

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 271**

51 Int. Cl.:

C12N 15/49 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.1998 E 08172729 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2055780**

54 Título: **Constructos de antígenos útiles en la detección y la diferenciación de anticuerpos contra el VIH**

30 Prioridad:

15.08.1997 US 911824

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

06.03.2014

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
DEPT. 377, BLDG AP6A-1 100 ABBOTT PARK
ROAD
ABBOTT PARK, IL 60064-6008, US**

72 Inventor/es:

**HACKETT, JOHN R., JR.;
YAMAGUCHI, JULIE;
GOLDEN, ALAN M.;
BRENNAN, CATHERINE A. y
HICKMAN, ROBERT K.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 446 271 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

Constructos de antígenos útiles en la detección y la diferenciación de anticuerpos contra el VIH

5 **Antecedentes de la invención**

Esta invención se refiere de forma general a inmunoensayos para la detección y la diferenciación de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) del Grupo M, contra el VIH-1 del Grupo O y contra el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2 (VIH-2). Más particularmente, la invención se refiere a nuevos constructos de antígeno útiles como reactivos en dichos ensayos, así como a polinucleótidos, clones de ADN, vectores de expresión, células hospedadoras transformadas y similares que son útiles en la preparación de dichos antígenos.

La detección de una infección por VIH en un paciente y la caracterización del tipo vírico se llevan a cabo típicamente mediante el uso de inmunoensayos que se basan en la alta interacción específica entre los antígenos usados como reactivos y los anticuerpos circulantes en el suero del paciente. La inmunorreactividad de los anticuerpos del paciente con algunos antígenos, y en menor grado o ninguno con otros, permite la identificación del tipo y del subtipo del VIH que está presente.

Actualmente existen dos grupos filogenéticos principales del VIH-1 denominados como Grupos "M" y "O." G. Meyers y col., *Human Retroviruses and AIDS 1995*, Los Álamos National Laboratory, Los Álamos, NM (1995). Las cepas clínicas del VIH-1 del Grupo M se han dividido adicionalmente en subgrupos (A hasta J) que están aproximadamente equidistantes filogenéticamente entre sí. Las cepas clínicas del Grupo M predominan en todo el mundo. Los informes más recientes sobre la secuencia del VIH-1 del Grupo O indican que estos virus estaban tan estrechamente relacionados con un virus de chimpancé como con otros subgrupos del VIH-1. Véase, por ejemplo, L. G. Gürtler y col., *J. Virology* 68: 1581 - 1585 (1994); M. Vanden Haesevelde y col., *J. Virology* 68: 1586 - 1596 (1994); De Leys y col., *J. Virology* 64: 1207 - 1216 (1990); DeLeys y col., Patente de EE.UU. Nº 5.304.466; L. G. Gürtler y col., Publicación de Patente Europea N 591914 A2. Las secuencias del Grupo O son las más divergentes de las secuencias del VIH-1 descritas hasta la fecha. Aunque las cepas del VIH-1 del Grupo O son endémicas del África central occidental (Camerún, Guinea Ecuatorial, Nigeria y Gabón), ahora se han identificado pacientes infectados con cepas clínicas del Grupo O en Bélgica, Francia, Alemania, España y Estados Unidos. Véase, por ejemplo, R. DeLeys y col., *supra*; P. Charneau y col., *Virology* 205: 247 - 253 (1994); I. Loussert-Ajaka y col., *J. Virology* 69: 5640 - 5649 (1995); H. Hampl y col., *Infection* 23: 369 - 370 (1995); A. Mas y col., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12: 1647 - 1649 (1996); M. Peters y col., *AIDS* 11: 493 - 498 (1997); y M. A. Rayfield y col., *Emerging Infectious Diseases* 2: 209 - 212 (1996).

La serología del VIH-1 del Grupo M se caracteriza en su mayor parte por las secuencias de aminoácidos de las proteínas víricas expresadas (antígenos), particularmente aquellas que comprenden las regiones del núcleo y de la cubierta (env). Como entre diversas cepas de este virus de rápida mutación, estos antígenos son estructural y funcionalmente similares, pero tienen secuencias de aminoácidos divergentes que desencadenan anticuerpos que son similares pero no idénticos en su especificidad por un antígeno en particular.

Uno de los objetivos serológicos clave para la detección de una infección por VIH-1 es la proteína transmembranal de 41.000 MW (TMP), la glucoproteína 41 (gp41). La gp41 es una proteína altamente inmunógena que desencadena una respuesta de anticuerpos fuerte y sostenida en individuos considerados seropositivos para el VIH. Los anticuerpos contra esta proteína son de los primeros en aparecer en la seroconversión. La respuesta inmunitaria contra la gp41 permanece aparentemente relativamente fuerte en el transcurso de la enfermedad, según evidencia la prácticamente universal presencia de anticuerpos anti-gp41 en pacientes asintomáticos, así como en aquellos que muestran las etapas clínicas del SIDA. Una proporción significativa de la respuesta de los anticuerpos frente a la gp41 está dirigida hacia una región inmunodominante bien caracterizada (IDR) de la gp41.

Las infecciones por el VIH de tipo 2 (VIH-2), un virus encontrado inicialmente en individuos procedentes de África, se han identificado ahora en seres humanos fuera del área endémica inicial del África occidental y se ha informado en personas europeas que han vivido en África occidental o que han tenido relaciones sexuales con individuos procedentes de esta región. Véase, por ejemplo, A. G. Saimot y col. *Lancet* i: 688 (1987); M. A. Rey y col. *Lancet* i: 388 - 389 (1987); A. Werner y col. *Lancet* i: 868 - 869 (1987); G. Brucker y col. *Lancet* i: 223 (1987); K. Marquart y col., *AIDS* 2: 141 (1988); CDC, *MMWR* 37: 33 - 35 (1987); Anónimo, *Nature* 332: 295 (1988). En todo el mundo se han documentado casos de SIDA debidos al VIH-2. Los estudios serológicos indican que mientras que los VIH-1 y los VIH-2 comparten múltiples epítomos comunes en sus antígenos del núcleo, las glucoproteínas de la cubierta de estos dos virus tienen una reactividad cruzada mucho menor. F. Clavel, *AIDS* 1: 135 - 140 (1987). Se cree que esta reactividad cruzada limitada de los antígenos de la cubierta explica por qué los ensayos serológicos disponibles actualmente para el VIH-1 pueden fracasar al reaccionar con ciertos sueros de individuos con anticuerpos contra el VIH-2. F. Denis y col., *J. Clin. Micro.* 26: 1000 - 1004 (1988). La recientemente concedida Patente de EE.UU. Nº 5.055.391 cartografía el genoma del VIH-2 y proporciona ensayos para detectar el virus.

Estas cepas víricas son, en su mayor parte, fácilmente identificadas y caracterizadas mediante el uso de pruebas diagnósticas disponibles comercialmente. Sin embargo, han surgido preocupaciones relativas a la capacidad de los inmunoensayos disponibles actualmente, diseñados para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 (Grupo M) y/o contra el VIH-2, de detectar la presencia de anticuerpos contra el VIH-1 del Grupo O. I. Lousseret-Ajaka y col. Lancet 343: 1393 - 1394 (1994); C. A. Schable y col. Lancet 344: 1333 - 1334 (1994); L. Gürtler y col., J. Virol. Methods 51: 177 - 184 (1995). Aunque hasta la fecha se han encontrado pocos pacientes fuera del África central occidental infectados con cepas clínicas del VIH-1 del Grupo O, las autoridades sanitarias temen la aparición de este subtipo también en otras áreas geográficas.

10 Consecuentemente, existe una continua necesidad de nuevos antígenos, adecuados para su uso en inmunoensayos, que solos o conjuntamente con otros antígenos permitan el reconocimiento de todas las cepas clínicas y/o de las infecciones por VIH-1 (del Grupo M y del Grupo O) y por VIH-2. (Véase el documento WO 95/23973).

15 Resumen de la invención

Ahora se ha averiguado que ciertos polipéptidos o sus combinaciones son particularmente útiles en la detección de infecciones por el VIH-1 del Grupo O y por otros VIH. Consecuentemente, en un primer aspecto de la presente invención se desvela un polipéptido de la *env* de una cepa clínica del VIH-1 del Grupo O con una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61), que representa la región completa de la *env* del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112. De forma análoga se desvela un polipéptido de la *env* de una cepa clínica del VIH-1 del Grupo O que comprende una porción inmunorreactiva del anterior polipéptido completo, así como los polinucleótidos que codifican para dichos polipéptidos.

25 En un segundo aspecto de la presente invención, se desvela un constructo de antígeno que comprende un primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O fusionado con un segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O. Preferiblemente, el primer polipéptido de dicho constructo de antígeno es un polipéptido de la gp120 y el segundo polipéptido es un polipéptido de la gp41, opcionalmente con una porción de la región hidrófoba del polipéptido de la gp41 delecionada para facilitar la expresión cuando se expresa como un producto recombinante. También son preferidos entre los anteriores constructos de antígeno aquellos en los que al menos uno del primer y el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O deriva del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112, tales como aquellos en los que el primer polipéptido comprende una porción inmunorreactiva de la proteína gp120 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM 112.

35 En los anteriores constructos de la *env* del Grupo O, el primer polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los residuos 1 hasta 520 de la secuencia mostrada en la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61), o como alternativa, una porción inmunorreactiva de los mismos. Un primer polipéptido acortado y preferido es aquel con una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 476 hasta 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61). Junto con cualquiera de los anteriores polipéptidos, el segundo polipéptido usado en los constructos de la invención puede ser una porción inmunorreactiva de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM1 12, en la cual hay opcionalmente ausente una porción de la región hidrófoba de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112. En particular, la porción delecionada puede ser aquella parte de la gp41 que tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 690 hasta 715 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61).

45 El anterior segundo polipéptido tendrá preferiblemente una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 521 hasta 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una porción de la misma. Más preferiblemente, el segundo polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52); aún más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos puede consistir esencialmente en los residuos 47 hasta 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48); y incluso más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos puede consistir esencialmente en los residuos 47 hasta 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58). Algunos constructos representativos de la *env* del Grupo O de la invención son los constructos pGO-8PL, pGO-8CKS, pGO-9PL, pGO-9CKS, pGO-11PL y pGO-11CKS, así como cualquier derivado, variante y análogo de los mismos.

55 En un aspecto más de la presente invención, se desvela un constructo de antígeno que comprende una fusión de al menos un polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O con al menos un polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M, y más preferiblemente un constructo de antígeno que comprende una fusión de:

- 60
- (a) un primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O;
 - (b) un segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O;
 - (c) un primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M; y
 - (d) un segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M.

Los polipéptidos del VIH-1 del Grupo M de los constructos anteriores pueden derivar de una cepa clínica del VIH-1 del Subtipo B y preferiblemente al menos uno deriva del VIH-1 del Grupo M de la cepa clínica HXB2R. En cualquiera de estos constructos de la *env* de Grupo O/Grupo M, al menos una de las secuencias del VIH-1 del Grupo O puede derivar del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112.

Más particularmente, el primer polipéptido de la *env* del Grupo O y el primer polipéptido de la *env* del Grupo M pueden ser ambos polipéptidos de la gp120, mientras que el segundo polipéptido de la *env* del Grupo O y el segundo polipéptido de la *env* del Grupo M pueden ser ambos polipéptidos de la gp41. Para mejorar la expresión, una porción de la región hidrófoba de al menos uno de los polipéptidos de la gp41 puede estar delecionada. Los constructos de antígeno incluidos entre los anteriores son aquellos en los que:

- (a) el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O comprende una porción inmunorreactiva de la proteína gp120 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112;
- (b) el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O comprende una porción de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112
- (c) el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M comprende una porción inmunorreactiva de la proteína gp120 de una primera cepa clínica del VIH-1 del Grupo M del Subtipo B; y
- (d) el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M comprende una porción inmunorreactiva de la proteína gp41 de una segunda cepa clínica del VIH-1 del Grupo M del Subtipo B.

De entre estos constructos son preferidos aquellos en los que la primera y la segunda cepa clínica del VIH-1 del Grupo M del Subtipo B son la misma, y son la cepa clínica HXB2R del VIH-1 del Grupo M, así, aquellas en las que una porción de la región hidrófoba de la proteína gp41 de la cepa clínica HXB2R del VIH-1 del Grupo M está ausente del segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M.

Los constructos preferidos de la *env* del Grupo O/Grupo M incluyen aquellos en los que (a) el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 251 hasta 292 de la secuencia de la Figura 12 (ID. SEC. N°: 108) y (b) el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 293 hasta 599 de la secuencia de la Figura 12 (ID. SEC. N°: 108) o una porción de la misma. Son especialmente preferidos aquellos en los que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 293 hasta 492 de la secuencia de la Figura 12 (ID. SEC. N°: 108).

También son preferidos los anteriores constructos de la *env* del Grupo O/Grupo M en los que el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 1 hasta 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una porción de la misma, y especialmente aquellos que comprenden un primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O que tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 476 hasta 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61). El segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O puede ser aquel con una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 521 hasta 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una porción de la misma, en la que una porción de la región hidrófoba de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112 puede estar opcionalmente ausente. Los constructos preferidos son aquellos en los que dichos segundos polipéptidos de la *env* del VIH-1 del Grupo O tienen una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52); son más preferidos aquellos en los que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48); y son incluso más preferidos aquellos en los que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58). Algunos constructos representativos de la *env* del Grupo O/Grupo M de la invención son los constructos pGO-12CKS, pGO-13CKS y pGO-14PL y derivados, variantes y análogos de los mismos.

En otro aspecto más de la presente invención, se desvela un constructo de antígeno que comprende una fusión de un primer polipéptido de la *env* del VIH-1, un segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 y al menos un polipéptido adicional del VIH-1 y especialmente uno en el que cada uno de dichos polipéptidos de la *env* del VIH-1 son polipéptidos del VIH-1 del Grupo O. El primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O de este constructo puede ser un polipéptido de la gp120 y el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O un polipéptido de la gp41. Más particularmente, el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O de este constructo puede comprender una porción inmunorreactiva de la proteína gp120 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112, mientras que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O puede comprender una porción inmunorreactiva de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112.

De entre estos constructos se prefieren aquellos en los que el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 1 hasta 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61), o una porción de la misma; son más preferidos aquellos en los que el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 476 hasta 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61). Con respecto al segundo polipéptido de la *env* del VIH-1

del Grupo O, que puede tener una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 521 hasta 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una porción de la misma, y de la que una porción de la región hidrófoba de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112 puede estar opcionalmente ausente, se prefieren aquellos constructos en los que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una

5 secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52). Son incluso más preferidos aquellos con un segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O con una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48) y especialmente aquellos en los que la secuencia de aminoácidos consiste esencialmente en los residuos 47 hasta 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58).

10 El polipéptido adicional del VIH-1 de cualquiera de estos constructos puede ser un polipéptido de la *env* del Grupo O; sin embargo, se pretende que, como alternativa, sea un polipéptido inmunógeno de cualquiera de los grupos del VIH-1 M u O, o del VIH-2, incluyendo *env*, *gag*, *pol*, transcriptasa inversa y reguladora y otros componentes víricos. En cualquier caso se prefieren aquellos constructos a los que el polipéptido adicional del VIH-1 del Grupo O comprende una porción inmunorreactiva de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112.

15 También se prefieren aquellos en los que el polipéptido adicional del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 521 hasta 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una porción de la misma, en la que la región hidrófoba de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112 puede estar opcionalmente ausente. Son incluso más preferidos los constructos en los que el polipéptido adicional de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52); son particularmente preferidos aquellos en los que el polipéptido adicional de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48) y especialmente aquellos en los que el polipéptido adicional de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente

20 esencialmente en los residuos 47 hasta 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58). Los más preferidos son los constructos que tienen como polipéptido adicional de la *env* del VIH-1 del Grupo O la denominada región inmunodominante (IDR) del VIH-1 del Grupo O, que tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 250 hasta 281 de la Figura 17 (ID. SEC. N°: 120). Algunos constructos representativos de los anteriores son pGO-15CKS y pGO-15PL, así como cualquier derivado, variante y análogo de los mismos.

30 En otro aspecto más de la presente invención se desvela un constructo de antígeno que comprende un primer polipéptido de la *env* del VIH-2 fusionado con un segundo polipéptido de la *env* del VIH-2, y especialmente aquel en el que el primer polipéptido de la *env* del VIH-2 es un polipéptido de la gp120 y el segundo polipéptido de la *env* del VIH-2 es un polipéptido de la gp36. De entre dichos constructos se prefieren aquellos en los que:

- 35
- (a) el primer polipéptido de la *env* del VIH-2 tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 248 hasta 307 de la secuencia de la Figura 11 (ID. SEC. N°: 55) o una porción de la misma; y
 - (b) el segundo polipéptido de la *env* del VIH-2 tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 308 hasta 466 de la secuencia de la Figura 11 (ID. SEC. N°: 55) o una porción de la misma.
- 40

Un constructo representativo del VIH-2 de la invención es pVIH-210 (ID. SEC. N°: 55), así como cualquier derivado, variante y análogo del mismo.

45 Un aspecto adicional de la presente invención comprende polinucleótidos que codifican para cualquiera de los anteriores constructos de antígeno, polinucleótidos que pueden estar unidos operativamente a una secuencia de control capaz de dirigir la expresión en un hospedador adecuado y/o tener una secuencia codificante que haya sido modificada para proporcionar un sesgo de codón apropiado para el hospedador de expresión. Otros aspectos de la presente invención incluyen vectores de expresión que comprenden dichos polinucleótidos y células hospedadoras transformadas por ellos, particularmente cuando el hospedador es *Escherichia coli*.

50 En un aspecto más de la presente invención, se desvela un procedimiento para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 en una muestra de prueba que comprende las etapas de:

- 55
- (a) combinar al menos un constructo de antígeno de acuerdo con la invención con la muestra de prueba para formar una mezcla;
 - (b) incubar la mezcla en unas condiciones adecuadas para la formación de complejos entre el antígeno de los anticuerpos, si los hubiera, que estén presentes en la muestra y sean inmunológicamente reactivos con el antígeno; y
 - (c) detectar la presencia de cualquier complejo formado.
- 60

En una forma de realización del procedimiento, la detección de la procedencia de los complejos de la etapa (c) se realiza mediante el uso de un constructo de antígeno adicional de la invención al que se ha unido un compuesto generador de señal. En otra forma de realización, la detección se realiza mediante el uso de un constructo de antígeno de la invención adicional al que se ha unido un primer miembro de un par de unión específico y mediante el

65 uso de adicionalmente un reactivo indicador que comprende un segundo miembro del par de unión específico que

está unido al compuesto generador de señal. Una forma de realización adicional estipula que la detección de la presencia de los complejos de la etapa (c) se realiza mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra los complejos formados en la etapa (b), anticuerpo al que está unido un compuesto generador de señal. Otra forma de realización más estipula que la detección de la presencia de los complejos de la etapa (c) se realiza mediante el uso de un anticuerpo dirigido a los complejos formados en la etapa (b) y al que está unido un primer miembro de un par de unión específico; dicha detección adicional requiere el uso de un agente indicador que comprende un segundo miembro del par de unión específico al que está unido un compuesto generador de señal.

En un aspecto final de la presente invención se desvelan kits de inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra el VIH-1, kits que comprenden un constructo de antígeno de la invención. Dicho constructo puede usarse como un reactivo de captura o como un reactivo indicador. Alternativamente, el constructo de antígeno puede unirse a un primer miembro de un par de unión específico, comprendiendo adicionalmente el kit un reactivo indicador comprende un segundo miembro del par de unión específico unido a un compuesto generador de señal.

15 Breve descripción de los dibujos

En la descripción detallada de la presente invención que sigue se hace referencia a los dibujos anexos, en los que:

La FIGURA 1 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína de la env del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112 (ID. SEC. N°: 61).

La FIGURA 2 representa la estrategia usada para generar constructos génicos sintéticos de la env de las gp120 / gp41 del VIH-1 del Grupo O, en los que el inserto pGO-8 = Osyn-5' hasta Osyn-P3'; el inserto pGO-9 = Osyn-5' hasta Osyn-03'; el inserto pGO-11 = Osyn-5' hasta Osyn-M; y en los que H = la región hidrófoba del VIH-1 del Grupo O, deletados según se muestra.

Las FIGURAS 3A hasta 3D muestra una representación del diagrama de las etapas implicadas en la construcción de pGO-9PL/DH5α y de pGO-9CKS/XL1.

Las FIGURAS 4A hasta 4G muestra una representación del diagrama de las etapas implicadas en la construcción de pGO-11PL/DH5α y de pGO-11 CKS/XL1.

La FIGURA 5 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-8PL (ID. SEC. N°: 58).

La FIGURA 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-8CKS (ID. SEC. N°: 60).

La FIGURA 7 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-9PL (ID. SEC. N°: 48).

La FIGURA 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-9CKS (ID. SEC. N°: 50).

La FIGURA 9 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-11PL (ID. SEC. N°: 52).

La FIGURA 10 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-11CKS (ID. SEC. N°: 54).

La FIGURA 11 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pVIH-210 (ID. SEC. N°: 55).

La FIGURA 12 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGM-1CKS (ID. de SECUENCIA N°: 108).

La FIGURA 13 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-12CKS (ID. SEC. N°: 91), incluyendo una indicación de los residuos correspondientes al CKS / policonector, a la env de gp120 / gp41 de la cepa clínica del VIH-1 del Grupo M HXB2R y a la env de gp120 / gp41 de la cepa clínica VIH-1 del Grupo O HAM112.

La FIGURA 14 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-13CKS (ID. SEC. N°: 93), incluyendo una indicación de los residuos correspondientes al CKS / policonector, a la env de gp120 / gp41 de la cepa clínica del VIH-1 del Grupo M HXB2R y a la env de gp120 / gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112.

La FIGURA 15 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-14PL (ID. SEC. N°: 95), incluyendo una indicación de los residuos correspondientes a la env de gp120 / gp41 del VIH-1 del Grupo M de la cepa clínica HXB2R y a la env de gp120 / gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112.

La FIGURA 16 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-15CKS (ID. SEC. N°: 97), incluyendo una indicación de los residuos correspondientes al CKS / policonector, a la env de gp120 / gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112, un conector de cuatro aminoácidos y la segunda copia de la IDR de la gp41 de la cepa clínica del HAM112.

La FIGURA 17 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-15PL (ID. SEC. N°: 120), incluyendo una indicación de los residuos correspondientes a la env de gp120 / gp41 del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112, un conector de cuatro aminoácidos y la segunda copia de la IDR de la gp41 de la cepa clínica del HAM112.

Las FIGURAS 18 - 23 muestra los resultados obtenidos en inmunoensayos con microesferas recubiertas (descritos en el Ejemplo 14, a continuación) que ensayan la reactividad del antígeno pTB319 del Grupo M y de los antígenos recombinantes del Grupo O pGO-9CKS, pGO-11PL, pGO-12CKS, pGO-14PL y pGO-15CKS, respectivamente, con un conjunto de sueros que comprenden VIHPL-31 (Grupo positivo en M) y con los números de suero 14283, 189404, 193Ha, 14791, 267Ha y ESP-1 (todos positivos en el Grupo O).

Descripción detallada de la invención

5 En una forma de realización de un polipéptido aislado de la presente invención, la secuencia de aminoácidos de la proteína de la *env* del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112 se muestra en la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61). En el presente contexto, "aislado" pretende indicar que dichos polipéptidos están relativamente purificados con respecto a otros componentes víricos o celulares que estarían normalmente presentes *in situ*, hasta, e incluyendo, una preparación sustancialmente pura de la proteína. Dichos polipéptidos pueden utilizarse como reactivos de ensayo, en la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales, en la elaboración de vacunas, o de otra forma.

10 También se espera que sean útiles las porciones o los fragmentos inmunorreactivos de los anteriores polipéptidos. Por "inmunorreactivas" se entienden las porciones de una longitud tal que son capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria en un hospedador y/o de reaccionar con anticuerpos dirigidos específicamente contra las mismas; preferiblemente, dichos polipéptidos parciales tendrán cinco o más aminoácidos de longitud. Debería apreciarse que el término "porción", según se usa en el presente documento, se refiere tanto a secuencias truncadas terminalmente como aquellas acortadas por la eliminación de una secuencia interviniente.

20 Los anteriores polipéptidos y porciones se producirán mejor mediante la expresión de los polinucleótidos que codifican para los mismos. Esto permite también un grado de variabilidad en su secuencia, como por ejemplo debida a la degeneración del código genético, al sesgo de codón en favor de la célula hospedadora que expresa el polipéptido y a sustituciones conservativas de aminoácidos en la proteína resultante. Además, se anticipa que se producirán algunas variaciones en la secuencia entre -- y posiblemente incluso dentro de -- una cepa clínica dada del VIH-1 o de cualquier otra unidad filogenética. Consecuentemente, los polipéptidos y los constructos de la invención incluyen no sólo aquellos que son idénticos en su secuencia a la secuencia anterior, sino también aquellos que tienen una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en esa secuencia de referencia, en la que se entiende que el término "consiste esencialmente" engloba variantes de polipéptidos cuyas características estructurales y funcionales permanecen sustancialmente igual. Preferiblemente, dichas variantes (o "análogos") tendrán una homología de secuencia ("identidad") del 80 % o más con respecto a la secuencia de referencia de la Figura 1. En este sentido, las técnicas para la determinación de la "similitud" en la secuencia de aminoácidos son bien conocidas en la técnica. En general, "similitud" significa la comparación exacta de aminoácido a aminoácido de dos o más polipéptidos en el lugar apropiado, en la que los aminoácidos son idénticos o poseen unas propiedades químicas y/o físicas similares tales como la carga o la hidrofobicidad. Puede determinarse el denominado "porcentaje de similitud" entre las secuencias de polipéptidos. Las técnicas para la determinación de la identidad entre secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos también son bien conocidas en la técnica e incluyen la determinación de la secuencia de nucleótidos del ARNm para ese gen (habitualmente a través de un intermedio de ADNc) y la determinación de la secuencia de aminoácidos codificada por el mismo, y la comparación de ésta con una segunda secuencia de aminoácidos. En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a aminoácido entre dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos, respectivamente. Pueden compararse dos o más secuencias de polinucleótidos mediante la determinación de su "porcentaje de identidad", al igual que dos o más secuencias de aminoácidos. Los programas disponibles en el Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI), por ejemplo, el programa GAP, son capaces de calcular tanto la identidad entre dos polinucleótidos como la identidad y la similitud entre dos secuencias de polipéptidos, respectivamente. Otros programas para el cálculo de la identidad o de la similitud entre secuencias son conocidos en la técnica.

45 Según otra forma de realización de la invención, se proporcionan constructos de antígeno que son adecuados para su uso en la detección de anticuerpos anti-VIH-1. Según se describe con mayor detalle a continuación, dichos constructos pueden prepararse mediante medios recombinantes, como péptidos sintéticos, o de otra forma; además, pueden estar glucosilados o no glucosilados dependiendo de la forma y/o de la célula hospedadora por la que son elaborados. Consecuentemente, aunque se designan como si comprendieran glucoproteínas (por ejemplo, "un polipéptido de la gp120"), los constructos de antígeno de la invención pretenden incluir aquellos que son expresados en hospedadores bacterianos tales como *E. coli* y que por lo tanto no están glucosilados.

55 Debería mencionarse que los constructos anteriores son fusiones de varias secuencias, es decir, los constructos se forman mediante la unión de varias secuencias que contienen epítopos, como por ejemplo, mediante la co-expresión, la ligación o la síntesis secuencial. También unidos a ellos, y opcionalmente incluidos en los constructos de la invención, hay otras secuencias de polipéptidos tales como policonectores de expresión (CKS) y otras secuencias conectoras. El orden de las diversas secuencias de polipéptidos no es crítico; consecuentemente, los polipéptidos y sus epítopos pueden reorganizarse a conveniencia. También son posibles modificaciones adicionales, como por ejemplo, mediante mutación aleatoria o mutagénesis dirigida, o incluso la delección (eliminación u omisión) de ciertas regiones tales como la región hidrófoba de la gp41, cuya ausencia se ha averiguado que mejora la expresión del polipéptido remanente. En cualquier caso, tanto si son los mismos como si están sustancialmente modificados, puede decirse que los polipéptidos que experimentan estas modificaciones "derivan" de sus respectivas fuentes, y los polipéptidos resultantes pueden contemplarse como "derivados".

65 En otro aspecto más de la presente invención, se proporcionan procedimientos de ensayo que utilizan los constructos de la invención en la detección de anticuerpos anti-VIH-1 en muestras de prueba. Dichos procedimientos

5 permiten el ensayo directo de muestras biológicas; sin embargo, los procedimientos de ensayo también pueden modificarse para permitir el ensayo de muestras pre-procesadas tales como suero, células lisadas y extractos o preparaciones elaborados a partir de los mismos (como mediante concentración, dilución, separación, fijación y/o inmovilización). Dependiendo del formato de ensayo deseado, los constructos de antígeno también pueden modificarse para usarse en dichos ensayos, como por ejemplo mediante marcador, inmovilización sobre una fase sólida o de otro modo, o conjugación con otros reactivos de ensayo.

10 Se pretende que ciertos términos usados en este documento tengan unos significados específicos. Salvo que se indique de otro modo, los términos deben tener los siguientes significados:

15 El término "cebador" representa una secuencia específica de oligonucleótidos complementaria de una secuencia de nucleótidos objetivo y usada para hibridar con la secuencia de nucleótidos objetivo. Sirve como un punto de inicio para la polimerización de nucleótidos catalizada por la polimerasa de ADN, la polimerasa de ARN o la transcriptasa inversa.

20 El término "polinucleótido" según se usa en este documento significa una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto oligonucleótidos como desoxirribonucleótidos. Este término se refiere únicamente a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, el término incluye ADN tanto bi como monocatenario, así como ARN tanto bi como monocatenario. También incluye modificaciones, tales como metilación o protección, y formas no modificadas del polinucleótido.

25 "Codificado por" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una secuencia de un polipéptido. También están englobadas secuencias de polipéptidos que son inmunológicamente identificables con un polipéptido codificado por la secuencia. Por lo tanto, un "polipéptido," una "proteína" o una secuencia de "aminoácidos" según se reivindica en este documento pueden tener una similitud de al menos el 60 %, más preferiblemente una similitud de al menos aproximadamente el 70 % y muy preferiblemente una similitud de al menos aproximadamente el 80 % con una secuencia de polipéptidos o de aminoácidos en particular especificada a continuación.

30 Los términos "polipéptido recombinante" o "proteína recombinante", usados de forma intercambiable en este documento, describen un polipéptido que, en virtud de su origen o de la manipulación, no está asociado con todo o con una porción del polipéptido con el que está asociado en la naturaleza y/o está unido a un polipéptido distinto al que está unido en la naturaleza. Un polipéptido o una proteína recombinante o codificada no es necesariamente traducida a partir de una secuencia de ácidos nucleicos designada. También puede ser generada de cualquier forma, incluyendo la síntesis química o la expresión de un sistema de expresión recombinante.

35 "Polipéptido" y "proteína" se usan de forma intercambiable en este documento e indican una cadena molecular de aminoácidos unidos a través de enlaces covalentes y/o no covalentes. Los términos no se refieren a una longitud específica del producto. Por lo tanto, en la definición de polipéptido se incluyen péptidos, oligopéptidos y proteínas. Los términos incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares. Además, los fragmentos de proteína, análogos, proteínas mutadas o variantes, proteínas de fusión y similares están incluidos en el significado de polipéptido.

40 Un "fragmento" de un polipéptido especificado se refiere a una secuencia de aminoácidos que comprende al menos aproximadamente 3 - 5 aminoácidos, más preferiblemente al menos aproximadamente 8 - 10 aminoácidos e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 15 - 20 aminoácidos, derivados del polipéptido especificado.

45 El término "péptido sintético" según se usa en este documento, significa una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede sintetizarse químicamente mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos péptidos sintéticos son útiles en varias aplicaciones.

50 "Polipéptido purificado" significa un polipéptido de interés o un fragmento del mismo que está esencialmente exento, es decir, que contiene menos de aproximadamente un 50 %, preferiblemente menos de aproximadamente un 70 % y más preferiblemente, menos de aproximadamente un 90 % de componentes celulares con los que el polipéptido de interés está asociado de forma natural. Los procedimientos de purificación son conocidos en la técnica.

55 El término "aislado" significa que el material es eliminado de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si existe de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o ADN o polipéptido, que se separa a partir de algunos o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, se aísla. Dicho polinucleótido podría ser parte de un vector y/o dicho polinucleótido o polipéptido podría ser parte de una composición y estar aún aislado, ya que el vector o la composición no son parte de su entorno natural.

60 "Células hospedadoras recombinantes," "célula hospedadoras", "células," "líneas celulares," "cultivos celulares" y otros términos similares que denotan microorganismos o líneas celulares eucariotas superiores cultivadas como entidades unicelulares se refieren a células que pueden ser, o que han sido, usadas como receptores de un vector recombinante o de otro ADN transferido e incluyen la progenie original de la célula original que ha sido transfectada.

Según se usa en este documento "replicón" significa cualquier elemento genético, tal como un plásmido, un cromosoma o un virus, que se comporta como una unidad autónoma de replicación de polinucleótidos dentro de una célula.

5 Un "vector" es un replicón al que se le ha unido otro segmento de polinucleótido, tal como para propiciar la replicación y/o la expresión del segmento unido.

10 El término "secuencia de control" se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias codificantes a las que están ligadas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador. En los procariotas, dichas secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión a ribosomas y terminadores; en eucariotas, dichas secuencias de control incluyen generalmente promotores, terminadores y, en algunos casos, potenciadores. El término "secuencia de control" pretende por lo tanto incluir todos los componentes mínimos cuya presencia es necesaria para la expresión; y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder.

20 "Unido operativamente" se refiere a una situación en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de su forma prevista. Por lo tanto, por ejemplo, una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de una forma tal que la expresión de la secuencia codificante se consigue en unas condiciones compatibles con las secuencias de control.

25 Una "secuencia codificante" es una secuencia de polinucleótidos que es transcrita en ARNm y traducida en un polipéptido cuando se pone bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados por, e incluyen, un codón de inicio de la traducción en el 5'-terminal y uno o más codones de detención de la traducción en el 3'-terminal. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ARNm, ADNc y secuencias de polinucleótidos recombinantes.

30 El término "inmunológicamente identificable con / como" se refiere a la presencia de epítipo(s) y de polipéptido(s) que también está(n) presente(s) en, y que es (son) único(s) para, el (los) polipéptido(s) designado(s). La identidad inmunológica puede determinarse mediante la unión al anticuerpo y/o la competición en la unión. Estas técnicas son conocidas por el artesano experto y también se describen en este documento. La naturaleza única de un epítipo también puede determinarse mediante búsquedas informatizadas en bancos de datos conocidos, tales como GenBank, de las secuencias de polinucleótidos que codifican para el epítipo y mediante comparaciones de las secuencias de aminoácidos con otras proteínas conocidas.

40 Según se usa en este documento, "epítipo" significa un determinante antigénico de un polipéptido. Posiblemente, un epítipo puede comprender tres aminoácidos en una conformación espacial que es única para el epítipo. Generalmente, un epítipo consiste en al menos cinco de dichos aminoácidos y más habitualmente, consiste en al menos entre ocho y diez aminoácidos. Los procedimientos de examen de la conformación espacial son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, cristalografía por rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional.

45 Un "epítipo conformacional" es un epítipo que está formado por una yuxtaposición específica de aminoácidos en una estructura reconocible inmunológicamente, estando presentes dichos aminoácidos en el mismo polipéptido en un orden contiguo o no contiguo, o presentes en polipéptidos diferentes.

50 Un polipéptido es "inmunológicamente reactivo" con un anticuerpo cuando se une a un anticuerpo debido al reconocimiento por parte del anticuerpo de un epítipo específico contenido en el polipéptido. La reactividad inmunológica puede ser determinada mediante la unión del anticuerpo, más particularmente mediante la cinética de unión del anticuerpo, y/o mediante la competición en la unión mediante el uso de como competidor(es) un(os) polipéptido(s) conocido(s) que contiene(n) un epítipo contra el que está dirigido el anticuerpo. Los procedimientos para la determinación de si un polipéptido es inmunológicamente reactivo con un anticuerpo son conocidos en la técnica.

55 El término "transformación" se refiere a la inserción de un polinucleótido exógeno en una célula hospedadora, independientemente del procedimiento usado para la inserción. Por ejemplo, se incluyen la captación dirigida, la transducción o el apareamiento f-. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o como alternativa, puede estar integrado en el genoma del hospedador.

60 El término "muestra de prueba" se refiere a un componente del cuerpo de un individuo que es la fuente del analito (tal como anticuerpos de interés o antígenos de interés). Estos componentes son bien conocidos en la técnica. Estas muestras de prueba incluyen muestras biológicas que pueden ser ensayadas mediante los procedimientos de la presente invención descritos en este documento e incluyen fluidos corporales humanos y animales tales como sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, fluidos linfáticos y diversas secreciones externas del tracto respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, leche, glóbulos blancos, mielomas y similares; fluidos biológicos tales como sobrenadantes de cultivos celulares; muestras tisulares fijadas; y muestras celulares fijadas.

"Producto purificado" se refiere a una preparación del producto que ha sido aislada a partir de los constituyentes celulares con los que el producto está normalmente asociado, y a partir de otros tipos de células que pueden estar presentes en la muestra de interés.

5 La presente invención proporciona ensayos que utilizan miembros de unión específicos. Un "miembro de unión específico", según se usa en este documento, es un miembro de un par de unión específico. Esto es, dos moléculas diferentes en las que una de las moléculas se une específicamente, a través de medios químicos o físicos, a la segunda molécula. Por lo tanto, además de los pares de unión específicos de antígeno y anticuerpo de los
10 inmunoensayos habituales, otros pares de unión específicos pueden incluir biotina y avidina, carbohidratos y lectinas, secuencias de nucleótidos complementarias, moléculas efectoras y receptoras, cofactores y enzimas, inhibidores enzimáticos y enzimas, y similares. Adicionalmente, algunos pares de unión específicos pueden incluir miembros que son análogos de los miembros de unión específicos originales, por ejemplo, un analito-análogo. Algunos miembros de unión específicos inmunorreactivos incluyen antígenos, fragmentos de antígeno, anticuerpos y
15 fragmentos de anticuerpo, tanto monoclonales como policlonales y complejos de los mismos, incluyendo aquellos formados por moléculas de ADN recombinante.

Un "reactivo de captura", según se usa en este documento, se refiere a un miembro de unión específico no marcado que es específico para el analito en un ensayo en sándwich, para el reactivo indicador o el analito en un ensayo
20 competitivo, o para un miembro de unión específico accesorio, que por sí mismo es específico para el analito, como en un ensayo indirecto. El reactivo de captura puede unirse directa o indirectamente a un material en fase sólida antes de la realización del ensayo o durante la realización del ensayo, permitiendo así la separación de complejos inmovilizados a partir de la muestra de prueba.

El "reactivo indicador" comprende un "compuesto generador de señal" ("marcadores") que es capaz de generar y genera una señal medible detectable por medios externos, conjugado ("unido") a un miembro de unión específico. Un "miembro de unión específico" según se usa en este documento significa un miembro de un par de unión específico. Esto es, dos moléculas diferentes en las que una de las moléculas se une específicamente mediante un
30 medio químico o físico a la segunda molécula. Además de ser un miembro anticuerpo o de un par de unión específico, el reactivo indicador también puede ser un miembro de cualquier par de unión específico, incluyendo sistemas hapteno-anti-hapteno tales como biotina o anti-biotina, avidina o biotina, un carbohidrato o una lectina, una secuencia de nucleótidos complementaria, una molécula efectora o receptora, un cofactor enzimático y una enzima, un inhibidor enzimático o una enzima, y similares. Un miembro de unión específico inmunorreactivo puede ser un anticuerpo, un antígeno o un complejo anticuerpo / antígeno que es capaz de unirse al polipéptido de interés como
35 en un ensayo en sándwich, al reactivo de captura como en un ensayo competitivo o al miembro de unión específico accesorio como en un ensayo indirecto.

Los diversos "compuestos generadores de señal" (marcadores) contemplados incluyen cromógenos, catalizadores tales como enzimas, compuestos luminiscentes tales como fluoresceína y rodamina, compuestos
40 quimioluminiscentes tales como dioxetanos, acridinios, fenantridinios y luminol, elementos radioactivos y marcadores visuales directos. Algunos ejemplos de enzimas incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, y similares. La selección de un marcador en particular no es crítica, pero será capaz de producir una señal bien por sí mismo o bien junto con una o más sustancias adicionales.

Las "fases sólidas" ("soportes sólidos") son conocidas por los expertos en la técnica e incluyen las paredes de los pocillos de una bandeja de reacción, tubos de ensayo, microesferas de poliestireno, microesferas magnéticas, tiras de nitrocelulosa, membranas, micropartículas tales como partículas de látex, eritrocitos de oveja (o de otro animal) y Duracytes® (eritrocitos "fijados" mediante aldehído pirúvico y formaldehído, disponibles en Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) y otros. La "fase sólida" no es crítica y puede ser seleccionada por el experto en la técnica. Por lo tanto, las partículas de látex, las micropartículas, las microesferas magnéticas o no magnéticas, las membranas, los tubos de plástico, las paredes de pocillos de microtitulación, chips de vidrio o de silicio, eritrocitos de oveja (o de otro animal adecuado) y Duracytes® son todos ejemplos adecuados. Algunos procedimientos adecuados para la inmovilización de péptidos sobre fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares. Una "fase sólida", según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier material que sea insoluble o que pueda hacerse insoluble mediante una reacción subsiguiente. La fase sólida puede elegirse por su capacidad intrínseca de atraer e inmovilizar el reactivo de captura. El receptor adicional puede incluir una sustancia cargada que tiene una cara opuesta a la del propio reactivo de captura, o a una sustancia cargada conjugada con el reactivo de captura. Como otra alternativa más, la molécula receptora puede ser cualquier miembro de unión específico que está inmovilizado en (unido a) la fase sólida y que tenga la capacidad de inmovilizar el reactivo de captura a través
50 de una reacción de unión específica. La molécula receptora permite la unión indirecta del reactivo de captura sobre un material en fase sólida antes de la realización del ensayo o durante la realización del ensayo. La fase sólida puede ser por tanto un plástico, un plástico derivatizado, un metal magnético o no magnético, la superficie de vidrio o de silicio de un tubo de ensayo, un pocillo de microtitulación, una lámina, una microesfera, una micropartícula, un chip, eritrocitos de oveja (o de otro animal adecuado), Duracytes® y otras configuraciones conocidas por los
60 expertos habituales en la técnica.
65

Está contemplado y en el ámbito de la presente invención que la fase sólida también comprenda cualquier material poroso adecuado con una porosidad suficiente para permitir el acceso de los anticuerpos de detección y una afinidad superficial adecuada para unir los antígenos. Generalmente se prefieren estructuras microporosas, pero también pueden usarse materiales con estructuras en gel en estado hidratado. Dichos útiles soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, nitrocelulosa y nailon. Se contempla que dichos soportes sólidos porosos descritos en este documento preferiblemente están en forma de láminas con un espesor de aproximadamente 0,01 a 0,5 mm, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mm. El tamaño de poro puede variar en amplios límites, y preferiblemente es de aproximadamente 0,025 a 15 micrómetros, especialmente de aproximadamente 0,15 a 15 micrómetros. La superficie de dichos soportes puede activarse mediante procesos químicos que provoquen la unión covalente del antígeno o del anticuerpo al soporte. La unión irreversible del antígeno o del anticuerpo se obtiene, sin embargo, en general, mediante la adsorción sobre el material poroso a través de fuerzas hidrófobas poco conocidas. En la técnica se conocen otros soportes sólidos adecuados.

La presente invención proporciona secuencias de polinucleótidos derivadas del virus de la inmunodeficiencia humana de interés y los polipéptidos codificados por las mismas. El (los) polinucleótido(s) puede(n) estar en forma de ARNm o de ADN. Los polinucleótidos en forma de ADN, ADNc, ADN genómico y ADN sintético están en el ámbito de la presente invención. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la hebra codificante (sentido) o la hebra no codificante (antisentido). La secuencia codificante que codifica para el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia codificante proporcionada en este documento o puede ser una secuencia codificante diferente a la secuencia codificante como resultado de la redundancia o la degeneración del código genético, que codifique para el mismo polipéptido que el ADN proporcionado en este documento.

Este polinucleótido puede incluir únicamente la secuencia codificante del polipéptido, o la secuencia codificante del polipéptido y una secuencia codificante adicional tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia de pro-proteína, o la secuencia codificante del polipéptido (y opcionalmente la secuencia codificante adicional) y la secuencia no codificante, tal como una secuencia no codificante 5' y/o 3' de la secuencia codificante del polipéptido.

Además, la invención incluye variantes de polinucleótidos que contienen modificaciones tales como deleciones, sustituciones, adiciones de polinucleótidos; y cualquier modificación del polipéptido resultante de la secuencia variante del polinucleótido. Un polinucleótido de la presente invención también puede tener una secuencia codificante que sea una variante natural de la secuencia codificante proporcionada en este documento.

Además, la secuencia codificante del polipéptido puede estar fusionada en el mismo marco de lectura con una secuencia de polinucleótidos que ayude a la expresión y la secreción de un polipéptido desde una célula hospedadora, por ejemplo, una secuencia líder que funciona como secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido con una secuencia líder es una pre-proteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula hospedadora para formar la forma del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar para una pro-proteína que es la proteína más residuos de aminoácidos adicionales en 5'. Una proteína con una pro-secuencia es una pro-proteína y en algunos casos puede ser una forma inactiva de la proteína. Una vez que la pro-secuencia es escindida permanece una proteína activa. Por lo tanto, el polinucleótido de la presente invención puede codificar para una proteína, o para una proteína con una pro-secuencia o para una proteína que tenga tanto la pre-secuencia (secuencia líder) como una pro-secuencia.

