormente, una enorme cantidad de diferentes mutaciones por delección o inserción en el marco abierto de lectura precore pueden dar fundamentalmente el mismo resultado.

A fin de desarrollar un ensayo sensible para detectar las mutaciones pertinentes y las mutaciones hipotéticas, se desarrolló un procedimiento de barrido con sonda. Se diseñaron sondas parcialmente superpuestas y se aplicaron en un formato del LiPA (figura 2, línea 17 a 27). En este formato de ensayo, se reconocen positivamente las secuencias naturales sobre la región precore completa, conjuntamente con la variación del codón 15 para el genotipo A frente a los genotipos distintos de A, y las mutaciones más comunes en el codón 28 (TAG), en el codón 29 (GAC) y la combinación del codón 28 y 29 (TAGGAC). La ausencia de reactividad en una de las demás sondas siempre es indicativa de la presencia de una variación. Entonces se puede revelar la naturaleza exacta de esta variación mediante análisis de secuencias o con sondas del LiPA diseñadas adicionalmente.

La figura 3 muestra la reactividad de las muestras genotipadas seleccionadas sobre las sondas para la región precore. Se sometieron a prueba previamente las muestras para determinar la presencia de HBeAg o de anti-HBe. La interpretación de la reactividad sobre las sondas del LiPA para cada muestra se indica debajo de cada tira. Este enfoque permitió el cribado simultáneo de una muestra frente a mutaciones precore y la caracterización del genotipo vírico.

La figura 6 también muestra un panel de muestras con mutaciones en la región precore, así como muestras naturales. Las sondas usadas en este ensayo se enumeran en la figura 4. Este ensayo incluye un mutante en el codón 29 (motivo M4), que no estaba presente en el experimento en la figura 3.

### **Ejemplo 7. Detección de mutantes en la región HBeAg**

Se han descrito mutantes de escape vacunal. El mutante encontrado más comúnmente es la variación en el codón 145 de HBsAg (G145R o GGA a AGA). Las sondas del LiPA están diseñadas para detectar sondas naturales y mutantes. Las variaciones genotípicas están presentes en el entorno de codón 145. Por lo tanto, el genotipo A está abarcado por la sonda 77, el genotipo B por la sonda 78, el genotipo C por la sonda 79 y el genotipo D/E por la sonda 80. De ahí que, en principio, sea posible genotipar y detectar las cepas naturales del virus en un único experimento. Las secuencias diana mutantes están abarcadas por la sonda 81 y 82 para el genotipo A y D, respectivamente. Se puede usar la sonda 83 como control positivo en estos experimentos. La detección adicional de mutantes en la región determinante es posible por medio de un enfoque de barrido con sonda. Por lo tanto, se diseñan sondas para abarcar la secuencia natural de los diferentes genotipos sobre la región del epítipo de HBsAg y se aplican en un formato del LiPA. De nuevo aquí, la ausencia de tinción en una de estas sondas es indicativa de la presencia de una cepa mutante. Entonces, se determina la naturaleza exacta de esta variante mediante análisis de secuenciación.

**Ejemplo 8. Detección de cepas del VHB resistentes a lamivudina**

A través de la analogía con el VIH y la resistencia frente al compuesto antivírico 3TC (lamivudina o (-)-β-1-2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina), se predijo que tras el tratamiento de pacientes infectados con VHB con 3TC, se seleccionarían cepas víricas que mostrarían resistencia en el motivo YMDD en el gen pol de la HB. El motivo YMDD está localizado físicamente en la región HBsAg, pero se codifica en otro marco de lectura. De ahí que esta parte de la región pol del VHB se amplifique con la combinación de cebadores HBPr 74-HBr 94, pero no con la combinación HBPr 74-HBr 76. Las sondas que abarcan el motivo YMDD natural y el motivo YVDD mutante se indican en la figura 1, respectivamente las sondas 95 a 100 y 101 a 103, así como las sondas 115, 116, 127 y 132, produciendo las últimas sondas los mejores resultados en el ensayo LiPA. Se usó dicho ensayo para determinar la presencia de mutaciones en el motivo YMDD en el suero de un paciente infectado con el VHB durante el tratamiento con lamivudina. La fig. 7 muestra que en la primera fase del tratamiento (mayo de 1995) no se detectaron mutaciones. Durante el tratamiento, la carga vírica disminuyó, alcanzando un nivel de aproximadamente 10<sup>4</sup> durante noviembre y diciembre de 1995, después de lo que se observó una progresión, dando como resultado un nivel tan alto como durante los primeros meses del tratamiento en junio de 1996. De forma interesante, un ensayo LiPA realizado en febrero de 1996 indicó que la mayoría de virus presente poseía una mutación en el motivo YMDD, que había cambiado a YVDD. En junio de 1996, no se pudo detectar ningún motivo natural, sino únicamente YVDD mutante. Con este ensayo, de esta manera se pueden detectar fácilmente cepas del VHB resistentes. Además, la detección combinada del motivo YMDD y los mutantes precorre podría ser clínicamente importante en la predicción y pronóstico del tratamiento adicional.

**Referencias**

- Asseline U, Delarue M, Lancelot G, Toulme F, Thuong N (1984) Nucleic acid-binding molecules with high affinity and base sequence specificity : intercalating agents covalently linked to oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81(11):3297-301.
- Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 189-193.
- Bej A, Mahbubani M, Miller R, Di Cesare J, Haff L, Atlas R. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol Cell Probes* 1990; 4:353-365.
- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.
- Carman W, Zanetti A, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman A, and Thomas H. Vaccine induced escape mutants. *Lancet* 1990; 336:325-329.
- Carman W, Korula J, Wallace L, MacPhee R, Mimms L, and Decker R. Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. *Lancet* 1995; 345: 1406-1407.
- Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991; 350: 91-92.
- Crawford D. Hepatitis B virus 'escape' mutants: Arare event which causes vaccination failure. *British Med. J.* 1990; 301: 1058-1059.
- Duck P. Probe amplifier system based on chimeric cycling oligonucleotides. *Biotechniques* 1990; 9: 142-147.
- Gao Q, Gu Z, Parniak M, Cameron I, Cammack N, Boucher C, and Wainberg M. The same mutation that encodes low-level human immunodeficiency virus type-1 resistance to 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'-dideoxycytidine confers high level resistance to the (-) enantiomer of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37: 1390-1392.
- Guatelli J, Whitfield K, Kwoh D, Barringer K, Richman D, Gengeras T. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1874-1878.
- Hadziyannis S. Hepatitis B e antigen negative chronic hepatitis B: from clinical recognition to pathogenesis and treatment. *Viral Hepatitis* 1995; 1: 7-36.
- Honkoop P, de Man R, Zondervan P, Niesters H, and Schalm S. Histological improvement in patients with chronic hepatitis B virus infection treated with lamivudine is associated with a decrease in HBV-DNA by PCR. *Hepatology* 1995; 22: abstract 887.
- Kwoh D, Davis G, Whitfield K, Chappelle H, Dimichele L, Gengeras T. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1173-1177.
- Kwok S, Kellogg D, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sinisky J. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucl. Acids Res.* 1990; 18: 999.

