

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 485 292**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/49** (2006.01)

**C07K 14/155** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.1998 E 10182179 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2305818**

54 Título: **Construcciones de antígenos útiles en la detección y 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:

**13.08.2014**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)  
100 Abbott Park Road  
Abbott Park, IL 60064-3500, 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 2 485 292 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

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

5 **Antecedentes de la invención**

La presente descripción se refiere de forma general a inmunoensayos para la detección y 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 descripción se refiere a nuevas construcciones de antígenos 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 realizan típicamente usando inmunoensayos basados en la interacción altamente específica entre los antígenos usados como reactivos en el ensayo y los anticuerpos circulantes en el suero del paciente. La inmunorreactividad de los anticuerpos del paciente con algunos antígenos, y a un menor grado o de ninguna manera con otros, permite la identificación del tipo y subtipo del VIH que está presente.

Actualmente existen dos grupos filogenéticos principales del VIH-1 denominados Grupos "M" y "O." G. Meyers y col., Human Retroviruses and AIDS 1995, Los Alamos National Laboratory, Los Álamos, NM (1995). Los aislados del VIH-1 del Grupo M se han dividido adicionalmente en subgrupos (A J) que desde el punto de vista filogenético están aproximadamente equidistantes entre sí. Los aislados 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 Estados Unidos N° 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 aislados del Grupo O en Bélgica, Francia, Alemania, España y Estados Unidos. Véase, por ejemplo, R. DeLeys y col., citado anteriormente; P. Chamneau 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 transmembrana de 41.000 PM (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. Aparentemente la respuesta inmunitaria contra la gp41 permanece relativamente fuerte durante la enfermedad, según manifiesta 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 (IDR) bien caracterizada 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 Estados Unidos N° 5.055.391 cartografía el genoma del VIH-2 y proporciona ensayos para detectar el virus.

El documento WO 91/07664 describe construcciones del VIH-2 que comprenden la parte caxboxi terminal de la

gp120 y la parte amino-terminal de la gp120 para aplicaciones de diagnóstico.

El documento WO 95/23973 describe construcciones de antígenos para la detección de anticuerpos contra el VIH-2.

5 En la mayoría de los casos, estas cepas víricas se identifican y se caracterizan fácilmente usando pruebas diagnósticas disponibles en el comercio. 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, para detectar la presencia de anticuerpos contra el VIH-1 del Grupo O. I. Loussert-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 aislados del VIH-1 del Grupo O, las autoridades sanitarias temen la aparición de este subtipo también en otras áreas geográficas.

15 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 todos los aislados y/o infecciones por el VIH-1 (del Grupo M y del Grupo O) y por el VIH-2.

### Resumen de la invención

20 La presente invención proporciona una construcción de antígeno que consiste en una secuencia de aminoácidos de ID SEC NO: 55 o en una secuencia de aminoácidos diferente de la secuencia de aminoácidos de ID SEC NO 55 por un cambio conservativo debido a sustituciones de 1 a 5 aminoácidos, en la que la construcción de antígeno no reacciona en cruzado con los anticuerpos contra el VIH-1.

25 La presente invención proporciona además un polinucleótido que codifica una construcción de antígeno como se define anteriormente.

La presente invención proporciona incluso además un procedimiento para detectar anticuerpos contra el VIH-2 en una muestra de ensayo que comprende las etapas de:

- 30 (a) combinar al menos una construcción de antígeno como se define anteriormente con la muestra de ensayo para formar una mezcla;
- (b) incubar la mezcla en condiciones adecuadas para la formación de complejos entre el antígeno y los anticuerpos, si hubiera, que están presentes en la muestra y que son inmunológicamente reactivos con el antígeno; y
- 35 (c) detectar la presencia de cualquier complejo formado.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un kit de inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra el VIH-2 que comprende una construcción de antígeno como se define anteriormente.

40 Para comparar, la presente descripción también incluye otras construcciones de antígenos, polinucleótidos, inmunoensayos y kits que no se incluyen en la invención como se define anteriormente.

45 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 descripción se desvela un polipéptido de la *env* de un aislado del VIH-1 del Grupo O que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste 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 del aislado HAM112. De forma análoga se desvela un polipéptido de la *env* de un aislado del VIH-1 del Grupo O que comprende una parte inmunorreactiva del anterior polipéptido de longitud completa, así como los polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos.

50 En un segundo aspecto de la presente descripción, se desvela una construcción 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. Preferentemente, el primer polipéptido de dicha construcción de antígeno es un polipéptido de la gp120 y el segundo polipéptido es un polipéptido de la gp41, opcionalmente con una parte de la región hidrófoba del polipéptido de la gp41 delecionada para facilitar la expresión cuando se expresa como un producto recombinante. También se prefieren entre las construcciones de antígeno anteriores aquellas en las 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 del aislado HAM112, tales como aquellas en las que el primer polipéptido comprende una parte inmunorreactiva de la proteína gp120 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM 112.

60 En las construcciones de la *env* del Grupo O anteriores, el primer polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 1 a 520 de la secuencia mostrada en la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61), o como alternativa, una parte inmunorreactiva de los mismos. Un primer polipéptido acortado y preferido es uno que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 476 a 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61). Junto con cualquiera de los polipéptidos anteriores, el segundo polipéptido usado en las construcciones de la invención puede ser una parte inmunorreactiva de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O

del aislado HAM1 12, en la que una parte de la región hidrófoba de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112 está opcionalmente ausente. En particular, la parte delecionada puede ser aquella parte de la gp41 que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 690 a 715 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61).

El segundo polipéptido anterior tendrá preferentemente una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 521 a 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una parte de la misma. Más preferentemente, el segundo polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52); aún más preferentemente, la secuencia de aminoácidos puede consistir esencialmente en los restos 47 a 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48); y incluso más preferentemente, la secuencia de aminoácidos puede consistir esencialmente en los restos 47 a 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 59). Algunas construcciones representativas de la *env* del Grupo O de la invención son las construcciones pGO-8PL, pGO-8CKS, pGO-9PL, pGO-9CKS, pGO-11PL y pGO-11CKS, así como cualquier derivado, variante y análogo de los mismos.

En un aspecto más de la presente descripción, se desvela una construcción 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 preferentemente una construcción de antígeno que comprende una fusión de:

- (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 las construcciones anteriores pueden derivar de un aislado del VIH-1 del Subtipo B y preferentemente al menos uno deriva del VIH-1 del Grupo M del aislado HXB2R. En cualquiera de estas construcciones 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 del aislado 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 parte de la región hidrófoba de al menos uno de los polipéptidos de la gp41 puede estar delecionada. Las construcciones de antígeno incluidas entre las anteriores son aquellas en las que:

- (a) el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O comprende una parte inmunorreactiva de la proteína gp120 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112;
- (b) el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O comprende una parte de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112
- (c) el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M comprende una parte inmunorreactiva de la proteína gp120 de un primer aislado 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 parte inmunorreactiva de la proteína gp41 de un segundo aislado del VIH-1 del Grupo M del Subtipo B.

De entre estas construcciones se prefieren aquellas en las que el primer y segundo aislado del VIH-1 del Grupo M del Subtipo B son el mismo, y son el aislado HXB2R del VIH-1 del Grupo M, así como aquellos en los que una parte de la región hidrófoba de la proteína gp41 del aislado HXB2R del VIH-1 del Grupo M está ausente del segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M.

Las construcciones preferidas de la *env* del Grupo O/Grupo M incluyen aquellas en las que (a) el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 251 a 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 que consiste esencialmente en los restos 293 a 599 de la secuencia de la Figura 12 (ID. SEC. N°: 108) o una parte de la misma. Se prefieren especialmente aquellas en las que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo M tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 293 a 492 de la secuencia de la Figura 12 (ID. SEC. N°: 108).

También se prefieren las construcciones anteriores de la *env* del Grupo O/Grupo M en las que el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 1 a 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una parte de la misma, y especialmente aquellas que comprenden un primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 476 a 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 uno que tenga una secuencia de aminoácidos que consista esencialmente en los restos 521 a 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una parte de la misma, en la que una parte de la región hidrófoba de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112 puede estar opcionalmente ausente. Las construcciones preferidas son aquellas en las que dichos segundos polipéptidos de la

*env* del VIH-1 del Grupo O tienen una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52); son más preferidas aquellas en las que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48); y son incluso más preferidas aquellas en las que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58). Son construcciones representativas de la *env* del Grupo O/Grupo M de la descripción pGO-12CKS, pGO-13CKS y pGO-14PL y derivados, variantes y análogos de las mismas.

En otro aspecto más de la presente descripción, se desvela una construcción 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 esta construcción 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 esta construcción puede comprender una parte inmunorreactiva de la proteína gp120 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112, mientras que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O puede comprender una parte inmunorreactiva de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112.

De entre estas construcciones se prefieren aquellas en las que el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 1 a 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61), o una parte de la misma; son más preferidas aquellas en las que el primer polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 476 a 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 que consiste esencialmente en los restos 521 a 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una parte de la misma, y de la que una parte de la región hidrófoba de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112 puede estar opcionalmente ausente, se prefieren aquellas construcciones en las que el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52). Son incluso más preferidas aquellas con un segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O con una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48) y especialmente aquellas en las que la secuencia de aminoácidos consiste esencialmente en los restos 47 a 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58).

El polipéptido adicional del VIH-1 en cualquiera de estas construcciones puede ser un polipéptido de la *env* del Grupo O; sin embargo, se pretende que, como alternativa, sea un polipéptido inmunogénico 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 aquellas construcciones en las que el polipéptido adicional del VIH-1 del Grupo O comprende una parte inmunorreactiva de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112. También se prefieren aquellas en las que el polipéptido adicional del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 521 a 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una parte de la misma, en la que la región hidrófoba de la proteína gp41 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112 puede estar opcionalmente ausente. Son incluso más preferidas las construcciones en las que el polipéptido adicional de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52); son particularmente preferidas aquellas en las que el polipéptido adicional de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48) y especialmente aquellas en las que el polipéptido adicional de la *env* del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58). Las más preferidas son las construcciones 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 que consiste esencialmente en los restos 250 a 281 de la Figura 17 (ID. SEC. N°: 120). Algunas construcciones representativas de las anteriores son pGO-15CKS y pGO-15PL, así como cualquier derivado, variante y análogo de las mismas.

En otro aspecto más de la presente descripción se desvela una construcción 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 dichas construcciones se prefieren aquellas en las que:

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

La construcción VIH de la invención es pVIH-210 (ID. SEC. N°: 55), así como cualquier secuencia de aminoácidos diferente de la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. N°: 55 por un cambio conservativo debido a sustituciones de 1 a 5 aminoácidos.

Un aspecto adicional de la presente descripción comprende polinucleótidos que codifican cualquiera de las construcciones de antígeno anteriores, 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 más de la presente descripción incluyen vectores de expresión que comprenden dichos polinucleótidos y células hospedadoras transformadas por ellos, particularmente cuando el hospedador es *Escherichia coli*.

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

- (a) combinar al menos una construcción de antígeno de acuerdo con la invención con la muestra de ensayo para formar una mezcla;
- (b) incubar la mezcla en condiciones adecuadas para la formación de complejos entre el antígeno y 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.

En una realización del procedimiento, la detección de la presencia de los complejos en la etapa (c) se realiza usando una construcción de antígeno adicional de la descripción a la que se ha unido un compuesto generador de señal. En otra realización, la detección se realiza usando una construcción de antígeno adicional de la descripción a la que se ha unido un primer miembro de un par de unión específico y mediante el uso adicional un reactivo indicador que comprende un segundo miembro del par de unión específico que está unido al compuesto generador de señal. Una realización adicional estipula que la detección de la presencia de complejos en la etapa (c) se realiza usando un anticuerpo dirigido contra los complejos formados en la etapa (b), anticuerpo al que está unido un compuesto generador de señal. Otra realización más estipula que la detección de la presencia de complejos en la etapa (c) se realiza usando 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 reactivo 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 descripción se desvelan kits de inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra el VIH-1, kits que comprenden una construcción de antígeno de la descripción. Dicha construcción puede usarse como un reactivo de captura o como un reactivo indicador. Como alternativa, la construcción de antígeno puede unirse 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.

### Breve descripción de los dibujos

En la siguiente descripción detallada de la presente descripción se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

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

La FIGURA 2 representa la estrategia usada para generar construcciones génicas sintéticas de la env de las gp120 / gp41 del VIH-1 del Grupo O, en la 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 la que H = la región hidrófoba del VIH-1 del Grupo O, delecionados según se muestra.

Las FIGURAS 3A a 3D muestran una representación del diagrama de las etapas implicadas en la construcción de pGO-9PL/DH5 $\alpha$  y de pGO-9CKS/XL1.

Las FIGURAS 4A a 4G muestran una representación del diagrama de las etapas implicadas en la construcción de pGO-11 PL/DH5 $\alpha$  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-1 1CKS (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 restos correspondientes al CKS / policonector, a la env de gp120 / gp41 del aislado del VIH-1 del Grupo M HXB2R y a la env de gp120 / gp41 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112.

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

La FIGURA 15 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-14PL (ID. SEC. N°: 95), incluyendo una indicación de los restos correspondientes a la *env* de gp120/gp41 del VIH-1 del Grupo M del aislado HXB2Ry a la *env* de gp120/gp41 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112.

La FIGURA 16 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-15CKS (ID. SEC. N°: 97), incluyendo una indicación de los restos correspondientes al CKS / policonector, a la *env* de gp120 /gp41 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM1 12, un conector de cuatro aminoácidos y la segunda copia de la IDR de la gp41 del aislado del HAM 112.

La FIGURA 17 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-15PL (ID. SEC. N°: 120), incluyendo una indicación de los restos correspondientes a la *env* de gp120 / gp41 del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM1 12, un conector de cuatro aminoácidos y la segunda copia de la IDR de la gp41 del aislado del HAM112.

Las FIGURAS 18-23 muestran los resultados obtenidos en inmunoensayos con microesferas recubiertas (descritos en el Ejemplo 14, más adelante) 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 panel 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

En una realización de un polipéptido aislado de la presente descripción, la secuencia de aminoácidos de la proteína de la *env* del VIH-1 del Grupo O del aislado 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, para la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales, en la elaboración de vacunas, o de otra forma.

También se espera que sean útiles las partes o los fragmentos inmunorreactivos de los polipéptidos anteriores. Por "inmunorreactivas" se entienden las partes 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; preferentemente, dichos polipéptidos parciales tendrán una longitud de cinco o más aminoácidos. Debería apreciarse que el término "parte", como se usa en el presente documento, se refiere tanto a secuencias terminalmente truncadas como aquellas acortadas por la eliminación de una secuencia interviniente.