Los polinucleótidos de la presente invención también pueden tener la secuencia codificante fusionada en marco con una secuencia marcadora que permite la purificación del polipéptido de la presente invención. La secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9 para permitir la purificación del polipéptido fusionado con un marcador, en el caso de un hospedador bacteriano, o por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) cuando se usa un hospedador mamífero, por ejemplo células COS-7. La etiqueta de HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe. Véase, por ejemplo, I. Wilson y col., Cell 37: 767 (1984).

La presente invención también se refiere a polipéptidos del VIH-1 que tienen la secuencia de aminoácidos deducida según se proporciona en este documento, así como fragmentos, análogos y derivados de dichos polipéptidos. Los polipéptidos de la presente invención pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales purificados o polipéptidos sintéticos. El fragmento, el derivado o el análogo de dicho polipéptido puede ser uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos está sustituido por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético; o puede ser uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente; o puede ser uno en el que el polipéptido está fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol); o puede ser uno en el que los aminoácidos adicionales están fusionados con el polipéptido, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido, o una secuencia de pro-proteína. Dichos fragmentos, derivados y análogos están en el ámbito de la presente invención. Los polipéptidos y los polinucleótidos de la presente invención se proporcionan preferiblemente en una forma aislada y preferiblemente purificada.

Por lo tanto, un polipéptido de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del polipéptido natural o que es diferente por variaciones menores debidas a una o más sustituciones de aminoácidos. La variación puede ser un "cambio conservativo" típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos, en el que el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, la sustitución de leucina por isoleucina o de treonina por serina. Por el contrario, las variaciones pueden incluir cambios no conservativos, por ejemplo, la sustitución de una glicina por un triptófano. Algunas variaciones menores similares también pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Una guía para la determinación de cuáles y cuántos residuos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o deleccionados sin modificar la actividad biológica o inmunológica puede averiguarse mediante el uso de programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el programa informático DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison WI).

Los polipéptidos recombinantes de la presente invención pueden producirse no sólo como se muestra a continuación, sino también según varios procedimientos alternativos y mediante el uso de varias células hospedadoras y vectores de expresión. Las células hospedadoras están modificadas genéticamente (transducidas o transformadas o transfectadas) con los vectores de esta invención, que pueden ser un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar en forma de un plásmido, de una partícula vírica, de un fago, etc. Las células hospedadoras modificadas genéticamente pueden cultivarse en un medio convencional con nutrientes modificados según sea apropiado para la activación de los promotores, la selección de los transformantes o la amplificación de los genes derivados del VIH. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las usadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el artesano habitual experto.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden emplearse para la producción de un polipéptido mediante técnicas recombinantes. Por lo tanto, la secuencia del polinucleótido puede estar incluida en uno cualquiera de una diversidad de vehículos de expresión, en particular en vectores o en plásmidos, para la expresión de un polipéptido. Dichos vectores incluyen secuencias cromosómicas, no cromosómicas y de ADN sintético, por ejemplo, derivados del SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fagos; plásmidos de levaduras; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, ADN vírico tal como de la variolovacuna, de adenovirus, del virus de la viruela aviar y de la seudorrabia. Sin embargo, puede usarse cualquier otro plásmido o vector siempre que sea replicable y viable en el hospedador.

La secuencia de ADN apropiada puede ser insertada en el vector mediante varios procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en los sitios apropiados de endonucleasa restricción mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se considera que dichos procedimientos y otros están al alcance de los expertos en la técnica. La secuencia de ADN del vector de expresión está unida operativamente a una(s) secuencia(s) de control de la expresión apropiada(s) (promotor) para dirigir la síntesis del ARNm. Algunos ejemplos representativos de dichos promotores incluyen, pero no se limitan a, el promotor LTR o SV40, el lac o trp de *E. coli*, el promotor sub L del fago lambda P y otros promotores conocidos por controlar la expresión de los genes en células procariotas o eucariotas o sus virus. El vector de expresión también contiene un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Además, los vectores de expresión contienen preferiblemente un gen para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de las células hospedadoras transformadas, tal como reductasa de dihidrofolato o resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucariotas, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada según se describe anteriormente en este documento, así como una secuencia promotora o de control apropiada, pueden emplearse para transformar un hospedador apropiado para permitir que el hospedador exprese la proteína. Como ejemplos representativos de hospedadoras apropiadas pueden mencionarse: células bacterianas tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*; *Streptomyces sp.*; células fúngicas, tales como de levadura; células de insecto tales como de *Drosophila* y Sf9; células animales tales como de ovario de hámster chino (CHO), COS o de melanoma de Bowes; células vegetales, etc. Se considera que la selección de un hospedador apropiado está al alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas proporcionadas en este documento.

Más particularmente, la presente invención también incluye constructos recombinantes que comprenden una o más de las secuencias, según se describió ampliamente anteriormente. Los constructos comprenden un vector, tal como un plásmido o un vector vírico, en el que se ha insertado una secuencia de la invención, en una orientación directa o inversa. En un aspecto preferido de esta forma de realización, el constructo comprende adicionalmente secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, un promotor, unido operativamente a la secuencia. Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores y de promotores adecuados y que están disponibles en el mercado. A modo de ejemplo se proporcionan los siguientes vectores. Bacterianos: pINCY (Incyte Pharmaceuticals Inc., Palo Alto, CA), pSPORT1 (Life Technologies, Gaithersburg, MD), pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen) pBs, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucariotas: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Sin embargo, puede usarse cualquier otro plásmido o vector siempre que sea replicable y viable en el hospedador.

- Las regiones promotoras pueden seleccionarse de entre cualquier gen deseado mediante el uso de vectores CAT (transferasa de cloranfenicol) o de otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Algunos promotores bacterianos mencionados en particular incluyen *lacI*, *lacZ*, T3, SP6, T7, *gpt*, lambda P sub R, P sub L y *trp*. Algunos promotores eucariotas incluyen (CMV) inmediato temprano, cinasa de timidina del virus herpes simplex (HSV), SV40 temprano y tardío, LTRs procedentes de retrovirus y metalotioneína-I de ratón. La selección del vector y del promotor apropiado está en el nivel del experto habitual en la técnica.
- La célula hospedadora usada en este documento puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la célula hospedadora puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción del constructo en la célula hospedadora puede efectuarse mediante una transfección con fosfato cálcico, una transfección mediada por DEAE-Dextrano o una electroporación (L. Davis y col., "Basic Methods in Molecular Biology", 2ª edición, Appleton y Lang, Paramount Publishing, East Norwalk, CT).
- Los constructos en las células hospedadoras pueden usarse de una manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Alternativamente, los polipéptidos de la invención pueden ser producidos sintéticamente mediante sintetizadores peptídicos convencionales.
- Las proteínas pueden ser expresadas en células de mamífero, de levadura, de bacteria o en otras células bajo el control de los promotores apropiados. También pueden emplearse sistemas de traducción para producir dichas proteínas mediante el uso de ARNs derivados de los constructos de ADN de la presente invención. Los vectores de clonación y de expresión apropiados para su uso con hospedadores procariotas y eucariotas se describen en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).
- La transcripción de un ADN que codifica para los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores aumenta mediante la inserción de una secuencia promotora en el vector. Los promotores son elementos que actúan en cis del ADN, habitualmente aproximadamente desde 10 hasta 300 pb, que actúan sobre el promotor para aumentar su transcripción. Algunos ejemplos incluyen el promotor de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb del 100 hasta 270), un potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, un potenciador del polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.
- Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula hospedadora, por ejemplo, el gen de resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae* y un promotor derivado de un gen muy expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural secuencia abajo. Dichos promotores pueden derivar de operones que codifican para enzimas glucolíticas tales como la cinasa de 3-fosfoglicerato (PGK), el factor alfa, la fosfatasa ácida o proteínas de choque térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga es ensamblada en una fase apropiada con las secuencias de inicio y de terminación de la traducción y preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida en el espacio periplásmico o en el medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar para una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación N-terminal que imparte unas características deseadas, por ejemplo, la estabilización o la simplificación de la purificación del producto recombinante expresado.
- Algunos vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica para una proteína deseada junto con unas señales adecuadas de inicio y de terminación de la traducción en una fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores fenotípicos seleccionables y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y, si fuera deseable, para proporcionar su amplificación dentro del hospedador. Algunos hospedadores procariotas adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y varias especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, aunque pueden emplearse otros como una elección rutinaria.
- Algunos vectores de expresión útiles para uso bacteriano comprenden un marcador seleccionable y un origen de replicación bacterianos derivados de plásmidos que comprenden elementos genéticos del conocido vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). Otros vectores incluyen, pero no se limitan a, PKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI). Estas secciones del "esqueleto" del pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural que se va a expresar.
- Después de la transformación de una cepa hospedadora adecuada y del crecimiento de la cepa hospedadora hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado es desreprimido mediante un medio apropiado (por ejemplo, un cambio en la temperatura o una inducción química) y las células se cultivan durante un periodo adicional. Las células se recogen típicamente mediante centrifugación, se desestabilizan por medios físicos o químicos y el extracto bruto resultante se retiene para una purificación adicional. Las células microbianas que se emplean en la expresión de proteínas pueden ser desestabilizadas mediante cualquier procedimiento conveniente,

incluyendo ciclos de congelación y descongelación, aplicación de ultrasonidos, desestabilización mecánica o el uso de agentes de lisis celular; dichos procedimientos son bien conocidos por el artesano experto.

5 También pueden emplearse varios sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Algunos ejemplos de sistemas de expresión de mamífero incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos renales de mono descritas por Gluzman, Cell 23: 175 (1981) y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, tales como las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero comprenderán un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuados, y también cualquier sitio de unión a ribosomas necesario, un sitio de poliadenilación, sitios de corte y empalme de donante y de aceptor, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias no transcritas flanqueantes 5' y marcadores seleccionables tales como el gen de la fosfotransferasa de neomicina. Las secuencias de ADN derivadas del genoma vírico del SV40, por ejemplo, el origen del SV40, el promotor temprano, el potenciador, los sitios de corte y empalme y de poliadenilación, podrían usarse para proporcionar los requeridos elementos genéticos no transcritos. Algunos sectores representativos útiles incluyen pRc/CMV y pADNc3 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA).

15 Los polipéptidos derivados del VIH se recuperan y se purifican a partir de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacciones hidrófobas, cromatografía de hidroxipatito o cromatografía de lectina. Se prefiere tener bajas concentraciones (de aproximadamente 0,1 - 5 mM) de ión calcio presentes durante la purificación (Price y col., J. Biol. Chem. 244: 917). Las etapas de replegado de la proteína pueden usarse, según sea necesario, para completar la configuración de la proteína. Finalmente, puede realizarse una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para las etapas de finales de purificación.

25 Los polipéptidos de la presente invención puede ser productos purificados de forma natural expresados a partir de una línea celular muy expresante, o un producto de procedimientos sintéticos químicos, o producirse mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador procariota o eucariota (por ejemplo, mediante el cultivo de células bacterianas, de levadura, de vegetales superiores, de insecto y de mamífero). Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glucosilados con carbohidratos de mamífero o de otro eucariota, o pueden no estar glucosilados. Los polipéptidos de la invención también pueden incluir un residuo de aminoácido inicial de metionina.

35 La presente invención incluye adicionalmente versiones modificadas del polipéptido recombinante para excluir la glucosilación permitiendo la expresión de una forma reducida del carbohidrato de la proteína en sistemas de expresión de levadura, de insecto o de mamífero. Algunos procedimientos conocidos para la inactivación de los sitios de glucosilación incluyen, pero no se limitan a, los presentados en la Patente de EE.UU. 5.071.972 y en el documento EP 276.846.

40 Otras variantes incluidas en la presente invención incluyen aquellas obtenidas mediante la eliminación de secuencias que codifican para residuos de cisteína, evitando así la formación de puentes intramoleculares de disulfuro incorrectos que disminuyen la actividad biológica del producto proteico. Los constructos de la presente invención también pueden prepararse mediante la eliminación del sitio de procesamiento proteolítico, permitiendo su expresión en sistemas que contienen una proteasa problemática, por ejemplo, la proteasa KEX2 en levaduras. Algunos procedimientos conocidos para la eliminación de dichos sitios de proteasa incluyen, pero no se limitan a, un procedimiento para la eliminación de los sitios KEX2 presentado en el documento EP 212.914.

50 La presente invención incluye los péptidos anteriores en forma de oligómeros, dímeros, trímeros y oligómeros de órdenes superiores. Los oligómeros pueden formarse mediante varios medios que incluyen, pero no se limitan a, puentes de disulfuro entre péptidos, interacciones no covalentes entre péptidos y uniones de polietilenglicol entre péptidos.

55 La fusión de los péptidos anteriores con conectores peptídicos o con péptidos que son capaces de promover los oligómeros también está englobada en esta invención. Dichos péptidos incluyen, pero no se limitan a, cremalleras de leucina y péptidos derivados de anticuerpos, tales como los descritos en Landschulz y col., Science 240: 1759 (1988); Hollenbaugh y Aruffo, "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en Current Protocols in Immunology, Suplemento 4, págs.. 10.19.1 - 10.19.11 (1992) John Wiley and sons, Nueva York, NY.

60 Los plásmidos de partida pueden construirse a partir de plásmidos disponibles según procedimientos conocidos publicados. Además, los plásmidos equivalentes a los descritos son conocidos en la técnica y serán evidentes para el artesano experto habitual.

65 Una vez que se obtienen cultivos homogéneos de células recombinantes, pueden recuperarse grandes cantidades de la proteína producida recombinantemente a partir del medio condicionado y analizarse mediante el uso de procedimientos cromatográficos bien conocidos en la técnica. Un procedimiento alternativo para la producción de grandes cantidades de proteína secretada implica la transformación de embriones de mamífero y la recuperación de la proteína recombinante a partir de la leche producida por gatas, cabras, ovejas transgénicas, etc. Los polipéptidos

y las moléculas estrechamente relacionadas pueden ser expresadas recombinantemente de una forma tal que se facilite la purificación de la proteína. Una metodología implica la expresión de una proteína quimérica que incluye uno o más dominios adicionales del polipéptido que no están presentes de forma natural en los polipéptidos humanos. Dichos dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metales
 5 tales como dominios de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión / afinidad FLAGS (Immunex Corp, Seattle, WA). La inclusión de una secuencia conectora escindible tal como el Factor XA o la enterocinasa de Invitrogen (San Diego, CA) entre la secuencia del polipéptido y el dominio de purificación puede ser útil para la recuperación del polipéptido.

10 También está contemplado, y en el ámbito de la presente invención, que los anteriores antígenos recombinantes se usen en varios formatos de inmunoensayos, que incluyen, pero no se limitan a, ensayos directos e indirectos. Los medios para la adaptación de los antígenos a dichos formatos diversos -- como mediante conjugación a marcadores o a macromoléculas, o la inmovilización sobre superficies de soporte adecuadas -- son bien comprendidos y
 15 deberían ser familiares para los expertos en la técnica.

Por ejemplo, los polipéptidos, incluyendo sus fragmentos, o derivados o análogos de los mismos, de la presente invención, o las células que los expresan, pueden usarse para la detección de anticuerpos contra el VIH (también como un inmunógeno para producir anticuerpos). Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos
 20 policlonales o monoclonales, quiméricos, anticuerpos de cadena individual y humanizados, así como fragmentos Fab, o el producto de una genoteca de expresión de un Fab. Pueden usarse varios procedimientos conocidos en la técnica para la producción de dichos anticuerpos y fragmentos.

Además, los anticuerpos generados contra un polipéptido correspondiente a una secuencia de la presente invención pueden obtenerse mediante la inyección directa del polipéptido en un animal o mediante la administración del
 25 polipéptido a un animal tal como un ratón, un conejo, una cabra o un ser humano. Se prefiere un ratón, un conejo una cabra. El anticuerpo así obtenido se unirá entonces al propio polipéptido. De esta forma, puede usarse incluso una secuencia que codificase únicamente para un fragmento del polipéptido para generar anticuerpos que se unan al polipéptido natural. Dichos anticuerpos pueden usarse entonces para aislar el polipéptido a partir de muestras de
 30 prueba, tales como tejidos sospechosos de contener ese polipéptido. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione los anticuerpos producidos mediante cultivos continuos de líneas celulares. Algunos ejemplos incluyen la técnica de hibridoma según describen Kohler y Milstein, Nature 256: 495 - 497 (1975), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos según describen Kozbor y col, Immun. Today 4: 72 (1983) y la técnica de EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales
 35 humanos según describen Cole y col., en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc, Nueva York, NY, págs. 77 - 96 (1985). Las técnicas descritas pueden adaptarse para la producción de anticuerpos de cadena individual contra los productos de polipéptidos inmunógenos de esta invención. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.946.778.

40 Dichos anticuerpos pueden ser utilizados en diversos formatos de ensayo, que incluyen inmunoensayos en "sándwich" y ensayos con sondas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales o los fragmentos según se han descrito anteriormente pueden emplearse en diversos sistemas de ensayo para determinar la presencia, si la hubiera, de un polipéptido derivado del VIH en una muestra de prueba. Por ejemplo, en un primer formato de ensayo se pone en contacto un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento del mismo, o una combinación de estos
 45 anticuerpos, con el que se ha recubierto una fase sólida, con una muestra de prueba, para formar una primera mezcla. Esta primera mezcla se incuba durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para que se formen los complejos de antígeno / anticuerpo. Entonces se pone en contacto un reactivo indicador que comprende un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal o un fragmento de los mismos, o una combinación de estos anticuerpos, al que se le ha unido un compuesto generador de una señal, con los complejos de antígeno / anticuerpo
 50 para formar una segunda mezcla. Después esta segunda mezcla se incuba durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para que se formen los complejos de anticuerpo / antígeno / anticuerpo. La presencia de un antígeno de un polipéptido derivado del VIH presente en la muestra de prueba y su captura sobre la fase sólida, si lo hubiera, se determina mediante la detección de la señal medible generada por el compuesto generador de señal. La cantidad de antígeno de un polipéptido derivado del VIH presente en la muestra de prueba es proporcional a la señal
 55 generada.

O se pone en contacto un anticuerpo policlonal o monoclonal de un polipéptido derivado del VIH o un fragmento del mismo, o una combinación de estos anticuerpos, que está unida a un soporte sólido, con la muestra de prueba y un reactivo indicador que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmentos de los mismos, que se unen
 60 específicamente al antígeno de un polipéptido derivado del VIH, o una combinación de éstos anticuerpos a los que se les ha unido un compuesto generador de señal, para formar una mezcla. Esta mezcla se incuba durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para que se formen los complejos de anticuerpo / antígeno / anticuerpo. La presencia, si la hubiera, de un polipéptido derivado del VIH presente en la muestra de prueba y capturado sobre la fase sólida se determina mediante la detección de la señal medible generada por el compuesto generador de señal.
 65 La cantidad de proteínas del polipéptido derivado del VIH presente en la muestra de prueba es proporcional a la señal generada.

En otro formato de ensayo, puede emplearse uno o una combinación de al menos dos anticuerpos monoclonales como una sonda competitiva para la detección de anticuerpos contra la proteína del polipéptido derivado del VIH. Por ejemplo, las proteínas del polipéptido derivado del VIH, tales como los antígenos recombinantes desvelados en este documento, tanto solos como en combinación, recubren una fase sólida. Entonces se incubaba una muestra de prueba sospechosa de contener el anticuerpo contra el antígeno del polipéptido derivado del VIH con un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal y al menos un anticuerpo monoclonal, durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para que se formen los complejos de antígeno / anticuerpo bien de la muestra de prueba y el reactivo indicador unido a la fase sólida, o bien del reactivo indicador unido a la fase sólida. La reducción en la unión del anticuerpo monoclonal a la fase sólida puede medirse cuantitativamente.

En otro procedimiento de detección más, puede emplearse cada uno de los anticuerpos monoclonales o policlonales en la detección de antígenos de polipéptido derivados del VIH en secciones tisulares fijadas, así como en células fijadas mediante análisis inmunohistoquímicos. Pueden usarse análisis que citoquímicos en los que estos anticuerpos están marcados directamente (con, por ejemplo, fluoresceína, oro coloidal, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.) o están marcados mediante el uso de anticuerpos secundarios marcados anti-especie (con diversos marcadores según se ejemplifica en este documento) para rastrear la histopatología de la enfermedad.

Además, estos anticuerpos monoclonales pueden unirse a matrices similares a Sepharose activada con CNBr y usarse para la purificación por afinidad de proteínas específicas de polipéptidos derivados del VIH procedentes de cultivos celulares o de tejidos biológicos, tales como para purificar antígenos y proteínas recombinantes y naturales de polipéptidos derivados del VIH.

Los anticuerpos monoclonales también pueden usarse para la generación de anticuerpos quiméricos para uso terapéutico, o para otras aplicaciones similares.

Los anticuerpos monoclonales o los fragmentos de los mismos pueden proporcionarse individualmente para detectar antígenos de polipéptidos derivados del VIH. También pueden usarse combinaciones de los anticuerpos monoclonales (y de fragmentos de los mismos) conjuntamente como componentes en una mezcla o "cóctel" de al menos un anticuerpo de un polipéptido derivado del VIH con anticuerpos contra las otras regiones del polipéptido derivado del VIH, teniendo cada uno diferentes especificidades. Por lo tanto, este cóctel puede incluir anticuerpos monoclonales que están dirigidos contra proteínas de un polipéptido derivado del VIH y otros anticuerpos monoclonales contra los demás determinantes antigénicos del genoma del polipéptido derivado del VIH.

El anticuerpo policlonal o un fragmento del mismo que puede usarse en los formatos de ensayo debería unirse específicamente a una región de un polipéptido derivado del VIH o a otras proteínas de un polipéptido derivado del VIH usadas en el ensayo. El anticuerpo policlonal usado es preferiblemente de origen mamífero; puede usarse un anticuerpo policlonal anti-polipéptido derivado del VIH humano, de cabra, de ratón o de oveja. Lo más preferiblemente, el anticuerpo policlonal es un anticuerpo policlonal de ratón anti-polipéptido derivado del VIH. Los anticuerpos policlonales usados en los ensayos pueden usarse solos o como un cóctel de anticuerpos policlonales. Dado que los cócteles usados en los formatos de ensayo están formados por anticuerpos monoclonales o por anticuerpos policlonales con diferentes especificidades para el polipéptido derivado del VIH, serían útiles para el diagnóstico, la evaluación y el pronóstico del estado del polipéptido derivado del VIH, así como para el estudio de la diferenciación y la especificidad de la proteína del polipéptido derivado del VIH.

Está contemplado, y en el ámbito de la presente invención, que los polipéptidos derivados del VIH puedan ser detectables en ensayos mediante el uso de antígenos recombinantes, así como mediante el uso de péptidos sintéticos o de péptidos purificados que contienen secuencias de aminoácidos de polipéptidos derivados del VIH. También está en el ámbito de la presente invención que puedan usarse diferentes epítopos identificadores de péptidos sintéticos, recombinantes o purificados de cada uno de dichos polipéptidos derivados del VIH en combinación en un ensayo para diagnosticar, evaluar o pronosticar el estado de la enfermedad por el VIH. En este caso, estos péptidos recubren una fase sólida, o cada péptido individual puede recubrir una fase sólida individual, tal como micropartículas, y combinarse después para formar una mezcla de péptidos que pueden usarse posteriormente en los ensayos. Adicionalmente, se contempla que puedan usarse múltiples péptidos que definen epítopos de diferentes polipéptidos en combinación para elaborar un diagnóstico, una evaluación o un pronóstico de la enfermedad por el VIH. Los péptidos que recubren fases sólidas, o marcados con marcadores detectables, se dejan entonces competir con los péptidos procedentes de una muestra de un paciente por una cantidad limitada de anticuerpo. Una reducción en la unión de los péptidos sintéticos, recombinantes o purificados al anticuerpo (o a los anticuerpos) es una indicación de la presencia de polipéptidos secretados por el VIH en la muestra del paciente, lo que a su vez indica la presencia del gen del VIH en el paciente. Dichas variaciones de los formatos de ensayo son conocidas por los expertos habituales en la técnica y se analizan a continuación en este documento.

En otro formato de ensayo, la presencia de antígenos y/o de anticuerpos contra polipéptidos derivados del VIH puede ser detectada en un ensayo simultáneo, como sigue. Se pone en contacto simultáneamente una muestra de prueba con un reactivo de captura para un primer analito, en el que dicho reactivo de captura comprende un primer

miembro de unión específico para un primer analito unido a una fase sólida, y un reactivo de captura para un segundo analito, en el que dicho reactivo de captura comprende un primer miembro de unión para un segundo analito unido a una segunda fase sólida, para formar así una mezcla. Esta mezcla se incuba durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para que se formen los complejos de reactivo de captura / primer analito y reactivo de
5 captura / segundo analito. Estos complejos así formados se ponen después en contacto con un reactivo indicador que comprende un miembro de un par de unión específico para el primer analito marcado con un compuesto generador de señal y un reactivo indicador que comprende un miembro de un par de unión específico para el segundo analito marcado con un compuesto generador de señal para formar una segunda mezcla. Esta segunda
10 mezcla se incuba durante un tiempo y en unas condiciones específicas para formar los complejos de reactivo de captura / primer analito / reactivo indicador y reactivo de captura / segundo analito / reactivo indicador. La presencia de uno o más analitos se determina mediante la detección de una señal generada en relación con los complejos formados en una o en ambas fase sólidas, como una indicación de la presencia de uno o más analitos en la muestra de prueba. En este formato de ensayo pueden utilizarse antígenos recombinantes, así como los anticuerpos monoclonales producidos a partir de los mismos. Dichos sistemas de ensayo se describen con mayor detalle en la
15 Publicación EP N° 0473065.

En otros formatos de ensayo más, pueden utilizarse los polipéptidos desvelados en este documento para detectar la presencia de anticuerpos específicos para polipéptidos derivados del VIH en muestras de prueba. Por ejemplo, se
20 incuba una muestra de prueba con una fase sólida a la que se ha unido al menos una proteína recombinante. Estas se hacen reaccionar durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para que se formen los complejos de antígeno / anticuerpo. Después de la incubación, se detecta el complejo de antígeno / anticuerpo. Pueden usarse reactivos indicadores para facilitar la detección, dependiendo del sistema de ensayo elegido. En otro formato de ensayo también se pone en contacto una muestra de prueba con una fase sólida a la que se ha unido una proteína recombinante producida según se describe en este documento, con un anticuerpo monoclonal o policlonal específico
25 para la proteína, que preferiblemente ha sido marcado con un reactivo indicador. Después de la incubación durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para que se formen los complejos de anticuerpo / antígeno, se separa la fase sólida de la fase libre y se detecta el marcador bien en la fase sólida o bien en la libre como una indicación de la presencia del anticuerpo del polipéptido derivado del VIH. Se contemplan otros formatos de ensayo que utilizan los antígenos recombinantes desvelados en este documento. Éstos incluyen poner en contacto una muestra de prueba con una fase sólida a la que se ha unido al menos un antígeno procedente de una primera fuente, incubar la fase
30 sólida y la muestra de prueba durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para que se formen los complejos de antígeno / anticuerpo y poniendo en contacto después la fase sólida con un antígeno marcado, antígeno que deriva de la misma fuente o, como alternativa, de una segunda fuente diferente a la primera fuente. Por ejemplo, se usa una proteína recombinante derivada de una primera fuente, tal como *E. coli*, como un antígeno de captura sobre una fase sólida, se añade una muestra de prueba a la fase sólida así preparada y se utiliza una proteína recombinante derivada de una fuente diferente (es decir, que no sea de *E. coli*) como parte de un reactivo indicador. Asimismo también son posibles combinaciones de un antígeno recombinante sobre una fase sólida y un péptido sintético en la fase indicadora. Se contempla cualquier formato de ensayo que utilice un antígeno específico para un polipéptido derivado del VIH procedente de una primera fuente, un antígeno de captura y un antígeno específico para
35 el polipéptido derivado del VIH procedente de una segunda fuente. Por lo tanto, en el ámbito de esta invención están diversas combinaciones de antígenos recombinantes, así como el uso de péptidos sintéticos, proteínas purificadas, y similares. Ensayos como estos, y otros, se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.254.458.

También se contemplan y están en el ámbito de esta invención otras formas de realización que utilizan otras
45 diversas fases sólidas. Por ejemplo, según la presente invención pueden emplearse procedimientos de captura iónica para la inmovilización de un complejo de reacción inmovilizable con un polímero cargado negativamente (descrito en la Publicación EP N° 0326100 y en la Publicación EP N° 0406473), para efectuar una rápida reacción inmunoquímica en fase de disolución sólida. Un complejo inmune inmovilizable se separa del resto de la mezcla de reacción mediante interacciones iónicas entre el complejo polianiónico / inmune cargado negativamente y la matriz
50 porosa cargada positivamente tratada previamente, y se detecta mediante el uso de varios sistemas generadores de señal descritos previamente, incluyendo aquellos descritos en mediciones de señales quimioluminiscentes, según se describe en la Publicación EPO N° 0 273.115.

También pueden adaptarse los procedimientos de la presente invención para su uso en sistemas que utilizan la
55 tecnología de micropartículas, incluyendo sistemas automatizados y semiautomatizados en los que la fase sólida comprende una micropartícula (magnética o no magnética). Dichos sistemas incluyen aquellos descritos en las solicitudes publicadas EPO N° EP 0 425 633 y EP 0 424 634, respectivamente.

El uso de microscopía de sonda de barrido (SPM) en inmunoensayos también es una tecnología a la que pueden
60 adaptarse fácilmente los anticuerpos monoclonales de la presente invención. En la microscopía de sonda de barrido, en particular, en la microscopía de fuerzas atómicas, la fase de captura, por ejemplo, al menos uno de los anticuerpos monoclonales de la invención, se adhiere sobre una fase sólida y se utiliza la microscopía de barrido de sondas para detectar los complejos de antígeno / anticuerpo que puedan estar presentes en la superficie de la fase sólida. El uso de la microscopía de barrido de túnel elimina la necesidad de marcadores que normalmente deben
65 utilizarse en muchos sistemas de inmunoensayos para detectar los complejos de antígeno / anticuerpo. El uso de la SPM para monitorizar las reacciones de unión específicas puede realizarse de muchas formas. En una forma de

realización, un miembro de un compañero de unión específico (sustancia analito específica, que es el anticuerpo monoclonal de la invención) se une a una superficie adecuada para el barrido. La unión de sustancia analito específica puede ser mediante adsorción a una pieza de ensayo que comprende una fase sólida con una superficie plástica metálica, siguiendo los procedimientos conocidos por los expertos habituales en la técnica. O puede utilizarse una unión covalente de un compañero de unión específico (sustancia analito específica) a una pieza de ensayo, pieza de ensayo que comprende una fase sólida de plástico derivatizado, de metal, de silicio o de vidrio. Los procedimientos de unión covalente son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen varios medios de uniones irreversibles de compañeros de unión específicos a la pieza de ensayo. Si la pieza de ensayo es de silicio o de vidrio, la superficie debe estar activada antes de unir el compañero de unión específico. También pueden usarse interacciones entre polielectrolitos para inmovilizar un compañero de unión específico sobre una superficie de una pieza de ensayo mediante el uso de técnicas y químicas. El procedimiento preferido de unión es por medios covalentes. Después de la unión de un compañero de unión específico, la superficie puede tratarse adicionalmente con materiales tales como suero, proteínas u otros agentes de bloqueo para minimizar la unión no específica. La superficie también puede cribarse en el sitio de fabricación o en el punto de uso para verificar su idoneidad para los propósitos del ensayo. No se anticipa que el proceso de cribado altere las propiedades de unión específica de la pieza de ensayo.

Aunque la presente invención desvela la preferencia de uso de fases sólidas, se contempla que los reactivos tales como anticuerpos, proteínas y péptidos de la presente invención puedan utilizarse en sistemas de ensayo en fase no sólida. Estos sistemas de ensayo son conocidos por los expertos en la técnica, y se consideran en el ámbito de la presente invención.

La presente invención se comprenderá mejor en relación con los siguientes ejemplos, que pretenden ilustrar, pero no limitar, el espíritu y el ámbito de la invención.

25 Ejemplo 1

Procedimientos de clonación

30 Los oligonucleótidos para la construcción y la secuenciación de genes se sintetizaron en Abbott Laboratories, Synthetic Genetics (San Diego, CA) o en Oligo Etc. (Wilsonville, CA). Todos los reactivos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo la polimerasa de ADN AmpliTaq y la polimerasa de ADN UITma, fueron adquiridos en Perkin-Elmer Corporation (Foster City, CA) y usados según las especificaciones del fabricante, salvo que se indique de otro modo. Las amplificaciones mediante PCR se realizaron con un ciclador térmico GeneAmp 9600 (Perkin-Elmer). Salvo que se indique de otro modo, las enzimas de restricción se adquirieron en New England BioLabs (Beverly, MA) y los digeridos se realizaron según las recomendaciones del fabricante. Los fragmentos de ADN usados para la clonación se aislaron en geles de agarosa (Life Technologies, Gaithersburg, MD), salvo que se indique de otro modo.

40 Se cortaron los fragmentos deseados y el ADN se extrajo con el kit de extracción en gel QIAEX II o con el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) según las recomendaciones del fabricante. El ADN se resuspendió en H₂O o en TE [ácido etilendiaminatetraacético 1 mM (EDTA; pH 8,0; BRL Life Technologies), clorhidrato de tris(hidroximetil) aminometano 10 mM (Tris-HCl, pH 8,0; BRL Life Technologies)]. Las ligaciones se realizaron mediante el uso de un kit de ligación de ADN de Stratagene (Stratagene Cloning Systems La Jolla, CA) según las recomendaciones del fabricante. Las ligaciones se incubaron a 16 °C durante una noche.

50 Las transformaciones bacterianas se realizaron mediante el uso de células competentes MAX EFFICIENCY DH5α (BRL Life Technologies) o células supercompetentes Epicurian Coli XL1-Blue (Stratagene Cloning Systems) siguiendo los protocolos del fabricante. Salvo que se indique de otro modo, las transformaciones y las siembras por estrías bacterianas se colocaron en placas en agar LB (Lennox) con 150 µg/ ml de ampicilina (M1090; MicroDiagnostics, Lombard, IL) o en placas en agar LB + ampicilina complementadas con glucosa hasta una concentración final de 20 mM, como se indica. Todas las incubaciones bacterianas (las placas y los cultivos de una noche) se realizaron durante una noche (~ 16 horas) a 37 °C.

55 El cribado de los transformantes para la identificación de los clones deseados se consiguió mediante la secuenciación de ADN miniprep y/o mediante una PCR de colonias. El ADN miniprep se preparó con un Kit Qiagen Tip 20 Plasmid Prep o con un Kit Qiagen QIAwell 8 Plasmid Prep siguiendo las especificaciones del fabricante, salvo que se indique de otro modo. Para el cribado de las colonias mediante PCR, las colonias individuales se recogieron de las placas de transformación y se transfirieron a un pocillo de una placa estéril de fondo redondo de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) que contenía 100 µl de H₂O estéril.

60 Se transfirió un tercio del volumen a una segunda placa y se almacenó a 4 °C. La placa original de 96 pocillos se calentó en el microondas durante 5 minutos para desestabilizar las células. Entonces se transfirió un volumen de 1 µl a un tubo de PCR como molde. Se añadieron 9 µl de una mezcla maestra de PCR que contenía 1 µl de tampón de PCR 10X, 1 ml de dNTPs 2 mM, 1 µl (10 pmol) de cebador sentido, 1 µl (10 pmol) de cebador antisentido, 0,08 µl de

polimerasa de ADN AmpliTaq (0,4 unidades) y 4,2 µl de H₂O al tubo de PCR. Las reacciones se amplificaron generalmente durante 20 - 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 - 60 °C (dependiendo de las temperaturas de hibridación del cebador) durante 30 segundos y a 72 °C durante 60 segundos. Los cebadores eran dependientes del inserto, y las condiciones del ciclo se modificaron basándose en las temperaturas de hibridación del cebador y en la longitud del producto esperado. Después de la ciclación, se cargó aproximadamente 1/3 del volumen de la reacción en geles de agarosa para su análisis. Las colonias que contenían los clones deseados se propagaron desde la placa de transferencia.

Salvo que se indique de otro modo, la secuenciación del ADN se realizó en un secuenciador automático ABI Modelo 373A Stretch (Perkin Elmer). Las reacciones de secuenciación se establecieron con reactivos de un kit de reacción FS TACS Dye Term Ready (Perkin Elmer) y 250 - 500 ng de ADN de plásmido, según las especificaciones del fabricante. Las reacciones fueron procesadas en columnas Centri-Sep (Princeton Separations, Adelphia, N. J.) antes de ser cargadas en el secuenciador. Los datos de la secuenciación fueron analizados mediante el uso de Sequencher 3.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) y GeneWorks 2.45 (Oxford Molecular Group, Inc., Campbell, CA).

Ejemplo 2

Determinación de la secuencia de la *env* del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112

Se extrajo ARN vírico a partir de sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de sangre periférica humana infectadas con la cepa clínica del VIH-1 del Grupo O designada HAM112 (H. Hampl y col., *Infection* 23: 369 - 370) mediante el uso de un kit QIAamp Blood (Qiagen) y el procedimiento recomendado por el fabricante. El ARN se eluyó en un volumen de 50 µl de agua exenta de nucleasa (5Prime-3Prime, Inc., Boulder, CO) y se almacenó a -70 °C. La estrategia para la obtención de la secuencia de la región de la *env* implicaba la síntesis de un ADNc y una amplificación mediante PCR (anidada) de cuatro fragmentos solapantes del gen de la *env*. Los productos amplificados se secuenciaron directamente en un secuenciador automatizado ABI Modelo 373A Stretch. Las reacciones de amplificación se realizaron con los kits GeneAmp ARN PCR and GeneAmp PCR (Perkin Elmer) según detalla el fabricante. Las posiciones de los cebadores de oligonucleótidos se corresponden con la secuencia de la *env* del VIH-1 ANT70 (G. Myers y col., eds., *supra*). Se usaron los cebadores env10R [nucleótido (nt) 791 - 772; ID. SEC. N°: 62], env15R (nt 1592 - 1574; ID. SEC. N°: 63), env22R (nt 2321 - 2302; ID. SEC. N°: 64), env26R (nt 250 - 232 3' de la *env*; ID. SEC. N°: 65) para la síntesis del ADNc de los fragmentos 1 - 4, respectivamente. Las reacciones de transcripción inversa se incubaron a 42 °C durante 30 minutos, y después a 99 °C durante 5 minutos. La primera ronda de amplificaciones mediante PCR consistió en 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto mediante el uso de las combinaciones de cebadores: env1F (nt 184 - 166 5' de la *env*; ID. SEC. N°: 66) y env10R (ID. SEC. N°: 62), env7F (nt 564 - 586; ID. SEC. N°: 67) y env15R (ID. SEC. N°: 63), env12F (nt 1289 - 1308; ID. SEC. N°: 68) y env22R (ID. SEC. N°: 64), env19F (nt 2020 - 2040; ID. SEC. N°: 69) y env26R (ID. SEC. N°: 65) para los fragmentos 1 hasta 4, respectivamente. Para la segunda ronda de amplificación (PCR anidada), se usaron 5 µl de las respectivas reacciones de PCR de la primera ronda como molde, junto con las combinaciones de cebadores env2F (nt 37 - 15 5' de la *env*; ID. SEC. N°: 70) y env9R (nt 740 - 721; ID. SEC. N°: 71), env8F (nt 631 - 650; ID. SEC. N°: 72) y env14R (nt 1437 - 1416; ID. SEC. N°: 73), env13F (nt 1333 - 1354; ID. SEC. N°: 74) y env21R (nt 2282 - 2265; ID. SEC. N°: 75), env20F (nt 2122 - 2141; ID. SEC. N°: 76) y env25R (nt 111 - 94 3' de la *env*; ID. SEC. N°: 77) para los fragmentos 1 hasta 4, respectivamente. Las condiciones de la segunda ronda de amplificación fueron idénticas a las usadas para la primera ronda. Los fragmentos se purificaron en gel de agarosa y se extrajeron con un kit extracción en gel Qiagen QIAEX II. Los fragmentos se secuenciaron directamente con los cebadores usados para la PCR anidada junto con los cebadores env4F (ID. SEC. N°: 78) y env5R (ID. SEC. N°: 79) para el fragmento 1; los cebadores env10F (ID. SEC. N°: 80), env11F (ID. SEC. N°: 81), env11R (ID. SEC. N°: 82), env12F (ID. SEC. N°: 68) y AG1 (ID. SEC. N°: 87) para el fragmento 2; los cebadores env15F (ID. SEC. N°: 83) y env19R (ID. SEC. N°: 84) para el fragmento 3; los cebadores env22F (ID. SEC. N°: 85) y env24R (ID. SEC. N°: 86) para el fragmento 4. La secuencia de aminoácidos deducida de la *env* del VIH-1 del Grupo O de la cepa clínica HAM112 (ID. SEC. N°: 61) se presenta en la FIGURA 1.

Ejemplo 3

Construcción de genes sintéticos de las gp120 / gp41 de la *env* del VIH-1 del Grupo O

La FIGURA 2 representa la estrategia usada para generar constructos génicos sintéticos de las gp120 / gp41 de la *env* del VIH-1 del Grupo O. Las secuencias de las gp120 / gp41 de la *env* se basaron en la cepa clínica HAM112 del VIH-1 del Grupo O (ID. SEC. N°: 61). La determinación de la secuencia de la *env* de la HAM112 se detalla en el Ejemplo 2, anteriormente en este documento. Se diseñaron oligonucleótidos que codifican para los 45 aminoácidos C-terminales de la gp120 de la *env* y los 327 aminoácidos de la gp41 de la *env* (el nucleótido #1 es la primera base del primer codón de la gp120 en el gen sintético). El gen sintético tiene una delección de 26 aminoácidos (los nucleótidos 643 hasta 720), con respecto a la gp41 de la HAM112 natural, que engloba una región muy hidrófoba (H) (región transmembranal) de la gp41. Por lo tanto, la longitud completa del gen sintético de la gp41 es de 327 aminoácidos.

- En los oligonucleótidos sintéticos, los codones del VIH-1 natural fueron alterados para que se adecuaron al sesgo de codones de *E. coli* en un esfuerzo por aumentar los niveles de expresión de la proteína recombinante en *E. coli*. Véase, por ejemplo, M. Gouy y C. Gautier, *Nucleic Acids Research* 10: 7055 (1982); H. Grosjean y W. Fiers, *Gene* 18: 199 (1982); J. Watson y col. (eds.), *Molecular Biology of the Gene*, 4ª Ed., Benjamin Ku mMing Publishing Co., pág. 440 (1987). La estrategia de construcción génica implicó la síntesis de una serie de oligonucleótidos solapantes con extremos complementarios (Osyn-A hasta Osyn-L, representado como A hasta l). Cuando hibridaban, los extremos servían como cebadores para la extensión de la hebra complementaria.
- Entonces los fragmentos fueron amplificados mediante PCR. Este proceso ("tejido" de oligonucleótidos mediante PCR) y se reiteró para agrandar progresivamente el fragmento de gen. Se diseñó el oligonucleótido Osyn-5' para su clonación en el vector PL pKRR826. El vector de expresión, pKRR826, es una forma modificada del promotor lambda pL del vector pSDKR816, descrito en el N° de serie de EE.UU. 08/314.570. El pKRR826 es un derivado de un elevado número de copias de pBR322 que contiene el gen el represor cl sensible a la temperatura (Benard y col., *Gene* 5: 59). Sin embargo, el pKRR826 carece del terminador de la traducción mmBt1 y tiene los promotores lambda pL y lambda pR en orientación inversa con respecto al pSDKR816. La región policonectora del pKRR826 contiene los sitios de las enzimas de restricción Eco R1 y Bam H1 pero carece del codón de inicio ATG. La expresión óptima se obtiene cuando el extremo 5' del inserto génico (incluyendo una metionina N-terminal) se clona en el sitio Eco R1. El Osyn-5' fue diseñado para contener un sitio de restricción Eco R1 para la clonación y un codón ATG (metionina) para proporcionar un inicio de la traducción adecuado de las proteínas recombinantes. Los oligonucleótidos antisentido Osyn-03' (ID. SEC. N°: 15), Osyn-P3' (ID. SEC. N°: 16) y Osyn-M (M) (ID. SEC. N°: 14) contienen cada uno dos codones de terminación de la traducción secuenciales (TAA, TAG) y un sitio de restricción Bam H1. Cuando se usaron los cebadores exteriores Osyn-5' (ID. SEC. N°: 11) y Osyn-M (M) (ID. SEC. N°: 14) se sintetizó un gen completo de la gp41 (327 aminoácidos) (pGO-11PL; ID. SEC. N°: 52). Los oligonucleótidos exteriores Osyn-5' (ID. SEC. N°: 11) y Osyn-03' (ID. SEC. N°: 15) dieron como resultado un producto truncado de la gp41 de 199 aminoácidos (pGO-9PL; ID. SEC. N°: 48). Alternativamente, los oligonucleótidos exteriores Osyn-5' (ID. SEC. N°: 11) y Osyn-P3' (ID. SEC. N°: 16) dieron como resultado un producto truncado de la gp41 de 169 aminoácidos de longitud (pGO-8PL; ID. SEC. N°: 58).
- Los genes sintéticos también fueron expresados como proteínas de fusión de la sintetasa CMP-KDO (CKS). La transferencia mediada por PCR de los genes sintéticos desde pKRR826 a pJO200 (descrita en el N° de serie de EE.UU. 572.822) se consiguió con un cebador de PCR de un oligonucleótido sentido exterior alternativo (extremo 5'), Osyn-5'CKS (ID. SEC. N°: 25). El Osyn-5'CKS contenía un sitio de restricción Eco R1 y dio como resultado una fusión en marco del inserto génico sintético en CKS en el vector de expresión pJO200. Se usaron los cebadores externos 3' (antisentido) Osyn-M (ID. SEC. N°: 14), Osyn-O3' (ID. SEC. N°: 15) y Osyn-P3' (ID. SEC. N°: 16) junto con Osyn-5'CKS (ID. SEC. N°: 25) para generar pGO-11CKS (ID. SEC. N°: 54), pGO-9CKS (ID. SEC. N°: 50) y pGO-8 CKS (ID. SEC. N°: 60), respectivamente. Estas etapas se detallan a continuación en este documento.

