(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 386 264**

(21) Número de solicitud: 201031864

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

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **16.12.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **14.08.2012**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **14.08.2012**

(71) Solicitante/s:
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)
Avda. María Luisa s/n; Palacio-Pabellón de Perú
41013 Sevilla, ES

(72) Inventor/es:
MENÉNDEZ ARIAS, LUIS;
BARRIOLUENGO FERNÁNDEZ, VERÓNICA y
ÁLVAREZ GARCÍA, MARIA DEL MAR

(74) Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

(54) Título: **NUEVAS RETROTRANSCRIPTASAS DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 GRUPO 0**

(57) Resumen:
Nuevas retrotranscriptasas del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 grupo O. La presente invención 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 65 y/o en la posición 75, 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. También se refiere a un método de retrotranscripción, a un método de amplificación, a un método de secuenciación utilizando las retrotranscriptasas de la presente invención y a un kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo dichos métodos.

ES 2 386 264 A1

DESCRIPCIÓN

Nuevas retrotranscriptasas del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 grupo O

La presente invención se refiere a retrotranscriptasas aisladas de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) de grupo O y modificadas en las posiciones 65 y/o 75, que presentan una elevada fidelidad de copia y que mantienen una termoestabilidad elevada (similar a la de la retrotranscriptasa no mutada), así como a su uso para llevar a cabo la retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ácido nucleico molde.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

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) y se caracterizan por presentar una enorme diversidad genética. El VIH-1 se ha clasificado en cuatro grupos: M, N, O y P. 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). El primer aislado del 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 puede obtener información sobre el genoma completo de variantes del VIH-1 grupo O en bases de datos de secuencias de nucleótidos como GenBank (por ejemplo, en esta base de datos la cepa MVP5180/91 tiene el número de acceso L20571).

En los retrovirus, la retrotranscriptasa (RT) (o transcriptasa inversa) es la enzima responsable de la replicación del genoma viral. La RT convierte el ácido ribonucleico (ARN) genómico monocatenario en ácido desoxirribonucleico (ADN) bicatenario capaz de integrarse en el genoma de la célula hospedadora (Herschhorn y Hizi. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 2717-2747). Las RTs son ADN polimerasas capaces de utilizar como molde tanto ARN como ADN.

La RT del VIH-1 es un heterodímero constituido por dos subunidades, denominadas p66 y p51. En aislados del VIH-1 de grupo M – subtipo B, se sabe que la subunidad p51 posee 440 aminoácidos mientras que la subunidad 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. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que los homodímeros p66/p66 y los heterodímeros p66/p51 de la RT tienen actividad ADN polimerasa sobre complejos ARN/ADN y ADN/ADN, mientras que la p51 (monomérica u homodimérica) tiene muy poca o carece de dicha actividad (Herschhorn y Hizi. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 2717-2747).

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 de la p66 de la HIV-1 grupo M subtipo B, en una de las dos cadenas que forman el homodímero.

Las RTs son enzimas que carecen de actividad exonucleasa correctora de errores y por tanto, tienen una elevada tasa de error (alrededor de 10^{-4}), lo que explicaría en parte la enorme variabilidad genética observada en algunos retrovirus como el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Menéndez-Arias. *Viruses* 2009; 1: 1137-1165). A pesar de ello, las RTs se utilizan de forma generalizada en tecnología de ADN recombinante, como por ejemplo para la síntesis de ADN copia a partir de ARN mensajero (ARNm), como es el caso de la RT del virus Moloney de la leucemia de ratón (MLV) y la RT del virus de la mieloblastosis de aves (AMV) (Gerard *et al. Nucleic Acids Res* 2002; 30: 3118-3129; Yasukawa *et al. J Biochem (Tokyo)* 2008; 143: 261-268).

En relación a RTs del VIH-1, se ha visto que en reacciones de síntesis de ADN complementario, la RT del VIH-1 de grupo M – subtipo B muestra una eficacia similar a la de las RTs de MLV o AMV a 37 y 42 ºC, pero retiene una actividad mayor a 50 ºC. Por otra parte, se ha demostrado que la RT “wild-type” (salvaje o WT) del VIH-1 de grupo O presenta una mayor termoestabilidad en comparación con la RT de MLV y con una RT “wild-type” del VIH-1 grupo M – subtipo B (WO20101130864).

Las RTs del VIH-1 grupo O 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). Además, las RTs del VIH-1 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). Mutantes V75I y V75I/E478Q de la RT del VIH-1 grupo O proporcionan rendimientos más altos que los obtenidos con la RT “wild-type” del VIH-1 subtipo B en reacciones de amplificación por RT-PCR, cuando la retrotranscripción se lleva a cabo a 57 – 69 ºC (Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884). A pesar de su elevada termostabilidad, las RTs “wild-type” del VIH-1, tanto las del grupo M – subtipo B, como las del

grupo O, son aproximadamente 7 a 15 veces menos fieles que las RTs del MLV y AMV, en ensayos genéticos basados en la síntesis de ADN utilizando como molde el gen *lacZ* presente en el fago M13mp2 (Roberts *et al. Science* 1988; 242: 1171-1173; Roberts *et al. Mol Cell Biol* 1989; 9: 469-476; Menéndez-Arias. *Viruses* 2009; 1: 1137-1165; patente WO20101130864).

Se ha observado que algunos cambios de aminoácido pueden producir un incremento de fidelidad en algunas RTs, como por ejemplo las mutaciones K65A, K65R, V75I, D76V, R78A, V148I y Q151N, en el contexto de secuencia de la RT del VIH-1 de subtipo B (Menéndez-Arias. *Viruses*, 2009; 1: 1137-1165; Garforth *et al*. *J Mol Biol* 2010; 401: 33-44). Sin embargo, no es posible *a priori* conocer si la misma mutación ejerce el mismo efecto en una variante del VIH-1 filogenéticamente alejada del subtipo B como es el caso de las variantes de grupo O. De hecho, el mismo cambio puede tener efectos distintos según el contexto de secuencia. Por ejemplo, la sustitución E89G en la RT del VIH-1 del grupo M - subtipo B produce un aumento de fidelidad en ensayos de incorporación errónea y en ensayos de extensión de extremos desapareados (Drosopoulos y Prasad. *J Virol* 1996; 70: 4834-4838; Hamburgh *et al. Nucleic Acids Res* 1998; 26: 4389-4394; Rubinek *et al. Eur J Biochem* 1997; 247: 238-247). Sin embargo, en el contexto de secuencia de la RT del VIH-2, E89G tiene un efecto mínimo sobre la fidelidad de copia, medida con el mismo tipo de ensayos (Taube *et al. Eur J Biochem* 1997; 250: 106-114). Otro ejemplo es la mutación L74V, que en la RT del VIH-1 del grupo M subtipo B produce un aumento de fidelidad medida en ensayos de incorporación errónea y en ensayos de extensión de extremos desapareados (Rubinek *et al. Eur J Biochem* 1997; 247: 238-247), aunque estos efectos no se observaron cuando la mutación se introdujo en la RT del VIH-2 (Taube *et al. Eur J Biochem* 1997; 250: 106-114).

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

El problema técnico que resuelve la invención es el de proporcionar retrotranscriptasas (RTs) de retrovirus con mayor fidelidad de copia y por lo tanto menor tasa de error y que además sean estables a temperaturas elevadas, mayores de 54 ºC.

La presente invención se refiere a RTs aisladas de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) de grupo O y modificadas en una o en más posiciones, 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.

Con el fin de obtener nuevas RTs modificadas del VIH-1 de grupo O se han generado 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 lisina 65 por arginina (mutación K65R); o mediante la sustitución de lisina 65 y valina 75 por arginina e isoleucina, respectivamente (mutaciones K65R y V75I). Estas nuevas RTs muestran un incremento en su fidelidad de copia con respecto a la de la RT no modificada, sin que disminuya su termoestabilidad. Además se han comparado las RTs de la invención con otras RTs ya conocidas en el estado de la técnica. Las RTs del VIH-1 de grupo O portadoras de la mutación K65R o de las mutaciones K65R y V75I presentan mayor fidelidad de copia y termoestabilidad que las RTs de aislados o cepas del VIH-1 de grupo M subtipo B (RT del VIH-1 de subtipo B), y que la RT de MLV, empleadas con el mismo fin.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una RT aislada de un VIH-1 de grupo O y modificada para que comprenda una secuencia de aminoácidos en la que el residuo que corresponde a la posición 65 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por una arginina o por otro aminoácido que suponga una sustitución conservativa respecto a la arginina, donde dicha RT modificada tiene una fidelidad de copia incrementada con relación a la RT no modificada correspondiente, a la vez que mantiene la estabilidad a temperaturas elevadas de la enzima no modificada.

Dado que la p66 puede ser proteolizada, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos comprendida por la RT de la invención presenta una identidad de, al menos, un 70%, más preferiblemente, de, al menos, un 80% y, aún más preferiblemente, de al menos un 90% 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.

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 sustitución del residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1 por una isoleucina o por otro aminoácido que suponga una sustitución conservativa respecto a la isoleucina, y donde dicha RT modificada tiene una fidelidad de copia incrementada con relación a la RT no modificada y conserva la estabilidad de ésta a temperaturas elevadas.

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.

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.

El término “retrotranscriptasa aislada del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1" (o “human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase”, o “HIV-1 RT”) se refiere a una proteína retrotranscriptasa con actividad ADN polimerasa dependiente de ADN y ARN, 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 RT a partir del ARN viral obtenido de un aislado del VIH-1, y posterior clonación en un vector de expresión.

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.

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 “residuo” corresponde a un aminoácido.

El término “sustitución conservativa” se refiere a una sustitución que se realice con aminoácidos que se considerarían por un experto en la materia como similares, por ejemplo en propiedades fisico-químicas de hidrofobicidad, polaridad, carga o volumen de su cadena lateral, y que conllevaran a una actividad similar a la descrita para los mutantes de la presente invención. En la presente invención “amino ácidos similares” hace referencia a aminoácidos similares a arginina en el caso de la sustitución en el residuo de la posición 65 o similares a isoleucina en el caso de la sustitución en el residuo de la posición 75.

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 pre-estacionario.

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 [γ^{32}P]ATP), en presencia de distintas concentraciones de dNTP, una vez formado el complejo binario RT/molde-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 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 extender 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 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 extensión del extremo correctamente apareado.

Los ensayos bioquímicos en el estado pre-estacionario 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 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 que se ha eliminado la región correspondiente al gen *lacZ* de una de sus hebras. La reacción de síntesis de ADN se realiza en presencia de la RT y de concentraciones altas de los dNTPs. 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-galactopiranósido) e IPTG (isopropil-β-tio-galactopiranósido). 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.

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.

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 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.

