



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 358 824**

② Número de solicitud: 200930166

⑤ Int. Cl.:
C12N 9/12 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **13.05.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.05.2011

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑦ Inventor/es: **Álvarez García, María del Mar;**
Matamoros Grande, Tania y
Menéndez Arias, Luis

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Retrotranscriptasa del VIH-1 de grupo O modificada.**

⑤ Resumen:

Retrotranscriptasa del VIH-1 de grupo O modificada.
La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Más concretamente, se refiere a retrotranscriptasas aisladas de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) de grupo O y modificadas en la posición 75 y/o en la posición 478, que presentan una elevada fidelidad de copia y termoestabilidad, así como a su uso para llevar a cabo la retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ácido nucleico molde. La invención se refiere, además, a un método para obtener dichas retrotranscriptasas.

ES 2 358 824 A1

DESCRIPCIÓN

Retrotranscriptasa del VIH-1 de grupo O modificada.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Más concretamente, se refiere a retrotranscriptasas aisladas de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) de grupo O y modificadas que presentan una elevada fidelidad de copia y termoestabilidad, así como a su uso para llevar a cabo la retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ácido nucleico molde. La invención se refiere, además, a un método para obtener dichas retrotranscriptasas.

10

Estado de la técnica anterior

15 La enzima responsable de la replicación del genoma de los retrovirus se denomina retrotranscriptasa (RT) (o transcriptasa inversa). Esta enzima convierte el ARN genómico monocatenario en ADN bicatenario capaz de integrarse en el genoma de la célula hospedadora [revisado por Telesnitsky y Goff. En *Retroviruses*. Coffin *et al.* (ed.), p. 121-160, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview EE.UU., 1997]. Se trata de una polimerasa capaz de sintetizar ADN, utilizando como molde ARN ó ADN, indistintamente. Además, la RT posee actividad endonucleasa (RNasa H), que le permite degradar el molde ARN durante el proceso de síntesis de ADN dependiente de ARN.

20 Por tanto, las RTs de retrovirus son enzimas útiles para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero, que una vez amplificado por técnicas convencionales [reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo] puede utilizarse para detectar expresión génica en organismos o tejidos. A partir de librerías de ADNc es posible seleccionar transcritos de genes que una vez amplificados por PCR pueden ser clonados en plásmidos o vectores virales. Para estas aplicaciones resulta interesante disponer de RTs que presenten una mayor estabilidad térmica, es decir, que retengan actividad polimerasa a temperaturas relativamente elevadas, ya que en estas condiciones disminuirían los niveles de estructura secundaria en el ARN y mejoraría el proceso de amplificación. Por otro lado, las RTs son enzimas que carecen de actividad exonucleasa y por tanto, son polimerasas con una tasa de error relativamente alta, por lo que un aumento de su fidelidad sería deseable si lo que se pretende es clonar los productos derivados del ADNc generado durante la retrotranscripción.

30

35 Se han aislado y purificado RTs de diversos retrovirus. Entre ellas podemos citar, las del virus de mieloblastosis de aves (AMV), del virus Moloney de la leucemia de ratón (MLV) (Coté y Roth. *Virus Res* 2008; 134: 186-202), del virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV), del virus de la inmunodeficiencia de bóvidos (BIV), del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), del virus de la leucemia de bóvidos (BLV), y de espuma-retrovirus (revisado en Hizi y Herschhorn. *Virus Res* 2008; 134: 203-220); además de las RTs de virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y tipo 2 (VIH-2) y de la inmunodeficiencia de simios (SIV).

40 Desde un punto de vista metodológico las RTs más utilizadas comercialmente en reacciones de amplificación son las de MLV, AMV y VIH-1. En el caso de la RT del VIH-1, la enzima de referencia en este tipo de análisis es una variante "wild-type", que se clasifica filogenéticamente como perteneciente a subtipo B (grupo M). La RT del VIH-1 (subtipo B) es más estable que la RT del MLV a temperaturas superiores a 45°C.

45 La expansión de la epidemia del SIDA y la caracterización de aislados virales del VIH en diferentes partes del mundo ha permitido constatar su gran heterogeneidad y ha conducido a la identificación de variantes de la RT alejadas filogenéticamente de la RT del VIH-1 de subtipo B. Entre ellas, las más alejadas son las pertenecientes al grupo O, que se caracterizan por presentar alrededor de un 20% de aminoácidos distintos cuando se comparan con secuencias prototipo "wild-type" de subtipo B (Quiñones-Mateu *et al.* *Virology* 1997; 236: 364-373). Las RTs "wild-type" de grupo O son resistentes naturales a nevirapina y otros inhibidores no análogos a nucleósido y presentan mayor estabilidad en presencia de urea que las RTs de subtipo B (Menéndez-Arias *et al.* *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 27470-27479). Sin embargo, su expresión y purificación es difícil debido al escaso rendimiento de los procedimientos descritos hasta la fecha.

50 La caracterización de RTs obtenidas mediante mutagénesis dirigida ha permitido estudiar el papel de distintos cambios de aminoácido sobre la fidelidad de copia, así como la inactivación de la actividad RNasa H de la RT del VIH-1 (subtipo B). Sin embargo, el contexto de la secuencia ha demostrado ser de gran importancia (Taube *et al.* *Eur. J. Biochem.* 1997; 250: 106-114), por lo que no parece probable que una mutación analizada en la RT del VIH-1 subtipo B pueda ejercer el mismo efecto en una variante del VIH-1 filogenéticamente alejada como la RT del VIH-1 de grupo O.

60

Explicación de la invención

65 La presente invención se refiere a retrotranscriptasas (RTs) aisladas de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) de grupo O y modificadas que presentan una elevada fidelidad de copia y termoestabilidad, así como a su uso para llevar a cabo la retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ácido nucleico molde. La invención se refiere, además, a un método para obtener dichas RTs.

ES 2 358 824 A1

Las RTs de retrovirus son enzimas útiles, por ejemplo, para la obtención de ADN complementario a partir de ARN mensajero, que una vez amplificado puede ser clonado en un vector. Es deseable que las RTs que se utilicen con este fin presenten elevada estabilidad térmica, ya que en estas condiciones disminuirían los niveles de estructura secundaria en el ARN y mejoraría el proceso de amplificación. Sin embargo, las RTs son enzimas que carecen de actividad exonucleasa correctora de errores y por tanto, tienen una tasa de error relativamente alta, por lo que un aumento de su fidelidad sería deseable para poder ser empleadas con este fin.

En los ejemplos de la presente invención se describen mutantes de una RT aislada de un VIH-1 de grupo O (RT del VIH-1 de grupo O) cuya subunidad p66 ha sido modificada mediante la sustitución de la valina 75 por isoleucina (mutación V75I), de manera que se observa un incremento en su fidelidad de copia con respecto a la de la RT no modificada. Es importante tener en cuenta que las RTs del VIH-1 de grupo O portadoras de esta mutación presentan mayor fidelidad de copia y termoestabilidad que las RTs presentes en aislados o cepas del VIH-1 de grupo M subtipo B (RT del VIH-1 de subtipo B), empleadas actualmente con el mismo fin.

Sin embargo, la mutación V75I en la RT del VIH-1 de grupo O conduce a una pérdida de termoestabilidad con respecto a la RT no modificada. En los ejemplos de la presente invención se demuestra como la introducción de un segundo cambio de aminoácido (mutación) consistente en la sustitución del ácido glutámico de la posición 478 de la subunidad p66 por glutamina permite aumentar su termoestabilidad con respecto a la RT que únicamente presenta la mutación V75I. Por tanto, la presente invención, proporciona RTs con elevada termoestabilidad y fidelidad de copia, apropiadas para llevar a cabo la retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ácido nucleico molde.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una RT del VIH-1 de grupo O modificada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación que modifica dicha secuencia de aminoácidos en el residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1, en el que la RT modificada tiene una fidelidad de copia incrementada, con relación a la RT no modificada correspondiente.

Preferiblemente, dicha RT comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación de manera que el residuo que se corresponde con la posición 75 de la SEQ ID NO: 1 de esta secuencia de aminoácidos es isoleucina o una sustitución conservativa de isoleucina. Se entiende por sustitución conservativa de isoleucina aquella sustitución de isoleucina por otro aminoácido que presenta similares propiedades y permite la conservación de la función de la proteína que contiene dicha sustitución. Estas sustituciones conservativas, conocidas en el estado de la técnica, son sustituciones de isoleucina por leucina o metionina.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una RT del VIH-1 de grupo O modificada, que comprende una secuencia de aminoácidos, mutada según se ha descrito anteriormente, y que además tiene otra mutación que modifica dicha secuencia de aminoácidos en el residuo que corresponde a la posición 478 de la SEQ ID NO: 1, en el que la RT modificada tiene una termoestabilidad incrementada con relación a la RT modificada en el residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1.

Preferiblemente, dicha RT comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación de manera que el residuo que se corresponde con la posición 478 de la SEQ ID NO: 1 de esta secuencia de aminoácidos es glutamina o una sustitución conservativa de glutamina. Se entiende por sustitución conservativa de glutamina aquella sustitución de glutamina por otro aminoácido que presenta similares propiedades y permite la conservación de la función de la proteína que contiene dicha sustitución. Estas sustituciones conservativas, conocidas en el estado de la técnica, son sustituciones de glutamina por alanina, prolina, glicina, ácido aspártico, asparagina, serina o treonina.

De ahora en adelante utilizaremos la expresión "RT de la invención" para referirnos a una RT modificada según cualquiera de las características descritas anteriormente en la presente descripción.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos comprendida por la RT de la invención presenta una identidad de, al menos, un 90%, más preferiblemente, de, al menos, un 95% y, aún más preferiblemente, de, al menos un 98% con la SEQ ID NO: 1.

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una RT del VIH-1 de grupo O modificada que comprende la SEQ ID NO: 2.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una RT del VIH-1 de grupo O modificada que comprende la SEQ ID NO: 3.

Los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2) son los agentes etiológicos del SIDA en el hombre. Pertenecen al género *lentivirus* dentro de la familia *Retroviridae* (retrovirus), que poseen como una de sus principales características una enorme diversidad genética. El VIH-1 se ha clasificado en tres grupos: M, O y N. Del grupo M se conocen al menos 10 subtipos A-K, además de múltiples recombinantes de dichos subtipos (Buonaguro *et al.* J. Virol. 2007; 81: 10209-10219; Ramírez *et al.* Virus Res. 2008; 134: 64-73). El primer aislado de VIH-1 grupo O se obtuvo de pacientes infectados en 1987, y su secuencia de nucleótidos se publicó tres años más tarde (De Leys *et al.* J. Virol. 1990; 64: 1207-1216). Actualmente, se pueden obtener variantes del VIH-1 grupo O (por ejemplo, la cepa MVP5180/91) a través del NIH AIDS Research & Reference Reagent Program (<http://www.aidsreagent.org>) (Germantown, Maryland, EE.UU.)

ES 2 358 824 A1

La RT del VIH-1 es una enzima multifuncional que presenta actividades ADN polimerasa dependiente de ARN y de ADN y actividad endonucleasa o ribonucleasa H (RNasa H). Es un heterodímero constituido por dos subunidades, denominadas p66 y p51. La subunidad p51 posee 440 aminoácidos mientras que la p66 tiene 560. Aunque p51 y p66 comparten idéntica estructura primaria en sus primeros 440 residuos, los distintos subdominios contenidos en sus secuencias respectivas se orientan de forma diferente en ambas subunidades. La subunidad p66 participa de forma importante en la formación del surco en el que interacciona el complejo molde-cebador ya sea ARN/ADN o ADN/ADN, además del centro activo que interviene en la catálisis que conduce a la formación de enlaces fosfodiéster entre desoxirribonucleótidos 5'-trifosfato (dNTP) libres y el extremo 5' de la cadena de ADN que está siendo sintetizada. Por el contrario, la subunidad p51 tiene una función principalmente estructural.

Las subunidades p51 y p66 se generan a partir del procesamiento de la poliproteína Gag-Pol. Aunque no se conoce con exactitud cuáles son los intermediarios en el procesamiento de Gag-Pol que llevan a la formación del heterodímero funcional p66/p51, se sabe que *in vitro*, homodímeros p66/p66 pueden convertirse en heterodímeros p66/p51 por acción de la proteasa viral. Esta enzima realiza un corte endoproteolítico, entre los aminoácidos 440 y 441, en una de las dos cadenas que forman el homodímero.

El término "RT del VIH-1 de grupo O", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una retrotranscriptasa aislada de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 de grupo O. El término "RT del VIH-1 de subtipo B" se refiere a una retrotranscriptasa aislada de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 de grupo M subtipo B.

El término "retrotranscriptasa aislada del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1" se refiere a una proteína con actividad retrotranscriptasa que se encuentra sustancialmente o completamente libre de los componentes que normalmente lo acompañan o interactúan con ella en su forma natural. Puede obtenerse, por ejemplo, por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de la subunidad p66 de la retrotranscriptasa a partir del ARN viral obtenido de un aislado del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, y posterior clonaje en un vector de expresión.

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la subunidad p66 de la RT aislada de una cepa o de un aislado del VIH-1 grupo O. La subunidad p66 de la RT aislada de otras cepas u otros aislados del VIH-1 de grupo O presenta una identidad en su secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 de hasta el 90%.

Los términos "secuencia de aminoácidos" o "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

El término "fidelidad de copia" se refiere a la precisión de la polimerización, o la capacidad de la RT para discriminar entre los sustratos correctos e incorrectos (por ejemplo, nucleótidos) cuando está sintetizando moléculas de ácido nucleico que son complementarias a un ácido nucleico molde.

La fidelidad de la RT de la presente invención puede ser analizada mediante diferentes tipos de análisis, como por ejemplo, pero sin limitarnos, ensayos de fidelidad en cultivos celulares o ensayos de fidelidad *in vitro* (genéticos o bioquímicos).

Los ensayos de fidelidad en cultivos celulares se basan en el uso de un vector retroviral que contiene un gen marcador (como por ejemplo, pero sin limitarnos, *lacZα*, *timidina quinasa* o *neomicina*), además de todos los elementos necesarios para que tenga lugar la transcripción de las proteínas virales, su encapsidación, y la síntesis del ADN proviral. Este vector, del que se han eliminado genes esenciales como *gag*, *pol*, *env*, y/o genes accesorios, se introduce en una línea celular empaquetadora que le proporciona estos genes en *trans*, y el virus producido se utiliza para infectar células diana. En estas células, el vector es capaz de completar una ronda de replicación y de integrarse en el genoma de la célula diana para formar provirus. Una única ronda de replicación implica una etapa de transcripción de ARN por la ARN polimerasa II celular, y una etapa de retrotranscripción que incluye la síntesis de ADN dependiente de ARN de una cadena del ADN proviral, y la síntesis posterior de la segunda cadena del ADN proviral a través de la actividad ADN polimerasa dependiente de ADN de la RT. Dado que el provirus es incapaz de expresar proteínas virales esenciales, no ocurren ciclos adicionales de replicación. Seleccionando un cultivo celular apropiado, se pueden detectar los fenotipos natural o mutante del gen marcador, y obtener así frecuencias de mutación.