A. Tejido mediante PCR de oligonucleótidos sintéticos.

- Se realizaron tres reacciones de PCR (volumen de 100 µl) como sigue:

- (1) Reacción 1B: polimerasa de ADN AmpliTaq (2,5 U) y 1X de tampón, junto con 40 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 25 pmol de cada uno de los oligonucleótidos Osyn-A (ID. SEC. N°: 3) y Osyn-D (ID. SEC. N°: 5) y 0,25 pmol de cada uno de los oligonucleótidos Osyn-B (ID. SEC. N°: 17) y Osyn-C (ID. SEC. N°: 4);
- (2) Reacción 2A: polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con MgCl₂ 1,5 mM, 40 µM de cada dNTP, 25 pmol de cada uno de los oligonucleótidos Osyn-E (ID. SEC. N°: 6) y Osyn-H (ID. SEC. N°: 9) y 0,25 pmol de cada uno de los oligonucleótidos Osyn-F (ID. SEC. N°: 7) y Osyn-G (ID. SEC. N°: 8); y
- (3) Reacción 3A: polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con MgCl₂ 1,5 mM, 40 µM de cada dNTP, 25 pmol de cada uno de los oligonucleótidos Osyn-I (ID. SEC. N°: 10) y Osyn-L (ID. SEC. N°: 13) y 0,25 pmol de cada uno de los oligonucleótidos Osyn-J (ID. SEC. N°: 18) y Osyn-K (ID. SEC. N°: 12).

- Las amplificaciones consistieron en 20 ciclos de 97 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 60 segundos. Después las reacciones se incubaron a 72 °C durante 7 minutos y se mantuvieron a 4 °C. Los productos derivados de la PCR 1B, 2A y 3B se aislaron en gel en un gel de agarosa al 1 %.

B. Tejido mediante PCR de los productos de la PCR de la Reacción 1B y de la Reacción 2A.

- Se preparó una reacción de PCR con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con MgCl₂ 1,5 mM, 40 µM de cada dNTP, 24,4 pmol del oligonucleótido Osyn-5' (ID. SEC. N°: 11), 25 pmol del oligonucleótido Osyn-P3' (ID. SEC. N°: 16) y ~ 10 ng de cada uno de los productos aislados en gel 1B y 2A del Ejemplo 3, Sección 1A, anteriormente en este documento. Las condiciones de ciclación eran las mismas que las del Ejemplo 3, Sección 1A. Se usó una segunda ronda de amplificación para generar más producto deseado. Esto se realizó elaborando una mezcla UITma según se describió anteriormente en este documento (volumen de reacción de 100 µl) con 49 pmol de

Osyn-5' (ID. SEC. N°: 11), 50 pmol de Osyn-P3' (ID. SEC. N°: 16) y 5 µl del producto de la PCR de la primera ronda como molde. Estas reacciones se incubaron a 94 °C durante 90 segundos y después se ciclaron como anteriormente (Sección 3A). El producto de la PCR Osyn-5' / Osyn-P3' se aisló en gel según se describió anteriormente en este documento.

5

C. Clonación del producto de la PCR Osyn-5'-Osyn-P3'.

El producto de la PCR Osyn-5'-Osyn-P3' se digirió con las endonucleasas de restricción Eco R1 + Bam H1 y se ligó en el vector pKRR826 (descrito anteriormente en este documento) que había sido digerido con Eco R1 + Bam H1 y aislado en gel. El producto de la ligación se usó para transformar células competentes DH5α. El clon deseado fue identificado mediante PCR de colonias mediante el uso de los oligonucleótidos pKRREcoR1 directo (ID. SEC. N°: 38) y pKRRBamH1 inverso (ID. SEC. N°: 39). El ADN Miniprep se preparó a partir de un cultivo de una noche del clon candidato pGO-8 A2, y el inserto del plásmido Osyn-5'-Osyn-P3' se secuenció con los cebadores de oligonucleótidos pKRREcoR1 directo (ID. SEC. N°: 38), pKRRBamH1 inverso (ID. SEC. N°: 39), 41sy-1 (ID. SEC. N°: 44) y 41sy-2 (ID. SEC. N°: 41).

10

15

D. Modificación del clon candidato pGO-8 A2.

Se preparó un volumen de reacción de PCR de 100 µl con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón, junto con MgCl₂ 1,5 mM, 40 µM de cada dNTP, 50 pmol de los oligonucleótidos Osyn-5'-repair (ID. SEC. N°: 24), 50 pmol de Osyn-P3' (ID. SEC. N°: 16) y ~ 1 ng del ADN miniprep del clon candidato pGO-8 A2 como molde (obtenido a partir de las reacciones establecidas anteriormente en este documento). La reacción se incubó a 94 °C durante 90 segundos y después se amplificó con 20 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 60 segundos. El producto de la PCR Osyn-5'-repair / Osyn-P3' se aisló después en gel y se digirió con Eco R1 + Bam H1. El producto digerido se ligó en el vector pKRR826 digerido con Eco R1 + Bam H1. El producto de la ligación se usó para transformar células competentes DH5α. El clon deseado fue identificado mediante PCR de colonias mediante el uso de los oligonucleótidos pKRREcoR1 directo (ID. SEC. N°: 38) y pKRRBamH1 inverso (ID. SEC. N°: 39). Se estableció un cultivo de una noche del clon candidato 6 de pGO-8 y se preparó un ADN miniprep. El inserto del plásmido Osyn-5'-repair / Osyn-P3' se secuenció con los cebadores de los oligonucleótidos pKRREcoR1 directo (ID. SEC. N°: 38), pKRRBamH1 inverso (ID. SEC. N°: 39), 41sy-1 (ID. SEC. N°: 44) y 41 sy-2 (ID. SEC. N°: 41). Basándose en los resultados de la secuenciación, el clon candidato #6 de pGO-8 se designó como pGO-8PL/DHSα. La ID. SEC. N°: 57 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante. La FIGURA 5 presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-8PL (ID. SEC. N°: 58). La proteína recombinante pGO-8PL consiste en una metionina N-terminal, 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112) y 169 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM112).

20

25

30

35

E. Construcción del pGO-8CKS/XL1.

El pGO-8CKS/XL1 (la ID. SEC. N°: 59 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante) codifica para la proteína recombinante pGO-8CKS. La FIGURA 6 presenta la secuencia de aminoácidos de pGO-8CKS (ID. SEC. N°: 60). Esta proteína consiste en 246 aminoácidos de CKS / policonector, 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM112) y 169 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM112). La construcción del pGO-8CKS/XL1 se realizó como sigue.

40

45

50

55

60

Se preparó una reacción de PCR (volumen de 100 µl) con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con MgCl₂ 1,5 mM, 40 µM de cada dNTP, 50 pmol de Osyn-5'CKS (ID. SEC. N°: 25), 50 pmol de Osyn-P3' (ID. SEC. N°: 16) y 1 ng de ADN miniprep del clon #6 de pGO-8PL. La reacción se incubó a 94 °C durante 90 segundos, después se amplificó con 25 ciclos de 94 °C durante 30 segundos; 55 °C durante 30 segundos; 72 °C durante 90 segundos. Entonces, el producto de la PCR Osyn-5'CKS / Osyn-P3' se aisló en gel. Eco R1 + Bam H1 digirieron el producto de la PCR Osyn-5'CKS / Osyn-P3' PCR y el vector pJ0200. El vector digerido pJ0200 se aisló en gel y se ligó al producto digerido de la PCR Osyn-5'CKS / Osyn-P3'. Se transformaron células supercompetentes XL1-Blue con la ligación y se colocaron en placas con LB + ampicilina complementadas con glucosa 20 mM. Las colonias se sembraron de nuevo por estrías para su aislamiento en el mismo tipo de placas. Un cultivo de una noche del clon pGO-8CKS/XL1 se hizo crecer en medio LB + 100 µg/ml de carbenicilina (Sigma Chemical Co.) + glucosa 20 mM (Sigma Chemical Co.). Se elaboraron reservas congeladas (0,5 ml de cultivo de una noche + 0,5 ml de glicerol) y se preparó ADN para el análisis de la secuencia. Se usaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores de secuenciación: CKS-1 (ID. SEC. N°: 30), CKS-2 (ID. SEC. N°: 31), CKS-3 (ID. SEC. N°: 32), CKS-4 (ID. SEC. N°: 33), 43461 (ID. SEC. N°: 2), 43285 (ID. SEC. N°: 1), 41sy-1B (ID. SEC. N°: 29), 41sy-2B (ID. SEC. N°: 34), CKS176.1 (ID. SEC. N°: 19) y CKS3583 (ID. SEC. N°: 20).

F. Construcción del pGO-9PL/DH5α.

Las FIGURAS 3A hasta 3D muestran una representación diagramática de las etapas implicadas en la construcción del pGO-9PL/DH5α. El pGO-9PL/DH5α codifica para la proteína recombinante pGO-9PL. La ID. SEC. N°: 47 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante de pGO-9PL/DH5α. La FIGURA 7 ilustra la secuencia

65

de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-9PL (ID. SEC. N°: 48). Esta proteína consiste en una metionina N-terminal, 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM112) y 199 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112). La construcción del pGO-9PL/DH5 α se realizó como sigue.

5 Etapa 1: se preparó una reacción de PCR de 100 μ l con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con MgCl₂ 1,5 mM, 40 μ M de cada dNTP, 50 pmol de Osyn-5' (ID. SEC. N°: 11), 50 pmol de Osyn-H (ID. SEC. N°: 9) y -2 ng de ADN miniprep del clon candidato #6 de pGO-8 (obtenido del Ejemplo 3, Sección D, anteriormente en este documento) como molde. La reacción se incubó a 94 °C durante 120 segundos y después se amplificó con 8 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 60 segundos.

10 Etapa 2: se preparó una reacción de PCR de 100 μ l con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con MgCl₂ 1,5 mM, 40 μ M de cada dNTP, 50 pmol de Osyn-5' (ID. SEC. N°: 11), 50 pmol de Osyn-03' (ID. SEC. N°: 15) y 10 μ l de la reacción de PCR de la etapa 1 como molde. La reacción se incubó a 94 °C durante 120 segundos, después se amplificó con 18 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos, seguido de una incubación a 72 °C durante 5 minutos.

20 El producto de la PCR Osyn-5' / Osyn-03' (2A / 2B) se aisló después en gel y se digirió con Eco R1 + Bam H1. El producto digerido se ligó en el vector pKRR826 digerido con Eco R1 + Bam H1. El producto de la ligación se usó a continuación para transformar células competentes DH5 α . Se preparó un cultivo de una noche del clon candidato 3 de pGO-9PL y se preparó un ADN miniprep. El inserto del plásmido Osyn-5' / Osyn-03' se secuenció con los siguientes oligonucleótidos como cebadores: pKRREcoR1 directo (ID. SEC. N°: 38), pKRRBamH1 inverso (ID. SEC. N°: 39), 41sy-1C (ID. SEC. N°: 40), 41sy-2 (ID. SEC. N°: 41), 41sy-3 (ID. SEC. N°: 42) y 41 sy-4 (ID. SEC. N°: 23). Entonces el clon p#3 de GO-9PL se sembró de nuevo por estrías para su aislamiento. Se recogió una colonia aislada y se hizo crecer en un cultivo de una noche, y se elaboró una reserva congelada (0,5 ml de glicerol + 0,5 ml de cultivo de una noche).

30 La reserva se almacenó a -80 °C. La secuencia se confirmó mediante el uso de los cebadores indicados anteriormente en este documento y este clon se designó como pGO-9PL/DH5 α (la ID. SEC. N°: 47 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante, y la ID. SEC. N°: 48 presenta la secuencia de aminoácidos de la región codificante). El pGO-9PL/DH5 α se sembró de nuevo por estrías, se hizo crecer en un cultivo de una noche, y se preparó un ADN miniprep (este prep se designó como H5).

35 G. Construcción del pGO-9CKS/XL1

Las FIGURAS 3A hasta 3D muestran una representación diagramática de las etapas implicadas en la construcción del pGO-9CKS/YL1. El pGO-9CKS/XL1 codifica para la proteína recombinante pGO-9CKS. La FIGURA 8 presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-9CKS (ID. SEC. N°: 50). Esta proteína consiste en 246 aminoácidos de CKS y policonector, seguido de 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112) y 199 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112). La construcción del pGO-9CKS/XL1 se realizó como sigue.

45 Se prepararon dos reacciones de PCR (volumen de 100 μ l) con polimerasa de ADN UITma (3U) y 1X de tampón junto con MgCl₂ 1,5 mM, 40 μ M de cada dNTP, 50 pmol de Osyn-5'CKS (ID. SEC. N°: 25), 50 pmol de Osyn-03' (ID. SEC. N°: 15) y 1 ng de ADN miniprep del clon candidato 3 pGO-9PL (obtenido del Ejemplo 3, Sección F, anteriormente en este documento). Cada reacción se incubó a 94 °C durante 120 segundos, después se amplificó con 24 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 120 segundos, seguido de una incubación a 72 °C durante 5 minutos. El producto de la PCR Osyn-5'CKS / Osyn-03' PCR se aisló después en gel. El producto de la PCR Osyn-5'CKS / Osyn-03' PCR y el vector pJO200 se digirieron con Eco R1 + Bam H1. El vector digerido pJO200 se aisló en gel y se ligó con el producto de la PCR digerido Osyn-5'CKS / Osyn-03'. Se transformaron células supercompetentes XL1-Blue con la ligación y se colocaron en placas de LB + ampicilina complementadas con glucosa 20 mM. Las colonias se sembraron de nuevo por estrías para su aislamiento en el mismo tipo de placas. Se hizo crecer un cultivo de una noche del clon candidato 4 pGO-9CKS en medio LB + 100 mg/ml de carbenicilina (Sigma Chemical Co.) + glucosa 20 mM (Sigma Chemical Co.). Se elaboraron reservas congeladas (0,5 ml de cultivo de una noche + 0,5 ml de glicerol) y se preparó ADN para el análisis de la secuencia.

50 Se usaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores de secuenciación: CKS-1 (ID. SEC. N°: 30), CKS-2 (ID. SEC. N°: 31), CKS-3 (ID. SEC. N°: 32), CKS-4 (ID. SEC. N°: 33), 43461 (ID. SEC. N°: 2), 43285 (ID. SEC. N°: 1), 41sy-1B (ID. SEC. N°: 29), 41sy-2B (ID. SEC. N°: 34), 41sy-3B (ID. SEC. N°: 35), CKS176.1 (ID. SEC. N°: 19), CKS3583 (ID. SEC. N°: 20) y pTB-S8 (ID. SEC. N°: 28). El clon candidato 4 pGO-9CKS se designó como pGO-9CKS/XL1 (la ID. SEC. N°: 49 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante, y la ID. SEC. N°: 50 presenta la secuencia de aminoácidos de la región codificante).

60 H. Construcción del fragmento Osyn I-M.

El fragmento Osyn-O-M se construyó como sigue. Se preparó una reacción de PCR de 100 µl mediante el uso de polimerasa de ADN AmpliTaq (2,5 U), 1X de tampón, 50 µM de cada dNTP, 50 pmol de 1-PCR (ID. SEC. N°: 26), 50 pmol de Osyn-M (ID. SEC. N°: 14) y 10 ng de fragmento de PCR aislado en gel 3A (Ejemplo 3, sección A, anteriormente en este documento). La reacción se incubó a 95 °C durante 105 segundos y después se amplificó con 15 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos y después se mantuvo a 72 °C durante 7 minutos. El producto, designado como Osyn I-M, se aisló en gel y se clonó en el vector PCR II (kit de clonación TA; Invitrogen, San Diego, CA) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. El producto de ligación resultante se usó para transformar células competentes DH5α. Se generó un plásmido de ADN miniprep a partir de una noche del clon IM-6 y el inserto génico se secuenció con los oligonucleótidos 56759 (ID. DE SECUENCIA N°: 45) y 55848 (ID. SEC. N°: 46).

I. Síntesis y tejido de los fragmentos de la PCR I/6R e IM-6F.

Estos procedimientos se realizaron como sigue.

Etapas 1: se prepararon las siguientes reacciones de PCR (volumen de 100 µl): (a) I/6R con polimerasa de ADN AmpliTaq (2,5 U), 1X de tampón, 50 µM de cada dNTP, 50 pmol de I-PCR (ID. SEC. N°: 26), 50 pmol de IM-6R (ID. SEC. N°: 22) y 281 ng del clon IM-6 (obtenido a partir del Ejemplo 3, Sección H) como molde; (b) 6F/M con polimerasa de ADN AmpliTaq (2,5 U), 1X de tampón, 50 mM de cada dNTP, 50 pmol de IM-6F (ID. SEC. N°: 21), 50 pmol de M-PCR (ID. SEC. N°: 27) y 281 ng del clon IM-6 (obtenido a partir del Ejemplo 3, Sección H) como molde.

Las reacciones se incubaron a 95 °C durante 105 segundos y después se amplificaron con 20 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos, después se incubaron a 72 °C durante 7 minutos. A continuación los productos de la PCR I/6R y 6F/M se aislaron en gel siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en este documento.

Etapas 2: se preparó una reacción de PCR (volumen de 100 µl) con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con 1,5 mM de MgCl₂, 40 µM de cada dNTP, 50 pmol de I-PCR (ID. SEC. N°: 26), 50 pmol de M-PCR (ID. SEC. N°: 27), ~ 50 ng de I/6R y ~ 20 ng de 6F/M. La reacción se incubó a 95 °C durante 105 segundos y después se amplificó con 20 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 60 segundos, seguido de una incubación a 72 °C durante 7 minutos. El producto de la PCR fue procesado en una columna Centrisep (Princeton Separations) siguiendo las instrucciones del fabricante.

J. Construcción del pGO-11PL/DH5α.

Las FIGURAS 4A hasta 4F muestran una representación diagramática de las etapas implicadas en la construcción del pGO-11PL/DH5α. El pGO-11PL/DH5α codifica para la proteína recombinante pGO-11PL. La FIGURA 9 presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-11PL (ID. SEC. N°: 52). Esta proteína consiste en una metionina N-terminal, 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112) y 327 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112). El pGO-11PL/DH5α se construyó como sigue.

El producto final de la PCR del Ejemplo 3, Sección I, y el vector pGO-9PL (miniprep H5 del Ejemplo 3, sección F) fueron digeridos secuencialmente con Age I y Bam H1. El digerido pGO-9PL se trató después con fosfatasa alcalina intestinal bovina (BRL Life Technologies) durante 15 minutos a 37 °C, se extrajo con fenol / cloroformo y se precipitó con NaOAc y EtOH. Subsecuentemente el vector (pGO-9PL) se aisló en gel. El digerido pGO-9PL y el producto digerido de la PCR se ligaron y el producto de la ligación se usó para transformar células competentes DH5α. Se sembraron de nuevo por estrías para su aislamiento. Entonces se identificó el clon pGO11-4 y se sembró de nuevo por estrías para su aislamiento. Se preparó un cultivo de una noche de pGO11-4 con objeto de generar reservas congeladas y ejecutar el ADN miniprep para la secuenciación. Se secuenció el clon pGO11-4 con los siguientes cebadores de oligonucleótidos: pKRREcoR1 directo (ID. SEC. N°: 38), pKRRBamH1 inverso (ID. SEC. N°: 39), 41sy-1C (ID. SEC. N°: 40), 41 sy-2 (ID. SEC. N°: 41), 4 1 sy-3 (ID. SECUENCIA N°: 42), 41sy-4 (ID. SEC. N°: 23), 41sy-5B (ID. SEC. N°: 43), 41sy-SC (ID. SEC. N°: 36) y 41sy-6B (ID. SEC. N°: 37). Basándose en los resultados de la secuenciación, este clon se designó como pGO-11PL/DH5α (la ID. SEC. N°: 51 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante, y la ID. SEC. N°: 52 presenta la secuencia de aminoácidos de la región codificante).

K. Construcción del pGO-11CKS/XL1.

Las FIGURAS 4A hasta 4G muestran una representación diagramática de las etapas implicadas en la construcción del pGO-11CKS/XL1. El pGO-11CKS/XL1 codifica para la proteína recombinante pGO-11CKS. La FIGURA 10 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-11CKS (ID. SEC. N°: 54). Esta proteína consiste en 246 aminoácidos de CKS y el policonector, seguido de 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112) y 327 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112). El pGO-11CKS/XL1 se construyó como sigue.

Se preparó una reacción de PCR (volumen de 100 μ l) con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con 1,5 μ M de $MgCl_2$, 40 μ M de cada dNTP, 50 pmol de Osyn-5'CKS (ID. SEC. N°: 25), 50 pmol de Osyn-M (ID. SEC. N°: 14) y 1 ng de pGO11-4 (obtenido a partir del Ejemplo 3, Sección J) como molde. La reacción se incubó a 94 °C durante 105 segundos y después se amplificó con 20 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 120 segundos, seguido de una incubación a 72 °C durante 7 minutos. El producto de la PCR Osyn-5'CKS / Osyn-M se aisló en gel. Después se digirieron el producto de la PCR Osyn-5'CKS / Osyn-M y el vector pJO200 con Eco R1 + Bam H1. El vector digerido pJO200 se aisló en gel. Se prepararon ligaciones de una noche (16 °C) con el producto digerido de la PCR. Se transformaron células supercompetentes XL1-Blue con la ligación y se colocaron en placas de LB + ampicilina complementadas con glucosa 20 mM. Las colonias se sembraron de nuevo por estrías para su aislamiento en las mismas placas. Después se preparó un cultivo de una noche (medio LB + 100 μ g/ml de carbenicilina + glucosa 20 mM) del clon candidato 2 pGO-11CKS. Se elaboraron reservas congeladas (0,5 ml de glicerol al 80 % + 0,5 ml durante una noche de cultivo) así como el ADN miniprep para la secuenciación. Se usaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores para el análisis de la secuencia: CKS-1 (ID. SEC. N°: 30), CKS-2 (ID. SEC. N°: 31), CKS-3 (ID. SEC. N°: 32), CKS-4 (ID. SEC. N°: 33), 43461 (ID. SEC. N°: 2), 43285 (ID. SEC. N°: 1), 41sy-1B (ID. SEC. N°: 29), 41sy-2B (ID. SEC. N°: 34), 41sy-3B (ID. SEC. N°: 35), 41sy-4 (ID. SEC. N°: 23), 41sy-5C (ID. SEC. N°: 36), 41sy-6B (ID. SEC. N°: 37), CKS176.1 (ID. SEC. N°: 19), CKS3583 (ID. SEC. N°: 20) y pTB-S8 (ID. SEC. N°: 28). El clon #2 pGO-11CKS se designó como pGO-11CKS/XL1. La ID. SEC. N°: 53 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante de pGO-11CKS/XL1 y la ID. SEC. N°: 54 presenta la secuencia de aminoácidos de la región codificante de pGO-11CKS/XL1.

Ejemplo 4

Construcción del pVIH210/XL1-Blue

La FIGURA 11 presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pVIH-210 (ID. SEC. N°: 55). Esta proteína consiste en 247 aminoácidos de las secuencias de CKS / conector, 60 aminoácidos de la gp120 de la *env* (#432 - 491; cepa clínica D194.10 del VIH-2) y 159 aminoácidos de la gp36 de la *env* (#492 - 650; cepa clínica D194.10 del VIH-2). La construcción del pVIH210/XL1-Blue se realizó como sigue.

Se clonó el ADN genómico de la cepa clínica del VIH-2 D194.10 [H. Kuhnel y col., *Nucleic Acids Research* 18: 6142 (1990)] en el vector de clonación EMBL3 lambda. Véase H. Kuhnel y col., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.* 86: 2383 - 2387 (1989) y H. Kuhnel y col., *Nucleic Acids Research* 18: 6142 (1990). El clon lambda que contiene D194.10 (lambda A10) se obtuvo en Diagen Corporation (Dillseldorf, Germany). Se preparó una reacción de PCR (volumen de 100 μ l) mediante el uso de polimerasa de ADN AmpliTaq (3,75 unidades), 200 μ M de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0,5 μ g del cebador 3634 (ID. SEC. N°: 88; hibridación en las posiciones 7437 - 7455 en la cepa clínica D194.10 del VIH-2 (número de acceso de EMBL #X52223), 0,5 μ g del cebador 3636 (ID. SEC. N°: 89; hibridación en las posiciones 8095 - 8077), 1X de tampón de PCR y 5 μ l del ADN lambda A10 diluido a 1:50. La reacción se incubó durante 5 minutos a 94 °C después se amplificó con 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 45 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 2 minutos; seguido de una incubación a 72 °C durante 5 minutos. La reacción de PCR se extrajo con fenol / cloroformo (Boehringer Mannheim Corporation, Indianápolis, IN) y el ADN se precipitó con etanol (AAPER Alcohol & Chemical Company, Shelbyville, KY). El ADN se digirió con Eco R1 + Bam H1 y se purificó en gel de agarosa al 1,5 % (SeaKem GTG agarose, FMC Corporation, Rockland, Maine). El producto purificado se ligó en el vector pJO200 digerido con Eco R1 + Bam H1 mediante el uso de 800 unidades de ligasa T4 de ADN (New England BioLabs). Se transformaron células supercompetentes XL1-Blue (Stratagene) con 2 μ l de la ligación, según detalla el fabricante, y se colocaron en placas LB complementadas con ampicilina (Sigma Chemical Company). Se establecieron cultivos de una noche mediante la inoculación de colonias individuales en medio Superbroth II (GIBCO BRL, Grand Island, NY) complementado con 50 μ g/ml de ampicilina (Sigma) y glucosa 20 mM (Sigma). Se establecieron reservas congeladas mediante la adición de 0,3 ml de glicerol al 80 % a 0,7 ml de durante una noche. Después de la mezcla, las reservas se almacenaron a -70 °C. Se preparó ADN miniprep a partir de los cultivos de una noche mediante el uso del procedimiento de lisis alcalina, seguido de una precipitación con PEG. Las reacciones de secuenciación se realizaron con un kit de reactivos 7-desaza-dGTP con Sequenase Versión 2.0 (United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH) según detalla el fabricante. Las reacciones se realizaron en geles de acrilamida al 6 % (GIBCO BRL Gel-Mix 6) mediante el uso del aparato de gel IBI según recomienda el fabricante. Basándose en los resultados de las secuencias, el clon gel #7 de pVIH-210 se designó como pVIH-210. La secuencia de aminoácidos de la región codificante pVIH-210 se presenta como la ID. SEC. N°: 55.

Ejemplo 5

Crecimiento e inducción de cepas de *E. coli* con el constructo de antígeno recombinante gp41 del VIH-7 del Grupo O

Se prepararon cultivos de siembra de una noche de pGO-9CKS/XL1 y de pGO-11CKS/XL en 500 ml de suero estéril Excell Terrific (disponible en Sigma Chemical Corp., St. Louis Mo.) complementado con 100 μ g/ml de ampicilina sódica y colocado en una estufa de incubación orbital en agitación a 32 °C o a 37 °C. Se transfirieron inóculos de cien mililitros (100 ml) desde los cultivos de siembra a los matraces que contenían 1 litro de suero estéril Excell

Terrific complementado con 100 µg/ml de ampicilina sódica. Los cultivos se incubaron a 37 °C hasta que alcanzaron un crecimiento semilogarítmico, y después se indujeron con ITPG (isopropiltiogalactósido) 1 mM durante 3 horas a 37 °C. (En el caso de constructos de vectores PL, los cultivos se incubaron a 32 °C hasta que alcanzaron un crecimiento semilogarítmico, y después se indujeron durante 3 horas cambiando las temperaturas de los cultivos a 42 °C.) Después del periodo de inducción, las células se sedimentaron mediante centrifugación y se recogieron siguiendo procedimientos estándar. Las células sedimentadas se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento adicional.

Ejemplo 6

Aislamiento y solubilización del antígeno recombinante gp41 del VIH-1 del Grupo O producido como cuerpos de inclusión insolubles en *E. coli*

Las células congeladas obtenidas del Ejemplo 5 se resuspendieron mediante homogenización en tampón de lisis frío que comprende Tris 50 mM a pH 8, Na EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, 8 % (p/v) de sacarosa, Triton X-100® al 5 % (v/v), PMSF 1 mM y pepstatina A 1 µM. Se añadió lisozima a los homogeneizados a una concentración de 1,3 mg por gramo de células procesadas, y la mezcla resultante se incubó durante 30 minutos en hielo para lisar las células. Los cuerpos de inclusión se separaron a partir de proteínas solubles mediante centrifugación. Estos cuerpos de inclusión sedimentados se lavaron y se sedimentaron secuencialmente en (1) tampón de lisis; (2) Na EDTA 10 mM a pH 8, 30 % (p/v) de sacarosa; y (3) agua. Los cuerpos de inclusión lavados se resuspendieron en Tris 50 mM a pH 8, Na EDTA 10 mM, NaCl 150 mM y urea 3 M y se incubaron en hielo durante 1 hora. Los cuerpos de inclusión se separaron entonces de las proteínas solubilizadas mediante centrifugación. Los cuerpos de inclusión sedimentados se solubilizaron completamente en guanidina-HCl 7 M, Tris 50 mM a pH 8, beta-mercaptoetanol (BME) al 0,1 % (v/v) durante una noche a 4 °C. Los antígenos recombinantes solubilizados se clarificaron mediante centrifugación, se pasaron a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenaron a -20 °C hasta su purificación mediante cromatografía.

Ejemplo 7

Purificación del antígeno recombinante gp41 del VIH-1 del Grupo O mediante cromatografía

Los antígenos recombinantes solubilizados gp41 del VIH-1 del Grupo O obtenidos a partir del Ejemplo 6 se purificaron mediante un procedimiento en dos etapas, como sigue. Los extractos en guanidina-HCl de los antígenos insolubles se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna Sephacril S-300 equilibrada con Tris 50 mM a pH 8, urea 8 M y BME al 0,1 % (v/v). Se usó una electroforesis en SDS-poliacrilamida para analizar las fracciones. Las fracciones que contienen el antígeno recombinante gp41 se agruparon y después se concentraron mediante ultrafiltración. El concentrado de antígeno recombinante se trató con SDS al 4 % (p/v) y con BME al 5 % (p/v) a temperatura ambiente durante 3 horas. El antígeno tratado con SDS se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna de Sephacril S-300 equilibrada con Tris 25 mM a pH 8, NaCl 0,15 M, BME al 0,1 % v/v, SDS al 0,1 % (p/v). Se usó una electroforesis en SDS-poliacrilamida para analizar las fracciones. Las fracciones que contienen el antígeno recombinante se agruparon, se pasaron a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenaron a -70 °C.

Ejemplo 8

Preparación del antígeno del VIH-1 del Grupo M

Las células que contienen el plásmido pTB319 se hicieron crecer y se indujeron según se describe en el Ejemplo 5. Las células se lisaron y los cuerpos de inclusión fueron procesados esencialmente según se describe en el Ejemplo 5 de la patente de EE.UU. N° 5.124.255. El material sedimentado se solubilizó subsiguientemente en SDS, fosfato, pH 6,8, y después se sometió a una cromatografía en una columna S-300.

Ejemplo 9

Preparación del antígeno del VIH-2

Se hicieron crecer células pVIH-210/XL1-Blue (Ejemplo 4, anteriormente en este documento) y se indujeron según se describe en el Ejemplo 5. Las células se lisaron con un tampón que contenía fosfato, MgCl₂, Na EDTA, Triton X-100® a pH 7,4 complementado con benzonasa, lisozima y PMSF. Los cuerpos de inclusión se separaron de las proteínas solubles mediante centrifugación. El sedimento se lavó secuencialmente con: H₂O destilada; Triton X-100®, desoxicolato, NaCl, fosfato pH 7,0; fosfato 50 mM, pH 7,0; urea, SDS en fosfato, pH 7,0 + BME. Las proteínas se solubilizaron en SDS, fosfato, pH 7,0 y BME, y después se sometieron a una cromatografía en una columna S300.

Ejemplo 10

Ensayo inmunocromatográfico en una etapa para la detección y la diferenciación simultáneas del VIH-1 del Grupo M, del VIH-1 del Grupo O y del VIH-2

A. Preparación del reactivo

- 5 1. Se preparó una suspensión de selenio (Se) coloidal sustancialmente como sigue: se disolvió SeO_2 en agua hasta una concentración de 0,0625 gm/ml. Entonces se disolvió ascorbato en agua hasta una concentración de 0,32 gm/ml y se calentó en un baño de agua a 70 °C durante 24 horas. Entonces la disolución de ascorbato se diluyó hasta 10 0,0065 gm/ml en agua. La disolución de SeO_2 se añadió rápidamente a la disolución diluida de ascorbato y se incubó a 42 °C. La incubación finalizó después de un mínimo de 42 horas, cuando la absorbancia máxima excedía 30 a una longitud de onda de entre 542 nm y 588 nm. La suspensión coloidal se enfrió hasta 2 - 8 °C, después se almacenó. La suspensión coloidal de selenio está disponible en Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois (Code 25001).
- 15 2. Se prepararon conjugados de selenio coloidal / anticuerpo como sigue. La suspensión de selenio coloidal se concentró hasta una absorbancia de 25 (DO 500 - 570) en agua destilada. Entonces, se añadió MOPS 1 M hasta una concentración final de 10 mM a pH 7,2. Se diluyeron anticuerpos de cabra específicos para la región Fc de la IgG humana (u otra especie de anticuerpo específica para la región Fc de la IgG) hasta una concentración de 0,75 mg/ml con tampón de fosfato 50 mM, y la preparación de anticuerpo resultante se añadió entonces con mezcla a la suspensión coloidal de selenio preparada como se describió anteriormente en este documento, hasta una concentración final de anticuerpo de 75 µg/ml. La agitación se continuó durante 40 minutos. Entonces, se añadió a la disolución un 1 % (en peso) de albúmina sérica bovina (BSA), y la disolución del conjugado de selenio coloidal / anticuerpo se agitó durante 15 minutos adicionales y se centrifugó a 5.000 x g durante 90 minutos. Después de esto se eliminó el 90 % del sobrenadante y el sedimento se resuspendió con el resto del sobrenadante. Inmediatamente antes de recubrir con este conjugado de selenio-IgG una almohadilla de fibra de vidrio, se diluyó a 1:10 con diluyente de conjugado (1 % [en peso] de caseína, 0,1 % [en peso] de Triton X-405® y Tris 50 mM, pH 8,2).
- 20 3. El reactivo de control del procedimiento se preparó como una mezcla de sueros positivos para el VIH-1 (grupo M), el VIH-1 (grupo O) y el VIH-2, y se utilizó en un dispositivo de tiras individual como control positivo del ensayo.
- 25 4. El reactivo de control negativo usado era el humano normal utilizado en un dispositivo de ensayo individual como control negativo del ensayo.

30 B. Preparación de la almohadilla de aplicación.

El material de la almohadilla de aplicación comprende papel de fibra de vidrio con resina unida (Lydall). Se aplicó aproximadamente 0,1 ml del conjugado preparado (descrito en el anterior párrafo 2) en la almohadilla de aplicación.

35 C. Preparación del material cromatográfico.

Todos los reactivos se aplican sobre una membrana de nitrocelulosa mediante la carga y el desvío de la inyección de reactivo. La nitrocelulosa está soportada por una membrana MYLAR® que está recubierta con un adhesivo sensible a la presión.

- 40 Los reactivos de captura de la muestra de prueba se prepararon mediante (a) la dilución del antígeno específico preparado según se describió anteriormente en este documento hasta una concentración de 0,5 mg/ml en diluyente de inyección (Tris 100 mM, pH 7,6 con un 1 % de sacarosa (en peso), NaCl al 0,9 % y 5 µg/ml de fluoresceína) para el reactivo de captura del VIH-1 del Grupo O (pGO-9/CKS, ID. SEC. N°: 50), (b) para el reactivo de captura del VIH-1 del Grupo M, subgrupo B (pTB319, ID. SEC. N°: 56) y (c) para el reactivo de captura del VIH-2 (pVIH-210, ID. SEC. N°: 55). Se aplicaron 0,098 µl de un primer reactivo de captura (reactivo del VIH-1 del Grupo M subgrupo B; ID. SEC. N°: 56) a la tira en la ubicación de captura designada y que constituía un sitio de captura de un paciente. De forma análoga, se aplicaron 0,098 µl de un segundo reactivo de captura (reactivo del VIH-1 del Grupo O; ID. SEC. N°: 50) a la tira en la ubicación de captura designada y que constituía un sitio de captura de un paciente y 0,098 µl de un tercer reactivo de captura (reactivo del VIH-2; ID. SEC. N°: 55) se aplicó a la tira en la ubicación de captura designada y que constituía un sitio de captura de un paciente.
- 50

D. Ensayo rápido para detectar la presencia de anticuerpos contra el VIH.

- 55 Se realizó un ensayo rápido para detectar la presencia de anticuerpos contra el VIH en muestras de prueba de suero, sangre completa, saliva y orina, como sigue. En un tubo de Eppendorf de 1,5 ml se mezclaron 5 µl de suero y 600 µl de tampón de elución de muestra (SEB) (que contiene Tris 50 mM, BSA al 1 % (p/v), Triton X-405® al 0,4 % (v/v), caseína al 1,5 % (p/v), IgG bovina al 3 % (p/v), lisado de *E. coli* al 4 % (v/v), [pH 8,2]). Se aplicaron cuatro gotas de esta mezcla al pocillo de la muestra del alojamiento STAR. Después, se añadió 1 µl de suero o de sangre completa a 100 µl de SEB a un pocillo de una placa de microtitulación y se añadió la tira de nitrocelulosa al pocillo. Después de esto se punteó 1 µl de suero o de sangre completa directamente en el dispositivo de ensayo del pocillo de la muestra de la inyección y se añadieron 4 gotas de SEB. Cuando se ensayaba la saliva, se añadieron 50 ó 75 µl de saliva a 50 µl o a 25 µl de SEB, respectivamente, en un pocillo de una placa de microtitulación, y después se añadió la tira de ensayo de nitrocelulosa al pocillo. Cuando se ensayaba la orina, se añadieron 50 µl de orina a 50 µl de SEB en un pocillo de una placa de microtitulación, y se añadió la tira de ensayo de nitrocelulosa al pocillo.
- 60
- 65

Alternativamente, se usaron 100 µl de orina en el pocillo de una placa de microtitulación y se añadió la tira de ensayo de nitrocelulosa, sin el uso de SEB.

5 La IgG de la muestra fue unida por el coloide de selenio-cabra anti-IgG humana de la almohadilla conjugada, y los complejos fueron cromatografiados a lo largo de la longitud de las tiras de ensayo de la membrana de nitrocelulosa sobre la que previamente se aplicaron los tres antígenos recombinantes pGO-9 CKS ID. SEC. N°: SO), pTB319 (VIH-1 del Grupo M (subgrupo B), ID. SEC. N°: 56) y pVIH210 (VIH-2, ID. SEC. N°: 55) a una concentración de 1 mg/ml mediante el uso de una máquina biodot, que proporcionaba una dispensación por desplazamiento positivo mediante el uso de tamaños de gota precisos. El dispositivo de ensayo se incubó después a temperatura ambiente durante dos minutos y los resultados se leyeron visualmente.

E. Ensayo de sangre completa adicionada.

15 En un tubo de Eppendorf de 1,5 ml se añadieron el equivalente de 1 µl de sangre confirmada positiva para el VIH-1 del Grupo O, el VIH-1 del Grupo M o el VIH-2, o de sangre completa confirmada negativa de la muestra de prueba para el VIH-1 del Grupo O, el VIH-1 del Grupo M o el VIH-2, a 5 µl de un suero confirmado negativo para el VIH-1 del Grupo O, el VIH-1 del Grupo M o el VIH-2, junto con 100 µl de SEB y se mezclaron. Esta mezcla se aplicó al pocillo de la muestra del dispositivo de ensayo de la invención.

20 La IgG de la muestra fue unida por el coloide de selenio-cabra anti-IgG humana de la almohadilla conjugada, y los complejos fueron cromatografiados a lo largo de la longitud de las tiras de ensayo de la membrana de nitrocelulosa sobre la que previamente se aplicaron los tres antígenos recombinantes pGO-9 CKS ID. SEC. N°: 50), pTB319 (VIH-1 del Grupo M (subgrupo B), ID. SEC. N°: 56) y pVIH210 (VIH-2, ID. SEC. N°: 55) a una concentración de 1 mg/ml mediante el uso de una máquina biodot, que proporcionaba una dispensación por desplazamiento positivo mediante el uso de tamaños de gota precisos. El dispositivo de ensayo se incubó después a temperatura ambiente durante dos minutos y los resultados se leyeron visualmente.

F. Resultados.

30 Si en la muestra de prueba estaba presente el anticuerpo contra el antígeno 1, se indicaba una reacción visible en el área de la zona de captura del antígeno 1 y en la zona de finalización del ensayo, y no en las zonas del antígeno 2 o del antígeno 3. Si en la muestra de prueba estaba presente el anticuerpo contra el antígeno 2, se indicaba una reacción visible en el área de la zona de captura del antígeno 2 y en la zona de finalización del ensayo, y no en las zonas del antígeno 1 o del antígeno 3. Si en la muestra de prueba estaba presente el anticuerpo contra el antígeno 3, se indicaba una reacción visible en el área de la zona de captura del antígeno 3 y en la zona de finalización del ensayo, y no en las zonas del antígeno 1 o del antígeno 2. También, un control negativo no debería ser reactivo (no muestra reacción visible) en las zonas del antígeno 1, del antígeno 2 y del antígeno 3, pero debería ser reactivo en la zona de finalización del ensayo. Un control positivo (anticuerpo conocido, reactivo contra el antígeno 1, 2 y/o 3) debería ser reactivo en la zona del antígeno apropiado al que se une específicamente en una reacción antígeno / anticuerpo. Un resultado se consideró inválido cuando se producía una reacción positiva en una de las zonas de captura del antígeno pero no en la zona de finalización del ensayo, y se repitió el ensayo.

45 (i) *Ensayo de anticuerpos en sangre, orina y saliva.* La sangre, la orina y la saliva de tres pacientes (identificados mediante los números de pacientes 0109, 4068 y 4475) se ensayaron sobre los dispositivos de nitrocelulosa en fase sólida de la invención según se describió en este documento y siguiendo el protocolo de ensayo según se estableció anteriormente en este documento. Cada muestra de prueba de sangre y de orina de cada paciente 0109, 4068 y 4475 era reactiva con el antígeno 1 (pTB319; ID. SEC. N°: 56). Las muestras de prueba de saliva de los pacientes 4068 y 4475 también fueron reactivas con el antígeno 1, mientras que la muestra de prueba de saliva del paciente 0109 no fue reactiva en el dispositivo de ensayo de la invención. La muestra de prueba de saliva del paciente 0109 se ensayó de nuevo posteriormente mediante un EIA estándar y se confirmó que no era reactiva para los anticuerpos contra la gp41 del VIH-1, lo que indicaba que los resultados obtenidos para la muestra de saliva del paciente 0109 eran válidos.

55 (ii) *Ensayo de muestras negativas para anticuerpos contra el VIH.* Se ensayaron dos sueros negativos y dos muestras de prueba de sangre completa negativas, cada una adicionada con dos sueros negativos. Las muestras no contenían anticuerpos específicos para los antígenos relevantes y las muestras de prueba eran negativas después del ensayo sobre la prueba (es decir, no había reactividad, indicado por ninguna barra visible significativa de una reacción en ninguna posición O, M o 2). La muestra de prueba estaba presente en cada dispositivo de ensayo, según lo indicaba una barra de reacción positiva zona de reactividad de la muestra de prueba.

60 (iii) *Ensayo de anticuerpos contra el VIH-1 del Grupo M.* Se ensayaron cinco sueros de VIH-1 del Grupo M y cinco muestras de sangre completa adicionadas con sueros positivos para el VIH-1 del Grupo M mediante el uso de diez dispositivos. Se observó que las muestras de VIH-1 del Grupo M contenían anticuerpos específicos para el antígeno del VIH-1 del Grupo M (pTB319) según demuestra el desarrollo de una línea de reacción en la zona de antígeno del VIH-1 del Grupo M, y podían verse líneas de reacción visibles en la zona de finalización del ensayo en nueve de los 10 dispositivos de ensayo. Aunque había una banda presente en

un dispositivo de ensayo particular en la zona de captura para el anticuerpo del VIH-1 del Grupo M, la muestra de prueba no alcanzó la zona de finalización del ensayo, y por lo tanto el ensayo tuvo que ser repetido para esta muestra en particular. No se observó reactividad cruzada con los reactivos de captura para el VIH del grupo O ni el VIH-2.