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 ºC, preferiblemente de, al menos, 50 ºC, más preferiblemente de, al menos, 55 ºC y aún más preferiblemente de, al menos 60 ºC.

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 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 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 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 ºC, preferiblemente de, al menos, 55 ºC, más preferiblemente de, al menos 60 ºC y aún más preferiblemente de, al menos, 65 ºC.

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.

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 del VIH-1 grupo O “wild-type” (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 termostabilidad incrementada cuando la cantidad de producto obtenido mediante 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 del VIH-1 grupo O “wild-type” (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 X_1NX_2, en la que X_1 es el aminoácido en la secuencia de proteína no mutada, X_2 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 oligonucléotido. 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 polinucléotido 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.

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

Los términos “polinucleótido”, “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico” y “oligonucleótido” 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.

Un tercer 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.

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.

El término “vector de expresión”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un vector de clonación 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.

El termino “expresión” se refiere al proceso por el cuál 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.

El término “célula” o “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.

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.

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.

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.

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 codificadora. Secuencias de control apropiadas para la expresión de un polinucleótido en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica.

Utilizando técnicas bien conocidas, un experto en la materia sería 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.

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:

a) un promotor,

b) una señal de inicio de la transcripción,

c) una señal de terminación de la transcripción,

d) una señal de poliadenilación, o

e) un activador transcripcional.

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.

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.

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 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. 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.

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.

El término “proteasa del 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, o en posiciones próximas, y 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 clonación 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 (cepa NL4-3). En el virus, dicha proteasa forma homodímeros mediante la unión no covalente de sus subunidades.

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 postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

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%.

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.

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 o alrededor de 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.

Un cuarto 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.

Una realización preferida de este aspecto de la 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.

Otra realización preferida de este aspecto de la 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, o entre residuos próximos a éstos. De ahora en adelante utilizaremos la expresión “célula 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.

Un quinto 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

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

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

a) cultivar la célula de la invención, y

b) aislar la RT expresada en el paso (a) por dicha célula y preservarla en condiciones que permitan a la RT estar activa.

Las condiciones que permitirían la actividad de la RT aislada en el método descrito en el sexto aspecto de la invención son las aplicables a cualquier proteína y conocidas para cualquier experto en la materia, por ejemplo condiciones que permitan que la proteína se pliegue correctamente y que sea funcionalmente activa (por ejemplo, que posea actividad catalítica, en el caso de enzimas). Ejemplos de factores a tener en cuenta para mantener la funcionalidad de la proteína incluyen, pero sin limitarnos, condiciones adecuadas de pH, concentración de electrolitos y sales adecuado, presencia de agentes reductores como el ditiotreitol a concentraciones apropiadas, o la adición de agentes estabilizantes.

Un séptimo 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.

Un octavo 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.

Un noveno 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.

Un décimo aspecto de la presente invención se refiere a un método de retrotranscripción de un ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm, que comprende:

a) mezclar dicho ácido nucleico molde con la RT de la invención, e

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

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

a) mezclar dicho ácido nucleico con la RT de la invención y con, al menos, una ADN polimerasa dependiente de ADN, e

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

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

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

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

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.

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.

El término “ácido nucleico molde” o “molde” 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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).

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.

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.

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.

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 desoxirribonucleótidos 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 Vent™), *Pyrococcus furiosis* (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* (Tfl/Tub), *Thermus ruber* (Tru), *Thermus brockianus* (DyNAzyme™), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth) o *Mycobacterium* sp. (Mtb, Mlep).

Un decimotercer 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.

Un decimocuarto aspecto de la invención se refiere al uso del kit del decimotercer aspecto de la invención para la retrotranscripción, la amplificación o la secuenciación de un ácido nucleico molde, donde preferiblemente éste es ARN mensajero.

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.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Electroforesis de las RTs analizadas. Muestra la pureza de las distintas RTs obtenidas. La electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS muestra: 1, marcadores de peso molecular (de arriba hacia abajo: 97,4 kDa, 66,2 kDa, 45 kDa y 31 kDa); 2, RT del VIH-1 grupo O “wild-type” (WT); 3, RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación K65R; 4, RT del VIH-1 grupo O portadora de las mutaciones K65R y V75I; 5, RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación R78A; pocillos 6 y 7: albúmina de suero bovino (66,2 kDa) (1 y 2 µg respectivamente).

Figura 2. Termoestabilidad de las RTs analizadas. Muestra la estabilidad térmica de variantes de la RT del VIH-1 grupo O en comparación con la RT del VIH-1 grupo M - subtipo B (BH10_WT). Para cada enzima, se representa la actividad específica residual ADN polimerasa ARN-dependiente, determinada tras preincubar la enzima con el molde-iniciador durante 5 min a la temperatura indicada, y relativa a la obtenida cuando la preincubación se realiza a 37 ºC. Las reacciones de polimerización se llevan a cabo con poli(rA)/oligo$(dT)_{16}$ como molde-iniciador y [^{3}H]dTTP como sustrato. Las velocidades de incorporación de nucleótido obtenidas para las distintas enzimas a 37 ºC (valores de referencia) fueron: 0.72 ± 0.28 s^{-1} para RTO_WT (RT del VIH-1 grupo O “wild-type”), 0.92 ± 0.25 s^{-1} para RTO_K65R (RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación K65R), 0.61 ± 0.26 s^{-1} para RTO_K65R/V75I (RT del VIH-1 grupo O portadora de las mutaciones K65R y V75I), 0.45 ± 0.06 s^{-1} para RTO_R78A (RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación R78A, donde la arginina de la posición 78 se sustituyó por una alanina), 0.25 ± 0.06 s^{-1} para RTO_V75I/R78A (RT del VIH-1 grupo O portadora de las mutaciones V75I y R78A), 0.57 ± 0.06 s^{-1} para RTO_V75I (RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación V75I) y 1.17 ± 0.4 s^{-1} para BH10_WT (RT del VIH-1 grupo M – subtipo B BH10).

Figura 3. Actividad ADN polimerasa dependiente de ARN de las RTs analizadas. Muestra la amplificación por RT-PCR de fragmentos de ARN codificante para actina de 900 pares de bases (A) y para tubulina de 1200 pares de

bases (B), a partir de ARN total de hígado de ratón. La amplificación se llevó a cabo con las siguientes RTs: pocillo 2, RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación K65R (RTO_K65R); pocillo 3, RT del VIH-1 grupo O portadora de las mutaciones K65R y V75I (RTO_K65R/V75I); pocillo 4, RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación R78A (RTO_R78A); pocillo 5, RT del VIH-1 grupo O portadora de las mutaciones V75I y R78A (RTO_V75I/R78A); pocillo 6, RT del VIH-1 grupo O "wild-type" (RTO_WT); pocillo 7, V75I en el contexto de O_WT RT (RTO_V75I); pocillo 8, RT del VIH-1 subtipo B BH10 (RT BH10_WT); y pocillo 9, RT del virus Moloney de la leucemia de ratón (RT MLV) (pocillo 8). En los pocillos 1 y C se muestran marcadores de peso molecular (digerido de ADN de fago Φ29, llevado a cabo con HindIII) y un control negativo realizado en ausencia de ADN complementario, respectivamente. Las temperaturas indicadas se refieren a la reacción de síntesis del ADN copia.

Figura 4. Fidelidad de copia de las RTs analizadas. Muestra la eficiencia de incorporación de nucleótidos incorrectos (A) y la eficiencia de extensión de extremos desapareados (B), obtenida con dos de las tres RTs mutantes caracterizadas (RTO_K65R y RTO_K65R/V75I), en comparación con las de la RT del VIH-1 grupo O "wild-type" (RTO_WT) y la RT portadora de la mutación V75I (RTO_V75I).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

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 a continuación ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1: Generación, expresión y purificación de variantes de la RT del VIH de tipo 1 de grupo O.

La expresión y purificación de las RTs se llevó a cabo con una versión modificada del plásmido p66RTB utilizando las herramientas moleculares descritas en la bibliografía, que pasamos a describir brevemente (Boretto *et al. Anal Biochem* 2001; 292: 139-147; Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884; patente WO20101130864). La expresión y purificación de las RTs se llevó a cabo con una versión modificada del plásmido p66RTB que contiene el gen de resistencia a ampicilina y en el que se clonó la región codificante de la subunidad p66 de la RT de un aislado del VIH-1 de grupo O. 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 produjo la subunidad p66, modificada en el extremo N-terminal (amino terminal) por la presencia de tres aminoácidos: Met-Asn-Ser, y en el extremo C-terminal (carboxilo terminal) por la presencia de una cola de 9 aminoácidos (Glu-Ser-Thr-His-His-His-His-His-His), que contenía los seis residuos de histidina, que facilitan su purificación. La subunidad p51 se generó 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_K65R y RTO_K65R/V75I 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 K65R. Como molde para la introducción de K65R, se empleó el plásmido portador de la secuencia que codifica para la p66 del VIH-1 (grupo O) ("wild-type"), descrito anteriormente. La mutación K65R también se introdujo en el plásmido portador de V75I, para obtener el doble mutante K65R/V75I. Tras la mutagénesis se comprobó por secuenciación que la región codificadora de p66 en dichos plásmidos era correcta y que contenía únicamente las mutaciones introducidas. Las secuencias de nucleótidos de los insertos portadores de las mutaciones K65R y K65R/V75I se muestran en las SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, respectivamente. SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 contienen nucleótidos en los extremos 5´ y 3´ que codifican para aminoácidos adicionales del extremo N-terminal (Met-Asn-Ser) y del extremo C-terminal (Glu-Ser-Thr-His-His-His-His-His-His) de la subunidad p66 de la RT. Las secuencias de aminoácidos de las RTs que se obtuvieron de la expresión de los plásmidos mutantes se indican en las SEQ ID NO: 11 (K65R) y SEQ ID NO: 12 (K65R/V75I). Dichas secuencias contienen los aminoácidos adicionales de los extremos N- y C-terminales indicados anteriormente.

La subunidad p66 (con sus extremos modificados) se co-expresó 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 pATproteasa, en fase exponencial de crecimiento, y se indujo la expresión de RT con isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (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 P11 (Whatman)] y de afinidad [en columnas de Ni^{2+}-nitriloacético-agarosa (ProBond™, Invitrogen)]. En la cromatografía en fosfocelulosa, la RT se eluyó con un gradiente de NaCl (0 a 2 M) en tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6.8). En la cromatografía de afinidad la RT se eluyó con un gradiente de imidazol (de 0 a 500 mM) en fosfato sódico 50 mM (pH 6,0). Las fracciones que contenían la RT se reunieron y se dializaron tres veces frente a tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), que contenía NaCl 25 mM,

ditiotreitol 1 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y glicerol al 10% y posteriormente se concentraron utilizando dispositivos tipo Centriprep-30 y Centricon-30 (Amicon, Millipore).

