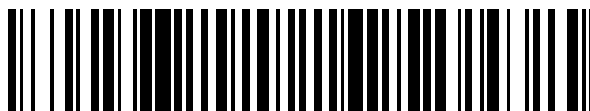


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 024**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2010** **E 10739694 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013** **EP 2408914**

54 Título: **Método para determinar la sensibilidad o la resistencia de productos aislados de retrovirus a moléculas y kits de diagnóstico**

30 Prioridad:

16.07.2009 US 504456

15.07.2009 US 503174

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

18.10.2013

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (50.0%)
Jardin du Pharo, 58 boulevard Charles Livon
13284 Marseille Cedex 07, FR y
CNRS (50.0%)

72 Inventor/es:

GLUSCHANKOF, PABLO;
RAOULT, DIDIER;
BEN M'BAREK, NAJOUA;
AUDOLY, GILLES y
PERRIN-EAST, CHRISTELLE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 426 024 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para determinar la sensibilidad o la resistencia de productos aislados de retrovirus a moléculas y kits de diagnóstico

Solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de las Solicitudes de los Estados Unidos con el Núm. de Ser. 12/503.174 y Núm. de Ser. 12/504.456 presentadas el 15 de Julio de 2009 y 16 de Julio de 2009.

Campo técnico

- 10 Esta descripción se refiere a métodos para determinar la sensibilidad o la resistencia de productos aislados de retrovirus a moléculas, a tratamientos retrovirales terapéuticos basados en inhibidores de proteasas virales, y a kits de diagnóstico derivados de la aplicación de los métodos.

Antecedentes

- 15 Los agentes etiológicos del SIDA son los virus de la inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2. Estos virus, que comparten ciertas características clínicas y biológicas, tienen grandes diferencias, en particular con respecto a la forma en que en la que se infecta el anfitrión. De este modo, la infección por el VIH-2 es más difícil que por el VIH-1 (Ancelle R, O Bletry, A C Baglin, F Brun-Vezinet, MA Rey y P Godeau, 1987, Long incubation period for HIV-2 infection. Lancet. 1:688-9; Marlink R, P Kandki, I Thior, K Travers, G Eisen, T Siby, I Traore, C C Hsieh, M C Dia and E H Gueye. 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. Science. 265:1587-90; Adjorlolo-Johnson G, K M De Cock, E Ekpini, K M Vetter, T Sibailly, K Brattegaard, D Yavo, R Doorly, J P Whitaker and L Kestens. 1994. Prospective comparison of mother-to-child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast. JAMA. 272:462-6; Marlink, R. 1996. Lessons from the second AIDS virus, HIV-2. AIDS. 10:689-99.), la carga viral en plasma de los individuos infectados por VIH-2 es menos elevada e inferior que la de los individuos infectados por VIH-1 (Andersson S, H Norrgren, Z da Silva, A Biague, S Bamba, S Kwok, C Christopherson, G Biberfeld, and J Albert. 2000. Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. Arch. Intern. Med. 160:3286-93; Popper S J, A D Sarr, K U Travers, A Gueye-Ndiaye, S Mboup, M E Essex, and P J Kanki. 1999. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. J Infect Dis. 180:1116-21.), y los individuos infectados por VIH-2 desarrollan la enfermedad más lentamente (Vittinghoff E, S Scheer, P O'Malley, G Colfax, S D Holmberg and S P Buchbinder. 1999. Combination antiretroviral therapy and recent declines in AIDS incidence and mortality. J Infect Dis. 179:717-20; Blanco R, Carrasco, L, and Ventoso, I. 2003. Cell killing by HIV-1 protease. J. Biol. Chem. 278:1086-93; Liu H, Krizek J, and Bretscher A. 1992. Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. Genetics 132:665-673).

- 35 El VIH-2 se identificó por primera vez en África Occidental en 1986 (Clavel F, D Guetard, F Brun-Vezinet, S Chamaret, M A Rey, M O Santos-Ferreira, A G Laurent, C Daguuet, C Katlama, and C Rouzioux. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science. 233:343-6). En esta región, la prevalencia del VIH-2 varía entre 1% y 10% (Langley C L, E Benga-De, C W Critchlow, I Ndoeye, M D Mbengue-Ly, J Kuypers, G Woto-Gaye, S Mboup, C Bergeron, K K Holmes, and N B Kiviat. 1996. HIV-1, HIV-2, human papillomavirus infection and cervical neoplasia in high-risk African women. AIDS. 10:413-7; Poulsen A G, B Kvinesdal, P Aaby, K Molbak, K Frederiksen, F Dias and E Lauritzen. 1989. Prevalence of and mortality from human immunodeficiency virus type 2 in Bissau, West Africa. Lancet. 1:827-31; Wilkins A, D Ricard, J Todd, H Whittle, F Dias, and A Paulo Da Silva 1993. The epidemiology of HIV infection in a rural area of Guinea-Bissau. AIDS. 7:1119-22). La mayoría de los casos de infección por el VIH-2, fuera de África Occidental, se encuentran en los países europeos y especialmente en Portugal, en donde los individuos infectados por el VIH-2 representan el 13% de la población infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana (Soriano V, P Gomes, W Heneine, A Holguin, M Doruana, R Antunes, K Mansinho, W M Switzer, C Araujo, V Shanmugam, H Lourenco, J Gonzalez-Lahoz and F Antunes. 2000. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. J. Med. Virol. 61:111-6). En Francia, se ha estimado que 1% de la población infectada por el VIH está infectado por el virus de tipo 2.

- 50 En los países desarrollados, los individuos infectados por el VIH-1 y/o por el VIH-2 son tratados mediante terapia química, compuesta por moléculas que tienen una actividad inhibidora para una u otra de las dos enzimas virales: Transcriptasa Inversa y Proteasa.

Por otra parte, los individuos infectados por el VIH-1 y/o por el VIH-2 también son tratados mediante terapia química, compuesta por moléculas que tienen una actividad inhibidora del proceso de la entrada viral o de las enzimas virales: Transcriptasa Inversa, Proteasa, e Integrasa.

- 55 A pesar de que el tratamiento ha ayudado significativamente a reducir la morbilidad y la mortalidad causadas por la infección por el VIH (Palella FJ, Jr, KM Delaney, AC Moorman, MO Loveless, J Fuhrer, GA Satten, DJ Aschman y SD Holmberg. 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus

infection. HIV Outpatient Study Investigators. N. Engl. J. Med. 338:853-60; Vittinghoff E, S Scheer, P O'Malley, G Colfax, S D Holmberg and S P Buchbinder. 1999. Combination antiretroviral therapy and recent declines in AIDS incidence and mortality. J. Infect. Dis. 179:717-20), Se han observado algunos casos de fracaso terapéutico.

La posibilidad de amplificar, a partir del plasma, ARN o ADN de las células de los individuos infectados por el VIH-1 y el fracaso terapéutico, ha hecho posible comprender a nivel molecular la ineficacia espontánea o progresiva de los tratamientos terapéuticos. La determinación, en particular, de la secuencia de ácido nucleico de las dos enzimas virales transcriptasa inversa y proteasa ha demostrado la aparición de un cierto número de mutaciones. Los resultados obtenidos durante los estudios in vitro en los que la cepa viral de tipo salvaje (y por lo tanto sensible a los tratamientos) que portaba las mutaciones han demostrado claramente la implicación de estas mutaciones en la resistencia del virus al tratamiento.

Los investigadores por lo tanto han realizado una cierta cantidad de trabajo sobre estas mutaciones y las resistencias que generan para orientar y guiar la elección del tratamiento terapéutico y optimizar su eficacia.

Se desarrollaron dos enfoques técnicos diferentes para orientar los tratamientos terapéuticos. Uno consistió en la búsqueda solo de las mutaciones ya conocidas dentro de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas virales y se denomina enfoque de determinación del genotipo. El otro, que no necesita el conocimiento de la presencia de mutaciones resistentes dentro de las secuencias virales, consiste en el ensayo en un sistema basado en células la inhibición de la replicación viral en presencia de moléculas inhibidoras, y se denomina enfoque de determinación del fenotipo.

Desafortunadamente, las estrategias económicas de los laboratorios han conducido la mayoría de las veces a una falta general de interés en la comunidad científica en relación con el tratamiento de los pacientes infectados por el VIH-2 (siendo las poblaciones más afectadas por el VIH-2 principalmente las de los países en desarrollo) o han dado lugar a soluciones inadecuadas: tratamientos, pruebas y análisis que son demasiado caros, diagnósticos, por ejemplo, diagnósticos de determinación del fenotipo que son demasiado largos o imposibles de implementar en el lugar, ausencia de estructuras competentes en el país de que se trate, etc.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en los diferentes estudios llevados a cabo sobre el VIH-2 no han sido lo suficientemente consistentes como para que sea posible formular una correlación entre una mutación particular de la proteasa del VIH-2, y un fenotipo de resistencia.

Cabe señalar que, la progresión de la enfermedad que es más lenta en los individuos infectados por el VIH-2 que en los infectados por el VIH-1, el recuento de células T CD4 y la determinación de la carga viral en plasma no toman en cuenta rápidamente la aparición de cepas resistentes en los pacientes en tratamiento.

Existen en la actualidad varias empresas que proporcionan el perfil de resistencia de una cepa de VIH aislada de un paciente infectado a través de la determinación del fenotipo. Conceptualmente las tres pruebas se parecen entre sí y se basan en la capacidad de cada inhibidor de la proteasa para inhibir la liberación de un virus recombinante infeccioso que comprende la proteasa del virus que infecta al paciente. Las compañías son: EUROFINS-Viralliance (Francia), que produce Phenoscrypt.TM., Virco-Johnson & Johnson (Bélgica, EE.UU.), que produce Antivirogram.TM., y Monogram Biosciences, ex Virologic (Estados Unidos), que produce PhenoSense.TM. En los tres casos, la realización de estas pruebas requiere una organización logística significativa, personal especializado en biología molecular y virología e infraestructuras costosas del tipo de laboratorio seguro P3 (parece que un perfil completo costaría en la actualidad entre 800 y 1.000 euros por muestra). El retraso que existe entre el momento en que el material biológico llega a los laboratorios y el momento en que se establece el perfil de resistencia varía, para cada cepa de VIH-1, entre dos y tres semanas.

Bajo estas circunstancias, la puesta en el mercado de una prueba rápida fiable, por ejemplo, una prueba de determinación del fenotipo que sea simple de aplicar y poco costoso ha convertido en un imperativo. Tal prueba ayudaría a los médicos tratantes a verificar la aparición de cepas resistentes en los pacientes infectados por retrovirus, en particular VIH 1 o 2, en particular para las poblaciones desfavorecidas. Por otra parte, esta prueba también se podría utilizar para una investigación de "alta velocidad" y/o "alto rendimiento" de nuevas moléculas que tengan actividad inhibidora de la proteasa de retrovirus.

M'Barek Najoua et al, 2006 (Retrovirology, 6 de Septiembre de 2006. Vol 3, Núm. 1) describen una prueba de funcionamiento para determinar la resistencia o la sensibilidad de una proteasa del VIH-2 a los inhibidores de proteasa, sobre la base de la citotoxicidad implicada por la expresión de la proteasa madura del VIH-2 en dicha levadura, en donde dicha citotoxicidad es anulada por los inhibidores de proteasa.

Se sabe que la expresión de la proteasa de VIH-1 en presencia de una secuencia corta aguas arriba del dominio de proteasa del precursor Gag-Pol da como resultado el procesamiento de la proteasa activa en E. coli, mientras que la expresión de una proteasa de tipo salvaje prolongada solo con la metionina inicial no permite recuperar la actividad proteolítica (Wan Min et al, Biochemical Journal, vol. 316, Núm. 2, 1996, páginas 569-573).

Resumen

Los autores de la presente invención ofrecen un método para determinar la sensibilidad o la resistencia de los productos aislados de retrovirus VIH a una molécula que incluye a) amplificar secuencias que codifican una proteasa de un retrovirus que se va a estudiar, con o sin la secuencia o algunas secuencias de aminoácidos situadas aguas arriba y aguas abajo de un sitio de escisión de un precursor en el que están situadas las secuencias de aminoácidos, b) recombinar fragmentos de ADN, un producto final de la amplificación, y un vector de expresión que permite la expresión de la secuencia codificante de la proteasa del retrovirus que se va a estudiar bajo el control de un promotor inducible conocido a través de la co-transformación del vector y los fragmentos de ADN con al menos una célula de levadura, c) cultivar la célula o células de levadura co-transformadas para obtener un número suficiente de transformantes para llevar a cabo una prueba de sensibilidad o resistencia, y recuperar los transformantes procedentes de la célula co-transformada, en cualquier medio adecuado, d) incubar los transformantes en presencia de una molécula que se va a someter a ensayo, e) analizar cualitativamente o cuantitativamente las células vivas, y f) deducir el fenotipo de sensibilidad o resistencia.

Los autores de la presente invención también proporcionan un kit de diagnóstico que lleva a cabo el método, que incluye cebadores nucleotídicos seleccionados del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 y 58; al menos un vector de expresión; al menos una cepa de la levadura; y al menos una placa de múltiples pocillos u otro soporte.

Breve descripción de los dibujos

Las FIGS. 1 y 2 son representaciones esquemáticas de la co-transformación del vector pRS316-Gal1/10M escindido por la enzima de restricción NotI con el producto de la segunda PCR para obtener una célula de levadura transformada que tiene la secuencia de la proteasa del VIH-2 bajo el control del promotor inducible Gall.

La FIG. 3 es una representación esquemática del recuento de células vivas y muertas y una determinación del fenotipo.

La FIG. 4 es una representación esquemática de un kit de diagnóstico.

La FIG. 5a muestra un par de gráficos de porcentaje de células vivas como una función de la concentración de inhibidor.

La FIG. 5b muestra fotografías de crecimiento de las células como una función de la resistencia al inhibidor.

Descripción detallada

Los autores de la presente invención proporcionan métodos para determinar la sensibilidad o la resistencia de retrovirus, tales como el VIH a moléculas, tratamientos terapéuticos basados en inhibidores de la proteasa viral, mediante el uso de levadura. En otras palabras, los autores de la presente invención proporcionan el uso de levadura para determinar la resistencia o la sensibilidad de la proteasa viral a moléculas, y/o las moléculas químicas que se utilizan en el contexto de los protocolos terapéuticos. Los autores de la presente invención también proporcionan kits de diagnóstico que comprenden los elementos necesarios para aplicar el método.

Más concretamente, los métodos hacen posible determinar, de forma rápida y a bajo coste, el fenotipo de resistencia de la proteasa de VIH-2 en pacientes infectados. Los métodos también permiten determinar, de forma rápida y a bajo coste, el fenotipo de resistencia de la proteasa de VIH-1 en pacientes infectados. Los métodos permiten adicionalmente la búsqueda a "alta velocidad" y/o de "alto rendimiento" de nuevas moléculas químicas que tienen una actividad inhibidora de la proteasa viral con el fin de desarrollar nuevos tratamientos terapéuticos.

Por lo tanto los autores de la presente invención proporcionan medios que permiten la definición rápida y de bajo coste del fenotipo de resistencia de la proteasa de VIH-2 o VIH-1 en pacientes infectados, en virtud de la utilización de levadura. Los métodos de los autores de la presente invención también se pueden aplicar para definir el fenotipo de resistencia de la proteasa de VIH-1, o la proteasa de cualquier otro retrovirus.

