

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 024**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/005** (2006.01)

**C12N 9/12** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2001 E 10182339 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2360243**

54 Título: **Variantes de la ADN polimerasa del virus de la hepatitis B y de antígenos de superficie y sus procedimientos**

30 Prioridad:

**09.06.2000 AU PQ810900**

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

**17.08.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BARTHOLOMEUSZ, ANGELINE, INGRID;  
LOCARNINI, STEPHEN, ALISTER;  
AYRES, ANNA;  
LITTLEJOHN, MARGARET, ROSE;  
MCCAUGHAN, GEOFFREY, WILLIAM y  
ANGUS, PETER, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

**TORNER LASALLE, Elisabet**

ES 2 630 024 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Variantes de la ADN polimerasa del virus de la hepatitis B y de antígenos de superficie y sus procedimientos

Campo de la invención

5 La presente invención versa en general sobre variantes virales que presentan sensibilidad reducida a agentes y, en particular, a análogos nucleósidos. Más en particular, la presente invención va dirigida a variantes del virus de la hepatitis B que presentan resistencia completa o parcial a análogos nucleósidos. Las variantes también pueden comprender mutaciones que afectan a la interactividad inmunológica a componentes superficiales virales. La presente invención contempla, además, ensayos para detectar tales variantes virales, ensayos que son útiles en la monitorización de regímenes terapéuticos antivirales y en el desarrollo de vacunas nuevas o modificadas dirigidas  
10 contra agentes virales y, en particular, variantes del virus de la hepatitis B. La presente invención también contempla el uso de las variantes virales para buscar agentes capaces de inhibir la infección, la réplica y/o la liberación del virus.

Antecedentes de la invención

15 Los detalles bibliográficos de las publicaciones a las que se hace referencia numérica en esta memoria están recogidos al final de la descripción.

Las mutaciones específicas en una secuencia de aminoácidos son representadas en la presente memoria como "Xaa<sub>1</sub>nXaa<sub>2</sub>", siendo Xaa<sub>1</sub> el residuo aminoácido original antes de la mutación, siendo n el número de residuo y siendo Xaa<sub>2</sub> el aminoácido mutante. La abreviatura "Xaa" puede ser el código de tres letras o de una sola letra (es decir, "X"). Los residuos aminoácidos para la ADN polimerasa del virus de la hepatitis B son numerados, siendo el residuo metionina en el motivo Tyr Met Asp Asp (YMDD) el residuo número 550.  
20

El virus de la hepatitis B (VHB) puede causar estados de una enfermedad debilitante y puede llevar a una insuficiencia hepática aguda. El VHB es un virus ADN que se replica mediante un ARN intermediario y utiliza transcripción inversa en su estrategia de replicación (1). El genoma del VHB es de naturaleza compleja, teniendo una estructura de ADN parcialmente bicatenaria con marcos de lectura abiertos con solapamiento que codifican genes de superficie, centrales, de polimerasa y X. La naturaleza compleja del genoma del VHB está representada en la Figura 1.  
25

La presencia de una ADN polimerasa del VHB ha llevado a la propuesta de que los análogos nucleósidos pudieran actuar como agentes antivirales eficaces. Ejemplos de análogos nucleósidos objeto de ensayo en la actualidad son penciclovir y su forma oral fanciclovir [FAM] (2,3,4,5) y lamivudina [LAM] (6,7). El adefovir también ha resultado tener actividad anti-VHB eficaz *in vitro*.  
30

La hepatitis, debido a la reactivación del virus de la hepatitis B (VHB), es una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes positivos al antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg+) que se someten a trasplante de médula ósea (BMT) (8-10). La patogenia subyacente está relacionada con una inmunosupresión intensa, durante una terapia citotóxica o inmunosupresora, que potencia la replicación viral con el consiguiente aumento en la infección de los hepatocitos. La reconstitución subsiguiente con células madre de donantes, junto con la disminución progresiva de los agentes inmunosupresores opuestos al injerto contrario al anfitrión, restaura la función inmunológica. Esto da como resultado la rápida destrucción de los hepatocitos infectados (11). El resultado del BMT alógeno también se ve afectado por la situación en cuanto al VHB del donante (11). De hecho, se demostró que el aclaramiento serológico del HBsAg en receptores HBsAg+ después del BMT alógeno estaba asociado con el injerto de médula positiva con los anticuerpos de superficie de la hepatitis B (anti-HBs) y con los anticuerpos centrales de la hepatitis B (anti-HBc) (12-17).  
35  
40

Según se ha afirmado anteriormente, FAM es el profármaco oral del penciclovir [9-(4-hidroxi-3-hidroximetilbut-1-il) guanina; BRL 39123], que se demostró que inhibía la replicación de los hepadnavirus en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* (18-22). Recientemente, han sido usados con éxito FAM y LAM ((-)-β-2'-desoxi-3'-tiacitidina o 3TC) para prevenir/tratar la hepatitis relacionada con la reactivación del VHB al quitar la quimioterapia/inmunosupresión (23, 24) y para prevenir la reaparición del VHB tras un trasplante ortotópico de hígado [OLT] (25-28).  
45

Como la de la LAM, la resistencia al FAM en el contexto posterior al OLT ha sido identificada en sujetos tanto inmunosuprimidos como inmunocompetentes. Las mutaciones documentadas de la polimerasa por FAM asociadas con el "brote" incluyen G518E (29), V519L (30), G520C (29), P523L (30), L526M (30), L526V (31), T530S (29), V553I (32). Dado que el gen de la polimerasa del VHB se solapa con el gen de la envoltura, las mutaciones en el dominio catalítico de la polimerasa pueden afectar a la secuencia de aminoácidos de la proteína de la envoltura y viceversa. En particular, la secuencia genética para el dominio de neutralización del VHB denominada determinante "a", que se encuentra dentro del HBsAg y está situada entre los aminoácidos 99 y 169, se solapa en realidad con las regiones catalíticas fundamentales de la proteína de la polimerasa viral, y en particular con los dominios A y B (33). De hecho, V519L, V553I, G518E están asociadas con cambios al HBsAg de la E164D, codón de parada en 199, y de la E164K, respectivamente (30,32,33). En cambio, el uso de la HBIG para la profilaxis contra la reincidencia del  
50  
55

5 VHB después de un OLT fue asociado con variantes en el HBsAg, que podría tener cambios concomitantes en el gen de la polimerasa (34-36). En un trabajo que condujo hasta la presente invención, los inventores identificaron la selección de las variantes del VHB en receptores positivos al HBsAg tratados con FAM y/o LAM tras un trasplante de médula ósea alógena y después de un OLT. Además de las mutaciones únicas en la VHB polimerasa y del HBsAg seleccionado durante el tratamiento, hubo varios cambios de aminoácidos en algunos aislados de VHB que fueron coherentes con un cambio del genotipo del VHB en la población predominante del virus.