Los polipéptidos y partes anteriores se producirán mejor por expresión de polinucleótidos que codifican 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 espera que se produzcan algunas variaciones en la secuencia entre - y posiblemente incluso dentro de - un aislado determinado del VIH-1 o de cualquier otra unidad filogenética. En consecuencia, los polipéptidos y las construcciones 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 la expresión "consiste esencialmente" engloba polipéptidos variantes cuyas características estructurales y funcionales siguen siendo sustancialmente iguales. Preferentemente, 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, en la materia se conocen bien técnicas para determinar la "similitud" de la secuencia de aminoácidos. 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 propiedades químicas y/o físicas similares tales como la carga o la hidrofobicidad. Después, entre las secuencias polipeptídicas comparadas puede determinarse el denominado "porcentaje de similitud". Las técnicas para determinar la identidad entre secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos también son bien conocidas en la técnica e incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ARNm para ese gen (habitualmente a través de un intermedio de ADNc) y determinar 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 paquete informático Wisconsin Sequence Analysis, 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. En la técnica se conocen otros programas para calcular la identidad o la similitud entre secuencias.

Según otra realización de la descripción, se proporcionan construcciones de antígeno que son adecuadas para su uso en la detección de anticuerpos anti-VIH-1. Según se describe con mayor detalle a continuación, dichas construcciones 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 elaboradas. Consecuentemente, aunque se designan como si comprendieran glucoproteínas (por ejemplo,

"un polipéptido de la gp120"), las construcciones de antígeno de la descripción pretenden incluir aquellas que se expresan en hospedadores bacterianos tales como *E. coli* y que por lo tanto no están glucosiladas.

Debería mencionarse que las construcciones anteriores son fusiones de varias secuencias, es decir, las construcciones se forman mediante la unión de varias secuencias que contienen epítomos, como por ejemplo, mediante coexpresión, ligamiento o síntesis secuencial. También unidos a ellas, y opcionalmente incluidas en las construcciones de la descripción, 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 epítomos 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 restante. 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 fuentes respectivas, y los polipéptidos resultantes pueden contemplarse como "derivados".

En otro aspecto más de la presente descripción, se proporcionan procedimientos de ensayo que utilizan las construcciones de la invención en la detección de anticuerpos anti-VIH-1 en muestras de ensayo. Dichos procedimientos 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, las construcciones de antígeno también pueden modificarse para usarse en dichos ensayos, como por ejemplo mediante marcado, inmovilización sobre una fase sólida o de otro modo, o conjugación con otros reactivos de ensayo.

Se pretende que ciertos términos usados en este documento tengan unos significados especializados. Salvo que se indique de otro modo, los términos indicados a continuación deberán tener los siguientes significados:

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.

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.

"Codificado por" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de un polipéptido. También se incluyen 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", como se reivindica en este documento, pueden tener una similitud de al menos el 60 %, más preferentemente una similitud de al menos aproximadamente el 70 % y muy preferentemente una similitud de al menos aproximadamente el 80 % con una secuencia de polipéptidos o de aminoácidos particular especificada más adelante.

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 toda o con una parte del polipéptido con la que está asociada 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 está necesariamente traducida a partir de una secuencia de ácidos nucleicos designada. También puede generarse de cualquier forma, incluyendo la síntesis química o la expresión de un sistema de expresión recombinante.

"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.

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

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.

5 "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 %, preferentemente menos de aproximadamente un 70 % y más preferentemente, 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.

10 El término "aislado" significa que el material está retirado 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 de algunos o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. 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.

15 "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.

20 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 de replicación autónoma de polinucleótidos dentro de una célula.

25 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.

30 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 procariontes, 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.

35 "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 condiciones compatibles con las secuencias de control.

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

45 El término "inmunológicamente identificable con / como" se refiere a la presencia de epítipo(s) y 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 experto en la materia y también se describen en este documento. La exclusividad de un epítipo también puede determinarse mediante búsquedas informatizadas en bancos de datos conocidos, tales como GenBank, de las secuencias de polinucleótidos que codifican el epítipo y mediante comparaciones de secuencias de aminoácidos con otras proteínas conocidas.

50 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.

55 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.

60 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 determinarse mediante la unión del anticuerpo, más particularmente mediante la cinética de

unión del anticuerpo, y/o mediante la competición en la unión usando como competidor(es) un(os) polipéptido(s) conocido(s) que contiene(n) un epítipo contra el que está dirigido el anticuerpo. En la técnica se conocen procedimientos para determinar si un polipéptido es inmunológicamente reactivo con un anticuerpo.

5 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.

10 El término "muestra de ensayo" se refiere a un componente del organismo 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 ensayo incluyen muestras biológicas que pueden ensayarse mediante los procedimientos 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.

La presente descripción 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 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 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 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 ensayo.

El "reactivo indicador" comprende un "compuesto generador de señal" ("marcador") 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 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 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 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 posterior. 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 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, una microplaca, eritrocitos de oveja (o de otro animal adecuado), Duracytes® y otras configuraciones conocidas por los expertos habituales en la materia.

Se contempla y se incluye en el ámbito de la presente descripción que la fase sólida también comprenda cualquier material poroso adecuado con 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 sin limitación, nitrocelulosa y nailon. Se contempla que dichos soportes sólidos porosos descritos en este documento preferentemente están en forma de láminas con un espesor de aproximadamente 0,01 a 0,5 mm, preferentemente de aproximadamente 0,1 mm. El tamaño de poro puede variaren amplios límites, y preferentemente 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 descripción 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 se incluyen en el ámbito de la presente descripción. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena codificante (sentido) o la cadena no codificante (antisentido). La secuencia codificante que codifica 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 el mismo polipéptido que el ADN proporcionado en este documento.

Este polinucleótido puede incluir solo 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 proproteína, 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 descripción incluye polinucleótidos variantes que contienen modificaciones tales como deleciones, sustituciones o adiciones de polinucleótidos; y cualquier modificación del polipéptido resultante de la secuencia del polinucleótido variante. Un polinucleótido de la presente descripción 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 la misma fase 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 restos 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 descripción 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 descripción 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 descripción 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 restos de aminoácidos está sustituido por un resto de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un resto de aminoácido conservado) y dicho resto 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 restos 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 se incluyen en el ámbito de la presente descripción. Los polipéptidos y los polinucleótidos de la presente descripción se proporcionan preferentemente en una forma aislada y preferentemente purificada.

Por lo tanto, un polipéptido de la presente descripción 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 restos de aminoácidos pueden ser sustituidos, insertados o delecionados sin modificar la actividad biológica o inmunológica puede averiguarse usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el programa informático DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison WI).

Los polipéptidos recombinantes de la presente descripción pueden producirse no sólo como se muestra a continuación, sino también según varios procedimientos alternativos y usando varias células hospedadoras y vectores de expresión. Las células hospedadoras están modificadas genéticamente (transducidas o transformadas o transfectadas) con los vectores de la presente 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 experto habitual en la materia.

Los polinucleótidos de la presente descripción 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 vehiculos 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 vacuna, 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 insertarse en el vector mediante varios procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en sitios apropiados de endonucleasas de restricción mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se considera que dichos procedimientos y otros se incluyen en el alcance de los expertos en la técnica. La secuencia de ADN en el vector de expresión está unida operativamente a una secuencia(s) de control (promotor) de expresión apropiada para dirigir la síntesis del ARNm. Como ejemplos representativos de dichos promotores se incluyen, pero sin limitación, el promotor LTR o SV40, el lac o trp de *E. coli*, el promotor sub L del fago lambda P y otros promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en células procariotas o eucariotas o en 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 preferentemente un gen para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de las células hospedadoras transformadas, tal como dihidrofolato reductasa 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 materia a partir de las enseñanzas proporcionadas en este documento.

Más particularmente, la presente descripción también incluye construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias, como se describió ampliamente en líneas anteriores. Las construcciones 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 realización, la construcción 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 comercio. 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, pMH16a, 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 usando vectores CAT (transferasa de cloranfenicol) o de otros vectores con marcadores de selección. 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, timidina quinasa del herpesvirus simple (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 de la construcción 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).

Las construcciones en 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 producirse sintéticamente mediante sintetizadores peptídicos convencionales.

Las proteínas pueden expresarse en células de mamífero, de levadura, de bacteria o en otras células bajo el control de promotores apropiados. También pueden emplearse sistemas de traducción acelulares para producir dichas proteínas usando los ARN derivados de las construcciones de ADN de la presente descripción. Los vectores de clonación y de expresión apropiados para su uso con hospedadores procariotas y eucariotas se describen en Sambrook col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

La transcripción de un ADN que codifica los polipéptidos de la presente descripción por eucariotas superiores aumenta mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en cis, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Algunos ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (del pb 100 al 270), un potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, un potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores de selección 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 altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural cadena abajo. Dichos promotores pueden derivar de operones que codifican enzimas glucolíticas tales como la 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), el factor alfa, la fosfatasa ácida o proteínas de choque térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en fase apropiada con secuencias de inicio y de terminación de la traducción y preferentemente, 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 una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación N-terminal que imparte características deseadas, por ejemplo, la estabilización o la simplificación de la purificación del producto recombinante expresado.

Vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica 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 de selección fenotípicos 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.

Vectores de expresión útiles para uso bacteriano comprenden un marcador de selección y un origen de replicación bacteriano derivados de plásmidos que comprenden elementos genéticos del muy conocido vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). Otros vectores incluyen, pero sin limitación, PKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI). Estas secciones del "esqueleto" del pBR322 se combinan con un promotor apropiado y con la secuencia estructural que va a expresarse.

Después de la transformación de una cepa hospedadora adecuada y del crecimiento de la cepa hospedadora a una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se desreprime mediante un medio apropiado (por ejemplo, un cambio de temperatura o una inducción química) y las células se cultivan durante un periodo de tiempo adicional. Las células se recogen típicamente por centrifugación, se desestabilizan por medios físicos o químicos y el extracto bruto resultante se guarda para purificación adicional. Las células microbianas que se emplean en la expresión de proteínas pueden desestabilizarse 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 muy conocidos por el experto en la técnica.

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 donadores y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción, secuencias no transcritas flanqueantes 5' y marcadores de selección tales como el gen de la neomicina fosfotransferasa. 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. Como vectores representativos útiles se incluyen pRc/CMV y pADNc3 (disponibles en Invitrogen, San Diego, CA).

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

Los polipéptidos de la presente descripción puede ser productos purificados de forma natural expresados a partir de una línea celular con alta expresión, o un producto de procedimientos sintéticos químicos, o producirse mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador procarionota o eucariota (por ejemplo, mediante el cultivo de células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insecto y de mamífero). Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente descripción 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 resto de aminoácido inicial de metionina.

La presente descripción 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 sin limitación, los presentados en la Patente de Estados Unidos 5.071.972 y en el documento EP 276.846.

Otras variantes incluidas en la presente descripción incluyen aquellas obtenidas mediante la eliminación de secuencias que codifican para restos de cisteína, evitando así la formación de puentes intramoleculares de disulfuro incorrectos que disminuyen la actividad biológica del producto proteico. Las construcciones de la presente descripción también pueden prepararse eliminando el sitio de procesamiento proteolítico, permitiendo su expresión en sistemas que contienen una proteasa problemática, por ejemplo, la proteasa KEX2 en levaduras. Como procedimientos conocidos para la eliminación de dichos sitios de proteasa se incluyen, pero sin limitación, un procedimiento para eliminar los sitios KEX2 presentados en el documento EP 212.914.

La presente descripción 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 sin limitación, puentes de disulfuro entre péptidos, interacciones no covalentes entre péptidos y uniones de polietilenglicol entre péptidos.

La fusión de los péptidos anteriores con conectores peptídicos o con péptidos que son capaces de promover los oligómeros también se incluye en la presente descripción. Dichos péptidos incluyen, pero sin limitación, cremalleras de leucina y a 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 e hijos, Nueva York, NY.

5 Los plásmidos de partida pueden construirse a partir de plásmidos disponibles de acuerdo con procedimientos conocidos publicados. Además, en la técnica se conocen plásmidos equivalentes a los descritos y serán obvios para el experto habitual en la materia.

10 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 usando 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 sin limitación, péptidos quelantes de metales 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 enteroquinasa de Invitrogen (San Diego, CA), entre la secuencia del polipéptido y el dominio de purificación puede ser útil para la recuperación del polipéptido.

20 También se contempla y se incluye en el ámbito de la presente descripción, que los anteriores antígenos recombinantes se usen en diversos formatos de inmunoensayos, que incluyen, pero sin limitación, ensayos directos e indirectos. Los medios para la adaptación de los antígenos a dichos diversos formatos – como por conjugación con marcadores o a macromoléculas, o inmovilización sobre superficies de soporte adecuadas - son muy conocidos y deberían ser familiares para los expertos en la materia.

30 Por ejemplo, pueden utilizarse polipéptidos, incluyendo sus fragmentos, o derivados o análogos de los mismos, de la presente invención, o células que los expresan, para la detección de anticuerpos contra el VIH (también como un inmunógeno para producir anticuerpos). Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos 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.

35 Además, los anticuerpos generados contra un polipéptido correspondiente a una secuencia de la presente descripción pueden obtenerse mediante la inyección directa del polipéptido en un animal o mediante la administración del 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 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 humanos según describen Colé y col., en Monoclonal Antibodies and Cáncer 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 la presente descripción. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.946.778.

40 Dichos anticuerpos pueden utilizarse en diversos formatos de ensayo, que incluyen inmunoensayos de tipo "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 ensayo. 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 anticuerpos, con el que se ha recubierto una fase sólida, con una muestra de ensayo, 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. Después, 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, se pone en contacto con los complejos de antígeno/anticuerpo 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 ensayo 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 ensayo es proporcional a la señal generada.

5 Para formar una mezcla, 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 ensayo y un reactivo indicador que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal o fragmentos de los mismos, que se unen 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. Esta mezcla se incuba durante un tiempo y en 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 ensayo y capturado sobre la fase sólida se determina mediante la detección de la señal medible generada por el compuesto generador de señal. 10 La cantidad de proteínas del polipéptido derivado del VIH presente en la muestra de ensayo es proporcional a la señal generada.

15 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 incuba una muestra de ensayo que se sospecha que tiene 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 condiciones suficientes para que se formen los complejos de antígeno/anticuerpo bien de la muestra de ensayo 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. 20

25 En otro procedimiento de detección más, cada uno de los anticuerpos monoclonales o policlonales puede emplearse 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 citoquímicos en los que estos anticuerpos están marcados directamente (por ejemplo, con fluoresceína, oro coloidal, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.) o están marcados usando anticuerpos secundarios marcados antiespecie (con diversos marcadores según se ilustra en este documento) para rastrear la histopatología de la enfermedad.

30 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.