El rendimiento obtenido a partir de 3 litros de cultivo (aproximadamente 10 g de células), estimado a partir del coeficiente de extinción molar de la RT a 280 nm (ε_{280} = 260450 $M^{-1}cm^{-1}$), fue superior a 10 mg para la RT con la mutación K65R y superior a 20 mg para el doble mutante K65R/V75I. La pureza de las RTs obtenidas fue superior al 95% de acuerdo a estimaciones llevadas a cabo con geles de poliacrilamida y SDS (Figura 1).

EJEMPLO 2: Efecto de la mutación K65R por sí sola o combinada con V75I (mutante K65R/V75I) sobre la termoestabilidad y la eficiencia de la reacción de retrotranscripción acoplada con amplificación por PCR.

La estabilidad térmica de las RTs se determinó midiendo la actividad ADN polimerasa ARN-dependiente residual, obtenida tras preincubar las enzimas durante 5 minutos a diferentes temperaturas en el rango de 37 a 58 ºC, en presencia del complejo molde-iniciador. A continuación, se llevaron a cabo reacciones de polimerización a 37 ºC, en presencia de poli(rA)/oligo$(dT)_{16}$ 1 µM y [^{3}H]dTTP 50 µM, en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 20 mM, $MgCl_2$ 10 mM y ditiotreitol 8 mM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 0.2 – 1 pmol de enzima (en 30 µl de volumen de reacción) y se incubaron durante 0 – 10 min, para calcular la tasa de incorporación de dTTP. Las reacciones se detuvieron añadiendo 20 µl de EDTA a 0.5 M (Quiñones-Mateu *et al. Virology* 1997; 236: 364-373; Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884).

Los ensayos de estabilidad térmica demostraron que todas las RTs del VIH-1 grupo O (al igual que la RT “wild-type” del VIH-1 subtipo B) retenían más del 60% de su actividad tras ser incubadas a 46 ºC durante 5 min (Figura 2). Cuando la preincubación se realiza a 50 ºC, todas ellas, excepto el mutante R78A, retenían más del 40% de la actividad inicial. El estudio comparado de las distintas enzimas reflejó diferencias importantes a 54 ºC. Cuando la preincubación se hacía a esta temperatura, solo retenían actividad significativa (25-35%) cuatro variantes de la RT del VIH-1 grupo O: la enzima “wild-type” y las mutantes K65R, V75I y K65R/V75I. En estas condiciones la RT “wild-type” del VIH-1 subtipo B, retiene alrededor de un 5%, mientras que los mutantes R78A y V75I/R78A no presentan actividad significativa.

Para analizar los efectos de las mutaciones sobre la eficiencia de la reacción de retrotranscripción acoplada con amplificación por PCR se llevaron a cabo reacciones de retrotranscripción a diferentes temperaturas, y posteriormente los productos de reacción (ADN complementario, ADNc) se amplificaron por PCR en condiciones estándar (Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884). Típicamente, la reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl [4 µl de tampón Tris-HCl 250 mM (pH 8,3 at 25 ºC) que contenía KCl 375 mM, $MgCl_2$ 15 mM y ditiotreitol 50 mM; 1 µl de ARN total aislado de hígado de ratón (1 µg/µl) (Stratagene); 4 µl de una mezcla de los 4 dNTPs (a 2,5 mM cada uno de ellos); 1 µl de oligo-dT (100 µM); 0,5 µl de inhibidor de RNasa (40 unidades/µl) (RNasin® Plus, Promega); la RT a una concentración aproximada de 150 nM y el resto hasta 20 µl de agua]. Inicialmente se incubó el ARN de hígado de ratón y el oligo-dT a 68 ºC durante 3 min. Después se añadieron los demás componentes de la reacción (incluida la RT) y se incubó durante 1 hora a la temperatura deseada para ver termostabilidad. Finalmente, la reacción se detuvo incubando 10 min a 92 ºC, para obtener el ADNc. El ADNc se amplificó por PCR en condiciones estándar, utilizando Taq polimerasa u otras enzimas similares (por ejemplo, Expand High Fidelity ADN polimerasa, Roche).

La eficiencia de la reacción de retrotranscripción a diferentes temperaturas se determinó tras amplificación por PCR del ADN copia obtenido. La RT “wild-type” del VIH-1 grupo O y los mutantes K65R, V75I y K65R/V75I resultaron ser eficaces en la amplificación de un fragmento de ARN de aproximadamente 900 pares de bases derivado del gen de actina, a partir de reacciones de retrotranscripción llevadas a cabo a distintas temperaturas (Figura 3A). Resultados similares se obtuvieron en la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1200 pares de bases de un ARN que codifica para tubulina (Figura 3B). Los cebadores utilizados para la amplificación del ADN copia de actina (ACT1 y ACT3) o de tubulina (TUB1 y TUB2) han sido descritos con anterioridad (Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884). La eficacia de las cuatro enzimas fue similar a la obtenida con la RT “wild-type” del VIH-1 grupo M - subtipo B (cepa BH10), y superior a la de la RT de MLV.

EJEMPLO 3: Efecto de la mutación K65R por sí sola o combinada con V75I (mutante K65R/V75I) sobre la fidelidad de copia de la RT de grupo O.

La fidelidad de copia de las RTs se determinó mediante ensayos genéticos utilizando el plásmido M13mp2 *lac*Zα (Bebenek y Kunkel. *Methods Enzymol* 1995; 262: 217-232). Además se llevaron a cabo ensayos cinéticos de incorporación de nucleótido y ensayos cinéticos de extensión de extremos desapareados, en condiciones de estado pre-estacionario, a fin de determinar la capacidad de las distintas enzimas para discriminar entre nucleótidos correctos e incorrectos o complejos molde-iniciador correcta o incorrectamente apareados. Para ello se utilizó el complejo molde-iniciador 31T/21P, o derivados de éste, en los que el extremo 3’OH del cebador 21P podría estar desapareado.

La fidelidad de copia de las distintas RTs se midió en ensayos de complementación en los que se utilizaron derivados del fago M13mp2 portadores del gen *lacZ*. Con estos ensayos se determinó la frecuencia con que se obtenían mutantes cuando el proceso de síntesis se realizaba con las distintas RTs recombinantes (Tabla 1). Un

aumento de fidelidad de copia se refleja en la aparición en el ensayo de un número menor de placas mutantes. La RTs portadoras de las mutaciones K65R y K65R/V75I mejoraron la fidelidad de copia de la RT "wild-type" del VIH-1 grupo O en 10,8 y 9,3 veces, respectivamente. Su fidelidad es además superior en 1,5 a 1,8 veces a la obtenida con la RT del MLV.

Tabla 1. Fidelidad de la RT del VIH-1 grupo O "wild-type" (RTO_WT) comparada con las del VIH-1 grupo M - subtipo B ("wild-type" BH10) (BH10_WT) y del MLV (RT_MLV) y de distintos mutantes de la RT del VIH-1 grupo O: K65R (RTO_K65R), K65R/V75I (RTO_K65R/V75I), V75I (RTO_V75I), R78A (RTO_R78A) y E478Q (RTO_E478Q, en la que se sustituyó el residuo de ácido glutámico de la posición 478 por glutamina), estimada mediante ensayos genéticos de complementación (M13mp2 *lacZ*α "forward mutation assay").

Enzima	Placas totales	Placas mutantes	Frecuencia de mutantes	Incremento de la fidelidad		
				(respecto a RTO_WT)	(respecto a BH10_WT)	(respecto a RT_MLV)
RTO_WT [a]	7579	63	0,00831	-	2,5	
RTO_K65R	75474	58	0,00077	10,8	26,8	1,8
RTO_K65R/V75I	55657	50	0,00089	9,3	23,2	1,5
RTO_V75I [a]	9894	47	0,00475	1,7	4,3	
RTO_R78A	80664	48	0,00059	14,1	35,0	2,3
RTO_E478Q	30634	44	0,00144	5,8	14,4	
BH10_WT [b]	6736	139	0,02064		-	
RT_MLV	29648	40	0,00135	6,2	15,3	-

[a] Datos para RTO_WT y RTO_V75I tomados de Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884.

[b] Datos para BH10_WT tomados de Matamoros *et al. J Mol Biol* 2008; 375: 1234-1248.

Los ensayos de incorporación de nucleótido (ensayos bioquímicos basados en la utilización de geles) demostraron que las variantes de la RT de grupo O K65R y K65R/V75I (es decir, RTO_K65R y RTO_K65R/V75I) presentaban una eficacia catalítica similar o incluso un poco superior (en el caso de K65R) a la de la enzima "wild-type" (RTO_WT). Los ensayos de incorporación errónea de nucleótido demostraron que el mutante K65R era de 3,9 a 8 veces más fiel que la enzima "wild-type" para la incorporación al DNA de C [citidina (monofosfato)], G [guanosina (monofosfato)] o A [adenosina (monofosfato)] en lugar de T [timidina (monofosfato)]; mientras que el mutante K65R/V75I presentaba una fidelidad incluso superior en ensayos de incorporación de C o A en lugar de T (Tabla 2). Ambas enzimas mejoraban la fidelidad del mutante V75I para la incorporación de C o A en lugar de T.

En ensayos de extensión de extremos desapareados, los dos mutantes (K65R y K65R/V75I) eran más fieles que la enzima "wild-type" en reacciones de extensión de extremos desapareados, aunque las diferencias con el mutante V75I eran pequeñas (Tabla 3). En cualquier caso, el doble mutante K65R/V75I exhibía una fidelidad 5,2 veces superior a la de la RT "wild-type" para la extensión de extremos G:A, 9,5 veces superior para la extensión de G:T y 22,8 veces superior para la extensión de G:C. Las diferencias entre las cuatro RTs aparecen reflejadas gráficamente en la Figura 4.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de incorporación errónea de nucleótidos sobre el complejo molde-iniciador 31T/21P para la RT del VIH-1 grupo O "wild-type" (RTO_WT) y los mutantes K65R (RTO_K65R), K65R/V75I (RTO_K65R/V75I) y V75I (RTO_V75I), determinados en el estado pre-estacionario.