- Landgren U, Kaiser R, Sanders J, Hood L. A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 1988; 241:1077-1080.
- Li J-S, Tong S-P, Wen Y-M, Vivitski L, Zhang Q, and Trépo C. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an Hbe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the preCore region. *J. Virol.* 1993; 67: 5402-5410.
- 5 Ling, R., Mutimer, D., Ahmed, M., Boxall, E. H., Elias, E., Dusheiko, G.M. and Harrison, T.J. Selection of mutations in the Hepatitis B Virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996; 24: 711-713.
- Lok A, Akarca U, and Greene S. Mutations in the precore region of hepatitis B virus serve to enhance of the secondary structure of the pre-genome encapsidation signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 4077-4081.
- 10 Lomeli H, Tyagi S, Printchard C, Lisardi P, Kramer F. Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin Chem* 1989; 35: 1826-1831.
- Magnius L, and Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology* 1995; 38: 24-34.
- 15 Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, Mitsuya H, Reitz M, Cohen J, Broder S (1987) Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides : inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(21):7706-10.
- Miller P, Yano J, Yano E, Carroll C, Jayaram K, Ts'o P (1979) Nonionic nucleic acid analogues. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* 18(23):5134-43.
- Naoumov N, Perillo R, Chokshi S, Dienstag J, Vicary C, Brown N, and Williams R. Reduction in hepatitis B virus quasispecies during lamivudine treatment is associated with enhanced virus replication and hepatocytolysis. *Hepatology* 1995; 22: abstract 885.
- 20 Nielsen P, Egholm M, Berg R, Buchardt O (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 254(5037):1497-500.
- Nielsen P, Egholm M, Berg R, Buchardt O (1993) Sequence specific inhibition of DNA restriction enzyme cleavage by PNA. *Nucleic-Acids-Res.* 21(2):1997-200.
- 25 Okamoto H, Yotsumoto S, Akahane Y, Yamanaka T, Miyazaki Y, Sugai Y, Tsuda F, Tanaka T, Miyakawa Y, and Mayumi M. Hepatitis B virus with precore region defects prevail in persistently infected hosts along with serocon-version to the antibody against e antigen. *J. Virol.* 1990; 64: 1298-1303.
- Saiki R, Walsh P, Levenson C, Erlich H. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:6230-6234.
- 30 Sato S, Suzuki K, Akahane Y, Akamatsu K, Akiyama K, Yunomura K, Tsuda F, Tanaka T, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann. Intern. Medicine* 1995; 122: 241-248.
- Shaw, T., Mok, S.S., Locarnini, S.A. Inhibition of hepatitis B virus DNA polymerase by enantiomers of penciclovir triphosphate and metabolic basis for selective inhibition of HBV replication by penciclovir. *Hepatology* 1996; 24: 996-1002.
- 35 Stuyver L, Rossau R, Wyseur A, et al. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J. Gen. Virol.* 1993; 74 : 1093-1102.
- Takahashi K, Aoyama K, Onhno N, Iwata K, Akahane Y, Baba K, Yoshizawa H, and Mishiro S. The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection. *J. Gen. Virol.* 1995; 76: 3159-3164.
- 40 Tipples, G.A., Ma, M.M., Fischer, K.P., Bain, V.G., Kneteman, N.M. and Tyrell, D.L.J. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996; 24: 714-717.
- Waters J, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, and Thomas H. Loss of the common 'a' determinant of hepatitis B surface antigen by vaccine-induced escape mutants. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: 2543-2547.
- 45 Wu D, Wallace B. The ligation amplification reaction (LAR) - amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 1989; 4:560-569.
- Yuan T, Faruqi A, Shih J, and Shih C. The mechanism of natural occurrence of two closely linked HBV precore predominant mutations. *Virol.* 1995; 211: 144-156.

Zhang X, Zoulim F, Habersetzer F, Xiong S, and Trépo C. Analysis of hepatitis B virus genotypes and preCore region variability during interferon treatment of Hbe antigen negative chronic hepatitis B. *J. Med. Virol.* 1996; xxx-xxx.

Li J. et al. (1990) *Journal of General Virology*, 71, 1993-1998



**REIVINDICACIONES**

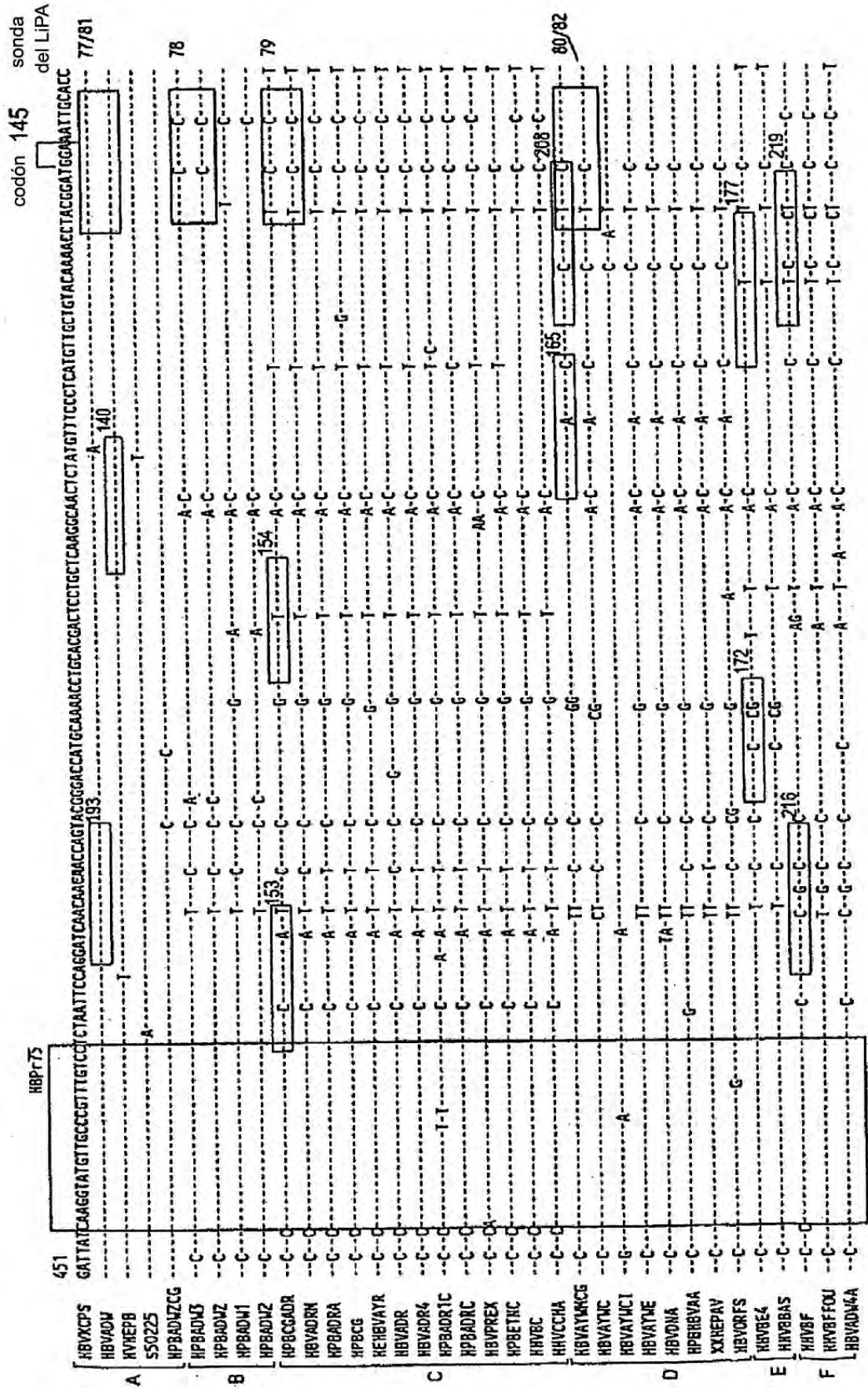
1. Procedimiento para la detección y/o el análisis genético del VHB en una muestra biológica, que comprende:
- (i) si es necesario, liberar, aislar o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en dicha muestra;
  - (ii) si es necesario, amplificar la parte pertinente de un gen del VHB adecuado presente en dicha muestra con al menos un par de cebadores adecuados;
  - (iii) hibridar los ácidos polinucleicos de la etapa (i) o (ii) con una combinación de al menos una sonda de cada uno de los siguientes grupos:
    - SEQ ID 88
    - SEQ ID 89
    - SEQ ID 9, 118, 119, 120, 121
    - SEQ ID 10
    - SEQ ID 122, 123, 124, 125, 126
    - SEQ ID 42;
  - (iv) detectar los híbridos formados en la etapa (iii);
  - (v) inferir el genotipo del VHB presente en dicha muestra a partir de la(s) señal(es) de hibridación diferencial(es) obtenida(s) en la etapa (iv).
2. Kit de ensayo para la detección y/o el análisis genético del VHB presente en una muestra biológica de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1, que comprende los siguientes componentes:
- (i) cuando sea apropiado, un medio para liberar, aislar o concentrar los ácidos polinucleicos presentes en dicha muestra;
  - (ii) cuando sea apropiado, al menos un par de cebadores adecuados;
  - (iii) al menos una sonda de cada uno de los siguientes grupos:
    - SEQ ID 88
    - SEQ ID 89
    - SEQ ID 9, 118, 119, 120, 121
    - SEQ ID 10
    - SEQ ID 122, 123, 124, 125, 126
    - SEQ ID 42;
  - posiblemente fijada a un soporte sólido;
  - (iv) un tampón de hibridación, o componentes necesarios para producir dicho tampón;
  - (v) una solución de lavado, o componentes necesarios para producir dicha solución;
  - (vi) cuando sea apropiado, un medio para detectar los híbridos resultantes de la hibridación precedente;
  - (vii) cuando sea apropiado, un medio para unir dicha sonda a una localización conocida sobre un soporte sólido.