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

40 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. 45

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 preferentemente de origen mamífero; puede usarse un anticuerpo policlonal anti-polipéptido derivado del VIH humano, de cabra, de ratón o de oveja. Lo más preferentemente, 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. 50 55

Se contempla y se encuentra en el ámbito de la presente descripción, que los polipéptidos derivados del VIH puedan ser detectables en ensayos usando antígenos recombinantes, así como usando péptidos sintéticos o péptidos purificados que contienen secuencias de aminoácidos de polipéptidos derivados del VIH. También se encuentra en el ámbito de la presente invención que puedan usarse diferentes epitopos 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 pueden recubrir una fase sólida, o cada péptido individual puede recubrir fases sólidas individuales, tal como micropartículas, y combinarse después para formar una mezcla de péptidos que puede usarse posteriormente en los ensayos. 60 65 Adicionalmente, se contempla que puedan usarse múltiples péptidos que definen epitopos 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 después competir con los péptidos 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 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, de la siguiente manera. Se pone en contacto simultáneamente una muestra de ensayo 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 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 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 ensayo. 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 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 incuba una muestra de ensayo 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 ensayo 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 para la proteína, que preferentemente 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 ensayo con una fase sólida a la que se ha unido al menos un antígeno procedente de una primera fuente, incubar la fase sólida y la muestra de ensayo 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 ensayo 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 el polipéptido derivado del VIH procedente de una segunda fuente. Por lo tanto, en el ámbito de la presente descripción se incluyen 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 Estados Unidos N° 5.254.458, que goza de propiedad común.

También se contemplan y se incluyen en el ámbito de la presente descripción otras realizaciones que utilizan diversas fases sólidas distintas. Por ejemplo, según la presente descripción pueden emplearse procedimientos de captura de iones 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 solución. 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 porosa cargada positivamente tratada previamente, y se detecta usando diversos 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.

Además, los procedimientos de la presente descripción pueden adaptarse para su uso en sistemas que utilizan la 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 EPO Nos EP 0 425 633 y EP 0 424 634 publicadas, respectivamente.

5 El uso de microscopía de sonda de barrido (SPM) en inmunoensayos también es una tecnología a la que pueden adaptarse fácilmente los anticuerpos monoclonales de la presente descripción. 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 descripción, 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 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 realización, un miembro de un compañero de unión específico (sustancia analito específica, que es el anticuerpo monoclonal de la descripción) se une a una superficie adecuada para el barrido. La unión de la sustancia analito específica puede ser mediante adsorción a una pieza de ensayo que comprende una fase sólida con una superficie de plástico o de metal, siguiendo los procedimientos conocidos por los expertos habituales en la técnica. O puede utilizarse 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 usando técnicas y químicas. El procedimiento de unión preferido 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 bloqueantes para minimizar la unión no específica. La superficie también puede escanearse en el sitio de fabricación o en el punto de uso para verificar su idoneidad para los propósitos del ensayo. No se espera que el proceso de barrido altere las propiedades de unión específicas de la pieza de ensayo.

30 Aunque la presente descripción desvela la preferencia del uso de fases sólidas, se contempla que los reactivos tales como anticuerpos, proteínas y péptidos de la presente descripción 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 incluidos en el ámbito de la presente descripción.

35 La presente descripción se comprenderá mejor en relación con los siguientes ejemplos. Los ejemplos ilustran la invención en la medida en que se relacionan con el antígeno recombinante pVIH210 (VIH-2 ID SEC N°:55).

#### Ejemplo 1

##### Procedimientos de clonación

40 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, se adquirieron en Perkin-Elmer Corporation (Foster City, CA) y usados según las especificaciones del fabricante, salvo que se indique de otro modo. Las amplificaciones por 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.

50 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 H<sub>2</sub>O o en TE [ácido etilendiaminetetraacético 1 mM (EDTA; pH 8,0; BRL Life Technologies), clorhidrato de tris(hidroximetil) aminometano 10 mM (Tris-HCl, pH 8,0; BRL Life Technologies)]. Los ligamientos se realizaron usando un kit de ligamiento de ADN de Stratagene (Stratagene Cloning Systems La Jolla, CA) según las recomendaciones del fabricante. Los ligamientos se incubaron a 16 °C durante una noche.

60 Las transformaciones bacterianas se realizaron usando 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 a una concentración final de 20 mM, como se indica. Todas las incubaciones bacterianas (placas y cultivos de una noche) se realizaron durante una noche (~ 16 horas) a 37 °C.

65 La exploración de transformantes para la identificación de clones deseados se realizó mediante la secuenciación de

ADN miniprep y/o mediante 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 la exploración 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 H<sub>2</sub>O estéril. Un tercio del volumen se transfirió a una segunda placa y se conservó a 4 °C. La placa original de 96 pocillos se calentó en el microondas durante 5 minutos para desestabilizar las células. Después, 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 11 µl de tampón de PCR 10X, 1 µl de dNTPs 2mM, 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 H<sub>2</sub>O 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 del ciclado, aproximadamente 1/3 del volumen de la reacción se cargó 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 se procesaron en columnas Centri-Sep (Princeton Separations, Adelphia, N. J.) antes de cargarse en el secuenciador. Los datos de la secuenciación se analizaron usando Sequencher 3.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) y GeneWorks 2.45 (Oxford Molecular Group, Inc., Campbell, CA).

## Ejemplo 2

25

### Determinación de la secuencia de la *env* del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112

Se extrajo ARN vírico de sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de sangre periférica humana infectadas con el aislado del VIH-1 del Grupo O denominado HAM112 (H. Hampf y col., Infection 23: 369 - 370) usando un kit QIAamp Blood (Qiagen) y el procedimiento recomendado por el fabricante. El ARN se eluyó en un volumen de 50 µl de agua sin nucleasa (5Prime-3Prime, Inc., Boulder, CO) y se conservó 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 y GeneAmp PCR (Perkin Elmer) según detalla el fabricante. Las posiciones de los cebadores oligonucleotídicos se corresponden con la secuencia de la *env* del VIH-1 ANT70 (G. Myers y col., eds., citado anteriormente). 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 usando 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 a 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 a 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. En la FIGURA 1 se presenta la secuencia de aminoácidos deducida de la *env* del VIH-1 del Grupo O del aislado HAM112 (ID. SEC. N°: 61).

## 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 construcciones génicas sintéticas de las gp120 / gp41 del VIH-1 del Grupo O. Las secuencias de las gp120 /gp41 de la *env* se basaron en el aislado 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 codificaban los 45 aminoácidos C-terminales de la gp120 de la *env* y los 327 aminoácidos de la gp41 de la *env* (el nucleótido N°1 es la primera base del primer codón de la gp120 en el gen sintético). El gen sintético tiene una deleción de 26 aminoácidos (los nucleótidos 643 a 720), con respecto a la gp41 de la HAM112 natural, que engloba una región altamente hidrófoba (H) (región transmembrana) de la gp41. Por lo tanto, la longitud completa del gen sintético de la gp41 tiene 327 aminoácidos.

En los oligonucleótidos sintéticos, los codones del VIH-1 natural se alteraron 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 mVling 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 cadena complementaria.

Después, los fragmentos se amplificaron por PCR. Este proceso ("tejido" de oligonucleótidos mediante PCR) 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 Estados Unidos 08/314.570. El pKRR826 es un derivado de un elevado número de copias de pBR322 que contiene el gen del represor cl sensible a la temperatura (Benard y col., *Gene* 5: 59). Sin embargo, el pKRR826 carece del terminador de la traducción *rmBtI* 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' se diseñó 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 se expresaron 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 Estados Unidos 572.822) se realizó con un cebador de PCR oligonucleotídico en sentido externo 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-03' (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) de la siguiente manera:

(1) Reacción 1B: polimerasa de ADN AmpliTaq (2,5 U) y 1X de tampón, junto con 40 (JV1 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 MgCl<sub>2</sub> 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 MgCl<sub>2</sub> 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 a 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 1B, 2A y 3B derivados de la PCR 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 MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 40

5  $\mu$ M 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  $\mu$ l) con 49 pmol de Osyn-5' (ID. SEC. N°: 11), 50 pmol de Osyn-P3' (ID. SEC. N°: 16) y 5  $\mu$ l 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.

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

15 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 del ligamiento se usó para transformar células competentes DH5 $\alpha$ . El clon deseado se identificó mediante PCR de colonias usando oligonucleótidos pKRREcoRI directo (ID. SEC. N°: 38) y pKRRBamHI 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 oligonucleotídicos pKRREcoRI directo (ID. SEC. N°: 38), pKRRBamHI inverso (ID. SEC. N°: 39), 41sy-1 (ID. SEC. N°: 44) y 41sy-2 (ID. SEC. N°:41).

#### 20 D. Modificación del clon candidato pGO-8 A2.

25 Se preparó un volumen de reacción de PCR de 100  $\mu$ l con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón, junto con MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 40  $\mu$ M de cada dNTP, 50 pmol de oligonucleótidos Osyn-5'-repair (ID. SEC. N°: 24), 50 pmol de Osyn-P3' (ID. SEC. N°: 16) y ~ 1 ng de 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 a 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 del ligamiento se usó para transformar células competentes DH5 $\alpha$ . El clon deseado fue identificado mediante PCR de colonias usando oligonucleótidos pKRREcoRI directo (ID. SEC. N°: 38) y pKRRBamHI 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 pKRREcoRI directo (ID. SEC. N°: 38), pKRRBamHI inverso (ID. SEC. N°: 39), 41sy-1 (ID. SEC. N°: 44) y 41 sy-2 (ID. SEC. N°: 41). Basándose en los resultados de secuenciación, el clon candidato N°6 de pGO-8 se denominó pGO-8PL/DHS $\alpha$ . 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, aislado HAM 112) y 169 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, aislado HAM112).

#### 35 E. Construcción del pGO-8CKS/XL1.

45 El pGO-8CKS/XL1 (la ID. SEC. N°: 59 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante) codifica 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, aislado HAM112) y 169 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, aislado HAM112). La construcción del pGO-8CKS/XL1 se realizó de la siguiente manera.

50 Se preparó una reacción de PCR (volumen de 100  $\mu$ l) con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 40  $\mu$ M 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 N°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. Después, 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'. Con el ligamiento se transformaron células supercompetentes XL1-Blue 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  $\mu$ g/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. Como cebadores de secuenciación se usaron los siguientes oligonucleótidos: 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).

#### 65 F. Construcción del pGO-9PL/DH5 $\alpha$ .

Las FIGURAS 3A a 3D muestran una representación diagramática de las etapas implicadas en la construcción de pGO-9PL/DH5 $\alpha$ . El pGO-9PL/DH5 $\alpha$  codifica la proteína recombinante pGO-9PL. La ID. SEC. N $^{\circ}$ : 47 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante de pGO-9PL/DH5 $\alpha$ . La FIGURA 7 ilustra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-9PL (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 48). Esta proteína consiste en una metionina N-terminal, 45 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, aislado HAM112) y 199 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, aislado HAM 112). La construcción de pGO-9PL/DH5 $\alpha$  se realizó de la siguiente manera:

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

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

25 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 del ligamiento se usó después para transformar células competentes DH5 $\alpha$ . 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: pKRRcoRI directo (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 38), pKRRBamHI inverso (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 39), 41sy-1C (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 40), 41sy-2 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 41), 41sy-3 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 42) y 41 sy-4 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 23). Después el clon N $^{\circ}$ 3 de pGO-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 conservó a -80  $^{\circ}$ C. La secuencia se confirmó mediante usando los cebadores indicados anteriormente en este documento y este clon se denominó pGO-9PL/DH5 $\alpha$  (la ID. SEC. N $^{\circ}$ : 47 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante, y la ID. SEC. N $^{\circ}$ : 48 presenta la secuencia de aminoácidos de la región codificante). El pGO-9PL/DH5 $\alpha$  se sembró de nuevo por estrías, se hizo crecer en un cultivo de una noche, y se preparó un ADN miniprep (este prep se denominó H5).

#### G. Construcción del pGO-9CKS/XL1

40 Las FIGURAS 3A a 3D muestran una representación diagramática de las etapas implicadas en la construcción del pGO-9CKS/YL1. El pGO-9CKS/XL1 codifica la proteína recombinante pGO-9CKS. La FIGURA 8 presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante pGO-9CKS (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 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, aislado HAM 112) y 199 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, aislado HAM 112). La construcción del pGO-9CKS/XL1 se realizó de la siguiente manera

45 Se prepararon dos reacciones de PCR (volumen de 100  $\mu$ l) con polimerasa de ADN UITma (3U) y 1X de tampón junto con MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 40  $\mu$ M de cada dNTP, 50 pmol de Osyn-5'CKS (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 25), 50 pmol de Osyn-03' (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 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  $^{\circ}$ C durante 120 segundos, después se amplificó con 24 ciclos de 94  $^{\circ}$ C durante 30 segundos, 55  $^{\circ}$ C durante 30 segundos, 72  $^{\circ}$ C durante 120 segundos, seguido de una incubación a 72  $^{\circ}$ 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 el ligamiento 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. Se usaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores de secuenciación: CKS-1 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 30), CKS-2 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 31), CKS-3 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 32), CKS-4 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 33), 43461 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 2), 43285 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 1), 41sy-1B (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 29), 41sy-2B (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 34), 41sy-3B (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 35), CKS176.1 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 19), CKS3583 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 20) y pTB-S8 (ID. SEC. N $^{\circ}$ : 28). El clon candidato 4 pGO-9CKS se denominó pGO-9CKS/XL1 (la ID. SEC. N $^{\circ}$ : 49 presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante, y la ID. SEC. N $^{\circ}$ : 50 presenta la secuencia de aminoácidos de la región codificante).

65

H. Construcción del fragmento Osyn I-M.

El fragmento Osyn-O-M se construyó de la siguiente manera. Se preparó una reacción de PCR de 100 µl usando 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, denominado 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 del ligamiento resultante se usó para transformar células competentes DH5α. Se generó un plásmido de ADN miniprep a partir de un cultivo de una noche del clon IIV1-6 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 de la siguiente manera.

Etapa 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.

Etapa 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 MgCl<sub>2</sub>, 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 a 4F muestran una representación diagramática de las etapas implicadas en la construcción del pGO-11PL/DH5α. El pGO-11 PL/DH5α codifica 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, aislado HAM 112) y 327 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, aislado HAM 112). El pGO-11PL/DH5α se construyó de la siguiente manera.

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 de ternero (CIA, Calf Intestinal Alkaline) (BRL Life Technologies) durante 15 minutos a 37 °C, se extrajo con fenol / cloroformo y se precipitó con NaOAc y EtOH. Posteriormente el vector (pGO-9PL) se aisló en gel. El digerido pGO-9PL y el producto digerido de la PCR se ligaron y el producto del ligamiento se usó para transformar células competentes DH5α. Las colonias se sembraron de nuevo por estrías para su aislamiento. Después se identificó el clon pG011-4 y se sembró de nuevo por estrías para su aislamiento. Se preparó un cultivo de una noche de pG011-4 para generar reservas congeladas y ejecutar el ADN miniprep para la secuenciación. El clon pG011-4 se secuenció con los siguientes cebadores oligonucleotídicos: pKRREcoRI directo (ID. SEC. N°: 38), pKRRBamHI inverso (ID. SEC. N°: 39), 41 sy-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), 41 sy-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 denominó 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 a 4G muestran una representación diagramática de las etapas implicadas en la construcción de pGO-11CKS/XL1. El pGO-11CKS/XL1 codifica 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,

aislado HAM 112) y 327 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, aislado HAM 112). El pGO-11CKS/XL1 se construyó de la siguiente manera.