En los ensayos bioquímicos se utiliza la RT purificada para la determinación de constantes cinéticas sobre un molde ARN o ADN, bajo unas condiciones determinadas (pH, concentración de sustrato, etc...). De esta manera se pueden obtener los parámetros cinéticos de la fidelidad de copia de ADN (dependiente de ARN o ADN) de la RT, tanto en estado estacionario como preestacionario.

Los ensayos bioquímicos de incorporación errónea en el estado estacionario, se basan en la determinación de las constantes cinéticas (k_{cat} y K_m) para la incorporación de nucleótidos en el extremo 3' de un cebador y proporcionan una estimación de la selectividad de la RT por el nucleótido. La determinación de los parámetros cinéticos se lleva a cabo midiendo la incorporación de nucleótidos en el extremo 3' del cebador, previamente marcado en su extremo 5' con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP, en presencia de distintas concentraciones de dNTP, una vez formado el complejo binario RT/molde-
 5 cebador. Los productos resultantes son analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Los datos obtenidos se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten, y los parámetros k_{cat} (tasa de incorporación) y K_m (constante de Michaelis-Menten) son determinados para los nucleótidos correctos e incorrectos. La eficiencia de incorporación errónea (f_{inc}) se define como la relación entre la eficacia catalítica (k_{cat}/K_m) obtenida para el nucleótido incorrecto y la
 10 eficacia catalítica obtenida para el nucleótido correcto. Así, una mayor fidelidad de la RT implica una menor eficiencia de incorporación errónea.

Para que se produzca la fijación de un error en el ADN naciente, no es suficiente la incorporación de un nucleótido incorrecto, la RT debe ser capaz además, de elongar el extremo desapareado que se genera como consecuencia de esta incorporación errónea. Esta medida de fidelidad se lleva a cabo mediante ensayos de extensión de extremos
 15 desapareados. En estos ensayos se calculan las constantes cinéticas en estado estacionario para la incorporación de un nucleótido correcto sobre dos tipos de complejo molde-cebador: el complejo con el extremo 3' correctamente apareado y el mismo complejo con el extremo 3' desapareado. La eficiencia de extensión de extremos desapareados (f_{ext}) se define como la relación entre k_{cat}/K_m obtenida para la extensión del extremo desapareado y la obtenida para la
 20 extensión del extremo correctamente apareado.

Los ensayos bioquímicos en el estado preestacionario examinan la capacidad de la RT para unirse e incorporar el dNTP a tiempos muy cortos (como por ejemplo, del orden de milisegundos). De esta forma, es posible el cálculo de la constante de afinidad (K_d) para la interacción entre el dNTP y el complejo binario RT/molde-cebador, y de la constante de polimerización (k_{pol}). La eficiencia de incorporación errónea y de extensión de extremos desapareados se
 25 determina a partir de los valores de k_{pol}/K_d obtenidos para la incorporación de nucleótidos correctos o incorrectos, o los obtenidos para la incorporación de nucleótidos correctos sobre complejos molde-cebador que contienen un extremo 3'OH apareado o desapareado.

Los ensayos genéticos más utilizados, denominados “forward mutation assays”, se suelen llevar a cabo usando como molde-cebador de la reacción de síntesis de ADN, el ADN bicatenario del fago M13mp2, del cual se ha eliminado la zona correspondiente al gen *lacZ* de una de las hebras. La reacción de síntesis de ADN se realiza en presencia de la RT y de concentraciones altas de los dNTPs.
 30

Tras la transformación bacteriana con el producto de la reacción, los mutantes se identifican como placas azules/blancas en medio de cultivo que contiene X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -galactopiranosido) e IPTG (isopropil- β -tio-galactopiranosido). De este modo, si en la reacción de síntesis de ADN no se producen errores, el resultado es una placa azul oscuro. Por el contrario, la introducción de uno o varios errores implica la pérdida parcial o total de la α -complementación, lo que se traduce en placas azul claro o blancas. El ADN recuperado de estas placas puede ser secuenciado, para determinar exactamente el número, el tipo y la posición en el genoma de las mutaciones introducidas por la RT.
 35
 40

Otro tipo de ensayos genéticos son los ensayos de reversión. Estos ensayos se basan en el uso de moldes que contienen una mutación inactivante (típicamente, codones de terminación o inserciones de un nucleótido). La reversión de la mutación se traduce en la corrección del error y por lo tanto en la restauración de la actividad del gen marcador.
 45

El “incremento en la fidelidad de copia” puede medirse mediante la comparación de parámetros indicativos de la fidelidad de copia de las RTs de la invención y la RT no modificada. Estos parámetros pueden analizarse, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante cualquiera de los métodos anteriormente descritos en este documento.

Una RT con una fidelidad de copia “incrementada” o “aumentada” se define como una RT que tiene un incremento o un aumento significativo (aplicando criterios estadísticos) en la fidelidad de copia con respecto a la RT no modificada, típicamente de, al menos, 1,5 veces, más preferiblemente de, al menos, 2 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 3 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 4 veces. Por ejemplo, en ensayos bioquímicos de incorporación de nucleótido, se considera un aumento de fidelidad cuando el valor obtenido para la RT modificada es
 50 significativamente superior al de la no modificada (aplicando criterios estadísticos), típicamente, de al menos, 1,5 veces, preferiblemente, de al menos, 2 veces, más preferiblemente de, al menos, 3 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 4 veces. Por ejemplo, en ensayos genéticos (“forward mutation assays”) se considera fidelidad incrementada cuando hay un aumento significativo (aplicando criterios estadísticos) en la frecuencia de mutante obtenida por la RT modificada, típicamente de, al menos, un 50% (1,5 veces), preferiblemente, de al menos, 2 veces, más preferiblemente de, al menos, 3 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 4 veces.
 55
 60

La temperatura a la cual la actividad polimerasa (dependiente de ARN o ADN) de una RT es máxima se denomina temperatura óptima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica de la RT, de manera que su actividad polimerasa (dependiente de ADN o ARN) decrece. El término “termoestabilidad” se refiere a la estabilidad mostrada por una RT cuando se encuentra sometida a una temperatura elevada, por ejemplo, típicamente, una temperatura de, al menos, 45°C, preferiblemente de, al menos, 55°C, más preferiblemente de, al menos, 60°C y aún más preferiblemente de, al menos 65°C.
 65

ES 2 358 824 A1

La termoestabilidad de la RT de la presente invención puede ser analizada mediante diferentes tipos de análisis. La termoestabilidad de la RT de la presente invención, puede estimarse, por ejemplo, pero sin limitarse, midiendo la actividad específica ADN polimerasa a distintas temperaturas elevadas, utilizando un complejo molde-cebador, analizando la actividad RT residual después de someter a la enzima a una incubación a temperatura elevada durante
5 distintos intervalos de tiempo, analizando la vida media de la RT o midiendo la cantidad y/o la longitud del producto sintetizado por la RT a una elevada temperatura.

La “vida media” de una proteína es un parámetro que permite medir su termoestabilidad. Por ejemplo, la vida media de la actividad RT se refiere al tiempo en que la actividad polimerasa (dependiente de ARN o ADN) se reduce
10 a la mitad cuando la reacción de síntesis (dependiente de ARN o ADN) se realiza a una elevada temperatura.

Otros parámetros indicativos de la termoestabilidad de una RT son la cantidad y/o la longitud del producto sintetizado por la RT cuando la reacción de síntesis se realiza a una elevada temperatura. Por ejemplo, se puede obtener una estimación de la estabilidad de la RT, analizando la cantidad del producto obtenido mediante la RT en una RT-PCR. Para ello, se puede realizar primero una reacción de retrotranscripción empleando como ácido nucleico molde
15 ARN total a una temperatura elevada, y después el ADN complementario obtenido de la retrotranscripción se puede amplificar el producto de reacción mediante PCR. La cantidad de producto obtenido en estas reacciones constituye una medida de la estabilidad de la RT, a la temperatura en la que se ha llevado a cabo la reacción de retrotranscripción.

Una “reacción de síntesis a elevada temperatura”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una reacción y, más preferiblemente, una reacción de retrotranscripción (o transcripción inversa), que se realiza a una temperatura de, al menos, 45°C, preferiblemente de, al menos, 55°C, más preferiblemente de, al menos 60°C y aún más preferiblemente de, al menos, 65°C.

En algunas circunstancias, la RT de la invención puede mostrar un incremento de la termoestabilidad en presencia o en ausencia del ácido nucleico molde. Es conocido en el estado de la técnica que las RTs son, típicamente, más estables en presencia del ácido nucleico molde.

La expresión “termoestabilidad incrementada”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a que la RT del VIH-1 de grupo O modificada, que comprende una secuencia de aminoácidos, mutada en los residuos que corresponden a la posiciones 75 y 478 de la SEQ ID NO: 1, conserva su actividad a una temperatura de reacción de síntesis más elevada, o actúa más tiempo a la misma temperatura, que la RT que únicamente tiene una mutación en el residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1.

Una RT con termoestabilidad “incrementada” o “aumentada” se define como una RT que tiene un incremento o un aumento significativo (aplicando criterios estadísticos) en la termoestabilidad, típicamente de, al menos, 1,5 veces, más preferiblemente de, al menos, 2 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 3 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 4 veces, con respecto a la RT que únicamente tiene una mutación en el residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, cuando se estima la termoestabilidad mediante la cantidad del producto obtenido mediante la RT en una RT-PCR, se considera que la RT tiene una fidelidad de copia incrementada cuando la cantidad de producto obtenido mediante la RT-PCR tiene un incremento o un aumento significativo (aplicando criterios estadísticos), típicamente de, al menos 1,5 veces, preferiblemente de, al menos, 3 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 4 veces, con respecto a la RT que únicamente tiene una mutación en el residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “mutación” se refiere a una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido distinto. Los aminoácidos individuales en una secuencia se representan aquí como XN, en la que X es el aminoácido en la secuencia (designado mediante el código de una letra universalmente aceptado en la nomenclatura de aminoácidos), y N es la posición en la secuencia. Las mutaciones puntuales tipo sustitución en una secuencia de aminoácidos se representan aquí como X₁NX₂, en la que X₁ es el aminoácido en la secuencia de proteína no mutada, X₂ es el aminoácido en la secuencia de proteína mutada, y N es la posición en la secuencia de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos comprendida por la RT de la invención puede obtenerse mediante técnicas de ingeniería genética o recombinante bien conocidas en el estado de la técnica. Pueden obtenerse, por ejemplo, mutando el gen de la RT mediante mutagénesis dirigida o al azar. Preferiblemente, la mutación se introduce en la secuencia de aminoácidos mediante un cambio de codón adecuado en el polinucleótido que codifica para la RT. Más preferiblemente, los mutantes de la presente invención pueden obtenerse mediante la técnica de mutagénesis dirigida por oligonucleótido. Esta técnica consiste en el anillamiento de un oligonucleótido complementario (excepto por la presencia de uno o más nucleótidos desapareados) con la secuencia nucleotídica de la RT del VIH-1 de grupo O. El oligonucleótido parcialmente desapareado es entonces extendido por una ADN polimerasa, generando una molécula de ADN de cadena doble que contiene el cambio deseado en la secuencia de una de las cadenas. Los cambios introducidos en la secuencia tienen como consecuencia el cambio de un aminoácido por otro. El polinucleótido de doble cadena puede ser entonces insertado en un vector de expresión apropiado y el polipéptido mutante producido. La mutagénesis dirigida por oligonucleótido puede ser llevada a cabo, por ejemplo, mediante PCR.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención.

ES 2 358 824 A1

Los términos “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

5 Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un vector que comprende el polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención.

El vector puede ser, por ejemplo un vector de clonación o un vector de expresión. Preferiblemente, dicho vector es un vector apropiado para la expresión y purificación de la RT de la invención.

10 El término “vector de clonación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura.

15 El término vector de “expresión”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un vector de clonaje adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula, denominada célula huésped. Dicho ácido nucleico se encuentra, por lo general, unido operativamente a secuencias de control.

20 El término “expresión” se refiere al proceso por el cual se sintetiza un polipéptido a partir de un polinucleótido. Incluye la transcripción del polinucleótido en un ARN mensajero (ARNm) y la traducción de dicho ARNm en una proteína o un polipéptido.

25 El término “célula huésped”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier organismo procariota o eucariota que es recipiente de un vector de expresión, de clonación o de cualquier otra molécula de ADN.

30 El término “secuencia de control”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a secuencias nucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa. Ejemplos de secuencias de control, son por ejemplo, pero sin limitarse, promotores, señales de inicio de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, señales de poliadenilación o activadores transcripcionales.

35 La expresión “unidos operativamente”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a un polinucleótido, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

40 Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región del ADN, generalmente “aguas arriba” o “upstream” del punto de inicio de la transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles.

45 Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico. Ejemplos de promotores procariotas incluyen, por ejemplo, pero sin limitarnos, los promotores de los genes *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI*, *tet*, *gal*, *trc*, o *tac* de *E. coli*, o el promotor del gen α -*amylase* de *B. subtilis*. Para la expresión de un ácido nucleico en una célula procariota también es necesaria la presencia de un sitio de unión ribosomal situado “upstream” de la secuencia codificante. Secuencias de control apropiadas para la expresión de un polinucleótido en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica.

50 Utilizando técnicas bien conocidas, un experto en la materia será capaz de obtener un vector adecuado para la expresión de la secuencia de aminoácidos que comprende la RT de la invención en cualquier célula procariota o eucariota.

55 Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un vector que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención, donde dicho polinucleótido está unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

- 60 a) un promotor,
b) una señal de inicio de la transcripción,
c) una señal de terminación de la transcripción,
65 d) una señal de poliadenilación, o
e) un activador transcripcional.

ES 2 358 824 A1

Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un vector que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida por la RT de la invención, donde dicho polinucleótido está unido en fase de lectura a una secuencia nucleotídica que codifica para una etiqueta de purificación.