10 El documento WO 00/61758 (D1) sí da a conocer mutaciones en la posición 584; sin embargo, no las mutaciones específicas divulgadas en la presente solicitud de patente. Además, tampoco ha sido dado a conocer el uso de estos mutantes adicionales para determinar el potencial de que un VHB presente sensibilidad reducida a dichos compuestos.

15 Según la presente invención, los inventores han identificado variantes del VHB, seleccionadas siguiendo un tratamiento con FAM y/o LAM, con mutaciones en la ADN polimerasa del gen del VHB que reducen la sensibilidad del VHB a este análogo nucleósido. También ocurren mutaciones correspondientes en el antígeno de superficie. La identificación de estas variantes del VHB es importante para el desarrollo de ensayos para monitorizar la resistencia al FAM y/o a la LAM y/o la resistencia a otros regímenes terapéuticos análogos con nucleósidos y buscar agentes que sean útiles como agentes terapéuticos alternativos.

Sumario de la invención

20 En toda esta memoria, a no ser que el contexto requiera algo distinto, se entenderá la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, implica la inclusión de un elemento o de un entero o de un grupo de elementos o de enteros especificados, pero no la exclusión de ningún otro elemento o entero o grupo de elementos o de enteros.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos son objeto de referencia mediante un número identificador de secuencia (Nº ID SEC:). Los N<sup>os</sup> ID SEC se corresponden numéricamente con los identificadores de secuencias <400>1, <400>2, etc. Se proporciona un listado de secuencias después de las reivindicaciones.

25 Un aspecto de la presente descripción está dirigido a una variante aislada del VHB, comprendiendo dicha variante una mutación de nucleótidos en un gen que codifica una ADN polimerasa que dé como resultado la sustitución de al menos un aminoácido a dicha ADN polimerasa del VHB seleccionada de una o más de N/S/H584T, N/S/H584A y H584I y presentando dicha variante una menor sensibilidad al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos.

30 Otro aspecto de la presente descripción proporciona una variante del VHB que comprende una mutación en un marco de lectura abierto con solapamiento en su genoma, estando dicha mutación en una región definida por uno o más de los dominios F y A a E de la ADN polimerasa del VHB y presentando dicha variante una menor sensibilidad al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos.

35 Otro aspecto adicional de la presente descripción proporciona una variante del VHB que comprende una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica una ADN polimerasa que dé como resultado una adición, una sustitución y/o una delección de aminoácidos en dicha ADN polimerasa en uno o más de los aminoácidos mostrados en las Fórmulas I y/o II:

40 FÓRMULA I L, B<sub>1</sub> B<sub>2</sub>, D, W, G, P, C, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, H, G, B<sub>5</sub>, H, B<sub>6</sub>, I, R, B<sub>7</sub>, P, R, T, P, B<sub>8</sub>, R, V, B<sub>9</sub>, G, G, V, F, L, V, D, K, N, P, H, N, T, B<sub>10</sub>, E, S, B<sub>11</sub>, L, B<sub>12</sub>, V, D, F, S, Q, F, S, R, G, B<sub>13</sub>, B<sub>14</sub>, B<sub>15</sub>, V, S, W, P, K, F, A, V, P, N, L, B<sub>16</sub>, S, L, T, N, L, L, S\*

en la que:

- B<sub>1</sub> es L, o R, o I
- B<sub>2</sub> es E, o D
- B<sub>3</sub> es T, o D, o A, o N, o Y
- B<sub>4</sub> es E, o D
- B<sub>5</sub> es E, o K, o Q
- B<sub>6</sub> es H, o R, o N
- B<sub>7</sub> es I, o T
- B<sub>8</sub> es A, o S
- B<sub>9</sub> es T o R
- B<sub>10</sub> es A, o T, o S
- B<sub>11</sub> es R, o T
- B<sub>12</sub> es V, o G
- B<sub>13</sub> es S, o I, o T, o N, o V
- B<sub>14</sub> es T, o S, o H, o Y
- B<sub>15</sub> es R, o H, o K, o Q

B<sub>16</sub> es Q, o P;

y

5 FÓRMULA I I S Z<sub>1</sub> L S W L S L D V S A A F Y H Z<sub>2</sub> P L H P A A M P H L L Z<sub>3</sub> G S S G L Z<sub>4</sub> R Y V A R L S S Z<sub>5</sub> S Z<sub>6</sub>  
 Z<sub>7</sub> X N Z<sub>8</sub> Q Z<sub>9</sub> Z<sub>10</sub> X X X Z<sub>11</sub> L H Z<sub>12</sub> Z<sub>13</sub> C S R Z<sub>14</sub> L Y V S L Z<sub>15</sub> L L Y Z<sub>16</sub> T Z<sub>17</sub> G Z<sub>18</sub> K L H L Z<sub>19</sub> Z<sub>20</sub> H P I Z<sub>21</sub> L G F  
 R K Z<sub>22</sub> P M G Z<sub>23</sub> G L S P F L L A Q F T S A I Z<sub>24</sub> Z<sub>25</sub> Z<sub>26</sub> Z<sub>27</sub> Z<sub>28</sub> R A F Z<sub>29</sub> H C Z<sub>30</sub> Z<sub>31</sub> F Z<sub>32</sub> Y M\* D D Z<sub>33</sub> V L G A  
 Z<sub>34</sub> Z<sub>35</sub> Z<sub>36</sub> Z<sub>37</sub> H Z<sub>38</sub> E Z<sub>39</sub> L Z<sub>40</sub> Z<sub>41</sub> Z<sub>42</sub> Z<sub>43</sub> Z<sub>44</sub> Z<sub>45</sub> Z<sub>46</sub> L L Z<sub>47</sub> Z<sub>48</sub> G I H L N P Z<sub>49</sub> K T K R W G Y S L N F M G Y Z<sub>50</sub> I  
 G

en la que:

- X es cualquier aminoácido;
- Z<sub>1</sub> es N o D;
- Z<sub>2</sub> es I o P;
- Z<sub>3</sub> es I o V;
- Z<sub>4</sub> es S o D;
- Z<sub>5</sub> es T o N;
- Z<sub>6</sub> es R o N;
- Z<sub>7</sub> es N o I;
- Z<sub>8</sub> es N o Y o H;
- Z<sub>9</sub> es H o Y;
- Z<sub>10</sub> es G o R;
- Z<sub>11</sub> es D o N;
- Z<sub>12</sub> es D o N;
- Z<sub>13</sub> es S o Y;
- Z<sub>14</sub> es N o Q;
- Z<sub>15</sub> es L o M;
- Z<sub>16</sub> es K o Q;
- Z<sub>17</sub> es Y o F;
- Z<sub>18</sub> es R o W;
- Z<sub>19</sub> es Y o L;
- Z<sub>20</sub> es S o A;
- Z<sub>21</sub> es I o V;
- Z<sub>22</sub> es I o L;
- Z<sub>23</sub> es V o G;
- Z<sub>24</sub> es C o L;
- Z<sub>25</sub> es A o S;
- Z<sub>26</sub> es V o M;
- Z<sub>27</sub> es V o T;
- Z<sub>28</sub> es R o C;
- Z<sub>29</sub> es F o P;
- Z<sub>30</sub> es L o V;
- Z<sub>31</sub> es A o V;
- Z<sub>32</sub> es S o A;
- Z<sub>33</sub> es V o L o M;
- Z<sub>34</sub> es K o R;
- Z<sub>35</sub> es S o T;
- Z<sub>36</sub> es V o G;
- Z<sub>37</sub> es Q o E;
- Z<sub>38</sub> es L o S o R;
- Z<sub>39</sub> es S o F;
- Z<sub>40</sub> es F o Y;
- Z<sub>41</sub> es T o A;
- Z<sub>42</sub> es A o S;
- Z<sub>43</sub> es V o I;
- Z<sub>44</sub> es T o C;
- Z<sub>45</sub> es N o S;
- Z<sub>46</sub> es F o V;
- Z<sub>47</sub> es S o D;
- Z<sub>48</sub> es L o V;
- Z<sub>49</sub> es N o Q;
- Z<sub>50</sub> es V o I; y
- M\* es el aminoácido 550;

y en la que S\* en la Fórmula I está designada como el aminoácido 420 y la primera S en la Fórmula II está designada como el aminoácido 421;  
y en la que dicha variante presenta menor sensibilidad al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos.

5 La presente invención contempla un procedimiento de determinación del potencial de que un VHB presente sensibilidad reducida a un análogo nucleósido, comprendiendo dicho procedimiento el aislamiento de ADN o del correspondiente ARNm de dicho VHB y la búsqueda de una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica la ADN polimerasa del VHB, lo que da como resultado que se seleccione al menos la mutación de un aminoácido de una o más de N/S/H584T, N/S/H584A y H584I, siendo la presencia de tal mutación una indicación de la probabilidad  
10 de resistencia a dicho análogo nucleósido.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona una composición que comprende una variante de VHB que comprende una mutación en la ADN polimerasa del VHB seleccionada de una o más de N/S/H584T, N/S/H584A y H584I resistente al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos o un antígeno de superficie del VHB de dicha variante del VHB o una forma recombinante o derivada de la misma o su equivalente químico y uno o  
15 más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto adicional de la presente descripción proporciona un uso de una variante de VHB en el que dicha variante comprende una mutación de nucleótidos en un gen que codifica una ADN polimerasa que dé como resultado al menos una adición o una sustitución de aminoácidos en dicha ADN polimerasa seleccionada de una o más de N/S/H584T, N/S/H584A y H584I resistente al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la hepatitis.  
20

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación diagramática que muestra el genoma parcialmente bicatenario del ADN del VHB que muestra los marcos de lectura abiertos con solapamiento que codifican los genes de superficie (S), centrales (C), de polimerasa (P) y X.  
25

La Figura 2 es una representación que muestra regiones conservadas de los dominios A a E (subrayadas) del VHB. M en YMDD está designada como el aminoácido número 550. El símbolo A\*≡ indica más de tres posibilidades de aminoácidos en esta posición de la secuencia de consenso. La Fórmula I de la presente memoria muestra la secuencia de consenso que define el dominio A.  
30

#### Descripción detallada de las realizaciones preferentes

La presente descripción se refiere, en parte, a la identificación y el aislamiento de variantes resistentes a análogos nucleósidos del VHB tras el tratamiento de pacientes con FAM y/o LAM y, opcionalmente, con otros análogos nucleósidos. En particular, los pacientes tratados con FAM y/o LAM dieron origen a variantes del VHB que presentaban una sensibilidad menor o reducida al FAM y/o a la LAM. La referencia en la presente memoria a  
35 "menor" o "reducida" en relación con la sensibilidad al FAM y/o a la LAM incluye y abarca una resistencia completa o sustancial al análogo nucleósido, así como una resistencia parcial, e incluye una tasa de replicación o eficacia de replicación que es superior a la del tipo natural en presencia de un análogo nucleósido. En un aspecto, esta medida por un aumento en la carga viral hasta un nivel similar o mayor que los niveles previos al tratamiento.

En consecuencia, un aspecto de la presente descripción va dirigido a una variante aislada del VHB, comprendiendo dicha variante una mutación de nucleótidos en un gen que codifica una ADN polimerasa que da como resultado la adición, la sustitución y/o la delección de al menos un aminoácido a dicha ADN polimerasa y presentando dicha variante menos sensibilidad al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos.  
40

Además de una mutación en el gen que codifica la ADN polimerasa, debido a la naturaleza solapada del genoma del VHB (Figura 1), también puede producirse una correspondiente mutación en el gen que codifica el antígeno de superficie (HBsAg) que dé como resultado una menor interactividad de reactivos inmunológicos tales como anticuerpos y células inmunológicas con el HBsAg. La reducción en la interactividad de los reactivos inmunológicos con un componente de la superficie viral generalmente incluye la ausencia de memoria inmunológica para reconocer o reconocer sustancialmente el componente de superficie viral. Por lo tanto, la presente invención describe, una variante del VHB que presenta menor sensibilidad al FAM y/o a la LAM e interactividad reducida de un reactivo  
45 inmunológico con el HBsAg, seleccionándose la variante para el tratamiento posterior con FAM y/o con LAM.

Por lo tanto, una variante viral puede llevar la mutación solamente en la ADN polimerasa o tanto en la ADN polimerasa como en el HBsAg. El término "mutación" ha de ser entendido en su contexto más amplio, e incluye mutaciones múltiples.  
50

En consecuencia, otro aspecto de la presente descripción proporciona una variante del VHB que comprende una mutación en un marco de lectura abierto con solapamiento en su genoma, estando dicha mutación en una región  
55

definida por uno o más dominios F y A a E de la ADN polimerasa del VHB y presentando dicha variante una menor sensibilidad al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos.

Otro aspecto preferente de la presente descripción contempla una variante del VHB que comprende una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica el HBsAg que da como resultado la adición, la sustitución y/o la delección de aminoácidos en dicho HBsAg en una región correspondiente a la secuencia de aminoácidos mostrada en las Fórmulas I y II y presentando dicha variante menor sensibilidad al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos.