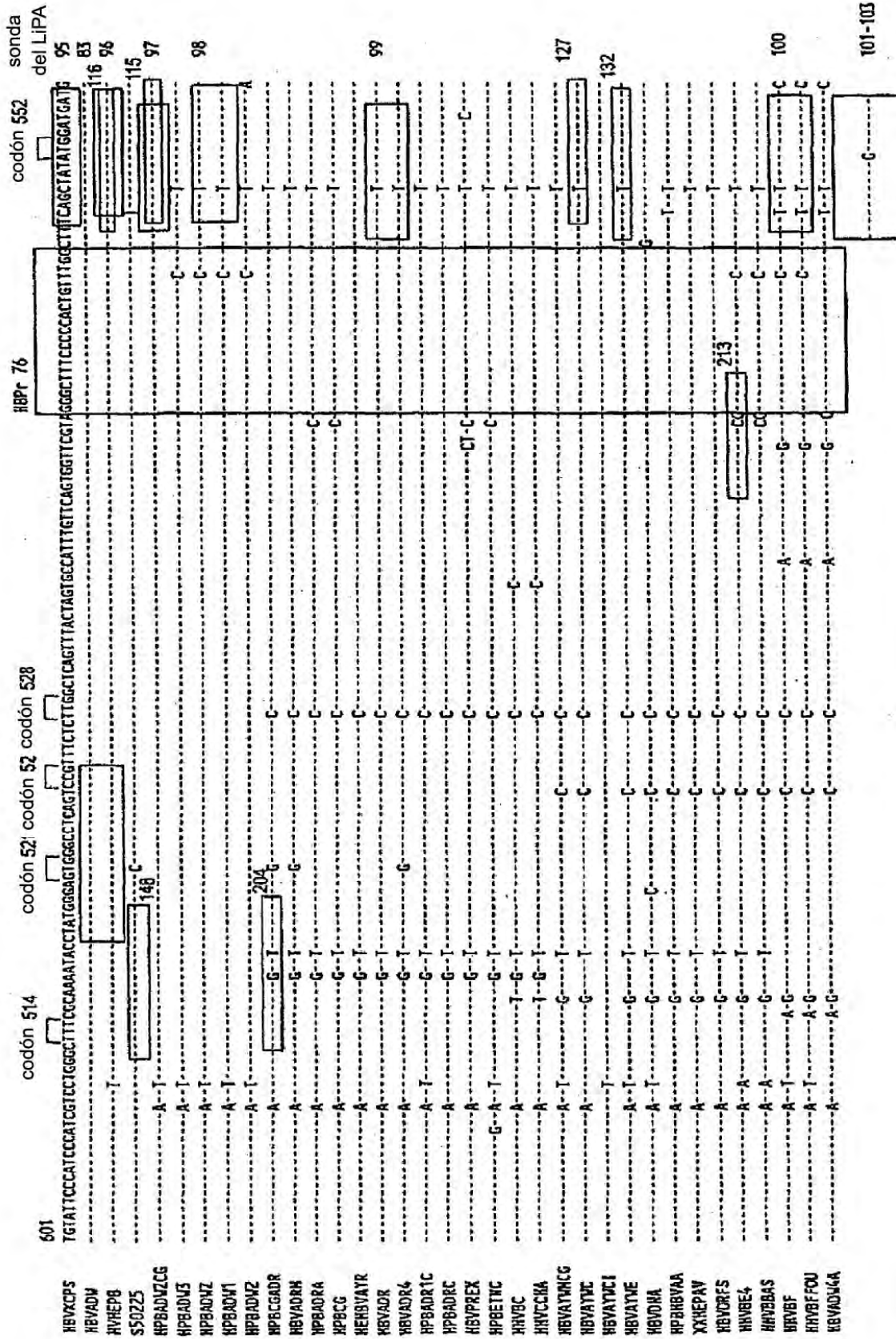


Inicio HBsAg

HBVYCSF ATGGAGACATCACATCAGGATTCCTAGGACCCCTGCTGCTGTTACAGCGGGGTTTTCTTGTTCACAGAACTCTCAATACCCGACGCTAGACTCGTGGGCTCTCAATTTCTAGGGGGGTACCCTGGTGTG  
 HBVADV .....T.....A.....A.....  
 HVHEPB .....A.....A.....  
 S5025 .....C.....C.....  
 HPBADVZCG .....C.....T-T.....AG.....  
 HPBADWJ .....C.....A.....AAA.....  
 HPBADVZ .....C.....A.....AA.....  
 HPBADW1 .....C.....A.....AA.....  
 HPBADVZ .....C.....A.....AA.....  
 HPBCGADR .....G-CA.....A.....AG-AC.....  
 HBVADRH .....G-CA.....A.....AG-AC.....  
 HPBADRA .....G-CA.....A.....AG-AC.....  
 HPBCG .....G-CA.....A.....AG-AC.....  
 HEHBVATR .....G-CA.....A.....AG-AC.....  
 HBVAOR .....CA.....A.....AG-AC.....  
 HBVADR4 .....CA.....A.....C.....CAG-AC.....  
 HPBADRTIC .....CA.....A.....AG-AC.....  
 HPBADRC .....CA.....A.....AA-AA.....  
 HBVPREX .....G-CA.....A.....AG-AC.....  
 HPBETNC .....CA.....A.....AG-AC.....  
 HBVBC .....CA.....A.....AG-AC.....  
 HBVYCHH .....CA.....A.....AAG-AC.....  
 HBVAYMCG .....CA.....A.....AA-TA.....  
 HBVATYC .....T.....A.....AA-TA.....  
 HBVAYUCI .....T.....G.....AA-TA.....  
 HBVATYE .....T.....A.....AA-TA.....  
 HBVONA .....G.....A.....AA-TA.....  
 HPBRBYAA .....A.....A.....AA-CA.....  
 XXHEPAV .....A.....A.....AA-TA.....  
 HBVORFS .....A.....A.....AA-CA.....  
 HBVBEZ .....A.....A.....AG-T.....  
 HBVBAS .....A.....A.....AG-T.....  
 HBVBF .....C.....T-G.....ACT-AG.....  
 HBVBFQV .....C.....T-G.....ACT-AG.....  
 HBVADWGA .....C.....T.....ACT-G.....