5 La expresión “etiqueta de purificación” o “etiqueta de afinidad”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una secuencia de aminoácidos que ha sido incorporada (generalmente, por ingeniería genética) a una proteína para facilitar su purificación. La etiqueta, que puede ser otra proteína o una secuencia corta de aminoácidos, permite la purificación de la proteína, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad. Algunos ejemplos de etiquetas de purificación conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse a: el péptido de unión a calmodulina (CBP), la enzima glutatión-S-transferasa (GST) o una cola de residuos de histidina. Preferiblemente, la etiqueta de purificación consiste en al menos 6 residuos de histidina.

10 De ahora en adelante utilizaremos la expresión “vector primero de la invención” para referirnos a un vector que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia comprendida en la RT de la invención, donde dicho vector presenta cualquiera de las características descritas anteriormente en la presente descripción.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un vector que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida por la RT de la invención y que, además, comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1. De ahora en adelante utilizaremos la expresión “vector segundo de la invención” para referirnos a un vector que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia comprendida en la RT de la invención, donde dicho vector presenta cualquiera de las características del vector primero de la invención, y que además comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.

20 En una realización preferida, la proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1 es la proteasa del VIH-1, una variante de la proteasa del VIH-1 o un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente.

25 El término “proteasa de VIH-1”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una proteasa aislada de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1. El término “proteasa aislada del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1” se refiere a una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1, que se encuentra sustancialmente o completamente libre de los componentes que normalmente lo acompañan o interactúan con ella en su forma natural. Puede obtenerse, por ejemplo, por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de la proteasa a partir del ARN viral obtenido de un aislado del VIH-1, y posterior clonaje en un vector de expresión. Preferiblemente, la proteasa del VIH-1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4. La SEQ ID NO: 4 corresponde a la secuencia de la proteasa del VIH-1 aislada de la cepa prototípica de grupo M-subtipo B NL4-3. En el virus, dicha proteasa forma homodímeros mediante la unión no covalente de sus subunidades.

30 En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteasa del VIH-1. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término “variante” incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranscripcionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

35 Tal como aquí se utiliza, una proteína es “sustancialmente homóloga” a la proteasa del VIH-1 cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%.

40 El término “fragmento”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de la proteasa del VIH-1 o de una sus variantes.

45 La expresión “funcionalmente equivalente”, tal como aquí se utiliza, significa que la proteína o el fragmento de la proteína en cuestión mantiene la capacidad de realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende el vector primero de la invención. De ahora en adelante utilizaremos la expresión “célula primera de la invención” para referirnos a una célula que comprende el vector primero de la invención.

ES 2 358 824 A1

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende el vector segundo de la invención. De ahora en adelante utilizaremos la expresión “célula segunda de la invención” para referirnos a una célula que comprende el vector segundo de la invención.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende el vector primero de la invención y que, además, comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1. De ahora en adelante utilizaremos la expresión “célula
10 tercera de la invención” para referirnos a una célula con dichas características.

De ahora en adelante utilizaremos la expresión “célula de la invención” para referirnos a la célula primera, a la célula segunda o a la célula tercera de la invención. La célula de la invención puede ser una célula procariota o eucariota. Preferiblemente, la célula de la invención es una célula procariota.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención que comprende:

- a) cultivar la célula de la invención, y
- 20 b) aislar la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT expresada en el paso (a) por dicha célula.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir la RT de la invención que comprende:

- 25 a) cultivar la célula de la invención, y
- b) aislar la RT expresada en el paso (a) por dicha célula.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la RT de la invención para la RT de un ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la RT de la invención para la amplificación de un ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la RT de la invención para la secuenciación de un ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm.

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de RT de un ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm, que comprende:

- a) mezclar dicho ácido nucleico molde con la RT de la invención, e
- 45 b) incubar la mezcla del paso (a) en condiciones que permitan la síntesis de ADN complementario al ácido nucleico molde.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de amplificación de un ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm, que comprende:

- 50 a) mezclar dicho ácido nucleico con la RT de la invención y con, al menos, una ADN polimerasa dependiente de ADN, e
- 55 b) incubar la mezcla del paso (a) en condiciones que permitan la amplificación de ADN complementario al ácido nucleico molde.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de secuenciación de un ácido nucleico, preferiblemente ARNm, que comprende:

- 60 a) poner en contacto dicho ácido nucleico con la RT de la invención,
- b) incubar dicha mezcla en condiciones que permitan la síntesis de una población de moléculas de ADN complementario al ácido nucleico molde, y
- 65 c) separar dicha población de moléculas de ADN complementario para determinar la secuencia de nucleótidos.

ES 2 358 824 A1

El término “retrotranscripción” o “transcripción inversa”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la síntesis de un ADN complementario a un ARN.

5 El término “amplificación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ácido nucleico molde. En una realización preferida, la amplificación tiene lugar mediante PCR.

El término “secuenciación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación del orden de los nucleótidos de un ácido nucleico molde.

10 El término “ácido nucleico molde”, “ácido nucleico templado”, “molde” o “templado”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico de cadena simple o de doble cadena que va a ser retrotranscrita, amplificada o secuenciada.

15 La expresión “condiciones que permitan la síntesis de ADN complementario” se refiere a las condiciones en las que puede tener lugar la incorporación de los nucleótidos a un ADN naciente mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde.

20 Generalmente las condiciones en las que tiene lugar la síntesis de ADN incluyen: (a) poner en contacto dicho ácido nucleico molde con la RT de la invención en una mezcla que además comprende un cebador, un catión bivalente, por ejemplo, Mg^{2+} , y nucleótidos, y (b) someter dicha mezcla a una temperatura suficiente para que una polimerasa de ADN, por ejemplo, la RT de la invención, inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y de lugar una población de moléculas de ADN complementario de diferente tamaño. La separación de dicha población de moléculas de ADN complementario permite determinar la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico molde.

25 La incorporación de nucleótidos mal apareados durante la síntesis del ADN complementario puede resultar en una o más bases desapareadas. Por tanto, la cadena de ADN sintetizada puede no ser exactamente complementaria al ácido nucleico molde.

30 La expresión “condiciones que permitan la síntesis de una población de moléculas de ADN complementario al ácido nucleico molde” se refiere a las condiciones en las cuáles se realiza la secuenciación, y que generalmente incluyen (a) poner en contacto dicho ácido nucleico molde con la RT de la invención en una mezcla que además comprende un cebador, un catión bivalente, (por ejemplo, Mg^{2+}), y nucleótidos, generalmente, dNTPs y, al menos, un ddNTP, y (b) someter dicha mezcla a una temperatura suficiente para que una polimerasa de ADN, por ejemplo, la RT de la invención, inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y de lugar a una población de moléculas de ADN complementario de diferente tamaño. La separación de dicha población de moléculas de ADN complementario, generalmente, mediante electroforesis, permite determinar la secuencia de nucleótidos.

40 El término “cebador”, como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando hibrida con el ácido nucleico molde. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de desoxirribosa.

45 Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los cebadores pueden diseñarse para hibridar con secuencias específicas de nucleótidos en el ácido nucleico molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

50 El término “cebador específico”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un cebador cuya secuencia es complementaria a una secuencia específica de nucleótidos en el ácido nucleico molde que se quiere retrotranscribir, amplificar o secuenciar.

55 El término “cebador arbitrario” se refiere a un cebador cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ácido nucleico molde que se quiere retrotranscribir, amplificar o secuenciar. Con frecuencia se emplea una población de distintos cebadores arbitrarios. El término “cebadores arbitrarios” se refiere a un conjunto de cebadores cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ácido nucleico molde que se quiere retrotranscribir, amplificar o secuenciar.

60 El término “hibridación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al apareamiento de dos moléculas de ácido nucleico (de ADN y/o ARN) de cadena simple complementarias para dar una molécula de doble cadena. Preferiblemente, la complementariedad es del 100%. Esto es, en la región de complementariedad cada nucleótido de una de las dos moléculas de ácido nucleico puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido presente en la otra molécula de ácido nucleico. Sin embargo, aquellos con una experiencia normal en el campo reconocerán que dos moléculas de ácido nucleico que posean una región con complementariedad menor al 100% también pueden hibridar.

65 El término “nucleótido”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a un molécula orgánica formada por la unión covalente de una pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. El término nucleótido incluye desoxirribonucleósidos trifosfato como, por ejemplo, pero sin limitarse, dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, o

derivados de los mismos. El término nucleótido incluye también dideoxirribonucleósidos trifosfato (ddNTPs), como por ejemplo, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP, ddTTP o derivados de los mismos.

De acuerdo con la presente invención un “nucleótido” o un “cebador” puede ser marcado o etiquetado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

El término “ADN polimerasa dependiente de ADN”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una ADN polimerasa capaz de catalizar la polimerización de desoxinucleótidos utilizando ADN como ácido nucleico molde. Ejemplos de ADN polimerasa dependientes de ADN que pueden ser empleadas en el método de amplificación de la siguiente invención son, pero sin limitarnos, las ADN polimerasas de *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermotoga neapolitana* (Tne), *Thermotoga maritima* (Tma), *Thermococcus litoralis* (Tli or VENTTM), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Pyrococcus species* GB-D (Deep Vent™), *Pyrococcus woosii* (Pwo), *Bacillus stearo-thermophilus* (Bst), *Bacillus caldophilus* (Bca), *Sulfolobus acidocaldarius* (Sac), *Thermoplasma acidophilum* (Tac), *Thermus flavus* (Tff/Tub), *Thermus ruber* (Tru), *Thermus brockianus* (DyNAzyme™), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth) o *Mycobacterium* sp. (Mtb, Mlep).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos anteriormente en la presente descripción.

Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un kit para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos anteriormente en la presente descripción, que comprende:

- a) la RT de la invención, y
- b) al menos, un elemento de la lista que comprende:
 - i) un tampón,
 - ii) un cebador,
 - iii) una ADN polimerasa dependiente de ADN, y
 - iv) un nucleótido.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS de la RT del VIH-1 grupo O “wild-type” resultante de la purificación. M, marcadores de peso molecular, pocillos 1-4: albúmina de suero bovino (66,2 kDa) (0,5, 1, 2 y 4 μ g respectivamente); pocillos 5-7: alícuotas de la RT de VIH-1 grupo O purificada. El rendimiento de la purificación fue superior a 3 mg de RT por litro de cultivo procesado.

Figura 2. Muestra la eficiencia de extensión de extremos desapareados obtenida con los tres mutantes analizados.

Figura 3. Muestra la amplificación por RT-PCR de fragmentos de ARN codificante para actina, de (A) 500 y (B) 1000 pares de bases, a partir de ARN total de hígado de ratón. La amplificación se llevó a cabo con las enzimas indicadas [RT de VIH-1 grupo O “wild-type” (RTO), RT de VIH-1 subtipo B BH10 (RTB), mutante V75I en el contexto de RTO (RTO V75I) y el doble mutante V75I/E478Q en el contexto de RTO (RTO V75I/E478Q)]. Las temperaturas indicadas se refieren a la reacción de síntesis del ADN copia. La eficiencia de estas enzimas se compara también con la de la RT de virus Moloney de la leucemia de ratón carente de actividad RNasa H (MLV) (véanse reacciones de retrotranscripción a temperaturas superiores a 65°C). Act neg, control negativo (sin ADNc); Esc, marcadores de peso molecular.

Figura 4. Muestra la actividad RNasa H de distintas RTs: RT de VIH-1 grupo O “wild-type” (RTO_WT), RT de VIH-1 subtipo B BH10 (BH10_WT), mutante V75I en el contexto de RTO (RTO_V75I), mutante E478Q en el contexto de RTO (RTO_E478Q) y el doble mutante V75I/E478Q en el contexto de RTO (RTO V75I/E478Q). En la parte inferior se indican las secuencias del molde y del cebador utilizado, indicándose con un asterisco la posición del extremo marcado radiactivamente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

10 *Generación, expresión y purificación de las RTs del virus VIH de tipo 1 de grupo O "wild type" y mutantes*

La expresión y purificación de las RTs se llevó a cabo con una versión modificada del plásmido p66RTB (Boretto *et al.* Anal. Biochem. 2001; 292: 139-147; Matamoros *et al.* J. Mol. Biol. 2005; 349: 451-463), que contiene el gen de resistencia a ampicilina y en el que clonamos la región codificante de la subunidad p66 de la RT de un aislado del VIH-1 de grupo O (Menéndez-Arias *et al.* J. Biol. Chem. 2001; 276: 27470-27479). Para ello se digirió el plásmido p66RTB portador de la enzima SS RT (descrito en Matamoros *et al.* J. Mol. Biol. 2005; 349: 451-463) con las enzimas EcoRI y XhoI y se clonó el inserto que codifica para la subunidad p66 de la RT de VIH-1 grupo O, derivado de la digestión con las mismas enzimas del plásmido pRT6 (portador de la variante ESP49) (Menéndez-Arias *et al.* J. Biol. Chem. 2001; 276: 27470-27479). La secuencia de nucleótidos que comprende la región que codifica para la subunidad p66 del VIH-1 (grupo O) en el plásmido de expresión se muestra en la SEQ ID NO: 5, mientras que la secuencia de aminoácidos de la RT obtenida con dicho plásmido se indica en la SEQ ID NO: 6. Utilizando esta construcción se produce la subunidad p66, modificada en el extremo N-terminal por la presencia de tres aminoácidos: Met-Asn-Ser, y en el extremo C-terminal por la presencia de una cola de 9 aminoácidos (Glu-Ser-Thr-His-His-His-His-His), que contiene los seis residuos de histidina, que facilitan su purificación. La subunidad p51 se genera por el procesamiento proteolítico de p66, por parte de la proteasa del VIH-1 co-expresada mediante la utilización del plásmido pATproteasa (Boretto *et al.* Anal. Biochem. 2001; 292: 139-147).

Los plásmidos para la expresión de las RTs mutantes RTO_V75I y RTO_V75I/E478Q se obtuvieron por mutagénesis dirigida utilizando el kit "Quik-Change Site-Directed Mutagenesis" de Stratagene, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como oligonucleótidos mutagénicos se emplearon: SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para introducir la mutación V75I, y SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para E478Q. Como molde para la introducción de V75I, se empleó el plásmido portador de la secuencia que codifica la p66 de VIH-1 (grupo O), descrito anteriormente. La mutación E478Q se introdujo en el plásmido portador de V75I. Tras la mutagénesis se comprobó por secuenciación que la región codificante de p66 en dichos plásmidos era correcta y contenía únicamente las mutaciones introducidas. Las secuencias de nucleótidos de los insertos portadores de las mutaciones V75I y V75I/E478Q se muestran en las SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, y las secuencias de aminoácidos de las RTs obtenidas de la expresión de los plásmidos mutantes se indican las SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14.