Preferentemente, las variantes están en forma aislada, de modo que han experimentado al menos una etapa de purificación alejadas de un fluido corporal presente de forma natural. Alternativamente, las variantes pueden ser mantenidas en un fluido corporal aislado o pueden estar en forma de ADN. La presente descripción también va dirigida a clones moleculares infecciosos que comprenden el genoma o partes del mismo de una variante de VHB.

Las mutaciones en la ADN polimerasa del VHB incluyen, por ejemplo, variantes seleccionadas de pacientes con recurrencia del VHB tras un tratamiento con FAM y/o LAM. El tratamiento con un análogo nucleósido puede ocurrir en relación con un procedimiento de trasplante (por ejemplo, trasplante de médula ósea (BMT) o OLT) o tras un tratamiento de pacientes a los que se les ha diagnosticado hepatitis. Tras la selección de las variantes, son obtenibles cargas virales a niveles mayores que los niveles previos al tratamiento.

Las mutaciones en la ADN polimerasa del VHB incluyen, por ejemplo, una o más de Q471K, Q471N, Y472Q, T474A, L478L/M, N485H, Y487Y/PARADA, V/G/E488L, L493L/W, F524F/L, I533I/V, V537I, S548G, S548S/C, N/S/H584T, N/S/H584A, H584I, R588R/S e I599A. El término "PARADA" significa un codón de parada. También pueden producirse mutaciones correspondientes en el antígeno de superficie (es decir, HBsAg). Las del HBsAg incluyen, por ejemplo, una o más de T118R, N131T, M133K/M, M133I, C139C/G y W182/PARADA.

La identificación de las variantes de la presente invención permite la generación de una gama de ensayos para detectar tales variantes. La detección de tales variantes puede ser importante en la identificación de variantes resistentes para determinar la forma apropiada de quimioterapia y/o para monitorizar protocolos de vacunación y desarrollar preparaciones de vacunas nuevas o modificadas.

En consecuencia, otro aspecto de la presente descripción contempla un procedimiento para determinar el potencial de que un VHB presente sensibilidad reducida al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos, comprendiendo dicho procedimiento el aislamiento de ADN o del correspondiente ARNm de dicho VHB y la búsqueda de una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica la ADN polimerasa del VHB, lo que da como resultado la sustitución, la delección y/o la adición de al menos un aminoácido en uno cualquiera o más de los dominios F y A a E o de una región proximal a los mismos de dicha ADN polimerasa y está asociada con la resistencia o una menor sensibilidad al FAM y/o a la LAM, siendo la presencia de tal mutación una indicación de la probabilidad de resistencia a dicho FAM y/o dicha LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos.

Según la invención, el ensayo detecta una o más de las mutaciones siguientes en la ADN polimerasa del VHB: N/S/H584T, N/S/H584A y H584I.

La detección del VHB o de sus componentes en células, lisados celulares, fluido sobrenadante cultivado y fluido corporal puede efectuarse mediante cualquier medio conveniente, incluyendo cualquier medio de detección a base de ácidos nucleicos; por ejemplo, mediante técnicas de hibridación de ácidos nucleicos o mediante una o más reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). La expresión "fluido corporal" incluye cualquier fluido derivado de la sangre, la linfa, sistemas de tejidos u órganos, incluyendo suero, sangre completa, biopsia y fluido de biopsia, explantes de órganos y suspensión de órganos, tales como suspensiones hepáticas. La invención también abarca el uso de diferentes formatos de ensayo de dichos medios de detección a base de ácidos nucleicos, incluyendo polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismo de cadena monocatenaria (SSCP), detección por amplificación y discrepancia (AMD), reacción en cadena de la polimerasa de secuencia repetitiva intercalada (IRS-PCR), reacción en cadena de la polimerasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), entre otros. Otras formas de detección incluyen transferencias de Northern, transferencias de Southern, secuenciación PCR, procedimientos de anticuerpos, tales como ELISA, transferencia de Western e inmunohistoquímica. Un ensayo particularmente útil incluye los reactivos y los componentes requeridos para los sistemas de detección arbitrados por oligonucleótidos u oligopéptidos inmovilizados.

También se pueden detectar variantes con referencia al HBsAg. Las mutaciones preferentes del HBsAg incluyen una o más de T118R, N131T, M133K/M, M133I, C139C/G y W182/PARADA.

La detección de variantes de aminoácidos de la ADN polimerasa se logra convenientemente por referencia a la secuencia de aminoácidos de consenso mostrada en la Figura 2 y en las Fórmulas I y II. Los polimorfismos mostrados representan las variaciones mostradas en diversas bases de datos para cepas patógenas activas del VHB. Cuando una variante del VHB comprende un aminoácido diferente de lo que se representa, entonces se considera que tal aislado es una variante putativa del VHB que tiene una actividad alterada de la ADN polimerasa.