Las secuencias codificantes de algunas de las dianas terapéuticas, por ejemplo, la transcriptasa inversa, la proteasa, y la integrasa, así como las denominadas "proteínas" estructurales (matriz, cápsida, nucleocápsida), están situadas dentro de un precursor polipeptídico común denominado Gag-Pol, codificado por el gen viral gag-pol (Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. Nature, 324:691-5). Es la acción de la proteasa viral la que, mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos específicos referidos como sitios de escisión, que enmarcan las secuencias primarias de los diferentes constituyentes del precursor, es responsable de la liberación de estas proteínas (Oroszlan S y Luftig RB. 1990. Retroviral proteinases. Curr Top Microbiol Immunol. 157:153-85). Se ha demostrado que, para la proteasa de VIH-1, las secuencias de aminoácidos situadas aguas arriba y aguas abajo del sitio de escisión cumplen un papel importante en el evento de reconocimiento de la enzima por su sustrato, y por lo tanto son determinantes para su actividad proteolítica (Pettit S C, Simsic J, Loeb D D, Everitt L, Hutchison CA 3^o, Swanstrom R. 1991. Analysis of retroviral protease cleavage sites reveals two types of cleavage sites and the structural requirements of the P1 amino acid. J. Biol. Chem. 266:14539-47, Pettit S C, Moody M D, Wehbie R S, Kaplan A H, Nantermet P V, Klein C A, Swanstrom R. 1994). El dominio P2 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 Gag regula el procesamiento

proteolítico sucesivo secuencial y se requiere para producir viriones completamente infecciosos (J Virol. 68:8017-27, Moody M D, Pettit S C, Shao W, Everitt L, Loeb D D, Hutchison C A 3^o, Swanstrom R. 1995). Una cadena lateral en la posición 48 de la solapa proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo-1 proporciona un determinante de especificidad adicional (Virology. 207:475-85, Boross P, Bagossi P, Copeland T D, Oroszlan S, Louis J M, Tozser J. 1999. Effect of substrate residues on the P2' preference of retroviral proteinases. Eur J Biochem. 264:921-9).

Un artículo científico que apareció en 2003 demostró que la expresión de la proteasa del VIH-1 por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* causó la muerte de esta última a través de un mecanismo todavía desconocido, cuya consecuencia fue la lisis celular de la levadura en cuestión (Blanco R, Carrasco L y Ventoso I. 2003. Cell killing by HIV-1 protease. J. Biol. Chem. 278:1086-93).

Los autores de la presente invención demostraron que se producía el mismo fenómeno cuando las levaduras expresaban la proteasa de VIH-2. Por consiguiente, inhibiendo la actividad enzimática viral mediante la modificación de su sitio catalítico, los autores de la presente invención tuvieron éxito en la prevención de la aparición de este evento celular.

Además, Blanco et al (Blanco R, Carrasco L y Ventoso I. 2003. Cell killing by HIV-1 protease. J. Biol. Chem. 278:1086-93) también demostraron que la inhibición de la proteasa del VIH-1 por uno de los inhibidores utilizados en la terapia anti-VIH inhibió la muerte celular de la levadura causada por la expresión de la proteasa viral. Debido a este hecho, es posible medir cuantitativamente la sensibilidad y la resistencia de la proteasa de los individuos infectados a las diversas moléculas inhibidas.

Por otra parte, los autores de la presente invención trabajaron sobre el precursor Gag-Pol activo más pequeño que, una vez expresado en la levadura, induce la muerte celular a través de la actividad de proteasa. Puesto que la definición de una proteína precursora de proteasa funcional es una a partir de la cual la proteasa se puede, sucesivamente, separar mediante escisión y destruir después la levadura que la expresa, los autores de la presente invención crearon y expresaron un gran número de precursores de Gag-Pol truncados en levadura en los que el sitio de escisión de la proteasa o bien estaba presente o bien estaba ausente por mutaciones específicas del ácido nucleico. Los autores de la presente invención encontraron sorprendentemente que el precursor de proteasa activa más pequeño se definía como la secuencia de Gag-Pol más pequeña, que contenía la proteasa flanqueada por sus sitios de escisión que solo induce la muerte celular de la levadura cuando el sitio de escisión situado en la porción N-terminal de la secuencia de la proteasa está presente. En la ausencia de éste, el precursor expresado no es capaz de alterar el crecimiento celular.

Los autores de la presente invención descubrieron sorprendentemente que una secuencia que codificaba la proteasa precedida por los 6 aminoácidos del sitio de escisión y seguida de al menos un aminoácido del otro sitio de escisión era la forma precursora activa más pequeña que inducía la muerte celular cuando se expresaba en levadura.

Por tanto, los métodos de los autores de la presente invención hacen que sea posible determinar, en el contexto celular de las levaduras, el fenotipo de sensibilidad de la proteasa viral de un retrovirus tal como VIH-2 o VIH-1, a fármacos con actividad inhibidora.

En otras palabras, hace que sea posible determinar la sensibilidad o resistencia de los productos aislados de retrovirus tales como VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) a moléculas químicas que tienen una actividad inhibidora de la proteasa viral o a tratamientos terapéuticos basados en inhibidores de la proteasa viral, caracterizados por el uso para este propósito de al menos una levadura cuya lisis celular está causada por la expresión de la proteasa de retrovirus.

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que, no sólo la secuencia específica que codifica la proteasa, sino también una secuencia precursora de la proteasa de VIH-1 cuando se incorporan a un vector de expresión, a través de un procedimiento de co-transformación en la levadura, permiten la expresión de la proteasa y causan la muerte de la levadura. En otras palabras, los autores de la presente invención descubrieron que las secuencias que comprenden la secuencia codificante de la proteasa de VIH-1 extraída de, por ejemplo, sangre o células infectadas, se expresan funcionalmente en levadura.

Por lo tanto, los métodos de los autores de la presente invención les permiten determinar la sensibilidad o resistencia de la proteasa de retrovirus a moléculas en un sistema no infeccioso basado en células en presencia de su sustrato natural. Adicionalmente, los métodos de los autores de la presente invención les permiten someter a ensayo moléculas que tienen un efecto sobre la actividad de la proteasa y también sobre la expresión de la proteasa. Por otra parte, los métodos de los autores de la presente invención les permiten someter a ensayo moléculas que tienen un efecto directo sobre la actividad de la proteasa hacia su sustrato natural que es, por ejemplo, el precursor de proteasa. Por ejemplo, el método permite a los autores de la presente invención someter a ensayo moléculas que inhiben la actividad de la proteasa actuando sobre la secuencia codificante de la proteasa, y/o codificante del precursor de la proteasa, al actuar sobre la traducción de la proteasa, al actuar sobre el mecanismo de transcripción, y/o sobre la actividad de la proteasa.

Por otra parte, los métodos de los autores de la presente invención permiten la determinación de la sensibilidad o la resistencia de la proteasa que tiene al menos una mutación, por ejemplo, en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteasa y el precursor de proteasa.

- 5 Esquemáticamente, los métodos comprenden un vector de expresión, la elección del sistema de células, el método de expresión de las proteasas de los individuos infectados y de ensayo de la susceptibilidad a los fármacos.

Esto comprende las siguientes etapas:

extraer opcionalmente los ácidos nucleicos, ADN y/o ARN de fluidos corporales o células (sangre u otros) tomados de un individuo o animal infectados por el retrovirus, mediante cualquier medio adecuado;

amplificar las secuencias codificantes de proteasa del retrovirus que se va a estudiar;

- 10 recombinar los fragmentos de ADN, el producto final de la amplificación, y un vector de expresión que permite la expresión de la secuencia codificante de la proteasa, y/o cualquier otra forma o longitud del precursor de proteasa del retrovirus que se va a estudiar bajo el control de un promotor inducible conocido, a través de la co-transformación del vector y los fragmentos de ADN con al menos una célula de levadura cuya lisis celular está causada por la expresión de la proteasa de retrovirus;

- 15 cultivar la célula o células de levadura co-transformadas para obtener un número suficiente de transformantes para realizar la prueba de sensibilidad o resistencia, y recuperar de los transformantes procedentes de la célula co-transformada, en cualquier medio adecuado;

incubar los transformantes en presencia, preferiblemente con una concentración cada vez mayor, de cada molécula que se va a someter a ensayo;

- 20 analizar cualitativamente o cuantitativamente las células vivas; y

deducir el fenotipo de resistencia.

Los ácidos nucleicos se pueden extraer de células infectadas por un retrovirus, y/o fluidos corporales de un individuo o animal infectados, y/o sangre de un individuo o animal infectados, y/o a partir de medios de cultivo de células infectadas.

- 25 Las moléculas que se van a someter a ensayo, también denominadas "moléculas de ensayo", se seleccionan del grupo que comprende moléculas de una genoteca, moléculas químicas, moléculas naturales y moléculas extraídas de plantas.

Las moléculas de ensayo se pueden seleccionar del grupo que comprende moléculas químicas que tienen una actividad inhibidora de la proteasa viral, tratamientos terapéuticos basados en inhibidores de la proteasa viral o de la maduración viral.

- 30 Las secuencias de la proteasa amplificadas de acuerdo con el método incluyen las que codifican la proteína aislada o las que codifican la proteína y comprende todas o algunas de las secuencias de aminoácidos situadas aguas arriba y aguas abajo del sitio de escisión del precursor de la proteína en la que están situadas.

El retrovirus puede ser el VIH-1.

- 35 Las secuencias amplificadas que codifican la proteasa del retrovirus que se va a estudiar de acuerdo con el método pueden ser secuencias mutadas o no mutadas. Las secuencias amplificadas que codifican la proteasa del retrovirus, por ejemplo, VIH-1, que se va a estudiar pueden ser seleccionadas del grupo que comprende los SEQ ID NO: 10 a 37.

La levadura utilizada en el método puede ser del tipo de *Saccharomyces cerevisiae*.

- 40 Los ácidos nucleicos se pueden amplificar, por ejemplo, mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa utilizando par de cebadores seleccionados del grupo que comprende los SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42, 48, 51 a 58.

Los protocolos utilizados en el laboratorio con el fin de obtener transformantes de levadura que codifican un gen exógeno generalmente comienzan con una primera etapa para la obtención de los fragmentos de ADN que codifican el gen de interés, ya sea mediante amplificación génica (técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)), o ya sea mediante liberación del gen en virtud de la acción de las enzimas de restricción, que cortan el ADN que contiene la secuencia de interés. Esta primera etapa es equivalente en tiempo a medio día de trabajo.

- 45 El fragmento de ADN liberado es sub-clonado a continuación en un vector de expresión por la acción de la enzima ADN ligasa (una operación que dura una noche) y el producto de reacción se amplifica en una bacteria, después de su transformación (un día para obtener las bacterias que tienen ADN plasmídico incorporado, y un día y medio para la obtención y caracterización del transformante buscado, que contiene el plásmido que codifica el gen de interés).

- 50 El fragmento de ADN liberado es sub-clonado a continuación en un vector de expresión por la acción de la enzima ADN ligasa (una operación que dura una noche) y el producto de reacción se amplifica en una bacteria, después de su transformación (un día para obtener las bacterias que tienen ADN plasmídico incorporado, y un día y medio para la obtención y caracterización del transformante buscado, que contiene el plásmido que codifica el gen de interés).

Por otra parte, para producir cantidades suficientes del plásmido que contiene el gen de interés con vistas a la transformación de la levadura, el clon bacteriano obtenido en la etapa anterior puede ser amplificado (una noche) y los plásmidos purificados mediante métodos conocidos convencionales (un día).

El plásmido purificado obtenido se utiliza a continuación para transformar la cepa de levadura seleccionada (1/2 día).

- 5 La cepa de levadura transformada se obtiene aproximadamente 4 días después del evento de transformación.

Por consiguiente, mediante el uso de los protocolos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica, es posible obtener una cantidad suficiente de transformantes de levadura para un estudio posterior de un gen de interés, por ejemplo, desarrollando una prueba de sensibilidad o resistencia, el tiempo que transcurre entre la preparación del fragmento de ADN que codifica el gen de interés y la obtención de la cepa de levadura que lo expresa que es un mínimo de 8 días. Por otra parte, como se ha descrito anteriormente, se utilizan varias técnicas.

10 La magnitud de estos retrasos y la multiplicidad de las técnicas utilizadas necesariamente dan lugar a elevados costes de producción, incompatibles con el desarrollo de una prueba de sensibilidad o resistencia rápida que sea simple de implementar y de bajo coste.

En otras palabras, los métodos de la técnica anterior para obtener transformantes de levadura no son deseables.

- 15 El cultivo de los transformantes se puede realizar, por ejemplo, en medio líquido y/o medio sólido. El medio utilizado en los métodos de los autores de la presente invención puede ser cualquier medio conocido y adecuado para el cultivo de los transformantes, por ejemplo, un medio sintético mínimo que contienen una fuente de carbono tal como glucosa o galactosa y que carece o no de un nutriente específico, por ejemplo, uracilo.

20 "Análisis cualitativo o cuantitativo" significa cualquier análisis de células vivas conocido en la técnica. Por ejemplo, puede ser una etapa de recuento o anotación de las células vivas, por ejemplo, midiendo la absorbancia, por ejemplo a 600 nm, de un medio líquido, o mediante recuento a simple vista, mediante observación cuando se cultivan los transformantes, por ejemplo, en un medio sólido. También puede ser, por ejemplo, el resultado de las pruebas de laboratorio para la sensibilidad de los transformantes a una molécula de ensayo u otro método que implica el uso de una molécula de ensayo. Por ejemplo, puede ser una forma semi-cuantitativa basado en la difusión (método de Kirby-Bauer); discos pequeños que contienen una molécula de ensayo o discos de papel impregnados, se dejan caer en diferentes zonas del cultivo, por ejemplo, sobre una placa de agar, que es un entorno rico en nutrientes, en el que pueden crecer los transformantes. La molécula que se va a someter a ensayo se difunde en la zona que rodea a cada disco. También puede ser, por ejemplo, un modo cuantitativo basado en la dilución: se establece una serie de dilución de la molécula que se va a someter a ensayo, es decir, por ejemplo, una serie de viales de reacción con concentraciones progresivamente más bajas de sustancia molécula.

25 La sensibilidad o resistencia de la proteasa se pueden deducir, por ejemplo, mediante la medición de la concentración inhibidora semimáxima (CI50), comparando el número de células vivas entre los transformantes incubadas con las moléculas y no incubados con las moléculas.

30 Teniendo en cuenta los estudios sobre la capacidad de la levadura para reparar "ADN roto" (ADN mellado) mediante el mecanismo de la recombinación homóloga, los autores de la presente invención descubrieron que, durante este evento celular, una molécula de ADN es reparada en un punto preciso en su secuencia, poniendo en su lugar secuencias homólogas en el sitio de la "mella" y tomadas en otra molécula de ADN. Mediante el uso de este fenómeno fisiológico, es posible introducir una secuencia definida en el ADN "mellado" a condición de que la secuencia definida esté enmarcada a ambos lados por secuencias idénticas a las que están situadas alrededor del sitio de la "mella".

35 El tamaño mínimo de las secuencias homólogas presentes en las dos moléculas de ADN para que el evento de recombinación pueda tener lugar es de aproximadamente 30 a 40 pares de bases.

40 Esta técnica simplifica muy ventajosamente la obtención de transformantes mediante la reducción, en particular, del número de manipulaciones que implican una reducción significativa en el tiempo necesario de experimentación (aproximadamente la mitad en comparación con los protocolos conocidos) y en el coste de producción. El uso de esta técnica también permite manipular un gran número de muestras al mismo tiempo.