Se preparó una reacción de PCR (volumen de 100  $\mu$ l) con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 40  $\mu$ 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 pG011-4 (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 pJ0200 con Eco R1 + Bam H1. El vector digerido pJ0200 se aisló en gel. Se prepararon ligamientos de una noche (16 °C) con el producto digerido de la PCR. Se transformaron células supercompetentes XL1-Blue con el ligamiento 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 ng/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) como el ADN miniprep para la secuenciación. Como cebadores se usaron los siguientes oligonucleótidos 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 denominó 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* (N°432 - 491; aislado D194.10 del VIH-2) y 159 aminoácidos de la gp36 de la *env* (N°492 - 650; aislado D194.10 del VIH-2). La construcción del pH1V210/XL1-Blue se realizó de la siguiente manera.

Se clonó el ADN genómico del aislado del VIH-2 D194.10 [H. Kuhnel y col., Nucliec Acids Research 18: 6142 (1990)] en el vector de clonación EMBL3 lambda. Véase H. Kuhnel y col., Proc. Nat'l. Acad. Sci. Estados Unidos 86: 2383 - 2387 (1989) y H. Kuhnel y col., Nucleic Acids Research 18: 6142 (1990). El clon lambda que contenía D194.10 (lambda A10) se obtuvo en Diagen Corporation (Düsseldorf, Alemania). Se preparó una reacción de PCR (volumen de 100  $\mu$ l) usando polimerasa de ADN AmpliTaq (3,75 unidades), 200  $\mu$ M de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 0,5  $\mu$ g del cebador 3634 (ID. SEC. N°: 88; hibridación en las posiciones 7437 - 7455 en el aislado D194.10 del VIH-2 (número de acceso de EMBL X52223), 0,5  $\mu$ g del cebador 3636 (ID. SEC. N°: 89, hibridación en las posiciones 8095 - 8077), 1X de tampón de PCR y 5  $\mu$ 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 pJ0200 digerido con Eco R1 + Bam H1 usando 800 unidades de ligasa T4 de ADN (New England BioLabs). Se transformaron células supercompetentes XL1-Blue (Stratagene) con 2  $\mu$ l del ligamiento, 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  $\mu$ 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 conservaron a -70 °C. Se preparó ADN miniprep a partir de los cultivos de una noche usando el 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 % (GTBCO BRL Gel-Mix 6) usando el aparato de gel IBI según recomienda el fabricante. Basándose en los resultados de las secuencias, el clon gel N°7 de pVIH-210 se denominó 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 la construcción 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 caldo Excell

Terrific (disponible en Sigma Chemical Corp., St. Louis Mo.) complementado con 100 µg/ml de ampicilina sódica y colocado en una incubadora orbital en agitación a 32 °C o a 37 °C. Se transfirieron inóculos de cien mililitros (100 µl) desde los cultivos de siembra a los matraces que contenían 1 litro de caldo 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 construcciones 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 por centrifugación y se recogieron siguiendo procedimientos estándar. Las células sedimentadas se conservaron a -70 °C hasta su procesamiento adicional.

#### Ejemplo 6

##### Aislamiento y solubilización del antígeno recombinante qp41 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, Tritón X-100® al 5 % (v/v), PMSF 1 mM y pepstatina A 1 µM. A los homogeneizados se añadió lisozima 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 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 después de las proteínas solubilizadas mediante centrifugación. Los cuerpos de inclusión sedimentados se solubilizaron completamente en HCl-guanidina 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 conservaron a -20 °C hasta su purificación mediante cromatografía.

#### Ejemplo 7

##### Purificación del antígeno recombinante qp41 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, de la siguiente manera. 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 contenían 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 contenían el antígeno recombinante se agruparon, se pasaron a través de un filtro de 0,2 µm y se conservaron a -70° C.

#### Ejemplo 8

##### Preparación del antígeno del VIH-1 del Grupo M

Las células que contenían 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 se procesaron esencialmente según se describe en el Ejemplo 5 de la patente de Estados Unidos N° 5.124.255. El material sedimentado se solubilizó posteriormente 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 usaron con un tampón que contenía fosfato, MgCl<sub>2</sub>, Na EDTA, Tritón X-100® a pH 7,4 complementado con benzonasa, lisozima y PMSF. Los cuerpos de inclusión se separaron de las proteínas solubles por centrifugación. El sedimento se lavó secuencialmente con: H<sub>2</sub>O destilada; Tritón 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

5 A. Preparación del reactivo

1. Se preparó una suspensión de selenio (Se) coloidal sustancialmente de la siguiente manera: se disolvió SeO<sub>2</sub> en agua a una concentración de 0,0625 gm/ml. Después se disolvió ascorbato en agua a una concentración de 0,32 gm/ml y se calentó en un baño de agua a 70 °C durante 24 horas. Después la disolución de ascorbato se diluyó a 0,0065 gm/ml en agua. La solución de SeO<sub>2</sub> se añadió rápidamente a la solución 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 a 2 - 8 °C, después se conservó. La suspensión coloidal de selenio está disponible en Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois (Code 25001).

15 2. Se prepararon conjugados de selenio coloidal / anticuerpo de la siguiente manera. La suspensión de selenio coloidal se concentró hasta una absorbancia de 25 (DO 500 - 570) en agua destilada. Después, se añadió MOPS 1 M a 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 humana) a una concentración de 0,75 mg/ml con tampón fosfato 50 mM, y la preparación de anticuerpo resultante se añadió después con mezcla a la suspensión coloidal de selenio preparada como se describió anteriormente en este documento, a una concentración final de anticuerpo de 75 µg/ml. La agitación continuó durante 40 minutos. Después, a la solución se añadió albúmina de suero bovina (BSA) al 1 % (en peso) y la solución del conjugado de selenio coloidal / anticuerpo se agitó durante 15 minutos más 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 Tritón X-405® y Tris 50 mM, pH 8,2).

25 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.

30 4. El reactivo de control negativo usado era el humano normal utilizado en un dispositivo de ensayo individual como control negativo del ensayo.

35 B. Preparación de la almohadilla de aplicación.

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

40 C. Preparación del material cromatográfico.

Todos los reactivos se aplicaron a una membrana de nitrocelulosa por carga y deflexión por inyección del reactivo. La nitrocelulosa se sujeta con una membrana MYLAR® que está recubierta con un adhesivo sensible a presión.

45 Los reactivos de captura de la muestra de ensayo se prepararon mediante (a) la dilución del antígeno específico preparado según se describió anteriormente en este documento a 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.

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

Se realizó un ensayo rápido para detectar la presencia de anticuerpos contra el VIH en muestras de ensayo de suero, sangre completa, saliva y orina, de la siguiente manera. 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 contenía Tris 50 mM, BSA al 1 % (p/v), Tritón 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 aplicó puntualmente 1 µl de suero o de sangre completa directamente en el pocillo de muestra del dispositivo de ensayo y se añadieron 4 gotas de SEB. Cuando se ensayaba la saliva, se

añadieron 50 o 75  $\mu\text{l}$  de saliva a 50  $\mu\text{l}$  o a 25  $\mu\text{l}$  de SEB, respectivamente, en un pocillo de una placa de microtitulación, y después la tira de ensayo de nitrocelulosa se añadió al pocillo. Cuando se ensayaba la orina, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de orina a 50  $\mu\text{l}$  de SEB en un pocillo de una placa de microtitulación, y la tira de ensayo de nitrocelulosa se añadió al pocillo. Alternativamente, se usaron 100  $\mu\text{l}$  de orina en el pocillo de una placa de microtitulación y se añadió la tira de ensayo de nitrocelulosa, sin el uso de SEB.

La IgG de la muestra se unió por el coloide de selenio- anti-IgG humana de cabra en la almohadilla conjugada, y los complejos se cromatografiaron 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 usando una máquina biodot, que proporcionaba una dispensación por desplazamiento positivo usando tamaños de gota precisos. El dispositivo de ensayo se incubó después a temperatura ambiente durante dos minutos y los resultados se leyeron visualmente.

#### 15 E. Ensayo de sangre completa adicionada.

En un tubo de Eppendorf de 1,5 ml se añadieron el equivalente de 1  $\mu\text{l}$  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 ensayo para el VIH-1 del Grupo O, el VIH-1 del Grupo M o el VIH-2, a 5  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  de SEB y se mezclaron. Esta mezcla se aplicó al pocillo de muestra del dispositivo de ensayo de la invención.

La IgG de la muestra se unió por el coloide de selenio- anti-IgG humana de cabra de la almohadilla conjugada, y los complejos se cromatografiaron 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 usando una máquina biodot, que proporcionaba una dispensación por desplazamiento positivo usando tamaños de gota precisos. El dispositivo de ensayo se incubó después a temperatura ambiente durante dos minutos y los resultados se leyeron visualmente.

#### 30 F. Resultados.

Si en la muestra de ensayo 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 ensayo 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 ensayo 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.

(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 ensayo 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 ensayo de saliva de los pacientes 4068 y 4475 también fueron reactivas con el antígeno 1, mientras que la muestra de ensayo de saliva del paciente 0109 no fue reactiva en el dispositivo de ensayo de la invención. La muestra de ensayo 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.

(ii) *Ensayo de muestras negativas para anticuerpos contra el VIH.* Se ensayaron dos sueros negativos y dos muestras de ensayo 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 ensayo 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 ensayo estaba presente en cada dispositivo de ensayo, según lo indicaba una barra de reacción positiva zona de reactividad de la muestra de ensayo.

(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 usando 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 ensayo 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.

(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 ensayo de sangre completa adicionadas con sueros del VIH-1 del Grupo O usando 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).

(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 ensayo 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.

(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 ensayo positiva para el VIH-1 del Grupo M, una muestra de ensayo positiva para el VIH-1 del Grupo O, una muestra de ensayo 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 ensayo positiva para el VIH-1 del Grupo M sólo era reactiva con el antígeno del VIH-1 del Grupo M; la muestra de ensayo positiva para el VIH-1 del Grupo O sólo era reactiva con el antígeno del VIH-1 del Grupo O; y la muestra de ensayo 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 ensayo del VIH-1 del Grupo M y las dos del VIH-1 del Grupo O usadas se confirmaron como muestras seropositivas que previamente se habían ensayado usando un inmunoensayo enzimático disponible en el comercio (Abbott #3A77) y que se habían amplificado por PCR, secuenciado y subtipado basándose en un análisis filogenético. Las cinco muestras usadas del VIH-2 eran seropositivas usando el mismo EIA y se confirmaron como muestras positivas para el VIH-2 usando un ensayo de inmunotransferencia Western para el VIH-2 (Sanofi).

## Ejemplo 11

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

#### A. Modificación del pTB319

El plásmido pTB319 (Patente de Estados Unidos N° 5.124.255) codifica una proteína recombinante gp41 troncada 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 construcciones génicas híbridas del VIH-1 Grupo M y del Grupo O se usó 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. N°: 98) y pTB319+T (ID. SEC. N°: 99) se hibridaron y se ligaron en el pTB319 digerido con Rsr II y Bst XI. El producto del ligamiento 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 usando las combinaciones de cebadores pTB-S4 (ID. SEC. N°: 100) / pTB-S7 (ID. SEC. N°: 101) y pTB-S4 (ID. DE SECUENCIA N°: 100)/63168 (ID. SEC. N°: 121). Se establecieron cultivos de una noche para los clones candidatos en caldo LB complementado con glucosa 3 mM y 200 µg/ml de ampicilina para la preparación de ADN miniprep. Se secuenció toda la región codificante usando los cebadores oligonucleotídicos: 43461 (ID. SEC. N°: 2), 43285 (ID. SEC. N°: 1), CKS-1 (ID. SEC. N°: 30), CKS-3 (ID. SEC. N°: 32), 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), pTB-S6 (ID. SEC. N°: 106), pTB-S7 (ID. SEC. N°: 101) y pTB-S8 (ID. SEC. N°: 28). Basándose en los resultados de la secuenciación, el clon pTB319+A-N°31 (pGMcks-1) tiene la secuencia de la región codificante deseada. Este clon se denominó posteriormente pGM-1CKS/XL1 (la ID. SEC. N°: 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. N°: 108).

#### B. Construcción del pGO-12CKS/XL1

El pGO-12CKS/XL1 codifica la proteína recombinante pGO-12CKS, cuya secuencia de aminoácidos (ID. SEC. N°: 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, aislado HXB2R), 200 aminoácidos de la gp41 de la env (H1V-1 Grupo M, aislado HXB2R), 45 aminoácidos de la gp120 de la env (VIH-1 del Grupo O, aislado HAM 112) y

199 aminoácidos de la gp41 de la env (VIH-1 del Grupo O, aislado HAM 112). El pGO-12CKS/XL1 se construyó de la siguiente manera:

5 Se estableció una reacción de PCR (volumen de 100  $\mu$ l) con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con  $MgCl_2$  1,5 mM, 40  $\mu$ 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/0-57pGO-9/Kpn se aisló en gel. El producto de la PCR pTB/0-57pGO-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 de ternero (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. Con el producto del ligamiento se transformaron células supercompetentes XL1-Blue 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  $\mu$ g/ml de carbenicilina + glucosa 20 mM) del clon pGO-12CKS N°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 N°1 se denominó 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).

#### G. Construcción del pGO-13CKS/XL1

30 El pGO-13CKS/XL1 codifica 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, aislado HXB2R), 200 aminoácidos de la gp41 de la env (VIH-1 del Grupo M, aislado HXB2R), 45 aminoácidos de la gp120 de la env (VIH-1 del Grupo O, aislado HAM 112) y 169 aminoácidos de la gp41 de la env (VIH-1 del Grupo O, aislado HAM 112). El pGO-13CKS/XL1 se construyó de la siguiente manera:

40 Se estableció una reacción de PCR (volumen de 100  $\mu$ l) con polimerasa de ADN UITma (3 U) y 1X de tampón junto con  $MgCl_2$  1,5 M, 40  $\mu$ 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/0-5'/pGO-8/Kpn se aisló en gel. El producto de la PCR pTB/0-5'/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 del ligamiento 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  $\mu$ g/ml de carbenicilina + glucosa 20 mM) del clon pGO-13CKS N°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 N°1 se denominó 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 $\alpha$

65 El pGO-14PL/DH5 $\alpha$  codifica 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, aislado HAM 112), 200 aminoácidos de la gp41 de la env (VIH-1 del Grupo O,

aislado HAM 112) fusionados con 42 aminoácidos de la gp120 de la *env* (VIH-1 del Grupo M, aislado HXB2R) y 200 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo M, aislado HXB2R). El pGO-14PL/DH5α se construyó de la siguiente manera:

5 Se estableció una reacción de PCR (volumen de 100 μl) con polimerasa de ADN UITma (3U) y 1X de tampón junto con MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 40 μM 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-N°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 I 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 DH5α con el producto del ligamiento y se colocaron en placas en LB + ampicilina (150 μg/ml). Las colonias se analizaron para comprobar la presencia del inserto adecuado mediante PCR de colonias usando 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 se sembraron de nuevo por estrías para su aislamiento en el mismo tipo de placas. Se establecieron cultivos de una noche (medio LB + 100 μg/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. Como cebadores se usaron los siguientes oligonucleótidos 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), pKRREcoRI 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 N°11 se denominó pGO-14PL/DH5α. (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).