- La presente descripción contempla, además, agentes que inhiben las variantes del VHB resistentes al FAM y/o a la LAM. Tales agentes serán particularmente útiles si el clínico contempla un tratamiento a largo plazo con FAM y/o LAM y/u, opcionalmente, otros análogos nucleósidos. Los agentes pueden ser ADN o ARN o moléculas químicas proteináceas o no proteináceas. También se contempla la búsqueda de productos naturales, tales como los derivados de plantas, coral y microorganismos como una fuente potencial útil de agentes enmascarantes. Los agentes pueden estar en forma aislada o en forma de una composición farmacéutica y pueden ser administrados secuencial o simultáneamente con el análogo nucleósido.
- La presente descripción contempla un procedimiento de detección de un agente que presenta actividad inhibidora a un VHB con sensibilidad reducida al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos, comprendiendo dicho procedimiento:
- generar una estructura genética que comprende una cantidad eficaz competente para la replicación del genoma de dicho VHB resistente al famciclovir contenida o fundida en una cantidad de un genoma de baculovirus eficaz para infectar células y luego infectar dichas células con dicha estructura;
- poner dichas células, antes, durante y/o después de la infección, en contacto con el agente que ha de ser sometido a ensayo;
- cultivar dichas células durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el VHB y, opcionalmente, el VHB adicional se repliquen, expresen secuencias genéticas y/o ensamblen y/o liberen virus o partículas de tipo virus si son resistentes a dicho agente; y
- someter a las células, a los lisados celulares o al fluido sobrenadante del cultivo a medios de detección viral o de componentes virales para determinar si el virus ha sido replicado o no, ha expresado o no material genético y/o se ha ensamblado o no y/o se ha liberado o no en presencia de dicho FAM y/o dicha LAM.
- En una realización alternativa, la presente invención proporciona un procedimiento de detección de un agente anti VHB que presenta actividad inhibidora a un VHB con sensibilidad reducida al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos, comprendiendo dicho procedimiento:
- generar una estructura genética que comprende una cantidad eficaz competente para la replicación del genoma de dicho VHB contenida o fundida en una cantidad de un genoma de baculovirus eficaz para infectar células y luego infectar dichas células con dicha estructura;
- poner dichas células, antes, durante y/o después de la infección, en contacto con el agente que ha de ser sometido a ensayo;
- cultivar dichas células durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el VHB se replique, exprese secuencias genéticas y/o ensamble y/o libere virus o partículas de tipo virus si son resistentes a dicho agente; y someter a las células, a los lisados celulares o al fluido sobrenadante del cultivo a medios de detección viral o de componentes virales para determinar si el virus ha sido replicado o no, ha expresado o no material genético y/o se ha ensamblado o no y/o se ha liberado o no en presencia de dicho FAM y/o dicha LAM.
- En una realización alternativa adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento de detección de un agente anti VHB que presenta actividad inhibidora a un VHB con sensibilidad reducida al FAM y/o a la LAM y, opcionalmente, a otros análogos nucleósidos, comprendiendo dicho procedimiento:
- generar una línea celular continua que comprende una copia infecciosa del genoma de dicho VHB en una cantidad eficaz competente para la replicación de modo que dicho genoma infeccioso del VHB se integre de manera estable en dicha línea celular continua, tal como, sin limitación, 2.2.15 o AD;
- poner dichas células en contacto con el agente que ha de ser sometido a ensayo;
- cultivar dichas células durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el VHB se replique, exprese secuencias genéticas y/o ensamble y/o libere virus o partículas de tipo virus si son resistentes a dicho agente; y
- someter a las células, a los lisados celulares o al fluido sobrenadante del cultivo a medios de detección viral o de componentes virales para determinar si el virus ha sido replicado o no, ha expresado o no material genético y/o se ha ensamblado o no y/o se ha liberado o no en presencia de dicho FAM y/o dicha LAM.
- La presente descripción describe, además, un HBsAg aislado de las variantes del VHB descritas en la presente memoria. Más en particular, la presente descripción proporciona un HBsAg o una forma recombinante del mismo o un derivado o un equivalente químico del mismo. El componente de superficie aislado y, más en particular, el antígeno de superficie aislado o sus equivalentes recombinante, derivado o químico son útiles en el desarrollo de composiciones biológicas tales como formulaciones de vacunas.

En consecuencia, la presente descripción contempla una composición que comprende una variante de VHB resistente al famciclovir o a un antígeno de superficie del VHB de dicha variante del VHB o a una forma recombinante o derivada de la misma o su equivalente químico. La composición puede ser considerada una composición biológica.

- 5 Generalmente, si se usa un VHB, es atenuado primero. La composición biológica según este aspecto de la presente invención generalmente comprende, además, uno o más vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

La composición biológica puede comprender el HBsAg o una molécula semejante de una variante del VHB, o la composición puede ser un cóctel de varios HBsAg o moléculas semejantes de una gama de variantes del VHB resistentes al FAM y/o a la LAM. Se aplican inclusiones similares cuando la composición comprende un VHB.

- 10 La presente invención se extiende a juegos de ensayos para una variante de VHB que comprende una mutación en la ADN polimerasa del VHB seleccionada de una o más de N/S/H584T, N/S/H584A y H584I resistentes al FAM y/o a la LAM. Tales juegos pueden contener, por ejemplo, los reactivos provenientes de la PCR o de otra tecnología de hibridación de ácidos nucleicos o reactivos para técnicas de detección basadas en la inmunología. Un ensayo particularmente útil incluye los reactivos y los componentes requeridos para los sistemas de detección arbitrados por  
15 oligonucleótidos u oligopéptidos inmovilizados.

- La presente invención contempla, además, el uso de una variante de VHB resistente al FAM y/o a la LAM, comprendiendo dicha variante una mutación de nucleótidos en un gen que codifica una ADN polimerasa que da como resultado que la sustitución de al menos un aminoácido a dicha ADN polimerasa se seleccione de una o más de N/S/H584T, N/S/H584A y H584I en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la hepatitis.  
20

- La presente invención también contempla el uso de las presentes variantes del VHB para buscar agentes antivirales. Estos agentes antivirales inhiben el virus. El término "inhibir" incluye contrarrestar o prevenir de otra manera la infección, la replicación, el ensamblado y/o la liberación o cualquier etapa intermedia. Los agentes antivirales preferidos influyen análogos nucleósidos; sin embargo, la presente invención se extiende a moléculas no nucleósidas.  
25

- En consecuencia, otro aspecto de la presente invención contempla el uso de una variante del VHB resistente al FAM y/o a la LAM, comprendiendo dicha variante una mutación de nucleótidos en un gen que codifica una ADN polimerasa que da como resultado que la sustitución de al menos un aminoácido a dicha ADN polimerasa se seleccione de una o más de N/S/H584T, N/S/H584A y H584I para buscar un agente antiviral capaz de inhibir dicha variante del VHB.  
30

- La presente descripción versa, además, sobre una variante del VHB que comprende la mutación S548G o la S548C seleccionada tras el tratamiento con LAM de un paciente sometido previamente a una terapia con FAM/HBIG antes de un trasplante de hígado. La mutación S548G se produjo concurrentemente con las mutaciones L526M, M550V y Y472Q detectadas por secuenciación de clones derivados de un producto amplificado por PCR. En un VHB aislado de un paciente tratado con LAM se detectó una mutación adicional: la S548S/C.  
35

La presente invención es descrita adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

#### Ejemplo 1

##### Pacientes y tratamiento

- 40 Fueron estudiados ocho pacientes que recibieron BMT alógeno en el Centro de Trasplantes de Médula Ósea en el Hospital Queen Mary, de Hong Kong. Todos fueron tratados con FAM como profilaxis contra la reactivación del VHB tras el BMT, según se había documentado previamente (23). Brevemente, todos los pacientes recibieron 250 mg de FAM oral tres veces al día durante al menos una semana (intervalo: 1-12 semanas) antes del BMT y luego siguieron recibiendo 24 semanas después del BMT. Los niveles de FAM fueron incrementados hasta 500 mg tres veces al día en pacientes que presentaron ya fuera niveles elevados de ADN de VHB o la detección inicial del HBsAg como  
45 marcador de la reactivación del VHB. Dos pacientes fueron tratados con FAM y/o LAM después de un trasplante de hígado.