301  
 HBVXCP5 CTTGCCAAGATTCCGAGTCCCAACTCCAACTCACTCACAACCTCCTGTCTCCAAATTGCTGTTATCGCTGGATGTGTCGCGGGTTTTATCATATTCCTCTGCTGCTATGGCTCATCTTCTTGTGGTCTTCTG  
 HBVADU -----GA-----A-----A-----A-----  
 HXHEPB -----G-----A-----A-----A-----  
 S50Z25 -----G-----A-----A-----A-----  
 HPBADWZCG -----A-T-G-G-----T-GT-----G-----C-----G-----  
 HPBADW3 -----A-T-G-G-----T-GT-----G-----C-----G-----  
 HPBADWZ -----A-T-G-G-----G-----C-----G-----  
 HPBADW1 -----A-T-G-G-----G-----C-----G-----  
 HPBADWZ -----A-T-G-G-----G-----C-----G-----  
 HPBGGADR -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HBVADRM -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HPBADRA -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HPBC6 -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HEHBVAYR -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HBVADR -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HBVADR6 -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HPBADRTC -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HPBADRC -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HBVPREX -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HPBETHC -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HXVBC -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HXVCCA -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HBVATMCG -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HBVATMC -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HBVATMCI -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HBVATUE -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HBVDNA -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HPBBVAA -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 XKHEPAV -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HBVORFS -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HXVBE4 -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HXVBBAS -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HXVBF -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HXVBF0U -----C-----C-----C-----C-----C-----  
 HBVADHGA -----C-----C-----C-----C-----C-----





	751	KBP-94	Fin de HBsAg
HBVCP5	TGGTATTGGGGCCAAAGCTGTACAGCATCGTGAGTGCCCTTATACCCCTGTTACCAATTTCTTTGTCCTGGGTATACATTTAA		ACCCTAACAAACAABAGATGGGTATTCCCTAAACTTCATGGCTACATAATTTGGAAGTT
HBVADW			
HBMEP8			
SSOZ25			
HPBADWZCG			
HPBADW3			
HPBADWZ			
HPBADW1			
HPBADW2			
HPBCGADR			
HBVADRK			
HPBADRA			
HPBCG			
HEHBVAYR			
HBVADR			
HBVADR4			
HPBADR1C			
HPBADRC			
HBVPREX			
HPBETNC			
HRVBC			
HRVCCHA			
HBVAYMCG			
HBVAYLC			
HBVAYWCI			
HBVAYZE			
HBVDNA			
HPBHBVAA			
XXHEPAV			
HBVORF5			
HRVBE4			
HRVBSAS			
HRVBF			
HRVBF0U			
HBVADHAA			





HBVXCP5 CCTTAATGCCCTTGTATACAAAGCTAAAGGCTTCACTTCTCCCAACTTAAAGGCTTTCTAAGTAACAGTACATGAACCTTTACCCGTTGCTCGGCAACGGCCTGGTCTGTGCCAAGTGTTCCTGACCGCAACCC  
 HBVADH .....T.....C.....T.....C.....T.....A.....T.....A.....T.....  
 HVKEP8 .....G.....T.....G.....T.....AC...A...TC.....A.....  
 \$502Z5 .....T.....G.....T.....CC...A...TC.....A.....  
 HPBADVZG .....T.....T.....T.....C.....TC.....A.....  
 HPBADV3 .....T.....T.....T.....C.....TC...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HPBADM1 .....T.....T.....T.....C.....TC.....A.....  
 HPBADV2 .....T.....T.....T.....C.....TC...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HPBGGDR .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVADRM .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HPBADRA .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HPBCG .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HEBVAYR .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVADR .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVADR4 .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HPBADR1C .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HPBDRC .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVPREX .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HPBETNC .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVBC .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HVCCCHA .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVAYMCG .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVAYUC .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVAYICI .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVAYNE .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVONA .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HPBHVAA .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 XXREPAY .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVORFS .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HVVBE4 .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVBBAS .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVBF .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVFFOU .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....  
 HBVADN4A .....T.....T.....T.....G.....T.....A...TC-C.....C...G-AC-G-C///-C.....A.....

1201  
CCACTGGCTGGCCATAGCCATCAGCCGATGGCTTGTGGCTCCTCTGGCGATCCACTGCGGAATCCTAGCCGCTTGTGGAGCAGCCGGTCTGGAGCAAGCTCATCGGAACCTGACCAATCTGTGCTCC

HBVXDFS  
HBVADW  
HVEHPB  
S50225  
HPBADWZCG  
HPBADVS  
HPBADVZ  
HPBADW1  
HPBADVZ  
HPBCGADR  
HBVAORH  
HPBADRA  
HPBCG  
HEHBVAYR  
HBVADR  
HBVADR4  
HPBADR1C  
HPBADRC  
HBVPREX  
HPBETHC  
KIVBC  
HHVCCHA  
HBVAYWICG  
HBVAYJC  
HBVATNC1  
HBVAYNE  
HBVONA  
HPBHBVAA  
XXHEPAV  
HBVORFS  
HNBEE4  
HNBBAS  
HNBBF  
HNBBFOU  
HBVADW4A

-----A-----C-----G-----A-----  
-----A-----C-----A-----T-----A-----A-----A-----A-----A-----G-----  
-----A-----G-----T-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----G-----C-----T-----T-----  
-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----T-----A-----G-----  
-----A-----G-----G-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----G-----A-----T-----G-----C-----G-----T-----  
-----A-----G-----G-----A-----A-----A-----A-----A-----G-----A-----T-----G-----C-----G-----T-----  
-----G-----T-----G-----G-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----T-----C-----C-----A-----T-----  
-----A-----G-----AGC-----C-----/-----A-----A-----G-----G-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----A-----T-----T-----GC-----C-----/-----G-----A-----C-----A-----T-----G-----C-----C-----T-----  
-----A-----T-----T-----ATC-----G-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----G-----C-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----A-----T-----T-----G-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----G-----C-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----A-----G-----T-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----G-----C-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----T-----T-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----T-----G-----CG-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----T-----G-----TC-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----GT-----G-----TC-----C-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----ATAG-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----T-----G-----CA-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----T-----G-----C-----G-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----T-----  
-----AT-----C-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----AT-----C-----C-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----A-----T-----C-----C-----T-----  
-----T-----T-----A-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----T-----  
-----T-----T-----A-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----T-----  
-----T-----T-----A-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----T-----  
-----T-----T-----A-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----C-----T-----

	1351	Inicio de proteína HBx
HBVXKFS	TCTCCGGAATATACATCGTTTCC	ATGGCTGTAGGCTGACTGCCAATGATCTCTCGGGGACGACCCCTCTCGGGGCGCCTGGAGTCTCTGGTCCCTTCTCC
HBVADV	.....A.....	.....C.....
HYNEPB	.....C.....	.....A.....
SS0225	.....A.....	.....G.....
HPBADVZCG	-T-T-A-.....C-.....	-A-.....T-.....A-.....T-.....C-.....G-A-.....C-G-A-.....C-G-A-.....
HPBADV3	-T-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HPBADVZ	-T-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HPBADV1	-C-C-G-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HPBADV2	-C-C-G-.....A-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HPBCGADR	-T-.....C-C-A-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HPBADRM	-C-C-A-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HPBADRA	-C-C-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HPBCG	-C-C-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HEHBVAYR	-C-C-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HBVADR	-C-E-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HBVADR4	-C-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HPBADR1C	-C-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HPBADRC	-C-C-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HBVPREX	-C-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HPBETNC	-C-C-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HBVBC	-C-.....C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HYCCCHA	-T-C-.....C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HBVAYMCG	-A-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HBVATWC	-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HBVATNCI	-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HBVAYME	-T-.....T-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HBVDNA	-A-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HPBBSVAA	-C-C-.....G-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
XXHEPAV	-C-C-.....A-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HBVORFS	-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HWBE4	-C-.....C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HWBBSAS	-C-.....G-.....C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HWBF	-T-.....G-.....C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HWBFFOU	-C-.....G-.....C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....
HBVADW4A	-TA-.....G-C-C-C-.....	-G-.....C-.....C-.....T-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....C-.....G-.....