### 30 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

#### 35 A. Construcción del pGO-15CKS/XL1

El pGO-15CKS/XL1 codifica 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, aislado HAM 112), 199 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH- Grupo O, aislado 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, aislado HAM 112). El pGO-15CKS/XL1 se construyó de la siguiente manera:

45 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 HI, se extrajo con fenol / cloroformo y se precipitó con etanol. Los oligonucleótidos sintéticos synIDRN°2-A (ID. SEC. N°: 117) y synIDRN°2-B (ID. SEC. N°: 118) se trataron con quinasa de polinucleótido quinasa (Boehringer Mannheim Biochemicals) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Los oligonucleótidos tratados con quinasa se hibridaron y el dúplex se ligó al vector digerido (Age I + Bam H1) pGO-11CKS. Con el producto del ligamiento se transformaron células supercompetentes XL1-Blue y las células se colocaron en placas en LB complementadas con 150 μg/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 μg/ml de ampicilina. Se establecieron cultivos de una noche de los clones candidatos en medio 2X LB (Life Technologies, Inc.) complementado con 100 μg/ml de carbenicilina y glucosa 20 mM (Sigma Chemical Co.). Se preparó ADN miniprep a partir de los cultivos de una noche usando 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. Como cebadores se usaron los siguientes oligonucleótidos 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 denominó 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).

65

B. Construcción del pGO-15PL/DH5 $\alpha$ .

El pGO-15PL/DH5 $\alpha$  codifica 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, aislado HAM 112), 199 aminoácidos de la gp41 de la *env* (VIH-1 del Grupo O, aislado 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, aislado HAM 112). El pGO-15PL/DH5 $\alpha$  se construyó de la siguiente manera:

Se estableció una reacción de PCR (volumen de 100  $\mu$ l) con polimerasa de ADN AmpliTaq (2,5 U) y 1X de tampón junto con 40  $\mu$ 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 usando 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). Con el producto del ligamiento se transformaron células competentes DH5 $\alpha$  y se colocaron en placas en LB complementadas con 150  $\mu$ g/ml de ampicilina. Los clones candidatos se identificaron 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 N°4 se sembró de nuevo por estrías para su aislamiento. Se estableció un cultivo del clon N°4 en medio 2X LB (Life Technologies) complementado con 100  $\mu$ 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 usando un kit de aislamiento de ADN Promega 373 (Promega Corp.) según detalla el fabricante. Se establecieron reservas congeladas sedimentando 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. Como cebadores se usaron los siguientes oligonucleótidos 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 N°4 se denominó pGO-15PL/DH5 $\alpha$ . (La ID. SEC. N°: presenta la secuencia de nucleótidos de la región codificante y la ID. SEC. N°: 120 presenta la secuencia de aminoácidos codificada).

Ejemplo 13Preparación 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 antígenos anteriores se prepararon haciendo crecer e induciendo cepas de *E. coli* que contenían las construcciones de antígenos recombinantes respectivas 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 Tritón X-100® (v/v), PMSF 1 mM y pepstatina A 1  $\mu$ 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 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. El antígeno(o antígenos) recombinante solubilizado se aclaró por centrifugación, se hizo pasar a través de un filtro de 0,2  $\mu$ m. El (los) antígeno(s) solubilizado(s) de la gp41 se precipitaron de la disolución de guanidina-HCl 7 M mediante una dilución con agua (1:7) a una concentración final de guanidina-HCl de 1 M. Después de una 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.

A continuación, los antígenos recombinantes de la gp41 del VIH-1 del Grupo O solubilizados se purificaron de la siguiente manera: en primer lugar, los antígenos recombinantes se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico usando columnas Q-Sepharose (Pharmacia) o S-Sepharose (Pharmacia). Las soluciones 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 se eluían de 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 por 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  $\mu$ m y se conservaron 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 accederá 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  $\mu$ g/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 Tritón 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 conservaron 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 usando el 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 300  $\mu$ l de una solución de sustrato, (1,28 mg/ml de o-fenilendiamina • HCl en tampón de citrato - fosfato que contenía peróxido de hidrógeno al 0,02 %) se añadieron a cada pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para detener la reacción se añadió 1 ml de ácido sulfúrico 1 N y se procedió a realizar la lectura de las bandejas 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 ensayos anteriores, mostrados en la Figuras 18 - 23, demuestran las mejoras en cuanto a sensibilidad y selectividad disponibles usando los antígenos recombinantes.

Las microesferas recubiertas con el 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 solo 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.

## 5 Ejemplo 15

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

### 10 A. Ensayos

Con objeto de evaluar en inmunoensayos el rendimiento de las construcciones 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). Las construcciones se ensayaron usando 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.

Para el Ensayo 1, se incorporó pGO-11CKS purificado en un ensayo basado en microesferas disponible en el comercio y recubriendo con la construcción 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 del conjugado pGO-9CKS unido y no unido, se añadió el sustrato y el ensayo se completó según se indica en el Ejemplo 14.

Para el Ensayo 2, se incorporó pGO-11CKS purificado en un segundo ensayo disponible en el comercio recubriendo las micropartículas con la construcción 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 posteriormente 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.

Para el Ensayo 3, se incorporó pGO-11CKS purificado en un tercer ensayo disponible en el comercio recubriendo las micropartículas con la construcción 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.

Para el Ensayo 4, se incorporó pGO-11CKS purificado en un ensayo de desarrollo recubriendo micropartículas magnéticas con la construcción 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 posteriormente se hicieron reaccionar con pGO-9CKS conjugado con acridinio.

### B. Resultados

En las siguientes Tablas 1 y 2 se muestran los resultados de los ensayos anteriores, en las que los datos se presentan como proporciones entre señal / corte (S/CO). El Formato 1 se refiere al ensayo convencional sin las construcciones de antígeno de la presente descripción, mientras que el Formato 2 se refiere al ensayo complementado con las construcciones del VIH-1 del Grupo O.

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 usando el Formato 1, mientras que se obtuvo una S/CO similar (7,22) a una dilución 160 veces mayor (1:1.600) usando el Formato 2. Esta tendencia se mantuvo en todas las plataformas de ensayo ensayadas. La utilidad de los recombinantes del grupo O fue particularmente obvia 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, con la adición de las construcciones 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 por tanto 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 inmunoensayos de formato directo anteriores.

ES 2 485 292 T3

Tabla 1

		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	12,41	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	NE	NE	0,37	3,33	NE	NE
	1:10.000	0,05	1,55	NE	NE	0,38	1,69	NE	NE
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	NE	NE	0,74	8,16	NE	NE
	1:10.000	0,12	1,68	NE	NE	0,48	4,56	NE	NE
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	1,11	NE	NE	0,39	0,97	NE	NE
	1:10.000	0,15	0,45	NE	NE	0,37	0,70	NE	NE

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

ES 2 485 292 T3

	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	NE	NE	0,53	6,52	NE	NE
	1:10.000	0,17	1,39	NE	NE	0,43	3,58	NE	NE
ESPI	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
	1:600	0,20	8,35	0,52	1,76	0,46	5,66	0,56	1,06
	1:5.000	0,08	3,31	NE	NE	0,57	2,36	NE	NE
	1:1.000	0,09	2,05	NE	NE	0,37	1,34	NE	NE
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	NE	NE	0,94	2,49	NE	NE
	1:10.000	0,26	1,00	NE	NE	0,59	1,58	NE	NE

La presente descripción se refiere a:

- 5 1. Una construcción 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. Una construcción de antígeno según el Punto 1 en la que el primer polipéptido es un polipéptido de la gp120 y el segundo polipéptido es un polipéptido de la gp41.
3. Una construcción de antígeno según el Punto 2 en la que una parte de la región hidrófoba del polipéptido de la gp41 se ha deletado.
- 10 4. Una construcción de antígeno según cualquiera de los Puntos 1, 2 y 3 en la que al menos uno del primer y el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O *env* deriva del aislado HAM 112 del VIH-1 del Grupo O.
5. Una construcción de antígeno según el Punto 1 en la que el primer polipéptido comprende una parte inmunorreactiva de la proteína gp120 del aislado HAM 112 del VIH-1 del Grupo O.
- 15 6. Una construcción de antígeno según el Punto 5 en la que el primer polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 1 a 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una parte de la misma.
7. Una construcción de antígeno según el Punto 6 en la que el primer polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 476 a 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°:61).
- 20 8. Una construcción de antígeno según cualquiera de los Puntos 1, 5, 6 y 9 en la que el segundo polipéptido comprende una parte inmunorreactiva de la proteína gp41 del aislado HAM 112 del VIH-1 del Grupo O.
9. Una construcción de antígeno según el Punto 8 en la que el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 521 a 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una parte de la misma.
- 25 10. Una construcción de antígeno según el Punto 8 en la que una parte de la región hidrófoba de la proteína

gp41 del aislado HAM 112 del VIH-1 del Grupo O está ausente en el segundo polipéptido.

11. Una construcción de antígeno según el Punto 8 en la que la parte delecionada es aquella parte de la gp41 que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 690 a 715 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°:61).

12. Una construcción de antígeno según el Punto 8 en la que el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52).

13. Una construcción de antígeno según el Punto 8 en la que el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48).

14. Una construcción de antígeno según el Punto 8 en la que el segundo polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 47 a 212 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58).

15. Una construcción de antígeno según el Punto 1 seleccionada 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 una construcción 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 transformado 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 ensayo que comprende las etapas de:

(a) combinar al menos una construcción de antígeno según cualquiera de los Puntos 1 y 15 con la muestra de ensayo para formar una mezcla;

(b) incubar la mezcla en condiciones adecuadas para formación de los complejos entre el antígeno y los anticuerpos, si es que existen 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 usando una construcción 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 usando una construcción 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 usando 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 usando 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 una construcción de antígeno según cualquiera de los Puntos 1 y 15.

28. Un kit de inmunoensayo según el Punto 27 en el que la construcción de antígeno es un reactivo de captura.

29. Un kit de inmunoensayo según el Punto 27 en el que la construcción de antígeno es un reactivo indicador.

30. Un kit de inmunoensayo según el Punto 27 en el que la construcción 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.

La presente invención también se refiere a:

1. Una construcción 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.

2. Una construcción 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. Una construcción 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.

4. Una construcción de antígeno según el Punto 3 en el que el primer polipéptido de la env del VIH-1 del Grupo O comprende una parte inmunorreactiva de la proteína gp120 del aislado HAM112 del VIH-1 del Grupo O y el segundo polipéptido de la env del VIH-1 del Grupo O comprende una parte inmunorreactiva de la proteína gp41 del aislado HAM112 del VIH-1 del Grupo O.

5. Una construcción 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 que consiste esencialmente en los restos 1 a 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una parte de la misma.
6. Una construcción 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 que consiste esencialmente en los restos 521 a 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una parte de la misma.
7. Una construcción 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 que consiste esencialmente en los restos 476 a 520 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°:61).
8. Una construcción de antígeno según el Punto 7 en el que una parte de la región hidrófoba de la proteína gp41 del aislado HAM112 del VIH-1 del Grupo O está ausente en el segundo polipéptido de la *env* del VIH-1 del Grupo O.
9. Una construcción 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 que consiste esencialmente en los restos 47 a 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52).
10. Una construcción 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 que consiste esencialmente en los restos 47 a 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°: 48).
11. Una construcción 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 que consiste esencialmente en los restos 47 a 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58).
12. Una construcción 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. Una construcción de antígeno según el Punto 12 en el que el polipéptido adicional del VIH-1 del Grupo O comprende una parte inmunorreactiva de la proteína gp41 del aislado HAM112 del VIH-1 del Grupo O.
14. Una construcción de antígeno según el Punto 13 en el que el polipéptido adicional del VIH-1 del Grupo O tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 521 a 873 de la secuencia de la Figura 1 (ID. SEC. N°: 61) o una parte de la misma.
15. Una construcción de antígeno según el Punto 14 en el que una parte de la región hidrófoba de la proteína gp41 del aislado HAM112 del VIH-1 del Grupo O está ausente del polipéptido adicional del VIH-1 del Grupo O.
16. Una construcción 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 que consiste esencialmente en los restos 47 a 373 de la Figura 9 (ID. SEC. N°: 52).
17. Una construcción 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 que consiste esencialmente en los restos 47 a 245 de la Figura 7 (ID. SEC. N°:48).
18. Una construcción 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 que consiste esencialmente en los restos 47 a 215 de la Figura 5 (ID. SEC. N°: 58).
19. Una construcción 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 que consiste esencialmente en los restos 250 a 281 de la Figura 17 (ID. SEC. N°: 120).
20. Una construcción 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.
21. Una construcción de antígeno que comprende un primer polipéptido de la *env* del VIH-2 fusionado con un segundo polipéptido de la *env* del VIH-2.
22. Una construcción 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.