La subunidad p66 (con sus extremos modificados) se coexpresa en *E. coli* XL1 Blue con la proteasa del VIH-1 (subtipo B) empleando el vector pATprotease (Boretto *et al.* Anal. Biochem. 2001; 292: 139-147), portador de resistencia a kanamicina. Se obtuvieron 3 cultivos de 1 litro cada uno (medio estándar Luria-Broth con ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml) de *E. coli* portadora de los plásmidos de expresión de RT grupo O ("wild-type" o los mutantes correspondientes) y pATprotease, en fase exponencial de crecimiento, y se indujo la expresión de RT con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 20-24 horas.

Al cabo de ese tiempo se recogieron las bacterias y se procesaron siguiendo el procedimiento descrito por Boretto *et al.* (Anal. Biochem. 2001; 292: 139-147), en el que se incluye una etapa de lisis bacteriana y homogenización, seguida de cromatografías de intercambio iónico (en fosfocelulosa) y de afinidad (en columnas de Ni²⁺-nitriloacético-agarosa).

El rendimiento obtenido a partir de 3 litros de cultivo (10 g de células) fue de 10 mg, estimado a partir del coeficiente de extinción molar de la RT a 280 nm ($\epsilon_{280} = 260450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Kati *et al.* J. Biol. Chem. 1992; 267: 25988-25997). La proporción de enzima activa obtenida fue igual o superior al 40%. La pureza de la RT obtenida fue superior al 95% de acuerdo a estimaciones llevadas a cabo con geles de poliacrilamida y SDS (Figura 1). Estos rendimientos son sensiblemente superiores a los obtenidos utilizando protocolos anteriormente descritos, en los que el rendimiento no superaba los 50-100 µg para el mismo volumen de cultivo de partida (Quiñones-Mateu *et al.* Virology 1997; 236: 364-373).

Ejemplo 2

60 *Efecto de las mutaciones V75I y V75I/E478Q sobre la fidelidad de copia*

La fidelidad de copia de las RTs se ha determinado mediante ensayos cinéticos de incorporación de nucleótido en el estado pre-estacionario, utilizando complejos molde-cebador 31T/21P en los que el extremo 3'OH puede estar correcta o incorrectamente apareado (Matamoros *et al.* J. Mol. Biol. 2008; 375: 1234-1248), y mediante ensayos genéticos utilizando el plásmido M13mp2 *lacZα* (Bebenek y Kunkel. Methods Enzymol. 1995; 262: 217-232; Matamoros *et al.* J. Mol. Biol. 2008; 375: 1234-1248).

ES 2 358 824 A1

La RT de grupo O portadora del cambio V75I retiene actividad catalítica similar a la RT “wild-type” y presenta una menor capacidad para extender cebadores que contienen un extremo 3' desapareado (Tabla 1; Figura 2). En ensayos cinéticos en los que se determina la eficacia catalítica de la reacción con distintos complejos molde-cebador, se observó que la presencia de la mutación V75I produce un descenso de la eficiencia de extensión de extremos desapareados de 3,5 veces para el par G:T; 2,9 veces para el par G:G y de 3,7 veces para el par G:A, cuando se compara con la RT de VIH-1 grupo O “wild-type”, y de 2 a 6 veces cuando se compara con la RT de VIH-1 subtipo B (cepa prototipo BH10).

Por otro lado se midió la fidelidad en ensayos de complementación que utilizan derivados del fago M13mp2 en los que está presente el gen *lacZ*. Se determinó la frecuencia con que se obtenían mutantes cuando el proceso de síntesis se realiza con las distintas RTs recombinantes (Tabla 2). Un aumento de fidelidad de copia se refleja en la aparición en el ensayo de un número menor de placas mutantes. La RT del VIH-1 grupo O “wild-type” presentaba un incremento de fidelidad de 2,5 veces con respecto a la RT del VIH-1 subtipo B (“wild-type” BH10), mientras que la presencia de la mutación V75I en el contexto de la RT de VIH-1 grupo O mejoraba la fidelidad de copia en 4,7 veces respecto a la RT de subtipo B. En el contexto de secuencia de la RT de VIH-1 grupo O, el doble mutante V75I/E478Q presenta una fidelidad de copia similar a la de V75I, en ensayos de complementación que utilizan derivados del fago M13mp2 en los que está presente el gen *lacZ*.

TABLA 1

Parámetros cinéticos de extensión de extremos desapareados sobre el complejo molde-cebador 31T/21P para la RT del VIH-1 subtipo B “wild-type” BH10 (BH10_WT), comparada con la del VIH-1 grupo O “wild-type” (RTO_WT) y con el mutante V75I en el contexto de secuencia de VIH-1 grupo O (RTO_V75I), determinados en el estado pre-estacionario

Enzima	Par de bases en 3'	k_{pol} (s ⁻¹)	K_d (μM)	k_{pol}/K_d (μM ⁻¹ s ⁻¹)	Eficiencia de extensión de extremos desapareados (f_{ext})
BH10_WT	G:C	11,57 ± 0,49	13,40 ± 1,88	0,863 ± 0,126	
	G:T	2,54 ± 0,13	2628 ± 252	(9,66 ± 1,04) × 10 ⁻⁴	(11,2 ± 2,03) × 10 ⁻⁴
	G:G	0,266 ± 0,020	1014 ± 188	(2,62 ± 0,52) × 10 ⁻⁴	(3,05 ± 0,75) × 10 ⁻⁴
	G:A	0,0158 ± 0,0009	5110 ± 755	(3,09 ± 0,49) × 10 ⁻⁶	(3,59 ± 0,77) × 10 ⁻⁶
RTO_WT	G:C	14,69 ± 0,98	11,75 ± 2,94	1,25 ± 0,32	
	G:T	7,59 ± 0,92	2638 ± 785	(28,8 ± 9,24) × 10 ⁻⁴	(23,0 ± 9,46) × 10 ⁻⁴
	G:G	0,559 ± 0,071	1132 ± 316	(4,94 ± 1,51) × 10 ⁻⁴	(4,01 ± 1,58) × 10 ⁻⁴
	G:A	0,0211 ± 0,0030	7817 ± 2334	(2,71 ± 0,89) × 10 ⁻⁶	(2,17 ± 0,90) × 10 ⁻⁶
RTO_V75I	G:C	13,95 ± 1,22	14,60 ± 4,33	0,955 ± 0,295	
	G:T	2,76 ± 0,21	4400 ± 789	(6,27 ± 1,22) × 10 ⁻⁴	(6,56 ± 2,40) × 10 ⁻⁴
	G:G	0,322 ± 0,007	2426 ± 178	(1,33 ± 0,10) × 10 ⁻⁴	(1,39 ± 0,44) × 10 ⁻⁴
	G:A	0,0068 ± 0,0008	12110 ± 2536	(0,56 ± 0,13) × 10 ⁻⁶	(0,59 ± 0,23) × 10 ⁻⁶

TABLA 2

Fidelidad de la RT del VIH-1 subtipo B “wild-type” BH10 (BH10_WT), comparada con la del mutante V75I (en el contexto de secuencia de BH10), con la del VIH-1 grupo O “wild-type” (RTO_WT) y con los mutantes V75I y V75I/E478Q en el contexto de secuencia de VIH-1 grupo O (RTO_V75I y RTO_V75I/E478Q), estimada mediante ensayos genéticos (M13mp2 lacZa “forward mutation assay”)

Enzima	Placas totales	Placas mutantes	Frecuencia de mutantes	Incremento de la fidelidad	
				(respecto a BH10_WT)	(respecto a RTO_WT)
BH10_WT ^a	6736	139	0,0206	-	
BH10_V75I ^a	6033	42	0,0069	3,0	
RTO_WT	7579	63	0,0083	2,5	-
RTO_V75I	9894	43	0,0043	4,7	1,9
RTO_V75I/E478Q	2046	10	0,0049	4,2	1,7

^a Datos para BH10_WT y BH10_V75I, tomados de Matamoros *et al. J. Mol. Biol.* 2008; 375: 1234-1248.

Ejemplo 3

Efecto de las mutaciones V75I y V75I/E478Q sobre la termoestabilidad

Para analizar la termostabilidad de los mutantes se llevaron a cabo reacciones de retrotranscripción a diferentes temperaturas, y posteriormente los productos de reacción (ADNc) se amplificaron por PCR en condiciones estándar. Típicamente, la reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen de 20 μ l [4 μ l de tampón Tris-HCl 250 mM (pH 8,3 at 25°C) que contiene KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM y ditioneitol 50 mM; 1 μ l de ARN total aislado de hígado de ratón (1 μ g/ μ l); 4 μ l de una mezcla de los 4 dNTPs (a 2,5 mM cada uno de ellos); 1 μ l de oligo-dT (100 μ M); 0,5 μ l de inhibidor de RNasa (40 unidades/ μ l); la RT a una concentración aproximada de 150 nM y el resto hasta 20 μ l de agua]. Inicialmente se incubó el ARN y el oligo dT a 68°C durante 3 min. Después se añaden los demás componentes de la reacción y se incubó durante 1 hora a la temperatura deseada para ver termostabilidad. Finalmente, la reacción se detiene incubando 10 min a 92°C, para obtener el ADNc. Este se amplifica por PCR en condiciones estándar, utilizando Taq polimerasa y los cebadores ACT1 y ACT2 (fragmento de 500 pares de bases) o ACT1 y ACT3 (fragmento de 1000 pares de bases). Las secuencias de los cebadores utilizados son: ACT1: SEQ ID NO: 15, ACT2: SEQ ID NO: 16, y ACT3: SEQ ID NO: 17.

Ejemplo 4

Pérdida de la actividad RNasa H en las RTs portadoras del cambio E478Q

Los estudios de termostabilidad llevados a cabo con las cuatro RTs de VIH-1 (VIH-1 grupo O “wild-type”, VIH-1 grupo O mutante V75I, VIH-1 grupo O mutante V75I/E478Q y VIH-1 subtipo B “wild-type BH10”) y la RT del virus Moloney de la leucemia de ratón (MLV) demostraron que las tres enzimas derivadas de VIH-1 grupo O eran las más termoestables (Figura 3). Sin embargo la presencia de V75I disminuía la termostabilidad de la enzima, mientras que cuando iba acompañada por el cambio E478Q, se producía una mejora en su estabilidad que se reflejaba en un aumento en la intensidad de la banda amplificada. Esto se debe a que la presencia de la mutación E478Q conduce a la pérdida de actividad RNasa H de la enzima (Figura 4), lo que facilita la estabilidad del ARN en reacciones de amplificación.

La actividad RNasa H de los mutantes generados se determinó con un complejo molde-cebador, cuya estructura aparece en la parte inferior. El molde ARN se encuentra marcado en su extremo 5' con ³²P y la reacción se lleva a cabo a 37°C, en presencia de molde-cebador ARN/ADN a 50 nM y la RT correspondiente a 100 nM, en un tampón que contenía: Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 50 mM y MgCl₂ 5 mM. Las reacciones se iniciaron tras añadir 1 μ l de la RT concentrada y MgCl₂. Se tomaron alícuotas a 0, 15, 60, 120, 240 y 480 s, y la reacción se detuvo añadiendo EDTA 10 mM disuelto en formamida al 90%. Las muestras se analizaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida y urea. Los fragmentos de 26 y 25 nucleótidos se generan como consecuencia de la ruptura del molde ARN por parte de la actividad RNasa H de la RT. La ausencia de degradación del molde de 31 nucleótidos demuestra la pérdida de actividad RNasa H por parte de los mutantes portadores del cambio E478Q.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Retrotranscriptasa aislada de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 de grupo O y modificada para que comprenda una secuencia de aminoácidos en la que el residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por una isoleucina o por otro aminoácido que suponga una sustitución conservativa respecto a la isoleucina, donde dicha retrotranscriptasa modificada tiene una fidelidad de copia incrementada con relación a la retrotranscriptasa no modificada correspondiente.
- 10 2. Retrotranscriptasa según la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 90% con la SEQ ID NO: 1.
3. Retrotranscriptasa según la reivindicación 2, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 95% con la SEQ ID NO: 1.
- 15 4. Retrotranscriptasa según la reivindicación 3, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 98% con la SEQ ID NO: 1.
- 20 5. Retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la secuencia de aminoácidos además tiene otra sustitución del residuo que corresponde a la posición 478 de la SEQ ID NO: 1 por una glutamina o por otro aminoácido que suponga una sustitución conservativa respecto a la glutamina, y donde dicha retrotranscriptasa modificada tiene una termoestabilidad incrementada con relación a la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 6. Retrotranscriptasa según las reivindicaciones 1 a 4, donde la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 2.
7. Retrotranscriptasa según la reivindicación 5, donde la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 3.
- 30 8. Polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de una retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 8.
- 35 10. Vector según la reivindicación 9 donde el polinucleótido está unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:
- a) un promotor,
 - b) una señal de inicio de la transcripción,
 - 40 c) una señal de terminación de la transcripción,
 - d) una señal de poliadenilación, o
 - 45 e) un activador transcripcional.
11. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 donde el polinucleótido está unido en fase de lectura a una secuencia que codifica para una etiqueta de purificación.
- 50 12. Vector según la reivindicación 11 donde la etiqueta de purificación consiste en una cola de residuos de histidina.
13. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que además comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos de una retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.
- 55 14. Célula que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 y que además comprende otro vector que comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.
- 60 15. Célula que comprende el vector según la reivindicación 13.
16. Método para producir la secuencia de aminoácidos de una retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:
- 65 a) cultivar la célula según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, y

ES 2 358 824 A1

b) aislar la secuencia de aminoácidos de la retrotranscriptasa expresada en el paso (a) por dicha célula.

17. Método para producir la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende:

5 a) cultivar la célula según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, y

b) aislar la retrotranscriptasa expresada en el paso (a) por dicha célula.

10 18. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la retrotranscripción de un ácido nucleico molde.

19. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la amplificación de un ácido nucleico molde.

15 20. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la secuenciación de un ácido nucleico molde.

20 21. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 donde el ácido nucleico molde es ARNm.

22. Método de retrotranscripción de un ácido nucleico molde que comprende:

25 a) mezclar dicho ácido nucleico molde con la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, e

b) incubar la mezcla del paso (a) en condiciones que permitan la síntesis de ADN complementario al ácido nucleico molde.

30 23. Método de amplificación de un ácido nucleico molde que comprende:

a) mezclar dicho ácido nucleico con la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y con, al menos, una ADN polimerasa dependiente de ADN, e

35 b) incubar la mezcla del paso (a) en condiciones que permitan la amplificación de ADN complementario al ácido nucleico molde.