Fin de proteina pol de HB

1501	HBVXEPS	GTCTGCCGTTCCAGCCGACACGGGCGCACCTCTCTTACGGGGTCTCCCGTCTGTGCGCTTGCATCTGCCGGTCCGCTGGCACTTGGCTTCCAGCTTGCACAGTTCGCATGGAGACCCACCGTGA	ACCCCCATCAGATCTCCCAAGGT
	HBVADW	-----	-----
	HVNEPB	-----	-----
	SS0225	-----	-----
	HPBADVZCG	-----	-----
	HPBADV3	-----A--GT-----	-----G--A-----
	HPBADVZ	-----A--GA-----	-----G--A-----
	HPBADV1	-----A--GT-----	-----CGG--A-----
	HPBADV2	-----TT--A--GA-----	-----G--G--T-----
	HPBCGADR	-----G-----	-----G--G--T-----
	HBVADRM	-----G-----	-----G--C--G--T-----
	HPBADRA	-----	-----C--G--T-----
	HPBCG	-----	-----C--G--T-----
	KEHBVAYR	-----	-----C--G--T-----
	HBVADR	-----	-----C--G--T-----
	HBVADR4	-----TTTT-----	-----C--G--T-----
	HPBADRTC	-----	-----C--G--T-----
	HPBADRC	-----G-----	-----C--G--T-----
	HBVPREX	-----	-----C--G--T-----
	HPBETMC	-----	-----G--GT-----
	HNVC	-----G--A-----	-----CAT--G--T-----
	RYCCHA	-----G--A-----	-----CAT--G--AT-----
	KBVAYMCG	-----T--GT-----	-----C--AT--T-----
	HBVAYC	-----CA-----	-----C--A--AT-----
	HBVAYNC1	-----T--GA-----	-----TA-----
	HBVAYNE	-----	-----A--GT-----
	HBVDWA	-----A-----	-----C--AT--T-----
	HPBHVAA	-----A-----	-----A--CAT--T-----
	XXHEPAV	-----T--GA-----	-----C--CT--T-----
	HBVORFS	-----GT-----	-----C--A--T-----
	HNVBEE4	-----G-----	-----C--A--AT-----
	HNVBBS	-----	-----CCTG--GTT-----A--CA--
	HNVBFB	-----A--T-----	-----CCTG--GTT-----A--CA--
	HNVBFFOU	-----T-----	-----CCTG--GTT-----A--CA--
	HBVADW4A	-----G--T-----	-----CCTG--GTT-----A--CA--

	1651	HBPr 69	HBPr 70	promotor de precore	promotor de core	sonda del LiPA
HBVXCP5	CTTACATAAGAGGACTTTGGAC	CTCAGGCAATGTCAACGACCGACCTTGAGGCTACTTCAAGACTGTGTGTTAAGCACTGGGAGGAGCTGGGGAGGACATTAGGCTTTAAGGTCCTTTGTATTAGGAGCTGTAGGCATAAATTGGT				
HBVADH						
RVHEPB						
SS0225						
HPBADVZEG						
HPBADV5						
HPBADVZ						
HPBADNT						
HPBADH2						
HPBCCGDR						
HBVADRM						
HPBADRA						
HPBCG						
HEHVA1R						
HBVADR						
HBVADR4						
HPBADR1C						
HPBADRC						
HEVPREX						
HPBETHC						
HBVBC						
HBVCSHA						
HBVATMCG						
HBVATVC						
HBVATNCI						
HBVATNE						
HBVONA						
HPBHBVAA						
XXHEPAV						
HBVORFS						
HBVBE6						
HBVBSAS						
HBVBF						
HBVBF0U						
HBVADVGA						

89

88

	Fin de proteína Hbx	codones 15	codones 22,29	Inicio de HbcAg	HBPr 7	sonda del LIPA
1801	Inicio de precore ATGCAACTTTT/CACCTCTGCTAA	TCACTCTGTGACATGTCACACTGTTAAGGCTCCAAAGCTGTGGCTTGGGTC	ATGGACATTGACCTTATAAAGAAATTTGGACCTACTGTGGACTACT	ATGGACATTGACCTTATAAAGAAATTTGGACCTACTGTGGACTACT	ATGGACATTGACCTTATAAAGAAATTTGGACCTACTGTGGACTACT	45
HBVCP5	CTGGCCACCGAGCACC	TTCTCTGTGACATGTCACACTGTTAAGGCTCCAAAGCTGTGGCTTGGGTC	ATGGACATTGACCTTATAAAGAAATTTGGACCTACTGTGGACTACT	ATGGACATTGACCTTATAAAGAAATTTGGACCTACTGTGGACTACT	ATGGACATTGACCTTATAAAGAAATTTGGACCTACTGTGGACTACT	12
HBVADV	/	/	/	/	/	13
HNHEPB	/	/	/	/	/	34
SS0225	/	/	/	/	/	46
HPBADVZCG	/	/	/	/	/	47
HPBADV3	/	/	/	/	/	48
HPBADVZ	/	/	/	/	/	49
HPBADV1	/	/	/	/	/	9
HPBADV2	/	/	/	/	/	10
HPBGGADR	/	/	/	/	/	62
HBVADRH	/	/	/	/	/	
HPBADRA	/	/	/	/	/	
HPBCC	/	/	/	/	/	
HEHBVATR	/	/	/	/	/	
HBVADR	/	/	/	/	/	
HBVADR4	/	/	/	/	/	
HPBADR1C	/	/	/	/	/	
HPBADRC	/	/	/	/	/	
HBVPREX	/	/	/	/	/	
HPBETHC	/	/	/	/	/	
HNVCB	/	/	/	/	/	
HNVCCHA	/	/	/	/	/	
HBVATKCG	/	/	/	/	/	
HBVATNC	/	/	/	/	/	
HBVATNC1	/	/	/	/	/	
HBVATNE	/	/	/	/	/	
HBVDNA	/	/	/	/	/	
HPBHBVAJ	/	/	/	/	/	
XXHEPAV	/	/	/	/	/	
HBVORFS	/	/	/	/	/	
HNVE4	/	/	/	/	/	
HNVBAS	/	/	/	/	/	
HNVEF	/	/	/	/	/	
HNVEFFOU	/	/	/	/	/	
HBVADW4A	/	/	/	/	/	







2251 Inicio de proteína pol de HB  
 H5VXCP5 TGAATATTGGCTCTTTCCGGAGTGGATTCCGCACTCTCCAGCCTATAGACCACCAA ATGCCCTATCTTATACACACTCCGGAACACTGTTGTAGACACGGGACGGCCAGGCTCCCTTAGACAGCAACTCCCTCGCCTCG  
 HBVADW -----T-----T-----C-----  
 RVHEPB -----T-----T-----A-----  
 S50225 -----T-----T-----A-----  
 HPBADWZCG -----G-----T-----A-----  
 HPBADV3 -----G-----T-----A-----  
 HPBADMZ -----G-----T-----A-----  
 HPBADW1 -----A-----T-----A-----  
 HPBADW2 -----A-----T-----A-----  
 HPBGGADR -----R-----T-----A-----  
 HBVADRH -----G-----T-----C-----  
 HPBADRA -----G-----T-----C-----  
 HPBCC5 -----G-----T-----C-----  
 HEHBVATR -----G-----T-----C-----  
 HBVADR -----G-----T-----C-----  
 HBVADR4 -----G-----T-----C-----  
 HPBADR1C -----G-----T-----C-----  
 HPBADRC -----G-----T-----C-----  
 HBVPREX -----G-----T-----C-----  
 HPBETNC -----G-----T-----C-----  
 HVVBC -----G-----T-----C-----  
 HVVCCA -----G-----T-----C-----  
 HBVAYKRCG -----G-----T-----C-----  
 HBVAYVC -----G-----T-----C-----  
 HBVAYUCI -----G-----T-----C-----  
 HBVAYVE -----G-----T-----C-----  
 HBVDNA -----G-----T-----C-----  
 HPBBVAA -----G-----T-----C-----  
 XXHEPAY -----G-----T-----C-----  
 HBVCRFS -----G-----T-----C-----  
 HBVBE4 -----G-----T-----C-----  
 HNVBBAS -----G-----T-----C-----  
 HIVBF -----G-----T-----C-----  
 HVBGF F0J -----G-----T-----C-----  
 HBVADWGA -----G-----T-----C-----