Enzima	Nucleótido	k_{pol} (s^{-1})	K_d (μM)	k_{pol}/K_d ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	Eficiencia de incorporacón errónea (f_{inc}) [b]
RTO_WT [a]	dTTP	14,7 ± 1,0	11,8 ± 2,9	1,25 ± 0,32	
	dCTP	0,72 ± 0,10	7652 ± 2083	(9,5 ± 2,9) × 10^{-5}	7,57 × 10^{-5}
	dGTP	0,15 ± 0,03	11730 ± 3750	(1,3 ± 0,5) × 10^{-5}	1,03 × 10^{-5}
	dATP	(7,3 ± 0,2) × 10^{-3}	1485 ± 150	(4,9 ± 2,2) × 10^{-6}	3,94 × 10^{-6}
RTO_V75I[a]	dTTP	13,9 ± 1,2	14,6 ± 4,3	0,96 ± 0,30	
	dCTP	0,27 ± 0,05	11023 ± 3792	(2,4 ± 0,9) × 10^{-5}	2,54 × 10^{-5} (3,0)
	dGTP	(6,3 ± 0,9) × 10^{-2}	7481 ± 2307	(8,4 ± 2,9) × 10^{-6}	8,76 × 10^{-6} (1,2)
	dATP	(2,2 ± 0,2) × 10^{-3}	2308 ± 720	(9,5 ± 3,1) × 10^{-7}	9,98 × 10^{-7} (3,9)
RTO_K65R	dTTP	10,7 ± 0,9	5,8 ± 1,9	1,82 ± 0,60	
	dCTP	0,17 ± 0,02	9559 ± 1908	(1,7 ± 0,4) × 10^{-5}	9,51 × 10^{-6} (8,0)
	dGTP	(3,1 ± 1,9) × 10^{-2}	6452 ± 857	(4,8 ± 0,7) × 10^{-6}	2,66 × 10^{-6} (3,9)
	dATP	(4,8 ± 0,1) × 10^{-3}	3680 ± 178	(1,3 ± 0,1) × 10^{-6}	7,09 × 10^{-7} (5,6)
RTO_ K65R/V75I	dTTP	12,7 ± 1,3	13,3 ± 3,7	0,95 ± 0,28	
	dCTP	(3,3 ± 0,3) × 10^{-2}	5686 ± 995	(5,8 ± 1,1) × 10^{-6}	6,06 × 10^{-6} (12,5)
	dGTP	0,11 ± 0,02	13430 ± 4605	(8,3 ± 3,3) × 10^{-6}	8,70 × 10^{-6} (1,2)
	dATP	(3,3 ± 0,2) × 10^{-3}	5290 ± 553	(6,2 ± 0,7) × 10^{-7}	6,52 × 10^{-7} (6,0)

[a] Datos para RTO_WT y RTO_V75I tomados de Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884.

[b] El valor de eficiencia de incorporación errónea (f_{inc}) se define como:

f_{inc} = [k_{pol}(incorrecto)/K_d(incorrecto) / k_{pol}(correcto)/K_d(correcto)], donde los nucleótidos incorrectos fueron dCTP, dGTP o dATP, mientras que el nucleótido correcto fue dTTP. Los números entre paréntesis representan el aumento relativo de fidelidad obtenido para cada nucleótido incorrecto, a partir de la expresión: f_{inc} (RTO_WT) / f_{inc} (RT mutante).

Tabla 3. Parámetros cinéticos de extensión de extremos desapareados sobre el complejo molde-iniciador 31T/21P para la RT del VIH-1 grupo O “wild-type” (RTO_WT) y los mutantes K65R (RTO_K65R), K65R/V75I (RTO_K65R/V75I) y V75I (RTO_V75I), determinados en el estado pre-estacionario.

Enzima	Par de bases en posición 3´	k_{pol} (s^{-1})	K_d (μM)	k_{pol}/K_d ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	Eficiencia de extensión de extremos desapareados (f_{ext}) [b]
RTO_WT [a]	G:C	14,7 ± 1,0	11,8 ± 2,9	1,25 ± 0,32	
	G:T	7,6 ± 0,9	2638 ± 785	$(2,9 \pm 0,9) \times 10^{-3}$	$2,30 \times 10^{-3}$
	G:G	0,56 ± 0,07	1132 ± 316	$(4,9 \pm 1,5) \times 10^{-4}$	$3,95 \times 10^{-4}$
	G:A	$(2,1 \pm 0,3) \times 10^{-2}$	7817 ± 2334	$(2,7 \pm 0,9) \times 10^{-6}$	$2,17 \times 10^{-6}$
RTO_V75I [a]	G:C	13,9 ± 1,2	14,6 ± 4,3	0,96 ± 0,30	
	G:T	2,8 ± 0,2	4400 ± 789	$(6,3 \pm 1,2) \times 10^{-4}$	$6,56 \times 10^{-4}$ (3,5)
	G:G	0,32 ± 0,01	2426 ± 178	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-4}$ (2,8)
	G:A	$(6,8 \pm 0,8) \times 10^{-3}$	12110 ± 2536	$(5,6 \pm 1,3) \times 10^{-7}$	$5,86 \times 10^{-7}$ (3,7)
RTO_K65R	G:C	10,7 ± 0,9	5,8 ± 1,9	1,82 ± 0,60	
	G:T	3,1 ± 0,5	2214 ± 1058	$(1,4 \pm 0,7) \times 10^{-3}$	$7,80 \times 10^{-4}$ (2,9)
	G:G	0,19 ± 0,02	1416 ± 328,4	$(1,3 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$7,25 \times 10^{-5}$ (5,4)
	G:A	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	15180 ± 4239	$(8,7 \pm 2,9) \times 10^{-7}$	$4,78 \times 10^{-7}$ (4,5)
RTO_ K65R/V75I	G:C	12,7 ± 1,3	13,3 ± 3,7	0,95 ± 0,28	
	G:T	2,4 ± 0,2	10450 ± 1644	$(2,3 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	$2,43 \times 10^{-4}$ (9,5)
	G:G	$(8,7 \pm 0,9) \times 10^{-2}$	5213 ± 1096	$(1,7 \pm 0,4) \times 10^{-5}$	$1,77 \times 10^{-5}$ (22,3)
	G:A	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	3578 ± 786	$(3,9 \pm 0,9) \times 10^{-7}$	$4,15 \times 10^{-7}$ (5,2)

[a] Datos para RTO_WT y RTO_V75I tomados de Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884.

[b] El valor de eficiencia de extensión de extremos desapareados (f_{ext}) se define como:

f_{ext} = [k_{pol}(desapareado)/K_d(desapareado) / k_{pol}(apareado)/K_d(apareado)], donde los pares de bases desapareados fueron G:T, G:G y G:A, mientras que el par correctamente apareado fue G:C. Los números entre paréntesis representan el aumento relativo de fidelidad obtenido para cada par de bases, a partir de la expresión: f_{ext} (RTO_WT) / f_{ext} (RT mutante).

REIVINDICACIONES

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 65 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por una arginina o por otro aminoácido que suponga una sustitución conservativa respecto a la arginina.

2. Retrotranscriptasa según la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 70% con la SEQ ID NO: 1.

3. Retrotranscriptasa según la reivindicación 2, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 80% con la SEQ ID NO: 1.

4. Retrotranscriptasa según la reivindicación 3, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 90% con la SEQ ID NO: 1.

5. Retrotranscriptasa según las reivindicaciones 1 a 4, donde la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 2.

6. Retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la secuencia de aminoácidos además tiene otra sustitución del residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1 por una isoleucina o por otro aminoácido que suponga una sustitución conservativa respecto a la isoleucina.

7. Retrotranscriptasa según la reivindicación 6, donde la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 3.

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.

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,

c) una señal de terminación de la transcripción,

d) una señal de poliadenilación, o

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.

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 de realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos de una retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 entre, o alrededor de, los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.

14. Célula que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.

15. Célula según la reivindicación 14, 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 o alrededor de los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.

16. Célula que comprende el vector según la reivindicación 13.

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

a) cultivar la célula según cualquiera de las reivindicaciones 14, 15 ó 16, y

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

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

a) cultivar la célula según cualquiera de las reivindicaciones 14, 15 ó 16, y

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

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

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

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

22. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 donde el ácido nucleico molde es ARNm.

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

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.

24. 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

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

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

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

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

26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25 donde el ácido nucleico molde es ARNm.

27. Kit que comprende:

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

28. Uso de un kit según la reivindicación 27, para la retrotranscripción, la amplificación o la secuenciación de un ácido nucleico molde.