Los autores de la presente invención proporcionan más abajo una descripción detallada de los ejemplos preferidos de aplicación sus métodos.

Ejemplo 1

50 Este ejemplo de aplicación se utiliza preferentemente cuando la proteasa expresada es la proteína aislada. Cuando la proteasa es expresada con todas o algunas de las secuencias de aminoácidos situadas aguas arriba y aguas abajo del sitio de escisión del precursor de proteína que la contiene, los cebadores y fragmentos de nucleótidos descritos anteriormente deberán modificarse en consecuencia.

1 - Preparación y modificación del vector de expresión:

El objetivo de la modificación es poder subclonar el gen de la proteasa a partir del virus que infecta a cada individuo infectado estudiado y transformar la levadura con el gen de la proteasa obtenido, por medio de un procedimiento sencillo y rápido (un procedimiento de una sola etapa).

- 5 Los autores de la presente invención crearon una versión modificada del vector pRS316-Gal1/10, que comprende el promotor inducible GAL1/10 en la posición 5' del sitio de clonación del gen que se va a expresar (Liu H, Krizek J, and Bretscher A. 1992. Construction of a GAL-1 regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. Genetics 132:665-673).

Debido a esto, el gen viral se expresa cuando la célula es transformada con este vector en presencia de galactosa y el gen no se expresa cuando las células transformadas están en la presencia de glucosa como fuente de carbono.

- 10 Para que el fragmento de ADN viral amplificado pueda ser insertado mediante recombinación homóloga en el vector de expresión, el vector debe ser modificado añadiéndole, inmediatamente después de la secuencia del promotor inducible, un cebador 5' de aproximadamente 40 pares de bases, seguido de un único sitio de restricción (para poder linealizar el vector), y un cebador 3' de aproximadamente 40 pares de bases. Aunque este vector modificado y linealizado es un buen sustrato para el evento de recombinación homóloga, la secuencia introducida en la posición 5'
- 15 (entre el gen y el promotor) no debe inhibir la transcripción de los genes.

Para producir la versión modificada del vector de expresión pRS316-Gal1/10, los autores de la presente invención cambiaron el fragmento BamHI-Sac1 de este sitio por otro fragmento de ADN también enmarcado por los sitios de restricción BamHI-Sac1 que contienen (de 5' a 3'):

- el sitio de restricción BamHI, único en el vector, seguido de
- 20 - los 35 a 45 nucleótidos de la secuencia de VIH-2 situados inmediatamente aguas arriba de la proteasa, seguidos de
- un sitio de restricción NotI, único en el vector, seguido de
- los 35 a 45 nucleótidos de la secuencia de VIH-2 situados inmediatamente aguas abajo de la proteasa, seguido de
- 25 - el sitio de restricción Sac1, único en el vector.

Las modificaciones del tamaño de este fragmento de aproximadamente 80-90 pares de bases se llevaron a cabo para optimizar la clonación experimental, la transformación y el sistema de expresión. Un único fragmento modificado entre los 10 diferentes que se habían sometido a ensayo fue suficiente para la recombinación homóloga y expresión de la proteasa viral.

- 30 La secuencia de este fragmento es la siguiente:

(SEQ ID N° 1)

5' GGATCCGGAGACACCATACAGGGAGCCACCAACAGCGGCCGAGTA
GAGCCAATAAAAATAATGCTAAAGCGAGCTC 3'

El vector de expresión pRS316-Gal1/10 modificado de este modo se denomina pRS316-Gal 1/10M.

2 - Elección del Sistema Celular

- 35 Cualquier cepa de levadura con marcadores de auxotrofia necesarios para permitir la selección del transformante que expresa la proteasa viral, y preferiblemente cualquier cepa de *Saccharomyces cerevisiae*.

3 - Subclonación de las proteasas de individuos afectados por el retrovirus, y transformación de levaduras en una sola etapa

La secuencia de ADN que codifica la proteasa de VIH-2 se amplifica mediante la técnica de PCR, dos veces.

- 40 La primera amplificación produce una cantidad significativa de ADN. Esta reacción se lleva a cabo utilizando ADN extraído de linfocitos de sangre periférica de individuos infectados. Los cebadores nucleotídicos utilizados son del tipo:

(SEQ ID N° 2)

Cebador efector: 5'-GAAAGAAGCCCCGCAACTTC-3'

(SEQ ID N° 3)

Cebador antisentido: 5'-GGGATCCATGTCACTTGCCA-3'

La segunda amplificación enmarca la proteasa de un codón de iniciación de la transcripción (ATG) y de un codón de terminación de la transcripción (TAA) y añade a cada lado las secuencias de aproximadamente 40 nucleótidos que los autores de la presente invención llevaron al vector cuando se éste se modificó. Esta reacción de PCR tiene lugar en el producto de la primera PCR con los cebadores del tipo:

(SEQ ID N° 4)

Cebador efector: 5'-
GAGGATCCGGAGACACCATACAGGGAGCCACCAACAGCGGCCGCGCCATG
CCTCAATTC-3'

(SEQ ID N° 5)

Cebador antisentido:

5'GCGGAGCTCGCTTTAGCATTATTTTTATTGGCTCTACTGCGGCCGCTTAAG
ATT-3'

El enmarcado de la proteasa por los codones de iniciación y terminación es el de la proteasa aislada o la proteína que comprende la totalidad o parte de las secuencias de aminoácidos situadas aguas arriba y aguas abajo del sitio de escisión del precursor en el que está situada.

La co-transformación del vector pRS316-Gal1/10M escindido por la enzima de restricción NotI con el producto de la segunda PCR hace que sea posible, a través del evento de recombinación homogénea que tuvo lugar en la célula, obtener una célula de levadura transformada que lleva la secuencia de la proteasa del VIH-2 bajo el control del promotor inducible Gal (FIGS 1 y 2).

4 - El ensayo

Se toma una muestra de sangre periférica de un individuo infectado por el VIH-2. Los linfocitos procedentes de este muestreo se purifican o no, y su ADN se extrae mediante métodos conocidos.

El ADN experimenta las dos reacciones de PCR anteriormente mencionadas para crear el fragmento de ADN, que porta la secuencia de la proteasa con o sin la secuencia o algunas de las secuencias de aminoácidos situadas aguas arriba y aguas abajo del sitio de escisión del precursor en el que está situado y compatible con el vector de expresión para causar el fenómeno de recombinación homogénea en las células transformadas.

Después de la purificación del producto de la segunda PCR, una cepa de levadura que tiene un genotipo ura3 es co-transformada con el vector lineal pRS316Gal1/10M (por su sitio NotI).

Los transformantes potencialmente productores de la proteasa se recuperan en cualquier vehículo adecuado tal como, por ejemplo, gelosa compuesta de agar, glucosa como fuente de carbono, y un entorno sintético con una deficiencia de uracilo.

Se depositan aproximadamente 10^5 células, procedentes de un único transformante, y se distribuyen en 12 pozos de una placa de 96 pocillos y se incuban en galactosa en presencia de 11 concentraciones crecientes de cada inhibidor que se va a someter a ensayo. El duodécimo pocillo no contiene ningún inhibidor.

Después de 36-48 horas a 30°C, las células vivas se cuentan por medio de una lectura densitométrica a 600 nm (FIG. 3).

La dosis necesaria para inhibir la mitad del crecimiento de las células en estas condiciones, en comparación con el crecimiento celular en ausencia de fármacos y en presencia de glucosa (Cl^{50}), define la susceptibilidad o resistencia de esta cepa específica.

El ensayo también se llevó a cabo en el plasma procedente este muestreo, purificado o no, y su ARN o ADN extraídos mediante métodos conocidos. En este caso, estos ácidos nucleicos se someten a las reacciones de RT-PCR y PCR anteriormente mencionadas, si son de tipo ARN, y sin fase RT si son de tipo ADN.

5 El intervalo de tiempo entre la toma de muestras de sangre y la definición del perfil de resistencia es de sólo una semana.

Ejemplo 2

En este ejemplo, el vector de expresión se modificó de la siguiente manera:

10 Se creó una primera versión modificada del vector pRS316-Gal1/10 mediante el intercambio del fragmento BamH1-Sac1 de este vector por un fragmento de ADN, también enmarcado por los sitios de restricción BamH1-SAC1 que contiene (desde 5' a 3'):

- el sitio de restricción BamH1, único en el vector, seguido de
- alrededor de 40 nucleótidos que codifican los aminoácidos situados después de la secuencia codificante de la proteasa de VIH-1, seguidos de
- un codón de parada, seguido de
- 15 - un sitio de restricción Sac1, único en el vector.

20 Las modificaciones de las secuencias de nucleótidos que codifican los aminoácidos situados después de la secuencia codificante de proteasa se llevaron a cabo para la clonación experimental, la transformación y el sistema de expresión. Entre los diversos fragmentos modificados creados y sometidos a ensayo para la recombinación homóloga seleccionada y la expresión de una forma precursora de la proteasa viral, que consiste en la secuencia codificante de proteasa seguido de 13 aminoácidos, un ejemplo incluye:

(SEQ ID N° 56)

**5'-GATCCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATTAA
GAGCTC-3' (para la creación de pRS316-Gal1/10 M-3).**

25 Una segunda versión modificada del vector pRS316-Gal1/10 se creó mediante el intercambio del fragmento BamH1-Sac1 de este vector por un fragmento de ADN, también enmarcado por los sitios de restricción BamH1-SAC1 que contiene (desde 5' a 3'):

- el sitio de restricción BamH1, único en el vector, seguido de
- un codón de iniciación, seguido de
- alrededor de 20 nucleótidos que codifican los aminoácidos situados antes de la secuencia codificante de la proteasa del VIH-1, seguidos de
- 30 - un sitio de restricción XhoI, único en el vector, seguido de
- alrededor de 40 nucleótidos que codifican los aminoácidos situados después de la secuencia codificante de la proteasa del VIH-1, seguidos de
- un codón de parada, seguido de
- un sitio de restricción Sac1, único en el vector.

35 Las modificaciones de las secuencias de nucleótidos que codifican los aminoácidos situados antes y después de la secuencia codificante de la proteasa se llevaron a cabo para la clonación experimental, la transformación y el sistema de expresión. Entre los diversos fragmentos modificados creados y sometidos a ensayo para la recombinación homóloga seleccionada y la expresión de una forma precursora de la proteasa viral, en este caso, el precursor corto en el tipo de SEQ ID NO: 15, un ejemplo incluye:

(SEQ ID N° 57)

40 **GGATCCATGTGGGGTAGAGACAACAACCTCCCTCGAGTCCTATTGAGACTG
TACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATTAAGAGCTC (para la creación de
pRS316-Gal1/10M-4).**

2 - Elección del sistema celular

Cualquier cepa de levadura con marcadores de auxotrofia necesarios para permitir la selección del transformante que expresa la proteasa viral, y, preferiblemente, cualquier cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. En este ejemplo se utilizó *Saccharomyces cerevisiae*.

- 5 3 - Sub-clonación de proteasas de individuos afectados por el retrovirus, y transformación de levaduras en una sola etapa

La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteasa de VIH, o cualquiera de sus formas precursoras, se amplificaron mediante la técnica de RT-PCR, seguido de una reacción de PCR como en el Ejemplo 1.

Los cebadores de nucleotídicos utilizados para la reacción de RT-PCR fueron del tipo:

(SEQ ID N° 52)

Cebador 5'GP7: ATGATGACAGCATGTGAGGGAG, y

(SEQ ID N° 53)

Cebador 3'R772: CCTGAAAATCCATAYAAAYAC.

10

La segunda reacción de PCR se lleva a cabo sobre el producto de la primera PCR con cualquiera de los cebadores del tipo:

(SEQ ID N° 55)

Cebador R2139S1: GAGCTCTTAATCCATTCTGGCTTTAATTTTAC
TGGTACAGTTTCAATTGGAC,

y

(SEQ ID N° 58)

Cebador 5'F-pc-rh: TATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGGA
TCCATGTGGGGTAGAGACAACAACCTCC

15

o los cebadores de tipo:

(SEC ID NO: 55)

Cebador R2139S1: y

(SEQ ID N° 42)

Cebador 5'F3: TATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGGAT
CCTTTAACATGCCTCAGATC.

- 20 En un caso, la co-transformación del vector pRS316-Gal1/10M-3 escindido por la enzima de restricción BamH1 con el producto de la segunda PCR, realizada con los cebadores de los SEC ID NO: 42 y 55, hace posible, a través del evento de recombinación homóloga que tuvo lugar en la célula, la obtención de una célula de levadura transformada, que portaba secuencia de una forma precursora de la proteasa de VIH-1 que consiste en la secuencia codificante de la proteasa seguida de 13 aminoácidos, bajo el control del promotor inducible Gal.

- 25 En el otro caso, la co-transformación del vector pRS316-Gal1/10M4 escindido por la enzima de restricción XhoI con el producto de la segunda PCR, realizada con los cebadores de los SEC ID NO: 54 y 55, hace que sea posible, a través del evento de recombinación homóloga que tuvo lugar en la célula, la obtención de una célula de levadura transformada, que porta la secuencia de una forma precursora de la proteasa del VIH-1 (como SEC ID NO: 15) bajo el control del promotor inducible Gal.

- 30 4 - El ensayo

Se toma una muestra de sangre periférica de un individuo infectado por el VIH-1. El plasma o los linfocitos procedentes de este muestreo se purifican o no, y su ARN o ADN se extraen por medio de kits de extracción conocidos, como Q1Aamp Viral RNA Mini Kit de QIAGEN (Países Bajos).

5 Estos ácidos nucleicos virales se someten a los mismos tratamientos definidos en el Ejemplo 1, para amplificar la secuencia de ADN que codifica el precursor de la proteasa.

Después de la purificación del producto de la segunda PCR, una cepa de levadura que tiene un genotipo *ura3* o bien es co-transformada con el vector lineal pRS316Gal1/10M-3 (por su sitio BamH1) o bien es co-transformada con el vector lineal pRS316Gal1/10M-4 (por su sitio XhoI).

10 Los transformantes que producen potencialmente la proteasa se recuperan en cualquier vehículo adecuado tal como gelosa compuesta de agar, glucosa como fuente de carbono, y un entorno sintético con una deficiencia de uracilo.

Aproximadamente el 10^5 células, procedentes de un único transformante, se depositan y se distribuyen en 12 pocillos de una placa de 96 pocillos y se incuban en medios que contienen galactosa líquida o sólida en la presencia de al menos 8 concentraciones crecientes de cada inhibidor que se va a someter a ensayo. Un pocillo no contiene ningún inhibidor.

15 Después de 36 a 48 horas a 30°C, las células vivas se cuentan mediante una lectura densitométrica a 600 nm (FIG 4) cuando el ensayo se llevó a cabo en medio líquido o a simple vista cuando el ensayo se llevó a cabo en medio sólido.

20 La dosis necesaria para la inhibición de la mitad del crecimiento celular en estas condiciones, en comparación con el crecimiento celular en ausencia de fármacos y en presencia de glucosa (Cl^{50}), define la susceptibilidad o resistencia de esta cepa específica.

El intervalo de tiempo entre la toma de muestras de sangre y la definición del perfil de resistencia es solo de una semana.