5 (iv) *Ensayo de anticuerpos contra el VIH-1 del Grupo O.* Se ensayaron dos sueros positivos confirmados para el VIH-1 del Grupo O y dos muestras de prueba de sangre completa adicionadas con sueros del VIH-1 del Grupo O mediante el uso de cuatro dispositivos adicionales. Se averiguó que las muestras de VIH-1 del Grupo O contenían anticuerpos específicos para el antígeno del HTV-1 del Grupo O según indicaba un resultado de una barra positiva en el área de la zona de captura del antígeno de VIH-1 del Grupo O, con líneas de reacción visibles en la zona de finalización del ensayo de cada dispositivo. No se observó reacción cruzada con antígenos de captura del VIH-1 del Grupo M o del VIH-2 (no había ninguna barra visible).

10 (v) *Ensayo de anticuerpos contra el VIH-2.* Se usaron diez dispositivos adicionales para ensayar cinco sueros positivos confirmados para el VIH-2 y sangre completa adicionada con los 5 sueros de VIH-2. Se averiguó que las muestras de VIH-2 contenían anticuerpos específicos para el antígeno de VIH-2 (pVIH210) según muestran las barras de reacción en la zona del antígeno de VIH-2. No se observó reacción entre estas muestras de prueba y los antígenos del VIH-1 del Grupo O o del VIH-1 del Grupo M; se observaron líneas de reacción visibles en la zona de finalización del ensayo de cada dispositivo.

15 (vi) *Ensayo del VIH-1 del Grupo M, del VIH-1 del Grupo O, del VIH-2 y de muestras negativas.* Se usaron cuatro dispositivos finales para ensayar una muestra de prueba positiva para el VIH-1 del Grupo M, una muestra de prueba positiva para el VIH-1 del Grupo O, una muestra de prueba positiva para el VIH-2 y una muestra de control negativa. El suero de ensayo negativo no reaccionó con ningún antígeno en la zona de captura de antígeno; la muestra de prueba positiva para el VIH-1 del Grupo M sólo era reactiva con el antígeno del VIH-1 del Grupo M; la muestra de prueba positiva para el VIH-1 del Grupo O sólo era reactiva con el antígeno del VIH-1 del Grupo O; y la muestra de prueba positiva para el VIH-2 sólo era reactiva con el antígeno del VIH-2. Se observaron líneas de reacción visibles en la zona de finalización del ensayo de cada dispositivo.

Las cinco muestras de prueba del VIH-1 del Grupo M y las dos del VIH-1 del Grupo O usadas fueron confirmadas como muestras seropositivas que habían sido previamente ensayadas mediante el uso de un inmunoensayo enzimático disponible comercialmente (Abbott #3A77) y habían sido amplificadas mediante PCR, secuenciadas y subtipadas basándose en un análisis filogenético. Las cinco muestras usadas del VIH-2 eran seropositivas mediante el uso del mismo EIA y fueron confirmadas como muestras positivas para el VIH-2 mediante el uso de un ensayo de inmunotransferencia Western para el VIH-2 (Sanofi).

35 Ejemplo 11

Construcción de genes híbridos sintéticos del VIH-1 del Grupo M y del VIH-1 del Grupo O

A. Modificación del pTB319

40 El plásmido pTB319 (Patente de EE.UU. Nº 5.124.255) codifica para una proteína recombinante gp41 truncada debido a una delección de una base dentro del gen sintético de la gp41 del VIH-1 del Grupo M que da como resultado un cambio de marco. Con objeto de facilitar la generación de constructos génicos híbridos del VIH-1 Grupo M y del Grupo O se usó una mutagénesis específica para eliminar el cambio de marco en la región codificante de la gp41 del pTB319. Esto se consiguió digiriendo secuencialmente el plásmido pTB319 con las endonucleasas de restricción Rsr II y Bst XI. Los oligonucleótidos sintéticos pTB319+A (ID. SEC. Nº: 98) y pTB319+T (ID. SEC. Nº: 99) se hibridaron y se ligaron en el pTB319 digerido con Rsr II y Bst XI. El producto de la ligación se usó para transformar células supercompetentes XL1-Blue y las células se colocaron en placas de LB agar complementadas con 150 µg/ml de ampicilina. Se usó una PCR de colonias para identificar correctamente los clones modificados mediante el uso de las combinaciones de cebadores pTB-S4 (ID. SEC. Nº: 100) / pTB-S7 (ID. SEC. Nº: 101) y pTB-S4 (ID. DE SECUENCIA Nº: 100) / 63168 (ID. SEC. Nº: 121). Se establecieron cultivos de una noche para los clones candidatos en medio LB complementado con glucosa 3 mM y 200 µg/ml de ampicilina para la preparación de ADN miniprep. Se secuenció la totalidad de la región codificante mediante el uso de los cebadores de oligonucleótidos: 43461 (ID. SEC. Nº: 2), 43285 (ID. SEC. Nº: 1), CKS-1 (ID. SEC. Nº: 30), CKS-3 (ID. SEC. Nº: 32), pTB-S1 (ID. SEC. Nº: 102), pTB-S2 (ID. SEC. Nº: 103), pTB-S3 (ID. SEC. Nº: 104), pTB-S4 (ID. SEC. Nº: 100), pTB-S5 (ID. SEC. Nº: 105), pTB-S6 (ID. SEC. Nº: 106), pTB-S7 (ID. SEC. Nº: 101) y pTB-S8 (ID. SEC. Nº: 28). Basándose en los resultados de la secuenciación, el clon pTB319+A-#31 (pGMcks-1) tiene la secuencia de la región codificante deseada. Este clon se designó subsiguientemente como pGM-1CKS/XL1 (la ID. SEC. Nº: 107 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante). La Figura 12 presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGM-1CKS (ID. SEC. Nº: 108).

B. Construcción del pGO-12CKS/XL1

65 El pGO-12CKS/XL1 codifica para la proteína recombinante pGO-12CKS, cuya secuencia de aminoácidos (ID. SEC. Nº: 91) se muestra en la Figura 13. Esta proteína consiste en 250 aminoácidos de CKS / policonector fusionados con

42 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo M, cepa clínica HXB2R), 200 aminoácidos de la gp41 de la *env* (H1V-1 Grupo M, cepa clínica HXB2R), 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112) y 199 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112). El pGO-12CKS/XL1 se construyó como sigue:

5 Se estableció una reacción de PCR (volumen de 100 μ l) con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con $MgCl_2$ 1,5 mM, 40 μ M de cada dNTP, 50 pmol de pTB/O-5' (ID. SEC. N°: 109), 50 pmol de pGO-9/Kpn (ID. SEC. N°: 110) y 1 ng de ADN de pGO-9PL (miniprep H5; obtenido a partir del Ejemplo 3, Sección F anterior) como molde. La reacción se incubó a 94 °C durante 105 segundos y después se amplificó con 22 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 75 segundos, seguido de una incubación a 72 °C durante 5 minutos. El producto de la PCR pub/O-5'/pGO-9/Kpn se aisló en gel. El producto de la PCR pTB/O-5'/pGO-9/Kpn y el plásmido pGM-1CKS (descrito en la Sección A anteriormente en este documento) se digirieron secuencialmente con Asp 718 (Boehringer Mannheim Biochemicals) y Bst XI. El vector digerido se trató después con fosfatasa alcalina intestinal bovina (Boehringer Mannheim Biochemicals), se extrajo con fenol / cloroformo y se precipitó con etanol. El producto de la PCR digerido se purificó en una columna Centri-Sep (Princeton Separations). El producto digerido de la PCR se ligó en el vector digerido y tratado con fosfatasa pGM-1CKS durante una noche a 16 °C. Se transformaron células supercompetentes XL1-Blue con el producto de la ligación y se colocaron en placas en LB + ampicilina complementadas con glucosa 20 mM. Las colonias se sembraron de nuevo por estrías para su aislamiento en el mismo tipo de placas. Se estableció un cultivo de una noche (medio LB + 100 μ g/ml de carbenicilina + glucosa 20 mM) del clon pGO-12CKS #1. Se elaboraron reservas congeladas (0,5 ml de glicerol al 80 % + 0,5 ml de cultivo de una noche) y se preparó ADN miniprep para la secuenciación. Se usaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores para el análisis de la secuencia: CKS-1 (ID. SEC. N°: 30), CKS-2 (ID. SEC. N°: 31), CKS-3 (ID. SEC. N°: 32), CKS-4 (ID. SEC. N°: 33), CKS 176.1 (ID. SEC. N°: 19), 3962 (ID. SEC. N°: 111), 3965 (ID. SEC. N°: 113), pTB-S2 (ID. SEC. N°: 103), pTB-S3 (ID. SEC. N°: 104), pTB-S4 (ID. SEC. N°: 100), pTB-S5 (ID. SEC. N°: 105), sy120-S1 (ID. SEC. N°: 112), 41sy-1B (ID. SEC. N°: 29), 41sy-2B (ID. SEC. N°: 34), 41sy-4 (ID. SEC. N°: 23), pTB-S8 (ID. SEC. N°: 28). Basándose en los resultados del análisis de la secuencia, el clon candidato pGO-12CKS #1 se designó como pGO-12CKS/XL1. (La ID. SEC. N°: 90 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante y la ID. SEC. N°: 91 presenta la secuencia de aminoácidos codificada).

30 G. Construcción del pGO-13CKS/XL1

El pGO-13CKS/XL1 codifica para la proteína recombinante pGO-13CKS, cuya secuencia de aminoácidos (ID. SEC. N°: 93) se muestra en la Figura 14. Esta proteína consiste en 250 aminoácidos de CKS / policonector fusionados con 42 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo M, cepa clínica HXB2R), 200 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo M, cepa clínica HXB2R), 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112) y 169 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112). El pGO-13CKS/XL1 se construyó como sigue:

40 Se estableció una reacción de PCR (volumen de 100 μ l) con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con $MgCl_2$ 1,5 M, 40 μ M de cada dNTP, 50 pmol de pTB/O-5' (ID. SEC. N°: 109), 50 pmol de pGO-8/Kpn (ID. SEC. N°: 114) y 1 ng de ADN de pGO-9PL (miniprep H5; obtenido a partir del Ejemplo 3, Sección F, anteriormente en este documento) como molde. La reacción se incubó a 94 °C durante 105 segundos y después se amplificó con 22 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 75 segundos, seguido de una incubación a 72 °C durante 5 minutos. El producto de la PCR pTB/O-5'/pGO-8/Kpn se aisló en gel. El producto de la PCR pTB/O-5'/pGO-8/Kpn y el plásmido pGM-1CKS (descrito en la Sección A anterior) se digirieron secuencialmente con Asp 718 (Boehringer Mannheim Biochemicals) y Bst XI. El vector digerido se trató después con fosfatasa alcalina intestinal bovina (Boehringer Mannheim Biochemicals), se extrajo con fenol / cloroformo y se precipitó con etanol. El producto digerido de la PCR se purificó en una columna Centri-Sep (Princeton Separations). El producto digerido de la PCR se ligó en el vector digerido y tratado con fosfatasa pGM-1CKS durante una noche a 16 °C. Se transformaron células supercompetentes XL1-Blue con el producto de la ligación y se colocaron en placas en LB + ampicilina complementadas con glucosa 20 mM. Las colonias se sembraron de nuevo por estrías para su aislamiento en el mismo tipo de placas. Se estableció un cultivo de una noche (medio LB + 100 μ g/ml de carbenicilina + glucosa 20 mM) del clon pGO-13CKS #1. Se elaboraron reservas congeladas (0,5 ml de glicerol al 80 % + 0,5 ml de cultivo de una noche) y se preparó ADN miniprep para la secuenciación. Se usaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores para el análisis de la secuencia: CKS-1 (ID. SEC. N°: 30), CKS-2 (ID. SEC. N°: 31), CKS-3 (ID. SEC. N°: 32), CKS-4 (ID. SEC. N°: 33), 43461 (ID. SEC. N°: 2), 43285 (ID. SEC. N°: 1), pTB-S1 (ID. SEC. N°: 102), pTB-S2 (ID. SEC. N°: 103), pTB-S3 (ID. SEC. N°: 104), pTB-S4 (ID. SEC. N°: 100), pTB-S5 (ID. SEC. N°: 105), sy120-S1 (ID. SEC. N°: 112), 41sy-1B (ID. SEC. N°: 29), 41sy-2B (ID. SEC. N°: 34), 41sy-4 (ID. SEC. N°: 23), pTB-S8 (ID. SEC. N°: 28). Basándose en los resultados del análisis de la secuencia, el clon candidato pGO-13CKS #1 se designó como pGO-13CKS/XL1 (la ID. SEC. N°: 92 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante y la ID. SEC. N°: 93 presenta la secuencia de aminoácidos codificada).

D. Construcción del pGO-14PL/DH5 α

El pGO-14PL/DH5 α codifica para la proteína recombinante pGO-14PL, cuya secuencia de aminoácidos (ID. SEC. N°: 95) se muestra en la Figura 15. Esta proteína consiste en una metionina N-terminal seguida de 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112), 200 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112) fusionados con 42 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo M, cepa clínica HXB2R) y 200 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo M, cepa clínica HXB2R). El pGO-14PL/DH5 α se construyó como sigue:

Se estableció una reacción de PCR (volumen de 100 μ l) con polimerasa de ADN UITma (3U) y 1X de tampón junto con MgCl₂ 1,5 mM, 40 μ M de cada dNTP, 50 pmol de pTB/Age5' (ID. SEC. N°: 115), 50 pmol de pGO/B-3' (ID. SEC. N°: 116) y 1 ng de ADN de pGM-1 CKS (miniprep de pTB319+A-#31; obtenido a partir de la Sección A anterior) como molde. La reacción se incubó a 95 °C durante 30 segundos y después se amplificó con 22 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 60 segundos, seguido de una incubación a 72 °C durante 5 minutos. El producto de la PCR pTB/Age5'/pGOB-3' se aisló en gel. El producto de la PCR pTB/Age5'/pGO/B-3' y el plásmido pGO-9PL (obtenido a partir del Ejemplo 3, Sección F anteriormente en este documento) se digirieron secuencialmente con Age 1 y Bam H1. El vector digerido se trató después con fosfatasa alcalina intestinal bovina (Boehringer Mannheim Biochemicals), se extrajo con fenol / cloroformo y se precipitó con etanol. El producto digerido de la PCR se purificó en una columna Centri-Sep (Princeton Separations). El producto digerido de la PCR se ligó en el vector digerido y tratado con fosfatasa pGM-1CKS durante una noche a 16 °C. Se transformaron células competentes DH5 α con el producto de la ligación y se colocaron en placas en LB + ampicilina (150 μ g/ml). Las colonias se analizaron para comprobar la presencia del inserto adecuado mediante PCR de colonias mediante el uso de los cebadores de vector pKRR EcoR1 directo (ID. SEC. N°: 38) y pKRR BamH inverso (ID. SEC. N°: 39). Las colonias que contenían los clones candidatos fueron sembradas de nuevo por estrías para su aislamiento en el mismo tipo de placas. Se establecieron cultivos de una noche (medio LB + 100 μ g/ml de carbenicilina) para generar reservas congeladas y ADN miniprep. Se elaboraron reservas congeladas (0,5 ml de glicerol al 80 % + 0,5 ml de cultivo de una noche) y se preparó ADN miniprep para la secuenciación. Se usaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores para el análisis de la secuencia: pTB-S1 (ID. SEC. N°: 102), pTB-S2 (ID. SEC. N°: 103), pTB-S3 (ID. SEC. N°: 104), pTB-S4 (ID. SEC. N°: 100), pTB-S5 (ID. SEC. N°: 105), 41sy-1C (ID. SEC. N°: 40), 41sly-2 (ID. SEC. N°: 41), 41sy-3 (ID. SEC. N°: 42), 41sy-4 (ID. SEC. N°: 23), pKRREcoR1 directo (ID. SEC. N°: 38), pKRR BamH1 inverso (ID. SEC. N°: 39). Basándose en los resultados del análisis de la secuencia, el clon candidato pGO-14PL #11 se designó como pGO-14PL/DH5 α . (La ID. SEC. N°: 94 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante y la ID. SEC. N°: 95 presenta la secuencia de aminoácidos codificada).

Ejemplo 12

Construcción de un gen sintético de gp120 / gp41 de la env del VIH-1 del Grupo O con una segunda copia de la región inmunodominante (IDR) de la gp41 fusionada al C-terminal

A. Construcción del pGO-15CKS/XL1

El pGO-15CKS/XL1 codifica para la proteína recombinante pGO-15CKS, cuya secuencia de aminoácidos (ID. SEC. N°: 97) se muestra en la Figura 16. Esta proteína consiste en 246 aminoácidos de CKS / policonector fusionados con 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112), 199 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH- Grupo O, cepa clínica HAM 112), seguido de un conector de 4 aminoácidos (Gly, Gly, Gly, Ser) y 32 aminoácidos que engloban la región IDR de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112). El pGO-15CKS/XL1 se construyó como sigue:

El plásmido pGO-11CKS propagado en células XL1-Blue (obtenidas a partir del Ejemplo 3, Sección K) se digirió secuencialmente con Age I y Bam H1, se extrajo con fenol / cloroformo y se precipitó con etanol. Los oligonucleótidos sintéticos synIDR#2-A (ID. SEC. N°: 117) y synIDR#2-B (ID. SEC. N°: 118) se trataron con cinasa de polinucleótido (Boehringer Mannheim Biochemicals) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Los oligonucleótidos tratados con cinasa se hibridaron y el dúplex se ligó al vector digerido (Age I + Bam H1) pGO-11CKS. Se transformaron células supercompetentes XL1-Blue con el producto de la ligación y las células se colocaron en placas en LB complementadas con 150 μ g/ml de ampicilina y se incubaron durante una noche. Se usó una PCR de colonias (cebadores 41sy-1B ID. SEC. N°: 29 y pTB-S8 ID. SEC. N°: 28) para identificar los clones candidatos. Las colonias se sembraron de nuevo por estrías para su aislamiento en placas LB complementadas con 150 μ g/ml de ampicilina. Se establecieron cultivos de una noche de los clones candidatos en medio 2X LB (Life Technologies, Inc.) complementado con 100 μ g/ml de carbenicilina y glucosa 20 mM (Sigma Chemical Co.). Se preparó ADN miniprep a partir de los cultivos de una noche mediante el uso de un kit de aislamiento de ADN Promega 373 (Promega Corporation, Madison, WI) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Los cultivos de una noche también se usaron para establecer reservas congeladas. Las células se sedimentaron y se resuspendieron en medio 2X LB con glicerol al 20 % (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) y se congelaron a -70 °C. Se usaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores para el análisis de la secuencia: CKS-1 (ID. SEC. N°:30), CKS-3 (ID. SEC. N°: 32), 43285 (ID. SEC. N°: 1), 43461 (ID. SEC. N°: 2), 41sy-1B (ID. SEC. N°: 29), 41sy-2B (ID. SEC. N°: 34), 41 sy-3B (ID. SEC. N°: 35), 41sy-4 (ID. SEC. N°: 23) y CKS3583 (ID. SEC. N°: 20). Basándose en los

resultados de la secuenciación, el clon candidato pGO-15CKS-48 se designó como pGO-15CKS/XL1 (la ID. SEC. N°: 96 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante y la ID. SEC. N°: 97 presenta la secuencia de aminoácidos codificada).

5 B. Construcción del pGO-15PL/DH5 α .

El pGO-15PL/DH5 α codifica para la proteína recombinante pGO-15PL, cuya secuencia de aminoácidos (ID. SEC. N°: 120) se muestra en la Figura 17. Esta proteína consiste en una metionina N-terminal seguida de 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112), 199 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112), un conector de 4 aminoácidos (Gly, Gly, Gly, Ser) y 32 aminoácidos que engloban la región IDR de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, cepa clínica HAM 112). El pGO-15PL/DH5 se construyó como sigue:

Se estableció una reacción de PCR (volumen de 100 μ l) con polimerasa de ADN AmpliTaq (2,5 U) y 1X de tampón junto con 40 μ M de cada dNTP, 50 pmol de 41sy-3B (ID. SEC. N°: 35), 50 pmol de pTB-S8 (ID. SEC. N°: 28) y 1 ng de ADN de pGO-15CKS (miniprep del clon candidato pGO-15CKS-48; obtenido a partir de la Sección A anterior) como molde. La reacción se incubó a 95 °C durante 30 segundos, después se amplificó con 35 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 60 segundos, seguido de una incubación a 72 °C durante 7 minutos. El producto amplificado se purificó mediante el uso de un kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen). El producto de amplificación purificado 41sy-3B/pTB-S8 se digirió secuencialmente con Age I y Bam H1, después se ligó a pGO-9PL (prep del vector tratado con fosfatasa digerido con Age I + Bam H1 del Ejemplo 3, Sección J anterior). Se transformaron células competentes DH5 α con el producto de la ligación y se colocaron en placas en LB complementadas con 150 μ g/ml de ampicilina. Los clones candidatos fueron identificados mediante PCR de colonias con los cebadores 41sy-3 (ID. SEC. N°: 42) y pKRR Bam H1 inverso (ID. SEC. N°: 39), seguido de la digestión del producto de la PCR con Age I. El clon candidato #4 se sembró de nuevo por estrías para su aislamiento. Se estableció un cultivo del clon #4 en medio 2X LB (Life Technologies) complementado con 100 μ g/ml de carbenicilina (Sigma Chemical Co.) y se incubó a 34 °C durante una noche. Se preparó ADN miniprep a partir de parte del cultivo de una noche mediante el uso de un kit de aislamiento de ADN Promega 373 (Promega Corp.) según detalla el fabricante. Se establecieron reservas congeladas sedimentado el remanente del cultivo de una noche y resuspendiendo las células en medio Terrific con glicerol al 20 % (J. T. Baker Co.) y congelando a -70 °C. Se usaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores para el análisis de la secuencia: pKRR EcoR1 directo (ID. SEC. N°: 38), pKRR Bam H1 inverso (ID. SEC. N°: 39), 41sy-1C (ID. SEC. N°: 40), 41sy-2 (ID. SEC. N°: 41), 41sy-3 (ID. SEC. N°: 42), 41sy-3B (ID. SEC. N°: 35) y 41sy-4 (ID. SEC. N°: 23). Basándose en los resultados de la secuenciación, el clon candidato pGO-15PL #4 se designó como pGO-15PL/DH5 α . (La ID. SEC. N°: 120 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante y la ID. SEC. N°: 120 presenta la secuencia de aminoácidos codificada).

Ejemplo 13

40 Preparación y purificación de los antígenos recombinantes de la gp41 del VIH-1 del Grupo O pGO-8 PL, pGO-9 PL, pGO-12CKS, pGO-14 PL y pGO-15CKS

Los anteriores antígenos se prepararon haciendo crecer e induciendo cepas de *E. coli* que contienen los respectivos constructos de antígenos recombinantes de la gp41 del VIH-1 del Grupo O según se describe en el Ejemplo 5. Las células congeladas resultantes se resuspendieron mediante homogenización en tampón de lisis frío que comprende Tris 50 mM a pH 8, Na EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, sacarosa al 8 % (p/v), 5 % de Triton X-100[®] (v/v), PMSF 1 mM y pepstatina A 1 μ M. Se añadió lisozima a los homogeneizados a una concentración de 1,3 mg por gramo de células procesado y se incubaron durante 30 minutos en hielo para lisar las células. Los cuerpos de inclusión se prepararon a partir de las proteínas solubles mediante centrifugación. Estos cuerpos de inclusión sedimentados se lavaron y se sedimentaron secuencialmente en 1) tampón de lisis; 2) Na EDTA 10 mM a pH 8, sacarosa al 30 % (p/v); y 3) agua. Los cuerpos de inclusión lavados se resuspendieron en Tris 50 mM a pH 8, Na EDTA 10 mM, NaCl 150 mM y urea 3 M y se incubaron en hielo durante 1 hora. Después los cuerpos de inclusión se separaron de las proteínas solubilizadas mediante centrifugación. Los cuerpos de inclusión sedimentados fueron completamente solubilizados en guanidina-HCl 7 M, Tris 50 mM a pH 8, beta-mercaptoetanol (BME) al 0,1 % (v/v) durante una noche a 4 °C. El (los) antígeno(s) recombinante(s) solubilizado(s) fue(ron) clarificado(s) mediante centrifugación, se pasaron a través de un filtro de 0,2 μ m. El (los) antígeno(s) solubilizado(s) de la gp41 se precipitaron desde la disolución de guanidina-HCl 7 M mediante una dilución con agua (1:7) hasta una concentración final de guanidina-HCl de 1 M. Después de un incubación a 4 °C durante 30 minutos, las proteínas precipitadas se centrifugaron y se resolubilizaron en Tris 50 mM a pH 8, urea 9 M, BME al 0,1 % (v/v) durante una noche a 4 °C.

Los antígenos recombinantes de la gp41 del VIH-1 del Grupo O solubilizados se purificaron a continuación como sigue: los antígenos recombinantes se purificaron en primer lugar mediante cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico mediante el uso de columnas Q-Sepharose (Pharmacia) o S-Sepharose (Pharmacia). Las disoluciones con un antígeno de la gp41 solubilizadas se cargaron en una columna Q-Sepharose o S-Sepharose que

previamente se había equilibrado con Tris 50 mM a pH 8, urea 8 M, BME al 0,1 % (v/v). Los antígenos de la gp41 (1) bien se hicieron pasar a través de la columna directamente y se recogieron en el volumen vacío o (2) bien se unieron a la matriz de la columna. Si se adsorbían, los antígenos de la gp41 fueron eluidos desde las columnas mediante un gradiente de NaCl 0 - 1 M. Se usó una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida para analizar las fracciones procedentes de las columnas de Q-Sepharose o S-Sepharose. Las fracciones que contenían los antígenos recombinantes de la gp41 se agruparon y después se concentraron mediante ultrafiltración. Los concentrados de antígenos recombinantes se trataron con SDS al 4 % (p/v) y BME al 5 % (p/v) a temperatura ambiente durante tres horas. Los antígenos tratados con SDS se purificaron adicionalmente mediante cromatografía de exclusión por tamaños en una columna Sephacril S-300 (Pharmacia) equilibrada con Tris 25 mM a pH 8, NaCl 0,15 M, BME al 0,1 % v/v, SDS al 0,1 % (p/v). Se usó una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida para analizar las fracciones de la columna S-300. Las fracciones que contenían los antígenos recombinantes purificados se agruparon, se pasaron a través de un filtro de 0,2 µm y se almacenaron a -70 °C.

Ejemplo 14

Prueba de reactividad del antígeno recombinante con muestras de VIH-1 del Grupo M y del Grupo O

A. Recubrimiento de microesferas

Con objeto de examinar la reactividad de los antígenos recombinantes del VIH-1, se recubrieron microesferas de poliestireno de un cuarto de pulgada con los recombinantes purificados. Estas microesferas recubiertas con antígenos se usaron en una serie de ensayos de captura para acceder a la reactividad de ambas muestras del VIH-1 del Grupo M y del Grupo O.

Se recubrieron microesferas de un cuarto de pulgada con los antígenos recombinantes a 0,5 µg/ml en PBS. Se recubrieron con los siguientes antígenos recombinantes: pTB319 (Grupo M), pGO-9/CKS, pGO-11/PL, pGO-12/CKS, pGO-14/PL y pGO-15/CKS (todos del Grupo O).

El procedimiento para recubrir las microesferas con los antígenos recombinantes es como sigue: para cada antígeno se lavaron 35,5 g (~ 250) de microesferas, (Abbott Laboratories código 93-2556, lote 6840M100) con N-propanol al 15 % en agua durante 30 minutos a 40 °C. Todas las incubaciones y los lavados se realizaron en pequeños tarros de vidrio marrón sobre una plataforma de agitación. La disolución de N-propanol se aspiró, se añadieron 58,25 ml de la disolución de antígeno y las microesferas se incubaron durante dos horas a 40 °C. La disolución de antígenos se aspiró y se añadieron 60 ml de una disolución de Triton X-100 al 0,1 % en PBS durante 30 minutos a 40 °C. Después las microesferas se lavaron con 60 ml de PBS dos veces y se incubaron con 60 ml de BSA al 2 % en PBS durante 30 minutos a 40 °C. Se aspiró la BSA y las microesferas se lavaron de nuevo con PBS. Después las microesferas se incubaron con 60 ml de sacarosa al 0,5 % en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se aspiró la sacarosa y las microesferas se dejaron secar al aire. Las microesferas recubiertas se almacenaron en frascos de polipropileno con un desecante a 4 °C.

B. Ensayos

Las microesferas recubiertas con antígenos recombinantes se ensayaron para comprobar su reactividad frente a varias muestras mediante el uso del kit de Abbott Laboratories 3A11 (de primera generación, formato de ensayo indirecto). Las muestras se diluyeron y se añadieron a los pocillos de bandejas de poliestireno. Se añadieron las microesferas y las bandejas se incubaron a 40 °C durante 1 hora. Las bandejas se lavaron con agua en un dispositivo de Abbott Laboratories QUICKWASH. A continuación se añadió el conjugado del kit, anti-IgG humana-peroxidasa de rábano picante, y las bandejas se incubaron de nuevo a 40 °C durante una hora. Las bandejas se lavaron de nuevo y se añadieron 300 µl de una disolución de sustrato, (1,28 mg/ml de o-fenilendiamina • HCl en tampón de citrato - fosfato que contiene peróxido de hidrógeno al 0,02 %) a cada pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 1 ml de ácido sulfúrico 1 N para detener la reacción y las bandejas se leyeron en un espectrofotómetro Abbott QUANTUM.

Las muestras usadas para este estudio eran un plasma humano normal, (Abbott Laboratories código 99800, lote 17535M400), usado como un control negativo; VIHPL-31 (sólo positivo para el Grupo M) y los siguientes sueros positivos del Grupo O: 14283, 189404, 193Ha, 14791, 267Ha y ESP-1. Todas las muestras excepto el plasma humano normal se analizaron a tres diluciones; 1:1.000, 1:10.000 y 1:100.000 en el diluyente de muestras del kit. Cada dilución de cada muestra se analizó por duplicado frente a cada una de las seis microesferas y los resultados de cada dilución se promediaron y se representaron gráficamente para cada microesfera.

C. Resultados

Los resultados de los anteriores ensayos, mostrados en la Figuras 18 - 23, demuestran las mejoras en la sensibilidad y en la selectividad disponibles mediante el uso de los antígenos recombinantes de la presente invención. Las microesferas recubiertas con un antígeno recombinante del VIH-1 del Grupo M (pTB319) detectaron la muestra de suero del Grupo M, pero no detectaron más que una de las muestras del Grupo O. Las microesferas recubiertas únicamente con antígenos recombinantes del VIH-1 del Grupo O (pGO-9/CKS, pGO-11/PL y pGO-15/CKS) detectaron las muestras de suero del Grupo O, pero mostraron una sensibilidad menor en la detección de la muestra del VIH-1 del Grupo M. Las microesferas que están recubiertas con antígenos recombinantes híbridos del Grupo M y del Grupo O (pGO-12/CKS y pGO-14/PL) fueron capaces de detectar ambas muestras positivas del VIH-1 del Grupo M y del Grupo O. Finalmente, el pGO-15/CKS, que tiene una secuencia adicional que representa la región inmunodominante del Grupo O de la gp41 unida por medios recombinantes al extremo carboxi de la proteína, mostró una mayor actividad con muestras del Grupo O de baja titulación.

Ejemplo 15

15 Análisis de la sensibilidad del ensayo para muestras infectadas con VIH del Grupo O mediante el uso de los antígenos recombinantes del Grupo O pGO-9CKS y pGO-11CKS

A. Ensayos

20 Con objeto de evaluar el rendimiento en inmunoensayos de los constructos de antígenos de la presente invención, se incorporaron los antígenos recombinantes pGO-9CKS y pGO-11CKS a cuatro inmunoensayos de VIH-1 / VIH-2 que contenían de reactivos del VIH-1 del Grupo M (subtipo B). Los constructos se ensayaron mediante el uso de un ensayo de microesferas (Ensayo 1) y 3 ensayos automatizados basados en micropartículas (Ensayos 2 - 4). En todos los casos, la reactividad de las muestras infectadas por el VIH-1 del Grupo O fue evaluada con (formato 2) y sin (formato 1) la incorporación de los recombinantes del VIH-1 del Grupo O. Las microesferas / micropartículas recubiertas se hicieron reaccionar con múltiples diluciones de los siguientes sueros humanos positivos para el VIH-1 del Grupo O: ESP1, 189404, 193Ha, 341 Ha, 2156 y ABB 9/96.

30 Para el Ensayo 1, se incorporó pGO-11CKS purificado en un ensayo basado en microesferas disponible comercialmente y recubriendo con el constructo de antígeno las microesferas de poliestireno de un cuarto de pulgada. Las microesferas recubiertas se hicieron reaccionar con un intervalo de diluciones de sueros humanos positivos para el VIH-1 del Grupo O, se lavaron y después se hicieron reaccionar con pGO-9CKS purificado conjugado con peroxidasa de rábano picante. Después del lavado / separación de la forma unida del conjugado pGO-9CKS de la no unida, se añadió el sustrato y el ensayo se completó según se indica en el Ejemplo 14.

35 Para el Ensayo 2, se incorporó pGO-11CKS purificado en un segundo ensayo disponible comercialmente recubriendo las micropartículas con el constructo de antígeno. Las microesferas recubiertas se hicieron reaccionar con el mismo intervalo de diluciones de sueros humanos positivos para el VIH-1 del Grupo O utilizados en el Ensayo 1. Después las micropartículas se lavaron y se hicieron reaccionar subsiguientemente con pGO-9CKS biotinilado. Después de un lavado adicional, las micropartículas se hicieron reaccionar con un anticuerpo policlonal anti-biotina conjugado con fosfatasa alcalina. La señal del ensayo se desarrolló mediante la adición del sustrato fosfato de metilumbeliferilo.

45 Para el Ensayo 3, se incorporó pGO-11CKS purificado en un tercer ensayo disponible comercialmente recubriendo las micropartículas con el constructo de antígeno. Las microesferas recubiertas se hicieron reaccionar de nuevo con el mismo intervalo de diluciones de sueros humanos positivos para el VIH-1 del Grupo O utilizados en el Ensayo 1. Después, las micropartículas se lavaron y se hicieron reaccionar después con pGO-9CKS biotinilado. Después del lavado, las micropartículas se hicieron reaccionar con un anticuerpo anti-biotina conjugado con acridinio como el compuesto generador de señal.

50 Para el Ensayo 3, se incorporó pGO-11CKS purificado en un ensayo de desarrollo recubriendo micropartículas magnéticas con el constructo de antígeno. Como en el Ensayo 1, las microesferas recubiertas se hicieron reaccionar con un intervalo de diluciones de sueros humanos positivos para el VIH-1 del Grupo O, se lavaron y subsiguientemente se hicieron reaccionar con pGO-9CKS conjugado con acridinio.

B. Resultados

60 Los resultados de los ensayos anteriores se presentan en las Tablas 1 y 2, a continuación, en las que los datos están presentados como proporciones entre señal / corte (S/CO). El Formato 1 se refiere al ensayo convencional sin los constructos de antígeno de la presente invención, mientras que el Formato 2 se refiere al ensayo complementado con los constructos del VIH-1 del Grupo O.

ES 2 446 271 T3

A partir de estos datos puede observarse que la adición de los recombinantes del VIH-1 del Grupo O dio como resultado una mejora significativa en la sensibilidad del ensayo para sueros infectados con el VIH-1 del Grupo O a todas las diluciones ensayadas. Por ejemplo, en el caso del Ensayo 1 y de la muestra 193Ha, se obtuvo una proporción de S/CO de 7,14 a una dilución de 1:10 mediante el uso de el Formato 1, en las que se obtuvo una similar S/CO (7,22) a una dilución 160 veces mayor (1:1.600) mediante el uso de el Formato 2. Esta tendencia se mantuvo en todas las plataformas de ensayo ensayadas. La utilidad de los recombinantes del grupo O fue particularmente evidente para la muestra 2156, que dio negativo (S/CO < 1) en los 4 ensayos previos a la adición de los recombinantes del grupo O. Sin embargo, tras la adición de los constructos del VIH-1 del Grupo O, esta muestra 2156 dio positivo en los cuatro ensayos a una dilución de 1:400. En el Ensayo 1, 2156 todavía era positiva a una dilución de 1:5.000. Se observó que la adición de los reactivos recombinantes pGO-9CKS y pGO-11CKS proporcionaba una sensibilidad sustancialmente mejor para sueros infectados por el VIH-1 del Grupo O cuando se usaban los anteriores inmunoensayos de formato directo.

Tabla 1

15

		Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3		Ensayo 4	
		Formato 1	Formato 2						
193Ha	1:10	7,14	16,92	3,67	10,05	9,65	37,57	0,93	8,99
	1:100	1,85	16,92	0,87	6,08	1,70	25,89	0,61	4,81
	1:200	1,00	16,92	0,66	5,03	1,18	23,57	0,54	4,07
	1:400	0,86	16,92	0,53	4,03	0,78	18,40	0,54	2,62
	1:800	0,39	2,41	0,41	2,56	0,59	13,00	0,55	1,74
	1:1.600	0,24	7,22	0,39	1,74	0,53	8,02	0,56	1,16
	1:5.000	0,09	2,14	NT	NT	0,37	3,33	NT	NT
	1:10.000	0,05	1,55	NT	NT	0,38	1,69	NT	NT
341HA	1:10	7,41	16,92	15,36	13,52	50,27	82,28	3,06	10,43
	1:100	3,34	16,92	7,30	9,78	13,25	55,32	1,34	7,09
	1:200	2,04	16,92	4,75	8,43	8,00	42,66	1,01	6,78
	1:400	1,32	16,92	2,57	6,66	4,41	31,89	0,90	4,83
	1:800	0,93	16,92	1,49	5,25	2,45	25,47	0,70	3,17
	1:1.600	0,50	11,41	0,92	3,84	1,26	17,48	0,63	2,50
	1:5.000	0,25	5,01	NT	NT	0,74	8,16	NT	NT
	1:10.000	0,12	1,68	NT	NT	0,48	4,56	NT	NT
2156	1:10	0,25	16,92	0,49	5,33	0,37	20,79	0,63	5,52
	1:100	0,11	14,89	0,44	3,46	0,42	14,00	0,54	2,41
	1:200	0,01	10,07	0,36	2,45	0,39	9,92	0,62	1,59
	1:400	0,13	5,93	0,38	1,65	0,38	6,01	0,53	1,13
	1:800	0,04	3,45	0,36	1,12	0,41	3,65	0,51	0,85
	1:1.600	0,01	1,91	0,40	0,75	0,44	2,12	0,54	0,66
	1:5.000	0,08	1,1	NT	NT	0,39	0,97	NT	NT
	1:10.000	0,15	0,45	NT	NT	0,37	0,70	NT	NT

Tabla 2

	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3		Ensayo 4		
	Formato 1	Formato 2							
ABB9/96	1:10	3,17	16,92	4,39	9,64	8,96	35,65	1,55	7,76
	1:100	1,67	16,90	0,83	6,00	2,33	28,06	0,75	4,43
	1:200	1,35	16,90	0,66	5,43	1,57	25,03	0,60	4,01
	1:400	1,12	16,90	0,52	4,19	1,13	21,90	0,59	3,20
	1:800	0,88	13,25	0,49	3,59	0,85	17,86	0,58	2,15
	1:1.600	0,48	9,19	0,40	2,63	0,65	12,87	0,55	1,50
	1:5.000	0,40	4,95	NT	NT	0,53	6,52	NT	NT
	1:10.000	0,17	1,39	NT	NT	0,43	3,58	NT	NT
ESP1	1:10	9,18	16,92	9,69	12,30	15,78	44,37	2,87	12,46
	1:100	1,06	16,92	2,78	6,88	2,08	22,02	0,77	5,12
	1:200	0,52	16,92	1,41	5,32	1,19	17,66	0,65	3,38
	1:400	0,26	16,92	0,87	3,90	0,79	13,38	0,60	2,59
	1:800	0,09	12,59	0,67	2,67	0,53	9,45	0,52	1,62
	1:1.600	0,20	8,35	0,52	1,16	0,46	5,66	0,56	1,06
	1:5.000	0,08	3,31	NT	NT	0,57	2,36	NT	NT
	1:10.000	0,09	2,05	NT	NT	0,37	1,34	NT	NT
189404	1:10	20,76	16,92	20,44	14,98	31,64	37,47	3,58	9,78
	1:100	10,37	16,92	8,12	7,83	12,19	24,67	1,26	4,60
	1:200	8,10	15,72	5,37	5,71	8,36	19,86	1,12	3,51
	1:400	4,38	11,61	3,11	4,10	5,33	14,20	0,76	2,32
	1:800	2,28	7,81	1,78	2,80	2,94	10,42	0,73	1,75
	1:1.600	1,34	4,55	1,03	1,66	1,81	6,12	0,57	1,21
	1:5.000	0,40	1,96	NT	NT	0,94	2,49	NT	NT
	1:10.000	0,26	1,00		NT	0,59	1,58	NT	NT

5 La presente invención concierne a:

1. Un constructo de antígeno que comprende un primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O fusionado con un segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O.
2. Un constructo de antígeno según el Punto 1 en el que el primer polipéptido es un polipéptido de la gp120 y el segundo polipéptido es un polipéptido de la gp41.
3. Un constructo de antígeno según el Punto 2 en el que se ha delecionado una porción de la región hidrófoba del polipéptido de la gp41.
4. Un constructo de antígeno según cualquiera de los Puntos 1, 2 y 3 en el que al menos uno del primer y el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O *env* deriva de la cepa clínica HAM 112 del VIH-1 del Grupo O.

5. Un constructo de antígeno según el Punto 1 en el que el primer polipéptido comprende una porción inmunorreactiva de la proteína gp120 de la cepa clínica HAM 112 del VIH-1 del Grupo O.
6. Un constructo de antígeno según el Punto 5 en el que el primer polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los residuos 1 hasta 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una porción de la misma.
7. Un constructo de antígeno según el Punto 6 en el que el primer polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 476 hasta 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61).
8. Un constructo de antígeno según cualquiera de los Puntos 1, 5, 6 y 9 en el que el segundo polipéptido comprende una porción inmunorreactiva de la proteína gp41 de la cepa clínica HAM 112 del VIH-1 del Grupo O.
9. Un constructo de antígeno según el Punto 8 en el que el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 521 hasta 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una porción de la misma.
10. Un constructo de antígeno según el Punto 8 en el que una porción de la región hidrófoba de la proteína gp41 de la cepa clínica HAM 112 del VIH-1 del Grupo O está ausente en el segundo polipéptido.
11. Un constructo de antígeno según el Punto 8 en el que la porción delecionada es aquella parte de la gp41 que tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 690 hasta 715 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61).
12. Un constructo de antígeno según el Punto 8 en el que el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52).
13. Un constructo de antígeno según el Punto 8 en el que el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48).
14. Un constructo de antígeno según el Punto 8 en el que el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 212 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58).
15. Un constructo de antígeno según el Punto 1 seleccionado de entre el grupo que consiste en pGO-8PL, pGO-8CKS, pGO-9PL, pGO-9CKS, pGO-11PL y pGO-11CKS y derivados, variantes y análogos de los mismos.
16. Un polinucleótido que codifica para un constructo de antígeno según cualquiera de los Puntos 1 y 15.
17. Un polinucleótido según el Punto 16 unido operativamente a una secuencia de control capaz de dirigir la expresión en un hospedador adecuado.
18. Un polinucleótido según el Punto 16 en el que la secuencia codificante se ha modificado para proporcionar un sesgo de codón apropiado para el hospedador de expresión.
19. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido según el Punto 16.
20. Una célula hospedadora transformada por un vector de expresión según el Punto 19.
21. Una célula hospedadora según el Punto 20 en el que el hospedador es *Escherichia coli*.
22. Un procedimiento para detectar anticuerpos contra el VIH-1 en una muestra de prueba que comprende las etapas de:
- (a) combinar al menos un constructo de antígeno según cualquiera de los Puntos 1 y 15 con la muestra de prueba para formar una mezcla;
- (b) incubar la mezcla en unas condiciones adecuadas para formación de los complejos entre el antígeno y los anticuerpos, si es que los hay presentes en la muestra y son inmunológicamente reactivos con el antígeno; y
- (c) detectar la presencia de cualquier complejo formado.
23. Un procedimiento según el Punto 22 en el que la detección de la presencia de los complejos de la etapa (c) se realiza mediante el uso de un constructo de antígeno adicional según cualquiera de los Puntos 1 y 15 al que se ha unido un compuesto generador de señal.
24. Un procedimiento según el Punto 22 en el que la detección de la presencia de los complejos de la etapa (c) se realiza mediante el uso de un constructo de antígeno adicional según cualquiera de los Puntos 4, 18, 19, 38, 39, 58, 59 y 62 al que está unido un primer miembro de un par de unión específico y mediante el uso adicional de un reactivo indicador que comprende un segundo miembro del par de unión específico al que se ha unido un compuesto generador de señal.
25. Un procedimiento según el Punto 22 en el que la detección de la presencia de los complejos de la etapa (c) se realiza mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra los complejos formados en la etapa (b) al que se ha unido un compuesto generador de señal.
26. Un procedimiento según el Punto 22 en el que la detección de la presencia de los complejos de la etapa (c) se realiza mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra los complejos formados en la etapa (b) al que se ha unido un primer miembro de un par de unión específico y mediante el uso adicional de un reactivo indicador que comprende un segundo miembro del par de unión específico al que se ha unido un compuesto generador de señal.
27. Un kit de inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 que comprende un constructo de antígeno según cualquiera de los Puntos 1 y 15.
28. Un kit de inmunoensayo según el Punto 27 en el que el constructo de antígeno es un reactivo de captura.
29. Un kit de inmunoensayo según el Punto 27 en el que el constructo de antígeno es un reactivo indicador.