Fin de HBcAg

2401	CAGACGACAGTCTCAATCGCCGGCTCCGAGAGATCTCAATCTGGGAATCTCAATGTTAG	TATTCTTGGACTCAIANGGTGGAAACTTACTGGGCTTATTCTCTAGAGTACCTATCTTAAATCCTGATGGCAACTCCTTCCT
HBVXCP5	.....	.....
HBVADW	.....	.....
HVNEPB	.....	.....
S502Z5	.....	.....
HPBADVZCG	.....	.....
HPBAOV3	.....	.....
HPBADVZ	.....	.....
HPBADW1	.....	.....
HPBADW2	.....	.....
HPBCGADR	.....	.....
HBVADRH	.....	.....
HPBADRA	.....	.....
HPBCG	.....	.....
KEHBVAYR	.....	.....
HBVADR	.....	.....
HBVADR4	.....	.....
HPBADR1C	.....	.....
HPBADRC	.....	.....
HBVPREX	.....	.....
HPBETNC	.....	.....
HRVBC	.....	.....
HRVCCA	.....	.....
HBVAYWCG	.....	.....
HBVAYKC	.....	.....
HBVAYWCI	.....	.....
HBVAYWE	.....	.....
HBVDNA	.....	.....
HPBHBVAA	.....	.....
XXHEPJV	.....	.....
HBVORFS	.....	.....
HRVBEG	.....	.....
HRVBAS	.....	.....
HRVBF	.....	.....
HRVBF0U	.....	.....
HBVADW4A	.....	.....

2551  
 HBVKPFS TTCCTAAGTCATTACAGAGGACATTTAATAGGTGTCACCAATTTGGGECCTCTCACTGTAATGAAATTAATATGCGTCCAGATTCTACTACCCACCTAAATATTTCCTTACGCAAAAGGAA  
 HBVADW .....A.....  
 HVHEPB .....T-A.....  
 SSOZS .....GC.....  
 HPBADVZCG .....A.....  
 HPBADWJ .....A-C-T-A-G.....  
 HPBADWZ .....A-C-A-G.....  
 HPBADW1 .....A-G-A-G.....  
 HPBADW2 .....G-G-A-G.....  
 HPBGGADR .....A.....  
 HBVADRK .....A.....  
 HPBADRA .....A.....  
 HPBGG .....A.....  
 HEBVAYR .....A.....  
 HBVADR .....A.....  
 HPBADR1C .....A.....  
 HPBADRC .....A.....  
 HBVPREX .....A.....  
 HPBETHC .....A.....  
 HRYBC .....A.....  
 HRYCCHA .....A.....  
 HBVAYM1CG .....A.....  
 HBVAYMC .....A.....  
 HBVAYUCI .....A.....  
 HBVAYUE .....A.....  
 HBYDNA .....A.....  
 HPBHVAA .....A.....  
 XXHEPAV .....A.....  
 HBVORFS .....A.....  
 HRYBE4 .....A.....  
 HRYBBAS .....A.....  
 HRYBF .....A.....  
 HRYBFOSU .....A.....  
 HBVADWKA .....A.....



	Inicio de HBpreS1ag	sonda del LIPA
HBVXCP5	TACAGC ATAGGAGTTGGTCAAAACCTCGCAAGGCATGGGACAGATCTTCTTCCCAACCCCTCGGGATTCCTCCCGATCATCAAGTTGGACGCTGATTCGGAGCCCACTCAACAATCCAGATTGGGACTTCAACCCCATC	50
HBVADW	-----	22
HYHEPB	-----	
S50225	-----	
HPBADVZG5	-----	57
HPBADH5	-----	
HPBADVZ	-----	
HPBADMT	-----	
HPBADU2	-----	
HPBCGDR	-----	
HBVADRH	-----	
HPBADRA	-----	
HPBCG	-----	
HEBVAYR	-----	
HBVADR	-----	
HBVADR4	-----	
HPBADP1C	-----	
HPBADRC	-----	
HBVPREX	-----	
HPBETNC	-----	
HBVBC	-----	
HBVCCHA	-----	
HBVATM1CG	-----	92
HBVATVC	-----	
HBVATMCI	-----	
HBVATVE	-----	
HBVDNA	-----	73
HPBBVAA	-----	
XXHEPAV	-----	
HBVDRFS	-----	60
HYBEB4	-----	61
HBVBBAS	-----	64
HYBGF	-----	
HBVBFQO	-----	63
HBVADU4A	-----	



	Inicio de HBPr 3	Inicio de HBpresZag
HBVXCPS	CGGCGATCAGGAGCGCCACTCCCATCTCTCCACCTCTAAGAGACAGCTCCTCAGGCC	ATGCGAGTGG
HBVADU	.....	.....
HVHEPB	.....	.....
SS0225	.....G.....A.....	.....
HPBADMZCG	.....	.....
HPBADW5	.....T.....A.....C-G.....C.....A.....	.....
HPBADWZ	.....T.....A.....C-G.....C.....	.....
HPBADW1	.....C.....C-A.....G.....C.....	.....
HPBADW2	.....T-A-C.....G.....C.....	.....
HPBCCADR	.....A.....	.....
HBVADRM	.....A.....	.....
HPBADRA	.....A.....	.....
HPBCG	.....A.....	.....
HERBVAYR	.....A.....	.....
HBVADR	.....A.....	.....
HBVADR4	.....A.....	.....
HPBADR1C	.....A.....	.....
HPBADRC	.....A.....	.....
HBVPREX	.....A.....	.....
HPBETNC	.....A-A-A.....G.....	.....
HNVBC	.....A.....	.....
HNVCHA	.....A.....	.....
HBVATMCG	.....C-A.....C-TC-G.....T-G.....C.....	.....
HBVATMC	.....C.....C-TC-G.....T-G.....A-C.....	.....
HBVATCI	.....C-A.....A.....C-TC-G.....T-G.....C.....	.....
HBVATYE	.....C.....C-TC-G.....T-G.....A-C.....	.....
HBVDNA	.....C.....C-TC-G.....T-G.....A-C.....	.....
HPBHBVAA	.....C.....A.....C-TC-G.....T-G.....A-C.....	.....
XXHEPAY	.....C.....C-CC-G.....T-G.....A-C.....	.....
HBVORFS	.....C.....C-CC-G.....T-G.....A-C.....	.....
HVBE4	.....C-A-A.....A.....T-G.....C.....	.....
HVBBAS	.....C-A-A.....A.....T-G.....C.....	.....
HNVBF	.....T-C-G-A.....A-C-RAG.....CA.....	.....
HKVBFDDJ	.....T-C-G-A.....A-C-AG.....CA.....A-A.....A	.....
HBVADW4A	.....G.....C-G-AA.....A-C-AG.....CA.....A-A.....A	.....