Ejemplo 3

Ejemplo de amplificaciones de secuencias de proteasa

25 1 - Secuencia del precursor de proteasa integral

La secuencia precursora de proteasa integral se amplificó mediante PCR a partir de la cepa viral de laboratorio pNL4.3 DNA con el uso de los siguientes cebadores:

(SEQ ID N° 38)

5'CebadorF-GagPol GCGGAGTCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCG AGA, y

(SEQ ID N° 39)

3'CebadorR-GagPol CTAATCTTTCTCGAGTGTTAATCCTCATCCTG TCTACTTG.

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

30 3 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95°C, 30 segundos a 55°C, 2 min a 72°C, y finalizar con una ronda de 7 min a 72°C.

35 El producto de la PCR (SEC ID NO: 18) se purificó mediante procedimientos convencionales digeridos por la enzima de restricción XbaI (Invitrogen, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante y se introdujo, por medio de la ligación de ADN durante la noche (ADN ligasa de T4 de Gibco EE.UU.), según las recomendaciones del fabricante en el vector pRS316-Gal/10 previamente digerido con XbaI.

2 - Secuencia del precursor de proteasa que comienza al principio de la secuencia codificante de proteasa y termina al final de la región codificante de Pol (SEC NO: 37)

40 La reacción de PCR se llevó a cabo sobre el constructo de ADN purificado en el vector pRS316-Gal/10 obtenido en el apartado 1. Las condiciones de la PCR y otras experimentaciones fueron las mismas condiciones descritas en el apartado 1 anterior.

La secuencia del precursor de la proteasa desde la secuencia codificante de la proteasa hasta el final de la secuencia codificante de gag-pol se obtuvo utilizando los siguientes cebadores:

(SEQ ID N° 42)

5' **Cebador F3:** TATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGGAT
CCTTTAACATGCCTCAGATC,

y

(SEQ ID N° 43)

3'CebadorM13F: GTTTTCCCAGTCACCACG para la etapa de amplificación.

5 Los cebadores se seleccionaron para proporcionar secuencias situadas en ambos lados del sitio de clonación en el vector de expresión.

Co-transformación de vector pRS316-Gal1/10 lineal (digerido con BamH1) con el producto de la PCR produjo, por medio de un evento de recombinación en la célula, una levadura transformada que portaba la secuencia del precursor bajo el control del promotor Gal inducible.

3 - Diferente tamaño de secuencia del precursor de proteasa

10 En este ejemplo se utilizó el constructo obtenido en el apartado 2 anterior.

El plásmido que contenía las secuencias del precursor gag-pol que empezaban en la proteasa y terminaban al final de la región pol se linealizó mediante digestión con la enzima de restricción XhoI (Invitrogen, EE.UU.) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

15 Después, se digirieron 6 microgramos del plásmido linealizado con 1 unidad de la enzima exonucleasa Bal31 (Biolabs, EE.UU.) a 30°C, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se tomaron alícuotas iguales cada 20 minutos durante 2 horas de incubación, y la reacción se detuvo con EDTA 25 mM. Esto produjo una digestión parcial de ADN y fragmentos de diferente tamaño. Estos fragmentos, presentes en cada alícuota de la digestión con Bal31, se ligaron a los siguientes oligonucleótidos de doble hebra en una proporción de 50 pmoles de oligonucleótidos con respecto a 1 microgramo de ADN:

(SEQ ID N° 44)

20 **efector Gal-gp-rh:** TATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCC
GGATCCATGTACGATGTACGATG

(SEQ ID N° 45)

antisentido Gal-gp-rh: ATATGAAATTGCAGTTCCTCTTTTTTGGG
GCCTAGGTACATGCTACATGCTAC

(SEQ ID N° 46)

efector M13-gp-rh: TAATAGGTAATAGGTAAGAGCTCCAATTCG
CCCTATAGTGAGTCGTATACAAT

(SEQ ID N° 47)

Antisentido M13-gp-rh: ATTATCCATTATCCATTCTCGAGGTAA
GCGGGATATCACTCAGCATAATGTAA.

25 Estos oligonucleótidos contienen adicionalmente los codones de iniciación y terminación y secuencias idénticas al vector pRS316-Gal1/10.

30 La co-transformación de vector pRS316-Gal1/10 linealizado por las enzimas BamH1-Sac1 con el producto de ligación previamente digerido con la enzima de restricción KpnI (Invitrogen, EE.UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante produce, mediante recombinación homóloga llevada a cabo en la célula, una genoteca de levaduras transformadas que portan cada una formas con supresiones C-terminales del precursor gag-pol que empiezan en la secuencia de la proteasa bajo el control del promotor inducible Gal.

4 - Una secuencia del precursor de proteasa truncada que comprende una única mutación (adición de un solo nucleótido A) para imitar el desplazamiento del marco de lectura abierto natural de la transcripción del gen Gag-Pol

Las condiciones de la PCR y otros experimentos fueron los mismos que las condiciones descritas en el apartado anterior 1.

- 5 Se elaboró una secuencia del precursor mutado que contenía un nucleótido A adicional en la posición 1638. Los cebadores utilizados para la reacción de PCR fueron:

(SEQ ID N° 49)

cebador 5'-a435: CAGGCTAATTTTTTAAGGG,

(SEQ ID N° 50)

cebador R-a435: CCCTTAAAAAATTAGCCTG,

(SEQ ID N° 51)

cebador F1071B1: GGATCCATGATGACAGCATGTCAGGGAGTGGGAG
GACCCGGCCATAAGGCAAGAGTTTTG,

y

(SEQ ID N° 55)

- 10 **cebador R2139S1:** GAGCTCTTAATCCATTCCTGGCTTTAATTTT
ACTGGTACAGTTTCAATTGGAC.

El precursor mutado se elaboró en dos etapas de PCR. En una primera PCR, 2 reacciones independientes, que utilizaban como molde el constructo obtenido en el apartado 2 anterior, implicaron los pares de cebadores, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 55 para una y SEQ ID NO: 50 y SEQ ID NO: 51 para la segunda, para introducir una A (adenina) adicional en la posición 1638 de la secuencia.

- 15 Estos dos productos de PCR se mezclaron y se diluyeron para que fueran un molde para la segunda PCR que se realizó con los cebadores de los SEC ID NO: 51 y SEQ ID NO: 55. El fragmento de ADN recién obtenido se digirió con las enzimas de restricción BamH1 y Sac1 (Invitrogen, EE.UU. y Fermentas, Canadá, respectivamente), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se ligaron con ADN ligasa de T4, (Gibso, EE.UU.) siguiendo las recomendaciones del fabricante, en el vector pRS316-Gal1/10 previamente digerido con enzimas de restricción
20 BamH1 y Sac1 (Invitrogen, EE.UU. y Fermentas, Canadá, respectivamente), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5 - Clonación de una secuencia del precursor de la proteasa de VIH-1 de pacientes infectados

- 25 Una secuencia codificante de la forma del precursor de la proteasa de VIH-1 se amplificó a partir de ARN total purificado extraído de plasma sanguíneo de los pacientes infectados mediante RT-PCR seguida de una reacción de PCR, como se describe en el Ejemplo 2.

Los cebadores utilizados para la reacción de RT-PCR fueron:

(SEQ ID N° 52)

Cebador5'GP7: ATGATGACAGCATGTGAGGGAG, y

(SEQ ID N° 53)

Cebador3'R772: CCTGAAAATCCATAYAAAYAC.

La segunda amplificación enmarca la proteasa entre un codón de iniciación de la transcripción (ATG) y un codón de terminación de la transcripción (TAA). ATG estaba situado 70 nucleótidos por encima del primer codón de la proteasa. TAA estaba situado 150 nucleótidos por debajo del último codón. Por otra parte, la segunda amplificación añade a ambos lados secuencias correspondientes al vector para clonarlo en levadura mediante recombinación homóloga. Esta PCR se realizó en el producto de la primera PCR con los siguientes cebadores:

(SEQ ID N° 55)

Cebador R2139S1: GAGCTCTTAATCCATTCCTGGCTTTAATTTTA
CTGGTACAGTTTCAATTGGAC.

y

(SEQ ID N° 54)

Cebador 5' F-pc-rh: ATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGGA
TCCATGTGGGGTAGAGACAACAACCTCC.

Ejemplo 4

- 10 Ejemplo de la determinación del carácter de resistencia/sensibilidad de la proteasa de un individuo infectado por VIH-1

Una secuencia codificante de la forma del precursor de la proteasa de VIH-1 corto, del tamaño del SEQ ID NO: 15, se amplificó mediante RT-PCR seguido de una reacción de PCR, como se describe en el Ejemplo 2, a partir de ARN total purificado extraído de plasma sanguíneo de un paciente infectado, es decir, P Núm. 10, que se sabe que porta cepas de VIH-1 resistentes a inhibidores de la proteasa como lopinavir, saquinavir y darunavir.

15

El procedimiento seguido fue el descrito en el Ejemplo 3 (5), utilizando los siguientes cebadores:

(SEQ ID N° 52)

Cebador 5'GP7: ATGATGACAGCATGTGAGGGAG, y

(SEQ ID N° 53)

Cebador 3'R772: CCTGAAAATCCATAYAAAYAC, para la etapa de RT-PCR, y los cebadores:

(SEQ ID N° 55)

Cebador R2139S1: GAGCTCTTAATCCATTCCTGGCTTTAATTTT
ACTGGTACAGTTTCAATTGGAC,

y

(SEQ ID N° 54)

Cebador 5' F-pc-rh: ATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGGA
TCCATGTGGGGTAGAGACAACAACCTCC, para la segunda amplificación.

20

El producto final de PCR obtenido se clonó en pRS316-Gal1/10M-4 mediante el procedimiento de una sola etapa de co-transformación descrito en el Ejemplo 2 (3). La célula de levadura transformado fue de la cepa BY4741 (Euroscarf, Alemania) que tenía el siguiente genotipo: MATa, his3.Δ.1, leu2.Δ.0, met15.Δ.0, ura3.Δ.0.

25

Para definir la capacidad de las moléculas de lopinavir, saquinavir y darunavir para inhibir la proteasa clonada, por lo tanto, el patrón de resistencia, se llevó a cabo el procedimiento descrito en el Ejemplo 3 (5) para obtener células de levadura que expresaban proteasas sensibles y resistentes. El carácter sensible o resistente de la proteasa clonada se determinó en medio líquido y sólido.

Cuando el ensayo de resistencia se llevó a cabo en medio líquido, la concentración más alta de las moléculas sometidas a ensayo fue:

50 microMolar para lopinavir,

100 microMolar para darunavir,

5 400 microMolar para saquinavir,

En el ensayo estuvieron presentes 7 diluciones seriadas, uno a uno, de esas disoluciones.

En paralelo, se siguió el mismo procedimiento para someter a ensayo la capacidad de los mismos inhibidores de proteasa para actuar sobre la forma del precursor de proteasa corto (SEC ID NO: 15) expresado en transformantes de levadura BY4741. En este caso, se llevó a cabo la amplificación de ADN, sobre el plásmido pNL4.3 purificado que portaba el genoma total de VIH-1 de la cepa sensible, mediante una reacción de PCR utilizando los siguientes cebadores:

(SEQ ID N° 55)

**Cebador R2139S1: GAGCTCTTAATCCATTCCTGGCTTTAATTTTA
CTGGTACAGTTTCAATTGGAC,**

y

(SEQ ID N° 54)

**Cebador 5' F-pc-rh: ATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCGGA
TCCATGTGGGGTAGAGACAACAACCTCC.**

15 Los resultados obtenidos, presentados como el porcentaje de células vivas como una función de la concentración de inhibidor en la FIG 5a, muestran:

i) carencia de inhibición, por las tres moléculas inhibidoras sometidas a ensayo, de la proteasa viral en su contexto precursor amplificada a partir del paciente P Núm. 10,

20 ii) inhibición, por las tres moléculas inhibidoras sometidas a ensayo, de una proteasa viral sensible en su contexto precursor amplificada a partir de una cepa de VIH-1 de tipo salvaje, a saber, pNL4.3.

Los datos fueron procesados mediante el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Inc, EE.UU.) para obtener los valores de CI50 correspondientes que se muestran en la Tabla 1:

TABLA 1

Inhibidor de la proteasa	CI50 (microMolar)	
	PNL4.3 proteasa	proteasa P Núm. 10
Lopinavir	39,2	> 10 ⁵
Darunavir	50,5	1907,0
Saquinavir	433,2	> 10 ⁵

Por lo tanto, la proteasa viral del paciente P Núm. 10 es resistente a las moléculas inhibidoras sometidas a ensayo.

- 5 Cuando el ensayo de resistencia se llevó a cabo en medio sólido, el transformante de levadura que expresaba cada proteasa viral cultivó en placa sobre medio mínimo sintético, placa de agar, en presencia de Galactosa al 2%. Se colocó en el centro de la placa un disco de papel de 5 mm de diámetro (Minitrans-Blot, Bio-Rad EE.UU.) impregnado con 10 microlitros de cualquiera de lopinavir 0,5 milimolar, darunavir 0,5 m milimolar, o saquinavir 1 milimolar. Después de 3 días a 30°C, se llevó a cabo la observación a simple vista. Cuando la proteasa viral expresada era sensible al inhibidor, se observó un halo de células en crecimiento, mientras que no se observaron células en crecimiento cuando las proteasas virales expresadas en las levaduras transformadas fueron resistentes al inhibidor (FIG. 5b).

Como se demuestra en este ejemplo, el método permite la determinación de la sensibilidad o la resistencia de productos aislados de retrovirus VIH a las moléculas.

Ejemplo 5

- 15 Kit de diagnóstico para la resistencia a retrovirus

Un kit de diagnóstico también determina la sensibilidad o la resistencia de los productos aislados de retrovirus a lo tratamientos retrovirales terapéuticos basadas en inhibidores de la proteasa viral. Éste puede comprender:

- 20 cebadores nucleotídicos y, por ejemplo, cebadores nucleotídicos como los descritos anteriormente para la aplicación de la amplificación del ADN que codifica la proteasa de retrovirus mediante la técnica de PCR, a saber:

para la primera amplificación cebadores del tipo:

(SEQ ID N° 2)

Cebador efector: 5'-GAAAGAAGCCCCGCAACTTC-3'

(SEQ ID N° 3)

Cebador antisentido: 5'-GGGATCCATGTCACTTGCCA-3'

para la segunda amplificación, cebadores del tipo:

(SEQ ID N° 4)

Cebador efector: 5'CGAGGATCCGGAGACACCATACAGGGAGCC
ACCAACAGCGGCCGCGCCATGCCTCAATTC3'

(SEQ ID N° 5)

Cebador antisentido: 5'GCGGAGCTCGCTTTAGCATTATTTTA
TTGGCTCTACTGCGGCCGCTTAA GATT3'

y/o cebadores seleccionados del grupo que comprende los SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42, 48, 51 a 58;

al menos un vector de expresión y, por ejemplo, el plásmido modificado y linealizado de acuerdo con los métodos de los autores de la presente invención y como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, el plásmido pRS316-Gal1/10M, M-3, M-4;

- 5 al menos una cepa de levadura con el marcador de auxotrofia necesario para permitir la selección del transformante que expresa la proteasa viral, y preferiblemente una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*; y

al menos una placa de múltiples pocillos o cualquier otro soporte adecuado.

- 10 Naturalmente, cuando se lleva a cabo la amplificación sobre el ARN o ADN que codifica la proteasa del retrovirus con todas o algunas de las secuencias de aminoácidos situadas aguas arriba y aguas abajo del sitio de escisión del precursor de la proteína que la contiene, los cebadores y fragmentos de nucleótidos se modificarán en consecuencia.