24. Método de secuenciación de un ácido nucleico molde que comprende:

40 a) poner en contacto dicho ácido nucleico con la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,

b) incubar dicha mezcla en condiciones que permitan la síntesis de una población de moléculas de ADN complementario al ácido nucleico molde, y

45 c) separar dicha población de moléculas de ADN complementario para determinar la secuencia de nucleótidos.

25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24 donde el ácido nucleico molde es ARNm.

50 26. Kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25 que comprende:

a) la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y

55 b) al menos, un elemento de la lista que comprende:

i) un tampón,

60 ii) un cebador,

iii) una ADN polimerasa dependiente de ADN, y

65 iv) un nucleótido.

FIG. 1

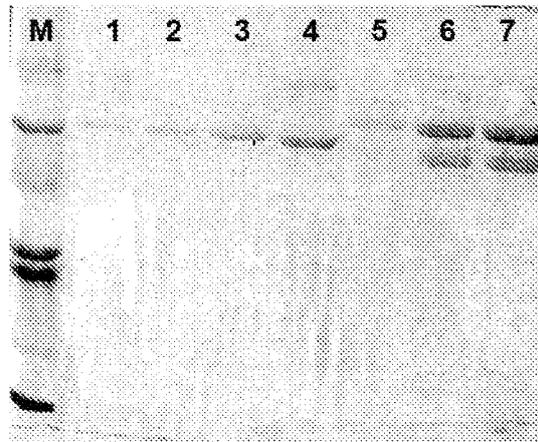


FIG. 2

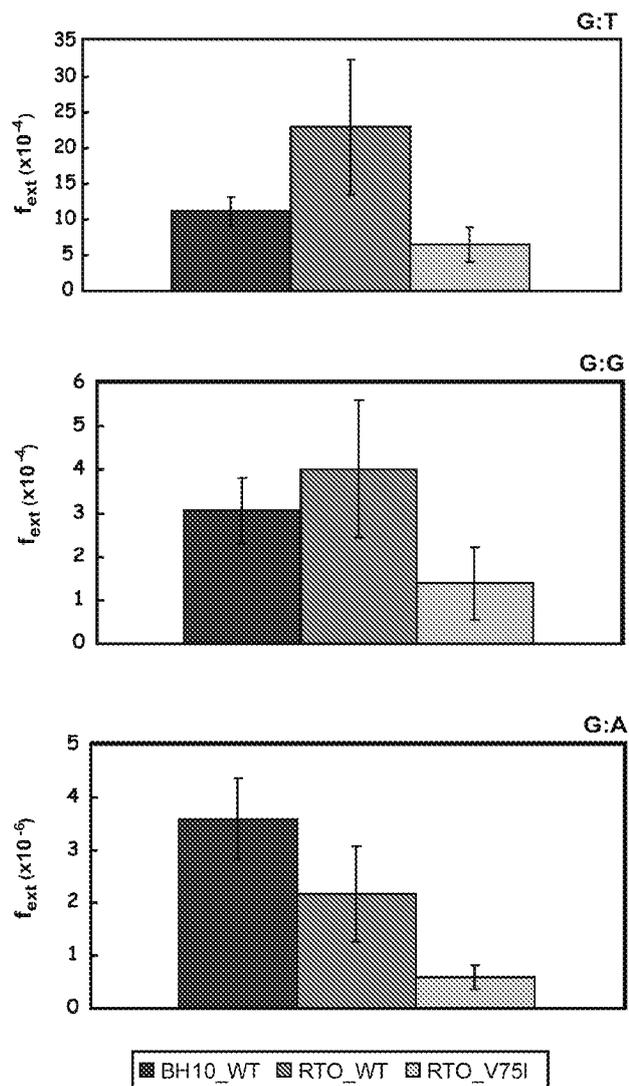
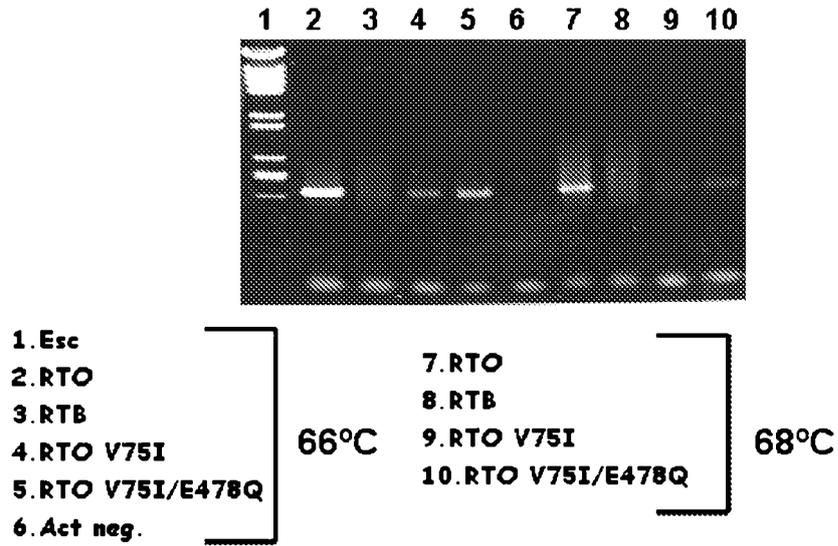


FIG. 3

A.



B.

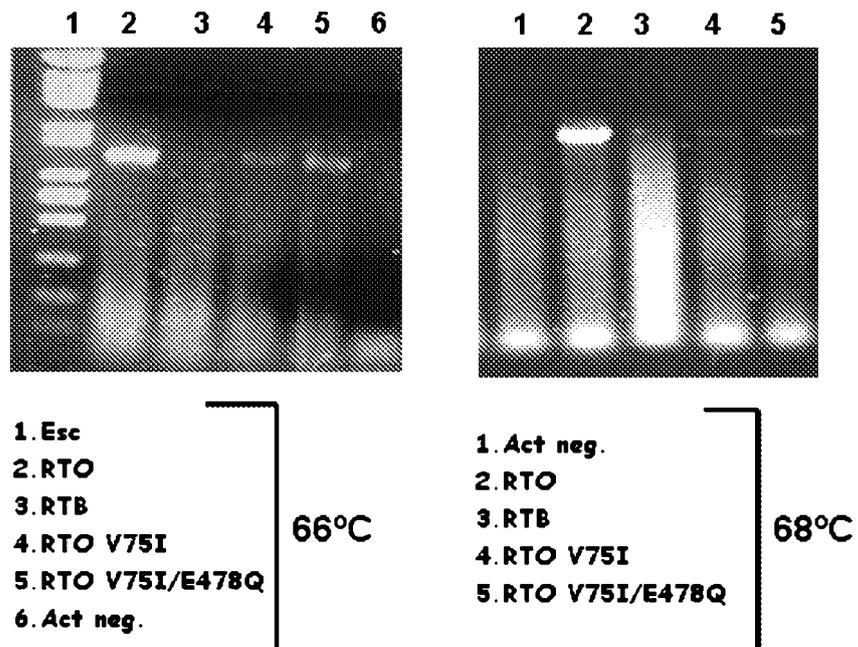
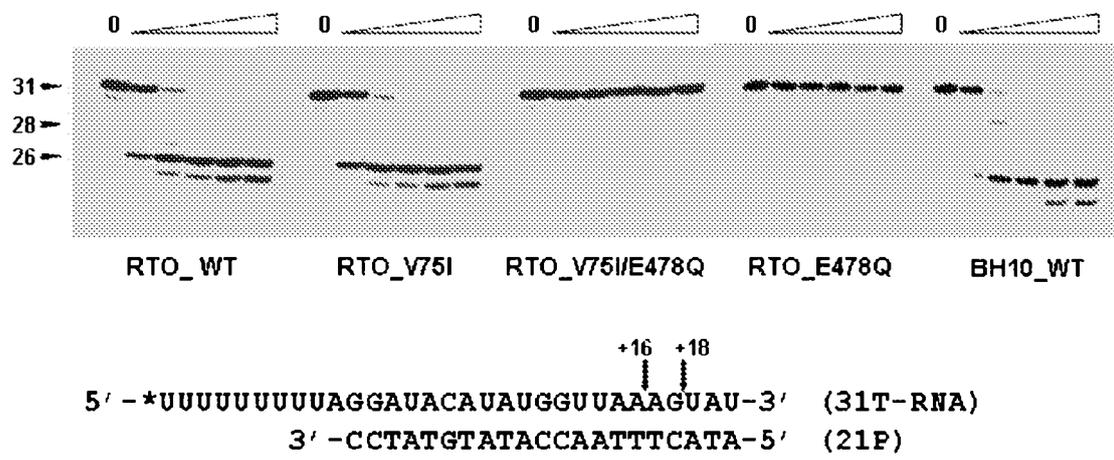


FIG. 4



ES 2 358 824 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

5 <120> Retrotranscriptasa del VIH-1 de grupo O modificada

<130> ES.1641.330

10 <160> 17

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 560

<212> PRT

<213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1) de Grupo O

20 <400> 1

25 Pro 1 Ile Ser Pro 5 Ile Ala Pro Val Pro 10 Val Lys Leu Lys Pro 15 Gly Met

Asp Gly Pro 20 Lys Val Lys Gln Trp Pro 25 Leu Ser Lys Glu Lys 30 Ile Glu

30 Ala Leu Thr 35 Ala Ile Cys Gln Glu Met Glu Gln Glu Gly 45 Lys Ile Ser

35 Arg Ile Gly Pro Glu Asn 55 Pro Tyr Asn Thr Pro 60 Ile Phe Ala Ile Lys

40 Lys 65 Lys Asp Ser Thr 70 Lys Trp Arg Lys Leu 75 Val Asp Phe Arg Glu Leu 80

Asn Lys Arg Thr 85 Gln Asp Phe Trp Glu 90 Val Gln Leu Gly Ile Pro 95 His

45 Pro Gly Gly Leu 100 Lys Gln Lys Arg Ser 105 Val Thr Val Leu Asp Val Gly

50 Asp Ala Tyr 115 Phe Ser Cys Pro Leu 120 Asp Pro Asp Phe Arg 125 Lys Tyr Thr

55 Ala Phe Thr Ile Pro Ser Val 135 Asn Asn Glu Thr Pro 140 Gly Ile Arg Tyr

Gln Tyr Asn Val Leu Pro 150 Gln Gly Trp Lys Gly 155 Ser Pro Ala Ile Phe 160

60 Gln Ser Ser Met Thr 165 Lys Ile Leu Asp Pro 170 Phe Arg Lys Asp Asn Pro 175

65 Glu Leu Glu Ile 180 Cys Gln Tyr Met Asp 185 Asp Leu Tyr Val Gly 190 Ser Asp

ES 2 358 824 A1

Leu Pro Leu Ala Glu His Arg Lys Arg Val Glu Leu Leu Arg Glu His
 195 200 205
 5 Leu Tyr Gln Trp Gly Phe Thr Thr Pro Asp Lys Lys His Gln Lys Glu
 210 215 220
 10 Pro Pro Phe Met Trp Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp Lys Trp Thr
 225 230 240
 15 Val Gln Pro Ile Lys Leu Pro Asn Lys Asp Val Trp Thr Val Asn Asp
 245 250 255
 20 Ile Gln Lys Leu Ile Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Gln
 260 265 270
 25 Gly Ile Arg Val Arg Glu Leu Cys Lys Leu Ile Arg Gly Thr Lys Ser
 275 280 285
 30 Leu Thr Glu Val Val Pro Leu Ser Lys Glu Ala Glu Met Glu Leu Glu
 290 295 300
 35 Glu Asn Arg Glu Lys Leu Lys Glu Pro Met His Gly Val Tyr Tyr Gln
 305 310 315 320
 40 Pro Asp Lys Asp Leu Trp Val Asn Ile Gln Lys Gln Gly Glu Gly Gln
 325 330 335
 45 Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Asp Glu His Lys Asn Leu Lys Thr Gly
 340 345 350
 50 Lys Tyr Thr Arg Gln Lys Ala Ser His Thr Asn Asp Ile Arg Gln Leu
 355 360 365
 55 Ala Glu Val Ile Gln Lys Val Ser Gln Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly
 370 375 380
 60 Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr Trp Glu Thr
 385 390 395 400
 65 Trp Trp Ala Asp Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu Trp Asp Tyr
 405 410 415
 Val Ser Thr Pro Pro Leu Ile Lys Leu Trp Tyr Arg Leu Glu Ser Glu
 420 425 430
 Pro Ile Arg Gly Ala Glu Thr Tyr Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg
 435 440 445
 Asp Thr Lys Leu Gly Lys Ala Gly Tyr Val Thr Glu Gln Gly Lys Gln

ES 2 358 824 A1

	450	455	460
5	Lys Ile Ile Lys Leu Asp Glu Thr Thr Asn Gln Lys Ala Glu Leu Met 465 470 475 480		
10	Ala Val Leu Leu Ala Leu Gln Asp Ser Lys Glu Lys Val Asn Ile Val 485 490 495		
15	Thr Asp Ser Gln Tyr Val Leu Gly Ile Ile Ser Ser Gln Pro Thr Gln 500 505 510		
20	Ser Glu Ser Pro Ile Val Gln Gln Ile Ile Glu Glu Leu Thr Lys Lys 515 520 525		
25	Glu Gln Val Tyr Leu Thr Trp Val Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly 530 535 540		
30	Asn Glu Lys Ile Asp Lys Leu Val Ser Lys Asp Ile Arg Arg Val Leu 545 550 555 560		
	<210> 2		
	<211> 560		
	<212> PRT		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
	<223> Secuencia de aminoácidos de la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de grupo O modificada con la mutación V75I		
	<400> 2		
40	Pro Ile Ser Pro Ile Ala Pro Val Pro Val Lys Leu Lys Pro Gly Met 1 5 10 15		
45	Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Ser Lys Glu Lys Ile Glu 20 25 30		
50	Ala Leu Thr Ala Ile Cys Gln Glu Met Glu Gln Glu Gly Lys Ile Ser 35 40 45		
55	Arg Ile Gly Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Ile Phe Ala Ile Lys 50 55 60		
60	Lys Lys Asp Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Ile Asp Phe Arg Glu Leu 65 70 75 80		
65	Asn Lys Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His 85 90 95		
70	Pro Gly Gly Leu Lys Gln Lys Arg Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly 100 105 110		