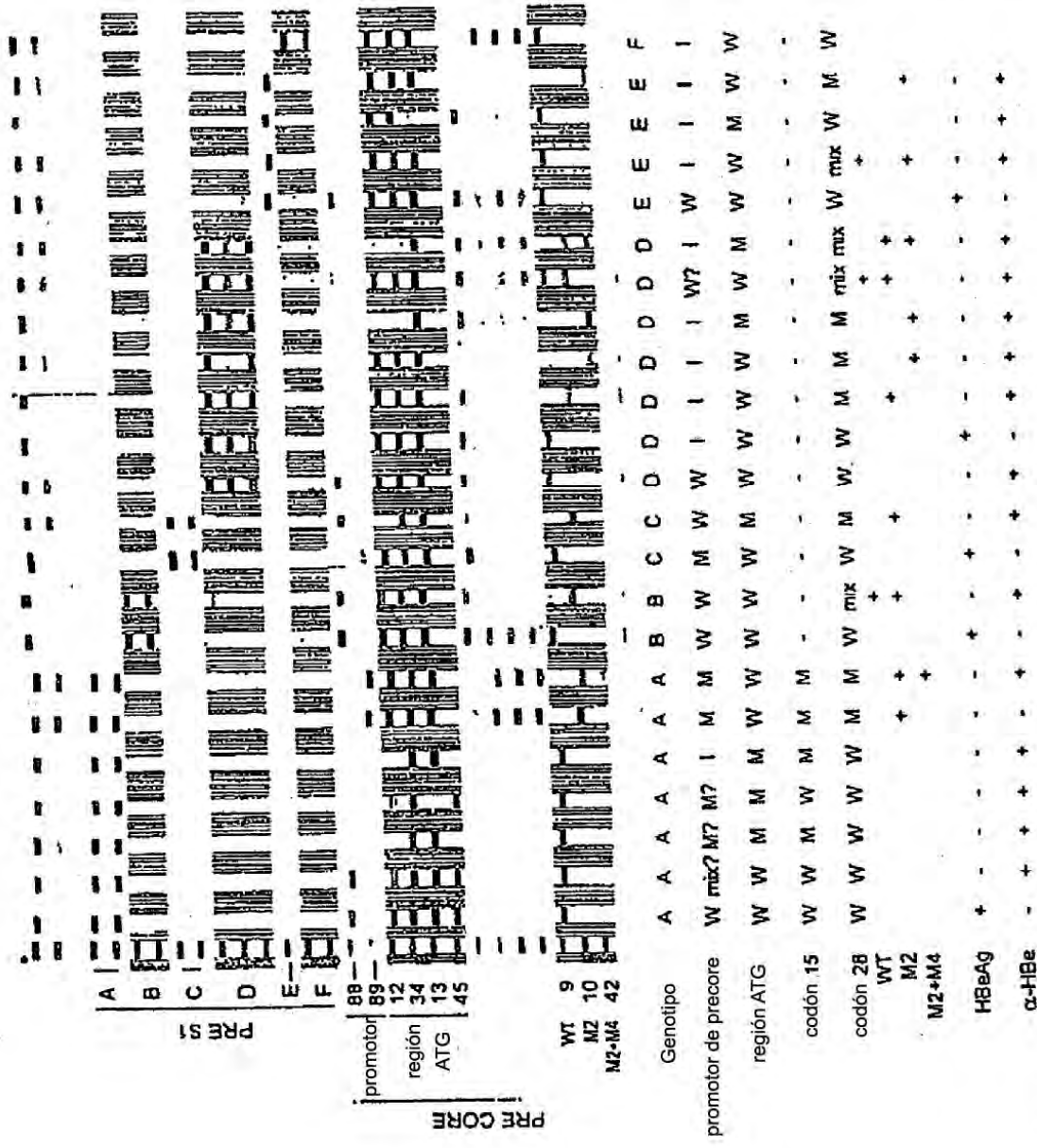
54

62

Diseño con VHB de LIPA			HBP	
Línea del LIPA	Región	Propósito	Número de sonda/SEQ ID NO	Secuencia
0		Línea a lápiz		
1		ADN biotinilado		
2	PreS1	Contr. de ampl.	33	CTGAGGGGCTCCACCCCA
3	PreS1	Genotipo A	22	AACCTCGCAAAGGCAT
4	PreS1	Genotipo A	50	CCCAGAGGGTTGGGAAC
	PreS1	Genotipo A	15	GCCAGCAGCCAACCAG
5	PreS1	Genotipo B	57	CTGCATTCAAAGCCAACT
	PreS1	Genotipo B	58	CCCCATGGGGGACTGTTG
6	PreS1	Genotipo B	59	CATACTCACAACGTGCCA
7	PreS1	Genotipo C	55	TTCAACCCCAACAAGGATC
8	PreS1	Genotipo C	54	TCAGGAAGACAGCCTAC
9	PreS1	Genotipo D	92	TTCTGCCCCATGCTGTA
10	PreS1	Genotipo D	56	AATGCTCCAGCTCCTAC
11	PreS1	Genotipo D	73	TTCCACCAGCAATCCTC
12	PreS1	Genotipo E	60	GGGCTTCTTGGACGGTCC
	PreS1	Genotipo E	81	CTCTCGAATGGGGGAAGA
	PreS1	Genotipo E	62	CCTAGCCCAATCACTCCA
13	PreS1	Genotipo F	63	AGCACCTCTCTCAACGACA
14	PreS1	Genotipo F	64	GCAAATTCCAGCAGTCCCG
	PreS1	Genotipo F	65	GCCAATGGCAAACAAGGTA
15	precore	- promotor	88	TAGGTTAAAGGTCCTTGT
16	precore	promotor	89	TAGGTTAATGATCCTTGT
17	precore	barrer codón -2 a +3	12	AAGTTGCATGGTGCTG
18	precore	barrer codón 1 a 5	34	ATGCAACTTTTTTACC
19	precore	barrer codón 5 a 9	13	CACCTCTGCCTAATCAT
20	precore	barrer codón 12 a 17	45	TGTACATGTCCCCTGTT
21	precore	barrer codón 12 a 17	46	TGTTTCATGTCCTACTGTT
22	precore	barrer codón 16 a 20	47	ACTGTTCAAGCCTCCAAG
23	precore	barrer codón 19 a 23	48	GGCACAGCTTGGAGGCTT
24	precore	barrer codón 23 a 27	49	AAAGCCACCCAAGGCACA
25	precore	codón 28 w	9	TGGCTTTGGGGCATGG
26	precore	codón 28 ml	10	TGGCTTTAGGGCATGG
27	precore	codón 28+29 ml	42	TGGCTTTAGGACATGGA

Fig. 2





I = indeterminado, W = natural, M = mutante;

Fig. 3

Genotipado en **HBsAg**

Genotipo	Oligo	Secuencia
A	HBPr 193	GGA TCA ACA ACA ACC AGT
	HBPr 140	CT CAA GGC AAC TCT ATG GG
	HBPr 77	CTA CGG ATG GAA ATT GC
B	HBPr 78	TAC GGA CGG AAA CTG C
C	HBPr 153	CT CTA CTT CCA GGA ACA G
	HBPr 154	C TGC ACG ATT CCT GCT
	HBPr 204	CT TTC GCA AGA TTC CTA TGG G
D	HBPr 165	AC TCT ATG TAT CCC TCC T
	HBPr 208	GC TGT ACC AAA CCT TCG GAT
E	HBPr 172	G GGA CCC TGC CGA AC
	HBPr 213	AG TGG TTC GCC GGG CTG G
F	HBPr 216	CA GGA TCC ACG ACC ACC AGG
	HBPr 219	GC TGT TCC AAA CCC TCG GAG
	HBPr 188	G CCA AAT CTG TGC AGC
A/B	HBPr 148	CT TTC GCA AAA TAC CTA TG
C/D/E	HBPr 80	CTT CGG ACG GAA ATT GC
E/F	HBPr 177	ATG TTG CTG TTC AAA ACC TG

Resistencia a fármacos en gen pol RT

Genotipo	Oligo	Secuencia	
A	HBPr 115	TCA GCT ATA TGG ATG ATG	natural
	HBPr 116	TTC AGC TAT GTG GAT GAT	mutante
D	HBPr 127	TC AGT TAT ATG GAT GAT G	natural
	HBPr 132	T TTC AGT TAT GTG GAT GAT	mutante

**PreCore region**

Genotipo	Oligo	Secuencia	
	HBPr 88	TAG GTT AAA GGT CTT TGT	promotor natural
	HBPr 89	TAG GTT AAT GAT CTT TGT	promotor mutante
	HBPr 119	TGG CTT TGG GGC ATG	codón 28 natural
	HBPr 10	TGG CTT TAG GGC ATG G	codón 28 con M2 mutante
	HBPr 122	TGG CTT TGG GAC ATG G	codón 29 con M4 mutante
	HBPr 42	TGG CTT TAG GAC ATG GA	codón con M2/M4 mutante