- El ensayo de cuantificación del ADN del VHB en el suero y de serología de la hepatitis, los marcadores serológicos de la hepatitis B, incluyendo los HBsAg, anti-HB, HBeAg, anti-HBe, el antígeno de la hepatitis C (VHC; de EIA II), el antígeno de la hepatitis D y el anti VIH fueron analizados mediante inmunoensayos enzimáticos disponibles comercialmente (Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, EE. UU.). El anticuerpo central total de la hepatitis B (anti-HbC) fue analizado mediante radioinmunoensayo (Corab, Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, EE. UU.). El ADN del VHB sérico fue cuantificado mediante el ensayo de amplificación de señal de ADNr (bDNA Quantiplex TM HBV DNA, Chiron, Emeryville, California, EE. UU.). Para minimizar la variación entre ensayos, fueron sometidas a ensayo muestras secuenciales dentro de una sola tanda.  
50

- 55 Ejemplo 2

Extracción de ADN del VHB de suero del paciente

Se recogieron sueros de 10 pacientes en varios puntos temporales y se extrajo el ADN del VHB. Se mezclaron partes alícuotas de 50 µl de los sueros con 150 µl de TE (10 mmol/L de Tris-HCl (pH 7,5), 2 mmol/l de EDTA), 1% p/v de dodecilsulfato sódico y 1 mg/ml de proteinasa K y fueron incubadas a 55°C durante 30 minutos. El ADN fue desproteinizado con fenol/cloroforno, precipitado con isopropanol y disuelto en 40 µl de agua sin nucleasas.

Ejemplo 3

Amplificación por PCR

Se amplificaron el dominio catalítico de la proteína polimerasa y el determinante "a" de la proteína de superficie. En la amplificación se usaron el cebador codificante (5'GCC TCA TTT T GTG GGT CAC CAT A-3' [N° ID SEC:1]) y el cebador no codificante (5'-TCT CTG ACA TAC TTT CCA AT-3' [N° ID SEC:2]) de la primera ronda (Bresatec, Adelaida, Australia). Cada reacción se llevó a cabo usando 5 µl del ADN extraído como plantilla, 1,5 U de polimerasa Taq (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Connecticut), 1 µmol/l de cebadores codificantes y no codificantes, 200 µmol/l de Tris-HCl (pH 8,3) y 0,01% p/v de gelatina. Se llevó a cabo la PCR mediante 40 ciclos de desnaturalización (94°C durante 45 segundos), hibridación (55°C durante 45 seg) y extensión (72°C durante 1,5 min), seguido por una extensión final de 7 min (Perkin-Elmer 2400, Cetus, Norwalk, Connecticut). Cuando hizo falta, se llevó a cabo una ronda adicional semianidada de amplificación usando 2 µl del producto de la primera ronda como plantilla y cebador 5' CAC AAC AAT CCA CCA AGC T3' [N° ID SEC:3] como cebador codificante. Las condiciones de amplificación fueron las mismas de la ronda inicial de amplificación, con solo 25 rondas de ciclo.

Ejemplo 4

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

Los productos amplificados fueron purificados mediante gel usando GeneClean II (BIO 101 Inc., La Jolla, California) y fueron secuenciados directamente usando el ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit según las especificaciones del fabricante (Perkin Elmer, Cetus Norwalk, Connecticut). Como cebadores de secuenciación se usaron cebadores de PCR, así como varios cebadores adicionales (5'-AAA TTC GCA GTC CCC AAC-3 [N° ID SEC:4]', 5'-TCT CTG ACA TAC TTT CCA AT-3' [N° ID SEC:5] y 5'-GAT TCC CTC CTG TTG CTG T-3' [N° ID SEC:6]) requeridos para secuenciar las regiones internas de los productos de la PCR. Se usaron MacVector y Assembly LIGN (MacVector versión 6.0 y Assembly LIGN, Oxford Molecular, Reino Unido) para analizar todos los datos automáticos de secuencias. Las secuencias de aminoácidos deducidas fueron comparadas con el aislado individual previo al tratamiento usando el subprograma ClustalW y con la secuencia publicada de consenso de la VHB polimerasa y las secuencias de HBsAg (38-40).

Ejemplo 5

Mutaciones de la VHB polimerasa

En este estudio, las variantes dominantes del VHB seleccionadas después del BMT y del tratamiento con FCV fueron examinadas mediante secuenciación de la región analítica del gen de la polimerasa y el determinante "a" del HBsAg. Se detectaron varios de los cambios deducidos de aminoácidos en la región catalítica del gen que codifica la VHB polimerasa; sin embargo, la mayoría de estos cambios eran coherentes con los cambios normalmente encontrados dentro de los genotipos del VHB. En la Tabla 1 están enumeradas las mutaciones únicas del VHB detectadas durante el tratamiento. En seis de ocho pacientes, se detectó una mutación en la polimerasa en el aminoácido 584, en la que se detectó (Tabla 1) una tirosina, o alanina, o serina/isoleucina (población mixta). En cuatro de ocho pacientes, esta mutación fue detectada durante el tratamiento con FAM y, en los dos pacientes restantes, la mutación fue detectada antes del tratamiento. Este cambio de aminoácidos ocurrió después del codón de terminación del HBsAg en el marco de lectura con solapamiento. Los otros cambios deducidos de aminoácidos que fueron detectados en aislados de múltiples pacientes incluyeron cambios en los aminoácidos 471, 474, 485 y 499. Estos cambios estaban ubicados en la región entre los dominios A y B y se solapaban con el determinante "a" del HBsAg. Se detectó un cambio en el dominio B de la polimerasa en F524F/L. En el dominio C no se detectó ninguna mutación única que contuviera el motivo "YMDD". Los cambios que no afectan al HBsAg y afectan únicamente a la polimerasa incluyen Q471K, T474A, L478L/M, F524F/L e I533I/V (Tabla 1).

En dos de los dos pacientes de trasplante de hígado, se detectó una mutación en el codón 548. La mutación S548G ocurrió concurrentemente con las mutaciones L526M, M550V e Y472Q, detectadas mediante secuenciación de clones derivados del producto amplificado por PCR. En un VHB aislado de un paciente tratado con LAM se detectó una mutación adicional: la G548S/C.

Ejemplo 6

Mutaciones del HBsAg

Se detectaron varios de los cambios en el gen que codifica el HBsAg; sin embargo, la mayoría de estos cambios eran coherentes con los cambios en el genotipo del VHB. En la Tabla 1 están enumeradas las mutaciones únicas que alteran tanto el HBsAg como la polimerasa, y en la Tabla 2 están enumeradas otras mutaciones que alteran el HBsAg solamente. Los cambios del HBsAg detectados en 133, 139, 145 y 182 son variantes que no se detectan en otros genotipos (39,40). En dos pacientes, se detectó una mutación G145R después de un BMT y de tratamiento con FAM. En uno de estos pacientes, fue detectada como una población mixta que contenía el virus del tipo natural y el virus con un HBsAg truncado debido a un codón de terminación. En otros dos pacientes se detectaron dos mutaciones resultantes en un HBsAg truncado. Estos codones de terminación se encontraron en los aminoácidos 182 y 216 (Tablas 1 y 2).