23. Una construcción de antígeno según el Punto 22 en el que:
- (a) el primer polipéptido de la *env* del VIH-2 tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 248 a 307 de la secuencia de la Figura 11 (ID. SEC. N°: 55) o una parte de la misma; y
- (b) el segundo polipéptido de la *env* del VIH-2 tiene una secuencia de aminoácidos que consiste esencialmente en los restos 308 a 466 de la secuencia de la Figura 11 (ID. SEC. N°: 55) o una parte de la misma.
24. Una construcción de antígeno según el Punto 21 que es el pVIH-210 y derivados, variantes y análogos del mismo.
25. Un polinucleótido que codifica una construcción de antígeno según cualquiera de los Puntos 1, 20, 21 y 24.
26. Un polinucleótido según el Punto 25 unido operativamente a una secuencia de control capa de dirigir la expresión en un hospedador adecuado.
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.
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 ensayo que comprende las etapas de:
- (a) combinar al menos una construcción de antígeno según cualquiera de los Puntos 1, 20, 21 y 24 con la muestra de ensayo 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 existen 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 usando una construcción 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 usando una construcción 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 usando un anticuerpo dirigido contra los complejos formados en la etapa (b) al que se ha unido un compuesto generador de señal.
35. Un procedimiento según el Punto 31 en el que la detección de la presencia de los complejos de la etapa (c) se realiza usando 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.
36. Un kit de inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 que comprende una construcción de antígeno según cualquiera de los Puntos 1, 20, 21 y 24.
37. Un kit de inmunoensayo según el Punto 36 en el que la construcción de antígeno es un reactivo de captura.
38. Un kit de inmunoensayo según el Punto 36 en el que la construcción de antígeno es un reactivo indicador.
39. Un kit de inmunoensayo según el Punto 36 en el que la construcción de antígeno está unida 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ABBOTT LABORATORIES

5 <120> NUEVAS CONSTRUCCIONES DE ANTÍGENO ÚTILES EN LA DETECCIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIH

<130>6165W001

10 <140> PCT/US1998/017014  
<141> 17-08-1998

<150> 08/911.824  
<151 > 15-08-1997

15 <160> 124

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210>1  
<211> 19  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

30 <400> 1  
gagatctca ggggtatcc 19

<210>2  
<211> 20  
35 <212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 2  
ggatcatcgg tcatcacc 20

45 <210>3  
<211> 114  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

55 <400>3

catgatcggg ggtgacatga aagacatctg gcgtaacgaa ctgttcaaatt acaaagttgt 60

tcgtgttaaa ccgttctctg ttgctccgac cccgatcgc tctccgggta tcgg 114

60 <210>4  
<211>111  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

ES 2 485 292 T3

<220>  
 <221> fuente  
 5 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"  
 <400> 4  
 gcaggttcca ctatgggtgc tgcagctacc gctctgaccg tacagaccca ctctgttattc 60  
 aaaggtatcg tacagcagca cgacaacctg ctgcgtgcaa tccaggcaca g 111  
 10 <210>5  
 <211> 110  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <221> fuente  
 20 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"  
 <400> 5  
 agctgctgggt tctggatcag ggtttccagt gccagcagac gagcacgcag ctgacggata 60  
 ccccatacag acagacgcag cagtttctgc tgtgcctgga ttgcacgcag 110  
 25 <210>6  
 <211>111  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"  
 <400> 6  
 35 ctgatccaga accagcagct gctgaacctg tggggctgca aaggctgtct gatctgctac 60  
 acctccgtta aatggaacga aacctggcgt aacaccacca acatcaacca g 111  
 40 <210>7  
 <211>117  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"  
 <400> 7  
 ctgaacctga gctttctgga tttcttcgta gatgggtggaa gaaacgttgt cgatctgctg 60  
 gtcccattcc tgccaggtea ggtaaccca gatctggttg atgttggtgg tgttacg 117  
 50 <210>8  
 <211> 101

ES 2 485 292 T3

<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 8

10 tccagaaagc tcaggttcag caggaacaga acgaaaaaaaa actgctggaa ctggacgaat 60  
gggcttctct gtggaactgg ctggacatca ccaaatggct g 101

<210>9  
<211> 114  
15 <212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 9

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

25

<210> 10  
<211> 107  
<212>ADN  
30 <213> Secuencia artificial

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

<400>10

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

40

<210> 11  
<211>31  
<212>ADN  
45 <213> Secuencia artificial

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

50 <400> 11  
ctacaagaat tccatgatcg gtggtgacat g 31

<210> 12  
55 <211>109  
<212>ADN

ES 2 485 292 T3

<213> Secuencia artificial

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

<400> 12

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

10

<210> 13  
<211> 114  
<212>ADN  
15 <213> Secuencia artificial

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

<400>13

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

25

<210> 14  
<211> 60  
<212>ADN  
30 <213> Secuencia artificial

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

<400> 14

atagtaggat cctattacag cagagagcgt tcgaagccct ggccaacacg acgcgggatg 60

40 <210> 15  
<211> 43  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

45

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

50 <400>15  
atagtaggat cctattattc accggtacga cccggagttt cag 43

<210> 16  
<211> 38  
55 <212>ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 485 292 T3

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

<400> 16  
 5 atagtaggat cctattacag ccatttggtg atgtccag 38

<210> 17  
 <211>106  
 <212>ADN  
 10 <213> Secuencia artificial

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

<400>17

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

20  
 <210> 18  
 <211>108  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"  
 30  
 <400>18

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

35  
 <210> 19  
 <211> 26  
 <212>ADN  
 <213>Secuencia artificial

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

45  
 <400>19  
 gcagcttctgt gttctgtgtg acggcg 26

<210>20  
 <211> 19  
 <212>ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

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

<400> 20  
 60 cgtaacggta cgacactcc 19

ES 2 485 292 T3

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

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

<400> 21  
 ccgctacctc cctgatcgac accttc 26

<210>22  
 <211>26  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15

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

<400> 22  
 gaagggtcgc atcagggagg tagcgg 26  
 25

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

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

<400> 23  
 gatgtccagc cagttccac 19

<210>24  
 <211>64  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40

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

<400> 24  
 50

ctacaagaat tccatgatcg gtggtgacat gaaagacatc tggcgtaacg aactgttcaa 60  
 atac 64

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

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

<400> 25  
 ctacaagaat tctatcgggtg gtagacatgaa 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

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

<400> 30  
 cccattaatg tgagttagct c 21

## ES 2 485 292 T3

5 <210>31  
<211> 20  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 31  
cctgacgaat gattgtcgca 20

15 <210>32  
<211> 19  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

25 <400> 32  
attcagcgac gacacggtg 19

30 <210>33  
<211> 18  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 33  
gtatccacac ctgtgcca 18

40 <210>34  
<211> 19  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

50 <400> 34  
agagtgggtc tgtacggtc 19

55 <210>35  
<211> 20  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 35  
aatgggcttc tctgtggaac 20

65 <210>36

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

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

10 <400> 36  
 ctgtctaacc tgatctctgg 20

<210>37  
 <211> 20  
 <212>ADN  
 15 <213> Secuencia artificial

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

<400> 37  
 acgcaggtga gagataacag 20

25 <210>38  
 <211> 22  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

35 <400> 38  
 gtgatacгаа acgaagcatt gg 22

<210>39  
 <211>21  
 40 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 39  
 gcgatatagg cgccagcaac c 21  
 50

<210>40  
 <211>21  
 <212>ADN

55 <213> Secuencia artificial

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

<400> 40  
 ctctgtatc aaaggtatcg t 21

65 <210>41  
 <211>18

<212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 41  
 10 agcagacgag cacgcagc 18

<210>42  
 <211>18  
 <212>ADN  
 15 <213> Secuencia artificial

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

20 <400> 42  
 ttcagcagga acagaacg 18

<210>43  
 <211> 18  
 <212>ADN  
 25 <213> Secuencia artificial

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

30 <400> 43  
 35 tccgctctg atcccgtc 18

<210>44  
 <211> 17  
 <212>ADN  
 40 <213> Secuencia artificial

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

45 <400> 44  
 ccaggcacag caggaac 17

<210>45  
 <211> 20  
 <212>ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

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

55 <400> 45  
 60 aactataga atactcaagc 20

<210>46  
 <211> 20  
 <212>ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 485 292 T3

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

<400> 46  
 taatacgact cactataggg 20

10 <210>47  
 <211> 741  
 <212>ADN  
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

15 <400> 47

atgatcggtg gtgacatgaa agacatctgg cgtaacgaac tgttcaaata caaagttggt 60  
 cgtgttaaac cgttctctgt tgctccgacc ccgatcgtc gtccggttat cggactggc 120  
 acccaccgtg aaaaacgtgc tgtaggtctg ggtatgctgt tcctgggcgt tctgtctgca 180  
 gcaggttcca ctatgggtgc tgcagctacc gctctgaccg tacagacca ctctgttacc 240  
 aaaggtatcg tacagcagca ggacaacctg ctgctgcaaa tccaggcaca gcaggaactg 300  
 ctgctctgt ctgtatgggg tatccgtcag ctgctgctc gtctgctggc actggaaacc 360  
 ctgatccaga accagcagct gctgaacctg tggggctgca aaggtegtct gatctgctac 420  
 acctccgtaaatggaacga aacctggcgt aacaccacca acatcaacca gatctgggggt 480  
 aacctgacct ggcaggaatg ggaccagcag atcgacaacg tttcttcac catctacgaa 540  
 gaaatccaga aagctcaggt tcagcaggaa cagaacgaaa aaaaactgct ggaactggac 600  
 gaatgggctt ctctgtggaa ctggctggac atcaccaaat ggctgcgtaa catccgtcag 660  
 ggctaccagc cgtgtccct gcagatcccg acctcgcagc agtctgaagc tgaaactccg 720  
 ggtcgtaccg gtgaataata g 741

20 <210>48  
 <211>245  
 <212>PRT  
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

25 <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 2 485 292 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

<210>49

<211>1476

5 <212>ADN

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 49

ES 2 485 292 T3

atgagttttg tggtcattat tcccgcgcgc tacgcgtcga cgcgtctgcc cggtaaacca 60  
 ttggttgata ttaacggcaa acccatgatt gttcatgttc ttgaacgcgc gcgtgaatca 120  
 ggtgccgagc gcatcatcgt ggcaaccgat catgaggatg ttgcccgcc cgttgaagcc 180  
 gctggcggg aagtatgtat gacgcgcgcc gatcatcagt caggaacaga acgtctggcg 240  
 gaagttgtcg aaaaatgccc attcagcgac gacacgggta tcgttaatgt gcagggtgat 300  
 gaaccgatga tccctgcgac aatcattcgt caggttgctg ataacctcgc tcagcgtcag 360  
 gtgggtatga cgactctggc ggtgccaatc cacaatgcgg aagaagcgtt taacccgaat 420  
 gcggtgaaaag tggttctcga cgctgaaggg tatgcactgt acttctctcg cgccaccatt 480  
 ccttgggatc gtgatcgttt tgcagaaggc cttgaaaccg ttggcgataa cttcctgcgt 540  
  
 catcttggtg tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca 600  
 agtccgtag aacacatcga aatgtagag cagctcgtg ttctgtggta cggcgaaaaa 660  
 atccatgttg ctggttctca ggaagttcct ggcacagggtg tggatacccc tgaagatctc 720  
 gaccctcga cgaattctat cgggtgtgac atgaaagaca tctggcgtaa cgaactgttc 780  
 aaatacaaaag ttgttctgtg 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 tggggtatcc gtcagctgcg tgctcgtctg 1080  
 ctggcactgg aaacctgat 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

5 <212>PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 50

ES 2 485 292 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 2 485 292 T3

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<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 2 485 292 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

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

<400> 53

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  
 gaagtgtcgc aaaaatgcgc attcagcgac gacacgggta tcgttaatgt gcagggtgat 300  
 gaaccgatga tccctgcgac aatcattcgt cagggttctg ataacctgc tcagcgtcag 360  
 gtgggtatga cgactctggc ggtgccaatc cacaatgcgg aagaagcgtt taaccggaat 420  
 gcggtgaaag tggttctcga cgctgaaggg tatgactgt acttctctcg cgccaccatt 480  
 ccttgggatac gtgatcgttt tgcagaaggc cttgaaaccg ttggcgataa cttcctgcgt 540  
 catcttggtat tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca 600  
 agtccgttag aacacatcga aatgtagag cagcttcgtg ttctgtggta cggcgaaaaa 660  
 atccatggtg ctggtgctca ggaagttcct ggcacagggtg tggatacccc tgaagatctc 720

10

ES 2 485 292 T3

gacccgtcga cgaattctat cgggtggtgac atgaaagaca tctggcgtaa cgaactgttc 780  
 aaatacaaaag ttgttcgtgt taaaccgttc tctgttgctc cgaccccgat cgctcgtccg 840  
 gttatcggta ctggcaccga cctgtaaaaa cgtgctgtag gtctgggtat gctgttcctg 900  
 ggcgttctgt ctgcagcagg ttccactatg ggtgctgcag ctaccgctct gaccgtacag 960  
 acccactctg ttatcaaagg tatcgtacag cagcaggaca acctgctgcg tgcaatccag 1020  
 gcacagcagg aactgctgcg tctgtctgta tggggtatcc gtcagctgcg tgctcgtctg 1080  
 ctggcactgg aaaccctgat ccagaaccag cagctgctga acctgtgggg ctgcaaagggt 1140  
 cgtctgatct gctacacctc cgttaaattg aacgaaacct ggcgtaacac caccaacatc 1200  
 aaccagatct ggggtaacct gacctggcag gaattgggacc agcagatcya caacgtttct 1260  
 tccaccatct acgaagaaat ccagaaagct caggttcagc aggaacagaa cgaaaaaaaa 1320  
 ctgctggaac tggacgaatg ggcttctctg tggaaactggc tggacatcac caaatggctg 1380  
 cgtaacatcc gtcaggggta ccagccgctg tccctgcaga tcccgacccg tcagcagtct 1440  
 gaagctgaaa ctccgggtcg tacCGgtgaa ggtgggtggtg acgaaggccg tccgctctg 1500  
 atcccgtctc cgcaggggtt cctgccgctg ctgtacaccg acctgcgtac catcatcctg 1560  
 tggctctacc acctgctgtc taacctgac tctggtactc agactgttat ctctcacctg 1620  
 cgtctgggtc tgtggattct gggtcagaaa atcatcgacg cttgccgtat ctgctgctgt 1680  
 gttatccact actggctgca ggaactgcag aaatccgcta cctccctgat cgacaccttc 1740  
 gctgttgtag ttgctaactg gactgacgac atcatcctgg gtatccagcg tctgggtcgt 1800  
 ggtatcctga acatcccgcg tctgtttcgc cagggcttcg aacgctctct gctgtaaatag 1860

<210>54  
 <211>618  
 5 <212>PRT  
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana  
 <400> 54

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 2 485 292 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 2 485 292 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  
 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  
 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

5 <212>PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 55

ES 2 485 292 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 2 485 292 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

<210>56  
 <211>491  
 5 <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

10

ES 2 485 292 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 2 485 292 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

atgatcggtg gtgacatgaa agacatctgg cgtaacgaac tgttcaaata caaagttggt 60  
 cgtgttaaac cgttctctgt tgctccgacc ccgatcgtc gtccggttat cgg tactggc 120  
 acccaccgtg aaaaacgtgc tgtaggtctg ggtatgctgt tctgggctg tctgtctgca 180  
 gcaggttcca ctatgggtgc tgcagctacc gctctgaccg tacagacca ctctgttatc 240  
 aaaggatcgc tacagcagca ggacaacctg ctgcgtgcaa tccaggcaca gcaggaactg 300  
 ctgcgtctgt ctgtatgggg tatccgtcag ctgcgtgctc gtctgctggc actggaaacc 360  
 ctgatccaga accagcagct gctgaacctg tggggctgca aaggtcgtct gatctgctac 420