Un principio del kit, también ilustrado en la FIG. 4, es el siguiente:

Utilizando la sangre del paciente, se amplifica el gen que codifica la proteasa viral mediante una reacción de RT-PCR con los cebadores descritos en el método y suministrados en el kit.

- 15 La amplificación del gen de la proteasa viral utilizando ADN celular también es posible.

El producto amplificado y el vector linealizado y modificado (también suministrado en el kit) se utilizan para la transformación de una cepa de levadura, también suministrada en el kit, en una placa de múltiples pocillos.

- 20 De una manera preferida, aunque en modo alguno limitante, después de la incubación a 30° en un horno de secado en un medio selectivo que contiene glucosa, se transfieren 2 microlitros de la suspensión celular a una nueva placa, suministrada en el kit, que contiene concentraciones crecientes de cada principio activo utilizado en la terapia. Se añaden 300 microlitros del medio seleccionado que contiene galactosa a cada pocillo, antes de incubar a 30°C en un horno de secado de 36 a 48 horas.

- 25 Al final de la incubación, por ejemplo, si el soporte era medio líquido, las células vivas se cuentan mediante una lectura densitométrica a 600 nm. La dosis necesaria para la inhibición de la mitad del crecimiento celular, en comparación con el crecimiento celular de la cepa de levadura que no expresa la proteasa viral, define la CI_{50} para cada inhibidor. Una comparación entre las CI_{50} obtenidas y las de una proteasa de tipo salvaje de referencia permite determinar cualquier fenotipo de resistencia.

- 30 Al final de la incubación, por ejemplo, si el soporte es sólido como en el Ejemplo 4, la observación a simple vista define el carácter sensible/resistente la proteasa de VIH hacia una molécula, por ejemplo, un inhibidor específico de la proteasa viral del individuo infectada, simplemente determinando si hay crecimiento (sensible) o no hay crecimiento (resistente) de la levadura transformada.

El intervalo de tiempo entre la toma de sangre y la definición del perfil de resistencia es de sólo una semana.

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> LUSCHANKOF, PABLO PERRIN-EAST, CHRISTELLE RAOUL, DIDIER BEN M'BAREK, NAJOUA AUDOLY, GILLES	
10	<120> Método para determinar la sensibilidad o la resistencia de productos aislados de retrovirus a moléculas y kits de diagnóstico	
	<130> AMI-B-0001PCT1	
15	<150> 12/503,174 <151> 2009-07-15	
	<150> 12/504,456 <151> 2009-07-16	
20	<160> 58	
	<170> PatentIn version 3.5	
25	<210> 1 <211> 77 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 1 ggatccggag acaccatata gggagccacc aacagcggcc gcagtagagc caataaaaat	60
	aatgctaaag cgagctc	77
35	<210> 2 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 2 gaaagaagcc ccgcaactc	20
45	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
50	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético	
55	<400> 3 gggatccatg tcaactgcc 20 <210> 4 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 4	

cgaggatccg gagacaccat acagggagcc accaacacgc gccgcgcat gcctcaattc 60

<210> 5
<211> 54
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

10 <400> 5
gcggagctcg ctttagcatt atttttattg gctctactgc ggccgcttaa gatt 54

<210> 6
15 <211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 6
ggatccggag acaccataca gggagccacc aacagcggcc40

25 <210> 7
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 7
gcagtagagc caataaaaat aatgctaaag cgagctc 37

35 <210> 8
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 8
45 gcggagctcg ctttagcatt atttttattg gctactgcgg ccgcttaaga tt 52

<210> 9
<211> 303
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de proteasa de VIH sintética que contienen codones de inicio (ATG) y parada (TAA)

55 <400> 9
atgcctcaga tcactctttg gcagcgaccc ctcgtcaca taaagatagg ggggcaatta 60
aaggaagctc tattagatac aggagcagat gatacagtat tagaagaaat gaatttgcca 120
ggaagatgga aacaaaaaat gataggggga attggagggt ttatcaaagt aagacagtat 180
gatcagatac tcatagaaat tgcggacat aaagctatag gtacagtatt agtaggacct 240
acacctgtca acataattgg aagaaatctg ttgactcaga ttggctgcac tttaaatttt 300
taa 303

<210> 10
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con 24 ácidos nucleicos más en su extremo 5', 3 ácidos nucleicos más en su extremo 3'

10

<400> 10	ggatccatgg tatcctttaa cttccctcag atcactcttt ggcagcgacc cctcgtcaca	60
	ataaagatag gggggcaatt aaaggaagct ctattagata caggagcaga tgatacagta	120
	ttagaagaaa tgaatttgcc aggaagatgg aaacaaaaa tgataggggg aattggaggt	180
	tttatcaaag taagacagta tgatcagata ctcatagaaa tctgcggaca taaagctata	240
	ggtacagtat tagtaggacc tacacctgtc aacataattg gaagaaatct gttgactcag	300
	attggctgca ctttaaattt tccc	324

<210> 11
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con 24 ácidos nucleicos más en su extremo 5', 60 ácidos nucleicos más en su extremo 3'

20

<400> 11	ggatccatgg tatcctttaa ctgcctcag atcactcttt ggcagcgacc cctcgtcaca	60
	ataaagatag gggggcaatt aaaggaagct ctattagata caggagcaga tgatacagta	120
	ttagaagaaa tgaatttgcc aggaagatgg aaacaaaaa tgataggggg aattggaggt	180
	tttatcaaag taagacagta tgatcagata ctcatagaaa tctgcggaca taaagctata	240
	ggtacagtat tagtaggacc tacacctgtc aacataattg gaagaaatct gttgactcag	300
	attggctgca ctttaaattt tcccattagt ccaattgaaa ctgtaccagt aaaattaaag	360
	ccaggaatgg attaagagct c	381

25

<210> 12
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con 27 ácidos nucleicos más en su extremo 5', 3 ácidos nucleicos más en su extremo 3'

35

<400> 12	ggatccatga ctgtatcctt taacttcctt cagatcactc tttggcagcg acccctcgtc	60
	acaataaaga taggggggca attaaaggaa gctctattag atacaggagc agatgataca	120
	gtattagaag aaatgaattt gccaggaaga tggaaccaa aaatgatagg gggaattgga	180
	ggttttatca aagtaagaca gtatgatcag atactcatag aaatctgcgg acataaagct	240
	ataggtacag tattagtagg acctacacct gtcaacataa ttggaagaaa tctgttgact	300
	cagattggct gcactttaaa ttttccc	327

<210> 13
 <211> 384

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

- 5 <223> Descripción de la Secuencia artificial: secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con 27 ácidos nucleicos más en su extremo 5', 60 ácidos nucleicos más en su extremo 3'

<400> 13

```
ggatccatga ctgtatcctt taacttgcct cagatcactc tttggcagcg acccctcgtc      60
acaataaaga taggggggca attaaaggaa gctctattag atacaggagc agatgatata      120
gtattagaag aaatgaattt gccaggaaga tggaaacaa aaatgatagg gggaattgga      180
ggttttatca aagtaagaca gtatgatcag atactcatag aaatctgcgg acataaagct      240
ataggtacag tattagtagg acctacacct gtcaacataa ttggaagaaa tctgttgact      300
cagattggct gcactttaaa ttttcccatt agtccaattg aaactgtacc agtaaaatta      360
aagccaggaa tggattaaga gctc                                           384
```

10

<210> 14
<211> 387
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15

<220>

- <223> Descripción de la Secuencia artificial: secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con 30 ácidos nucleicos más en su extremo 5', 60 more en su extremo 3'

20 <400> 14

```
ggatccatgg gaactgtatc ctttaacttg cctcagatca ctctttggca gcgaccctc      60
gtcacaataa agataggggg gcaattaaag gaagctctat tagatacagg agcagatgat      120
acagtattag aagaaatgaa tttgccagga agatggaaac caaaaatgat agggggaatt      180
ggagggttta tcaaagtaag acagtatgat cagatactca tagaaatctg cggacataaa      240
gctataggta cagtattagt aggacctaca cctgtcaaca taattggaag aaatctgttg      300
actcagattg gctgcacttt aaattttccc attagtccaa ttgaaactgt accagtaaaa      360
ttaagccag gaatggatta agagctc                                           387
```

25 <210> 15
<211> 435
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

- 30 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia precursora corta de VIH-1 sintética

<400> 15

```
ggatccatgt ggggtagaga caacaactcc ctctcagaag caggagccga tagacaagga      60
actgtatcct ttagcttccc tcagatcact ctttggcagc gaccctcgt cacaataaag      120
ataggggggc aattaaagga agctctatta gatacaggag cagatgatac agtattagaa      180
gaaatgaatt tgccaggaag atggaaacca aaaatgatag ggggaattgg aggttttatc      240
aaagtaagac agtatgatca gatactcata gaaatctgcg gacataaagc tataggtaca      300
gtattagtag gacctacacc tgtcaacata attggaagaa atctgttgac tcagattggc      360
tgcactttaa attttcccat tagtccaatt gaaactgtac cagtaaaatt aaagccagga      420
atggattaag agctc                                           435
```

<210> 16
<211> 435
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5
<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia precursora corta de VIH-1 sintética con mutación del sitio de escisión aguas abajo del sitio que codifica la proteasa

10
<400> 16
ggatccatgt ggggtagaga caacaactcc ctctcagaag caggagccga tagacaagga 60
actgtatcct ttagcttccc tcagatcact ctttggcagc gacccctcgt cacaataaag 120
ataggggggc aattaaagga agctctatta gatacaggag cagatgatac agtattagaa 180
gaaatgaatt tgccaggaag atggaaacca aaaatgatag ggggaattgg aggttttattc 240
aaagtaagac agtatgatca gatactcata gaaatctgcy gacataaagc tataggtaca 300
gtattagtag gacctacacc tgtcaacata attggaagaa atctgttgac tcagattggc 360
tgcactttaa atattcccat tagtccaatt gaaactgtac cagtaaaatt aaagccagga 420
atggattaag agctc 435

<210> 17
<211> 792
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia precursora larga de VIH-1 sintética con modificación del marco de lectura abierto

20
<400> 17
ggatccatga tgacagcatg tcagggagtg gggggacccg gccataaagc aagagttttg 60
gctgaagcaa tgagccaagt aacaaatcca gctaccataa tgatacagaa aggcaatttt 120
aggaaccaa gaaagactgt taagtgtttc aattgtggca aagaagggca catagccaaa 180
aattgcaggg cccctaggaa aaagggtgtg tggaaatgtg gaaaggaagg acaccaaatg 240
aaagattgta ctgagagaca ggctaatttt ttaagggaag atctggcctt cccacaaggg 300
aaggccaggg aattttcttc agagcagacc agagccaaca gccccaccag aagagagctt 360
caggtttggg gtagagacaa caactccctc tcagaagcag gagccgatag acaaggaact 420
gtatccttta acttccctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata 480
ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa 540
atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 600
gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta 660
ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 720
actttaaatt ttcccattag tccaattgaa actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg 780
25 gattaagagc tc 792

<210> 18
<211> 4345
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de Gag-pol de VIH-1 sintética

<400> 18

gCGgagTcta gaaggagaga gatgggtgcg agagcgTcgg tattaagcgg gggagaatta	60
gataaatggg aaaaaattcg gTtaaggcca gggggaaaga aacaatataa actaaaacat	120
atagtatggg caagcaggga gctagaacga ttcgcagtta atcctggcct tttagagaca	180
tcagaaggct gtagacaaat actgggacag ctacaaccat cccttcagac aggatcagaa	240
gaacttagat cattatataa tacaatagca gTcctctatt gtgtgcatca aaggatagat	300
gtaaaagaca ccaaggaagc cttagataag atagaggaag agcaaaacaa aagtaagaaa	360
aaggcacagc aagcagcagc tgacacagga aacaacagcc aggtcagcca aaattaccct	420
atagtgcaga acctccaggg gcaaatggta catcaggcca tatcacctag aactttaaat	480
gcatgggtaa aagtagtaga agagaaggct ttcagcccag aagtaatacc catgttttca	540
gcattatcag aaggagccac cccacaagat ttaaatacca tgctaaacac agtgggggga	600
catcaagcag ccatgcaaat gttaaaagag accatcaatg aggaagctgc agaatgggat	660
agattgcatc cagtgcattc agggcctatt gcaccaggcc agatgagaga accaagggga	720
agtgacatag caggaactac tagtaccctt caggaacaaa taggatggat gacacataat	780
ccacctatcc cagtaggaga aatctataaa agatggataa tcctgggatt aaataaaata	840
gtaagaatgt atagccctac cagcattctg gacataagac aaggaccaa ggaacccttt	900
agagactatg tagaccgatt ctataaaact ctaagagccg agcaagcttc acaagaggta	960

aaaaattgga	tgacagaaac	cttgttggtc	caaaatgcga	acccagattg	taagactatt	1020
ttaaaagcat	tgggaccagg	agcgacacta	gaagaaatga	tgacagcatg	tcagggagtg	1080
gggggacccg	gccataaagc	aagagttttg	gctgaagcaa	tgagccaagt	aacaaatcca	1140
gctaccataa	tgatacagaa	aggcaatfff	aggaaccaa	gaaagactgt	taagtgtttc	1200
aattgtggca	aagaagggca	catagccaaa	aattgcaggg	cccctaggaa	aaagggctgt	1260
tggaaatgtg	gaaaggaagg	acaccaaatg	aaagattgta	ctgagagaca	ggctaatttt	1320
ttagggaaga	tctggccttc	ccacaaggga	aggccagggg	atfctcttca	gagcagacca	1380
gagccaacag	ccccaccaga	agagagcttc	aggtttgggg	aagagacaac	aactccctct	1440
cagaagcagg	agccgataga	caaggaactg	tatcctttag	cttccctcag	atcactcttt	1500
ggcagcgacc	cctcgtcaca	ataaagatag	gggggcaatt	aaaggaagct	ctattagata	1560
caggagcaga	tgatacagta	ttagaagaaa	tgaatttgcc	aggaagatgg	aaacaaaaaa	1620
tgataggggg	aattggaggt	tttatcaaag	taagacagta	tgatcagata	ctcatagaaa	1680
tctgcggaca	taaagctata	ggtacagtat	tagtaggacc	tacacctgtc	aacataattg	1740
gaagaaatct	gttgactcag	attggctgca	ctttaaattt	tcccattagt	cctattgaga	1800
ctgtaccagt	aaaattaaag	ccaggaatgg	atggcccaaa	agttaaaca	tggccattga	1860
cagaagaaaa	aataaaagca	ttagtagaaa	ttgtacaga	aatggaaaag	gaaggaaaaa	1920
tttcaaaaat	tgggcctgaa	aatccatata	atactccagt	atttgccata	aagaaaaaag	1980
acagtactaa	atggagaaaa	ttagtagatt	tcagagaact	taataagaga	actcaagatt	2040
tctgggaagt	tcaattagga	ataccacatc	ctgcagggtt	aaaacagaaa	aatcagtaa	2100
cagtactgga	tgtgggcgat	gcatatffff	cagtccctt	agataaagac	ttcaggaagt	2160
atactgcatt	taccatacct	agtataaaca	atgagacacc	agggattaga	tatcagtaca	2220
atgtgcttcc	acagggatgg	aaaggatcac	cagcaatatt	ccagtgtagc	atgacaaaaa	2280
tcttagagcc	ttttagaaaa	caaatccag	acatagtcac	ctatcaatac	atggatgatt	2340
tgtatgtagg	atctgactta	gaaatagggc	agcatagaac	aaaaatagag	gaactgagac	2400
aacatctggt	gaggtgggga	tttaccacac	cagacaaaaa	acatcagaaa	gaacctccat	2460
tcctttggat	gggttatgaa	ctccatcctg	ataaatggac	agtacagcct	atagtgtgtc	2520
cagaaaagga	cagctggact	gtcaatgaca	tacagaaatt	agtgggaaaa	ttgaattggg	2580
caagtcagat	ttatgcaggg	attaaagtaa	ggcaattatg	taaacttctt	aggggaacca	2640
aagcactaac	agaagtagta	ccactaacag	aagaagcaga	gctagaactg	gcagaaaaca	2700
gggagattct	aaaagaaccg	gtacatggag	tgtattatga	cccatcaaaa	gacttaatag	2760
cagaaatata	gaagcagggg	caaggccaat	ggacatatca	aatttatcaa	gagccattta	2820
aaaatctgaa	aacaggaaaa	tatgcaagaa	tgaaggggtg	ccacactaat	gatgtgaaac	2880
aattaacaga	ggcagtacaa	aaaatagcca	cagaaagcat	agtaatatgg	ggaaagactc	2940
ctaaatttaa	attaccata	caaaaggaaa	catgggaagc	atgggtggaca	gagtattggc	3000