ES 2 358 824 A1

	Asp	Ala	Tyr 115	Phe	Ser	Cys	Pro	Leu 120	Asp	Pro	Asp	Phe	Arg 125	Lys	Tyr	Thr
5	Ala	Phe 130	Thr	Ile	Pro	Ser	Val 135	Asn	Asn	Glu	Thr	Pro 140	Gly	Ile	Arg	Tyr
10	Gln 145	Tyr	Asn	Val	Leu	Pro 150	Gln	Gly	Trp	Lys	Gly 155	Ser	Pro	Ala	Ile	Phe 160
15	Gln	Ser	Ser	Met	Thr 165	Lys	Ile	Leu	Asp	Pro 170	Phe	Arg	Lys	Asp	Asn 175	Pro
20	Glu	Leu	Glu	Ile 180	Cys	Gln	Tyr	Met	Asp 185	Asp	Leu	Tyr	Val	Gly 190	Ser	Asp
25	Leu	Pro	Leu 195	Ala	Glu	His	Arg	Lys 200	Arg	Val	Glu	Leu	Leu 205	Arg	Glu	His
30	Leu	Tyr 210	Gln	Trp	Gly	Phe	Thr 215	Thr	Pro	Asp	Lys	Lys 220	His	Gln	Lys	Glu
35	Pro 225	Pro	Phe	Met	Trp	Met 230	Gly	Tyr	Glu	Leu	His 235	Pro	Asp	Lys	Trp	Thr 240
40	Val	Gln	Pro	Ile	Lys 245	Leu	Pro	Asn	Lys	Asp 250	Val	Trp	Thr	Val	Asn 255	Asp
45	Ile	Gln	Lys	Leu 260	Ile	Gly	Lys	Leu	Asn 265	Trp	Ala	Ser	Gln	Ile 270	Tyr	Gln
50	Gly	Ile	Arg 275	Val	Arg	Glu	Leu	Cys 280	Lys	Leu	Ile	Arg	Gly 285	Thr	Lys	Ser
55	Leu	Thr 290	Glu	Val	Val	Pro	Leu 295	Ser	Lys	Glu	Ala	Glu 300	Met	Glu	Leu	Glu
60	Glu 305	Asn	Arg	Glu	Lys	Leu 310	Lys	Glu	Pro	Met	His 315	Gly	Val	Tyr	Tyr	Gln 320
65	Pro	Asp	Lys	Asp	Leu 325	Trp	Val	Asn	Ile	Gln 330	Lys	Gln	Gly	Glu	Gly 335	Gln
70	Trp	Thr	Tyr	Gln 340	Ile	Tyr	Gln	Asp	Glu 345	His	Lys	Asn	Leu	Lys 350	Thr	Gly
75	Lys	Tyr	Thr 355	Arg	Gln	Lys	Ala	Ser 360	His	Thr	Asn	Asp	Ile 365	Arg	Gln	Leu
80	Ala	Glu 370	Val	Ile	Gln	Lys	Val 375	Ser	Gln	Glu	Ser	Ile 380	Val	Ile	Trp	Gly

ES 2 358 824 A1

Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr Trp Glu Thr
 385 390 395 400
 5 Trp Trp Ala Asp Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu Trp Asp Tyr
 405 410 415
 10 Val Ser Thr Pro Pro Leu Ile Lys Leu Trp Tyr Arg Leu Glu Ser Glu
 420 425 430
 15 Pro Ile Arg Gly Ala Glu Thr Tyr Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg
 435 440 445
 20 Asp Thr Lys Leu Gly Lys Ala Gly Tyr Val Thr Glu Gln Gly Lys Gln
 450 455 460
 25 Lys Ile Ile Lys Leu Asp Glu Thr Thr Asn Gln Lys Ala Glu Leu Met
 465 470 475 480
 30 Ala Val Leu Leu Ala Leu Gln Asp Ser Lys Glu Lys Val Asn Ile Val
 485 490 495
 35 Thr Asp Ser Gln Tyr Val Leu Gly Ile Ile Ser Ser Gln Pro Thr Gln
 500 505 510
 40 Ser Glu Ser Pro Ile Val Gln Gln Ile Ile Glu Glu Leu Thr Lys Lys
 515 520 525
 45 Glu Gln Val Tyr Leu Thr Trp Val Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly
 530 535 540
 50 Asn Glu Lys Ile Asp Lys Leu Val Ser Lys Asp Ile Arg Arg Val Leu
 545 550 555 560
 45 <210> 3
 <211> 560
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 50 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la subunidad p66 de la RTdel VIH-1 de grupo O modificada con las mutaciones
 V75I y E478Q
 55 <400> 3
 60 Pro Ile Ser Pro Ile Ala Pro Val Pro Val Lys Leu Lys Pro Gly Met
 1 5 10 15
 65 Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Ser Lys Glu Lys Ile Glu
 20 25 30
 Ala Leu Thr Ala Ile Cys Gln Glu Met Glu Gln Glu Gly Lys Ile Ser

ES 2 358 824 A1

		35				40					45					
5	Arg	Ile 50	Gly	Pro	Glu	Asn 55	Pro	Tyr	Asn	Thr	Pro	Ile 60	Phe	Ala	Ile	Lys
10	Lys 65	Lys	Asp	Ser	Thr	Lys 70	Trp	Arg	Lys	Leu	Ile 75	Asp	Phe	Arg	Glu	Leu 80
15	Asn	Lys	Arg	Thr	Gln 85	Asp	Phe	Trp	Glu	Val 90	Gln	Leu	Gly	Ile	Pro 95	His
20	Pro	Gly	Gly	Leu 100	Lys	Gln	Lys	Arg	Ser 105	Val	Thr	Val	Leu	Asp 110	Val	Gly
25	Asp	Ala	Tyr 115	Phe	Ser	Cys	Pro	Leu 120	Asp	Pro	Asp	Phe	Arg 125	Lys	Tyr	Thr
30	Ala	Phe 130	Thr	Ile	Pro	Ser	Val 135	Asn	Asn	Glu	Thr	Pro 140	Gly	Ile	Arg	Tyr
35	Gln 145	Tyr	Asn	Val	Leu	Pro 150	Gln	Gly	Trp	Lys	Gly 155	Ser	Pro	Ala	Ile	Phe 160
40	Gln	Ser	Ser	Met 165	Thr	Lys	Ile	Leu	Asp	Pro 170	Phe	Arg	Lys	Asp	Asn 175	Pro
45	Glu	Leu	Glu	Ile 180	Cys	Gln	Tyr	Met	Asp 185	Asp	Leu	Tyr	Val	Gly 190	Ser	Asp
50	Leu	Pro	Leu 195	Ala	Glu	His	Arg	Lys 200	Arg	Val	Glu	Leu	Leu 205	Arg	Glu	His
55	Leu	Tyr 210	Gln	Trp	Gly	Phe	Thr 215	Thr	Pro	Asp	Lys	Lys 220	His	Gln	Lys	Glu
60	Pro 225	Pro	Phe	Met	Trp	Met 230	Gly	Tyr	Glu	Leu	His 235	Pro	Asp	Lys	Trp	Thr 240
65	Val	Gln	Pro	Ile	Lys 245	Leu	Pro	Asn	Lys	Asp 250	Val	Trp	Thr	Val	Asn 255	Asp
	Ile	Gln	Lys	Leu 260	Ile	Gly	Lys	Leu	Asn 265	Trp	Ala	Ser	Gln	Ile 270	Tyr	Gln
	Gly	Ile	Arg 275	Val	Arg	Glu	Leu	Cys 280	Lys	Leu	Ile	Arg	Gly 285	Thr	Lys	Ser
	Leu	Thr 290	Glu	Val	Val	Pro	Leu 295	Ser	Lys	Glu	Ala	Glu 300	Met	Glu	Leu	Glu

ES 2 358 824 A1

Glu Asn Arg Glu Lys Leu Lys Glu Pro Met His Gly Val Tyr Tyr Gln
 305 310 315 320
 5 Pro Asp Lys Asp Leu Trp Val Asn Ile Gln Lys Gln Gly Glu Gly Gln
 325 330 335
 10 Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Asp Glu His Lys Asn Leu Lys Thr Gly
 340 345 350
 15 Lys Tyr Thr Arg Gln Lys Ala Ser His Thr Asn Asp Ile Arg Gln Leu
 355 360 365
 20 Ala Glu Val Ile Gln Lys Val Ser Gln Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly
 370 375 380
 25 Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr Trp Glu Thr
 385 390 395 400
 30 Trp Trp Ala Asp Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu Trp Asp Tyr
 405 410 415
 35 Val Ser Thr Pro Pro Leu Ile Lys Leu Trp Tyr Arg Leu Glu Ser Glu
 420 425 430
 40 Pro Ile Arg Gly Ala Glu Thr Tyr Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg
 435 440 445
 45 Asp Thr Lys Leu Gly Lys Ala Gly Tyr Val Thr Glu Gln Gly Lys Gln
 450 455 460
 50 Lys Ile Ile Lys Leu Asp Glu Thr Thr Asn Gln Lys Ala Gln Leu Met
 465 470 475 480
 55 Ala Val Leu Leu Ala Leu Gln Asp Ser Lys Glu Lys Val Asn Ile Val
 485 490 495
 60 Thr Asp Ser Gln Tyr Val Leu Gly Ile Ile Ser Ser Gln Pro Thr Gln
 500 505 510
 Ser Glu Ser Pro Ile Val Gln Gln Ile Ile Glu Glu Leu Thr Lys Lys
 515 520 525
 65 Glu Gln Val Tyr Leu Thr Trp Val Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly
 530 535 540
 70 Asn Glu Lys Ile Asp Lys Leu Val Ser Lys Asp Ile Arg Arg Val Leu
 545 550 555 560

65 <210> 4
 <211> 99
 <212> PRT

ES 2 358 824 A1

<213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1) de Grupo B Suptipo M

<400> 4

```

5      Pro Gln Ile Thr Leu Trp Gln Arg Pro Leu Val Thr Ile Lys Ile Gly
      1          5          10          15
10     Gly Gln Leu Lys Glu Ala Leu Leu Asp Thr Gly Ala Asp Asp Thr Val
      20          25          30
15     Leu Glu Glu Met Asn Leu Pro Gly Arg Trp Lys Pro Lys Met Ile Gly
      35          40          45
20     Gly Ile Gly Gly Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Asp Gln Ile Leu Ile
      50          55          60
25     Glu Ile Cys Gly His Lys Ala Ile Gly Thr Val Leu Val Gly Pro Thr
      65          70          75          80
30     Pro Val Asn Ile Ile Gly Arg Asn Leu Leu Thr Gln Ile Gly Cys Thr
      85          90          95
      Leu Asn Phe

```

<210> 5

<211> 1720

35 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

40 <223> Secuencia del inserto portador de la región codificante para la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O con una cola de seis residuos de histidina, flanqueada por un sitio de restricción EcoRI en el extremo 5' y codones de terminación en el extremo 3'

45 <400> 5

```

      gaattctcct ataagcccca tagccccagt gccagtaaag ctaaaccag gaatggatgg      60
50     accaaaagta aaacaatggc ccctatctaa agaaaaata gaagcctta cagcaatatg      120
      ccaggaaatg gaacaagaag gaaaaatttc aagaatagga cctgaaaatc cttataatac      180
      acctatcttt gctataaaaa agaaagatag tactaagtgg agaaagctgg tagactttag      240
55     ggaattaaac aagagaacac aagatTTTTG ggaggtacag ttaggtatcc cacatccggg      300
      gggTTTTaag caaaagcgat ctgttacagt ctagatgta ggagatgcct atttctcatg      360
60     ccccttagac ccagatttta gaaaatatac tgctttcact attcctagt taaacaatga      420
      gaccccgagg ataagatacc agtacaatgt cctccgcaa ggatggaaag gttcgccagc      480
      catattccaa agttcaatga caaaaatttt agatccattt aggaaagaca acccagaatt      540
65     agaaatttgt cagtacatgg atgacctata tgtaggatca gatttaccct tggcagaaca      600

```

ES 2 358 824 A1

```

tagaaaaagg gttgaattgc ttagagaaca cttatatcag tggggattca ctaccctga      660
taaaaagcat caaaaggaac ctccctttat gtggatgggg tatgagctcc atccagataa      720
5  atggacagta cagcccatca aattgcctaa caaagatgtg tggacagtaa atgatataca      780
aaaactaata ggaaagttaa attgggcaag tcaaacttat caaggaatta gagtaagaga      840
attgtgtaag ttaattagag gcaccaagtc attaacagaa gtagtaccat taagcaaaga      900
10  ggacagatg gaattagagg agaacagaga gaaattaaaa gaaccaatgc atggtgtata      960
ctatcaacct gataaagact tatgggttaa tattcagaag caaggagaag ggcaatggac     1020
15  ttaccagata tatcaggatg aacataagaa cctcaaaaca gggaaatata ctaggcaaaa     1080
ggcctcccac acaaatgaca taagacaatt agcagaagta atccagaagg tgtctcaaga     1140
atctatagtt atctggggaa aattgcctaa atttaagctg ccagtcacta gagaaacttg     1200
20  ggaaacatgg tgggcagatt attggcaagc cacctggatc ccagaatggg attatgtcag     1260
cacacccccca ttgatcaaat tatggtaccg gttagaaagt gaacctatta ggggggcaga     1320
25  aacctattat gtagatggag cagctaatag agatacaaaa ttaggaaaag caggatatgt     1380
tacagaacaa gggaaacaga aaataataaa attagatgag accaccaatc aaaaggctga     1440
attaatggca gtattattag ccttacagga ttccaagaa aaagtaaata tagtaacaga     1500
30  ctcacaatat gtattgggca ttatctcctc ccagcctaca cagagtgaat cccctatagt     1560
tcagcagata atagaggaac taacaaaaaa ggaacaggtg tatcttacat gggttcctgc     1620
tcataaaggc ataggaggaa atgaaaaaat agataaatta gtaagcaagg atattagaag     1680
35  agtcctcgag tcgactcacc accaccacca ccaactgataa                        1720

```

40 <210> 6

<211> 572

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

45

<220>

<223> Subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O con modificaciones en los extremos N- y C-terminales que incluyen una cola de seis residuos de histidina

50

<400> 6

```

55  Met Asn Ser Pro Ile Ser Pro Ile Ala Pro Val Pro Val Lys Leu Lys
      1           5           10           15

```

```

60  Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Ser Lys Glu
      20           25           30

```

```

Lys Ile Glu Ala Leu Thr Ala Ile Cys Gln Glu Met Glu Gln Glu Gly
      35           40           45

```

```

65  Lys Ile Ser Arg Ile Gly Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Ile Phe
      50           55           60

```

ES 2 358 824 A1

Ala Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe
65 70 75 80

5 Arg Glu Leu Asn Lys Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly
85 90 95

10 Ile Pro His Pro Gly Gly Leu Lys Gln Lys Arg Ser Val Thr Val Leu
100 105 110

15 Asp Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser Cys Pro Leu Asp Pro Asp Phe Arg
115 120 125

Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Val Asn Asn Glu Thr Pro Gly
130 135 140