29. Uso de un kit según la reivindicación 28 donde el ácido nucleico es ARN mensajero.

FIG. 1

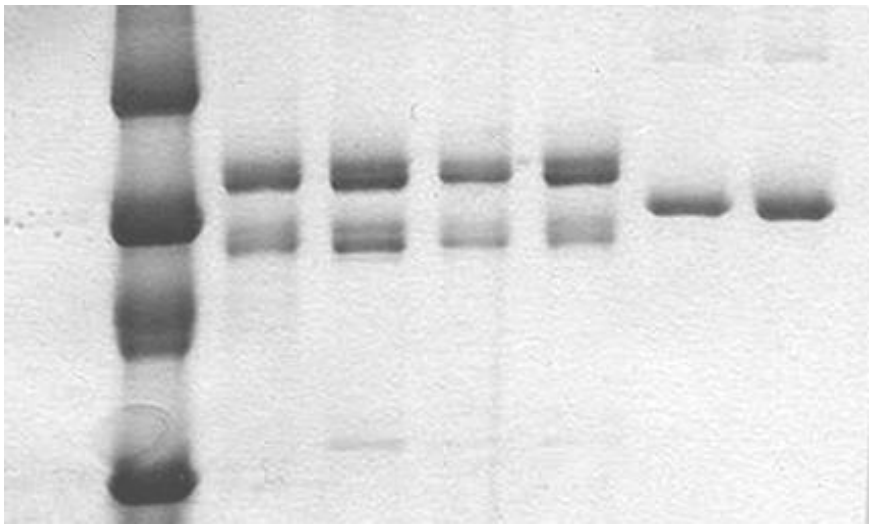


FIG. 2

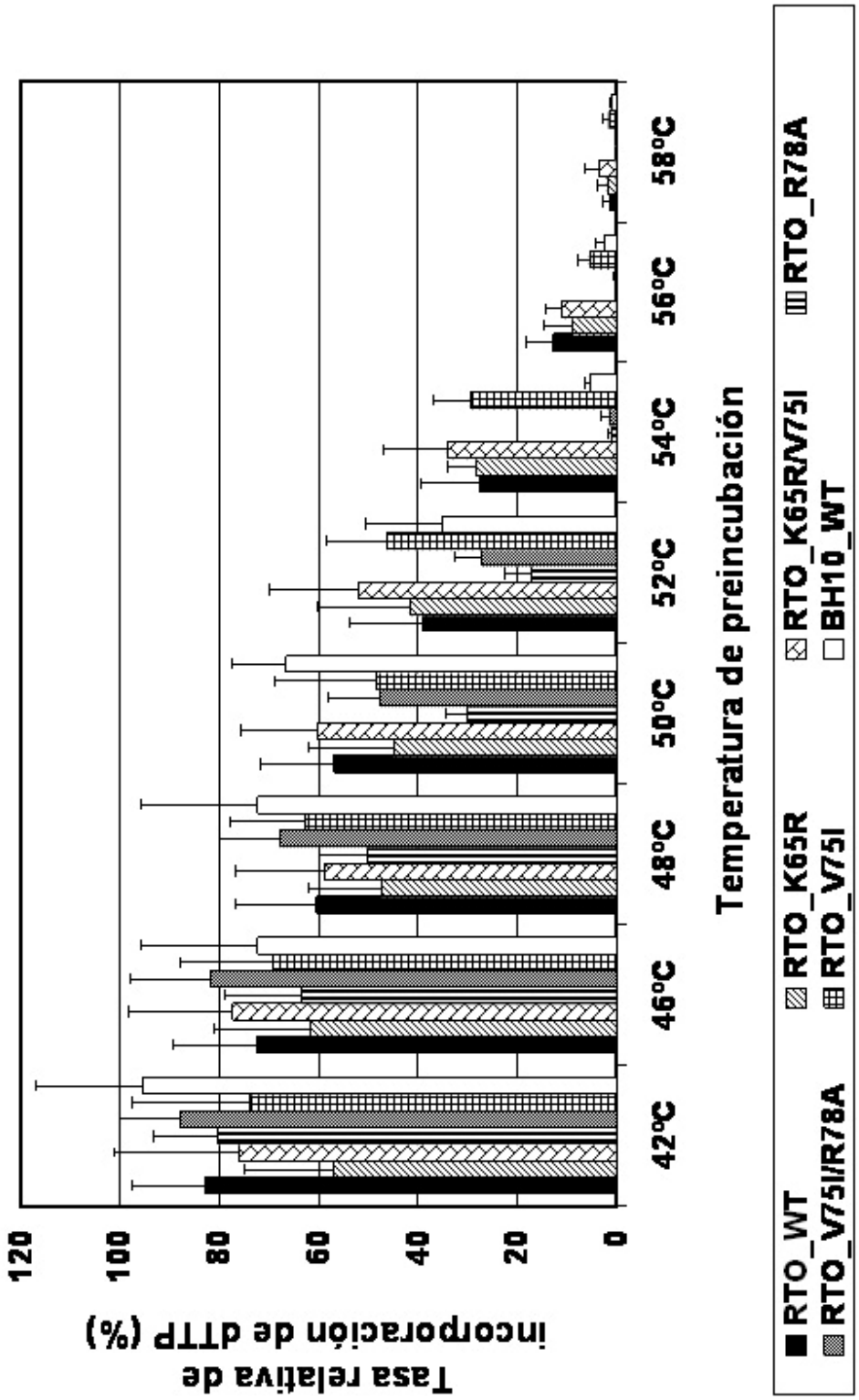

Tasa relativa de incorporación de dTTP (%)
120
100
80
60
40
20
0
42ºC
46ºC
48ºC
50ºC
52ºC
54ºC
56ºC
58ºC
Temperatura de preincubación
RTO_WT
RTO_V75I/R78A
RTO_K65R
RTO_V75I
RTO_K65R/V75I
BH10_WT
RTO_R78A

FIG. 3 A

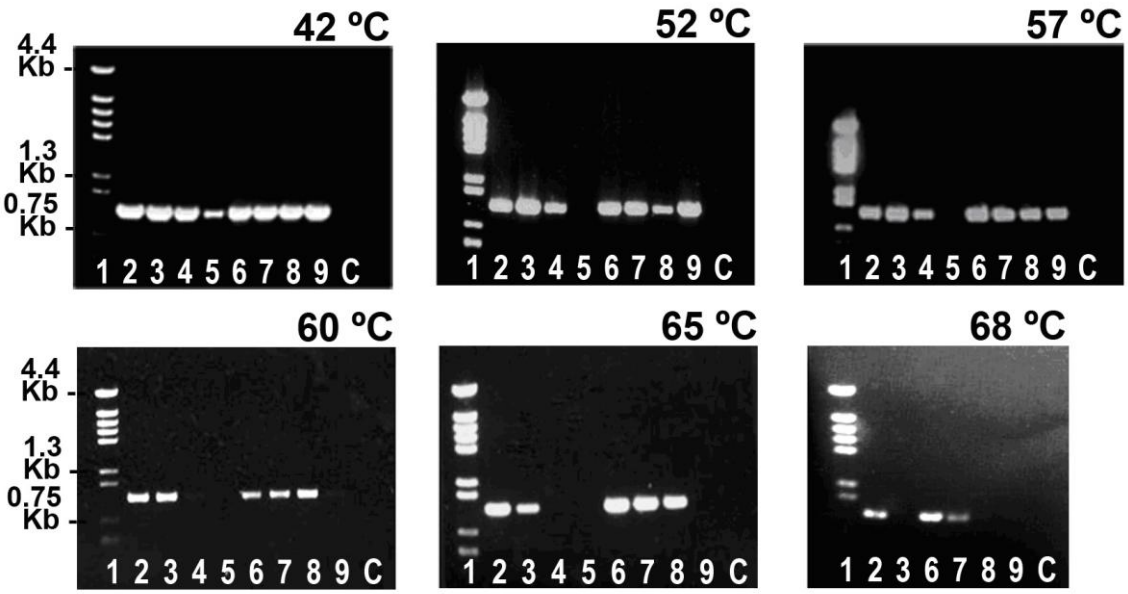

42 ºC
52 ºC
57 ºC
60 ºC
65 ºC
68 ºC
4.4 Kb
1.3 Kb
0.75 Kb
1 2 3 4 5 6 7 8 9 C
1 2 3 6 7 8 9 C

FIG 3 B

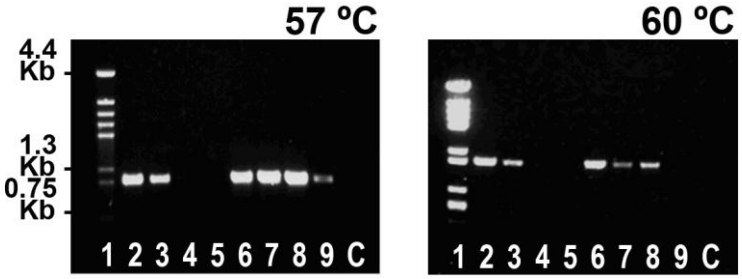
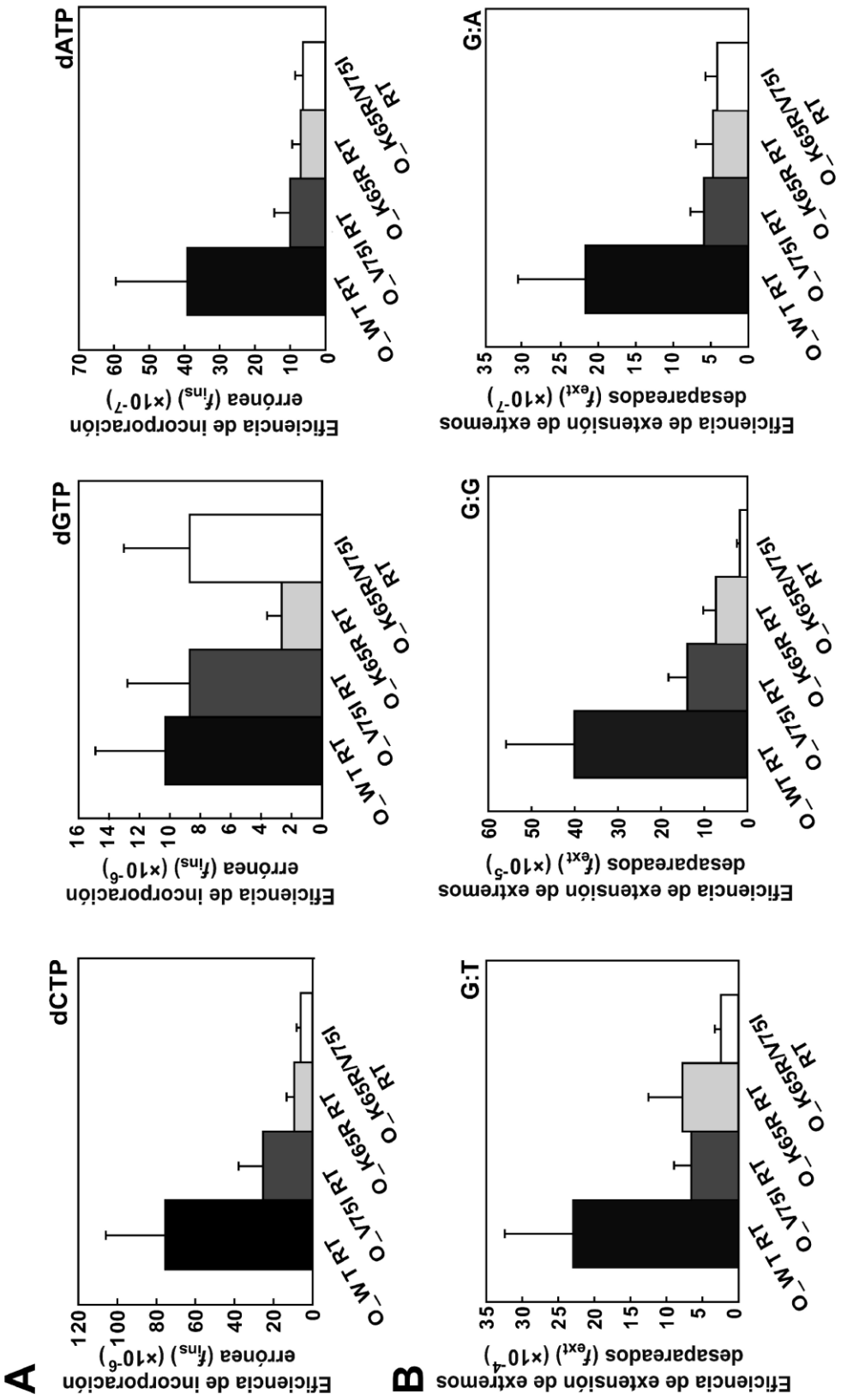

57 ºC
60 ºC
4.4 Kb
1.3 Kb
0.75 Kb
1 2 3 4 5 6 7 8 9 C

FIG. 4


A
dCTP
Eficiencia de incorporación errónea (f_{ins}) ($\times 10^{-6}$)
O_WT RT
O_V75I RT
O_K65R RT
O_K65RV75I RT
dGTP
Eficiencia de incorporación errónea (f_{ins}) ($\times 10^{-6}$)
dATP
Eficiencia de incorporación errónea (f_{ins}) ($\times 10^{-7}$)
B
G:T
Eficiencia de extensión de extremos desapareados (f_{ext}) ($\times 10^{-4}$)
G:G
Eficiencia de extensión de extremos desapareados (f_{ext}) ($\times 10^{-5}$)
G:A
Eficiencia de extensión de extremos desapareados (f_{ext}) ($\times 10^{-7}$)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