5

10 Ejemplo 7

Clonación de productos de PCR

Los productos de PCR provenientes de la amplificación por PCR ya fuera de la primera ronda o de la segunda fueron purificados usando GeneClean (Bio 101 Inc., La Jolla, California) y clonados en pPCR-Script (Stratagene) según las especificaciones del fabricante.

15

TABLA 1 Mutaciones y cambios de la VHB polimerasa en el marco solapado de lectura del HBsAg

Mutación de la VHB polimerasa	Aislado	Cambio AA en el HBsAg
Q471K Q471N	A-3, 4,5; D-1,2,3; F-3	sin cambio
Y472Q	SS	T1184
T474A	C-2; D-1,2; E-5	sin cambio
L478L/M	E-6	sin cambio
N485H	A-3,4,5; B-1,2; D-4	N131T
Y487Y/PARADA	C-6	M133K/M
V/G/E488L	B1,2	M133I*
L493L/W	A-4	C139C/G*
F524F/L	E-6	sin cambio
I533I/V	E-5	sin cambio
V537I	E-9	W182/PARADA
S548G	SS	sin cambio
S548S/C	MS	sin cambio
N/S/H584T N/S/H584A H584I	A-2; B-3; E-4; H-1,2,3,4,5,6 C-1,3,4,5,6 D-5	después de la PARADA del HBsAg
R588R/S	B-4	después de la PARADA del HBsAg
I599A	F-10	después de la PARADA del HBsAg

\* Cambios que no son detectados como variantes comunes en otros genotipos de VHB.

TABLA 2 Cambios en el HBsAg que no alteran la proteína de la VHB polimerasa

HBsAg	Aislado
Y225F	A3,4,5; D-4; F-3
Q181E	C-1
Q181G	C-2,3,4,5
Q181Q/G	C-6
S210K	C1,3,4,5
L216/PARADA	C1, C6
L216L/PARADA	C,3,4,5
S117T	E-9
L175L/S	E-6

Bibliografía

- 20 1. Summers, J. y Mason, W. Cell 29: 403-415, 1982.
2. Vere Hodge, R.A. Antiviral Chem. Chemother 4: 67-84, 1993.
3. Boyd y otros. Antiviral Chem. Chemother 32: 358-363, 1987.
- 25 4. Kruger y otros. Hepatology 22: 219A, 1994.

5. Main y otros. *J. Viral Hepatitis* 3: 211-215, 1996.
6. Severini y otros. *Antimicrobiol. Agents Chemother* 39: 1430-1435.
- 5 7. Dienstag y otros. *New England J. Med.* 333: 1657-1661, 1995.
8. Lau y otros. *Bone Marrow Transplant* 19: 795-9, 1997.
9. Reed y otros. *Blood* 77: 195-200, 1991.
- 10 10. Pariente y otros. *Dig Dis Sci* 33: 1185-91, 1988.
11. Liang y otros. *J. Clin. Oncol.* 1999 (en prensa).
- 15 12. Chen y otros. *Transplantation* 49: 708-13, 1990.
13. Ilan y otros. *Gastroenterology* 104: 1818-21, 1993.
14. Lok y otros. *Ann. Intern. Med.* 116: 957, 1992.
- 20 15. Ustun y otros. *Hepatology* 25: 1497-1501, 1997.
16. Lau y otros. *Hepatology* 25: 1497-1501, 1997.
- 25 17. Lau y otros. *J. Infect. Dis.* 178: 1585-91, 1998.
18. Shaw y otros. *Antimicrob. Agents Chemother* 38: 719-23, 1994.
19. Bartholomeusz y otros. *Intervirology* 40: 337-42, 1997.
- 30 20. Tsiquaye y otros. *J. Med. Virol.* 42: 306-10, 1994.
21. Trepo y otros. *J. Hepatol.* 26(1): 74, 1997.
- 35 22. Main y otros. *Viral Hepat.* 3: 211-5, 1996.
23. Lau y otros. *J. Hepatol.* 28: 359-68, 1998.
24. Lau y otros. *Hepatology* 28: 590A, 1998.
- 40 25. Kruger y otros. *Liver Transpl. Surg.* 2: 253-62, 1996.
26. Singh y otros. *Transplantation* 63: 1415-9, 1997.
- 45 27. Haller y otros. *Transpl. Int.* 9(1): S210-2, 1996.
28. Böker y otros. *Transplantation Jun* 27; 57: 1706-8, 1994.
29. Lau y otros. *Hepatology* 29: 580A, 1998.
- 50 30. Aye y otros. *J. Hepatol.* 26: 1148-53, 1997.
31. Naumov, N.V. *J. Hepatol.* 24: 282A, 1996.
- 55 32. Pichoud y otros. *Hepatology* 29: 230-37.
33. Locarnini y otros. *Hepatology* 29: 230-37, 1999.
34. Protzer-Knoll y otros. *Hepatology* 27: 254-63, 1998.
- 60 35. Locarnini y otros. *Hepatology* 26: 368A, 1997.
36. De Man y otros. *Hepatol.* 29: 669-75, 1998.
- 65 37. Poch y otros. *EMBO J* 8: 3867-3874, 1989.

38. Bartholomeusz y otros. International Antiviral News 5: 123-124, 1997.

39. Norder y otros. J Gen Virol 74: 1341-1348, 1993.

5 40. Norder y otros. Virology 198: 489-503, 1994

41. Lesburg y otros. Nature 6: 937-943, 1999.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Melbourne Health The University of Hong Kong The Austin and Repatriation Medical Centre University of Sydney

<120> VARIANTES VIRALES Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LAS MISMAS