20 Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro
145 150 155 160

25 Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Lys Ile Leu Asp Pro Phe Arg Lys
165 170 175

30 Asp Asn Pro Glu Leu Glu Ile Cys Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val
180 185 190

Gly Ser Asp Leu Pro Leu Ala Glu His Arg Lys Arg Val Glu Leu Leu
195 200 205

35 Arg Glu His Leu Tyr Gln Trp Gly Phe Thr Thr Pro Asp Lys Lys His
210 215 220

40 Gln Lys Glu Pro Pro Phe Met Trp Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp
225 230 235 240

45 Lys Trp Thr Val Gln Pro Ile Lys Leu Pro Asn Lys Asp Val Trp Thr
245 250 255

50 Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu Ile Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln
260 265 270

Ile Tyr Gln Gly Ile Arg Val Arg Glu Leu Cys Lys Leu Ile Arg Gly
275 280 285

55 Thr Lys Ser Leu Thr Glu Val Val Pro Leu Ser Lys Glu Ala Glu Met
290 295 300

60 Glu Leu Glu Glu Asn Arg Glu Lys Leu Lys Glu Pro Met His Gly Val
305 310 315 320

65

ES 2 358 824 A1

Tyr Tyr Gln Pro Asp Lys Asp Leu Trp Val Asn Ile Gln Lys Gln Gly
 325 330 335
 5
 Glu Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Asp Glu His Lys Asn Leu
 340 345 350
 10
 Lys Thr Gly Lys Tyr Thr Arg Gln Lys Ala Ser His Thr Asn Asp Ile
 355 360 365
 15
 Arg Gln Leu Ala Glu Val Ile Gln Lys Val Ser Gln Glu Ser Ile Val
 370 375 380
 20
 Ile Trp Gly Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr
 385 390 395 400
 25
 Trp Glu Thr Trp Trp Ala Asp Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu
 405 410 415
 30
 Trp Asp Tyr Val Ser Thr Pro Pro Leu Ile Lys Leu Trp Tyr Arg Leu
 420 425 430 435 440 445
 35
 Glu Ser Glu Pro Ile Arg Gly Ala Glu Thr Tyr Tyr Val Asp Gly Ala
 445 450 455 460 465 470 475 480
 40
 Ala Asn Arg Asp Thr Lys Leu Gly Lys Ala Gly Tyr Val Thr Glu Gln
 450 455 460 465 470 475 480
 45
 Gly Lys Gln Lys Ile Ile Lys Leu Asp Glu Thr Thr Asn Gln Lys Ala
 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520
 50
 Glu Leu Met Ala Val Leu Leu Ala Leu Gln Asp Ser Lys Glu Lys Val
 485 490 495 500 505 510 515 520
 55
 Asn Ile Val Thr Asp Ser Gln Tyr Val Leu Gly Ile Ile Ser Ser Gln
 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560
 60
 Pro Thr Gln Ser Glu Ser Pro Ile Val Gln Gln Ile Ile Glu Glu Leu
 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570
 Thr Lys Lys Glu Gln Val Tyr Leu Thr Trp Val Pro Ala His Lys Gly
 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595
 Ile Gly Gly Asn Glu Lys Ile Asp Lys Leu Val Ser Lys Asp Ile Arg
 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610
 Arg Val Leu Glu Ser Thr His His His His His His
 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610

<210> 7

65 <211> 36

<212> DNA

ES 2 358 824 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> cebador "sentido" empleado para introducir la mutación V75I en la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O

<400> 7

10 aagtgagaa agctgataga ctttagggaa ttaaac 36

<210> 8

15 <211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20 <220>

<223> cebador "antisentido" empleado para introducir la mutación V75I en la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O

25 <400> 8

gtttaattcc ctaaagtcta tcagctttct ccactt 36

30 <210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

35

<220>

<223> cebador "sentido" empleado para introducir la mutación E478Q en la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O

40

<400> 9

ccaatcaaaa ggctcaatta atggcag 27

45

<210> 10

<211> 27

50 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

55 <223> cebador "antisentido" empleado para introducir la mutación E478Q en la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O

<400> 10

60 ctgccattaa ttgagccttt tgattgg 27

<210> 11

65 <211> 1720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 358 824 A1

<220>

<223> Secuencia del inserto portador de la región codificante para la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O modificada mediante la mutación V75I, con modificaciones en los extremos N- y C-terminales que incluyen una cola de 6 residuos de histidina

5

<400> 11

10	gaattctcct ataagcccca tagccccagt gccagtaaag ctaaaaccag gaatggatgg	60
	accaaagta aaacaatggc ccctatctaa agaaaaata gaagccttaa cagcaatatg	120
	ccaggaaatg gaacaagaag gaaaaatttc aagaatagga cctgaaaatc cttataatac	180
15	acctatcttt gctataaaaa agaaagatag tactaagtgg agaaagctga tagactttag	240
	ggaattaaac aagagaacac aagatTTTTG ggaggtacag ttaggtatcc cacatccggg	300
	gggtttaaag caaaagcgat ctgttacagt cttagatgta ggagatgcct atttctcatg	360
20	ccccttagac ccagatttta gaaaatatac tgctttcact attcctagtg taaacaatga	420
	gaccccagga ataagatacc agtacaatgt cctcccgcaa ggatggaaag gttcgccagc	480
25	catattccaa agttcaatga caaaaatttt agatccattt aggaaagaca acccagaatt	540
	agaaatttgt cagtacatgg atgacctata tgtaggatca gatttaccct tggcagaaca	600
	tagaaaaagg gttgaattgc ttagagaaca cttatatcag tggggattca ctaccctga	660
30	taaaagcat caaaaggaac ctccctttat gtggatgggg tatgagctcc atccagataa	720
	atggacagta cagcccatca aattgcctaa caaagatgtg tggacagtaa atgatataca	780
35	aaaactaata ggaaagttaa attgggcaag tcaaatctat caaggaatta gagtaagaga	840
	attgtgtaag ttaattagag gcaccaagtc attaacagaa gtagtaccat taagcaaaga	900
	ggcagagatg gaattagagg agaacagaga gaaattaaaa gaaccaatgc atgggtgtata	960
40	ctatcaacct gataaagact tatgggttaa tattcagaag caaggagaag ggcaatggac	1020
	ttaccagata tatcaggatg aacataagaa cctcaaaaca gggaaatata ctaggcaaaa	1080
45	ggcctccac acaaatgaca taagacaatt agcagaagta atccagaagg tgtctcaaga	1140
	atctatagtt atctggggaa aattgcctaa atttaagctg ccagtcacta gagaaacttg	1200
	ggaaacatgg tgggcagatt attggcaagc cacctggatc ccagaatggg attatgtcag	1260
50	cacaccccca ttgatcaaat tatggtaccg gttagaaagt gaacctatta ggggggcaga	1320
	aacctattat gtagatggag cagctaatag agatacaaaa ttaggaaaag caggatatgt	1380
55	tacagaaca gggaaacaga aaataataaa attagatgag accaccaatc aaaaggctga	1440
	attaatggca gtattattag ccttacagga ttccaaagaa aaagtaaata tagtaacaga	1500
	ctcacaatat gtattgggca ttatctctc ccagcctaca cagagtgaat ccctatagt	1560
60	tcagcagata atagaggaac taacaaaaaa ggaacaggtg tatcttacat gggttcctgc	1620
	tcataaaggc ataggaggaa atgaaaaaat agataaatta gtaagcaagg atattagaag	1680
65	agtcctcgag tcgactcacc accaccacca ccaactgataa	1720

ES 2 358 824 A1

<210> 12

<211> 1720

<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Secuencia del inserto portador de la región codificante para la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O modificada mediante las mutaciones V75I y E478Q, con modificaciones en los extremos N- y C-terminales que incluyen una cola de 6 residuos de

<400> 12

15	gaattctcct ataagcccca tagccccagt gccagtaaag ctaaaaccag gaatggatgg	60
	accaaaagta aaacaatggc ccctatctaa agaaaaata gaagccttaa cagcaatatg	120
	ccaggaaatg gaacaagaag gaaaaatttc aagaatagga cctgaaaatc cttataatac	180
20	acctatcttt gctataaaaa agaaagatag tactaagtgg agaaagctga tagactttag	240
	ggaattaaac aagagaacac aagatttttg ggaggtacag ttaggtatcc cacatccggg	300
	gggttttaaag caaaagcgat ctgttacagt cttagatgta ggagatgcct atttctcatg	360
25	ccccttagac ccagatttta gaaaatatac tgctttcact attcctagtg taaacaatga	420
	gaccccagga ataagatacc agtacaatgt cctcccgcaa ggatggaaag gttcgccagc	480
30	catattccaa agttcaatga caaaaatttt agatccattt aggaaagaca acccagaatt	540
	agaaatttgt cagtacatgg atgacctata tgtaggatca gatttaccct tggcagaaca	600
	tagaaaaagg gttgaattgc ttagagaaca cttatatcag tggggattca ctaccctga	660
35	taaaaagcat caaaaggaac ctccccttat gtggatgggg tatgagctcc atccagataa	720
	atggacagta cagcccatca aattgcctaa caaagatgtg tggacagtaa atgatataca	780
40	aaaactaata ggaaagttaa attgggcaag tcaaatctat caaggaatta gagtaagaga	840
	attgtgtaag ttaattagag gcaccaagtc attaacagaa gtagtaccat taagcaaaga	900
	ggcagagatg gaattagagg agaacagaga gaaattaaaa gaaccaatgc atggtgtata	960
45	ctatcaacct gataaagact tatgggttaa tattcagaag caaggagaag ggcaatggac	1020
	ttaccagata tatcaggatg aacataagaa cctcaaaaca gggaaatata ctaggcaaaa	1080
	ggcctcccac acaaatgaca taagacaatt agcagaagta atccagaagg tgtctcaaga	1140
50	atctatagtt atctggggaa aattgcctaa atttaagctg ccagtcacta gagaaacttg	1200
	ggaaacatgg tgggcagatt attggcaagc cacctggatc ccagaatggg attatgtcag	1260
	cacacccccca ttgatcaaat tatggtaccg gttagaaagt gaacctatta ggggggcaga	1320
55	aacctattat gtagatggag cagctaatag agatacaaaa ttaggaaaag caggatatgt	1380
	tacagaacaa gggaaacaga aaataataaa attagatgag accaccaatc aaaaggctca	1440
60	attaatggca gtattattag ccttacagga ttccaaagaa aaagtaaata tagtaacaga	1500
	ctcacaatat gtattgggca ttatctcctc ccagcctaca cagagtgaat cccctatagt	1560
	tcagcagata atagaggaac taacaaaaaa ggaacaggtg tatcttacat gggttcctgc	1620
65	tcataaaggc ataggaggaa atgaaaaaat agataaatta gtaagcaagg atattagaag	1680
	agtccctcgag tcgactcacc accaccacca ccaactgataa	1720

ES 2 358 824 A1

<210> 13
 <211> 572
 <212> PRT
 5 <213> Artificial Sequence

<223> Subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O modificada mediante la mutación V75I con modificaciones en los extremos N- y C-terminales que incluyen una cola de 6 residuos de histidina

10 <400> 13

```

    15      Met Asn Ser Pro Ile Ser Pro Ile Ala Pro Val Pro Val Lys Leu Lys
           1          5          10          15
    20      Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Ser Lys Glu
           20          25          30
    25      Lys Ile Glu Ala Leu Thr Ala Ile Cys Gln Glu Met Glu Gln Glu Gly
           35          40          45
    30      Lys Ile Ser Arg Ile Gly Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Ile Phe
           50          55          60
    35      Ala Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Ile Asp Phe
           65          70          75          80
    40      Arg Glu Leu Asn Lys Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly
           85          90          95
    45      Ile Pro His Pro Gly Gly Leu Lys Gln Lys Arg Ser Val Thr Val Leu
           100          105
    50      Asp Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser Cys Pro Leu Asp Pro Asp Phe Arg
           115          120          125
    55      Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Val Asn Asn Glu Thr Pro Gly
           130          135          140
    60      Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro
           145          150          155          160
    65      Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Lys Ile Leu Asp Pro Phe Arg Lys
           165          170          175
    70      Asp Asn Pro Glu Leu Glu Ile Cys Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val
           180          185          190
    75      Gly Ser Asp Leu Pro Leu Ala Glu His Arg Lys Arg Val Glu Leu Leu
           195          200          205
    80      Arg Glu His Leu Tyr Gln Trp Gly Phe Thr Thr Pro Asp Lys Lys His
           210          215          220
    85      Gln Lys Glu Pro Pro Phe Met Trp Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp
           225          230          235          240
  
```

ES 2 358 824 A1

Lys Trp Thr Val Gln Pro Ile Lys Leu Pro Asn Lys Asp Val Trp Thr
 245 250 255
 5 Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu Ile Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln
 260 265 270
 10 Ile Tyr Gln Gly Ile Arg Val Arg Glu Leu Cys Lys Leu Ile Arg Gly
 275 280 285
 15 Thr Lys Ser Leu Thr Glu Val Val Pro Leu Ser Lys Glu Ala Glu Met
 290 295 300
 20 Glu Leu Glu Glu Asn Arg Glu Lys Leu Lys Glu Pro Met His Gly Val
 305 310 315 320
 25 Tyr Tyr Gln Pro Asp Lys Asp Leu Trp Val Asn Ile Gln Lys Gln Gly
 325 330 335
 30 Glu Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Asp Glu His Lys Asn Leu
 340 345 350
 35 Lys Thr Gly Lys Tyr Thr Arg Gln Lys Ala Ser His Thr Asn Asp Ile
 355 360 365
 40 Arg Gln Leu Ala Glu Val Ile Gln Lys Val Ser Gln Glu Ser Ile Val
 370 375 380
 45 Ile Trp Gly Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr
 385 390 395 400
 50 Trp Glu Thr Trp Trp Ala Asp Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu
 405 410 415
 55 Trp Asp Tyr Val Ser Thr Pro Pro Leu Ile Lys Leu Trp Tyr Arg Leu
 420 425 430
 60 Glu Ser Glu Pro Ile Arg Gly Ala Glu Thr Tyr Tyr Val Asp Gly Ala
 435 440 445
 65 Ala Asn Arg Asp Thr Lys Leu Gly Lys Ala Gly Tyr Val Thr Glu Gln
 450 455 460
 Gly Lys Gln Lys Ile Ile Lys Leu Asp Glu Thr Thr Asn Gln Lys Ala
 465 470 475 480
 Glu Leu Met Ala Val Leu Leu Ala Leu Gln Asp Ser Lys Glu Lys Val
 485 490 495
 Asn Ile Val Thr Asp Ser Gln Tyr Val Leu Gly Ile Ile Ser Ser Gln