<120> Nuevas retrotranscriptasas del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 grupo O

<130> ES.1641.843

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 560
<212> PRT
<213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1) de Grupo O

<400> 1

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

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
35 40 45

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

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

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

Pro Gly Gly Leu Lys Gln Lys Arg Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly
100 105 110

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

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

Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe
145 150 155 160

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

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

Leu Pro Leu Ala Glu His Arg Lys Arg Val Glu Leu Leu Arg Glu His
195 200 205

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

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

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

Ile Gln Lys Leu Ile Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Gln
260 265 270

Gly Ile Arg Val Arg Glu Leu Cys Lys Leu Ile Arg Gly Thr Lys Ser
275 280 285

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

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

Pro Asp Lys Asp Leu Trp Val Asn Ile Gln Lys Gln Gly Glu Gly Gln
325 330 335

Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Asp Glu His Lys Asn Leu Lys Thr Gly
340 345 350

Lys Tyr Thr Arg Gln Lys Ala Ser His Thr Asn Asp Ile Arg Gln Leu
355 360 365

Ala Glu Val Ile Gln Lys Val Ser Gln Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly
370 375 380

Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr Trp Glu Thr
385 390 395 400

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
450 455 460

Lys Ile Ile Lys Leu Asp Glu Thr Thr Asn Gln Lys Ala Glu Leu Met
465 470 475 480

Ala Val Leu Leu Ala Leu Gln Asp Ser Lys Glu Lys Val Asn Ile Val
485 490 495

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

Glu Gln Val Tyr Leu Thr Trp Val Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly
530 535 540

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> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de grupo O modificada con la mutación K65R

<400> 2

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

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
35 40 45

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

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

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

Pro Gly Gly Leu Lys Gln Lys Arg Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly
100 105 110

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

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

130 135 140

Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe
145 150 155 160

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

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

Leu Pro Leu Ala Glu His Arg Lys Arg Val Glu Leu Leu Arg Glu His
195 200 205

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

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

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

Ile Gln Lys Leu Ile Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Gln
260 265 270

Gly Ile Arg Val Arg Glu Leu Cys Lys Leu Ile Arg Gly Thr Lys Ser
275 280 285

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

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

Pro Asp Lys Asp Leu Trp Val Asn Ile Gln Lys Gln Gly Glu Gly Gln
325 330 335

Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Asp Glu His Lys Asn Leu Lys Thr Gly
340 345 350

Lys Tyr Thr Arg Gln Lys Ala Ser His Thr Asn Asp Ile Arg Gln Leu
355 360 365

Ala Glu Val Ile Gln Lys Val Ser Gln Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly
370 375 380

Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr Trp Glu Thr
385 390 395 400

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
450 455 460

Lys Ile Ile Lys Leu Asp Glu Thr Thr Asn Gln Lys Ala Glu Leu Met
465 470 475 480

Ala Val Leu Leu Ala Leu Gln Asp Ser Lys Glu Lys Val Asn Ile Val
485 490 495

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

Glu Gln Val Tyr Leu Thr Trp Val Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly
530 535 540

Asn Glu Lys Ile Asp Lys Leu Val Ser Lys Asp Ile Arg Arg Val Leu
545 550 555 560

<210> 3
<211> 560
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de grupo O modificada con las mutaciones K65R y V75I

<400> 3

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

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
35 40 45

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

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

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

Pro Gly Gly Leu Lys Gln Lys Arg Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly
100 105 110

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

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

Gln Tyr Asn Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe
145 150 155 160

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

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

Leu Pro Leu Ala Glu His Arg Lys Arg Val Glu Leu Leu Arg Glu His
195 200 205

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

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

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

Ile Gln Lys Leu Ile Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Gln
260 265 270

Gly Ile Arg Val Arg Glu Leu Cys Lys Leu Ile Arg Gly Thr Lys Ser
275 280 285

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

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

Pro Asp Lys Asp Leu Trp Val Asn Ile Gln Lys Gln Gly Glu Gly Gln
325 330 335

Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Asp Glu His Lys Asn Leu Lys Thr Gly
340 345 350

Lys Tyr Thr Arg Gln Lys Ala Ser His Thr Asn Asp Ile Arg Gln Leu
355 360 365

Ala Glu Val Ile Gln Lys Val Ser Gln Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly
370 375 380

Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr Trp Glu Thr
385 390 395 400

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
450 455 460

Lys Ile Ile Lys Leu Asp Glu Thr Thr Asn Gln Lys Ala Glu Leu Met
465 470 475 480

Ala Val Leu Leu Ala Leu Gln Asp Ser Lys Glu Lys Val Asn Ile Val
485 490 495

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

Glu Gln Val Tyr Leu Thr Trp Val Pro Ala His Lys Gly Ile Gly Gly
530 535 540

Asn Glu Lys Ile Asp Lys Leu Val Ser Lys Asp Ile Arg Arg Val Leu
545 550 555 560

<210> 4
<211> 99
<212> PRT
<213> Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1) de Grupo M Suptipo B

<400> 4

Pro Gln Ile Thr Leu Trp Gln Arg Pro Leu Val Thr Ile Lys Ile Gly
1 5 10 15

Gly Gln Leu Lys Glu Ala Leu Leu Asp Thr Gly Ala Asp Asp Thr Val
20 25 30

Leu Glu Glu Met Asn Leu Pro Gly Arg Trp Lys Pro Lys Met Ile Gly
35 40 45

Gly Ile Gly Gly Phe Ile Lys Val Arg Gln Tyr Asp Gln Ile Leu Ile
50 55 60

Glu Ile Cys Gly His Lys Ala Ile Gly Thr Val Leu Val Gly Pro Thr
65 70 75 80

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
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos del inserto portador de la región codificante de p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O con una cola de 6 histidinas, flanqueada por un sitio de restricción EcoRI en el extremo 5' y codones de terminación en el extremo 3'

<400> 5
gaattctcct ataagcccca tagccccagt gccagtaaag ctaaaaccag gaatggatgg 60

accaaaagta aaacaatggc ccctatctaa agaaaaaata gaagccttaa cagcaatatg 120

ccaggaaatg gaacaagaag gaaaaatttc aagaatagga cctgaaaatc cttataatac 180

acctatcttt gctataaaaa agaaagatag tactaagtgg agaaagctgg tagactttag 240

ggaattaaac aagagaacac aagatttttg ggaggtacag ttaggtatcc cacatccggg 300

gggtttaaag caaaagcgat ctgttacagt cttagatgta ggagatgcct atttctcatg 360

ccccttagac ccagatttta gaaaatatac tgctttcact attcctagtg taaacaatga 420

gaccccagga ataagatacc agtacaatgt cctcccgcaa ggatggaaag gttcgccagc 480

catattccaa agttcaatga caaaaatttt agatccattt aggaaagaca acccagaatt 540

agaaatttgt cagtacatgg atgacctata tgtaggatca gatttacccc tggcagaaca 600

tagaaaaagg gttgaattgc ttagagaaca cttatatcag tggggattca ctacccctga 660

taaaaagcat caaaaggaac ctccctttat gtggatgggg tatgagctcc atccagataa 720

atggacagta cagcccatca aattgcctaa caaagatgtg tggacagtaa atgatataca 780

aaaactaata ggaaagttaa attgggcaag tcaaatctat caaggaatta gagtaagaga 840

attgtgtaag ttaattagag gcaccaagtc attaacagaa gtagtaccat taagcaaaga 900

ggcagagatg gaattagagg agaacagaga gaaattaaaa gaaccaatgc atggtgtata 960

ctatcaacct gataaagact tatgggttaa tattcagaag caaggagaag ggcaatggac 1020

ttaccagata tatcaggatg aacataagaa cctcaaaaca gggaaatata ctaggcaaaa 1080

ggcctcccac acaaatgaca taagacaatt agcagaagta atccagaagg tgtctcaaga 1140

atctatagtt atctggggaa aattgcctaa atttaagctg ccagtcacta gagaaacttg 1200

ggaaacatgg tgggcagatt attggcaagc cacctggatc ccagaatggg attatgtcag 1260

cacaccccca ttgatcaaat tatggtaccg gttagaaagt gaacctatta ggggggcaga 1320

aacctattat gtagatggag cagctaatag agatacaaaa ttaggaaaag caggatatgt 1380

tacagaacaa gggaaacaga aaataataaa attagatgag accaccaatc aaaaggctga 1440

attaatggca gtattattag ccttacagga ttccaaagaa aaagtaaata tagtaacaga 1500

ctcacaatat gtattgggca ttatctcctc ccagcctaca cagagtgaat cccctatagt 1560

tcagcagata atagaggaac taacaaaaaa ggaacaggtg tatcttacat gggttcctgc 1620

tcataaaggc ataggaggaa atgaaaaaat agataaatta gtaagcaagg atattagaag 1680

agtcctcgag tcgactcacc accaccacca ccactgataa 1720

<210> 6
<211> 572
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la 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

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Gln Pro Asp Lys Asp Leu Trp Val Asn Ile Gln Lys Gln Gly
325 330 335

Glu Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Asp Glu His Lys Asn Leu
340 345 350

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

Ile Trp Gly Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr
385 390 395 400

Trp Glu Thr Trp Trp Ala Asp Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu
405 410 415

Trp Asp Tyr Val Ser Thr Pro Pro Leu Ile Lys Leu Trp Tyr Arg Leu
420 425 430

Glu Ser Glu Pro Ile Arg Gly Ala Glu Thr Tyr Tyr Val Asp Gly Ala
435 440 445

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
500 505 510

Pro Thr Gln Ser Glu Ser Pro Ile Val Gln Gln Ile Ile Glu Glu Leu
515 520 525

Thr Lys Lys Glu Gln Val Tyr Leu Thr Trp Val Pro Ala His Lys Gly
530 535 540

Ile Gly Gly Asn Glu Lys Ile Asp Lys Leu Val Ser Lys Asp Ile Arg
545 550 555 560

Arg Val Leu Glu Ser Thr His His His His His His
565 570

<210> 7
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido mutagénico: cebador "sentido" empleado para introducir la mutación K65R en la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O

<400> 7
ctttgctata aaaaggaaag atagtactaa gtgg 34

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido mutagénico: cebador "antisentido" empleado para introducir la mutación K65R en la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O

<400> 8
ccacttagta ctatctttcc tttttatagc aaag 34

<210> 9
<211> 1720
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos del inserto portador de la región codificante de la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O modificada mediante la mutación K65R, y nucleótidos adicionales que codifican para aminoácidos en sus extremos N- y C-terminales.