30. Un kit de inmunoensayo según el Punto 27 en el que el constructo de antígeno está unido un primer miembro de un par de unión específico, comprendiendo adicionalmente el kit un reactivo indicador que comprende un segundo miembro del par de unión específico unido a un compuesto generador de señal.

5 La presente invención también concierne a:

1. Un constructo de antígeno que comprende una fusión de un primer polipéptido de la *env* del VIH-1, un segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 y al menos un polipéptido adicional del VIH-1.
- 10 2. Un constructo de antígeno según el Punto 1 en el que el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 y el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 son cada uno un polipéptido del VIH-1 del Grupo O.
3. Un constructo de antígeno según el Punto 2 en el que el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O es un polipéptido de la gp120 y el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O es un polipéptido de la gp41.
- 15 4. Un constructo de antígeno según el Punto 3 en el que el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O comprende una porción inmunorreactiva de la proteína gp120 de la cepa clínica HAM112 del VIH-1 del Grupo O y el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O comprende una porción inmunorreactiva de la proteína gp41 de la cepa clínica HAM112 del VIH-1 del Grupo O.
- 20 5. Un constructo de antígeno según el Punto 4 en el que el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 1 hasta 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una porción de la misma.
- 25 6. Un constructo de antígeno según el Punto 5 en el que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 521 hasta 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una porción de la misma.
7. Un constructo de antígeno según el Punto 5 en el que el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 476 hasta 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61).
- 30 8. Un constructo de antígeno según el Punto 7 en el que una porción de la región hidrófoba de la proteína gp41 de la cepa clínica HAM112 del VIH-1 del Grupo O está ausente en el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O.
- 35 9. Un constructo de antígeno según el Punto 7 en el que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52).
- 40 10. Un constructo de antígeno según el Punto 7 en el que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48).
- 45 11. Un constructo de antígeno según el Punto 7 en el que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58).
- 50 12. Un constructo de antígeno según cualquiera de los Puntos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 en el que el polipéptido adicional del VIH-1 es un polipéptido de la *env* del Grupo O.
13. Un constructo de antígeno según el Punto 12 en el que el polipéptido adicional del VIH-1 del Grupo O comprende una porción inmunorreactiva de la proteína gp41 de la cepa clínica HAM112 del VIH-1 del Grupo O.
- 55 14. Un constructo de antígeno según el Punto 13 en el que el polipéptido adicional del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 521 hasta 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una porción de la misma.
- 60 15. Un constructo de antígeno según el Punto 14 en el que una porción de la región hidrófoba de la proteína gp41 de la cepa clínica HAM112 del VIH-1 del Grupo O está ausente del polipéptido adicional del VIH-1 del Grupo O.
- 65 16. Un constructo de antígeno según el Punto 12 en el que el polipéptido adicional de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52).

- 5 17. Un constructo de antígeno según el Punto 12 en el que el polipéptido adicional de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48).
- 10 18. Un constructo de antígeno según el Punto 12 en el que el polipéptido adicional de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 47 hasta 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58).
- 15 19. Un constructo de antígeno según el Punto 12 en el que el polipéptido adicional de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 250 hasta 281 de la Figura 17 (ID. SEC. N°: 120).
- 20 20. Un constructo de antígeno según el Punto 2 seleccionado de entre el grupo que consiste en pGO-15CKS y pGO-15PL y derivados, variantes y análogos de los mismos.
- 25 21. Un constructo de antígeno que comprende un primer polipéptido de la *env* del VIH-2 fusionado con un segundo polipéptido de la *env* del VIH-2.
- 30 22. Un constructo de antígeno según el Punto 21 en el que el primer polipéptido de la *env* del VIH-2 es un polipéptido de la gp120 y el segundo polipéptido de la *env* del VIH-2 es un polipéptido de la gp36.
- 35 23. Un constructo de antígeno según el Punto 22 en el que:
- 40 (a) el primer polipéptido de la *env* del VIH-2 tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 248 hasta 307 de la secuencia de la Figura 11 (ID. SEC. N°: 55) o una porción de la misma; y (b) el segundo polipéptido de la *env* del VIH-2 tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 308 hasta 466 de la secuencia de la Figura 11 (ID. SEC. N°: 55) o una porción de la misma.
- 45 24. Un constructo de antígeno según el Punto 21 que es el pVIH-210 y derivados, variantes y análogos del mismo.
- 50 25. Un polinucleótido que codifica para un constructo de antígeno según cualquiera de los Puntos 1, 20, 21 y 24.
- 55 26. Un polinucleótido según el Punto 25 unido operativamente a una secuencia de control capa de dirigir la expresión en un hospedador adecuado.
- 60 27. Un polinucleótido según el Punto 25 en el que la secuencia codificante se ha modificado para proporcionar un sesgo de codón apropiado para el hospedador de expresión.
- 65 28. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido según el Punto 25.
29. Una célula hospedadora transformada por un vector de expresión según el Punto 28.
30. Una célula hospedadora según el Punto 29 en la que el hospedador es *Escherichia coli*.
31. Un procedimiento para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 en una muestra de prueba que comprende las etapas de:
- (a) combinar al menos un constructo de antígeno según cualquiera de los Puntos 1, 20, 21 y 24 con la muestra de prueba para formar una mezcla;
- (b) incubar la mezcla en unas condiciones adecuadas para formación de los complejos entre el antígeno y los anticuerpos, si es que los hay presentes en la muestra y son inmunológicamente reactivos con el antígeno; y
- (c) detectar la presencia de cualquier complejo formado
32. Un procedimiento según el Punto 31 en el que la detección de la presencia de los complejos de la etapa (c) se realiza mediante el uso de un constructo de antígeno adicional según cualquiera de los Puntos 1, 20, 21 y 24 al que se ha unido un compuesto generador de señal.
33. Un procedimiento según el Punto 31 en el que la detección de la presencia de los complejos de la etapa (c) se realiza mediante el uso de un constructo de antígeno adicional según cualquiera de los Puntos 1, 20, 21 y 24 al que está unido un primer miembro de un par de unión específico y mediante el uso adicional de un reactivo indicador que comprende un segundo miembro del par de unión específico al que se ha unido un compuesto generador de señal.

34. Un procedimiento según el Punto 31 en el que la detección de la presencia de los complejos de la etapa (c) se realiza mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra los complejos formados en la etapa (b) al que se ha unido un compuesto generador de señal.

5 35. Un procedimiento según el Punto 31 en el que la detección de la presencia de los complejos de la etapa (c) se realiza mediante el uso de un anticuerpo dirigido contra los complejos formados en la etapa (b) al que se ha unido un primer miembro de un par de unión específico y mediante el uso adicional de un reactivo indicador que comprende un segundo miembro del par de unión específico al que se ha unido un compuesto generador de señal.

10 36. Un kit de inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 que comprende un constructo de antígeno según cualquiera de los Puntos 1, 20, 21 y 24.

15 37. Un kit de inmunoensayo según el Punto 36 en el que el constructo de antígeno es un reactivo de captura.

38. Un kit de inmunoensayo según el Punto 36 en el que el constructo de antígeno es un reactivo indicador.

20 39. Un kit de inmunoensayo según el Punto 36 en el que el constructo de antígeno está unido a un primer miembro de un par de unión específico, comprendiendo adicionalmente el kit un reactivo indicador que comprende un segundo miembro del par de unión específico unido a un compuesto generador de señal.

Lista de secuencias

25 <110> ABBOTT LABORATORIES

<120> NUEVOS CONSTRUCTOS DE ANTÍGENO ÚTILES EN LA DETECCIÓN Y LA DIFERENCIACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIH

30 <130> 6165W001

<140> PCT/US1998/017014

<141> 17-08-1998

35 <150> 08/911.824

<151> 15-08-1997

<160> 124

40 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<221> fuente

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

50

<400> 1

gagatcttca ggggtatcc 19

<210>2

<211> 20

55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

60

<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 2

ggatcatcgg ttcacaccc 20

65

ES 2 446 271 T3

<210>3
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 10 <400>3
 catgatcggg ggtgacatga aagacatctg gcgtaacgaa ctggtcaaat acaaagttgt 60
 tcgtgttaaa ccgttctctg ttgctccgac cccgatcgct cgtccgggta tcgg 114
 <210>4
 15 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 <400> 4
 gcagggtcca ctatgggtgc tgcagctacc gctctgaccg tacagacca ctctgttacc 60
 aaaggtatcg tacagcagca cgacaacctg ctgcgtgcaa tccaggcaca g 111
 25
 <210>5
 30 <211> 110
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 35 <400> 5
 agctgctggg tctggatcag ggtttccagt gccagcagac gagcacgcag ctgacggata 60
 ccccatacag acagacgcag cagttcctgc tgtgcctgga ttgcacgcag 110
 40
 <210>6
 <211> 111
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"
 50 <400> 6
 ctgatccaga accagcagct gctgaacctg tggggctgca aaggctgtct gatctgctac 60
 acctccgta aatggaacga aacctggcgt aacaccacca acatcaacca g 111

ES 2 446 271 T3

<210>7
 <211> 117
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

10

<400> 7

```

ctgaacctga gctttctgga tttcttcgta gatggtggaa gaaacgttgt cgatctgctg      60
gtccccattcc tgccagggtca ggttacccca gatctggttg atggtggtgg tgttacg      117
  
```

<210>8
 <211> 101
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

20

<400> 8

```

tccagaaagc tcaggttcag caggaacaga acgaaaaaaaa actgctggaa ctggacgaat      60
gggctttctct gtggaactgg ctggacatca ccaaattggct g                        101
  
```

25

<210>9
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

35

<400> 9

```

accttcaccg gtacgacccg gagtttcagc ttcagactgc tgacgggtcg ggatctgcag      60
ggacagcggc tggtagccct gacggatggt acgcagccat ttggtgatgt ccag      114
  
```

40

<210> 10
 <211> 107
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

50

<400> 10

```

cgggtcgtac cggatgaagg ggtggtgacg aaggccgtcc gcgtctgatc ccgtctccgc      60
agggtttcct gccgctgctg tacaccgacc tgcgtacat catcctg      107
  
```

<210> 11

ES 2 446 271 T3

<211>31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

10

<400> 11
 ctacaagaat tccatgatcg gtggtgacat g 31

15

<210> 12
 <211> 109
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 12

 gtctgtggat tctgggtcag aaaatcatcg acgcttgccg tatctgcgct gctgttatcc 60
 actactggct gcaggaactg cagaaatccg ctacctcct gatcgacac 109

25

<210> 13
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

35

<400> 13

 gcgaacacga cgcgggatgt tcaggatacc acgaccaga cgctggatac cacggatgat 60
 gtcgtcagtc cagttagcaa ctgcaacagc gaaggtgtcg atcagggagg tagc 114

40

<210> 14
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 14
 atagtaggat cctattacag cagagagcgt tcgaagcct ggcaacacg acgcgggatg 60

50

<210> 15
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

60

<400> 15
 atagtaggat cctattatc accggtacga cccggagttt cag 43

ES 2 446 271 T3

5 <210> 16
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 16
 atagtaggat cctattacag ccatttggtg atgtccag 38

15 <210> 17
 <211> 106
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 17

25 gcacccatag tggaaacctgc tgcagacaga acgcccagga acagcatacc cagacctaca 60
 gcacgttttt cacggtgggt gccagtaccg ataaccggac gagcga 106

30 <210> 18
 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

<400> 18

40 ctgaccaga atccacagac ccagacgcag gtgagagata acagtctgag taccagagat 60
 caggttagac agcaggtggt aggaccacag gatgatggta cgcaggtc 108

45 <210> 19
 <211> 26
 <212>ADN
 <213>Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /note=" Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético "

<400> 19
 gcagctcgt gtctgtggt acggcg 26

55 <210> 20
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

ES 2 446 271 T3

<400> 20
 cgtaacggta cgacactcc 19

5 <210>21
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

15 <400> 21
 ccgctacctc cctgatcgac accttc 26

20 <210> 22
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 22
 gaaggtgtcg atcagggagg tagcgg 26

30 <210> 23
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

40 <400> 23
 gatgtccagc cagttccac 19

45 <210> 24
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 24

 ctacaagaat tccatgatcg gtggtgacat gaaagacatc tggcgtaacg aactgttcaa 60
 atac 64

55 <210> 25
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 25

ES 2 446 271 T3

ctacaagaat tctatcggtg gtgacatgaa agac 34

5 <210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

15 <400> 26
cgggtcgtac cgggaaggt 20

20 <210> 27
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 27
atagtaggat cctattacag cag 23

35 <210> 28
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

45 <400> 28
gccggaagcg agaagaatc 19

50 <210> 29
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

60 <400> 29
tatcgtacag cagcaggac 19

65 <210> 30
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

75 <400> 30
cccattaatg tgagtagct c 21

80 <210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 446 271 T3

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 31
cctgacgaat gattgtcgca 20

10 <210> 32
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

20 <400> 32
atcagcgac gacacggtg 19

<210> 33
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 33
gtatccacac ctgtgcca 18

35 <210> 34
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

45 <400> 34
agagtgggtc tgtacggtc 19

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

55 <400> 35
aatgggcttc tctgtggaac 20

60 <210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 36

ES 2 446 271 T3

ctgtctaacc tgatctctgg 20
 <210> 37
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 <400> 37
 acgcaggtga gagataacag 20
 15 <210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 25 <400> 38
 gtgatacgaacgaagcatt gg 22
 <210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 35 <400> 39
 gcgatatagg cgccagcaac c 21
 40 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 50 <400> 40
 ctctgttacc aaaggtatcg t 21
 <210> 41
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
 60 <400> 41
 agcagacgag cacgcagc 18
 <210> 42
 <211> 18
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 446 271 T3

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
5

<400> 42
ttcagcagga acagaacg 18

10 <210> 43
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

20 <400> 43
tccgcgtctg atcccgtc 18

25 <210> 44
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

35 <400> 44
ccaggcacag caggaac 17

40 <210> 45
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

50 <400> 45
acactataga atactcaagc 20

55 <210> 46
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

65 <400> 46
taatacgact cactataggg 20

70 <210> 47
<211> 741
<212> ADN
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 47

ES 2 446 271 T3

```

atgatcggtg gtgacatgaa agacatctgg cgtaacgaac tgttcaaata caaagttggt      60
cgtgttaaac cgttctctgt tgctccgacc ccgatcgctc gtccggttat cggactctggc      120
accaccctg  aaaaacgtgc tgtaggtctg ggtatgctgt tcctgggcgt tctgtctgca      180
gcaggttcca ctatgggtgc tgcagctacc gctctgaccg tacagacca ctctgttacc      240
aaaggatcgt tacagcagca ggacaacctg ctgctgcaaa tccaggcaca gcaggaactg      300
ctgctgctgt ctgtatgggg tatccgtcag ctgctgctc gtctgctggc actggaaacc      360
ctgatccaga accagcagct gctgaacctg tggggctgca aaggctcgtct gatctgctac      420
acctccgtta aatggaacga aacctggcgt aacaccacca acatcaacca gatctgggggt      480
aacctgacct ggcaggaatg ggaccagcag atcgacaacg tttcttccac catctacgaa      540
gaaatccaga aagctcaggt tcagcaggaa cagaacgaaa aaaaactgct ggaactggac      600
gaatgggctt ctctgtggaa ctggctggac atcaccaaat ggctgcgtaa catccgctag      660
ggctaccagc cgctgtccct gcagatcccg acccgtcagc agtctgaagc tgaactccg      720
ggctgtaccg gtgaataata g                                             741

```

<210> 48
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

5

<400> 48

```

Met Ile Gly Gly Asp Met Lys Asp Ile Trp Arg Asn Glu Leu Phe Lys
 1           5           10           15

Tyr Lys Val Val Arg Val Lys Pro Phe Ser Val Ala Pro Thr Pro Ile
          20           25           30

Ala Arg Pro Val Ile Gly Thr Gly Thr His Arg Glu Lys Arg Ala Val
          35           40           45

Gly Leu Gly Met Leu Phe Leu Gly Val Leu Ser Ala Ala Gly Ser Thr
 50           55           60

Met Gly Ala Ala Ala Thr Ala Leu Thr Val Gln Thr His Ser Val Ile
 65           70           75           80

```

ES 2 446 271 T3

Lys Gly Ile Val Gln Gln Gln Asp Asn Leu Leu Arg Ala Ile Gln Ala
 85 90 95

Gln Gln Glu Leu Leu Arg Leu Ser Val Trp Gly Ile Arg Gln Leu Arg
 100 105 110

Ala Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Leu Ile Gln Asn Gln Gln Leu Leu
 115 120 125

Asn Leu Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys
 130 135 140

Trp Asn Glu Thr Trp Arg Asn Thr Thr Asn Ile Asn Gln Ile Trp Gly
 145 150 155 160

Asn Leu Thr Trp Gln Glu Trp Asp Gln Gln Ile Asp Asn Val Ser Ser
 165 170 175

Thr Ile Tyr Glu Glu Ile Gln Lys Ala Gln Val Gln Gln Glu Gln Asn
 180 185 190

Glu Lys Lys Leu Leu Glu Leu Asp Glu Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp
 195 200 205

Leu Asp Ile Thr Lys Trp Leu Arg Asn Ile Arg Gln Gly Tyr Gln Pro
 210 215 220

Leu Ser Leu Gln Ile Pro Thr Arg Gln Gln Ser Glu Ala Glu Thr Pro
 225 230 235 240

Gly Arg Thr Gly Glu
 245

5

- <210> 49
- <211> 1476
- <212> ADN
- <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
- <400> 49

ES 2 446 271 T3

atgagttttg tggtcattat tcccgcgcgc tacgcgtcga cgcgtctgcc cggtaaacca 60
 ttggttgata ttaacggcaa acccatgatt gttcatgttc ttgaacgcgc gcgtgaatca 120
 ggtgccgagc gcatcatcgt ggcaaccgat catgaggatg ttgcccgcgc cgttgaagcc 180
 gctggcgggtag aagtatgtat gacgcgcgcc gatcatcagt caggaacaga acgtctggcg 240
 gaagttgtcg aaaaatgccc attcagcgcac gacacgggta tcgttaatgt gcaggggtgat 300
 gaaccgatga tccctgcgac aatcattcgt cagggttgcg ataacctcgc tcagcgtcag 360
 gtgggtatga cgactctggc ggtgccaatc cacaatgcgg aagaagcgtt taaccggaat 420
 gcggtgaaag tggttctcga cgctgaaggg tatgcaactgt acttctctcg cgccaccatt 480
 ccttgggatc gtgatcgttt tgcaagaagg cttgaaaccg ttggcgataa cttctcgcgt 540

 catcttggta tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca 600
 agtccgtag aacacatcga aatgtagag cagcttcgtg ttctgtggta cggcgaaaaa 660
 atccatggtg ctgttgctca ggaagttcct ggcacagggtg tggatacccc tgaagatctc 720
 gaccctcga cgaattctat cgggtgtgac atgaaagaca tctggcgtaa cgaactgttc 780
 aaatacaaag ttgttcgtgt taaaccgttc tctgttgctc cgaccccgat cgctcgtccg 840
 gttatcggta ctggcaccca ccgtgaaaaa cgtgctgtag gtctgggtat gctgttcctg 900
 ggcgttctgt ctgcagcagg ttccactatg ggtgctgcag ctaccgctct gaccgtacag 960
 acccactctg ttatcaaagg tatcgtacag cagcaggaca acctgctgcg tgcaatccag 1020
 gcacagcagg aactgctgcg tctgtctgta tggggatcc gtcagctgcg tgctcgtctg 1080
 ctggcactgg aaaccctgat ccagaaccag cagctgctga acctgtgggg ctgcaaaggt 1140
 cgtctgatct gctacacctc cgttaaatgg aacgaaacct ggcgtaacac caccaacatc 1200
 aaccagatct ggggtaacct gacctggcag gaatgggacc agcagatcga caacgtttct 1260
 tccaccatct acgaagaaat ccagaaagct caggttcagc aggaacagaa cgaaaaaaaa 1320
 ctgctggaac tggacgaatg ggcttctctg tggaaactggc tggacatcac caaatggctg 1380
 cgtaacatcc gtcagggcta ccagccgctg tccctgcaga tcccgacctg tcagcagtct 1440
 gaagctgaaa ctccgggtcg taccggtgaa taatag 1476

<210> 50
 <211> 490
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

 <400> 50

5

ES 2 446 271 T3

Met Ser Phe Val Val Ile Ile Pro Ala Arg Tyr Ala Ser Thr Arg Leu
 1 5 10 15

Pro Gly Lys Pro Leu Val Asp Ile Asn Gly Lys Pro Met Ile Val His
 20 25 30

Val Leu Glu Arg Ala Arg Glu Ser Gly Ala Glu Arg Ile Ile Val Ala
 35 40 45

Thr Asp His Glu Asp Val Ala Arg Ala Val Glu Ala Ala Gly Gly Glu
 50 55 60

Val Cys Met Thr Arg Ala Asp His Gln Ser Gly Thr Glu Arg Leu Ala
 65 70 75 80

Glu Val Val Glu Lys Cys Ala Phe Ser Asp Asp Thr Val Ile Val Asn
 85 90 95

Val Gln Gly Asp Glu Pro Met Ile Pro Ala Thr Ile Ile Arg Gln Val
 100 105 110

Ala Asp Asn Leu Ala Gln Arg Gln Val Gly Met Thr Thr Leu Ala Val

ES 2 446 271 T3

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

ES 2 446 271 T3

385		390		395		400									
Asn	Gln	Ile	Trp	Gly	Asn	Leu	Thr	Trp	Gln	Glu	Trp	Asp	Gln	Gln	Ile
				405					410					415	
Asp	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Ile	Tyr	Glu	Glu	Ile	Gln	Lys	Ala	Gln	Val
			420					425					430		
Gln	Gln	Glu	Gln	Asn	Glu	Lys	Lys	Leu	Leu	Glu	Leu	Asp	Glu	Trp	Ala
		435					440					445			
Ser	Leu	Trp	Asn	Trp	Leu	Asp	Ile	Thr	Lys	Trp	Leu	Arg	Asn	Ile	Arg
	450					455					460				
Gln	Gly	Tyr	Gln	Pro	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Pro	Thr	Arg	Gln	Gln	Ser
465					470					475					480
Glu	Ala	Glu	Thr	Pro	Gly	Arg	Thr	Gly	Glu						
				485					490						

- <210>51
- <211> 1125
- <212> ADN
- <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

5

<400> 51

atgatcggtg	gtgacatgaa	agacatctgg	cgtaacgaac	tgttcaaata	caaagttggt	60
cggtgtaaac	cgttctctgt	tgctccgacc	ccgatcgctc	gtccggttat	cggtactggc	120
accacccgtg	aaaaacgtgc	tgtaggctctg	ggtagctgtg	tcctgggcgt	tctgtctgca	180
gcaggtcca	ctatgggtgc	tgcagctacc	gctctgaccg	tacagaccca	ctctgtttatc	240
aaaggtatcg	tacagcagca	ggacaacctg	ctgcgtgcaa	tccaggcaca	gcaggaactg	300
ctgcgtctgt	ctgtatgggg	tatccgtcag	ctgcgtgctc	gtctgctggc	actggaacc	360
ctgatccaga	accagcagct	gctgaacctg	tggggctgca	aaggtcgtct	gatctgctac	420
acctccgtta	aatggaacga	aacctggcgt	aacaccacca	acatcaacca	gatctggggt	480
aacctgacct	ggcaggaatg	ggaccagcag	atcgacaacg	tttcttccac	catctacgaa	540
gaaatccaga	aagctcaggt	tcagcaggaa	cagaacgaaa	aaaaactgct	ggaactggac	600
gaatgggctt	ctctgtggaa	ctggctggac	atcaccaaat	ggctgcgtaa	catccgctcag	660
ggctaccagc	cgctgtccct	gcagatcccc	accgctcagc	agtctgaagc	tgaaactccg	720
ggctcgtaccg	gtgaagggtg	tgggtgacgaa	ggccgtccgc	gtctgatccc	gtctccgcag	780
ggtttcctgc	cgctgctgta	caccgacctg	cgtaccatca	tcctgtggtc	ctaccacctg	840
ctgtctaacc	tgatctctgg	tactcagact	gttatctctc	acctcgtctc	gggtctgtgg	900
attctgggtc	agaaaatcat	cgacgcttgc	cgtatctgcg	ctgctgttat	ccactactgg	960
ctgcaggaac	tgagaaatc	cgctacctcc	ctgatcgaca	ccttcgctgt	tgcagttgct	1020
aactggactg	acgacatcat	cctgggtatc	cagcgtctgg	gtcgtggtat	cctgaacatc	1080
ccgcgtcgtg	ttcggcaggg	cttcgaacgc	tctctgctgt	aatag		1125

10

ES 2 446 271 T3

<210> 52
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

5

<400> 52

Met Ile Gly Gly Asp Met Lys Asp Ile Trp Arg Asn Glu Leu Phe Lys
 1 5 10 15
 Tyr Lys Val Val Arg Val Lys Pro Phe Ser Val Ala Pro Thr Pro Ile
 20 25 30
 Ala Arg Pro Val Ile Gly Thr Gly Thr His Arg Glu Lys Arg Ala Val
 35 40 45
 Gly Leu Gly Met Leu Phe Leu Gly Val Leu Ser Ala Ala Gly Ser Thr
 50 55 60
 Met Gly Ala Ala Ala Thr Ala Leu Thr Val Gln Thr His Ser Val Ile
 65 70 75 80
 Lys Gly Ile Val Gln Gln Gln Asp Asn Leu Leu Arg Ala Ile Gln Ala
 85 90 95
 Gln Gln Glu Leu Leu Arg Leu Ser Val Trp Gly Ile Arg Gln Leu Arg
 100 105 110
 Ala Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Leu Ile Gln Asn Gln Gln Leu Leu
 115 120 125
 Asn Leu Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys
 130 135 140
 Trp Asn Glu Thr Trp Arg Asn Thr Thr Asn Ile Asn Gln Ile Trp Gly
 145 150 155 160
 Asn Leu Thr Trp Gln Glu Trp Asp Gln Gln Ile Asp Asn Val Ser Ser
 165 170 175
 Thr Ile Tyr Glu Glu Ile Gln Lys Ala Gln Val Gln Gln Glu Gln Asn
 180 185 190
 Glu Lys Lys Leu Leu Glu Leu Asp Glu Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp
 195 200 205
 Leu Asp Ile Thr Lys Trp Leu Arg Asn Ile Arg Gln Gly Tyr Gln Pro
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gln Ile Pro Thr Arg Gln Gln Ser Glu Ala Glu Thr Pro
 225 230 235 240

ES 2 446 271 T3

Gly Arg Thr Gly Glu Gly Gly Gly Asp Glu Gly Arg Pro Arg Leu Ile
 245 250 255

Pro Ser Pro Gln Gly Phe Leu Pro Leu Leu Tyr Thr Asp Leu Arg Thr
 260 265 270

Ile Ile Leu Trp Ser Tyr His Leu Leu Ser Asn Leu Ile Ser Gly Thr
 275 280 285

Gln Thr Val Ile Ser His Leu Arg Leu Gly Leu Trp Ile Leu Gly Gln
 290 295 300

Lys Ile Ile Asp Ala Cys Arg Ile Cys Ala Ala Val Ile His Tyr Trp
 305 310 315 320

Leu Gln Glu Leu Gln Lys Ser Ala Thr Ser Leu Ile Asp Thr Phe Ala
 325 330 335

Val Ala Val Ala Asn Trp Thr Asp Asp Ile Ile Leu Gly Ile Gln Arg
 340 345 350

Leu Gly Arg Gly Ile Leu Asn Ile Pro Arg Arg Val Arg Gln Gly Phe
 355 360 365

Glu Arg Ser Leu Leu
 370

5

- <210> 53
- <211> 1860
- <212> ADN
- <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
- <400> 53

ES 2 446 271 T3

atgagttttg tggtcattat tcccgcgcgc tacgcgtcga cgcgtctgcc cggtaaacca 60
 ttggttgata ttaacggcaa acccatgatt gttcatgttc ttgaacgcgc gcgtgaatca 120
 ggtgccgagc gcatcatcgt ggcaaccgat catgaggatg ttgcccgccg cgttgaagcc 180
 gctggcgggtg aagtatgtat gacgcgcgcc gatcatcagt caggaacaga acgtctggcg 240
 gaagttgtcg aaaaatgcgc attcagcgac gacacgggta tcgttaatgt gcaggggatg 300
 gaaccgatga tccctgcgac aatcattcgt cagggttctg ataacctcgc tcagcgtcag 360
 gtgggtatga cgactctggc ggtgccaatc cacaatgcgg aagaagcgtt taacctgaat 420
 gcggtgaaag tggttctcga cgctgaaggg tatgactgtt acttctctcg gccaccatt 480
 ccttgggatc gtgatcgttt tgcagaaggc ctgaaaccg ttggcgataa ctctctcgt 540
 catcttggtt tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca 600
 agtccgtagg aacacatcga aatgttagag cagcttcgtg ttctgtggta cggcgaaaaa 660
 atccatgttg ctgttgctca ggaagttcct ggcacagggtg tggatacccc tgaagatctc 720

gaccgcgca cgaattctat cggtggtgac atgaaagaca tctggcgtaa cgaactgttc 780
 aaatacaaag ttgttcgtgt taaaccgttc tctgttctc cgaccccgat cgctcgtccg 840
 gttatcggta ctggcaccca ccgtgaaaaa cgtgctgtag gtctgggtat gctgttcctg 900
 ggcgttctgt ctgcagcagg ttccactatg ggtgctgcag ctaccgctct gaccgtacag 960
 acccactctg ttatcaaagg tatcgtacag cagcaggaca acctgctgcg tgcaatccag 1020
 gcacagcagg aactgctgcg tctgtctgta tggggatccc gtcagctgcg tgctcgtctg 1080
 ctggcactgg aaacctgat ccagaaccag cagctgctga acctgtgggg ctgcaaaggt 1140
 cgtctgatct gctacacctc cgttaaattg aacgaaacct ggcgtaacac caccaacatc 1200
 aaccagatct ggggtaacct gacctggcag gaatgggacc agcagatcya caacgtttct 1260
 tccaccatct acgaagaaat ccagaagct caggttcagc aggaacagaa cgaaaaaaaa 1320
 ctgctggaac tggacgaatg ggcttctctg tggaaactggc tggacatcac caaatggctg 1380
 cgtaacatcc gtcagggtta ccagccgctg tccctgcaga tcccgaaccg tcagcagtct 1440
 gaagctgaaa ctccgggtcg taccgggtgaa ggtgggtggg acgaaggccg tccgcgtctg 1500
 atcccgtctc cgcagggttt cctgccgctg ctgtacaccg acctgctgac catcatcctg 1560
 tggctctacc acctgctgtc taacctgatc tctggtaact agactgttat ctctcacctg 1620
 cgtctgggtc tgtggattct gggtcagaaa atcatcgagc cttgccgtat ctgcgtctct 1680
 gttatccact actggctgca ggaactgcag aaatccgcta cctccctgat cgacaccttc 1740
 gctgttgacg ttgctaactg gactgacgac atcatcctgg gtatccagcg tctgggtcgt 1800
 ggtatcctga acatcccgcg tcgtgttcgc cagggtctcg aacgctctct gctgtaatag 1860

5 <210> 54
 <211> 618
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

10 <400> 54

ES 2 446 271 T3

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

ES 2 446 271 T3

Val Gln Gly Asp Glu Pro Met Ile Pro Ala Thr Ile Ile Arg Gln Val
 100 105 110
 Ala Asp Asn Leu Ala Gln Arg Gln Val Gly Met Thr Thr Leu Ala Val
 115 120 125
 Pro Ile His Asn Ala Glu Glu Ala Phe Asn Pro Asn Ala Val Lys Val
 130 135 140
 Val Leu Asp Ala Glu Gly Tyr Ala Leu Tyr Phe Ser Arg Ala Thr Ile
 145 150 155 160
 Pro Trp Asp Arg Asp Arg Phe Ala Glu Gly Leu Glu Thr Val Gly Asp
 165 170 175
 Asn Phe Leu Arg His Leu Gly Ile Tyr Gly Tyr Arg Ala Gly Phe Ile
 180 185 190
 Arg Arg Tyr Val Asn Trp Gln Pro Ser Pro Leu Glu His Ile Glu Met
 195 200 205
 Leu Glu Gln Leu Arg Val Leu Trp Tyr Gly Glu Lys Ile His Val Ala
 210 215 220
 Val Ala Gln Glu Val Pro Gly Thr Gly Val Asp Thr Pro Glu Asp Leu
 225 230 235 240
 Asp Pro Ser Thr Asn Ser Ile Gly Gly Asp Met Lys Asp Ile Trp Arg
 245 250 255
 Asn Glu Leu Phe Lys Tyr Lys Val Val Arg Val Lys Pro Phe Ser Val
 260 265 270
 Ala Pro Thr Pro Ile Ala Arg Pro Val Ile Gly Thr Gly Thr His Arg
 275 280 285
 Glu Lys Arg Ala Val Gly Leu Gly Met Leu Phe Leu Gly Val Leu Ser
 290 295 300
 Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ala Thr Ala Leu Thr Val Gln
 305 310 315 320
 Thr His Ser Val Ile Lys Gly Ile Val Gln Gln Gln Asp Asn Leu Leu
 325 330 335
 Arg Ala Ile Gln Ala Gln Gln Glu Leu Leu Arg Leu Ser Val Trp Gly
 340 345 350
 Ile Arg Gln Leu Arg Ala Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Leu Ile Gln
 355 360 365

ES 2 446 271 T3

Asn Gln Gln Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Ile Cys
 370 375 380

Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn Glu Thr Trp Arg Asn Thr Thr Asn Ile
 385 390 395 400

Asn Gln Ile Trp Gly Asn Leu Thr Trp Gln Glu Trp Asp Gln Gln Ile
 405 410 415

Asp Asn Val Ser Ser Thr Ile Tyr Glu Glu Ile Gln Lys Ala Gln Val
 420 425 430

Gln Gln Glu Gln Asn Glu Lys Lys Leu Leu Glu Leu Asp Glu Trp Ala
 435 440 445

Ser Leu Trp Asn Trp Leu Asp Ile Thr Lys Trp Leu Arg Asn Ile Arg
 450 455 460

Gln Gly Tyr Gln Pro Leu Ser Leu Gln Ile Pro Thr Arg Gln Gln Ser
 465 470 475 480

Glu Ala Glu Thr Pro Gly Arg Thr Gly Glu Gly Gly Gly Asp Glu Gly
 485 490 495

Arg Pro Arg Leu Ile Pro Ser Pro Gln Gly Phe Leu Pro Leu Leu Tyr
 500 505 510 515

Thr Asp Leu Arg Thr Ile Ile Leu Trp Ser Tyr His Leu Leu Ser Asn
 515 520 525

Leu Ile Ser Gly Thr Gln Thr Val Ile Ser His Leu Arg Leu Gly Leu
 530 535 540

Trp Ile Leu Gly Gln Lys Ile Ile Asp Ala Cys Arg Ile Cys Ala Ala
 545 550 555 560

Val Ile His Tyr Trp Leu Gln Glu Leu Gln Lys Ser Ala Thr Ser Leu
 565 570 575

Ile Asp Thr Phe Ala Val Ala Val Ala Asn Trp Thr Asp Asp Ile Ile
 580 585 590

Leu Gly Ile Gln Arg Leu Gly Arg Gly Ile Leu Asn Ile Pro Arg Arg
 595 600 605

Val Arg Gln Gly Phe Glu Arg Ser Leu Leu
 610 615

<210> 55
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
 <400> 55

5

ES 2 446 271 T3

Met Ser Phe Val Val Ile Ile Pro Ala Arg Tyr Ala Ser Thr Arg Leu
1 5 10 15

Pro Gly Lys Pro Leu Val Asp Ile Asn Gly Lys Pro Met Ile Val His
20 25 30

Val Leu Glu Arg Ala Arg Glu Ser Gly Ala Glu Arg Ile Ile Val Ala
35 40 45

Thr Asp His Glu Asp Val Ala Arg Ala Val Glu Ala Ala Gly Gly Glu
50 55 60

Val Cys Met Thr Arg Ala Asp His Gln Ser Gly Thr Glu Arg Leu Ala
65 70 75 80

Glu Val Val Glu Lys Cys Ala Phe Ser Asp Asp Thr Val Ile Val Asn
85 90 95

Val Gln Gly Asp Glu Pro Met Ile Pro Ala Thr Ile Ile Arg Gln Val
100 105 110

Ala Asp Asn Leu Ala Gln Arg Gln Val Gly Met Thr Thr Leu Ala Val
115 120 125

Pro Ile His Asn Ala Glu Glu Ala Phe Asn Pro Asn Ala Val Lys Val
130 135 140

Val Leu Asp Ala Glu Gly Tyr Ala Leu Tyr Phe Ser Arg Ala Thr Ile
145 150 155 160

Pro Trp Asp Arg Asp Arg Phe Ala Glu Gly Leu Glu Thr Val Gly Asp
165 170 175

Asn Phe Leu Arg His Leu Gly Ile Tyr Gly Tyr Arg Ala Gly Phe Ile
180 185 190

Arg Arg Tyr Val Asn Trp Gln Pro Ser Pro Leu Glu His Ile Glu Met
195 200 205

Leu Glu Gln Leu Arg Val Leu Trp Tyr Gly Glu Lys Ile His Val Ala
210 215 220

Val Ala Gln Glu Val Pro Gly Thr Gly Val Asp Thr Pro Glu Asp Leu
225 230 235 240

Asp Pro Ser Thr Asn Ser Met Glu Gly Glu Leu Thr Cys Asn Ser Thr
245 250 255

Val Thr Ser Ile Ile Ala Asn Ile Asp Ser Asp Gly Asn Gln Thr Asn

ES 2 446 271 T3

260 265 270
 Ile Thr Phe Ser Ala Glu Val Ala Glu Leu Tyr Arg Leu Glu Leu Gly
 275 280 285
 Asp Tyr Lys Leu Ile Glu Val Thr Pro Ile Gly Phe Ala Pro Thr Lys
 290 295 300
 Glu Lys Arg Tyr Ser Ser Ala Pro Val Arg Asn Lys Arg Gly Val Phe
 305 310 315 320
 Val Leu Gly Phe Leu Gly Phe Leu Ala Thr Ala Gly Ser Ala Met Gly
 325 330 335
 Ala Ala Ser Leu Thr Leu Ser Ala Gln Ser Arg Thr Leu Leu Ala Gly
 340 345 350
 Ile Val Gln Gln Gln Gln Gln Leu Leu Asp Val Val Lys Arg Gln Gln
 355 360 365
 Glu Met Leu Arg Leu Thr Val Trp Gly Thr Lys Asn Leu Gln Ala Arg
 370 375 380
 Val Thr Ala Ile Glu Lys Tyr Leu Lys Asp Gln Ala Gln Leu Asn Ser
 385 390 395 400
 Trp Gly Cys Ala Phe Arg Gln Val Cys His Thr Thr Val Pro Trp Val
 405 410 415
 Asn Asp Ser Leu Thr Pro Asp Trp Asn Asn Met Thr Trp Gln Glu Trp
 420 425 430
 Glu Lys Arg Val His Tyr Leu Glu Ala Asn Ile Ser Gln Ser Leu Glu
 435 440 445
 Gln Ala Gln Ile Gln Gln Glu Lys Asn Met Tyr Glu Leu Gln Lys Leu
 450 455 460
 Asn Ser
 465

- 5
- <210> 56
 - <211> 491
 - <212> PRT
 - <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
 - <400> 56

Met Ser Phe Val Val Ile Ile Pro Ala Arg Tyr Ala Ser Thr Arg Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Lys Pro Leu Val Asp Ile Asn Gly Lys Pro Met Ile Val His
 20 25 30

ES 2 446 271 T3

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

ES 2 446 271 T3

Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val
 305 310 315 320

Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu
 325 330 335

Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp
 340 345 350

Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu
 355 360 365

Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile
 370 375 380

Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu
 385 390 395 400

Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile
 405 410 415

Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
 420 425 430

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Val
 435 440 445

Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr His Leu
 450 455 460

Pro Ile Pro Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Lys Lys Ala
 465 470 475 480

Ala Asn Val Thr Val Thr Val Pro Phe Val Trp
 485 490

- <210> 57
- <211> 651
- <212> ADN
- <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
- <400> 57

5

ES 2 446 271 T3

```
atgatcggg gtagacatgaa agacatctgg cgtaacgaac tgttcaaata caaagttggt 60
cgtgttaaac cgttctctgt tgctccgacc ccgatcgctc gtccgggttat cggtactggc 120
accaccctg aaaaacgtgc tgtaggtctg ggtatgctgt tcctgggcgt tctgtctgca 180
gcaggttcca ctatgggtgc tgcagctacc gctctgaccg tacagacca ctctgttacc 240
aaaggtatcg tacagcagca ggacaacctg ctgcgtgcaa tccaggcaca gcaggaactg 300
ctgcgtctgt ctgtatggg tatccgtcag ctgcgtgctc gtctgctggc actggaaacc 360
ctgatccaga accagcagct gctgaacctg tggggctgca aaggctctct gatctgctac 420

acctccgta aatggaacga aacctggcgt aacaccacca acatcaacca gatctggggg 480
aacctgacct ggcaggaatg ggaccagcag atcgacaacg tttcttcac catctacgaa 540
gaaatccaga aagctcaggt tcagcaggaa cagaacgaaa aaaaactgct ggaactggac 600
gaatgggctt ctctgtggaa ctggctggac atcaccaaat ggctgtaata g 651
```

<210> 58
<211> 215
<212> PRT
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 58

5

ES 2 446 271 T3

Met Ile Gly Gly Asp Met Lys Asp Ile Trp Arg Asn Glu Leu Phe Lys
 1 5 10 15

Tyr Lys Val Val Arg Val Lys Pro Phe Ser Val Ala Pro Thr Pro Ile
 20 25 30

Ala Arg Pro Val Ile Gly Thr Gly Thr His Arg Glu Lys Arg Ala Val
 35 40 45

Gly Leu Gly Met Leu Phe Leu Gly Val Leu Ser Ala Ala Gly Ser Thr
 50 55 60

Met Gly Ala Ala Ala Thr Ala Leu Thr Val Gln Thr His Ser Val Ile
 65 70 75 80

Lys Gly Ile Val Gln Gln Gln Asp Asn Leu Leu Arg Ala Ile Gln Ala
 85 90 95

Gln Gln Glu Leu Leu Arg Leu Ser Val Trp Gly Ile Arg Gln Leu Arg
 100 105 110

Ala Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Leu Ile Gln Asn Gln Gln Leu Leu
 115 120 125

Asn Leu Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys
 130 135 140

Trp Asn Glu Thr Trp Arg Asn Thr Thr Asn Ile Asn Gln Ile Trp Gly
 145 150 155 160

Asn Leu Thr Trp Gln Glu Trp Asp Gln Gln Ile Asp Asn Val Ser Ser
 165 170 175

Thr Ile Tyr Glu Glu Ile Gln Lys Ala Gln Val Gln Gln Glu Gln Asn
 180 185 190

Glu Lys Lys Leu Leu Glu Leu Asp Glu Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp
 195 200 205

Leu Asp Ile Thr Lys Trp Leu
 210 215

- 5
- <210> 59
 - <211> 1386
 - <212> ADN
 - <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
 - <400> 59

ES 2 446 271 T3

```

atgagttttg tggtcattat tcccgcgcgc tacgcgctga cgcgtctgcc cggtaaacca      60
ttggttgata ttaacggcaa acccatgatt gttcatgttc ttgaacgcgc gcgtgaatca      120
ggtgccgagc gcatcatcgt ggcaaccgat catgaggatg ttgcccgcgc cgttgaagcc      180
gctggcggtg aagtatgtat gacgcgcgcc gatcatcagt caggaacaga acgtctggcg      240
gaagttgtcg aaaaatgcgc attcagcgac gacacgggta tcgttaatgt gcaggggtgat      300
gaaccgatga tccctgcgac aatcattcgt caggttgctg ataacctcgc tcagcgtcag      360
gtgggtatga cgactctggc ggtgccaatc cacaatgcgg aagaagcgtt taaccggaat      420
gcggtgaaag tggttctcga cgctgaaggg tatgcaactgt acttctctcg cgccaccatt      480
ccttgggatc gtgatcgttt tgcagaaggc cttgaaaccg ttggcgataa cttctctcgt      540
catcttggta tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca      600
agtccgttag aacacatcga aatgtagag cagcttcgtg ttctgtggta cggcgaaaaa      660
atccatgttg ctgttgctca ggaagttcct ggcacagggtg tggatacccc tgaagatctc      720
gaccgcctga cgaattctat cggtggtgac atgaaagaca tctggcgtaa cgaactgttc      780
aaatacaaag ttgttcgtgt taaaccgttc tctgttgctc cgaccccgat cgctcgtccg      840
gttatcggta ctggcaccca ccgtgaaaaa cgtgctgtag gctctgggtat gctgttcctg      900
ggcgttctgt ctgcagcagg ttccactatg ggtgctgcag ctaccgctct gaccgtacag      960
accactctgt ttatcaaagg tatcgtacag cagcaggaca acctgctgcg tgcaatccag     1020
gcacagcagg aactgctgcg tctgtctgta tggggatcc gtcagctgcg tgctcgtctg     1080
ctggcactgg aaaccctgat ccagaaccag cagctgctga acctgtgggg ctgcaaaggt     1140
cgtctgatct gctacacctc cgttaaattg aacgaaacct ggcgtaacac caccaacatc     1200
aaccagatct ggggtaacct gacctggcag gaatgggacc agcagatcga caacgtttct     1260
tccaccatct acgaagaaat ccagaaagct caggttcagc aggaacagaa cgaaaaaaaa     1320
ctgctggaac tggacgaatg ggcttctctg tggaaactggc tggacatcac caaatggctg     1380
taatag
    
```