10

ES 2 485 292 T3

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 ggctgtaata g 651

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

5

<400> 58

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

10

<210>59  
 <211> 1386  
 <212>ADN

15

ES 2 485 292 T3

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 59

```

atgagtttfg tggtcattat tcccgcgcgc tacgcgtcga cgcgtctgcc cggtaaacca      60
ttggttgata ttaacggcaa acccatgatt gttcatgttc ttgaacgcgc gcgtgaatca      120
gggtcccgagc gcatcatcgt ggcaaccgat catgaggatg ttgcccgccg cgttgaagcc      180
gctggcggtg aagtatgtat gacgcgcgcc gatcatcagt caggaacaga acgtctggcg      240
gaagttgtcg aaaaatgcgc attcagcgac gacacgggtga tcgttaatgt gcagggtgat      300
gaaccgatga tccttgcgac aatcattcgt caggttgctg ataacctcgc tcagcgtcag      360
gtgggtatga cgactctggc ggtgccaatc cacaatgcgg aagaagcgtt taacccgaat      420
gcggtgaaag tggttctcga cgctgaaggg tatgcaactgt accttctctc 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 ggaagtccct ggcacagggtg tggatacccc tgaagatctc      720
gaccctcga cgaattctat cgggtggtgac atgaaagaca tctggcgtaa cgaactgttc      780
aaatacaaaag ttgttcgtgt taaaccgttc tetgttgctc cgaccccgat cgctcgtccg      840
gttatcggta ctggcaccca ccgtgaaaaa cgtgctgtag gtctgggtat gctgttctctg      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 cagctgtcga acctgtgggg ctgcaaaagg     1140
cgtctgatct getacacctc cgttaaattg aacgaaacct ggcgtaaacac caccaacatc     1200
aaccagatct ggggtaacct gacctggcag gaatgggacc agcagatcga caacgtttct     1260
tccaccatct acgaagaaat ccagaagct caggttcagc aggaacagaa cgaaaaaaaa     1320
ctgctggaac tggacgaatg ggcttctctg tggaaactggc tggacatcac caaatggctg     1380
taatag                                             1386

```

5

<210>60

<211>460

<212>PRT

10 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 60

```

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

```

15

ES 2 485 292 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 2 485 292 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  
 5 <212>PRT  
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 61

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 2 485 292 T3

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

<210>62

<211>20

<212>ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 62  
 5 yctytagaga gtgtccatt 20

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

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

15 <400> 63  
 gtgctwcctg ctgcactta 19

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

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

25 <400> 64  
 aagttgctca agaggtgga 20

30 <210>65  
 <211>19  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

40 <400> 65  
 ccttagaggc acttgaggt 19

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

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

<400> 66

ccaragcagt aagtaacgc 19

50 <210>67<211> 23<212>ADN<213> Secuencia artificial

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

<400> 67

55 rttaytaat tgtaactcca caa 23

<210> 68  
 <211> 20  
 <212>ADN  
 60 <213> Secuencia artificial

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

65 <400> 68

gamtytatgc acctcccatc 20

5 <210>69  
 <211>21  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 69

15 gacataacta aatggttg g 21

20 <210>70  
 <211> 23  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

25 <400> 70

atacttgara grttaagrag aat 23

30 <210>71  
 <211> 20  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 71

40 atgcatgtg tacaagtaac 20

45 <210>72  
 <211> 20  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 72

atacactatt gtgctccarc 20

55 <210>73  
 <211> 22  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

65 <400> 73

agttctccat atatcttca tr 22

<210>74  
 <211> 22  
 <212>ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"  
 10 <400> 74  
  
 aacataactg gaatgatyct ac 22  
  
 15 <210>75 <211> 18  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"  
  
 <400> 75  
  
 25 ctgagrtccg tgtacaac 18  
  
 <210>76  
 <211> 20  
 <212>ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"  
 35 <400> 76  
  
 attaggcagg gatatcaacc 20  
  
 40 <210>77 <211> 18  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 45 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"  
  
 <400> 77  
  
 50 cctactccag gtgcrcat 18  
  
 <210>78 <211> 19  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"  
  
 <400> 78  
  
 cawcacaagc ctgygttcc 19  
  
 65 <210> 79  
 <211> 20  
 <212>ADN

<213> Secuencia artificial

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

<400> 79

atgtcttcvt gcattgktc 20

10 <210>80  
<211> 20  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

20 <400> 80

aatgggacac tctctaragr 20

25 <210>81  
<211> 22  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 81

35 ttaactgtca tggagaattc tt 22

<210>82  
<211> 22  
<212>ADN  
40 <213> Secuencia artificial

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

45 <400> 82

aagaattctc catgacagtt aa 22

50 <210>83 <211> 19  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

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

<400> 83

60 taagtcgagc aggwagcac 19

<210>84  
<211>21  
<212>ADN  
65 <213> Secuencia artificial

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

5 <400> 84

ccacaacat ttagttatgt c 21

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

10

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

15 <400> 85

20 taccacctct tgagcaactt 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  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

35

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

40 <400> 87

tggcctggta cagcatggg 19

45

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

50

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

55 <400> 88

gtacgaattc catggaagg gagttgacct ge 32

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

60

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

65

ES 2 485 292 T3

<400> 89

tattggatcc ttatcageta ttagtttt gtag 34

5

<210> 90

<211> 2214

<212>ADN

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

10

<400> 90

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

ES 2 485 292 T3

gtgggtatgg cgactctggc ggtgccaatc cacaatgctg aagaagcgtt. taacccgaat 420  
 gcggtgaaag tggttctcga cgctgaaggg tatgcaactgt acttctctcg cgccaccatt 480  
 ccttgggatac gtgatcgttt tgcagaaggc cttgaaaccg ttggcgataa cttcctgcgt 540  
 catcttggta tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca 600  
 agtccgtag aacacatcga aatgtagag cagcttcgtg ttctgtgta cggcgaaaaa 660  
 atccatggtt ctgttgctca ggaagttcct ggcacagggtg tggatacccc tgaagatccg 720  
 tcgacagccc ttatgaagat ccccggcgac ccgggtgggtg gtgacatgcg tgacaactgg 780  
 cgttctgaac tgtacaaata caaagttggt aaaatcgaac cgctgggtgt tgcctccgact 840  
 aaagctaaac gtcgtgttgt tcagcgtgaa aaacgcgccg ttggtatcgg tgcaactgtc 900  
 ctgggtttcc tgggtgctgc tggttctacc atgggtgctg cttctatgac cctgactgtt 960  
 caggcccgtc agcttctgtc tgggtatcgt cagcagcaga acaatctgct gcgtgctatc 1020  
 gaagctcagc agcatctgct gcaactgacc gtttggggta tcaaacagct tcaggctcgt 1080  
 atcctggctg ttgaacgta cctgaaagac cagcagctgc tgggtatctg gggttgctct 1140  
 ggtaaaactga tctgcaactac tgctgttccg tggaaacgct cttgggtctaa caaatctctg 1200  
 gaacagatct ggaacaacat gacttggatg gaatgggacc gtgaaatcaa caactacaca 1260  
 agcttgatcc actctctgat cgaagaaagc cagaaccagc aggaaaaaaa cgaacaggaa 1320  
 cttctagaac tggacaaatg ggtaaccgt gttcgtcagg gttactctcc gctgtcttc 1380  
 cagaccatc tgcgatccc gcgtggtccg gaccgtccgg aaggtatcga agaagaaggc 1440  
 ggcgaacgtg accgtgaccg ttccattcgt ctggtaatcg gtggtgacat gaaagacatc 1500  
 tggcgtaacg aactgttcaa atacaaagt gttcgtgta aaccgttctc tgttgctccg 1560  
 accccgatcg ctctccggt tatcggtaact ggcaccacc gtgaaaaacg tgcgttaggt 1620  
 ctgggtatgc tgttctggg cgttctgtct gcagcagggt cactatggg tgcgtcagct 1680  
 accgctctga ccgtacagac cactctgtt atcaaaggta tcgtacagca gcaggacaac 1740  
 ctgctgcgtg caatccaggc acagcaggaa ctgctgcgtc tgcctgtatg gggtatccgt 1800  
 cagctgcgtg ctctctgct ggcactggaa accctgatcc agaaccagca gctgctgaac 1860  
 ctgtggggct gcaaaggctg tctgatctgc tacacctccg ttaaattggaa cgaaacctgg 1920  
 cgtaacacca ccaacatcaa ccagatctgg ggtaacctga cctggcagga atgggaccag 1980  
 cagatcgaca acgttcttc caccatctac gaagaaatcc agaaagctca ggttcagcag 2040  
 gaacagaacg aaaaaaaaaact gctggaactg gacgaatggg cttctctgtg gaactggctg 2100  
 gacatcacca aatggctgctg taacatccgt cagggtacc agccgctgtc cctgcagatc 2160  
 ccgaccctgc agcagctcga agctgaaact ccgggtcgtg ccggtgaata atag 2214

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

5

<400> 91

ES 2 485 292 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 2 485 292 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  
 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  
 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  
 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 2 485 292 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  
 5 <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 ttgccgcgc cgttgaagcc	180
gctggcggtg aagtatgtat gacgcgcgcc gatcatcagt caggaacaga acgtctggcg	240
gaagttgtcg aaaaatgcgc attcagcgac gacacggtga tcgttaatgt gcagggtgat	300
gaaccgatga tccctgcgac aatcattcgt caggttgctg ataacctcgc tcagcgtcag	360

10

ES 2 485 292 T3

gtgggtatgg cgactctggc ggtgccaatc cacaatgcgg aagaagcgtt taaccggaat 420  
 gcggtgaaag tggttctcga cgctgaaggg tatgcaactgt acttctctcg cgccaccatt 480  
 ccttgggatc gtgatcgttt tgcagaaggc cttgaaaccg ttggcgataa cttcctgcgt 540  
 catcttggta tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca 600  
 agtccgtagt aacacatcga aatgttagag cagcttcgtg ttctgtggta cggcgaaaaa 660  
 atccatgttg ctgttgctca ggaagttcct ggcacagggtg tggatacccc tgaagatccg 720  
 tcgacagccc ttatgaagat ccccggcgac ccgggtggtg gtgacatgcg tgacaactgg 780  
 cgttctgaac tgtacaaata caaagtgtgt aaaatcgaac cgctgggtgt tgctccgact 840  
 aaagctaaac gtcgtgtrgt tcagcgtgaa aaacgcgccc lgggtatcgg tgcactgttc 900  
 ctgggtttcc tgggtgctgc tggttctacc atgggtgctg cttctatgac cctgactgtt 960  
 caggcccgtc agcttctgtc tggtatcgtt cagcagcaga acaatctgct gcgtgctatc 1020  
 gaagctcagc agcatctgct gcaactgacc gtttggggta tcaaacagct tcaggctcgt 1080  
 atcctggctg ttgaacgtta cctgaaagac cagcagctgc tgggtatctg gggttgctct 1140  
 ggtaaactga tctgcaactac tgctgttccg tggaacgctt cttggtctaa caaatctctg 1200  
 gaacagatct ggaacaacat gacttggatg gaatgggacc gtgaaatcaa caactacaca 1260  
 agcttgatcc actctctgat cgaagaaagc cagaaccagc aggaaaaaaa cgaacaggaa 1320  
 cttctagaac tggacaaatg ggttaaccgt gttcgtcagg gttactctcc gctgtctttc 1380  
 cagaccatc tgccgatccc gcgtgggtccg gaccgtccgg aaggatcga agaagaaggc 1440  
 ggcgaacgtg accgtgaccg ttccattcgt ctggtaatcg gtgggtgacat gaaagacatc 1500  
 tggcgtaacg aactgttcaa atacaaagt tttcgtgta aaccgttctc tgttgctccg 1560  
 accccgatcg ctgctccggt tatcgggtact ggcaccacc gtgaaaaacg tgctgtaggt 1620  
 ctgggtatgc tgttcttggg cgttctgtct gcagcagggt ccaactatggg tgctgcagct 1680  
 accgctctga ccgtacagac ccactctgtt atcaaaggta tcgtacagca gcaggacaac 1740  
 ctgctgcgtg caatccaggc acagcaggaa ctgctgcgtc tgtctgtatg gggtatccgt 1800  
 cagctgcgtg ctgctctgct ggcactggaa 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 aaaaaaaact gctggaactg gacgaatggg cttctctgtg gaactggctg 2100  
 gacatcacca aatggctgta atag 2124

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

<400> 93

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

10







ES 2 485 292 T3

atgatcggtg gtgacatgaa agacatctgg cgtaacgaac tgttcaaata caaagttggt	60
cggtgtaaac cgttctctgt tgctccgacc ccgategctc gtccggttat cggtagctggc	120
accacccgtg aaaaacgtgc tgtaggtctg ggtatgctgt tcctgggctg tctgtctgca	180
gcaggttcca ctatgggtgc tgcagctacc gctctgaccg tacagacca ctctgttata	240
aaaggtatcg 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 gatctggggt	480
aacctgacct ggcaggaatg ggaccagcag atcgacaacg tttctccac catctacgaa	540
gaaatccaga aagctcaggt tcagcaggaa cagaacgaaa aaaaactgct ggaactggac	600
gaatgggctt ctctgtgtaa ctggctggac atcaccaaat ggctgcgtaa catccgtcag	660
ggctaccagc cgtctccct gcagatccc acccgtcagc agtctgaagc tgaactccg	720
ggctctaccg gtgaaggctc ggggtgggtgac gatctgctg acaactggcg tctgaactg	780
tacaaataca aagttgttaa aatcgaaacc ctgggtgttg ctccgactaa agctaaactg	840
cgtgtgttc agcgtgaaaa acgcgccgtt ggtatcggtg cactgttctt gggtttctg	900
ggctgctgctg gttctaccat gggctgctgct tctatgacc tgactgttca ggcccgtcag	960
cttctgctg gtatcgttca gcagcagaac aatctgctgc gtgctatcga agctcagcag	1020
catctgctgc aactgacctg ttggggatc aaacagcttc aggcctcgtat cctggctggt	1080
gaaacttacc tgaagacca gcagctgctg ggtatctggg gttgctctgg taaactgatc	1140
tgcactactg ctgttccgtg gaacgcttct tggcttaaca aatctctgga acagatctgg	1200
aacaacatga cttggatgga atgggacctg gaaatcaaca actacacaag cttgatccac	1260
tctctgatcg aagaaagcca gaaccagcag gaaaaaacg aacaggaact tctagaactg	1320
gacaaatggg ttaaccgtgt tcgtcagggg tactctccgc tgtctttcca gacctatctg	1380
ccgatcccgc gtggctccgga ccgtccgaa ggtatcgaag aagaaggcgg cgaacgtgac	1440
cgtgacctgt ccattcgtct ggtataatag	1470

<210>95

<211>488

5 <212>PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 95

ES 2 485 292 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 2 485 292 T3

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 Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp  
 245 250 255  
 Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly  
 260 265 270  
 Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg  
 275 280 285  
 Ala Val Gly Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly  
 290 295 300  
 Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln  
 305 310 315 320  
 Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile  
 325 330 335  
 Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln  
 340 345 350  
 Leu Gln Ala Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln  
 355 360 365  
 Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala  
 370 375 380  
 Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp  
 385 390 395 400