<400> 9
gaattctcct ataagcccca tagccccagt gccagtaaag ctaaaaccag gaatggatgg 60

accaaaagta aaacaatggc ccctatctaa agaaaaaata gaagccttaa cagcaatatg 120

ccaggaaatg gaacaagaag gaaaaatttc aagaatagga cctgaaaatc cttataatac 180

acctatcttt gctataaaaa ggaaagatag tactaagtgg agaaagctgg tagactttag 240

ggaattaaac aagagaacac aagatttttg ggaggtacag ttaggtatcc cacatccggg 300

gggtttaaag caaaagcgat ctgttacagt cttagatgta ggagatgcct atttctcatg 360

ccccttagac ccagatttta gaaaatatac tgctttcact attcctagtg taaacaatga 420

gaccccagga ataagatacc agtacaatgt cctcccgcaa ggatggaaag gttcgccagc 480

catattccaa agttcaatga caaaaatttt agatccattt aggaaagaca acccagaatt 540

agaaatttgt cagtacatgg atgacctata tgtaggatca gatttacccc tggcagaaca 600

tagaaaaagg gttgaattgc ttagagaaca cttatatcag tggggattca ctacccctga 660

taaaaagcat caaaaggaac ctccctttat gtggatgggg tatgagctcc atccagataa 720

atggacagta cagcccatca aattgcctaa caaagatgtg tggacagtaa atgatataca 780

aaaactaata ggaaagttaa attgggcaag tcaaatctat caaggaatta gagtaagaga 840

attgtgtaag ttaattagag gcaccaagtc attaacagaa gtagtaccat taagcaaaga 900

ggcagagatg gaattagagg agaacagaga gaaattaaaa gaaccaatgc atggtgtata 960

ctatcaacct gataaagact tatgggttaa tattcagaag caaggagaag ggcaatggac 1020

ttaccagata tatcaggatg aacataagaa cctcaaaaca gggaaatata ctaggcaaaa 1080

ggcctcccac acaaatgaca taagacaatt agcagaagta atccagaagg tgtctcaaga 1140

atctatagtt atctggggaa aattgcctaa atttaagctg ccagtcacta gagaaacttg 1200

ggaaacatgg tgggcagatt attggcaagc cacctggatc ccagaatggg attatgtcag 1260

cacaccccca ttgatcaaat tatggtaccg gttagaaagt gaacctatta ggggggcaga 1320

aacctattat gtagatggag cagctaatag agatacaaaa ttaggaaaag caggatatgt 1380

tacagaacaa gggaaacaga aaataataaa attagatgag accaccaatc aaaaggctga 1440

attaatggca gtattattag ccttacagga ttccaaagaa aaagtaaata tagtaacaga 1500

ctcacaatat gtattgggca ttatctcctc ccagcctaca cagagtgaat cccctatagt 1560

tcagcagata atagaggaac taacaaaaaa ggaacaggtg tatcttacat gggttcctgc 1620

tcataaaggc ataggaggaa atgaaaaaat agataaatta gtaagcaagg atattagaag 1680

agtcctcgag tcgactcacc accaccacca ccactgataa 1720

<210> 10
<211> 1720
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos del inserto portador de la región codificante para p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O modificada con las mutaciones K65R y V75I, y nucleótidos adicionales que codifican para aminoácidos en sus extremos N- y C-terminales.

<400> 10
gaattctcct ataagcccca tagccccagt gccagtaaag ctaaaaccag gaatggatgg 60

accaaaagta aaacaatggc ccctatctaa agaaaaaata gaagccttaa cagcaatatg 120

ccaggaaatg gaacaagaag gaaaaatttc aagaatagga cctgaaaatc cttataatac 180

acctatcttt gctataaaaa ggaaagatag tactaagtgg agaaagctga tagactttag 240

ggaattaaac aagagaacac aagatttttg ggaggtacag ttaggtatcc cacatccggg 300

gggtttaaag caaaagcgat ctgttacagt cttagatgta ggagatgcct atttctcatg 360

ccccttagac ccagatttta gaaaatatac tgctttcact attcctagtg taaacaatga 420

gaccccagga ataagatacc agtacaatgt cctcccgcaa ggatggaaag gttcgccagc 480

catattccaa agttcaatga caaaaatttt agatccattt aggaaagaca acccagaatt 540

agaaatttgt cagtacatgg atgacctata tgtaggatca gatttacccc tggcagaaca 600

tagaaaaagg gttgaattgc ttagagaaca cttatatcag tggggattca ctacccctga 660

taaaaagcat caaaaggaac ctccctttat gtggatgggg tatgagctcc atccagataa 720

atggacagta cagcccatca aattgcctaa caaagatgtg tggacagtaa atgatataca 780

aaaactaata ggaaagttaa attgggcaag tcaaatctat caaggaatta gagtaagaga 840

attgtgtaag ttaattagag gcaccaagtc attaacagaa gtagtaccat taagcaaaga 900

ggcagagatg gaattagagg agaacagaga gaaattaaaa gaaccaatgc atggtgtata 960

ctatcaacct gataaagact tatgggttaa tattcagaag caaggagaag ggcaatggac 1020

ttaccagata tatcaggatg aacataagaa cctcaaaaca gggaaatata ctaggcaaaa 1080

ggcctcccac acaaatgaca taagacaatt agcagaagta atccagaagg tgtctcaaga 1140

atctatagtt atctggggaa aattgcctaa atttaagctg ccagtcacta gagaaacttg 1200

ggaaacatgg tgggcagatt attggcaagc cacctggatc ccagaatggg attatgtcag 1260

cacaccccca ttgatcaaat tatggtaccg gttagaaagt gaacctatta ggggggcaga 1320

aacctattat gtagatggag cagctaatag agatacaaaa ttaggaaaag caggatatgt 1380

tacagaacaa gggaaacaga aaataataaa attagatgag accaccaatc aaaaggctga 1440

attaatggca gtattattag ccttacagga ttccaaagaa aaagtaaata tagtaacaga 1500

ctcacaatat gtattgggca ttatctcctc ccagcctaca cagagtgaat cccctatagt 1560

tcagcagata atagaggaac taacaaaaaa ggaacaggtg tatcttacat gggttcctgc 1620

tcataaaggc ataggaggaa atgaaaaaat agataaatta gtaagcaagg atattagaag 1680

agtcctcgag tcgactcacc accaccacca ccactgataa 1720

<210> 11
<211> 572
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O modificada mediante la mutación K65R, con modificaciones que incluyen tres aminoácidos en el extremo N-terminal y una cola de 6 residuos de histidina

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Gln Pro Asp Lys Asp Leu Trp Val Asn Ile Gln Lys Gln Gly
325 330 335

Glu Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Asp Glu His Lys Asn Leu
340 345 350

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

Ile Trp Gly Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr
385 390 395 400

Trp Glu Thr Trp Trp Ala Asp Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu
405 410 415

Trp Asp Tyr Val Ser Thr Pro Pro Leu Ile Lys Leu Trp Tyr Arg Leu
420 425 430

Glu Ser Glu Pro Ile Arg Gly Ala Glu Thr Tyr Tyr Val Asp Gly Ala
435 440 445

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
500 505 510

Pro Thr Gln Ser Glu Ser Pro Ile Val Gln Gln Ile Ile Glu Glu Leu
515 520 525

Thr Lys Lys Glu Gln Val Tyr Leu Thr Trp Val Pro Ala His Lys Gly
530 535 540

Ile Gly Gly Asn Glu Lys Ile Asp Lys Leu Val Ser Lys Asp Ile Arg
545 550 555 560

Arg Val Leu Glu Ser Thr His His His His His His
565 570

<210> 12
<211> 572
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos de la subunidad p66 de la RT del VIH-1 de Grupo O modificada mediante las mutaciones K65R y V75I, con modificaciones que incluyen tres aminoácidos en el extremo N-terminal y una cola de 6 residuos de histidina

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Tyr Gln Pro Asp Lys Asp Leu Trp Val Asn Ile Gln Lys Gln Gly
325 330 335

Glu Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Asp Glu His Lys Asn Leu
340 345 350

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

Ile Trp Gly Lys Leu Pro Lys Phe Lys Leu Pro Val Thr Arg Glu Thr
385 390 395 400

Trp Glu Thr Trp Trp Ala Asp Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu
405 410 415

Trp Asp Tyr Val Ser Thr Pro Pro Leu Ile Lys Leu Trp Tyr Arg Leu
420 425 430

Glu Ser Glu Pro Ile Arg Gly Ala Glu Thr Tyr Tyr Val Asp Gly Ala
435 440 445

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
500 505 510

Pro Thr Gln Ser Glu Ser Pro Ile Val Gln Gln Ile Ile Glu Glu Leu
515 520 525

Thr Lys Lys Glu Gln Val Tyr Leu Thr Trp Val Pro Ala His Lys Gly
530 535 540

Ile Gly Gly Asn Glu Lys Ile Asp Lys Leu Val Ser Lys Asp Ile Arg
545 550 555 560

Arg Val Leu Glu Ser Thr His His His His His His
565 570

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201031864

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 16.12.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	GARFORTH, S. J., DOMAOAL, R. A., LWATULA, C. et al. K65R and K65A substitutions in HIV-1 reverse transcriptase enhance polymerase fidelity by decreasing both dNTP misinsertion and mispaired primer extension efficiencies. Journal of Molecular Biology. Agosto 2010, Vol 401, Nº 1, páginas 33-44. ISSN 0022-2836. <Doi:10.1016/j.jmb.2010.06.001>	1-5, 8-29
A		6, 7
Y	QUIÑONES-MATEU, M. E., SORIANO, V., DOMINGO, E., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Characterization of the reverse transcriptase of a human immunodeficiency virus type 1 group O isolate. Virology. Septiembre 1997, Vol. 236, Nº 2, páginas 364-373. ISSN 0042-6822. <Doi:10.1006/viro.1997.8748>	1-5, 8-29
A	WO 2010/130864 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)) 18.11.2010, todo el documento.	6, 7
A		1-4, 6-29
A	ÁLVAREZ, M., MATAMOROS, T., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Increased thermostability and fidelity of DNA synthesis of wild-type and mutant HIV-1 group O reverse transcriptases. Journal of Molecular Biology. Octubre 2009, Vol. 392, Nº 4, páginas 872 - 884. ISSN 1089-8638. <Doi:10.1016/j.jmb.2009.07.081>	1, 6-29

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	Examinador	Página
31.07.2012	**E. Relaño Reyes**	1/7