<210> 60
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

 <400> 60

5

10

Met Ser Phe Val Val Ile Ile Pro Ala Arg Tyr Ala Ser Thr Arg Leu
 1 5 10 15

ES 2 446 271 T3

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

ES 2 446 271 T3

Glu Lys Arg Ala Val Gly Leu Gly Met Leu Phe Leu Gly Val Leu Ser
 290 295 300

Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ala Thr Ala Leu Thr Val Gln
 305 310 315 320

Thr His Ser Val Ile Lys Gly Ile Val Gln Gln Gln Asp Asn Leu Leu
 325 330 335

Arg Ala Ile Gln Ala Gln Gln Glu Leu Leu Arg Leu Ser Val Trp Gly
 340 345 350

Ile Arg Gln Leu Arg Ala Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Leu Ile Gln
 355 360 365

Asn Gln Gln Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Ile Cys
 370 375 380

Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn Glu Thr Trp Arg Asn Thr Thr Asn Ile
 385 390 395 400

Asn Gln Ile Trp Gly Asn Leu Thr Trp Gln Glu Trp Asp Gln Gln Ile
 405 410 415

Asp Asn Val Ser Ser Thr Ile Tyr Glu Glu Ile Gln Lys Ala Gln Val
 420 425 430

Gln Gln Glu Gln Asn Glu Lys Lys Leu Leu Glu Leu Asp Glu Trp Ala
 435 440 445

Ser Leu Trp Asn Trp Leu Asp Ile Thr Lys Trp Leu
 450 455 460

<210>61
 <211> 873
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana
 <400> 61

5

Met Ile Val Thr Met Arg Ala Met Gly Lys Arg Asn Arg Lys Leu Gly
 1 5 10 15

Ile Leu Tyr Ile Val Met Ala Leu Ile Ile Pro Cys Leu Ser Ser Ser
 20 25 30

Gln Leu Tyr Ala Thr Val Tyr Ala Gly Val Pro Val Trp Glu Asp Ala
 35 40 45

Ala Pro Val Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Asn Leu Thr Ser Thr Glu
 50 55 60

Lys His Asn Val Trp Ala Ser Gln Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Thr

10

ES 2 446 271 T3

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

ES 2 446 271 T3

610					615										620	
Asn 625	Thr	Thr	Asn	Ile	Asn 630	Gln	Ile	Trp	Gly	Asn 635	Leu	Thr	Trp	Gln	Glu 640	
Trp	Asp	Gln	Gln	Ile 645	Asp	Asn	Val	Ser	Ser 650	Thr	Ile	Tyr	Glu	Glu 655	Ile	
Gln	Lys	Ala	Gln 660	Val	Gln	Gln	Glu	Gln 665	Asn	Glu	Lys	Lys	Leu 670	Leu	Glu	
Leu	Asp	Glu 675	Trp	Ala	Ser	Leu	Trp 680	Asn	Trp	Leu	Asp	Ile 685	Thr	Lys	Trp	
Leu	Trp 690	Tyr	Ile	Lys	Ile	Ala 695	Ile	Ile	Ile	Val	Gly 700	Ala	Leu	Ile	Gly	
Val 705	Arg	Ile	Val	Met	Ile 710	Val	Leu	Asn	Leu	Val 715	Arg	Asn	Ile	Arg	Gln 720	
Gly	Tyr	Gln	Pro	Leu 725	Ser	Leu	Gln	Ile	Pro 730	Thr	Arg	Gln	Gln	Ser 735	Glu	
Ala	Glu	Thr	Pro 740	Gly	Arg	Thr	Gly	Glu 745	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Glu 750	Gly	Arg
Pro	Arg	Leu 755	Ile	Pro	Ser	Pro	Gln 760	Gly	Phe	Leu	Pro	Leu 765	Leu	Tyr	Thr	
Asp	Leu 770	Arg	Thr	Ile	Ile	Leu 775	Trp	Ser	Tyr	His	Leu 780	Leu	Ser	Asn	Leu	
Ile 785	Ser	Gly	Thr	Gln	Thr 790	Val	Ile	Ser	His	Leu 795	Arg	Leu	Gly	Leu	Trp 800	
Ile	Leu	Gly	Gln	Lys 805	Ile	Ile	Asp	Ala	Cys 810	Arg	Ile	Cys	Ala	Ala 815	Val	
Ile	His	Tyr	Trp 820	Leu	Gln	Glu	Leu	Gln 825	Lys	Ser	Ala	Thr	Ser 830	Leu	Ile	
Asp	Thr	Phe 835	Ala	Val	Ala	Val	Ala 840	Asn	Trp	Thr	Asp	Asp 845	Ile	Ile	Leu	
Gly	Ile 850	Gln	Arg	Leu	Gly	Arg 855	Gly	Ile	Leu	Asn	Ile 860	Pro	Arg	Arg	Val	
Arg 865	Gln	Gly	Phe	Glu	Arg 870	Ser	Leu	Leu								

<210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 446 271 T3

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 62
yctytagaga ggtgccatt 20

<210> 63
<211> 19
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
15 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 63
gtgctwcctg ctgcacta 19

20 <210> 64
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 64
aagttgctca agagtggtgta 20

<210> 65
<211> 19
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
40 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 65
ccttagaggc acttgaggt 19

45 <210> 66
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 66
ccaragcagt aagtaacgc 19

55 <210> 67
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

65 <400> 67
rttaaytaat tgtaactcca caa 23

ES 2 446 271 T3

5 <210> 68
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

15 <400> 68
gamtytatgc acctcccatc 20

20 <210> 69
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 69
gacataacta aatggttg g 21

35 <210> 70
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

45 <400> 70
atactgara grttaagrag aat 23

50 <210> 71
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

60 <400> 71
atgccatgtg tacaagtaac 20

65 <210> 72
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

75 <400> 72
atacactatt gtgctccarc 20

80 <210> 73
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 446 271 T3

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 73
agttctccat atatcttca tr 22

<210> 74
<211> 22
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
15 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 74
aacataactg gaatgatyct ac 22

20 <210> 75
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 75
ctgagrtccg tgtacaac 18

<210> 76
<211> 20
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
40 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 76
attaggcagg gatatcaacc 20

45 <210> 77
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 77
cctactccag gtgcrat 18

55 <210> 78
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

65 <400> 78
cawcacaagc ctgygttcc 19

ES 2 446 271 T3

5 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

15 <400> 79
 atgtctcvt gcattgkct 20

20 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 80
 aatgggacac tctctaragr 20

35 <210>81
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

45 <400> 81
 ttaactgtca tggagaattc tt 22

50 <210> 82
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

60 <400> 82
 aagaattctc catgacagtt aa 22

65 <210> 83
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 83
 taagtgcagc aggwagcac 19

<210> 84
 <211>21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 446 271 T3

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

5 <400> 84
ccacaacccat ttagttatgt c 21

<210> 85
<211> 20
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
15 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 85
taccacctct tgagcaact 20

20 <210> 86
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 86
cytgtctaataat yctycttgg 19

<210> 87
<211> 19
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
40 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 87
tggcctggta cagcatggg 19

45 <210> 88
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 88
gtacgaattc catggaaggg gagttgacct gc 32

55 <210> 89
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

65 <400> 89
tattggatcc ttatcagcta ttagttttt gtag 34

ES 2 446 271 T3

<210> 90
<211> 2214
<212> ADN
5 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 90

```
atgagttttg tggtcattat tcccgcgcgc tacgcgtcga cgcgtctgcc cggtaaacca      60
ttggttgata ttaacggcaa acccatgatt gttcatgttc ttgaacgcgc gcgtgaatca      120
ggtgccgagc gcatcatcgt ggcaaccgat catgaggatg ttgcccgcgc cgttgaagcc      180
gctggcggtg aagtatgtat gacgcgcgcc gatcatcagt caggaacaga acgtctggcg      240
gaagttgtcg aaaaatgcmc attcagcgc gacacggtga tcgttaatgt gcagggtgat      300
gaaccgatga tcctgcgcac aatcattcgt caggttgctg .ataacctcgc tcagcgtcag      360
```

ES 2 446 271 T3

gtgggtatgg cgactctggc ggtgccaatc cacaatgctg aagaagcgtt. taacccgaat 420
 gcggtgaaag tggttctcga cgctgaaggg tatgactgt acttctctcg cgccaccatt 480
 ccttgggatc gtgatcgttt tgcagaaggc cttgaaaccg ttggcgataa cttcctgctg 540
 catcttggta tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttactgtaa ctggcagcca 600
 agtccgttag aacacatcga aatgtagag cagcttcgtg ttctgtggta cggcgaaaaa 660
 atccatggtg ctggtgctca ggaagttcct ggcacagggtg tggatacccc tgaagatccg 720
 tcgacagccc ttatgaagat ccccgggcag ccgggtgggtg gtgacatgctg tgacaactgg 780
 cgttctgaac tgtacaaata caaagttggt aaaatcgaac cgctgggtgt tgctccgact 840
 aaagctaaac gtcgtggtgt tcagcgtgaa aaacgcgccg ttggtatcgg tgactgttc 900
 ctgggtttcc tgggtgctgc tggttctacc atgggtgctg cttctatgac cctgactgtt 960
 caggcccgtc agcttctgtc tggatcgtt cagcagcaga acaatctgct gcgtgctatc 1020
 gaagctcagc agcatctgct gcaactgacc gtttggggta tcaaacagct tcaggctcgt 1080
 atctggctg ttgaacgta cctgaaagac cagcagctgc tgggtatctg gggtgctct 1140
 ggtaaacgta tctgactac tgctgttccg tggaaacgct cttggtctaa caaatctctg 1200
 gaacagatct ggaacaacat gacttggatg gaatgggacc gtgaaatcaa caactacaca 1260
 agcttgatcc actctctgat cgaagaaagc cagaaccagc aggaaaaaaa cgaacaggaa 1320
 ctctagaac tggacaaatg ggtaaccgt gttcgtcagg gttactctcc gctgtctttc 1380
 cagacccatc tgccgatccc gcgtggtccg gaccgtccgg aaggatcga agaagaaggc 1440
 ggcgaacgtg accgtgaccg ttccattcgt ctggtaatcg gtggtgacat gaaagacatc 1500
 tggcgtaacg aactgttcaa atacaaagtt gttcgtgta aaccgttctc tgttgctccg 1560
 accccgatcg ctctccggt tatcggact ggacccacc gtgaaaaacg tgctgtaggt 1620
 ctgggtatgc tgttcttggg cgttctgtct gcagcagggt cactatggg tgctgcagct 1680
 accgctctga ccgtacagac cactctgtt atcaaaggta tcgtacagca gcaggacaac 1740
 ctgctgcgtg caatccaggc acagcaggaa ctgctgcgtc tgtctgtatg gggatccgt 1800
 cagctgcgtg ctctctgct ggcactggaa accctgatcc agaaccagca gctgctgaac 1860
 ctgtggggct gcaaaggctg tctgatctgc tacacctccg ttaaattgaa cgaaacctgg 1920
 cgtaacacca ccaacatcaa ccagatctgg ggtaacctga cctggcagga atgggaccag 1980
 cagatcgaca acgtttcttc caccatctac gaagaaatcc agaaagctca ggttcagcag 2040
 gaacagaacg aaaaaaact gctggaactg gacgaatggg cttctctgtg gaactggctg 2100
 gacatcacca aatggctgcg taacatccgt cagggtacc agccgctgtc cctgcagatc 2160
 ccgacccgtc agcagtctga agctgaaact ccgggtcgta ccggtgaata atag 2214

<210>91
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

5

<400> 91

ES 2 446 271 T3

Met Ser Phe Val Val Ile Ile Pro Ala Arg Tyr Ala Ser Thr Arg Leu
1 5 10 15

Pro Gly Lys Pro Leu Val Asp Ile Asn Gly Lys Pro Met Ile Val His
20 25 30

Val Leu Glu Arg Ala Arg Glu Ser Gly Ala Glu Arg Ile Ile Val Ala
35 40 45

Thr Asp His Glu Asp Val Ala Arg Ala Val Glu Ala Ala Gly Gly Glu
50 55 60

Val Cys Met Thr Arg Ala Asp His Gln Ser Gly Thr Glu Arg Leu Ala
65 70 75 80

Glu Val Val Glu Lys Cys Ala Phe Ser Asp Asp Thr Val Ile Val Asn
85 90 95

Val Gln Gly Asp Glu Pro Met Ile Pro Ala Thr Ile Ile Arg Gln Val
100 105 110

Ala Asp Asn Leu Ala Gln Arg Gln Val Gly Met Ala Thr Leu Ala Val
115 120 125

Pro Ile His Asn Ala Glu Glu Ala Phe Asn Pro Asn Ala Val Lys Val
130 135 140

Val Leu Asp Ala Glu Gly Tyr Ala Leu Tyr Phe Ser Arg Ala Thr Ile
145 150 155 160

Pro Trp Asp Arg Asp Arg Phe Ala Glu Gly Leu Glu Thr Val Gly Asp
165 170 175

Asn Phe Leu Arg His Leu Gly Ile Tyr Gly Tyr Arg Ala Gly Phe Ile
180 185 190

Arg Arg Tyr Val Asn Trp Gln Pro Ser Pro Leu Glu His Ile Glu Met
195 200 205

Leu Glu Gln Leu Arg Val Leu Trp Tyr Gly Glu Lys Ile His Val Ala
210 215 220

Val Ala Gln Glu Val Pro Gly Thr Gly Val Asp Thr Pro Glu Asp Pro
225 230 235 240

Ser Thr Ala Leu Met Lys Ile Pro Gly Asp Pro Gly Gly Gly Asp Met
245 250 255

Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile
260 265 270

ES 2 446 271 T3

Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln
 275 280 285
 Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu
 290 295 300
 Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu
 325 330 335
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp
 340 345 350
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu
 355 360 365
 Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile
 370 375 380
 Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu
 385 390 395 400
 Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile
 405 410 415
 Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
 420 425 430
 Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Val
 435 440 445
 Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr His Leu
 450 455 460
 Pro Ile Pro Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Glu Glu Gly
 465 470 475 480
 Gly Glu Arg Asp Arg Asp Arg Ser Ile Arg Leu Val Ile Gly Gly Asp
 485 490 495
 Met Lys Asp Ile Trp Arg Asn Glu Leu Phe Lys Tyr Lys Val Val Arg
 500 505 510
 Val Lys Pro Phe Ser Val Ala Pro Thr Pro Ile Ala Arg Pro Val Ile
 515 520 525
 Gly Thr Gly Thr His Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Leu Gly Met Leu
 530 535 540

ES 2 446 271 T3

Phe Leu Gly Val Leu Ser Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ala
 545 550 555 560

Thr Ala Leu Thr Val Gln Thr His Ser Val Ile Lys Gly Ile Val Gln
 565 570 575

Gln Gln Asp Asn Leu Leu Arg Ala Ile Gln Ala Gln Gln Glu Leu Leu
 580 585 590

Arg Leu Ser Val Trp Gly Ile Arg Gln Leu Arg Ala Arg Leu Leu Ala
 595 600 605

Leu Glu Thr Leu Ile Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys
 610 615 620

Lys Gly Arg Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn Glu Thr Trp
 625 630 635 640

Arg Asn Thr Thr Asn Ile Asn Gln Ile Trp Gly Asn Leu Thr Trp Gln
 645 650 655

Glu Trp Asp Gln Gln Ile Asp Asn Val Ser Ser Thr Ile Tyr Glu Glu
 660 665 670

Ile Gln Lys Ala Gln Val Gln Gln Glu Gln Asn Glu Lys Lys Leu Leu
 675 680 685

Glu Leu Asp Glu Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Leu Asp Ile Thr Lys
 690 695 700

Trp Leu Arg Asn Ile Arg Gln Gly Tyr Gln Pro Leu Ser Leu Gln Ile
 705 710 715 720

Pro Thr Arg Gln Gln Ser Glu Ala Glu Thr Pro Gly Arg Thr Gly Glu
 725 730 735

<210> 92
 <211> 2124
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 92

atgagttttg tggtcattat tcccgcgcgc tacgcgtcga cgcgtctgcc cggtaaacca 60
 ttggttgata ttaacggcaa acccatgatt gttcatgttc ttgaacgcgc gcgtgaatca 120
 ggtgccgagc gcatcatcgt ggcaaccgat catgaggatg ttgcccgcc cgttgaagcc 180
 gctggcggtg aagtatgtat gacgcgcgcc gatcatcagt caggaacaga acgtctggcg 240
 gaagttgtcg aaaaatgcgc attcagcgac gacacgggtga tcgttaatgt gcagggtgat 300
 gaaccgatga tccctgcgac aatcattcgt caggttgctg ataacctcgc tcagcgtcag 360

5

10

ES 2 446 271 T3

gtgggtatgg cgactctggc ggtgccaatc cacaatgctg aagaagcgtt taaccgcaat 420
gCGGTGaaag tggttctcga cgctgaaggg tatgcactgt acttctctcg cgccaccatt 480
ccttgggatc gtgatcggtt tgcagaaggc cttgaaaccg ttggcgataa cttcctgcgt 540
catcttggtta tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca 600
agtccgtag aacacatcga aatgtagag cagcttcgtg ttctgtggta cggcgaaaaa 660
atccatgttg ctggtgctca ggaagttcct ggacacaggtg tggatacccc tgaagatccg 720
tcgacagccc ttatgaagat ccccggcgac ccgggtggtg gtgacatgcg tgacaactgg 780
cgttctgaac tgtacaaata caaagttggt aaaatcgaac cgctgggtgt tgctccgact 840
aaagctaaac gtcgtggtgt tcagcgtgaa aaacygcy cy ltggtatcgg tgcactgttc 900
ctgggtttcc tgggtgctgc tggttctacc atgggtgctg cttctatgac cctgactgtt 960
caggcccgtc agcttctgtc tggatcgtt cagcagcaga acaatctgct gcgtgctatc 1020
gaagctcagc agcatctgct gcaactgacc gtttggggta tcaaacagct tcaggctcgt 1080
atcctggctg ttgaacgta cctgaaagac cagcagctgc tgggtatctg gggttgctct 1140
ggtaaaactga tctgcaactac tgctgttccg tggaaacgctt cttgggtctaa caaatctctg 1200
gaacagatct ggaacaacat gacttggatg gaatgggacc gtgaaatcaa caactacaca 1260
agcttgatcc actctctgat cgaagaaagc cagaaccagc aggaaaaaaaa cgaacaggaa 1320
cttctagaac tggacaaatg ggtaaccgt gttcgtcagg gttactctcc gctgtctttc 1380
cagaccatc tgccgatccc gcgtggtccg gaccgtccgg aaggatcga agaagaaggc 1440
ggcgaacgtg accgtgaccg ttccattcgt ctgtaaatcg gtggtgacat gaaagacatc 1500
tggcgtaacg aactgttcaa atacaaagtt gttcgtgta aaccgttctc tgttgctccg 1560
accccgatcg ctcgtccggt taticgtact ggcaccacc gtgaaaaacg tgctgtaggt 1620
ctgggtatgc tgttcctggg cgttctgtct gcagcagggt ccactatggg tgctgcagct 1680
accgctctga ccgtacagac cactctgtt atcaaaggta tcgtacagca gcaggacaac 1740
ctgctgcgtg caatccaggc acagcaggaa ctgctgcgtc tgtctgtatg gggtatccgt 1800
cagctgcgtg ctcgtctgct ggactggaa accctgatcc agaaccagca gctgctgaac 1860
ctgtggggct gcaaaggctg tctgatctgc tacacctccg ttaaatggaa cgaaacctgg 1920
cgtaacacca ccaacatcaa ccagatctgg ggtaacctga cctggcagga atgggaccag 1980
cagatcgaca acgtttcttc caccatctac gaagaaatcc agaaagctca ggttcagcag 2040
gaacagaacg aaaaaaaaaact gctggaactg gacgaatggg cttctctgtg gaactggctg 2100
gacatcacca aatggctgta atag 2124

<210> 93
<211> 706
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 93

5

Met Ser Phe Val Val Ile Ile Pro Ala Arg Tyr Ala Ser Thr Arg Leu

10

ES 2 446 271 T3

EP 2 055 780 B1

545	550	555	560
Thr Ala Leu Thr Val 565	Gln Thr His Ser Val 570	Ile Lys Gly Ile Val 575	Gln
Gln Gln Asp Asn 580	Leu Leu Arg Ala Ile 585	Gln Ala Gln Gln Glu 590	Leu Leu
Arg Leu Ser Val 595	Trp Gly Ile Arg 600	Gln Leu Arg Ala Arg 605	Leu Leu Ala
Leu Glu Thr Leu 610	Ile Gln Asn Gln 615	Gln Leu Leu Asn 620	Leu Trp Gly Cys
Lys Gly Arg Leu 625	Ile Cys Tyr Thr Ser 630	Val Lys Trp Asn 635	Glu Thr Trp 640
Arg Asn Thr Thr 645	Asn Ile Asn Gln Ile 650	Trp Gly Asn Leu 655	Thr Trp Gln
Glu Trp Asp Gln 660	Gln Ile Asp Asn Val 665	Ser Ser Thr Ile Tyr 670	Glu Glu
Ile Gln Lys Ala 675	Gln Val Gln Gln Glu 680	Gln Asn Glu Lys 685	Lys Leu Leu
Glu Leu Asp Glu 690	Trp Ala Ser Leu 695	Trp Asn Trp Leu 700	Asp Ile Thr Lys
Trp Leu 705			

<210> 94
 <211> 1470
 <212> ADN
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana

5

<400> 94

ES 2 446 271 T3

```

atgatcggg gtgacatgaa agacatctgg cgtaacgaac tgttcaaata caaagttggt      60
cgtgttaaac cgttctctgt tgcctcgacc ccgatcgctc gtccgggttat cggctactggc      120
acccaccgtg aaaaacgtgc tgtaggctctg ggtatgctgt tcctgggcgt tctgtctgca      180
gcagggtcca ctatgggtgc tgcagctacc gctctgaccg tacagaccca ctctgttacc      240
aaaggatatc tacagcagca ggacaacctg ctgctgcaa tccaggcaca gcaggaactg      300
ctgctctgt ctgtatggg tatccgtcag ctgctgctc gtctgtggc actggaaacc      360
ctgatccaga accagcagct gctgaacctg tggggctgca aaggctcgtct gatctgtacc      420
acctccgta aatggaacga aacctggcgt aacaccacca acatcaacca gatctggggt      480
aacctgacct ggcaggaatg ggaccagcag atcgacaacg tttctccac catctacgaa      540
gaaatccaga aagctcaggt tcagcaggaa cagaacgaaa aaaaactgct ggaactggac      600

gaatgggctt ctctgtggaa ctggctggac atcaccaaat ggctgcgtaa catccgtcag      660
ggctaccagc cgctgtccct gcagatcccg acccgtcagc agtctgaagc tgaactccg      720
ggctgtaccg gtgaaggctc ggggtggtgt gacatgcgtg acaactggcg ttctgaactg      780
tacaataca aagttgtaa aatcgaaccg ctgggtgttg ctccgactaa agctaaactg      840
cgtgtgttc agcgtgaaa acgcgcgctt ggtatcgggt cactgttctt gggtttctg      900
gggtgctgt gttctaccat ggggtctgct tctatgacc tgactgttca ggcccgtcag      960
cttctgtctg gtatcgttca gcagcagaac aatctgctgc gtgctatcga agctcagcag     1020
catctgtctg aactgaccgt ttggggatc aaacagcttc aggctcgtat cctggctgtt     1080
gaacgttacc tgaagacca gcagctgctg ggtatctggg gttgctctgg taaactgatc     1140
tgcactactg ctgttccgtg gaacgcttct tggcttaaca aatctctgga acagatctgg     1200
aacaacatga cttggatgga atgggaccgt gaaatcaaca actacacaag cttgatccac     1260
tctctgatcg aagaagcca gaaccagcag gaaaaaacg aacaggaact tctagaactg     1320
gacaaatggg ttaaccgtgt tcgtcagggt tactctccgc tgtctttcca gaccatctg     1380
ccgatcccgc gtggtccgga ccgtccgaa ggtatcgaag aagaaggcgg cgaacgtgac     1440
cgtgaccgtt ccattcgtct ggtataatag                                     1470

```

- <210> 95
- <211> 488
- <212> PRT
- <213> Virus de inmunodeficiencia humana
- <400> 95

ES 2 446 271 T3

Met Ile Gly Gly Asp Met Lys Asp Ile Trp Arg Asn Glu Leu Phe Lys
 1 5 10 15

Tyr Lys Val Val Arg Val Lys Pro Phe Ser Val Ala Pro Thr Pro Ile
 20 25 30

Ala Arg Pro Val Ile Gly Thr Gly Thr His Arg Glu Lys Arg Ala Val
 35 40 45

Gly Leu Gly Met Leu Phe Leu Gly Val Leu Ser Ala Ala Gly Ser Thr
 50 55 60

Met Gly Ala Ala Ala Thr Ala Leu Thr Val Gln Thr His Ser Val Ile
 65 70 75 80

Lys Gly Ile Val Gln Gln Gln Asp Asn Leu Leu Arg Ala Ile Gln Ala
 85 90 95

Gln Gln Glu Leu Leu Arg Leu Ser Val Trp Gly Ile Arg Gln Leu Arg
 100 105 110

Ala Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Leu Ile Gln Asn Gln Gln Leu Leu
 115 120 125

ES 2 446 271 T3

Asn 130 Leu Trp Gly Cys Lys Gly 135 Arg Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys
 Trp 145 Asn Glu Thr Trp Arg 150 Asn Thr Thr Asn Ile 155 Asn Gln Ile Trp Gly 160
 Asn 165 Leu Thr Trp Gln Glu Trp Asp Gln Gln 170 Ile Asp Asn Val Ser 175 Ser
 Thr 180 Ile Tyr Glu Glu Ile Gln Lys Ala 185 Gln Val Gln Gln Glu Gln 190 Asn
 Glu 195 Lys Lys Leu Leu Glu Leu Asp 200 Glu Trp Ala Ser Leu 205 Trp Asn Trp
 Leu 210 Asp Ile Thr Lys Trp Leu 215 Arg Asn Ile Arg Gln 220 Gly Tyr Gln Pro
 Leu 225 Ser Leu Gln Ile Pro 230 Thr Arg Gln Gln Ser 235 Glu Ala Glu Thr Pro 240
 Gly 245 Arg Thr Gly Glu Gly Pro Gly Gly Gln 250 Asp Met Arg Asp Asn 255 Trp
 Arg 260 Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val 265 Val Lys Ile Glu Pro 270 Leu Gly
 Val 275 Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg 280 Arg Val Val Gln Arg 285 Glu Lys Arg
 Ala 290 Val Gly Ile Gly Ala Leu 295 Phe Leu Gly Phe Leu 300 Gly Ala Ala Gly
 Ser 305 Thr Met Gly Ala Ala Ser 310 Met Thr Leu Thr 315 Val Gln Ala Arg Gln 320
 Leu 325 Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn 330 Asn Leu Leu Arg Ala 335 Ile
 Glu 340 Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu 345 Thr Val Trp Gly Ile 350 Lys Gln
 Leu 355 Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val 360 Glu Arg Tyr Leu 365 Lys Asp Gln Gln
 Leu 370 Leu Gly Ile Trp Gly Cys 375 Ser Gly Lys Leu 380 Ile Cys Thr Thr Ala
 Val 385 Pro Trp Asn Ala Ser 390 Trp Ser Asn Lys Ser 395 Leu Glu Gln Ile Trp 400

ES 2 446 271 T3

Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr
405 410 415
Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
420 425 430
Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Val Asn Arg Val Arg
435 440 445
Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr His Leu Pro Ile Pro Arg
450 455 460
Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Glu Glu Gly Gly Glu Arg Asp
465 470 475 480
Arg Asp Arg Ser Ile Arg Leu Val
485

- 5
- <210> 96
 - <211> 1584
 - <212> ADN
 - <213> Virus de inmunodeficiencia humana
 - <400> 96

ES 2 446 271 T3

```

atgagttttg tggtcattat tcccgcgcgc tacgcgtcga cgcgtctgcc cggtaaacca      60
ttggttgata ttaacggcaa acccatgatt gttcatgttc ttgaacgcgc gcgtgaatca      120
ggtgccgagc gcatcatcgt ggcaaccgat catgaggatg ttgccgcgc cgttgaagcc      180
gctggcggtg aagtatgtat gacgcgcgcc gatcatcagt caggaacaga acgtctggcg      240
gaagttgtcg aaaaatgcgc attcagcgac gacacgggta tcgttaatgt gcaggggtgat      300
gaaccgatga tccctgcgac aatcattcgt cagggttctg ataacctcgc tcagcgtcag      360
gtgggtatga cgactctggc ggtgccaatc cacaatgcgg aagaagcgtt taaccggaat      420
gcggtgaaag tggttctcga cgttgaaggg tatgactgt acttctctcg cgccaccatt      480
ccttgggatc gtgatcgttt tgcagaaggc cttgaaaccg ttggcgataa cttcctgcgt      540
catcttggta tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca      600
agtccgtag aacacatcga aatgtagag cagcttcgtg ttctgtggta cggcgaaaaa      660
atccatgttg ctggtgctca ggaagttcct ggcacagggt tggatacccc tgaagatctc      720
gaccgcgcga cgaattctat cggtggtgac atgaaagaca tctggcgtaa cgaactgttc      780
aaatacaaag ttgttcgtgt taaaccgttc tctgtgtctc cgaccccgat cgtcgtccg      840
gttatcggta ctggcaccca ccgtgaaaaa cgtgctgtag gtctgggtat gctgttcctg      900
ggcgttctgt ctgcagcagg ttccactatg ggtgctgcag ctaccgctct gaccgtacag      960
accactctg ttatcaaagg tatcgtacag cagcaggaca acctgctgcg tgcaatccag     1020
gcacagcagg aactgctgcg tctgtctgta tggggtatcc gtcagctgcg tgctcgtctg     1080

ctggcactgg aaacctgat ccagaaccag cagctgctga acctgtgggg ctgcaaagg      1140
cgtctgatct gctacacctc cgtaaattgg aacgaaacct ggcgtaacac caccaacatc     1200
aaccagatct ggggtaacct gacctggcag gaatgggacc agcagatcga caacgtttct     1260
tccaccatct acgaagaaat ccagaaagct cagggtcagc aggaacagaa cgaaaaaaaa     1320
ctgctggaac tggacgaatg ggcttctctg tggaaactggc tggacatcac caaatggctg     1380
cgtaacatcc gtcagggcta ccagccgctg tccctgcaga tcccgaccg tcagcagtct     1440
gaagctgaaa ctccgggtcg taccggtgaa ggtggcggtt ctgcctgct ggctctggaa     1500
actctgattc agaaccagca actgcttaac ctgtgggggt gcaagggccg cctgatttgc     1560
tacacttctg taaaatggta atag                                             1584

```

- 5 <210> 97
- <211> 526
- <212> PRT
- <213> Virus de inmunodeficiencia humana
- <400> 97

ES 2 446 271 T3

Met Ser Phe Val Val Ile Ile Pro Ala Arg Tyr Ala Ser Thr Arg Leu
 1 5 10 15

Pro Gly Lys Pro Leu Val Asp Ile Asn Gly Lys Pro Met Ile Val His
 20 25 30

Val Leu Glu Arg Ala Arg Glu Ser Gly Ala Glu Arg Ile Ile Val Ala
 35 40 45

Thr Asp His Glu Asp Val Ala Arg Ala Val Glu Ala Ala Gly Gly Glu
 50 55 60

Val Cys Met Thr Arg Ala Asp His Gln Ser Gly Thr Glu Arg Leu Ala
 65 70 75 80

Glu Val Val Glu Lys Cys Ala Phe Ser Asp Asp Thr Val Ile Val Asn
 85 90 95

Val Gln Gly Asp Glu Pro Met Ile Pro Ala Thr Ile Ile Arg Gln Val
 100 105 110

Ala Asp Asn Leu Ala Gln Arg Gln Val Gly Met Thr Thr Leu Ala Val
 115 120 125

Pro Ile His Asn Ala Glu Glu Ala Phe Asn Pro Asn Ala Val Lys Val
 130 135 140

Val Leu Asp Ala Glu Gly Tyr Ala Leu Tyr Phe Ser Arg Ala Thr Ile
 145 150 155 160

Pro Trp Asp Arg Asp Arg Phe Ala Glu Gly Leu Glu Thr Val Gly Asp
 165 170 175

ES 2 446 271 T3

Asn Phe Leu Arg His Leu Gly Ile Tyr Gly Tyr Arg Ala Gly Phe Ile
 180 185 190

Arg Arg Tyr Val Asn Trp Gln Pro Ser Pro Leu Glu His Ile Glu Met
 195 200 205

Leu Glu Gln Leu Arg Val Leu Trp Tyr Gly Glu Lys Ile His Val Ala
 210 215 220

Val Ala Gln Glu Val Pro Gly Thr Gly Val Asp Thr Pro Glu Asp Leu
 225 230 235 240

Asp Pro Ser Thr Asn Ser Ile Gly Gly Asp Met Lys Asp Ile Trp Arg
 245 250 255

Asn Glu Leu Phe Lys Tyr Lys Val Val Arg Val Lys Pro Phe Ser Val
 260 265 270

Ala Pro Thr Pro Ile Ala Arg Pro Val Ile Gly Thr Gly Thr His Arg
 275 280 285

Glu Lys Arg Ala Val Gly Leu Gly Met Leu Phe Leu Gly Val Leu Ser
 290 295 300

Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ala Thr Ala Leu Thr Val Gln
 305 310 315 320

Thr His Ser Val Ile Lys Gly Ile Val Gln Gln Gln Asp Asn Leu Leu
 325 330 335

Arg Ala Ile Gln Ala Gln Gln Glu Leu Leu Arg Leu Ser Val Trp Gly
 340 345 350

Ile Arg Gln Leu Arg Ala Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Leu Ile Gln
 355 360 365

Asn Gln Gln Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Ile Cys
 370 375 380

Tyr Thr Ser Val Lys Trp Asn Glu Thr Trp Arg Asn Thr Thr Asn Ile
 385 390 395 400

Asn Gln Ile Trp Gly Asn Leu Thr Trp Gln Glu Trp Asp Gln Gln Ile
 405 410 415

Asp Asn Val Ser Ser Thr Ile Tyr Glu Glu Ile Gln Lys Ala Gln Val
 420 425 430

Gln Gln Glu Gln Asn Glu Lys Lys Leu Leu Glu Leu Asp Glu Trp Ala
 435 440 445

ES 2 446 271 T3

Ser Leu Trp Asn Trp Leu Asp Ile Thr Lys Trp Leu Arg Asn Ile Arg
 450 455 460
 Gln Gly Tyr Gln Pro Leu Ser Leu Gln Ile Pro Thr Arg Gln Gln Ser
 465 470 475
 Glu Ala Glu Thr Pro Gly Arg Thr Gly Glu Gly Gly Gly Ser Arg Leu
 485 490 495
 Leu Ala Leu Glu Thr Leu Ile Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Leu Trp
 500 505
 Gly Cys Lys Gly Arg Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp
 515 520 525

5 <210> 98
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

15 <400> 98
 gaccgtccgg aaggtatcga agaagaaggc ggccaacgtg accgtgaccg ttccattcgt 60

20 <210> 99
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético "

30 <400> 99
 atggaacggt cacggtcacg ttcgccgct tcttctcga taccttcgg acg 53

35 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

45 <400> 100
 atctctggaa cagatctgga 20

50 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

60 <400> 101
 agtactgaag cagattccac 20

65 <210> 102

ES 2 446 271 T3

<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

10 <400> 102
ccgtcggttac gtcaactgg 19

<210> 103
<211> 18
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

20 <400> 103
cgccggtggt atcgggtgc 18

<210> 104
25 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 104
35 taccagacag aagctgacg 19

<210> 105
<211> 20
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

45 <400> 105
cttcgatcag agagtggatc 20

<210> 106
<211> 20
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

55 <400> 106
gacgatctgc gttctctgtg 20

<210> 107
<211> 1800
<212> ADN
60 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

65 <400> 107

ES 2 446 271 T3

atgagttttg tggtcattat tcccgcgcgc tacgcgctga cgcgtctgcc cggtaaacca 60
 ttggttgata ttaacggcaa acccatgatt gttcatgttc ttgaacgcgc gcgtgaatca 120
 ggtgccgagc gcatcatcgt ggcaaccgat catgaggatg ttgcccgcgc cgttgaagcc 180
 gctggcggtg aagtatgtat gacgcgcgcc gatcatcagt caggaacaga acgtctggcg 240
 gaagttgtcg aaaaatgcgc attcagcgcac gacacggatg tcgttaatgt gcaggggtgat 300
 gaaccgatga tccctgcgac aatcattcgt caggttgctg ataacctcgc tcagcgtcag 360
 gtgggtatgg cgactctggc ggtgccaatc cacaatgcgg aagaagcgtt taaccgcaat 420
 gcggtgaaag tggttctcga cgctgaaggg tatgcactgt acttctctcg cgccaccatt 480
 ccttgggatc gtgatcgttt tgcagaaggc cttgaaaccg ttggcgataa cttcctgcgt 540
 catcttggtg tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca 600
 agtccgtagg aacacatcga aatgtagag cagcttcgtg ttctgtggta cggcgaaaaa 660
 atccatgtag ctgttgctca ggaagttcct ggcacagggt tggatacccc tgaagatccg 720
 tcgacagccc ttatgaagat ccccggcgac ccgggtggtg gtgacatgcg tgacaactgg 780
 cgttctgaac tgtacaaata caaagttggt aaaatcgaac cgctgggtgt tgctccgact 840
 aaagctaaac gtcgtgtagt tcagcgtgaa aaacgcgcgc ttggtatcgg tgcactgttc 900
 ctgggtttcc tgggtgctgc tggttctacc atgggtgctg cttctatgac cctgactggt 960
 caggcccgtc agcttctgtc tggtagctt cagcagcaga acaatctgct gcgtgctatc 1020
 gaagctcagc agcatctgct gcaactgacc gtttggggta tcaaacagct tcaggctcgt 1080
 atcctggctg ttgaacgtta cctgaaagac cagcagctgc tgggtatctg gggttgctct 1140
 ggtaaactga tctgcaactac tgcgttccg tggaaacgctt cttggtctaa caaatctctg 1200
 gaacagatct ggaacaacat gacttgtagt gaatgggacc gtgaaatcaa caactacaca 1260
 agcttgatcc actctctgat cgaagaaagc cagaaccagc aggaaaaaaa cgaacaggaa 1320
 cttctagaac tggacaaatg ggttaaccgt gttcgtcagg gttactctcc gctgtctttc 1380
 cagaccatc tgccgatccc gcgtggtccg gaccgtccgg aaggtagcga agaagaaggc 1440
 ggcgaacgtg accgtgaccy ttccattcgt ctggtaaacc gttctctggc tctgatctgg 1500
 gacgatctgc gttctctgtg cctgttctct taccaccgtc tgcgtgatct gctgctgatc 1560

 gtgactcgta tcgttgaact gctcggccgt cgtgggtggg aagctctgaa atactggtgg 1620
 aatctgcttc agtactggtc ccaggaactg aaaaactctg ctgtttctct gctgaacgct 1680
 actgctatcg ctgttgctga aggcaccgat cgtgttatcg aagtagttca ggggtgcttac 1740
 cgtgctatcc gtcacattcc gcgtcgtatc cgtcagggtc tggaaactat cctgctgtaa 1800

<210> 108
 <211> 599
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana

5

<400> 108

ES 2 446 271 T3

Met Ser Phe Val Val Ile Ile Pro Ala Arg Tyr Ala Ser Thr Arg Leu
1 5 10 15

Pro Gly Lys Pro Leu Val Asp Ile Asn Gly Lys Pro Met Ile Val His
20 25 30

Val Leu Glu Arg Ala Arg Glu Ser Gly Ala Glu Arg Ile Ile Val Ala
35 40 45

Thr Asp His Glu Asp Val Ala Arg Ala Val Glu Ala Ala Gly Gly Glu
50 55 60

Val Cys Met Thr Arg Ala Asp His Gln Ser Gly Thr Glu Arg Leu Ala
65 70 75 80

Glu Val Val Glu Lys Cys Ala Phe Ser Asp Asp Thr Val Ile Val Asn
85 90 95

Val Gln Gly Asp Glu Pro Met Ile Pro Ala Thr Ile Ile Arg Gln Val
100 105 110

Ala Asp Asn Leu Ala Gln Arg Gln Val Gly Met Ala Thr Leu Ala Val
115 120 125

Pro Ile His Asn Ala Glu Glu Ala Phe Asn Pro Asn Ala Val Lys Val
130 135 140

Val Leu Asp Ala Glu Gly Tyr Ala Leu Tyr Phe Ser Arg Ala Thr Ile
145 150 155 160

Pro Trp Asp Arg Asp Arg Phe Ala Glu Gly Leu Glu Thr Val Gly Asp
165 170 175

Asn Phe Leu Arg His Leu Gly Ile Tyr Gly Tyr Arg Ala Gly Phe Ile
180 185 190

Arg Arg Tyr Val Asn Trp Gln Pro Ser Pro Leu Glu His Ile Glu Met
195 200 205

ES 2 446 271 T3

Leu Glu Gln Leu Arg Val Leu Trp Tyr Gly Glu Lys Ile His Val Ala
 210 215 220
 Val Ala Gln Glu Val Pro Gly Thr Gly Val Asp Thr Pro Glu Asp Pro
 225 230 235 240
 Ser Thr Ala Leu Met Lys Ile Pro Gly Asp Pro Gly Gly Gly Asp Met
 245 250 255
 Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile
 260 265 270
 Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln
 275 280 285
 Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu
 290 295 300
 Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu
 325 330 335
 Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp
 340 345 350
 Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu
 355 360 365
 Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile
 370 375 380
 Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu
 385 390 395 400
 Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile
 405 410 415
 Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn
 420 425 430
 Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Val
 435 440 445
 Asn Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr His Leu
 450 455 460
 Pro Ile Pro Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Glu Glu Gly
 465 470 475 480

ES 2 446 271 T3

Gly Glu Arg Asp Arg Asp Arg Ser Ile Arg Leu Val Asn Gly Ser Leu
 485 490 495

Ala Leu Ile Trp Asp Asp Leu Arg Ser Leu Cys Leu Phe Ser Tyr His
 500 505 510

Arg Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg Ile Val Glu Leu Leu
 515 520 525

Gly Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln
 530 535 540

Tyr Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Asn Ala
 545 550 555 560

Thr Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Val
 565 570 575

Gln Gly Ala Tyr Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln
 580 585 590

Gly Leu Glu Arg Ile Leu Leu
 595

5 <210> 109
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 109
 gactactgt agccattcgt ctgtaatcg gtggtgacat gaaagac 47

15 <210> 110
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

25 <400> 110
 acaatgatgg tacctattat tcaccggtac gac 33

30 <210> 111
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

<400> 111

ES 2 446 271 T3

attggtgat attaacgg 18

5 <210> 112
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

15 <400> 112
tcggtggtga catgaaagac 20

20 <210> 113
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

30 <400> 113
aaaataggcg tatcagcagg 20

35 <210> 114
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

45 <400> 114
acaatgatgg tacctattac agccattgg tgatgtccag 40

50 <210> 115
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

60 <400> 115
taacgatcag ctaccggtga aggtccgggt ggtggtgaca tgcgtg 46

65 <210> 116
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

70 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

75 <400> 116
caagatggat cctattatac cagacgaatg gaacggtc 38

80 <210> 117
<211> 122
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 446 271 T3

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

5
 <400> 117

```

    ccggtgaagg tggcggttct cgcctgctgg ctctggaac tctgattcag aaccagcaac      60
    tgcttaacct gtggggttgc aagggccgcc tgatttgcta cacttctgta aaatggtaat      120
    ag                                          122
  
```

<210> 118
 <211> 122
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"

15
 <400> 118

```

    gatcctatta ccattttaca gaagtgtagc aaatcaggcg gcccttgcaa cccacaggt      60
    taagcagttg ctggttctga atcagagttt ccagagccag caggcgagaa ccgccacctt      120
    ca                                          122
  
```

<210> 119
 <211> 849
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

25
 <400> 119

```

    atgatcggtg gtgacatgaa agacatctgg cgtaacgaac tgttcaaata caaagttggt      60
    cgtgttaaac cgttctctgt tgctccgacc ccgatcgtc gtccggttat cggacttggc      120
    acccaccgtg aaaaacgtgc tgtaggctctg ggtatgctgt tcctgggctg tctgtctgca      180
    gcaggttcca ctatgggtgc tgcagctacc gctctgaccg tacagacca ctctgttata      240
    aaaggatatg tacagcagca ggacaacctg ctgcgtgcaa tccaggcaca gcaggaaactg      300
    ctgcgtctgt ctgtatgggg tatccgtcag ctgcgtgctc gtctgctggc actggaacc      360
    ctgatccaga accagcagct gctgaacctg tggggctgca aaggctgctt gatctgctac      420
    acctccgta aatggaacga aacctggcgt aacaccacca acatcaacca gatctggggt      480
    aacctgacct ggcaagaaag ggaccagcag atcgacaacg tttcttccac catctacgaa      540

    gaaatccaga aagctcaggt tcagcaggaa cagaacgaaa aaaaactgct ggaactggac      600
    gaatgggctt ctctgtggaa ctggctggac atcaccaaat ggctgcgtaa catccgtcag      660
    ggctaccagc cgctgtccct gcagatcccg acccgtcagc agtctgaagc tgaaactccg      720
    ggtcgtaccg gtgaagggtg cggttctcgc ctgctggctc tggaactctt gattcagaac      780
    cagcaactgc ttaacctgtg gggttgcaag ggccgctga tttgctacac ttctgtaaaa      840
    tggtaatag                                          849
  
```

30
 <210> 120
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana

ES 2 446 271 T3

<400> 120

Met Ile Gly Gly Asp Met Lys Asp Ile Trp Arg Asn Glu Leu Phe Lys
 1 5 10 15

Tyr Lys Val Val Arg Val Lys Pro Phe Ser Val Ala Pro Thr Pro Ile
 20 25 30

Ala Arg Pro Val Ile Gly Thr Gly Thr His Arg Glu Lys Arg Ala Val
 35 40 45

Gly Leu Gly Met Leu Phe Leu Gly Val Leu Ser Ala Ala Gly Ser Thr
 50 55 60

Met Gly Ala Ala Ala Thr Ala Leu Thr Val Gln Thr His Ser Val Ile
 65 70 75 80

Lys Gly Ile Val Gln Gln Gln Asp Asn Leu Leu Arg Ala Ile Gln Ala
 85 90 95

Gln Gln Glu Leu Leu Arg Leu Ser Val Trp Gly Ile Arg Gln Leu Arg
 100 105 110

Ala Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr Leu Ile Gln Asn Gln Gln Leu Leu
 115 120 125

Asn Leu Trp Gly Cys Lys Gly Arg Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys
 130 135 140

Trp Asn Glu Thr Trp Arg Asn Thr Thr Asn Ile Asn Gln Ile Trp Gly
 145 150 155 160

Asn Leu Thr Trp Gln Glu Trp Asp Gln Gln Ile Asp Asn Val Ser Ser
 165 170 175

Thr Ile Tyr Glu Glu Ile Gln Lys Ala Gln Val Gln Gln Glu Gln Asn
 180 185 190

Glu Lys Lys Leu Leu Glu Leu Asp Glu Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp

195

200

205

Leu Asp Ile Thr Lys Trp Leu Arg Asn Ile Arg Gln Gly Tyr Gln Pro
 210 215 220

Leu Ser Leu Gln Ile Pro Thr Arg Gln Gln Ser Glu Ala Glu Thr Pro
 225 230 235 240

Gly Arg Thr Gly Glu Gly Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Leu Glu Thr
 245 250 255

Leu Ile Gln Asn Gln Gln Leu Leu Asn Leu Trp Gly Cys Lys Gly Arg
 260 265 270

Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp
 275 280

5 <210> 121
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"

15 <400> 121
 acgttcgccg ccttctctt cg 22

20 <210> 122
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: etiqueta sintética 6x His "
 <400> 122

30 His His His His His His
 1 5

35 <210> 123
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

<400> 123
 gaattccatg 10

<210> 124

ES 2 446 271 T3

5 <211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético"

15 <400> 124
taataggatc c 11

REIVINDICACIONES

1. Un constructo de antígeno seleccionado de entre:

5 1. Un constructo de antígeno que comprende:

10 a. una fusión de un primer polipéptido de la env de la gp120 del VIH-1 del Grupo O fusionado con un segundo polipéptido de la env de la gp41 del VIH-1 del Grupo O en el que (a) el primer polipéptido de la env de la gp120 del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos: 1 hasta 520 de la secuencia de la ID. SEC. N°: 61 y (b) el segundo polipéptido de la env de la gp41 del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos seleccionados de entre el grupo que consiste en: (i) los residuos 47 hasta 215 de la secuencia de la ID. SEC. N°: 58; y (ii) los residuos 47 hasta 245 de la secuencia de la ID. SEC. N°: 48; o

15 b. una fusión de un primer polipéptido de la env de la gp120 del VIH-1 del Grupo O fusionado con un segundo polipéptido de la env de la gp41 del VIH-1 del Grupo O en el que (a) el primer polipéptido de la env de la gp120 del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos 476 hasta 520 de la secuencia de la ID. SEC. N°: 61 y (b) el segundo polipéptido de la env de la gp41 del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos consistente esencialmente en los residuos seleccionados de entre el grupo que consiste en: (i) los residuos 521 hasta 873 de la secuencia del ID. SEC. N°: 61; (ii) los residuos 47 hasta 215 de la secuencia del ID. SEC. N°: 58; y (iii) los residuos 47 hasta 245 de la secuencia de la ID. SEC. N°: 48; o

25 2. Un constructo de antígeno que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en la secuencia de la ID. SEC. N°: 48, la secuencia de la ID. SEC. N°: 50, la secuencia de la ID. SEC. N°: 52, la secuencia de la ID. SEC. N°: 54 y secuencias que difieran de dichas secuencias en cambios conservativos debidos a entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos, cambios no conservativos o deleciones o inserciones de aminoácidos.