Fig. 4

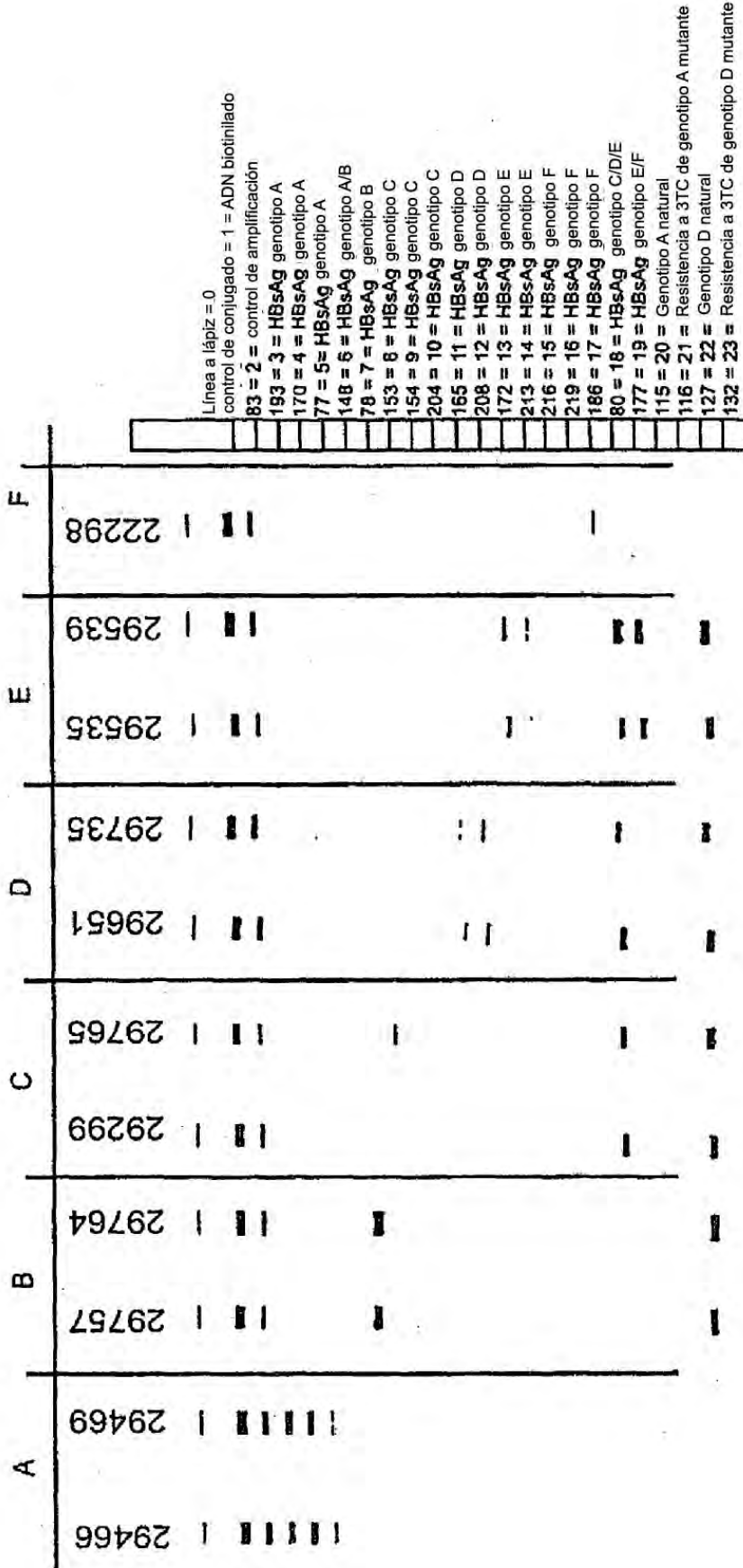


Fig. 5

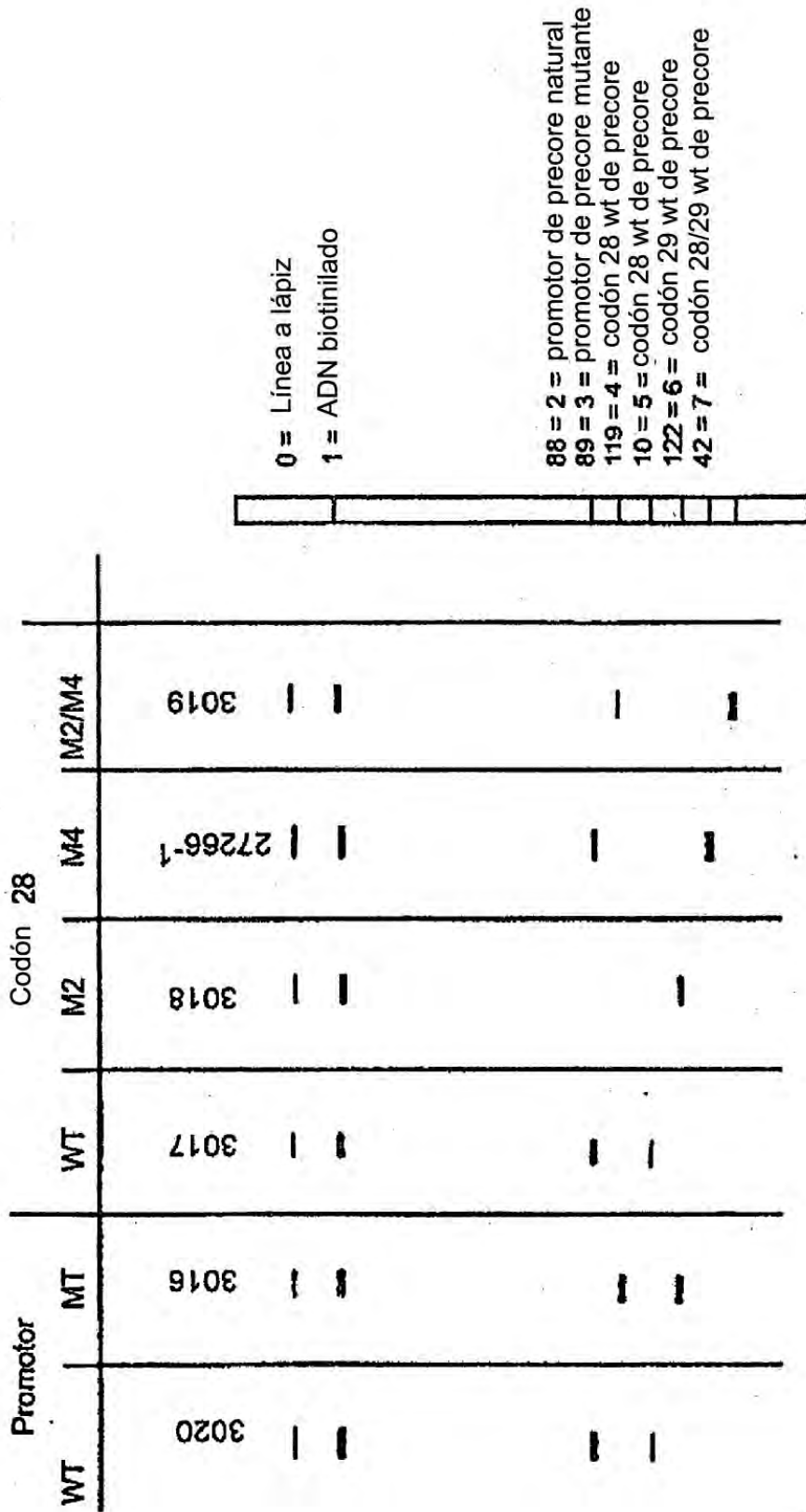


Fig. 6

# Paciente infectado con VHB tratado con lamivudina

Fig. 7