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201031864

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 16.12.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	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. Journal of Molecular Biology. Noviembre 2007, Vol. 375, Nº 5, páginas 1234-1248. ISSN 0022-2836. <Doi:10.1016/j.jmb.2007.11.021>	6-29
A	SHAH, F. S., CURR, K. A., HAMBURGH, M. E. et al. Differential influence of nucleoside analog-resistance mutations K65R and L74V on the overall mutation rate and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. The Journal of Biological Chemistry. Septiembre 2000, Vol. 275, Nº 35, páginas 27037-27044. ISSN 1359-6535.	1, 8-12, 14, 17-29
A	DAS, K., BANDWAR, R. P., WHINE, K. L. et al. Structural basis for the role of the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase polymerization, excision antagonism, and tenofovir resistance. Journal of Biological Chemistry. Diciembre 2009, Vol. 284, Nº 50, páginas 35092-35100. ISSN 1083-351X.	1, 8-12, 14, 17-29

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	Examinador	Página
31.07.2012	**E. Relaño Reyes**	2/7

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, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, XPESP, XPESP2, XPOAC, XPSPRNG, UniProt, aaGeneSeq, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents, PDB

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.07.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-29	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	6, 7	**SI**
	Reivindicaciones	1-5, 8-29	**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	GARFORTH, S. J. et al. Journal of Molecular Biology. Agosto 2010, Vol. 401, Nº 1, páginas 33-44.	06.08.2010
D02	QUIÑONES-MATEU, M. E. et al. Virology. Septiembre 1997, Vol. 236, Nº 2, páginas 364-373.	09.1997
D03	WO 2010/130864 A1	18.11.2010
D04	ÁLVAREZ, M. et al. Journal of Molecular Biology. Octubre 2009, Vol. 392, Nº 4, páginas 872-884.	10.2009
D05	MATAMOROS, T. et al. Journal of Molecular Biology. Noviembre 2008, Vol. 375, Nº 5, páginas 1234-1248.	11.2007
D06	SHAH, F. S. et al. The Journal of Biological Chemistry. Septiembre 2000, Vol. 275, Nº 35, páginas 27037-27044.	01.09.2000
D07	DAS, K. et al. Journal of Biological Chemistry. Diciembre 2009, Vol. 284, Nº 50, páginas 35092-35100.	11.12.2009

En D01 se realiza un estudio sobre la fidelidad de una RT del VIH-1 que presenta las sustituciones K65R o K65A. La mutación K65R disminuye la frecuencia en la que se producen sustituciones, inserciones o deleciones. Así mismo, también se afirma que las RT que contienen la mutación V75I, tienen una mayor fidelidad de copia que las enzimas silvestres. Sin embargo, cabe destacar, que no se contempla el análisis de la actividad de la doble mutante K65R/V75I.

D02 muestra la secuencia consenso de la RT del VIH-1 grupo O, así como la secuencia de varias cepas de este grupo, y las compara con la RT de la cepa BH10 del VIH-1 grupo M. Ambas RT presentan un 79% de identidad aminoacídica, siendo las secuencias del bucle β3-β4 de la cepa BH10 y de la secuencia consenso de la RT del grupo O, idénticas.

En D03 y D04 se anticipa una RT del VIH tipo 1 grupo O con las mutaciones V75I o V75I/E478Q. La introducción de la mutación V75I produce un incremento en la fidelidad de copia, aunque también la disminución en la termoestabilidad de la enzima. Sin embargo, la doble mutante V75I/E478Q consigue aumentar la fidelidad de copia y mantener la termoestabilidad. Con el fin de realizar este estudio, se expresó p66 con una cola de histidinas incorporada, junto con un vector que expresaba la proteasa. Cabe destacar, que la SEQ. ID. NO. 2 de D03, presenta un 99,8% de identidad con la SEQ. ID. NO. 3 de la solicitud, diferenciándose tan solo en el residuo 65. Por último, en D03 se apunta el uso de estas enzimas en retrotranscripción, amplificación o secuenciación, mientras que en D04 en retrotranscripción.

D05 investiga los efectos de diversas mutaciones en la posición 75 de la RT del VIH-1, aumentando V75I la fidelidad de la enzima. La proteína p66 se expresó junto con otro plásmido que expresaba la proteasa del VIH, y se purificó gracias a una cola de histidinas.

En D06 se muestra la estructura cristalográfica de la RT del VIH-1 con la mutación K65R. Esta proteína presenta un incremento en la fidelidad de copia, probablemente debido a que la capacidad de adaptación de la Arg65 y la Arg72 al nucleótido entrante es menor. Para la formación del cristal, se expresó la p61 mutada junto con la p51 silvestre, esta última unida una cola de histidinas.

En D07 se estudia el efecto de las mutaciones K65R y L74V en la RT del VIH-1. K65R aumenta la procesividad y fidelidad de copia de la polimerasa, quizá debido a que hay una mayor restricción de los residuos de la región para interaccionar con el nucleótido entrante. Aunque la mutación L74V no produce una disminución significativa de la frecuencia de mutaciones, otras mutaciones en el bucle β3-β4, región en donde se encuentran estos residuos, sí tienen este efecto.

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

La presente solicitud, tiene por objeto una retrotranscriptasa (RT) aislada de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 grupo O, que presenta una sustitución del residuo en la posición 65 por una arginina (reivindicaciones de la 1 a la 5), pudiendo tener una sustitución adicional del residuo en la posición 75 por isoleucina (reivindicaciones 6 y 7). Estas mutaciones producen un incremento en la fidelidad de copia de la polimerasa. Así mismo, se incluyen el polinucleótido que codifica esta enzima (reivindicación 8), el vector que lo comprende (reivindicaciones de la 9 a la 13), la célula que comprende el vector (reivindicaciones de la 14 a la 16) y el método para producir la proteína (reivindicaciones 17 y 18). Además, también son objeto de la invención, el uso de la retrotranscriptasa en la retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ácido nucleico (reivindicaciones de la 19 a la 22), así como los métodos de retrotranscripción, amplificación o secuenciación, que comprenden el uso de esta enzima (reivindicaciones de la 23 a la 26). Por último, se contempla un kit que comprende dicha polimerasa (reivindicación 27) y su uso en retrotranscripción, amplificación o secuenciación (reivindicaciones 28 y 29).

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

Las reivindicaciones de la 1 a la 29 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 5.

El objeto de la presente solicitud, es una retrotranscriptasa (RT) aislada de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 de grupo O, que presenta la mutación K65R y tiene al menos un 90% de identidad con respecto a la SEQ. ID. NO. 1 (reivindicaciones de la 1 a la 4), especificándose en la reivindicación 5 que tiene la secuencia SEQ. ID. NO. 2. Esta mutación le confiere a la enzima una mayor fidelidad de copia con respecto a la silvestre.

D01 anticipa que la mutación K65R, produce un incremento en la fidelidad de la copia de la RT del HIV-1.

La diferencia entre la solicitud y este documento, se encuentra en que dicho estudio no se realiza con una RT del VIH-1 tipo O.

D02 muestra el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de varias RT del VIH-1 grupo O y de la RT de la cepa BH10 del VIH-1 grupo M. La RT del grupo M y la secuencia consenso del grupo O presentan un 79% de identidad, siendo en el bucle β3-β4 (donde se encuentran R65 y V75) del 100%, y estando los residuos cercanos al sitio activo, altamente conservados. Cabe destacar que la secuencia denominada ESP1, tiene un 98% de identidad con la SEQ. ID. NO 1 de la invención, aunque no presenta la mutación reivindicada.

Por lo tanto, se considera que un experto en la materia intentaría obtener una RT del VIH-1 grupo O (D02) con una mayor fidelidad de copia mediante la sustitución K65R (D01), con una expectativa razonable de éxito (reivindicaciones de la 1 a la 4).

Además, el hecho de que la identidad entre la SEQ. ID. NO. 1 y ESP1 no sea del 100% (reivindicación 5) sino del 98%, no se considera relevante.

En consecuencia, se opina que las reivindicaciones de la 1 a la 5 no presentan actividad inventiva (Art. 8.1. LP 11/1986).

2.2 REIVINDICACIONES 6 Y 7

Las reivindicaciones 6 y 7 cumplen el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1. LP 11/1986).

2.3 REIVINDICACIONES DE LA 8 A LA 18.

La reivindicación 8, tiene por objeto un polinucleótido que codifica para la retrotranscriptasa de la invención.

Al no ser inventiva la RT del VIH-1 grupo O K65R (ver apartado 2.1), el polinucleótido que la codifica (reivindicación 8) tampoco lo es.

El objeto de la solicitud, es un vector que comprende dicho polinucleótido, en el que el polinucleótido está unido en fase de lectura a una secuencia que codifica para una cola de residuos de histidina, y además comprende una secuencia codificante para una proteasa capaz de realizar un corte endoproteolítico en la RT entre los residuos 440 y 441, así como la célula que comprende el vector (reivindicaciones de la 9 a la 14 y la 16).

En D01 se obtuvo la RT K65R, mediante su expresión en un plásmido junto con la proteasa del VIH. Además la RT incluía una cola de residuos de histidina para su aislamiento.

Por lo tanto, a la vista de los argumentos expuestos en el punto 2.1., las reivindicaciones de la 9 a la 14 y la 16, no tienen actividad inventiva (Art. 8.1. LP 11/1986).

La reivindicación 15 tiene por objeto una célula que comprende dos vectores, uno que comprende un polinucleótido que codifica para la RT de la invención y otro que expresa proteasa arriba indicada.

El hecho de que la RT y la proteasa se expresen en el mismo vector o en dos vectores diferentes no se considera relevante, por lo que la reivindicación 15 no presenta actividad inventiva (Art. 8.1. LP 11/1986).

Por último, las reivindicaciones 17 y 18 tienen por objeto sendos métodos para producir la secuencia aminoacídica o la RT de la invención, que comprenden cultivar la célula reivindicada.

Dado que la célula no tiene actividad inventiva, estos métodos tampoco son inventivos. En consecuencia, las reivindicaciones 17 y 18 no cumplen el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1. LP 11/1986).

2.4 REIVINDICACIONES DE LA 19 A LA 26

La presente solicitud, tiene por objeto el uso de la RT de la invención en la retrotranscipción, amplificación o secuenciación de un ARNm (reivindicaciones de la 19 a la 22), así como métodos de retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ARNm en los que se utiliza la RT de la invención (reivindicaciones de la 23 a la 26).

Al presentar la RT de la invención una mayor fidelidad de copia, se considera que es obvia su utilización en retrotranscripción, amplificación o secuenciación.

Por este motivo, se entiende que las reivindicaciones de la 19 a la 26 no tienen actividad inventiva (Art. 8.1. LP 11/1986).

2.5. REIVINDICACIONES DE LA 27 A LA 29

El objeto de la reivindicación 27 es un kit que comprende la RT de la invención, siendo el de las reivindicaciones 28 y 29 su uso en la retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ARNm.

A la vista de los argumentos expuestos en los puntos 2.1 y 2.4, las reivindicaciones de la 27 a la 29 no cumplen el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1. LP 11/1986).