30 2. Un polinucleótido que codifica para un constructo de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Un procedimiento para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 en una muestra de prueba que comprende las etapas de:

35 (a) combinar al menos un constructo de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 con la muestra de prueba para formar una mezcla;
(b) incubar la mezcla en unas condiciones adecuadas para formación de los complejos entre el antígeno y los anticuerpos, si es que los hay presentes en la muestra y son inmunológicamente reactivos con el antígeno; y
(c) detectar la presencia de cualquier complejo formado.

40 4. Un kit de inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 que comprende un constructo de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1.

45 5. Un constructo de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 que consiste en la secuencia de la ID. SEC. N°: 48 o en una secuencia que difiere de la ID. SEC. N°: 48 por un cambio conservativo debido a entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos, cambios no conservativos o deleciones o inserciones de aminoácidos.

50 6. Un constructo de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 que consiste en la secuencia de la ID. SEC. N°: 50 o en una secuencia que difiere de la ID. SEC. N°: 50 por un cambio conservativo debido a entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos, cambios no conservativos o deleciones o inserciones de aminoácidos.

7. Un constructo de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 que consiste en la secuencia de la ID. SEC. N°: 52 o en una secuencia que difiere de la ID. SEC. N°: 52 por un cambio conservativo debido a entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos, cambios no conservativos o deleciones o inserciones de aminoácidos.

55 8. Un constructo de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 que consiste en la secuencia de la ID. SEC. N°: 54 o en una secuencia que difiere de la ID. SEC. N°: 54 por un cambio conservativo debido a entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos, cambios no conservativos o deleciones o inserciones de aminoácidos.

60 9. Un constructo de antígeno aislado en el que dicho constructo de antígeno comprende una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión un primer polipéptido de la gp120 del VIH-1 del Grupo O fusionado con un segundo polipéptido de la gp41 del VIH-1 del Grupo O y en el que adicionalmente: (a) se ha delecionado una porción de la región hidrófoba del polipéptido de la gp41; y (b) el constructo de antígeno consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en la secuencia de la ID. SEC. N°: 52, la secuencia de la ID. SEC. N°: 54 y secuencias que difieren de dichas secuencias por un cambio conservativo debido a entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos, cambios no conservativos o deleciones o inserciones de aminoácidos.

10. El constructo de antígeno aislado de la reivindicación 9, en el que el constructo de antígeno consiste en la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. N°: 52 o en una secuencia que difiere de la ID. SEC. N°: 52 por un cambio conservativo debido a entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos, cambios no conservativos o deleciones o inserciones de aminoácidos.

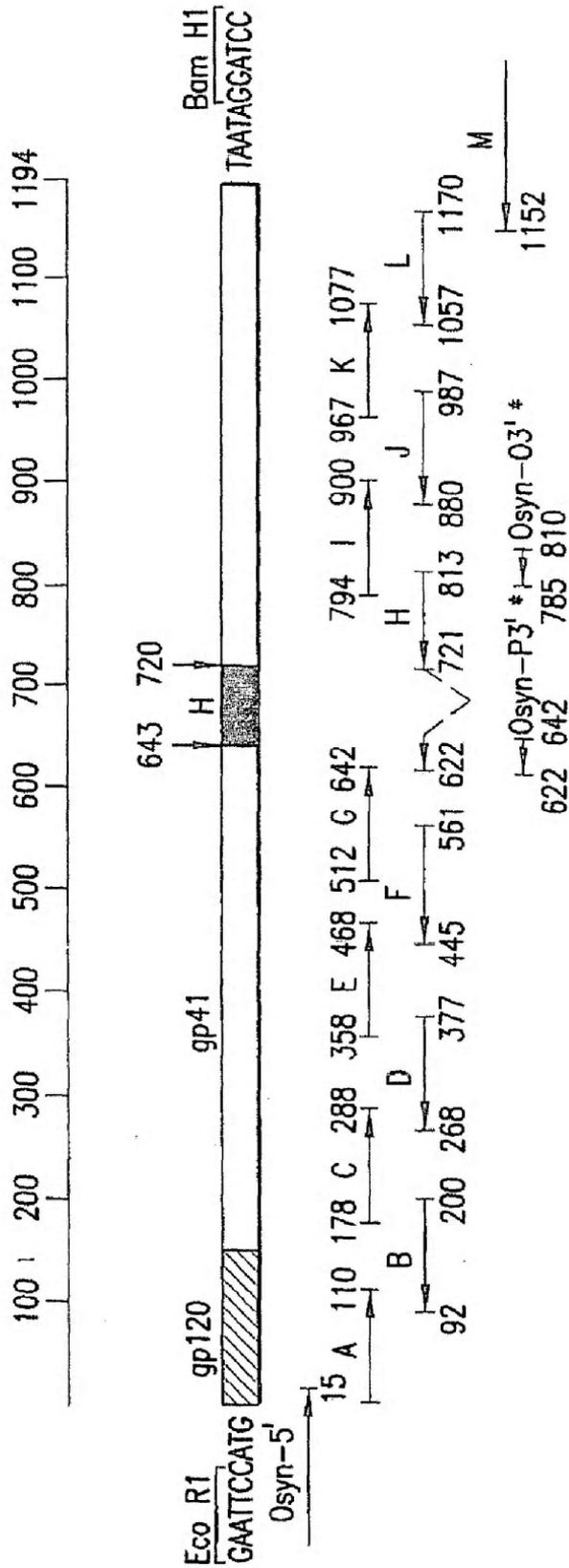
5

11. El constructo de antígeno aislado de la reivindicación 9, en el que el constructo de antígeno consiste en la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. N°: 54 o en una secuencia que difiere de la ID. SEC. N°: 54 por un cambio conservativo debido a entre 1 y 5 sustituciones de aminoácidos, cambios no conservativos o deleciones o inserciones de aminoácidos.

10

←gp120
 MIVTMRAMGK RNRKLGILYI VMALIIPCLS SSQLYATVYA GVPWEDAAP 50
 VLFCASDANL TSTEKHNVWA SQACVPTDPT PHEYLLTNVT DNFNIWENYM 100
 VEQMQEDIIS LWDQSLKPCI QMTFMCIQMN CTDIKNNNTS GTENRTSSSE 150
 NPMKTCEFNI TTVLKDKKEK KQALFYVSDL TKLADNNTTN TMYTLINCNS 200
 TTIKQACPKV SFEPIPIYYC APAGYAIFKC NSAEFNGTGK CSNISVVTCT 250
 HGIKPTVSTQ LILNGTLSKE KIRIMGKNIS DSGKNIIVTL SSDIEITCVR 300
 PGNNQTVQEM KIGPMAWYSM ALGTGSNRSR VAYCQYNTTE WEKALKNTAE 350
 RYLELINNTE GNTTMIFNRS QDGSDEVETH LHFNCHGEFF YCNTSEMFNY 400
 TFLCNGTNCN NTQSINSANG MIPCKLKQVV RSWMRGGGSL YAPPIPGNLT 450
 CISHITGMIL QMDAPWNKTE NTFRPIGGDM KDIWRNELFK YKVVRVKPFS 500
 VAPTPIARPV IGTGTHREKR ←gp41
 AVGLGMLFLG VLSAAGSTMG AAATALTVQT 550
 HSVIKGIVQQ QDNLLRAIQA QQELLRLSVW GIRQLRARLL ALETLIQNQQ 600
 LLNLWGCKGR LICYTSVKWN ETWRNTTNIN QIWGNLTWQE WDQQIDNVSS 650
 TIYEEIQKAQ VQEQNEKKL LELDEWASLW NWLDITKWLW YIKIATIIIVG 700
 ALIGVRIVMI VLNLVRNIRQ GYQPLSLQIP TRQQSEAETP GRTGEGGGDE 750
 GRPRLIPSPQ GFLPLLYTDL RTIILWSYHL LSNLISGTQT VISHLRLGLW 800
 ILGQKIIDAC RICA AVIHYW LQELQKSATS LIDTFAVAVA NWTDDIILGI 850
 QRLGRGILNI PRRVRQGFER SLL 873

FIG.1



* Terminadores de la traducción y sitios de clonación de Bam H1 en el extremo 5'

inserto pGO-8 = Osyn-5' hasta Osyn-P3'
 inserto pGO-9 = Osyn-5' hasta Osyn-03'
 inserto pGO-11 = Osyn-5' hasta Osyn-M'
 H = región hidrófoba (delecionada según se muestra)