aagccacctg gattcctgag tgggagtttg tcaatacccc tcccttagtg aagttatggt 3060
accagttaga gaaagaaccc ataataggag cagaaacttt ctatgtagat ggggcagcca 3120
atagggaaac taaattagga aaagcaggat atgtaactga cagaggaaga caaaaagttg 3180
tccccctaac ggacacaaca aatcagaaga ctgagttaca agcaattcat ctagctttgc 3240
aggattcggg attagaagta aacatagtga cagactcaca atatgcattg ggaatcattc 3300
aagcacaacc agataagagt gaatcagagt tagtcagtca aataatagag cagttaataa 3360
aaaaggaaaa agtctacctg gcatgggtac cagcacacaa aggaattgga ggaaatgaac 3420
aagtagatgg gttggtcagt gctggaatca ggaaagtact attttttagat ggaatagata 3480
aggcccaaga agaacatgag aaatatcaca gtaattggag agcaatggct agtgatttta 3540
acctaccacc tgtagtagca aaagaaatag tagccagctg tgataaatgt cagctaaaag 3600
gggaagccat gcatggacaa gtagactgta gcccaggaat atggcagcta gattgtacac 3660
atttagaagg aaaagttatc ttggtagcag ttcattgtagc cagtggatat atagaagcag 3720
aagtaattcc agcagagaca gggcaagaaa cagcatactt cctcttaaaa ttagcaggaa 3780
gatggccagt aaaacagta catacagaca atggcagcaa tttcaccagt actacagtta 3840
aggccgcctg ttggtgggcg gggatcaagc aggaatttgg cattccctac aatcccaaaa 3900
gtcaaggagt aatagaatct atgaataaag aattaaagaa aattatagga caggtaagag 3960
atcaggctga acatcttaag acagcagtag aaatggcagt attcatccac aattttaaaa 4020
gaaaaggggg gattgggggg tacagtgcag gggaaagaat agtagacata atagcaacag 4080
acatacaaac taaagaatta caaaaacaaa ttacaaaaat tcaaaatttt cgggtttatt 4140
acagggacag cagagatcca gtttgaaag gaccagcaaa gctcctctgg aaaggtgaag 4200
gggcagtagt aatacaagat aatagtgaac taaaagtagt gccagaaga aaagcaaaga 4260
tcatcaggga ttatggaaaa cagatggcag gtgatgattg tgtggcaagt agacaggatg 4320
aggattaaca ctcgagaaag attag 4345

<210> 19

<211> 326

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia artificial: secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 3 ácidos nucleicos más

<400> 19

ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata 60
ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa 120
atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 180
gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta 240
ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tggtgactca gattggctgc 300
actttaaat ttcctaagc tccaat 326

15

<210> 20

<211> 329

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 6 ácidos nucleicos más

<400> 20
ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata 60
ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa 120
atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 180
gtaagacagt atgatacagt actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta 240
ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 300
acttttaaatt ttcccattta agctccaat 329

<210> 21
 <211> 332
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 12 ácidos nucleicos más

<400> 21
ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata 60
ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa 120
atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 180
gtaagacagt atgatacagt actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta 240
ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 300
acttttaaatt ttcccattag ctaagctcca at 332

<210> 22
 <211> 340
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 16 ácidos nucleicos más

<400> 22
ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata 60
ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa 120
atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 180
gtaagacagt atgatacagt actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta 240
ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 300
acttttaaatt ttcccattag tcctaataagg taataggtaa 340

<210> 23
 <211> 371
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 51 ácidos nucleicos más

<400> 23

	ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata	60
	ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa	120
	atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa	180
	gtaagacagt atgatacagt actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta	240
	ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc	300
	actttaaatt ttcccattag tccaattgaa actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg	360
	gattaagagc t	371
	<210> 24	
	<211> 388	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de la Secuencia artificial: secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 66 ácidos nucleicos más	
	<400> 24	
	ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata	60
	ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa	120
	atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa	180
	gtaagacagt atgatacagt actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta	240
	ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc	300
	actttaaatt ttcccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg	360
	gatggcccaa aagttaaata ataggtaa	388
15	<210> 25	
	<211> 477	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 156 ácidos nucleicos más	
	<400> 25	
	ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata	60
	ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa	120
	atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa	180
	gtaagacagt atgatacagt actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta	240
	ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc	300
	actttaaatt ttcccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg	360
	gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaagc attagtagaa	420
25	atgtgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctaa taggtaa	477
	<210> 26	
	<211> 669	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 342 ácidos nucleicos más	

	<400> 26	
	ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata	60
	ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa	120
	atgaatttgc caggaagatg gaaacccaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa	180
	gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta	240
	ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc	300
	actttaaatt tttcctatta gtcctattga gactgtacca gtaaaattaa agccaggaat	360
	ggatggccca aaagttaaac aatggccatt gacagaagaa aaaataaaaag cattagtaga	420
	aatttgtaca gaaatggaaa aggaaggaaa aatttcacaaa attgggcctg aaaatccata	480
	caatactcca gtatttgcca taaagaaaaa agacagtact aaatggagaa aattagtaga	540
	tttcagagaa ctttaataaga gaactcaaga tttctgggaa gttcaattag gaataccaca	600
	tcctgcaggg ttaaaacaga aaaaatcagt aacagtactg gatgtgggcg atgctaatag	660
	gtaataggt	669
5	<210> 27 <211> 796 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 471 ácidos nucleicos más	
	<400> 27	
	ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata	60
	ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa	120
	atgaatttgc caggaagatg gaaacccaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa	180
	gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta	240
	ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc	300
	actttaaatt ttcccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaa gccaggaatg	360
	gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acatgaagaa aaaataaaaag cattagtaga	420
	aatttgtaca gaaatggaaa aggaaggaaa aatttcacaaa attgggcctg aaaatccata	480
	caatactcca gtatttgcca taaagaaaaa agacagtact aaatggagaa aattagtaga	540
	tttcagagaa ctttaataaga gaactcaaga tttctgggaa gttcaattag gaataccaca	600
	tcctgcaggg ttaaaacaga aaaaatcagt aacagtactg gatgtgggcg atgcatattt	660
	ttcagttccc ttagataaag acttcaggaa gtatactgca ttaccatac ctagtataaa	720
	caatgagaca ccagggatta gatatcagta caatgtgctt ccacagggat ggaaaggatc	780
15	actaataggt aatagg	796
	<210> 28 <211> 922 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 591 ácidos nucleicos más	
25	<400> 28	

```

ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata    60
ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa    120
atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa    180
gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta    240
ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tggtgactca gattggctgc    300
actttaaatt ttcccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg    360
gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaaagc attagtagaa    420
atgtgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aaatccatac    480
aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat    540
ttcagagAAC ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ktcaattarg aataccacat    600
cctgcagggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggcga tgcataatTTT    660
tcagttccct tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac    720
aatgagacac cagggattag atatcagtac aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca    780
ccagcaatat tccagtgtag catgacaaaa atcttagagc cttttagaaa acaaaatcca    840
gacatagtca tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg    900
ctaataaggta ataggtAaga gc                                          922

```

5 <210> 29
 <211> 994
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 663 ácidos nucleicos más

```

<400> 29
ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata    60
ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa    120
atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa    180
gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta    240
ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tggtgactca gattggctgc    300
actttaaatt ttcccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg    360
gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaaagc attagtagaa    420
atgtgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aaatccatac    480
aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat    540
ttcagagAAC ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ttcaattagg aataccacat    600
cctgcagggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggcga tgcataatTTT    660
tcagttccct tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac    720
aatgagacac cagggattag atatcagtac aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca    780
ccagcaatat tccagtgtag catgacaaaa atcttagagc cttttagaaa acaaaatcca    840
gacatagtca tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg    900
cagcatagaa caaaaataga ggaactgrga caacatctgt tgagggtgggg atttaccaca    960
ccagacaaaa aactaatagg taataggtaa gagc                                994

```

15

<210> 30
 <211> 1002
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 675 ácidos nucleicos más

10 <400> 30
 ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata 60
 ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa 120
 atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 180
 gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta 240
 ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 300
 actttaaat ttccattag tcctattgag actgtaccag twaaattaaa gccaggaatg 360
 gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaaagc attagtagaa 420
 atttgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aaatccatac 480
 aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat 540
 ttcagagaac ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ttcaattagg aataccacat 600
 cctgcagggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggcga tgcataatatt 660
 tcagttccct tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac 720
 aatgagacac cagggattag atatcagtac aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca 780
 ccagcaatat tccagtgtag catgacaaaa atcttagagc cttttagaaa acaaaatcca 840
 gacatagtca tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg 900
 cagcatagaa caaaaataga ggaactgaga caacatctgt tgaggtgggg atttaccaca 960
 ccagacaaaa aacatcagaa agaacctaag aggtaatagg ta 1002

15 <210> 31
 <211> 1005
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 678 ácidos nucleicos más

<400> 31

```

ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata      60
ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa      120
atgaatttgc caggaagatg gaaaccaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa      180
gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta      240
ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc      300
actttaaatt ttcmcattat tcctattgas actgtaccag tcaaattaa gccmaggagt      360
gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaagc attagtagaa      420
atgtgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aaatccatac      480
aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat      540
ttcagagaac ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ttcaattagg aataccacat      600
cctgcagggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggcga tgcataat      660
tcagttccct tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac      720
aatgagacac cagggattag atatcagtac aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca      780
ccagcaatat tccagtgtag catgacaaaa atcttagagc cttttagaaa acaaaatcca      840
gacatagtca tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg      900
cagcatagaa caaaaataga ggaactgaga caacatctgt tgagggtggg atttaccaca      960
ccagacaaaa aacatcagaa agaacctcct aataggtaat aggta                      1005

```

5 <210> 32
 <211> 1015
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 684 ácidos nucleicos más
 <400> 32

```

ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata 60
ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa 120
atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 180
gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta 240
ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 300
actttaaatt ttcccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg 360
gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaaagc attagtagaa 420
atgtgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aaatccatac 480
aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat 540
ttcagagaac ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ttcaattagg aataccacat 600
cctgcagggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggcga tgcataatctt 660
tcagtccctt tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac 720
aatgagacac cagggattag atatcagtac aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca 780
ccagcaatat tccagtgtag catgacaaaa atcttagagc cttttagaaa acaaaatcca 840
gacatagtca tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg 900
cagcatagaa caaaaataga ggractgaga caacatctgt tgaggtgggg atttaccaca 960
ccagacaaaa aacatcagaa agaacctcca ttcctaatag gtaataggta agagc 1015

```

<210> 33

<211> 1257

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 939 ácidos nucleicos más

<400> 33

```

ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata 60
ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa 120
atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 180

```

gtaagacagt atgatacagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta 240
 ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 300
 actttaaaatt tccccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg 360
 gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaaagc attagtagaa 420
 atttgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aaatccatac 480
 aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat 540
 ttcagagaac ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ttcaattagg aataccacat 600
 cctgcaggggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggcga tgcataatatt 660
 tcagttccct tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac 720
 aatgagacac cagggattag atatcagtag aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca 780
 ccagcaatat tccagtgtag catgacaaaa atcttagagc cttttagaaa acaaaatcca 840
 gacatagtag tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg 900
 cagcatagaa caaaaataga ggaactgaga caacatctgt tgaggtgggg atttaccaca 960
 ccagacaaaa aacatcagaa agaacctcca ttcctttgga tgggttatga actccatcct 1020
 gataaatgga cagtacagcc tatagtgtctg ccagaaaagg acagctggac tgtcaatgac 1080
 atacagaaat tagtgggaaa attgaattgg gcaagtcaga tttatgcagg gattaaagta 1140
 aggcaattat gtaaaacttct taggggaacc aaagcactaa cagragtagt accactaaca 1200
 gaagaagcag agctagaact ggcagaaaac agggagattc taaaagaacc taatagg 1257

<210> 34

<211> 1369

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 1044 ácidos nucleicos más

<400> 34

ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac cctcgtcac aataaagata 60
 ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa 120
 atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg tttatcaaaa 180
 gtaagacagt atgatacagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta 240
 ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 300
 actttaaaatt tccccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg 360
 gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaaagc attagtagaa 420
 atttgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aaatccatac 480
 aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat 540
 ttcagagaac ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ttcaattagg aataccacat 600

cctgcagggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggcga tgcataatatt 660
 tcagtttycct tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac 720
 aatgagacac cagggattag atatcagtac aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca 780
 ccagcaatat tccagtgtag catgacaaaa atcttagagc cttttagaaa acaaaatcca 840
 gacatagtca tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg 900
 cagcatagaa caaaaataga ggaactgaga caacatctgt tgaggtgggg atttaccaca 960
 ccagacaaaa aacatcagaa agaacctcca ttcctttgga tgggttatga actccatcct 1020
 gataaatgga cagtacagcc tatagtgtctg ccagaaaagg acagctggac tgtcaatgac 1080
 atacagaaat tagtgggaaa attgaattgg gcaagtcaga tttatgcagg gattaaagta 1140
 aggcaattat gtaaacttct taggggaacc aaagcactaa cagaagtagt accactaaca 1200
 gaagaagcag agctagaact ggcagaaaac agggagattc taaaagaacc ggtacatgga 1260
 gtgtattatg acccatcaaa agacttaata gcagaaatac agaagcaggg gcaaggccaa 1320
 tggacatatc aaatttatca agagccatta aaaatctaata aggtaatag 1369