ES 2 358 824 A1

	500	505	510
5	Pro Thr Gln Ser Glu Ser Pro Ile Val Gln Gln Ile Ile Glu Glu Leu 515 520 525		
10	Thr Lys Lys Glu Gln Val Tyr Leu Thr Trp Val Pro Ala His Lys Gly 530 535 540		
15	Ile Gly Gly Asn Glu Lys Ile Asp Lys Leu Val Ser Lys Asp Ile Arg 545 550 555 560		
20	Arg Val Leu Glu Ser Thr His His His His His His 565 570		
25	<210> 14 <211> 572 <212> PRT <213> Artificial Sequence		
30	<220> <223> Subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O modificada mediante las mutaciones V75I y E478Q con modificaciones en los extremos N- y C-terminales que incluyen una cola de 6 residuos de histidina		
35	Met Asn Ser Pro Ile Ser Pro Ile Ala Pro Val Pro Val Lys Leu Lys 1 5 10 15		
40	Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Ser Lys Glu 20 25 30		
45	Lys Ile Glu Ala Leu Thr Ala Ile Cys Gln Glu Met Glu Gln Glu Gly 35 40 45		
50	Lys Ile Ser Arg Ile Gly Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Ile Phe 50 55 60		
55	Ala Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Ile Asp Phe 65 70 75 80		
60	Arg Glu Leu Asn Lys Arg Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly 85 90 95		
65	Ile Pro His Pro Gly Gly Leu Lys Gln Lys Arg Ser Val Thr Val Leu 100 105 110		
	Asp Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser Cys Pro Leu Asp Pro Asp Phe Arg 115 120 125		
	Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro Ser Val Asn Asn Glu Thr Pro Gly 130 135 140		

ES 2 358 824 A1

Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro
 145 150 155 160
 5 Ala Ile Phe Gln Ser Ser Met Thr Lys Ile Leu Asp Pro Phe Arg Lys
 165 170
 10 Asp Asn Pro Glu Leu Glu Ile Cys Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val
 180 185 190
 15 Gly Ser Asp Leu Pro Leu Ala Glu His Arg Lys Arg Val Glu Leu Leu
 195 200 205
 Arg Glu His Leu Tyr Gln Trp Gly Phe Thr Thr Pro Asp Lys Lys His
 210 215 220
 20 Gln Lys Glu Pro Pro Phe Met Trp Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp
 225 230 235 240
 25 Lys Trp Thr Val Gln Pro Ile Lys Leu Pro Asn Lys Asp Val Trp Thr
 245 250 255
 30 Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu Ile Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln
 260 265 270
 35 Ile Tyr Gln Gly Ile Arg Val Arg Glu Leu Cys Lys Leu Ile Arg Gly
 275 280 285
 Thr Lys Ser Leu Thr Glu Val Val Pro Leu Ser Lys Glu Ala Glu Met
 290 295 300
 40 Glu Leu Glu Glu Asn Arg Glu Lys Leu Lys Glu Pro Met His Gly Val
 305 310 315 320
 45 Tyr Tyr Gln Pro Asp Lys Asp Leu Trp Val Asn Ile Gln Lys Gln Gly
 325 330 335
 50 Glu Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Asp Glu His Lys Asn Leu
 340 345 350
 55 Lys Thr Gly Lys Tyr Thr Arg Gln Lys Ala Ser His Thr Asn Asp Ile
 355 360 365
 Arg Gln Leu Ala Glu Val Ile Gln Lys Val Ser Gln Glu Ser Ile Val
 370 375 380
 60 Ile Trp Gly Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr
 385 390 395 400
 65 Trp Glu Thr Trp Trp Ala Asp Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu

ES 2 358 824 A1

	405	410	415
5	Trp Asp Tyr Val ₄₂₀ Ser Thr Pro Pro Leu ₄₂₅ Ile Lys Leu Trp Tyr ₄₃₀ Arg Leu		
10	Glu Ser Glu ₄₃₅ Pro Ile Arg Gly Ala ₄₄₀ Glu Thr Tyr Tyr Val ₄₄₅ Asp Gly Ala		
15	Ala Asn ₄₅₀ Arg Asp Thr Lys Leu ₄₅₅ Gly Lys Ala Gly Tyr ₄₆₀ Val Thr Glu Gln		
20	Gly ₄₆₅ Lys Gln Lys Ile Ile ₄₇₀ Lys Leu Asp Glu Thr ₄₇₅ Thr Asn Gln Lys Ala ₄₈₀		
25	Gln Leu Met Ala Val ₄₈₅ Leu Leu Ala Leu Gln ₄₉₀ Asp Ser Lys Glu Lys ₄₉₅ Val		
30	Asn Ile Val Thr ₅₀₀ Asp Ser Gln Tyr Val ₅₀₅ Leu Gly Ile Ile Ser ₅₁₀ Ser Gln		
35	Pro Thr Gln ₅₁₅ Ser Glu Ser Pro Ile ₅₂₀ Val Gln Gln Ile Ile ₅₂₅ Glu Glu Leu		
40	Thr Lys ₅₃₀ Lys Glu Gln Val Tyr ₅₃₅ Leu Thr Trp Val ₅₄₀ Pro Ala His Lys Gly		
45	Ile Gly Gly Asn Glu Lys ₅₅₀ Ile Asp Lys Leu Val ₅₅₅ Ser Lys Asp Ile Arg ₅₆₀		
50	Arg Val Leu Glu Ser ₅₆₅ Thr His His His His ₅₇₀ His His		

45 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

50 <220>
 <223> cebador "sentido" para amplificar el gen actina (ACT1)

55 <400> 15
 cctaggcacc aggggtgtgat

20

60 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

65 <220>
 <223> cebador "antisentido" para amplificar el gen actina (ACT2)

ES 2 358 824 A1

<400> 16

cggtcaggat cttcatgagg

20

5

<210> 17

<211> 21

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <223> cebador "antisentido" para amplificar el gen actina (ACT3)

<400> 17

cg tactcctg cttgctg atc c

21

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930166

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.05.2009

②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N9/12** (2006.01)
C12Q1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MATAMOROS, T., KIM, B., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Mechanistic insights into the role of Val75 of HIV-1 reverse transcriptase in misinsertion and mispair extension fidelity of DNA synthesis. The Journal of Molecular Biology. Febrero 2008, Vol. 375, Nº 5, páginas 1234-1248. ISSN 1089-8638. <DOI:10.1016/j.jmb.2007.11.021>	1-4,6,8-26
A	SISMOUR, A. M., LUTZ, S., PARK, J.-H. et al. PCR amplification of DNA containing non-standard base pairs by variants of reverse transcriptase from Human Immunodeficiency Virus-1. Nucleic Acids Research. 2004, Vol. 32, Nº 2, páginas 728-735. ISSN 1362-4962. <DOI:10.1093/nar/gkh241>	5,7-12,14,16-26
A	ABBONDANZIERI, E. A., BOKINSKY, G., RAUSCH, J. W., et al. Dynamic binding orientations direct activity of HIV reverse transcriptase. Nature. Mayo 2008, Vol. 453, Nº 7192 páginas 184-189. ISSN 1476-4687. <DOI:10.1038/nature06941>	5,7-10,14,16,17
A	RODES, B., MENDOZA, C., RODGERS, M. et al. Treatment response and drug resistance in patients infected with HIV type 1 group O viruses. AIDS Research and Human Retroviruses. Julio 2005, Vol. 21, Nº 7, páginas 602-607. ISSN 0889-2229. <DOI:10.1089/aid.2005.21.602>	1-4,6,8

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.04.2011

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, NPL, BIOSIS, COMPENDX, INSPEC, XPESP, XPOAC, UniProt, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents, aaGeneSeq

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.04.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-26	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 5, 7	SI
	Reivindicaciones 1-4, 6, 8-26	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MATAMOROS, T. et al. The Journal of Molecular Biology. Febrero 2008, Vol. 375, Nº 5, páginas 1234-1248.	02.2008
D02	SISMOUR, A. M. et al. Nucleic Acids Research. 2004, Vol. 32, Nº 2, páginas 728-735.	2004
D03	ABBONDANZIERI, E. A. et al. Nature. Mayo 2008, Vol. 453, Nº 7192, páginas 184-189.	05.2008
D04	RODES, B. et al. AIDS Research and Human Retroviruses. Julio 2005, Vol. 21, Nº 7, páginas 602-607.	07.2005

D01 investiga la importancia del residuo Val75 de la RT del VIH-1, en la fidelidad y especificidad de la enzima en la síntesis de ADN. Así, demuestra que este residuo influye en la fidelidad de copia, siendo V75I la mutación que produce un mayor incremento en la fidelidad de la RT.

En D02 se desarrolla una RT capaz de incorporar pares de bases no estándar, mediante la introducción de las mutaciones Y188L y E478Q. Mientras la primera mutación permite que la polimerasa sea capaz de incorporar las bases pyDAD y puADA, E478Q se introdujo para eliminar toda posible actividad nucleasa. Este doble mutante fue capaz de incorporar las bases pyDAD y puADA con suficiente fidelidad para ser utilizada en una PCR. Sin embargo, no es termoestable.

D03 estudia la posición de los diferentes tipos de sustratos de la transcriptasa reversa, y su relación con las distintas actividades de la misma. Para poder realizar este análisis, introduce la mutación E478Q, que elimina la actividad ARNasa de la enzima.

En D04 se secuencian el gen pol del VIH-1 grupo O, en seis pacientes infectados con el virus, analizando la aparición de mutaciones antes y durante el tratamiento. El desarrollo de resistencia a los antirretrovirales parece implicar cambios aminoacídicos en posiciones similares en las RT O y M. Una de estas posiciones es la Val75, aunque cambia a diferentes residuos en los dos grupos.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

Las reivindicaciones de la 1 a la 26 cumplen el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1 REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 4 Y 6

El objeto de la presente solicitud, es una retrotranscriptasa del VIH-1 grupo O, que presenta una mutación en el residuo 75 a isoleucina (reivindicación 1) y de secuencia SEQ. ID. NO. 2 (reivindicaciones de la 2 a la 4 y 6). Esta RT tiene una fidelidad de copia incrementada con respecto a la silvestre.

D01 anticipa el hecho de que la retrotranscriptasa de VIH-1 mutante V75I, muestra una fidelidad de copia mayor que la silvestre.

Aunque la RT del documento D01 no es una retrotranscriptasa de VIH-1 grupo O, la transcriptasas reversas de los grupos O y M son muy semejantes. De hecho, presentan mutaciones de resistencia a fármacos en los mismos residuos, siendo uno de ellos la valina 75.

Por lo tanto, un experto en la materia, intentaría obtener una RT del VIH-1 grupo O con una mayor fidelidad de la copia, mediante la introducción de la mutación V75I, con una expectativa razonable de éxito. Así, la reivindicación 1 no tiene actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

En las reivindicaciones de la 2 a la 4 y 6, se especifica que la secuencia de dicha RT es la SEQ. ID. NO. 2, que consiste en la secuencia ya conocida de la RT, pero con la mutación V75I. Dado que esta secuencia ya ha sido divulgada, este dato no se considera relevante.

Por lo tanto, las reivindicaciones de la 2 a la 4 y la 6, tampoco presentan actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

2.2. REIVINDICACIONES 5 Y 7

Las reivindicaciones 5 y 7 cumplen el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

2.3. REIVINDICACIONES DE LA 8 A LA 15

El objeto de la reivindicación 8, es un polinucleótido que codifica cualquiera de las secuencias de aminoácidos reivindicadas.

Dado que la RT perteneciente al VIH-1 grupo O con isoleucina en la posición 75 (reivindicación 1) no presenta actividad inventiva, el polinucleótido que la codifica tampoco. En consecuencia, la reivindicación 8 no tiene actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

La presente solicitud tiene por objeto, de acuerdo con las reivindicaciones de la 9 a la 13, el vector que comprende dicha secuencia de polinucleótidos, estando este polinucleótido unido en fase de lectura a una secuencia codificante para una cola de residuos de histidina, y otra secuencia codificante para una proteasa que corta la RT entre las posiciones 440 y 441 de la SEQ. ID. NO. 1.

D01 investiga la importancia del residuo Val75 de la RT del VIH-1, en la fidelidad y especificidad en la síntesis de ADN. Para ello, expresa las proteínas de interés unidas a una cola de histidinas. Además, con el fin de obtener el heterodímero p66/p55, se expresa la RT junto con la proteasa del HIV-1.

Por lo tanto, las características del vector han sido anticipadas en D01, y al no ser la secuencia codificante para la RT inventiva, el vector tampoco lo es. Así, las reivindicaciones de la 9 a la 13 tampoco cumplen el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

El objeto de las reivindicaciones 14 y 15 es una célula transformada que comprende la secuencia codificante para la RT unida a la cola histidinas, junto con la proteasa, incluida en el mismo vector o en otro diferente.

Al no presentar actividad inventiva las reivindicaciones de la 9 a la 13, tampoco cumplen este requisito las reivindicaciones 14 y 15 (Art. 8.1 LP 11/1986).

2.4. REIVINDICACIONES 16 Y 17

La solicitud tiene por objeto, de acuerdo con las reivindicaciones 16 y 17, un método de producción de la RT de VIH-1 grupo O, con una isoleucina en la posición 75, que comprende cultivar la célula de las reivindicaciones 14 ó 15 y aislar la proteína.

Dado que esta proteína no tiene actividad inventiva, y que el procedimiento consiste en pasos rutinarios conocidos por el experto en la materia, las reivindicaciones 16 y 17 no presentan actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

2.5. REIVINDICACIONES DE LA 18 A LA 26

También son objeto de la presente solicitud: el uso de la RT de la invención en la retrotranscripción (reivindicación 18), amplificación (reivindicación 19) o secuenciación (reivindicación 20), de ARNm (reivindicación 21); los métodos de retrotranscripción (reivindicación 22), amplificación (reivindicación 23) o secuenciación (reivindicación 24) de ARNm (reivindicación 25) que utilizan dicha RT; y por último, el kit que comprende la RT y otros reactivos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos anteriores (reivindicación 26).

En D01 se afirma que la RT del VIH-1 que presenta la mutación V75I tiene una fidelidad de copia incrementada.

Por lo tanto, un experto en la materia intentaría la utilización de una RT de VIH-1 del grupo O con Ile en la posición 75, en métodos de retrotranscripción, amplificación o secuenciación, con una expectativa razonable de éxito. En consecuencia, las reivindicaciones de la 18 a la 26 no cumplen el requisito actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).