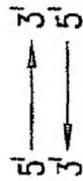


FIG.2

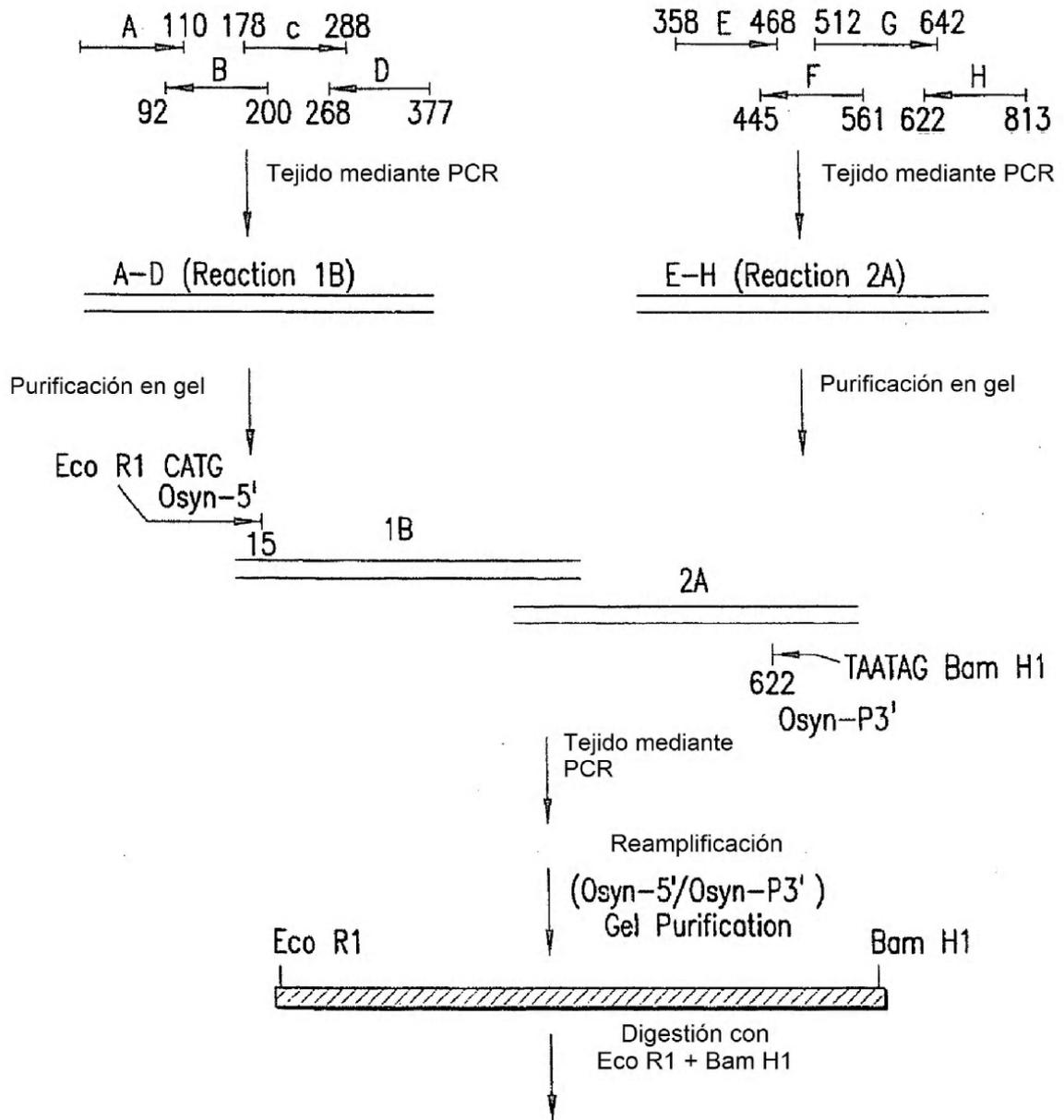


FIG.3A

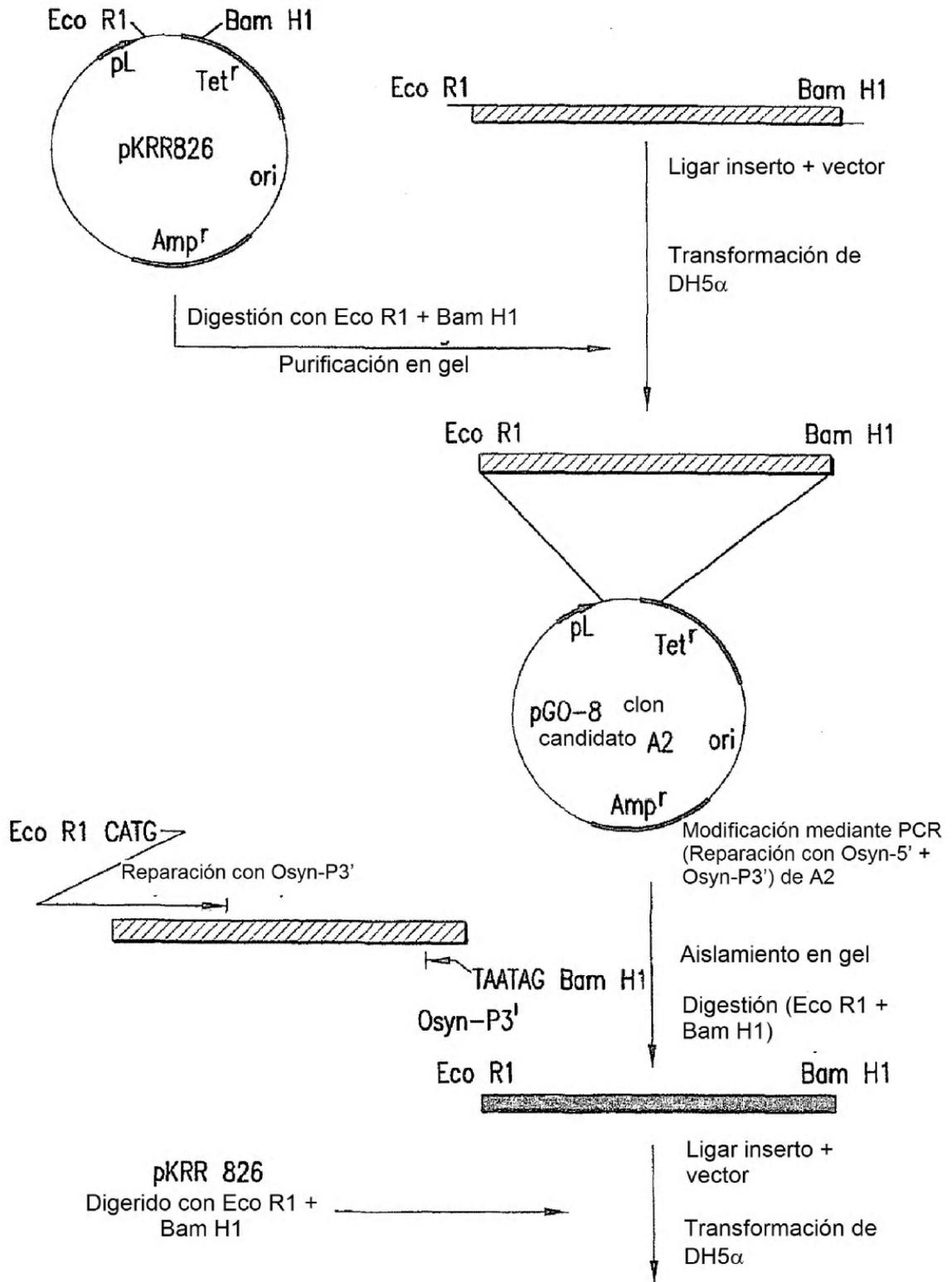


FIG.3B

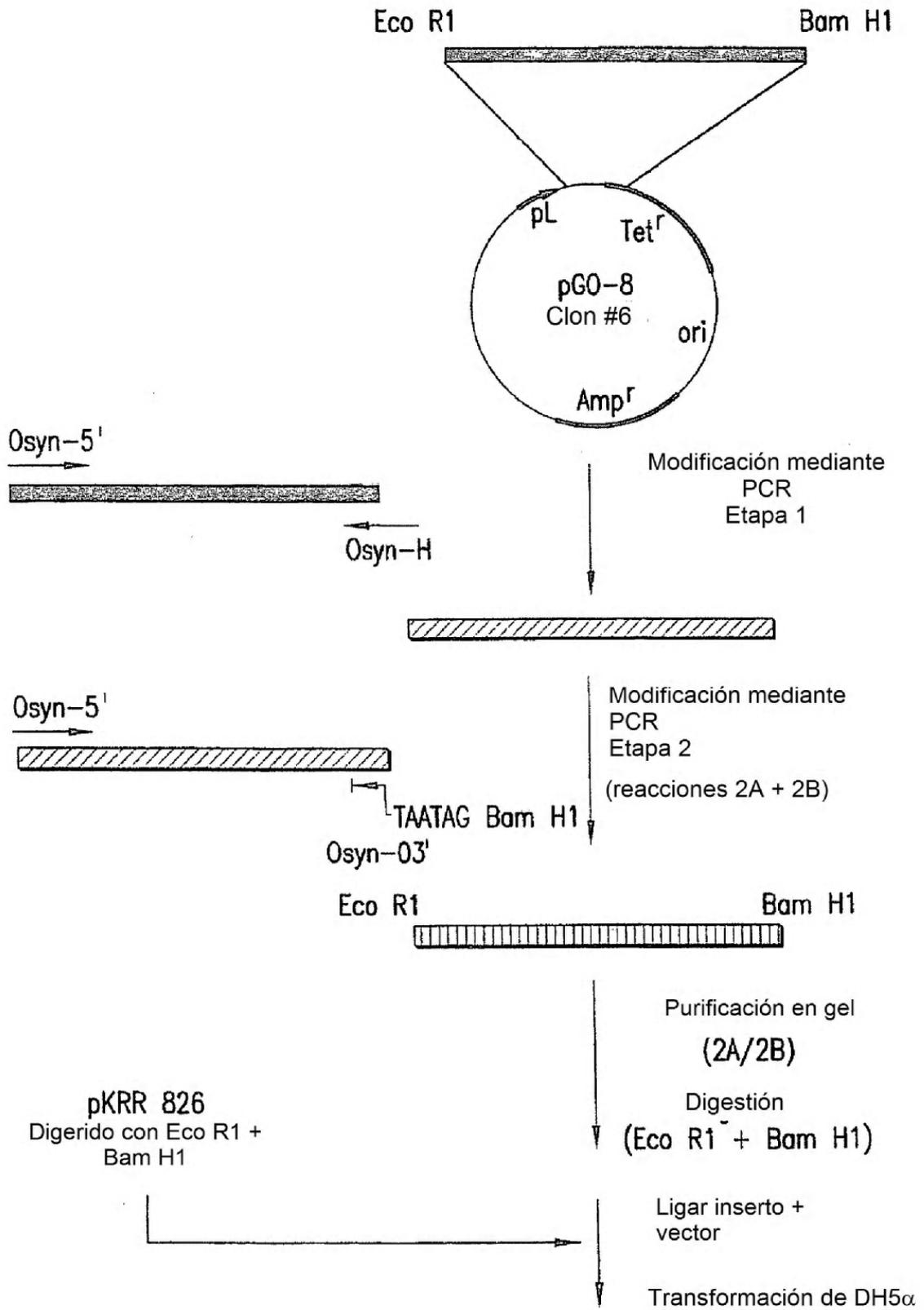


FIG.3C

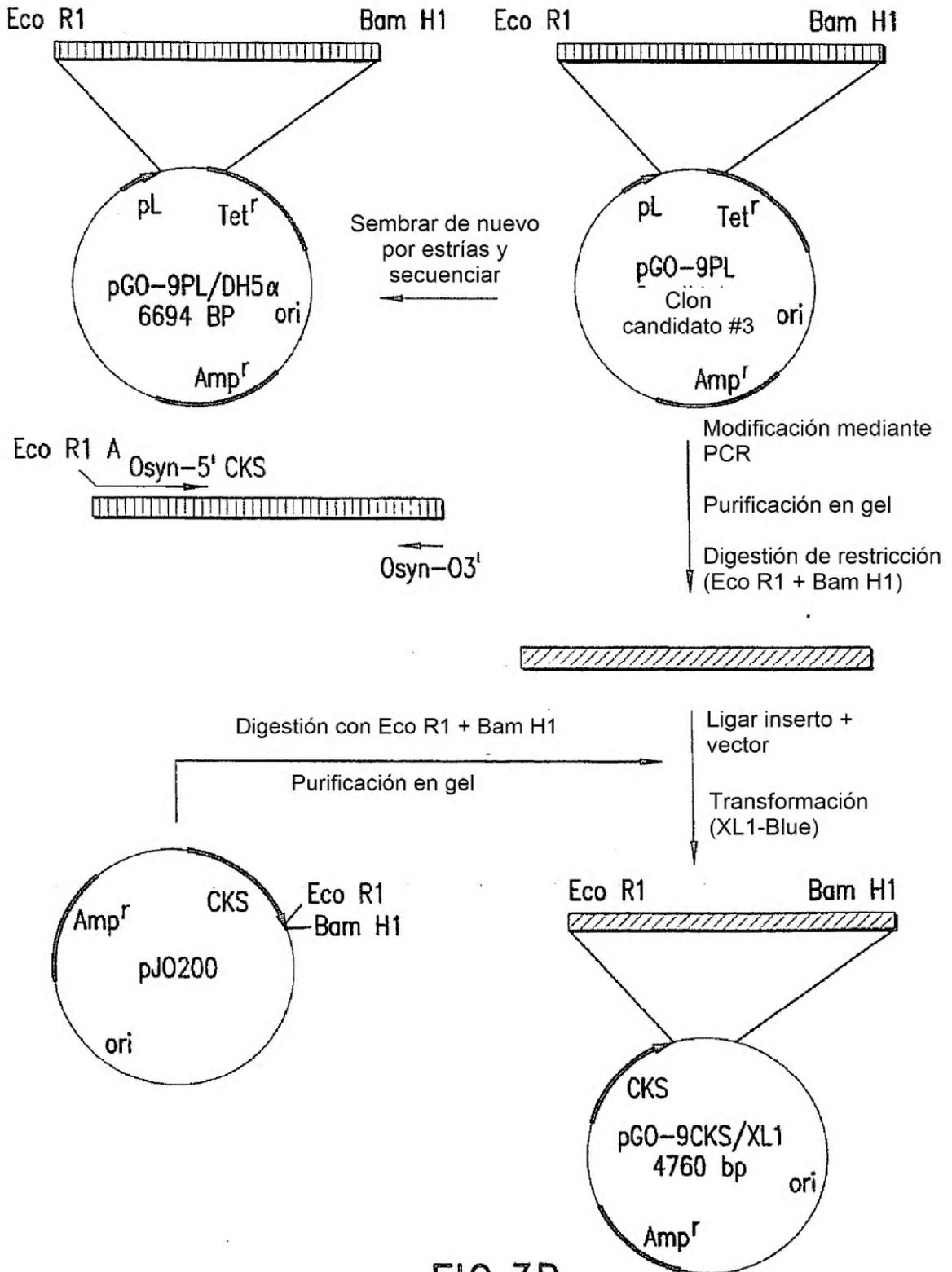


FIG.3D

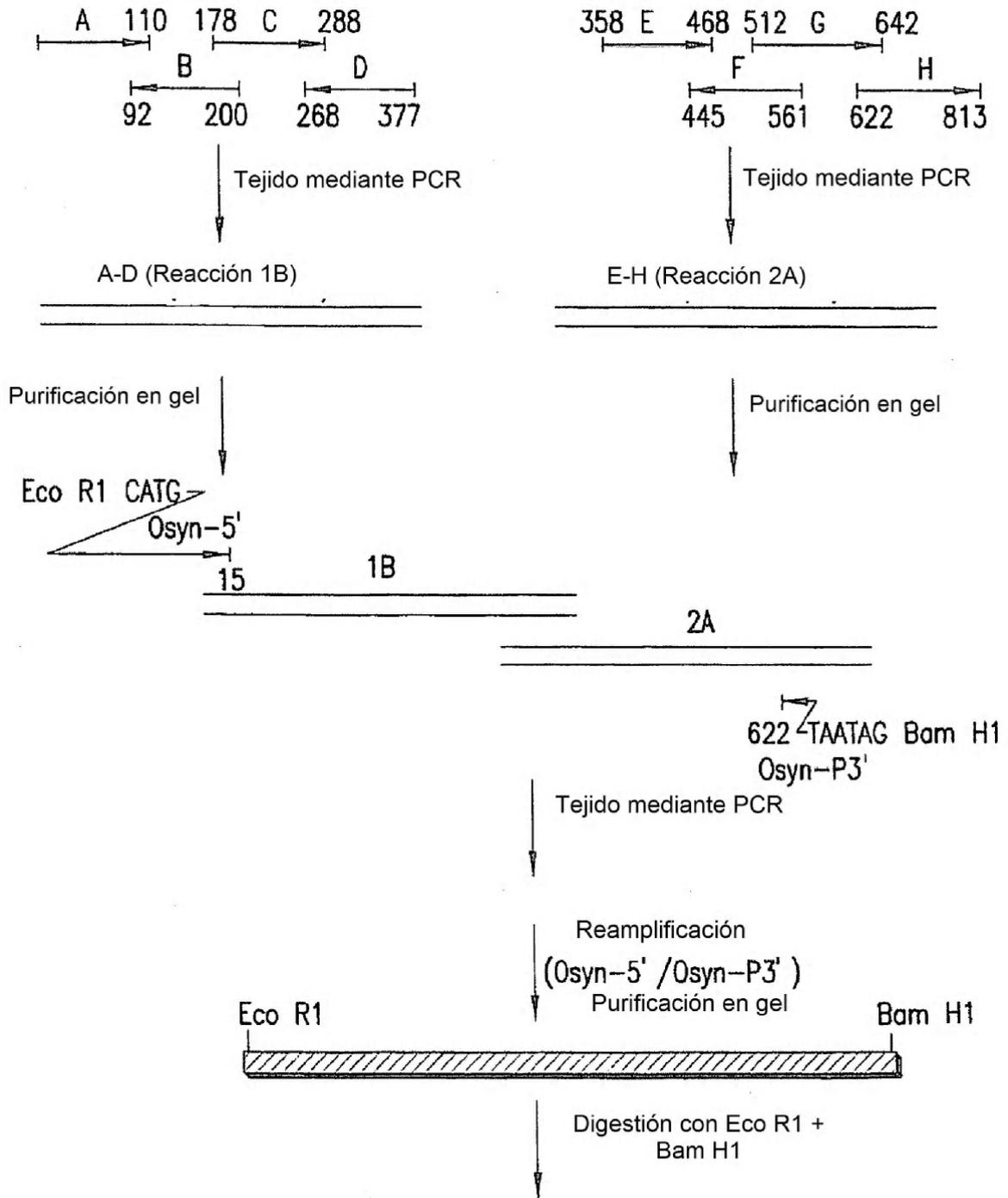


FIG.4A

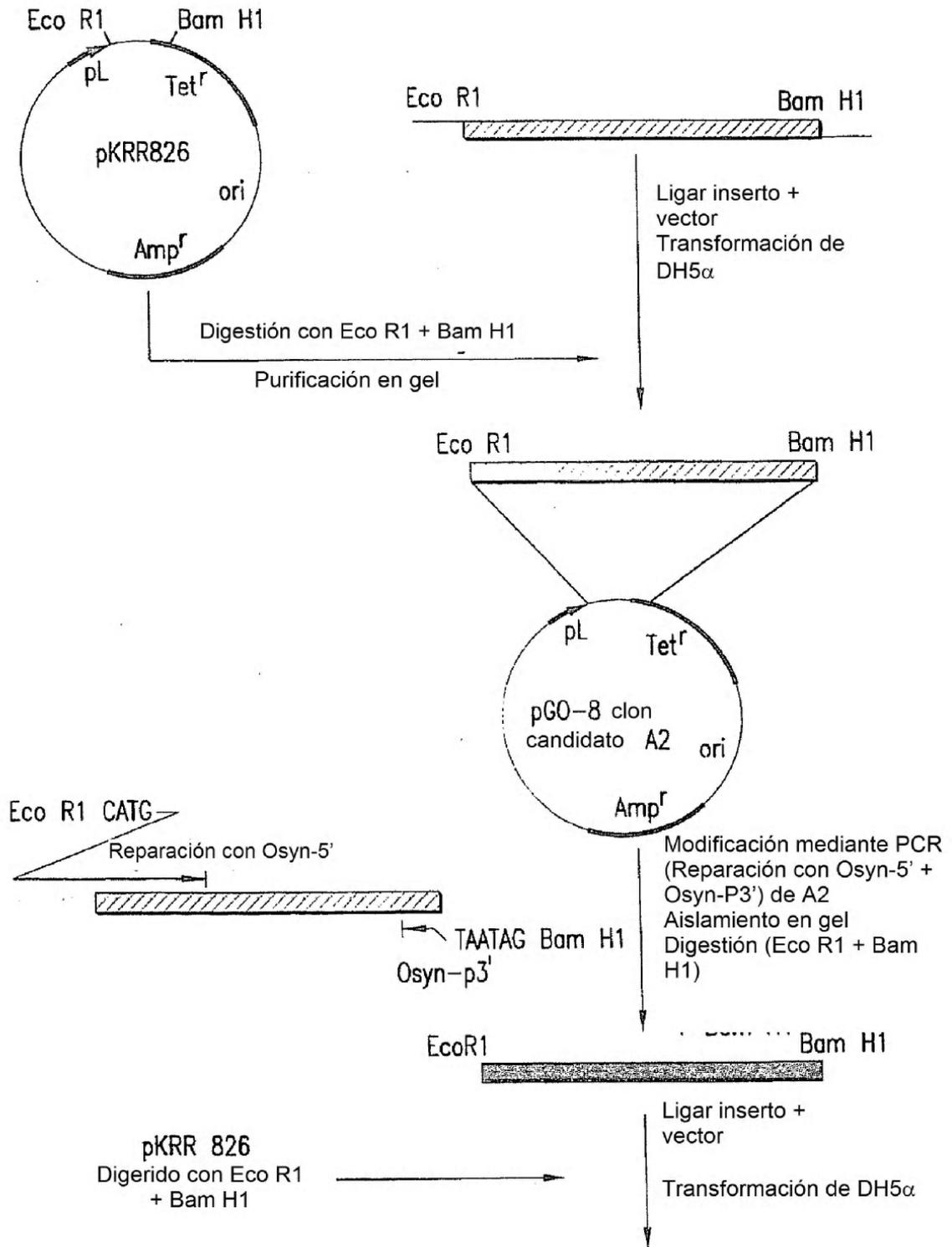


FIG.4B

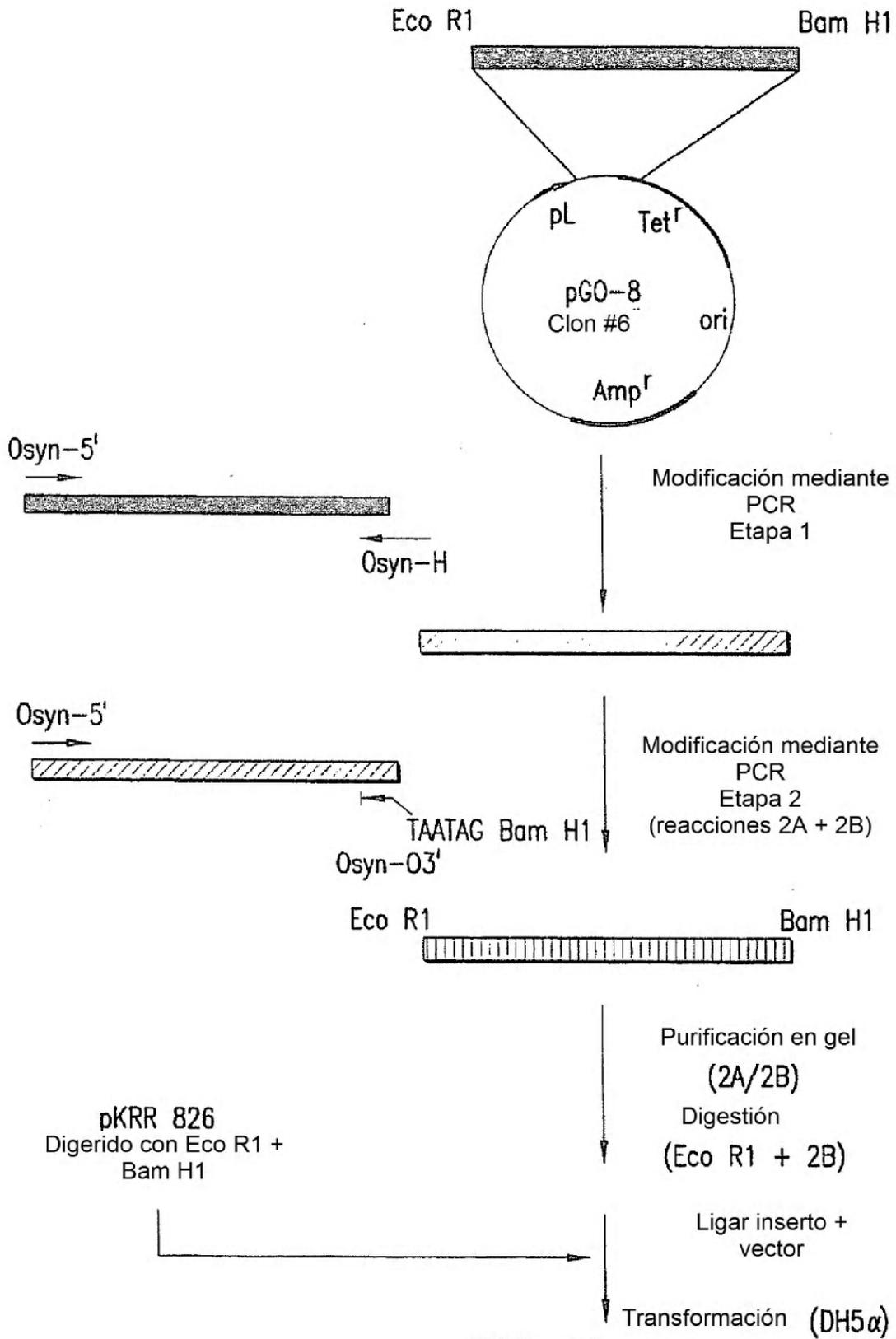


FIG.4C

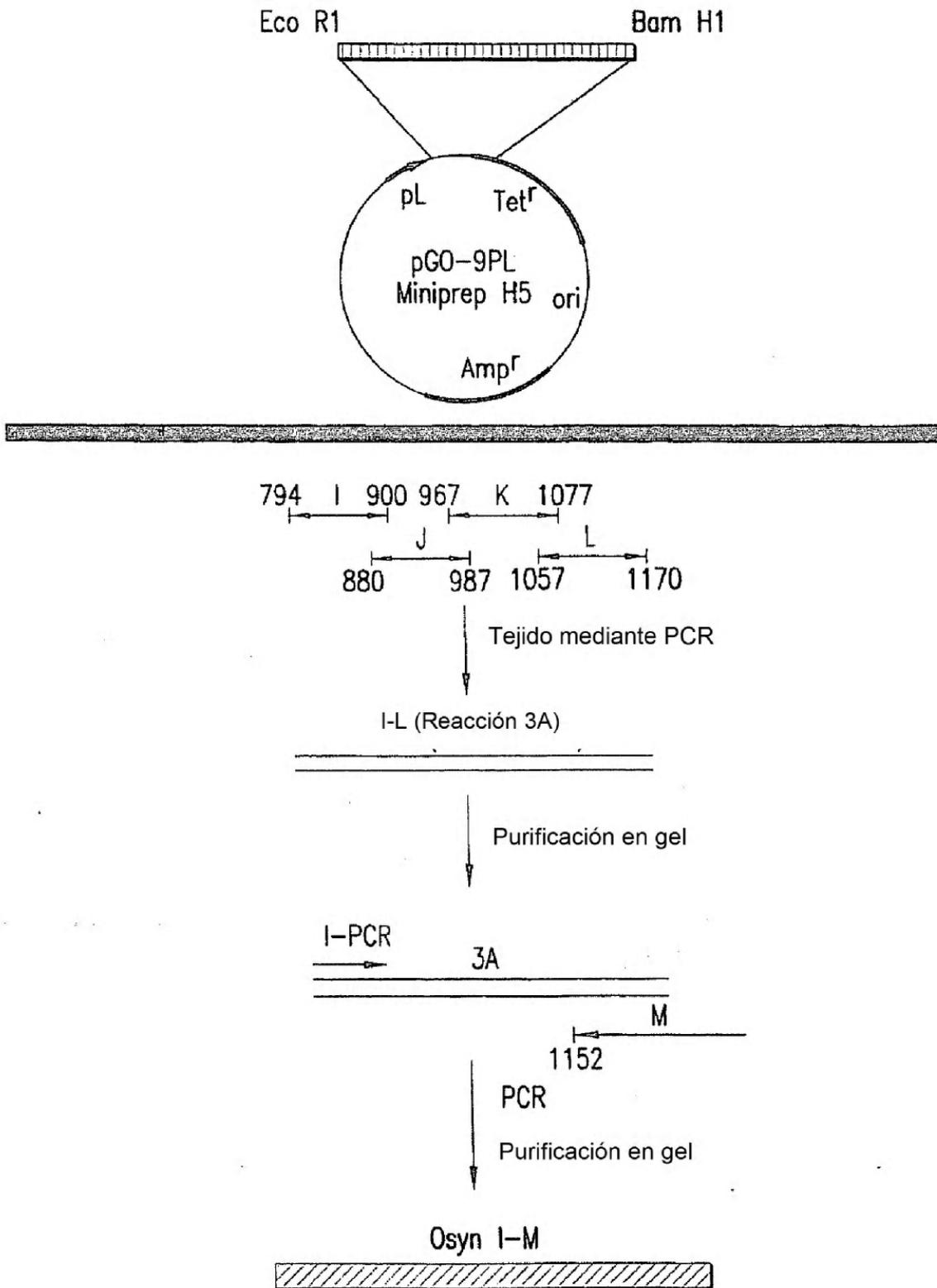


FIG.4D

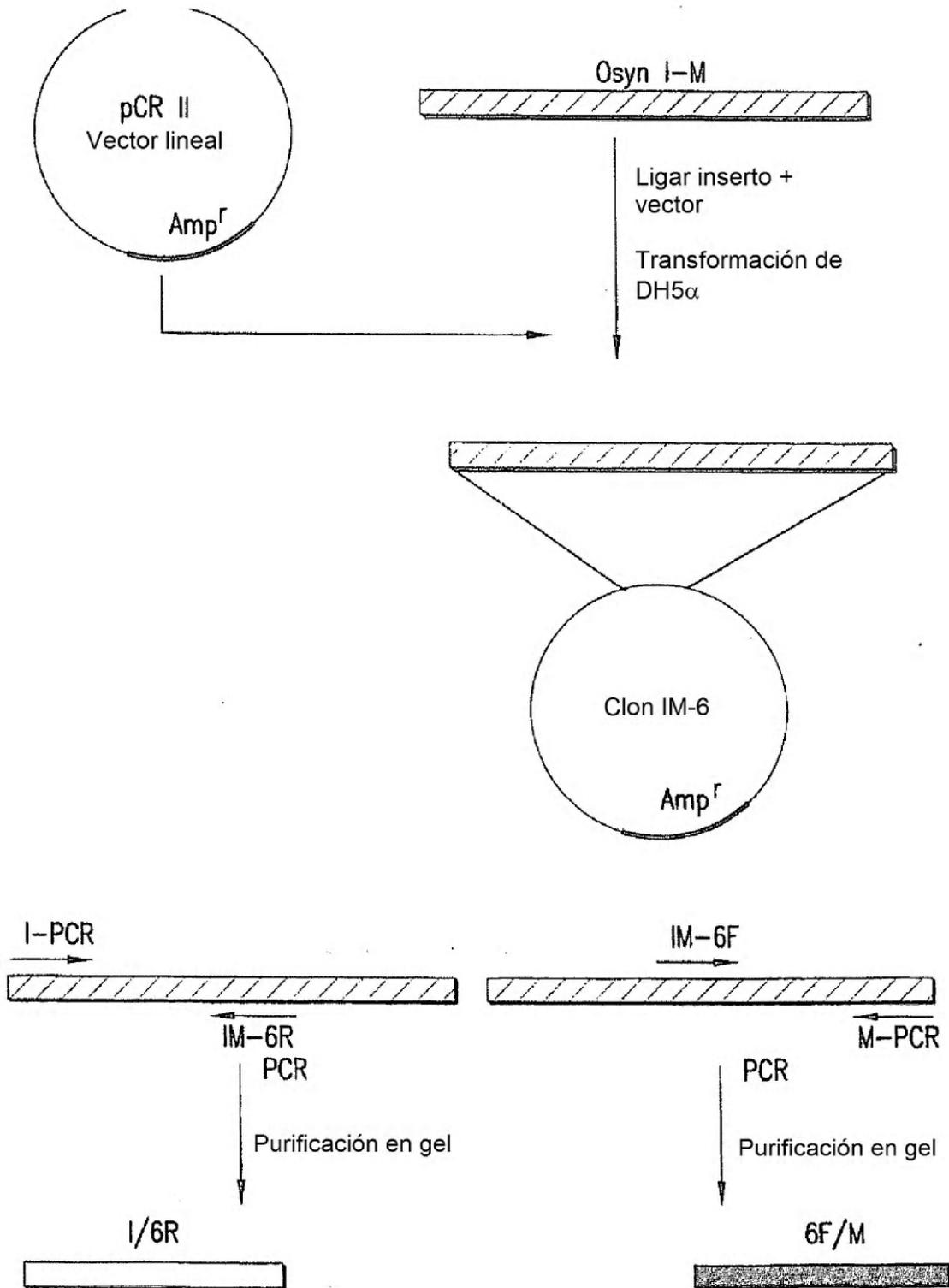


FIG.4E

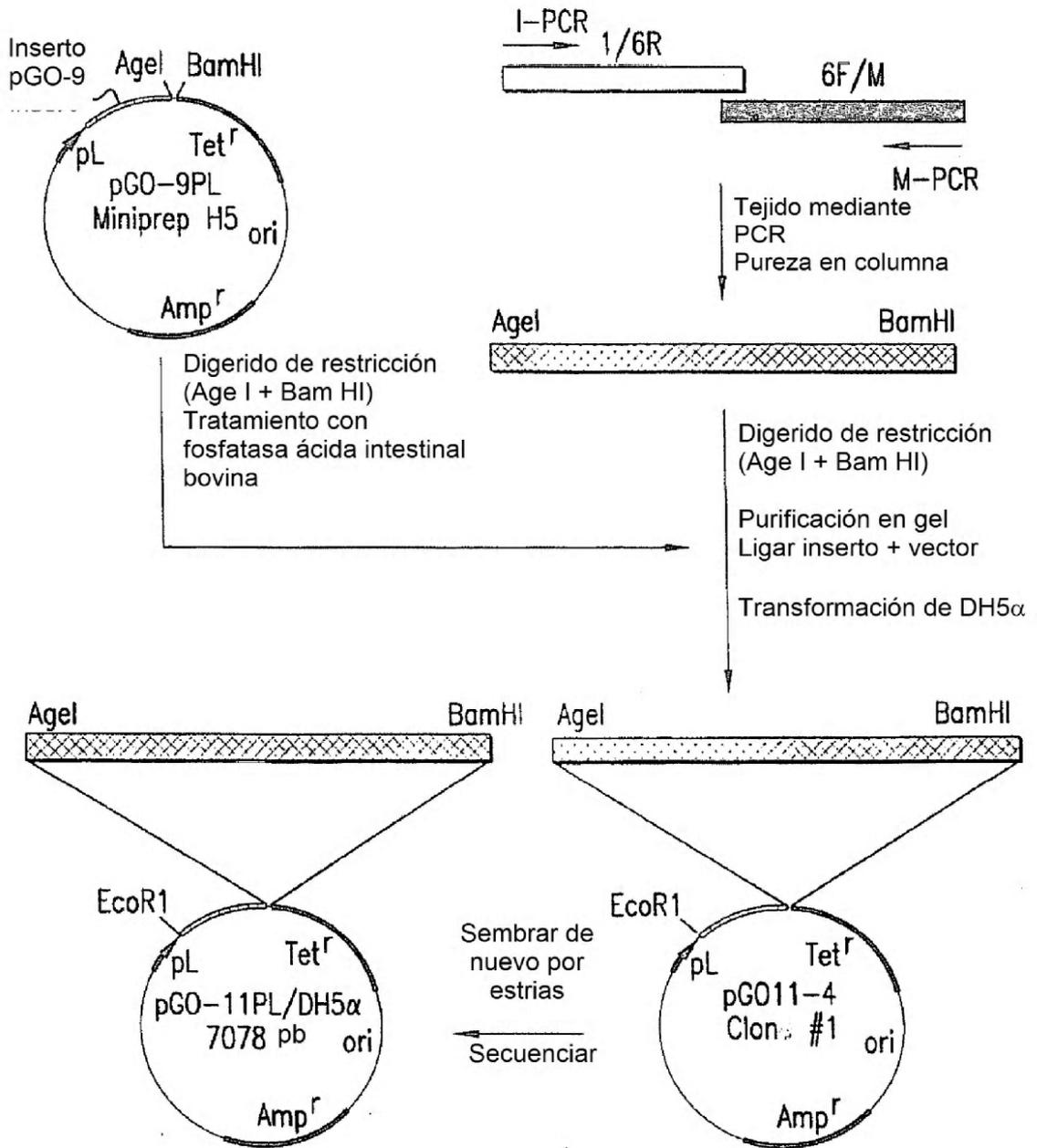


FIG.4F

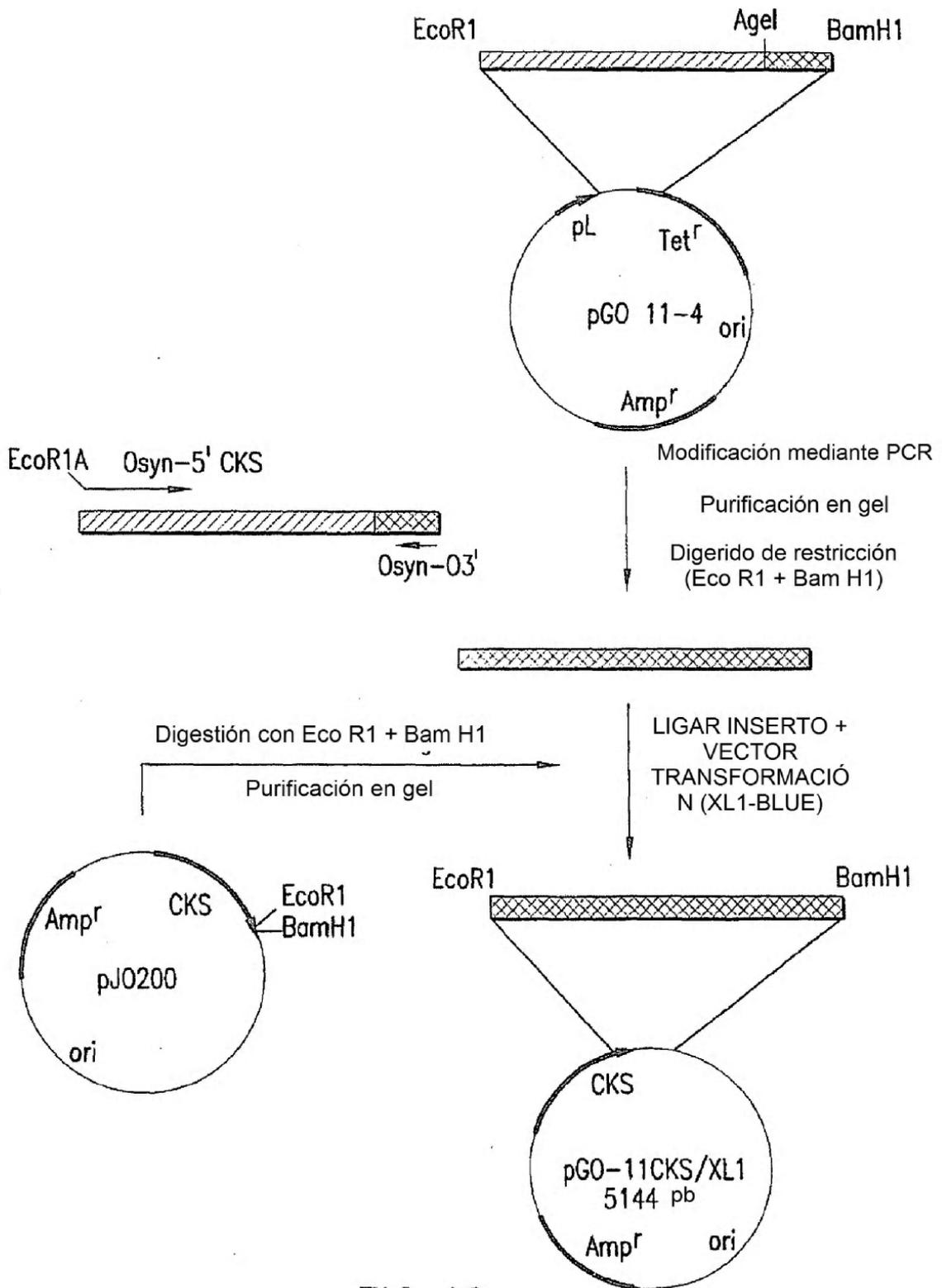


FIG.4G

└─ gp120
 MIGGDMKDIW RNELFKYKVV RVKPF SVAPT PIARPVIGTG THREKRAVGL 50
└─ gp41
 GMLFLGVLSA AGSTMGAAAT ALTVQTHSVI KGIVQQQDNL LRAIQAAQEL 100
 LRLSWVGIRQ LRARLLALET LIQNQQLLNL WGCKGRLICY TSVKWNETWR 150
 NTTNINQIWG NLTWQEWQQ IDNVSSTIYE EIQAQVQQE QNEKKLLELD 200
 EWASLWNWLD ITKWL 215

FIG.5

└─ CKS
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERII VATD 50
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVQGD 100
 EPMIPATIIA QVADNLAQRQ VGMTTLAVPI HNAEEAFNPN AVKVVLD AEG 150
 YALYFSRATI PWDRDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRAG FIRRYVNWQP 200
└─ gp120
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEVPT GTGVDTPEDL DPSTNSIGGD 250
└─ gp41
 MKDIWRNELF KYKVV RVKPF SVAPTPIARP VIGTGTHREK RAVGLGMLFL 300
 GVL SAAGSTM GAAATALTVQ THSVIKGIVQ QQDNL LRAIQ AQQELLRLSV 350
 WGIRQLRARL LALET LIQNQ QLLNLWGCKG RLICYTSVKW NETWRNTTNI 400
 NQIWGNLTWQ EWDQQIDNVS STIYEEIQKA QVQQEQNEKK LLELDEWASL 450
 WNWLDITKWL 460

FIG.6

gp120
 gp41
 MIGGDMKDIW RNELFKYKVV RVKPFVAPT PIARPVIGTG THREKRAVGL 50
 GMLFLGVLSA AGSTMGAAAT ALTVQTHSVI KGIVQQQDNL LRAIQAQQEL 100
 LRLSVWGIRQ LRARLLALET LIQNQQLNL WGCKGRLICY TSVKWNETWR 150
 NTTNINQIWG NLTWQEWQQ IDNVSSTIYE EIQAQVQQE QNEKKLLELD 200
 EWASLWNWLD ITKWLNRIRQ GYQPLSLQIP TRQQSEAETP GRTGE 245

FIG.7

CKS
 gp120
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERIIVATD 50
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVQGD 100
 EPMIPATIIR QVADNLAQRQ VGM TTLAVPI HNAEEAFNPN AVKVVLD AEG 150
 YALYFSRATI PWDRDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRAG FIRRYVNWQP 200
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEVPTGTVDTPEDL DPSTNSIGGD 250
 MKDIWRNELF KYKVV RVKPF SVAPTPIARP VIGTGTHREK gp41 RAVGLGMLFL 300
 GVLSAAGSTM GAAATALTVQ THSVIKGIVQ QQDNLLRAIQ AQQELLRLSV 350
 WGIRQLRARL LALETLIQNQ QLLNLWGCKG RLICYTSVKW NETWRNTTNI 400
 NQIWGNLTWQ EWDQQIDNVS STIYEEIQKA QVQQEQNEKK LLELDEWASL 450
 WNWLDITKWL RNIRQGYQPL SLQIPTRQQS EAETPGRTGE 490

FIG.8

^{gp120}
MIGGDMKDIW RNELFKYKVV RVKPFVAPT PIARPVIGTG ^{gp41}THREKRAVGL 50
GMLFLGVLSA AGSTMGAAAT ALTVQTHSVI KGIVQQQDNL LRAIQAQDEL 100
LRLSVWGIRQ LRKRLLALET LIQNQQLNL WGCKGRLICY TSVKWNETWR 150
NTTNINQIWG NLTWQEWQQ IDNVSSTIYE EIQAQVQQE QNEKKLLELD 200
EWASLWNWLD ITKWLNRIRQ GYQPLSLQIP TRQSEAETP GRTGEGGGDE 250
GRPRLIPSPQ GFLPLLYTDL RTIILWSYHL LSNLISGTQT VISHLRRLGLW 300
ILGQKIIDAC RICA AVIHYW LQELQKSATS LIDTF AVAVA NWTDDIILGI 350
QRLGRGILNI PRRVRQGFER SLL 373

FIG.9

↖CKS
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERIIIVATD 50
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVQGD 100
 EPMIPATIIR QVADNLAQRQ VGMITLAVPI HNAEEAFNPN AVKVVLD AEG 150
 YALYFSRATI PWDRDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRAG FIRRYVNWQP 200
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEV P GTGVDTPEDL DPSTNSIGGD 250
 ↖gp120
 MKDIWRNELF KYKVVRVKPF SVAPTPIARP VIGTGTHREK RAVGLGMLFL 300
 ↖gp41
 GVL SAAGSTM GAAATALTVQ THSVIKGIVQ QQDNLLRAIQ AQQELLRLSV 350
 WGIRQLRARL LALETLIQNQ QLLNLWGCKG RLICYTSVKW NETWRNTTNI 440
 NQIWGNLTWQ EWDQQIDNVS STIYEEIQKA QVQQEQNEKK LLELDEWASL 450
 WNWLDITKWL RNIRQGYQPL SLQIPTRQQS EAETPGRTGE GGGDEGRPRL 500
 IPSPQGFLPL LYTDLRTIIL WSYHLLSNLI SGTQTVISHL RLGLWILGQK 550
 IIDACRICA A VIH YWLQELQ KSATSLIDTF AVAVANWTDD IILGIQRLGR 600
 GILNIPRRVR QGFERSLL 618

FIG.10

↖CKS
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERII VATD 50
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVQGD 100
 EPMIPATIIIR QVADNLAQRQ VGMTTLAVPI HNAEEAFNPN AVKVV LDAEG 150
 YALYFSRATI PWDRDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRSG FIRRYVNWQP 200
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEV P GTGVDTPEDL DPSTNSMEGE 250
 ↖gp120
 LTCNSTVTSI IANIDSDGNQ TNITFSAEVA ELYRLELGDY KLIEVTPIGF 300
 ↖gp36
 APTKEKRYSS APVRNKRGVF VLGFLGFLAT AGSAMGAASL TLSAQSR TLL 350
 AGIVQQQQQL LDVVKROQEM LRLTWGTKN LQARVTAIEK YLKDQAQLNS 400
 WCAFRQVCH TTPVWVNDL TPDWNNMTWQ EWEKRVHYLE ANISQSLEQA 450
 QIQQEKMYE LQKLNS 466

FIG.11

↖CKS
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERIIIVATD 50
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVQGD 100
 EPMIPATIIR QVADNLAQRQ VGMATLAVPI HNAEEAFNPN AVKVVLD AEG 150
 YALYFSRATI PWDRDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRAG FIRRYVNWQP 200
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEV P GTGVDTPEDP STALMKIPGD 250
 ↖gp120 ↗gp41
 PGGGDMRDNW RSELYKYKVV KIEPLGVAPT KAKRRVVQRE KRAVGIGALF 300
 LGFLGAAGST MGAASMTLTV QARQLLSGIV QQQNNLLRAI EAQQHLLQLT 350
 VWGIKQLQAR ILAVERYLKD QQLLGIWGCS GKLICTTAVP WNASWSNKSL 400
 EQIWNMTWM EWDREINNYT SLIHSLIEES QNQQEKNEQE LLELDKWWNR 450
 VRQYSPLSF QTHLPIPRGP DRPEGIEEEG GERDRDRSIR LVNGSLALIW 500
 DDLRSLCLFS YHRLRDLLI VTRIVELLGR RGWEALKYWW NLLQYWSQEL 550
 KNSAVSLLNA TAIAVAEGTD RVIEVVQGAY RAIRHIPRRI RQGLERILL 599

FIG.12

↖CKS
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERIIIVATD 50
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVQGD 100
 EPMIPATIIR QVADNLAQRQ VGMATLAVPI HNAEEAFNPN AVKVVLD AEG 150
 YALYFSRATI PWDRDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRAG FIRRYVNWQP 200
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEV P GTGVDTPEDP STALMKIPGD 250
 ↖gp120 (HXB2R) ↖gp41 (HXB2R)
 PGGGDMRDNW RSELYKYKVV KIEPLGVAPT KAKRRVVQRE KRAVGIGALF 300
 LGFLGAAGST MGAASMTLTV QARQLLSGIV QQQNLLRAI EAQQHLLQLT 350
 VWGIKQLQAR ILAVERYLKD QQLLGIWGCS GKLICTTAVP WNASWSNKSL 400
 EQIWNMTWM EWDREINNYT SLIHSLIEES ONQQEKNEQE LLELDKVVNR 450
 VRQGYSPLSF QTHLPIPRGP DRPEGIEEEG GERDRDRSIR LVIGGDMKDI 500
 ↖gp120 (HAM112)
 WRNELFKYKV VRVKPFSVAP TPIARPVIGT GTHREKRAVG LGMLFLGVLS 550
 ↖gp41 (HAM112)
 AAGSTMGAAA TALTVQTHSV IKGIVQQQDN LLRAIQAAQE LLRLSVW GIR 600
 QLRARLLALE TLIQNQQLLN LWGCKGRLIC YTSVKWNETW RNTTNINQIW 650
 GNLTWQEQDQ QIDNVSSTIY EEIQKAQVQQ EQNEKKLLEL DEWASLWNWL 700
 DITKWLRNIR QGYQPLSLQI PTRQQSEAET PGRTGE 736

FIG.13

↖CKS
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERTIIVATD 50
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVQGD 100
 EPMIPATIIR QVADNLAQRQ VGMATLAVPI HNAEEAFNPN AVKVVLD AEG 150
 YALYFSRATI PWDRDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRAG FIRRYVNWQP 200
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEV P GTGVDTPEDP STALMKIPGD 250
 ↖gp120 (HXB2R) ↖gp41 (HXB2R)
 PGGGDMRDNW RSELYKYKVV KIEPLGVAPT KAKRRYVQRE KRAVGIGALF 300
 LGFLGAAGST MGAASMTLTV QARQLLSGIV QQQNNLLRAI EAQQHLLQLT 350
 VWGIKQLQAR ILAVERYLKD QLLGIWGCS GKLICTTAVP WNASWSNKSL 400
 EQIWNMTWM EWDREINNYT SLIHSLIEES ONQOEKNEQE LLELDKWVNR 450
 VRQYSPLSF QTHLP IPRGP DRPEGIEEEG GERDRDRSIR LVIGGDMKDI 500
 ↖gp120 (HAM112)
 WRNELFKYKV VRVKPFSVAP TPIARPVICT GTHREKRAVG LGMLFLGVLS 550
 ↖gp41 (HAM112)
 AAGSTMGAAA TALTVQTHSV IKGIVQQQDN LLRAIQAAQE LLRLSVWGIR 600
 QLRARLLALE TLIQNQQLLN LWGCKGRLIC YTSVKWNETW RNTTNINQIW 650
 GNLTWQEW DQ QIDNVSSTIY EEIQKAQVQQ EQNEKKLLEL DEWASLWNWL 700
 DITKWL 706

FIG.14

↳gp120 (HAM112) ↳gp41 (HAM112)
 M I G G D M K D I W R N E L F K Y K V V R V K P F S V A P T P I A R P V I G T G T H R E K R A V G L 50
 G M L F L G V L S A A G S T M G A A T A L T V Q T H S V I K G I V Q Q Q D N L L R A I Q A Q Q E L 100
 L R L S V W G I R Q L R A R L L A E T L I Q N Q Q L L N L W G C K G R L I C Y T S V K W N E T W R 150
 N T T N I N Q I W G N L T W Q E W D Q Q I D N V S S T I Y E E I Q K A Q V Q Q E Q N E K K L L E L D 200
 E W A S L W N W L D I T K W L R N I R Q G Y Q P L S L Q I P T R Q Q S E A E T P G R T G E G P G G G 250
↳gp120 (HXB2R)
 D M R D N W R S E L Y K Y K V V K I E P L G V A P T K A K R R V V Q R E K R A V G I G A L F L G F L 300
↳gp41 (HXB2R)
 G A A G S T M G A A S M T L T V Q A R Q L L S G I V Q Q Q N N L L R A I E A Q Q H L L Q L T W G I 350
 K Q L Q A R I L A V E R Y L K D Q Q L L G I W G C S G K L I C T T A V P W N A S W S N K S L E Q I W 400
 N N M T W M E W D R E I N N Y T S L I H S L I E E S Q N Q Q E K N E Q E L L E L D K W V N R V R Q G 450
 Y S P L S F Q T H L P I P R G P D R P E G I E E E G G E R D R D R S I R L V 488

FIG.15

↖CKS
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERIIIVATD 50
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVQGD 100
 EPMIPATIIR QVADNLAQRQ VGM TTLAVPI HNAEEAFNPN AVKVV LDAEG 150
 YALYFSRATI PWDRDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRAG FIRRYVNWQP 200
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEVPTGTDPEDL DPSTNSIGGD 250
 ↖gp120 (HAM112)
 MKDIWRNELF KYKVV RVKPF SVAPTPIARP VIGTGTHREK RAVGLGMLFL 300
 ↖gp41 (HAM112)
 GVLSAAGSTM GAAATALTVQ THSVIKGIVQ QQDNLLRAIQ AQQELLRLSV 350
 WGIRQLRARL LALETLIQNQ QLLNLWGCKG RLICYTSVKW NETWRNTNI 400
 NQIWGNLTWQ EWDQQIDNVS STIYEEIQKA QVQEQNEKK LLELDEWASL 450
 ↖linker↖IDR (HAM112)
 WWLDITKWL RNIROGYQPL SLQIPTRQQS EAETPGRTGE GGSRL LALE 500
 TLIQNQQLLN LWGCKGRLICYTSVKW 526

FIG.16

↖gp120 (HAM112) ↖gp41 (HAM112)
 MIGGDMKD JW RNELFKYKVV RVKPF SVAPT PIARPVIGTG THREKRAVGL 50
 GMLFLGVLSA AGSTMGAAAT ALTVQTHSVI KGIVQQQDNL LRAIQAQQEL 100
 LRLSWGIRQ LRARLLALET LIQNQQLLN LWGCKGRLICY TSVKWNETWR 150
 NTTNINQIWG NLTWQEWDDQ IDNVSSTIYE ETQKAQVQEQ QNEKKLLELD 260
 ↖linker↖IDR (HAM112)
 EWASLWWLD ITKWL RNIROGYQPLSLQIP TRQQSE AETPGRTGEGGSR 250
 LLALETLIQNQQLLN LWGCKGRLICYTSVKW 281

FIG.17

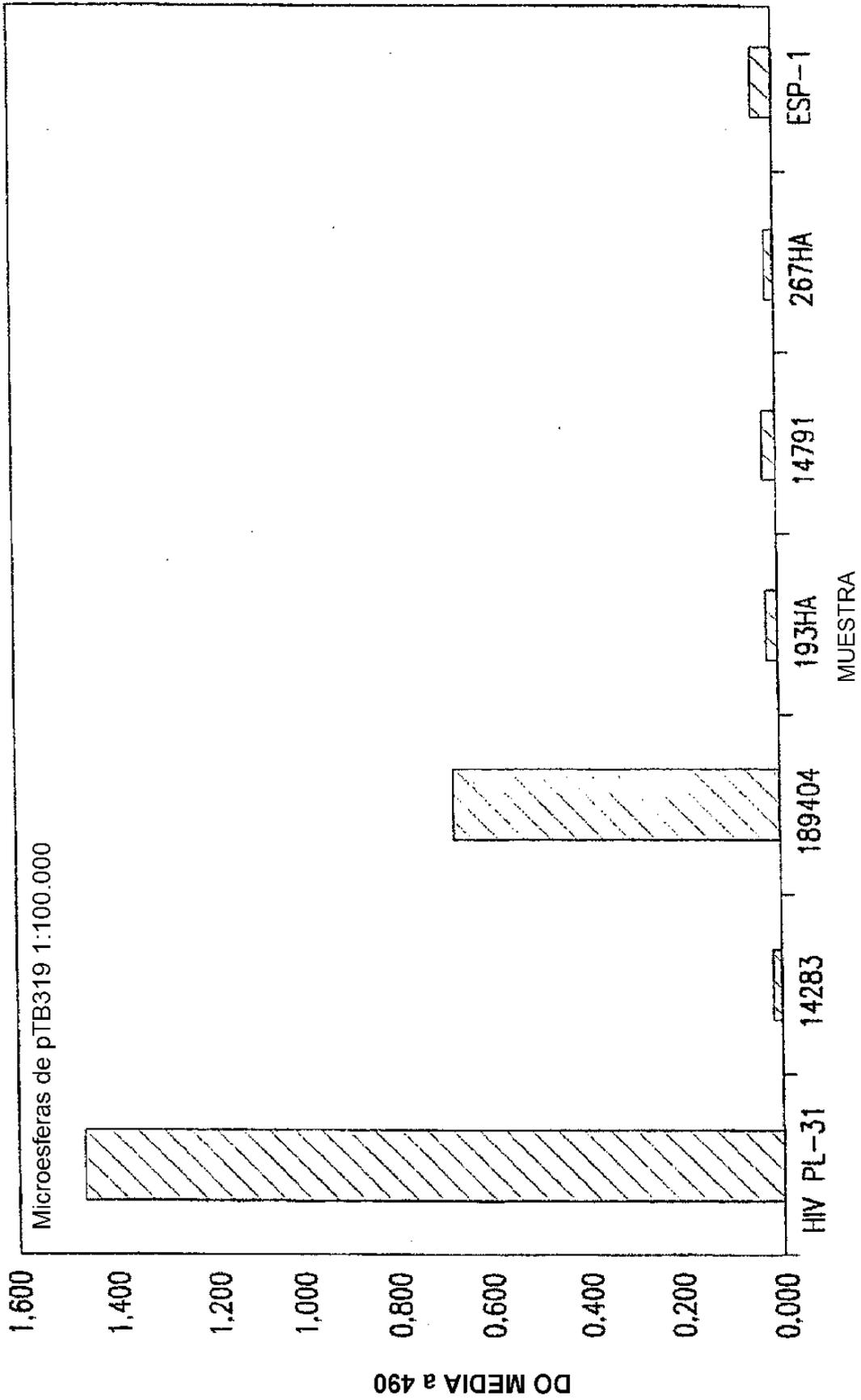
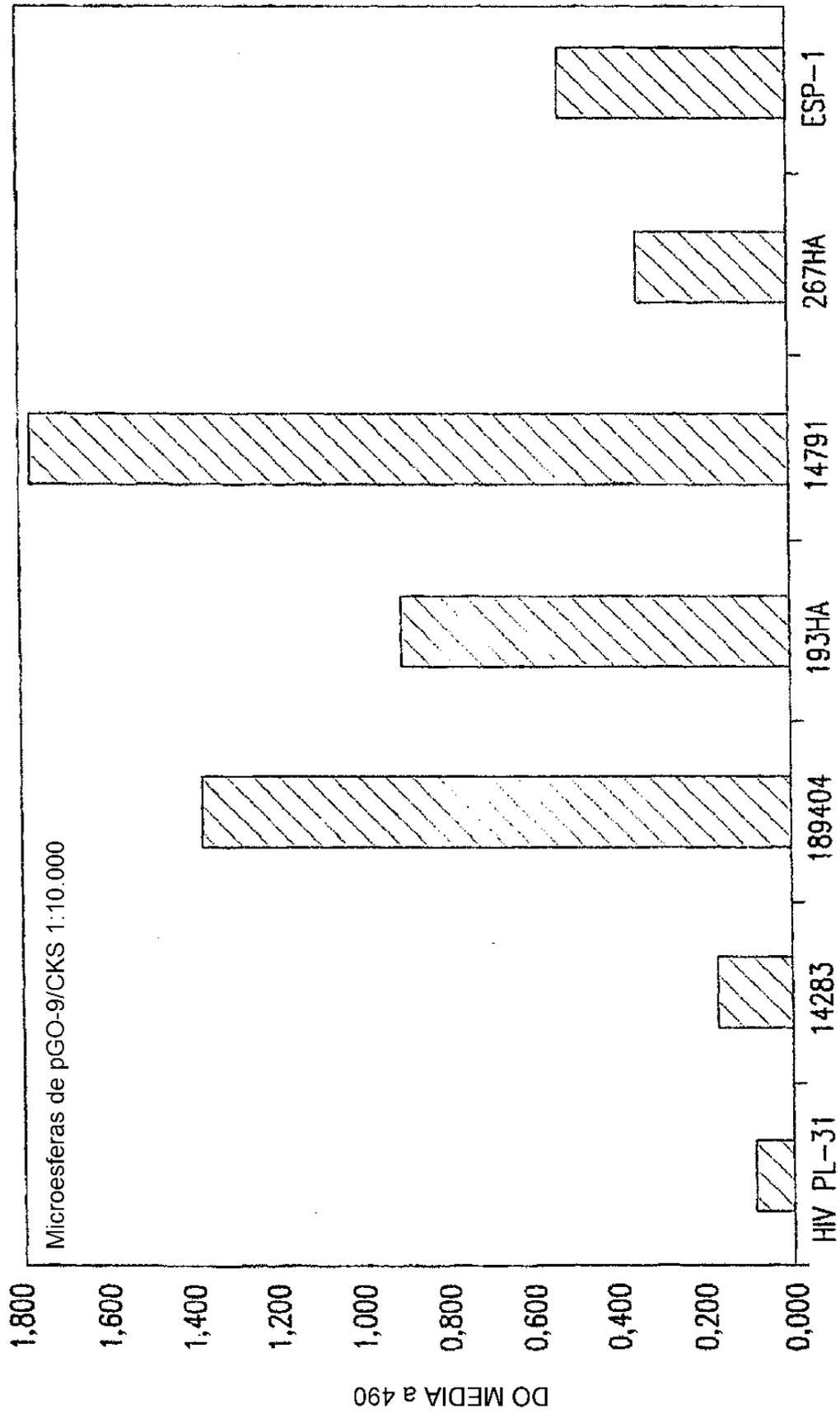


FIG.18



MUESTRA
FIG.19

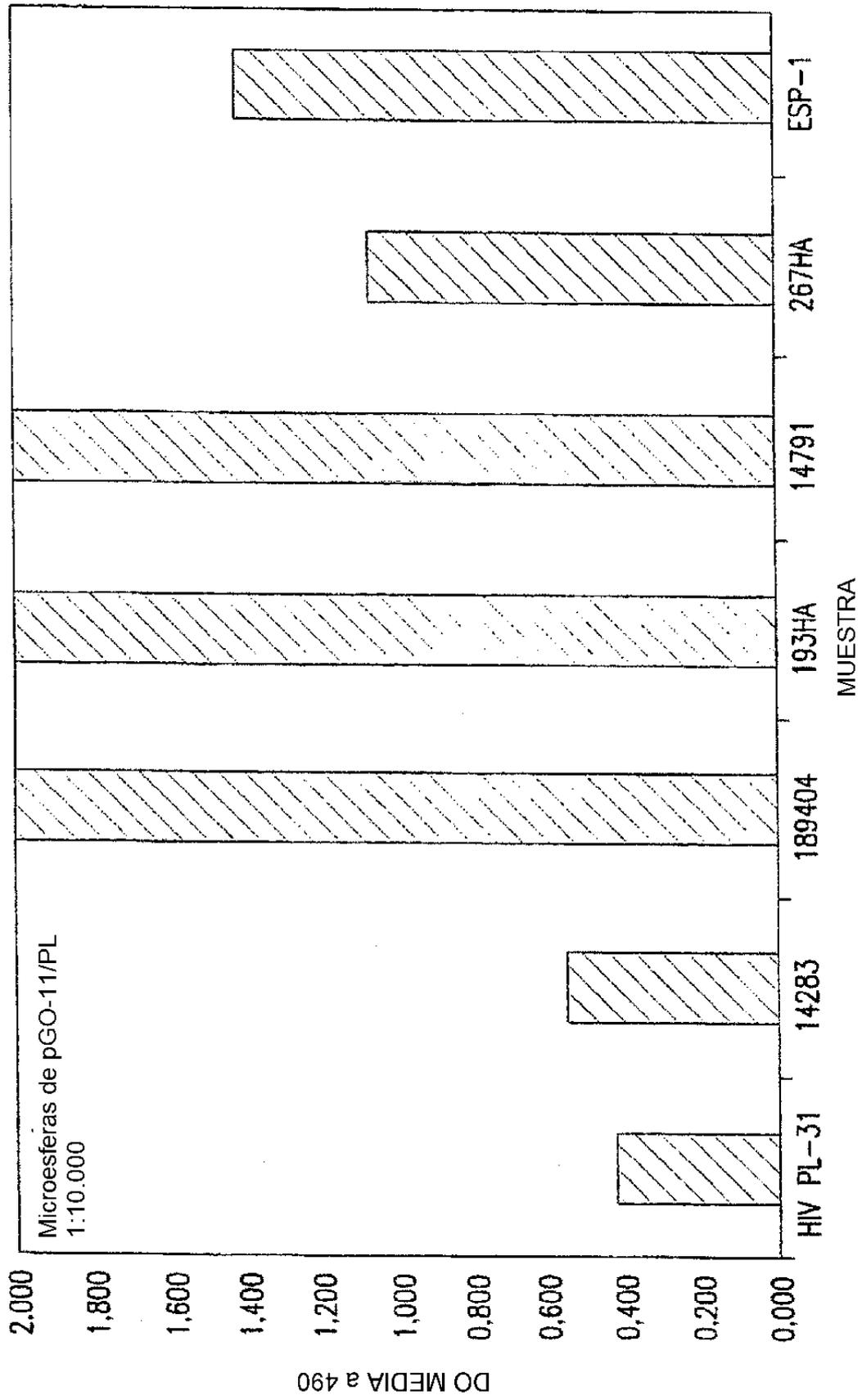


FIG.20

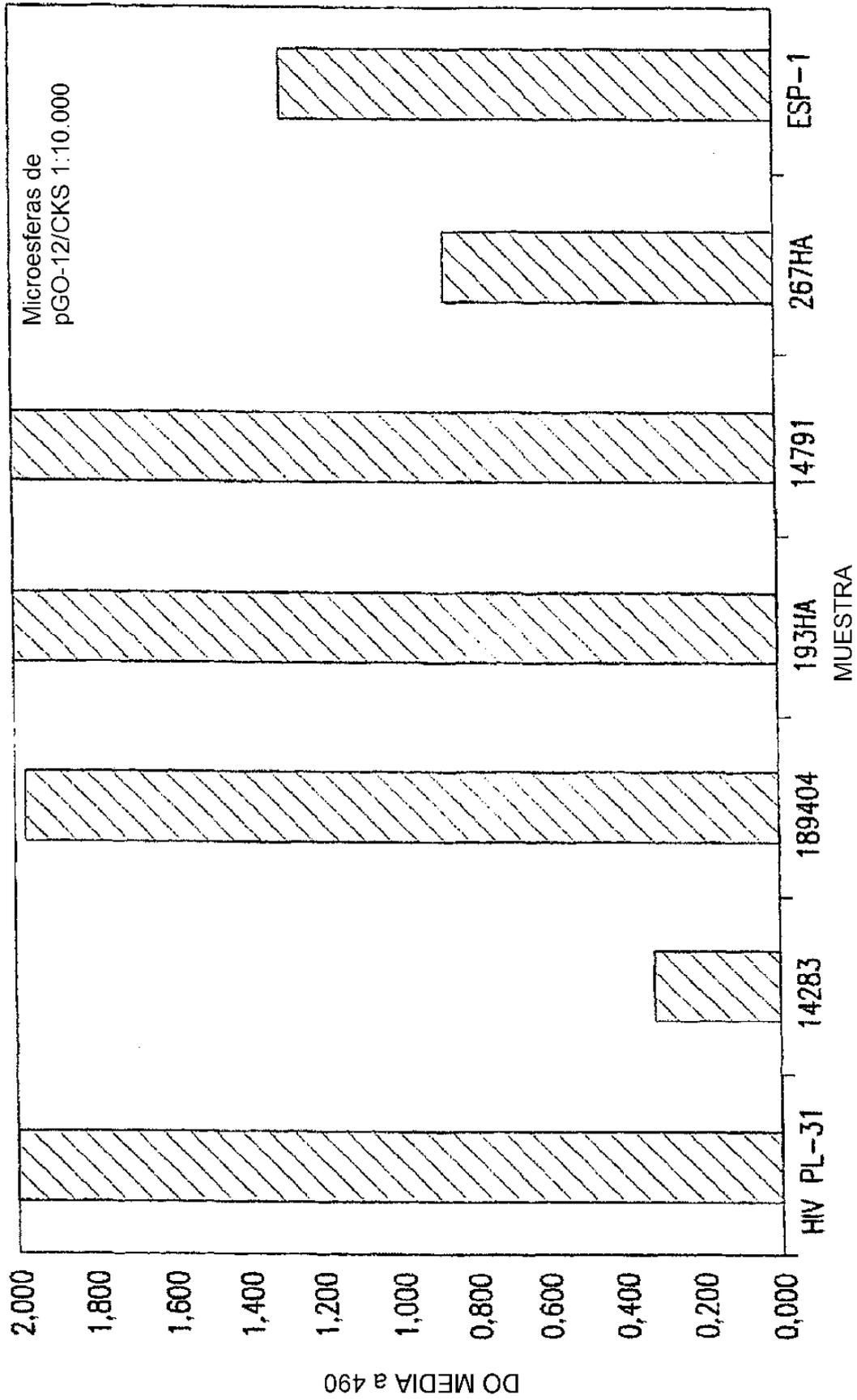


FIG.21

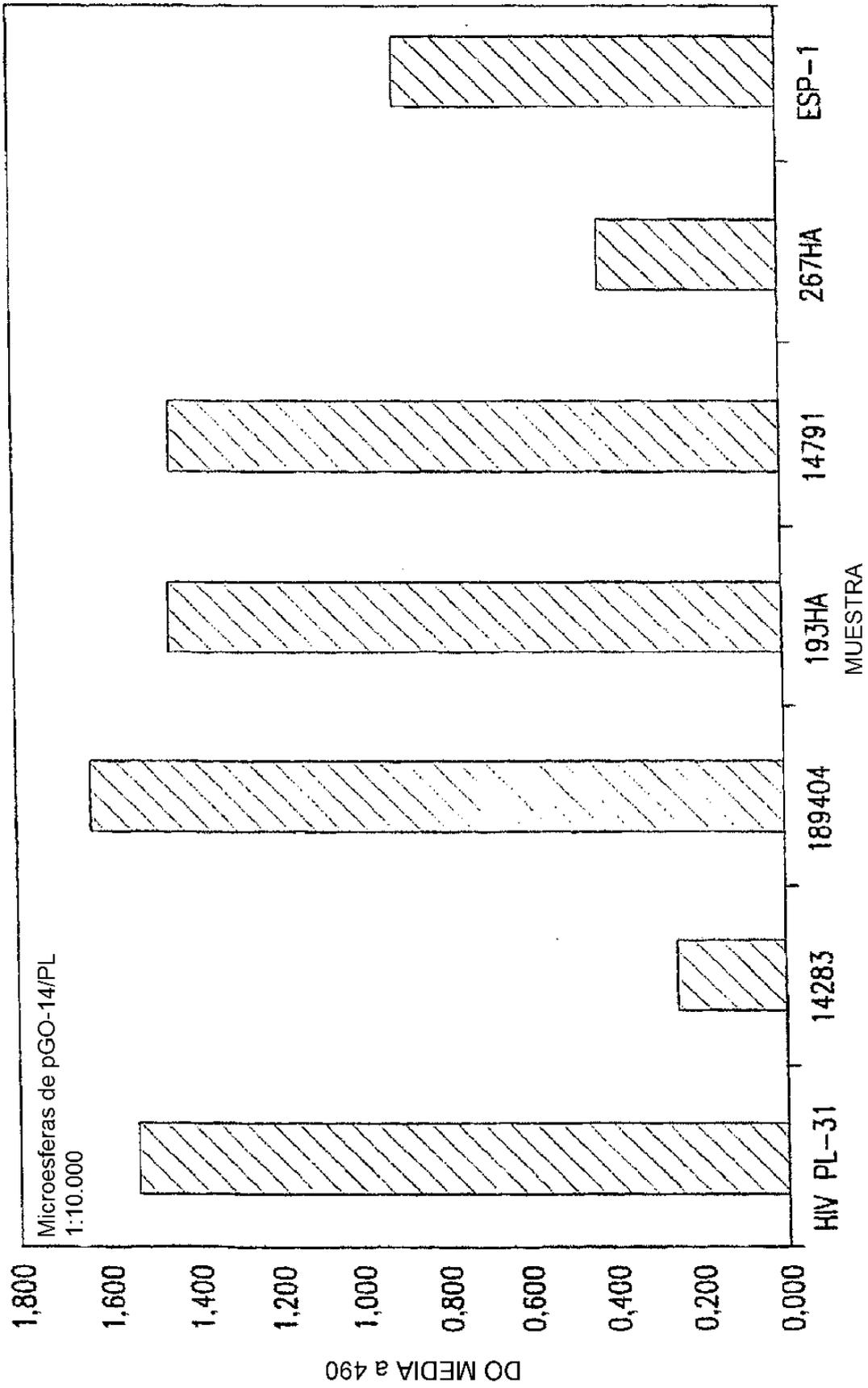


FIG.22

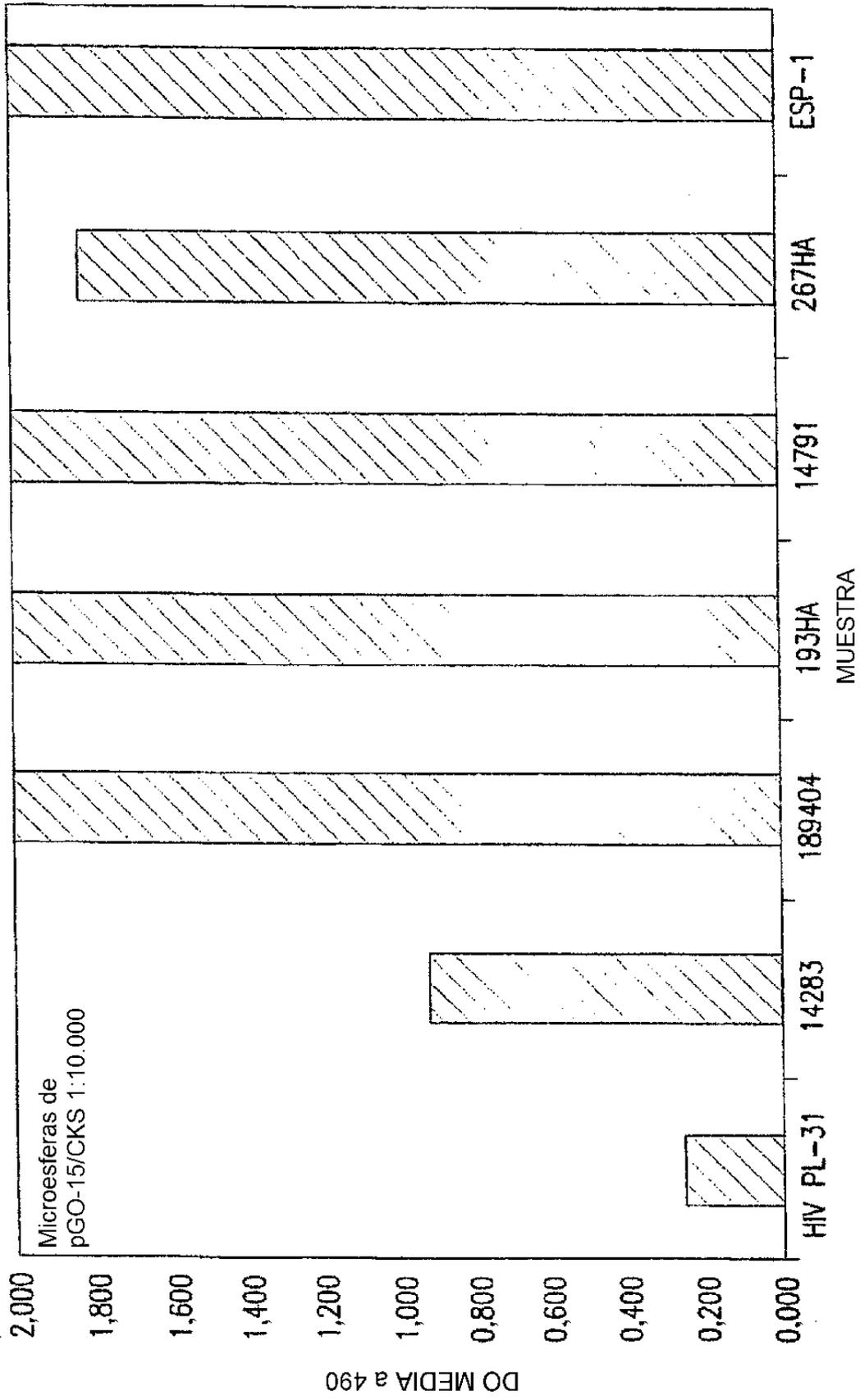


FIG.23