<210> 35

<211> 1405

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 1083 ácidos nucleicos más

<400> 35

ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata 60
 ggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa 120
 atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 180
 gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta 240
 ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 300
 acttttaaatt ttcccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg 360
 gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaaagc attagtagaa 420
 atttgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aaatccatac 480
 aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat 540
 ttcagagaac ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ttcaattagg aataccacat 600
 cctgcagggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggcga tgcataatatt 660
 tcagtttycct tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac 720
 aatgagacac cagggattag atatcagtac aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca 780
 ccagcaatat tccagtgtag catgacaaaa atcttagagc cttttagaaa acaaaatcca 840
 gacatagtca tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg 900

cagcatagaa caaaaataga ggaactgaga caacatctgt tgaggtggg atttaccaca	960
ccagacaaaa aacatcagaa agaacctcca ttcctttgga tgggttatga actccatcct	1020
gataaatgga cagtacagcc tatagtgtg ccagaaaagg acagctggac tgtcaatgac	1080
atacagaaat tagtgggaaa attgaattgg gcaagtcaga tttatgcagg gattaaagta	1140
aggcaattat gtaaacttct taggggaacc aaagcactaa cagaagtagt accactaaca	1200
gaagaagcag agctagaact ggcagaaaac agggagattc taaaagaacc ggtacatgga	1260
gtgtattatg acccatcaaa agacttaata gcagaaatac agaagcagg gcaaggccaa	1320
tggacatatc aaatttatca agagccatta aaaatctgaa aacaggaaag tatgcaagaa	1380
tgaagggtgc cmtaataggt aatag	1405

<210> 36

<211> 2851

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 2511 ácidos nucleicos más

<400> 36

ggatccttta acatgcctca gatcactctt tggcagcgac ccctcgtcac aataaagata	60
gggggggcaat taaaggaagc tctattagat acaggagcag atgatacagt attagaagaa	120
atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa	180
gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgcggac ataaagctat aggtacagta	240
ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc	300
actttaaat tttccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg	360
gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaagc attagtcgaa	420
atgtgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aaatccatac	480
aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat	540
ttcagagaac ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ttcaattagg aataccacat	600
cctgcagggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggcga tgcatatatt	660
tcagtccct tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac	720
aatgagacac cagggattag atatcagtac aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca	780
ccagcaatat tccagtgtag catgacaaaa atcttagagc cttttagaaa acaaaatcca	840
gacatagtca tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg	900
cagcatagaa caaaaataga ggaactgaga caacatctgt tgaggtggg atttaccaca	960
ccagacaaaa aacatcagaa agaacctcca ttcctttgga tgggttatga actccatcct	1020
gataaatgga cagtacagcc tatagtgtg ccagaaaagg acagctggac tgtcaatgac	1080
atacagaaat tagtgggaaa attgaattgg gcaagtcaga tttatgcagg gattaaagta	1140

```

aggcaattat gtaaacttct taggggaacc aaagcactaa cagaagtagt accactaaca 1200
gaagaagcag agctagaact ggcagaaaac agggagattc taaaagaacc ggtacatgga 1260
gtgtattatg acccatcaaa agacttaata gcagaaatac agaagcaggg gcaaggccaa 1320
tggacatatc aaatttatca agagccattt aaaaatctga aaacaggaaa gtatgcaaga 1380
atgaaggggtg cccacactaa tgatgtgaaa caattaacag aggcagtaca aaaaatagcc 1440
acagaaagca tagtaatatg gggaaagact cctaaattta aattacccat acaaaaggaa 1500
acatgggaag catggtggac agagtattgg caagccacct ggattcctga gtgggagttt 1560
gtcaataccc ctcccttagt gaagtattgg taccagttag agaaagaacc cataatagga 1620
gcagaaactt tctatgtaga tggggcagcc aatagggaaa ctaaattagg aaaagcagga 1680
tatgtaactg acagaggaag acaaaaagtt gtccccctaa cggacacaac aaatcagaag 1740
actgagttac aagcaattca tctagctttg caggattcgg gattagaagt aaacatagtg 1800
acagactcac aatatgcatt ggggaatcatt caagcacaac cagataagag tgaatcagag 1860
ttagtcagtc aaataataga gcagttaata aaaaaggaaa aagtctacct ggcatgggta 1920
ccagcacaca aaggaattgg aggaaatgaa caagtagata aattggtcag tgctggaatc 1980
aggaaagtac tattttttaga tggaatagat aaggcccaag aagaacatga gaaatatcac 2040
agtaattgga gagcaatggc tagtgatttt aacctaccac ctgtagtagc aaaagaaata 2100
gtagccagct gtgataaatg tcagctaaaa ggggaagcca tgcattggaca agtagactgt 2160
agcccaggaa tatggcagct agattgtaca catttagaag gaaaagttat cttggtagca 2220
gttcattgtag ccagtggata tatagaagca gaagtaattc cagcagagac agggcaagaa 2280
acagcatact tcctcttaaa attagcagga agatggccag taaaaacagt acatacagac 2340
aatggcagca atttcaccag tactacagtt aaggccgcct gttggtgggc ggggatcaag 2400
caggaatttg gcattcccta caatcccaa agtcaaggag taatagaatc tatgaataaa 2460
gaattaaaga aaattatagg acaggtaaga gatcaggctg aacatcttaa gacagcagta 2520
caaatggcag tattcatcca caatttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtgca 2580
ggggaagaa tagtagacat aatagcaaca gacatacaa ctaaagaatt acaaaaacaa 2640
attacaaaaa ttcaaaattt tcgggtttat tacagggaca gcagagatcc agtttgaaa 2700
ggaccagcaa agctcctctg gaaagggtgaa ggggcagtag taatacaaga taatagtac 2760
ataaaagtag tgccaagaag aaaagcaaag atcatcaggg attatggaaa acagatggca 2820
ggtgagattg tgggcaagta gacaggatta g 2851

```

<210> 37

<211> 2876

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de proteasa de VIH-1 sintética con un codón de inicio en la posición -1 y un codón de parada después de 2544 ácidos nucleicos más

<400> 37

ggatccttta	acatgcctca	gatcactctt	tggcagcgac	ccctcgtcac	aataaagata	60
ggggggcaat	taaaggaagc	tctattagat	acaggagcag	atgatacagt	attagaagaa	120
atgaatttgc	caggaagatg	gaaacccaaa	atgatagggg	gaattggagg	ttttatcaaa	180
gtaagacagt	atgatcagat	actcatagaa	atctgcggac	ataaagctat	aggtacagta	240
ttagtaggac	ctacacctgt	caacataatt	ggaagaaatc	tgttgactca	gattggctgc	300
actttaaatt	ttcccattag	tcctattgag	actgtaccag	taaaattaaa	gccaggaatg	360
gatggcccaa	aagttaaaca	atggccattg	acagaagaaa	aaataaaagc	attagtagaa	420
atttgtacag	aaatggaaaa	ggaaggaaaa	atttcaaaaa	ttgggcctga	aatccatac	480
aatactccag	tatttgccat	aaagaaaaaa	gacagtacta	aatggagaaa	attagtagat	540
ttcagagaac	ttaataagag	aactcaagat	ttctgggaag	ttcaattagg	aataccacat	600
cctgcagggt	taaaacagaa	aaaatcagta	acagtactgg	atgtgggcga	tgcatatttt	660
tcagtccctt	tagataaaga	cttcaggaag	tatactgcat	ttaccatacc	tagtataaac	720
aatgagacac	cagggattag	atatcagtac	aatgtgcttc	cacagggatg	gaaaggatca	780
ccagcaatat	tccagtgtag	catgacaaaa	atcttagagc	cttttagaaa	acaaaatcca	840
gacatagtca	tctatcaata	catggatgat	ttgtatgtag	gatctgactt	agaaataggg	900
cagcatagaa	caaaaataga	ggaactgaga	caacatctgt	tgagggtggg	atttaccaca	960
ccagacaaaa	aacatcagaa	agaacctcca	ttccttttga	tgggttatga	actccatcct	1020
gataaatgga	cagtacagcc	tatagtgtctg	ccagaaaagg	acagctggac	tgtcaatgac	1080
atacagaaat	tagtgggaaa	attgaattgg	gcaagtcaga	tttatgcagg	gattaaagta	1140
aggcaattat	gtaaacttct	taggggaacc	aaagcactaa	cagaagtagt	accactaaca	1200
gaagaagcag	agctagaact	ggcagaaaac	agggagattc	taaaagaacc	ggtacatgga	1260
gtgtattatg	acccatcaaa	agacttaata	gcagaaatac	agaagcagg	gcaaggccaa	1320
tggacatatc	aaatttatca	agagccatct	aaaaatctga	aaacaggaaa	atatgcaaga	1380
atgaagggtg	cccacactaa	tgatgtgaaa	caattaacag	aggcagtaca	aaaaatagcc	1440
acagaaaagca	tagtaatgat	gggaaagact	cctaaattta	aattacccat	acaaaaggaa	1500
acatgggaag	catggtggac	agagtattgg	caagccacct	ggattcctga	gtgggagttt	1560
gtcaataccc	ctcccttagt	gaagtattgg	taccagttag	agaaagaacc	cataatagga	1620
gcagaaaactt	tctatgtaga	tggggcagcc	aatagggaaa	ctaaattagg	aaaagcagga	1680
tatgtaactg	acagaggaag	acaaaaagtt	gtccccctaa	cggacacaac	aatcagaag	1740
actgagttac	aagcaattca	tctagctttg	caggattcgg	gattagaagt	aaacatagtg	1800
acagactcac	aatatgcatt	gggaatcatt	caagcacaac	cagataagag	tgaatcagag	1860
ttagtcagtc	aaataataga	gcagttaata	aaaaaggaaa	aagtctacct	ggcatgggta	1920
ccagcacaca	aaggaattgg	aggaaatgaa	caagtagatg	ggttggtcag	tgctggaatc	1980

aggaaagtac tattttttaga tggaatagat aaggcccaag aagaacatga gaaatatcac 2040
 agtaattgga gagcaatggc tagtgatttt aacctaccac ctgtagtagc aaaagaaata 2100
 gtagccagct gtgataaatg tcagctaaaa ggggaagcca tgcattggaca agtagactgt 2160
 agcccaggaa tatggcagct agattgtaca catttagaag gaaaagttat cttggttagca 2220
 gttcatgtag ccagtggata tatagaagca gaagtaattc cagcagagac agggcaagaa 2280
 acagcatact tcctcttaaa attagcagga agatggccag taaaaacagt acatacagac 2340
 aatggcagca atttcaccag tactacagtt aaggccgcct gttggtgggc ggggatcaag 2400
 caggaatttg gcattcccta caatcccaa agtcaaggag taatagaatc tatgaataaa 2460
 gaattaaaga aaattatagg acaggtaaga gatcaggctg aacatcttaa gacagcagta 2520
 caaatggcag tattcatcca caatttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtgc 2580
 ggggaaagaa tagtagacat aatagcaaca gacatacaa ctaaagaatt acaaaaacaa 2640
 attacaaaaa ttcaaaattt tcgggtttat tacagggaca gcagagatcc agtttgaaa 2700
 ggaccagcaa agctcctctg gaaaggtgaa ggggcagtag taatacaaga taatagtgc 2760
 ataaaagtag tgccaagaag aaaagcaaag atcatcaggg attatggaaa acagatggca 2820
 ggtgatgatt gtgtggcaag tagacaggat gaggattaac actcgagaaa gattag 2876

<210> 38

<211> 33

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido FgagPol sintético

<400> 38

gcggagtcta gaaggagaga gatgggtgcg aga 33

<210> 39

15 <211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia artificial: Oligonucleótido RGagPol sintético

<400> 39

ctaattttc tcgagtgtta atcctcatcc tgtctactg 40

<210> 40

25 <211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador Gal 5' sintético

<400> 40

tgaataacca cttaact 18

35

<210> 41

<211> 60

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador RP-12 3' sintético

<400> 41
cattcctggc ttaatttta ctggtacagt ctcaataggg ctaatttaaa aatttaaagt 60

5 <210> 42
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador F3 5' sintético

<400> 42
tatactttaa cgtcaaggag aaaaaacccc ggatccttta acatgcctca gatc 54

15 <210> 43
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador M13F 3' sintético

<400> 43
gtttcccag tcaccagc 18

25 <210> 44
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia Gal-gp-rh efectora sintética

<400> 44

35 tatactttaa cgtcaaggag aaaaaacccc ggatccatgt acgatgtacg atg 53

<210> 45
<211> 53
40 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia Gal-gp-rh antisentido sintética

45 <400> 45
atatgaaatt gcagttcctc tttttgggg cctaggtaga tgctacatgc tac 53

<210> 46
50 <211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
55 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia de M13-gp-rh efectora sintética

<400> 46
taataggtaa taggtaagag ctccaattcg ccctatagtg agtcgtatta caat 54

60 <210> 47
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Secuencia M13-gp-rh antisentido sintética

<400> 47
attatccatt atccattctc gaggttaagc gggatatcac tcagcataat gtta 54

5 <210> 48
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador F1071-120B sintético

<400> 48
gagggatcca tgtgggtag agacaacaac tcc 33

15 <210> 49
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador 5'-a435 sintético

<400> 49
caggctaatt tttaaggg 19

25 <210> 50
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia artificial: Cebador R-a435 sintético

<400> 50
cccttaaaaa attagcctg 19

35 <210> 51
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador F1071B1 sintético

45 <400> 51
ggatccatga tgacagcatg tcagggagtg ggaggaccg gccataaggc aagagtttg 60

<210> 52
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador GP7 5' sintético

55 <400> 52
atgatgacag catgtgagg ag 22

60 <210> 53
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador R772 3' sintético

<400> 53
cctgaaaatc catayaayac 20

5 <210> 54
<211> 59
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador F-pc-rh 5' sintético

<400> 54
atactttaac gtcaaggaga aaaaaccccg gatccatgtg gggtagagac aacaactcc 59

15 <210> 55
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador R2139S1 sintético

<400> 55
gagctcttaa tccattcctg gctttaatt tactgtgaca gttcaattg gac 53

25 <210> 56
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia sintética para la recombinación homóloga óptima y para la expresión de la proteasa viral

35 <400> 56
ggatccctat tgagactgta ccagtaaaat taaagccagg aatggattaa gagctc 56

40 <210> 57
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Fragmentos de ácido nucleico modificados sintéticos para la recombinación homóloga óptima y para la expresión de la proteasa viral

<400> 57
ggatccatgt ggggtagaga caacaactcc ctcgagtcct attgagactg taccagtaaa 60
attaaagcca ggaatggatt aagagctc 88

50 <210> 58
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador F-pc-rh 5' sintético

<400> 58
tatactttaa cgtcaaggag aaaaaacccc ggatccatgt ggggtagaga caacaactcc 60

60

REIVINDICACIONES

1. Un método de determinar la sensibilidad o la resistencia de los productos aislados de retrovirus VIH-1 a una molécula que comprende:

a) amplificar secuencias que codifican una proteasa de un retrovirus VIH-1 que se va a estudiar precedidas de los aminoácidos 6 del sitio de escisión y seguidas de al menos un aminoácido de otro sitio de escisión, en donde dichos sitios de escisión corresponden a los enlaces peptídicos específicos que enmarcan las secuencias primarias de la proteasa del VIH-1 en el precursor Gag-Pol que se hidroliza para la liberación de dicha proteasa,

b) recombinar fragmentos de ADN, un producto final de la amplificación, y un vector de expresión que permite la expresión de la secuencia que codifica la proteasa del retrovirus VIH-1 que se va a estudiar precedida por los 6 aminoácidos del sitio de escisión y seguida de al menos un aminoácido de otro sitio de escisión bajo control de un promotor inducible conocido por medio de la co-transformación del vector y los fragmentos de ADN con al menos una célula de levadura,

c) cultivar la célula o células de levadura co-transformada para obtener un número suficiente de transformantes para llevar a cabo un ensayo de sensibilidad o resistencia, y recuperar los transformantes procedentes de la célula co-transformada, en cualquier medio adecuado,

d) incubar los transformantes en presencia de una molécula que se va a someter a ensayo,

e) analizar cualitativamente o cuantitativamente las células vivas, y

f) deducir el fenotipo de sensibilidad o resistencia.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método permite que las moléculas de ensayo tengan un efecto directo sobre la actividad de la proteasa hacia su sustrato natural que es el precursor de la proteasa de VIH-1.