<130> 2422733/EJH

<150> AU PQ8109

15 <151> 2000-06-09

<160> 6

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 23

20 <212> ADN

<213> cebador

<400> 1

gcctcatttt gtgggtcacc ata 23

<210> 2

25 <211> 20

<212> ADN

<213> cebador

<400> 2

tctctgacat acttccaat 20

30 <210> 3

<211> 19

<212> ADN

<213> cebador

<400> 3

35 cacaacaatc caccaagct 19

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> cebador

40 <400> 4

aaattcgag tccccaac 18

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

45 <213> cebador

<400> 5

tctctgacat acttccaat 20

<210> 6

<211> 19

50 <212> ADN

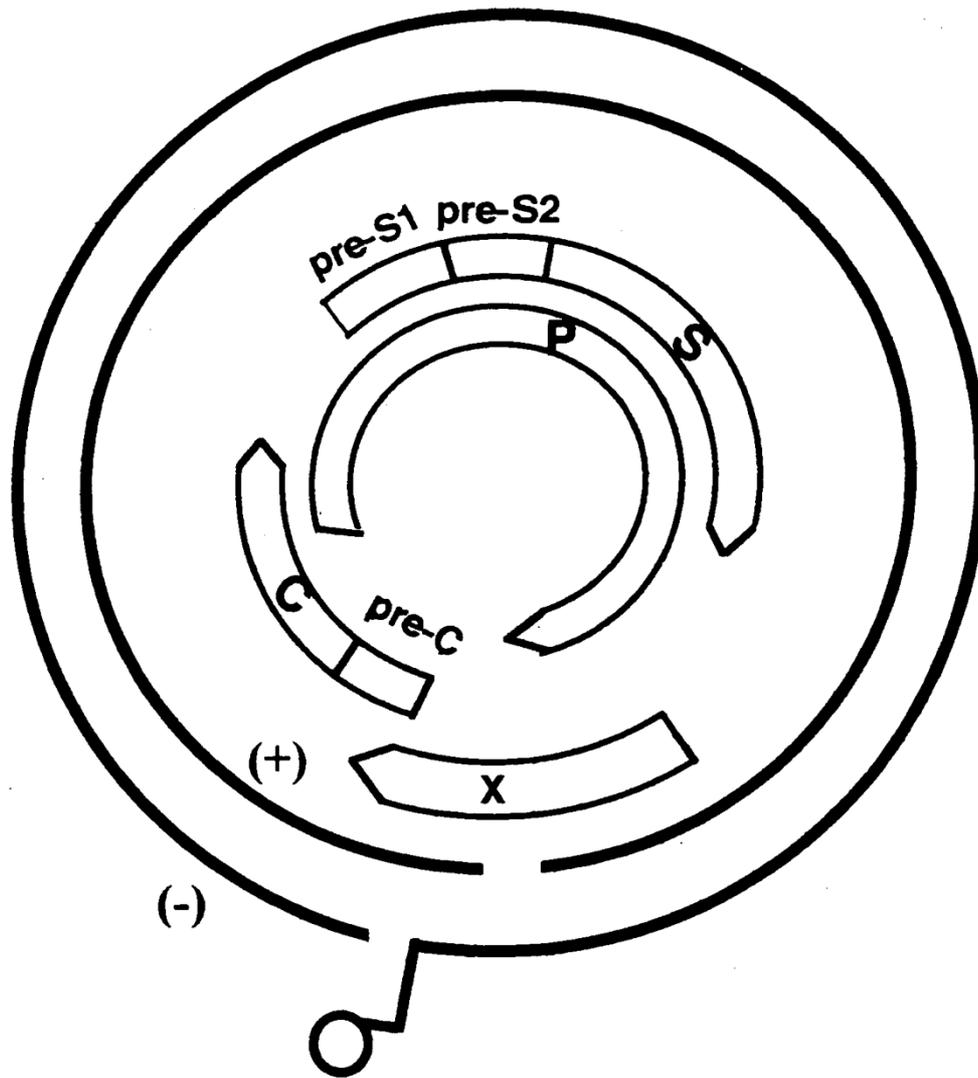
<213> cebador

<400> 6

gattccctcc tgggtgtg 19

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de determinación del potencial para que un VHB presente sensibilidad reducida a un análogo nucleósido, comprendiendo dicho procedimiento el aislamiento de ADN o del correspondiente ARNm de dicho VHB y la búsqueda de una mutación en la secuencia de nucleótidos que codifica la ADN polimerasa del VHB, lo que da como resultado que se seleccione al menos la mutación de un aminoácido de una o más de N/S/H584T, N/S/H584A y H584I, siendo la presencia de tal mutación una indicación de la probabilidad de resistencia a dicho análogo nucleósido.



**Figura 1**

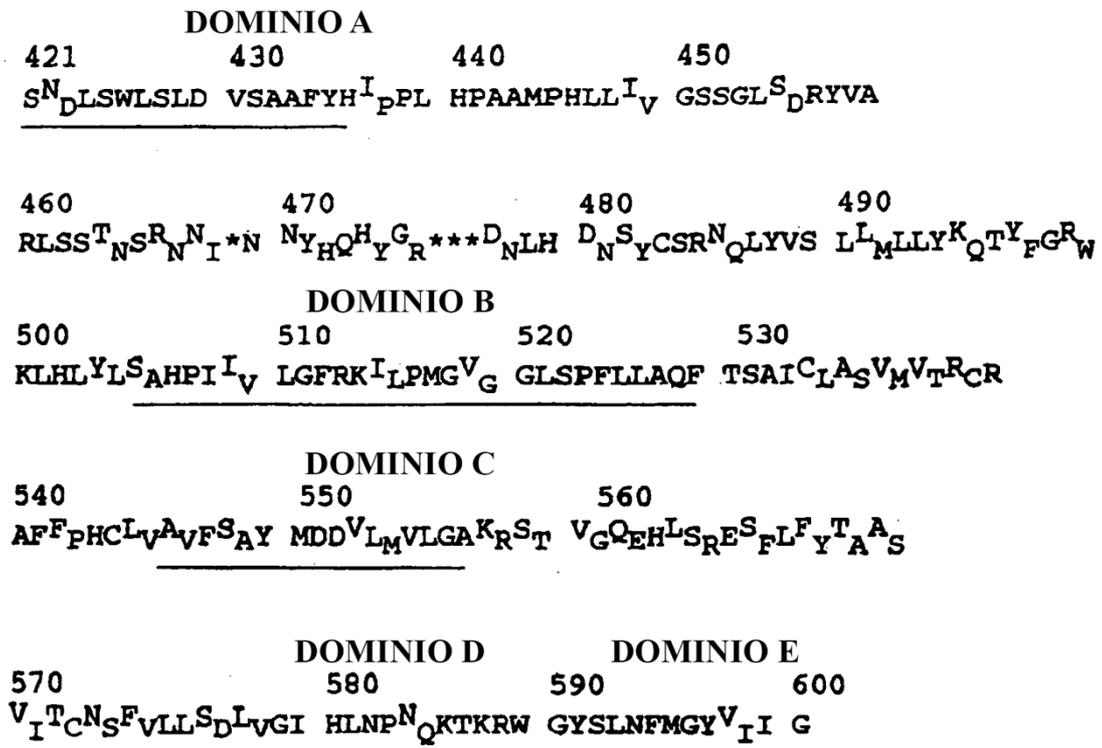


Figura 2