3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde se elaboró una secuencia del precursor de VIH-1 mutada que contiene un nucleótido A adicional en la posición 1638 para imitar el Desplazamiento del Marco de Lectura Abierto natural de la transcripción del Gen Gag-Pol.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende antes de la etapa a), extraer ácidos nucleicos de i) células infectadas por un retrovirus VIH-1 y/o ii) fluidos corporales de animales infectados, y/o iii) sangre de animales infectados, y/o iv) medios de cultivo de células infectadas.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el ácido nucleico es ADN y/o ARN.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde los ácidos nucleicos se extraen de células tomadas de un individuo o de un animal infectados por un retrovirus VIH-1 y/o ii) fluidos corporales de animales infectados, y/o iii) sangre de animales infectados, y/o iv) medios de cultivo de células infectadas.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las moléculas son al menos una seleccionada del grupo que consiste en moléculas de una genoteca, moléculas químicas, moléculas naturales y moléculas extraídas de plantas.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las moléculas son al menos una seleccionada del grupo que consiste de moléculas químicas que tienen una actividad inhibidora de la proteasa viral, tratamientos terapéuticos basados en inhibidores de la proteasa viral.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la incubación se lleva a cabo con una concentración creciente de moléculas.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico se amplifica con un par de cebadores seleccionados del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42, 48, 51 a 58.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico es uno cualquiera de los SEC ID NO: 9 a SEC ID NO: 37.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vector de expresión es el plásmido pRS316-Gal 1/10.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el vector de expresión es el plásmido pRS316-Gal1/10 que comprende el promotor inducible Gal1/10 en la posición 5' de un sitio de clonación de un gen que se va a expresar, y en donde un fragmento BamH1-Sac1 es remplazado por otro fragmento de ADN que consiste en (de 5' a 3'):

el sitio de restricción BamH1, único en el vector, seguido de aproximadamente 20 nucleótidos en una secuencia de retrovirus situada inmediatamente aguas arriba de la proteasa, seguido de un sitio de restricción, único en el vector, seguido de 0-2511 nucleótidos de la secuencia de retrovirus situado aguas abajo de la proteasa, seguido del sitio de restricción Sac1, único en el vector.

5 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde los aproximadamente 20 nucleótidos de la secuencia de retrovirus VIH-1 están situados aguas arriba de la proteasa, seguido de un sitio de restricción XhoI.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo de las células de levadura co-transformadas es deficiente en glucosa.

10 17. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la incubación del transformante se realiza en galactosa.

18. Un kit de diagnóstico que realiza el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende:

15 cebadores de nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en los SEQ ID NO: 38, 39, 40, 41, 42, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 y 58;

al menos un vector de expresión;

al menos una cepa de levadura; y

al menos una placa de múltiples pocillos u otro soporte.

20 19. El kit de diagnóstico según la reivindicación 18, en donde el vector de expresión es el plásmido pRS316-Gal1/10.

20. El kit de diagnóstico según la reivindicación 18, en donde la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

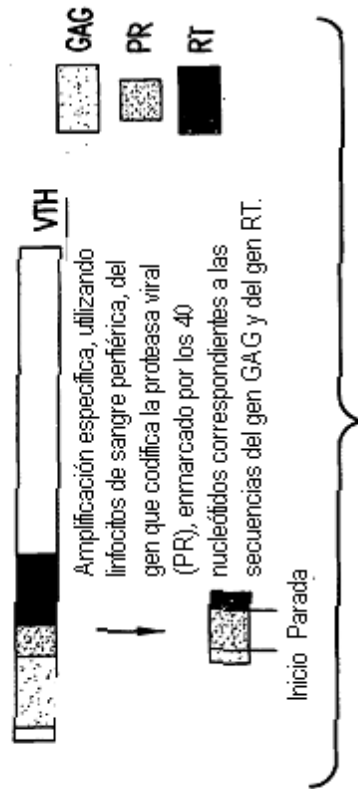


FIG.1

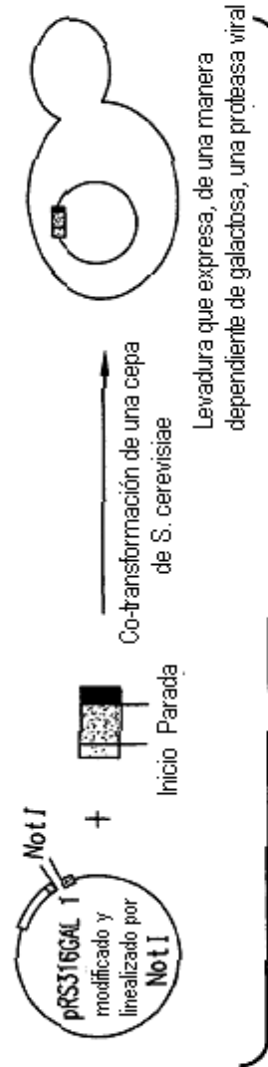


FIG.2

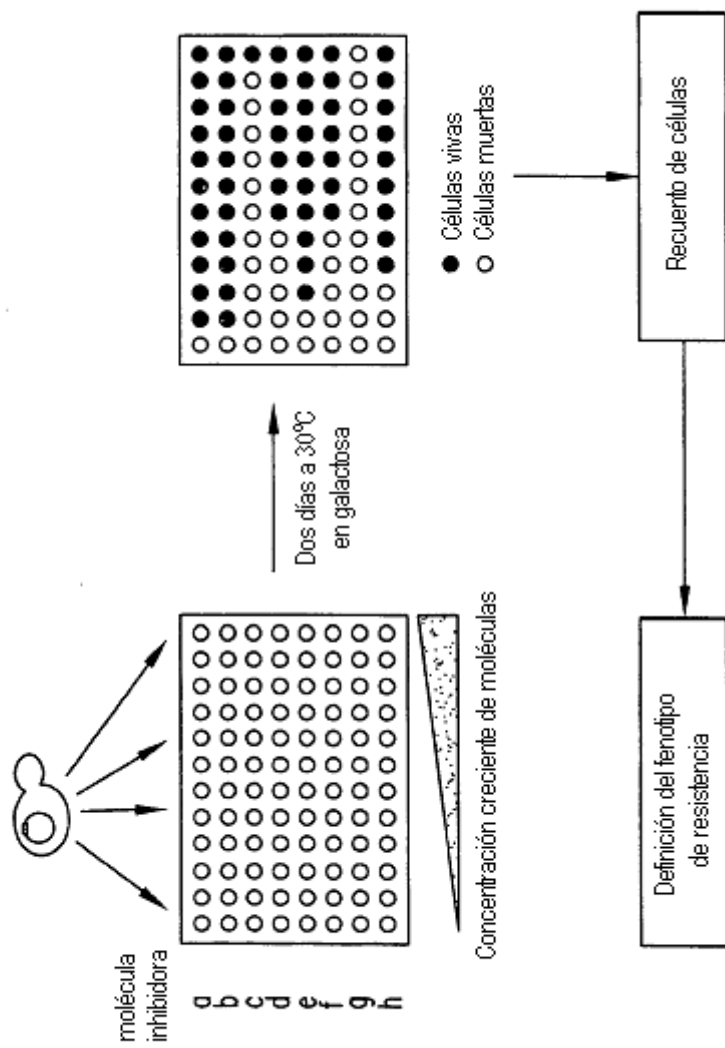


FIG.3

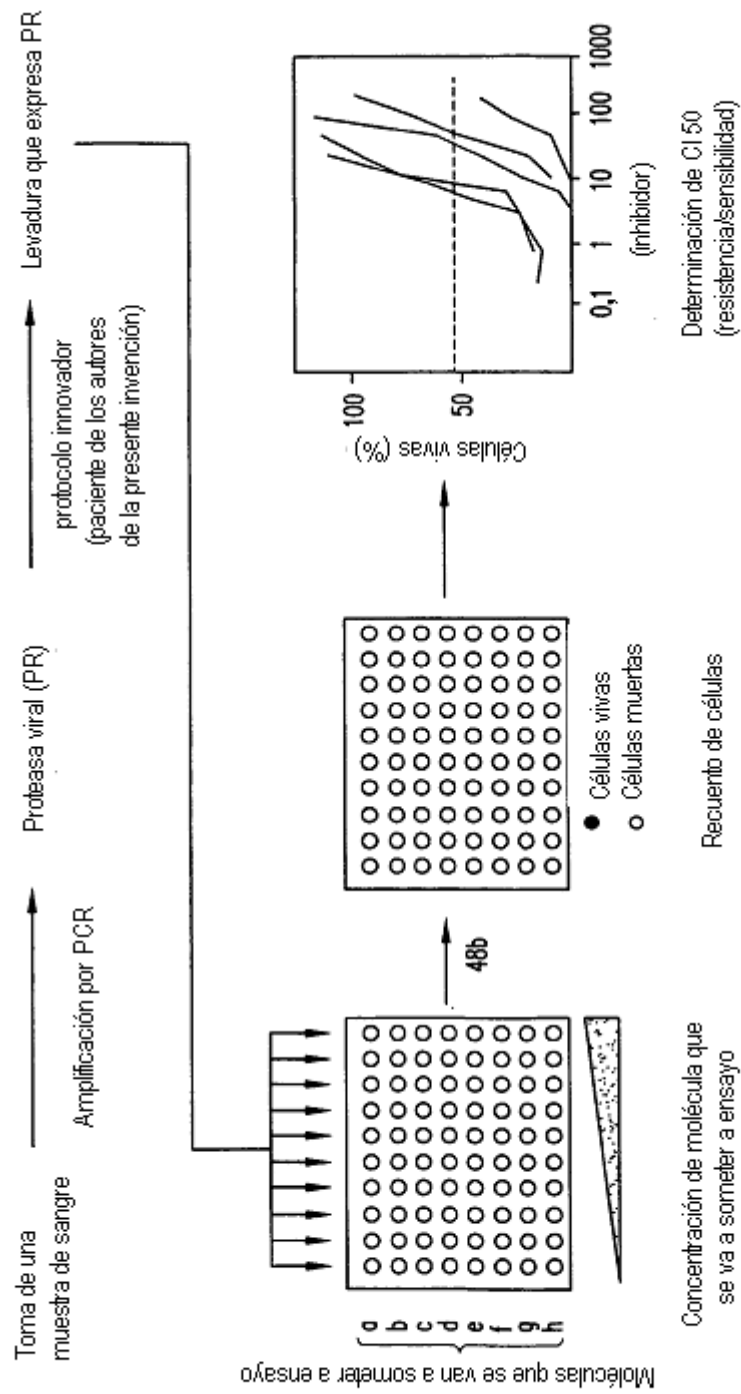


FIG.4

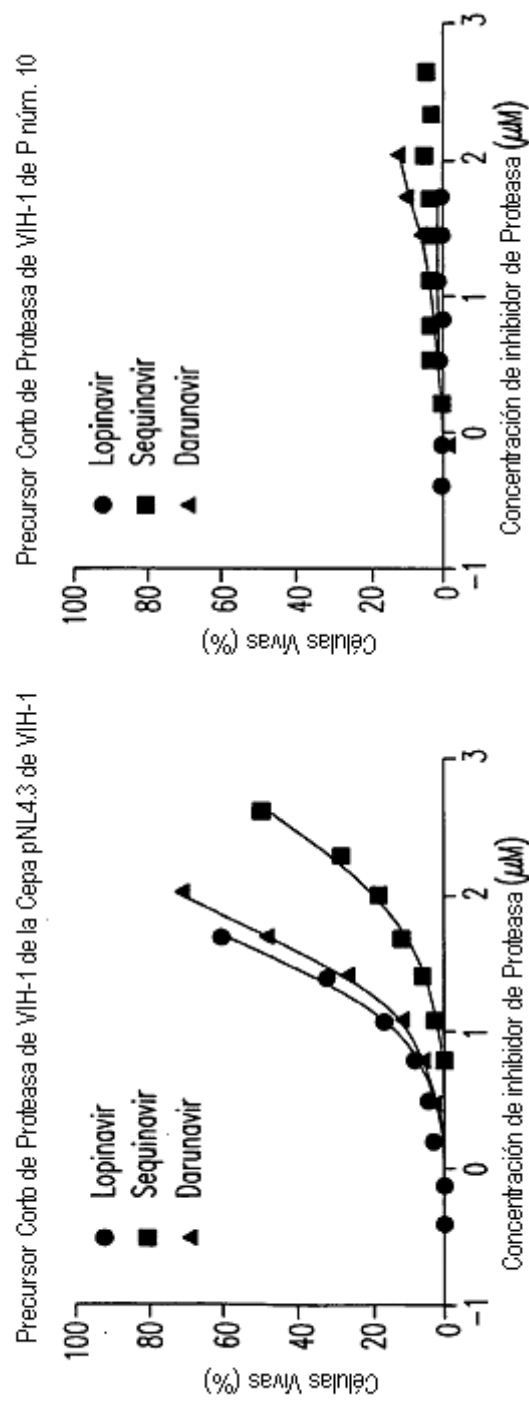


FIG.5a

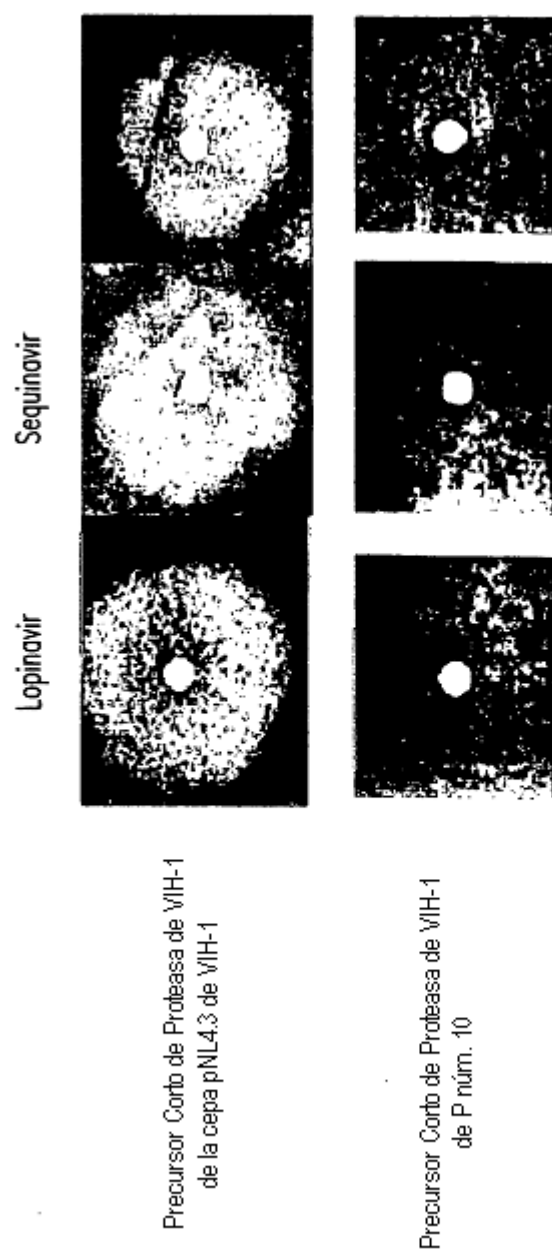


FIG. 5b