ES 2 485 292 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

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

5

atgagttttg tggtcattat tcccgcgcgc tacgcgtcga cgcgtctgcc cggtaaacca 60  
 ttggttgata ttaacggcaa acccatgatt gttcatgttc ttgaacgcgc gcgtgaatca 120  
 ggtgcccagc gcatcatcgt ggcaaccgat catgaggatg ttgcccgcgc cgttgaagcc 180  
 gctggcggtg aagtatgtat gacgcgcgcc gatcatcagt caggaacaga acgctctggc 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 cttcctgcgt 540  
 catcttggtg tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca 600  
 agtccgtag aacacatcga aatgtagag cagcttcgtg ttctgtggta cggcgaaaaa 660  
 atccatgttg ctggtgctca ggaagttcct ggcacaggtg tggatacccc tgaagatctc 720  
 gacccgtcga cgaattctat cggtggtgac atgaaagaca tctggcgtaa cgaactgttc 780  
 aaatacaaag ttgttcgtgt taaaccgttc tctgttgctc cgaccccgat cgtcgtccg 840  
 gttatcggtg ctggcaccga ccgtgaaaaa cgtgctgtag gtctgggtat gctgttctct 900  
 ggcgttctgt ctgcagcagg ttccactatg ggtgctgcag ctaccgctct gaccgtacag 960  
 acccactctg ttatcaaagg tatcgtacag cagcaggaca acctgctgcg tgcaatccag 1020  
 gcacagcagg aactgctgcg tctgtctgta tggggatccc gtcagctgcg tgctcgtctg 1080

10

ES 2 485 292 T3

ctggcactgg aaacctgat ccagaaccag cagctgctga acctgtgggg ctgcaaaggt 1140  
 cgtctgatct gctacacctc cgtaaagtgg aacgaaacct ggcgtaacac caccaacatc 1200  
 aaccagatct ggggtaacct gacctggcag gaatgggacc agcagatcga caacgtttct 1260  
 tccaccatct acgaagaaat ccagaaagct caggttcagc aggaacagaa cgaaaaaaaa 1320  
 ctgctggaac tggacgaaat ggcttctctg tggaaactggc tggacatcac caaatggctg 1380  
 cgtaacatcc gtcagggcta ccagccgctg tccctgcaga tcccgacctg tcagcagtct 1440  
 gaagctgaaa ctccgggtcg taccgggtgaa ggtggcggtt ctgcctgct ggctctggaa 1500  
 actctgattc agaaccagca actgcttaac ctgtgggggtt gcaagggccg cctgatttgc 1560  
 tacacttctg taaaatggta atag 1584

<210>97

<211>526

5 <212>PRT

<213>Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 97

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

10

ES 2 485 292 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 2 485 292 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  
465 470 475 480

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  
500 505 510

Gly Cys Lys Gly Arg Leu Ile Cys Tyr Thr Ser Val Lys Trp  
515 520 525

<210>98

<211> 60

5 <212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 98

gaccgtccgg aaggtatcga agaagaaggc ggcgaacgtg accgtgaccg ttccattcgt 60

15

<210>99

<211> 53

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<221> fuente

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

25 <400> 99

atggaacggt caggtcacg ttcgccgct tcttctcga tacctccgg acg 53

30

<210>100

<211> 20

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <221> fuente

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

<400>100

40 atctctggaa cagatctgga 20

<210> 101

<211> 20

<212>ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

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

50

<400>101

agtactgaag cagattccac 20  
 <210>102  
 <211> 19  
 5 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 10 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"  
 <400>102  
 ccgctgttac gtcaactgg 19  
 15 <210>103 <211> 18  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"  
 <400>103  
 25 cgccgttggt atcgggtc 18  
 <210> 104  
 <211> 19  
 30 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 35 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"  
 <400>104  
 taccagacag aagctgacg 19  
 40 <210>105  
 <211> 20  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"  
 50 <400>105  
 cttcgatcag agagtggatc 20  
 <210>106  
 55 <211> 20  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"  
 <400>106  
 65 gacgatctgc gttctctgtg 20

ES 2 485 292 T3

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

5

<400>107

```

atgagttttg tggtcattat tcccgcgcgc tacgcgctga cgcgtctgcc cggtaaacca      60
ttggttgata ttaacggcaa acccatgatt gttcatgttc ttgaacgcgc gcgtgaatca      120
ggtgccgagc gcatcatcgt ggcaaccgat catgaggatg ttgcccgcgc cgttgaagcc      180
gctggcggtg aagtatgtat gacgcgcgcg gatcatcagt caggaacaga acgtctggcg      240
gaagttgtcg aaaaatgctc attcagcgcg gacacgggtg tctgtaatgt gcaggggtgat      300
gaaccgatga tccctgcgac aatcattcgt caggttgcctg ataacctcgc tcagcgtcag      360
gtgggtatgg cgactctggc ggtgccaatc cacaatgcgg aagaagcgtt taaccggaat      420
gcggtgaaag tggttctcga cgtgaaaggg tatgcaactgt acttctctcg cgccaccatt      480
ccttgggatc gtgatcgttt tgcagaaggc cttgaaaccg ttggcgataa cttcctgcgt      540
catcttggtg tttatggcta ccgtgcaggc tttatccgtc gttacgtcaa ctggcagcca      600
agtcggttag aacacatcga aatgtagag cagcttcgtg ttctgtggtg cggcgaaaaa      660
atccatggtg ctggtgctca ggaagttcct ggcacagggtg tggatacccc tgaagatccg      720
tcgacagccc ttatgaagat ccccggcgac ccgggtggtg gtgacatgcg tgacaactgg      780
cgttctgaac tgtacaaata caaagtgtt aaaatcgaac cgtggtgtg tgctccgact      840
aaagctaaac gtcgtgttgt tcagcgtgaa aaacgcgccg ttggtatcgg tgcactgttc      900
ctgggtttcc tgggtgctgc tggttctacc atgggtgctg cttctatgac cctgactggt      960
caggcccgtc agcttctgtc tggatcgtt cagcagcaga acaatctgct gcgtgctatc     1020
gaagctcagc agcatctgct gcaactgacc gtttggggtg tcaaacagct tcaggctcgt     1080
atcctggctg ttgaacgtta cctgaaagac cagcagctgc tgggtatctg gggttgctct     1140
ggtaaacgta tctgcactac tgctgttccg tggaaagcct ctgggtctaa caaatctctg     1200
gaaacagatc tgaacaacat gacttggatg gaatgggacc gtgaaatcaa caactacaca     1260
agcttgatcc actctctgat cgaagaaagc cagaaccagc aggaaaaaaa cgaacaggaa     1320
cttctagaac tggacaaatg ggtaaccgt gttcgtcagg gttactctcc gctgtctttc     1380
cagacccatc tgccgatccc gcgtggtccg gaccgtccgg aaggatcga agaagaaggc     1440
ggcgaacgtg accgtgaccg ttccattcgt ctggtaaacg gttctctggc tctgatctgg     1500
gacgatctgc gttctctgtg cctgttctct taccaccgtc tgcgtgatct gctgctgatc     1560
gtgactcgtg tctgtgaact gctcggccgt cgtggttggg aagctctgaa atactggtgg     1620
aatctgcttc agtactggtc ccaggaactg aaaaactctg ctgtttctct gctgaacgct     1680
actgctatcg ctggtgctga aggcaccgat cgtgttatcg aagtagttca gggtgcttac     1740
cgtgctatcc gtcacattcc gcgtcgtatc cgtcagggtc tggaaactat cctgctgtaa     1800
    
```

10

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

15

ES 2 485 292 T3

<400>108

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 2 485 292 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 2 485 292 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"
- 15 <400>109  
 gactactgt agccattcgt ctgtaatcg gtggtgacat gaaagac 47
- 20 <210> 110  
 <211> 33  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial
- 25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
- 30 <400>110  
 acaatgatgg tacctattat tcaccgttac gac 33
- 35 <210> 111  
 <211> 18  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial
- <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: cebador sintético"
- <400> 111

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  
 tcggtgtga 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 tatcacgagg 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 agccatttgg 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

ES 2 485 292 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
5	<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"	
	<400>117	
	ccggtgaagg tggcggttct cgcctgctgg ctctggaaac tctgattcag aaccagcaac	60
	tgcttaacct gtggggttgc aagggccgcc tgatttgcta cacttctgta aaatggtaat	120
	ag	122
10	<210>118	
	<211> 122	
	<212>ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<221> fuente	
	<223> /nota = "Descripción de la secuencia artificial: polinucleótido sintético"	
	<400>118	
	gatcctatta ccattttaca gaagtgtagc aaatcaggcg gcccttgcaa cccacaggt	60
	taagcagttg ctggttctga atcagagttt ccagagccag caggcgagaa cgcaccctt	120
20	ca	122
	<210> 119	
	<211>849	
	<212>ADN	
25	<213> Virus de la inmunodeficiencia humana	
	<400> 119	
	atgatcggtg gtgacatgaa agacatctgg cgtaacgaac tgttcaaata caaagttggt	60
	cgtgttaaac cgttctctgt tgcctcgacc ccgatcgtc gtccggttat cggactggc	120
	accaccctg aaaaacgtgc ttaggtctg ggtatgctgt tctgggctg tctgtctgca	180
	gcaggttcca ctatgggtgc tgagctacc gctctgaccg tacagacca ctctgttata	240
	aaaggtatcg tacagcagca ggacaacctg ctgcgtgcaa tccaggcaca gcaggaactg	300
	ctgcctctgt ctgtatgggg tatccgtcag ctgcgtgctc gtctgctggc actggaaacc	360
	ctgatccaga accagcagct gctgaacctg tggggctgca aaggctctct gatctgtac	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 ggctgctgaa catccgtcag	660
	ggctaccagc cgctgtccct gcagatccc acccgtcagc agtctgaagc tgaactccg	720
	ggctgaccg gtgaaggtgg cggttctcgc ctgctggctc tggaaactct gattcagaac	780
	cagcaactgc ttaacctgtg gggttgcaag ggccgcctga tttgctacac tctgtaaaa	840
	tggtaatag	849
30	<210>120 <211> 281 <212>PRT	
	<213>Virus de la inmunodeficiencia humana	
	<400> 120	

ES 2 485 292 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



<220>

<221> fuente

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

5

<400>124

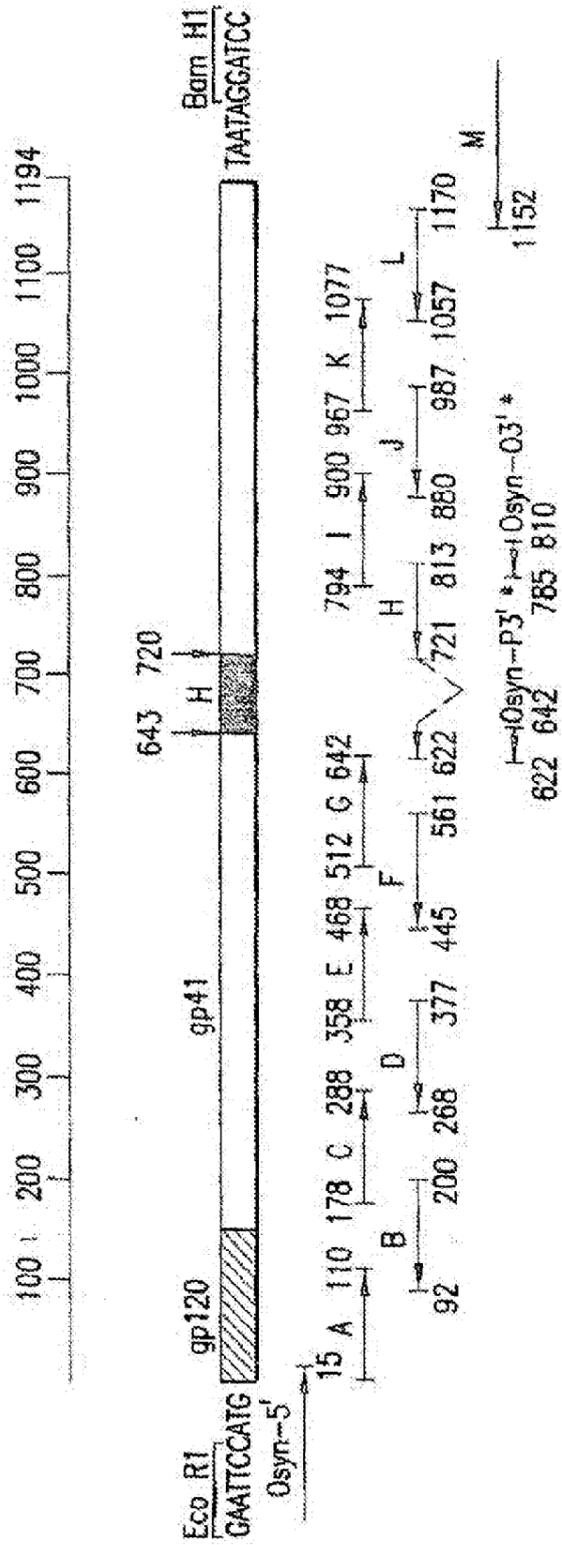
taataggatc c 11

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una construcción de antígeno que consiste en una secuencia de aminoácidos de ID SEC NO: 55 o en una secuencia de aminoácidos diferente de la secuencia de aminoácidos de ID SEC NO: 55 por un cambio conservativo debido a sustituciones de 1 a 5 aminoácidos, en la que la construcción de antígeno no reacciona en cruzado con anticuerpos contra el VIH-1
2. Un polinucleótido que codifica una construcción de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1.
- 10 3. Un procedimiento para detectar anticuerpos contra el VIH-2 en una muestra de ensayo que comprende las etapas de:
  - 15 (a) combinar al menos una construcción de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 con la muestra de ensayo para formar una mezcla;
  - (b) incubar la mezcla en condiciones adecuadas para la formación de complejos entre el antígeno y los anticuerpos, si hubiere, que están presentes en la muestra y que son inmunológicamente reactivos con el antígeno; y
  - (c) detectar la presencia de cualquier complejo formado.
- 20 4. Un kit de inmunoensayo para la detección de anticuerpos contra el VIH-2 que comprende una construcción de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1.

←gp120  
 MIVTMRAMGK RNRKLGILYI VMALIIPCLS SSQLYATVYA GVPVWEDAAP 50  
 VLFCASDANL TSTEKHNVWA SQACVPTDPT PHEYLNTNVT DNFNIWENYM 100  
 VEQMQEDIIS LWDQSLKPCI QMTFMCIQMN CTDIKNNNTS GTENRTSSSE 150  
 NPMKTCEFNI TTVLKDKKEK KQALFYVSDL TKLADNNTTN TMYTLINCNS 200  
 TTIKQACPKV SFEPPIIYYC 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 YAPPVPGNLT 450  
 CISHITGMIL QMDAPWNKTE NTFRPIGGDM KDIWRNELFK YKVVRVKPFS 500  
 VAPTPVIRPV IGTGTHREKR ←gp41  
 AVGLGMLFLG VLSAAGSTMG AAATALTVQT 550  
 HSVIKGIVQQ QDNLLRAIQV QOELLRLSVW GIRQLRARLL ALETLIQNQQ 600  
 LLNLWGCKGR LICYTSVKWN ETWRNTTNIN QIWGNLTWQE WQQQIDNVSS 650  
 TIYEEIQKAQ VOQEQNEKKL LEDEWASLW NWLDITKWLW YIKIATIIVG 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 (deletcionada según se muestra)

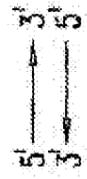


FIG.2

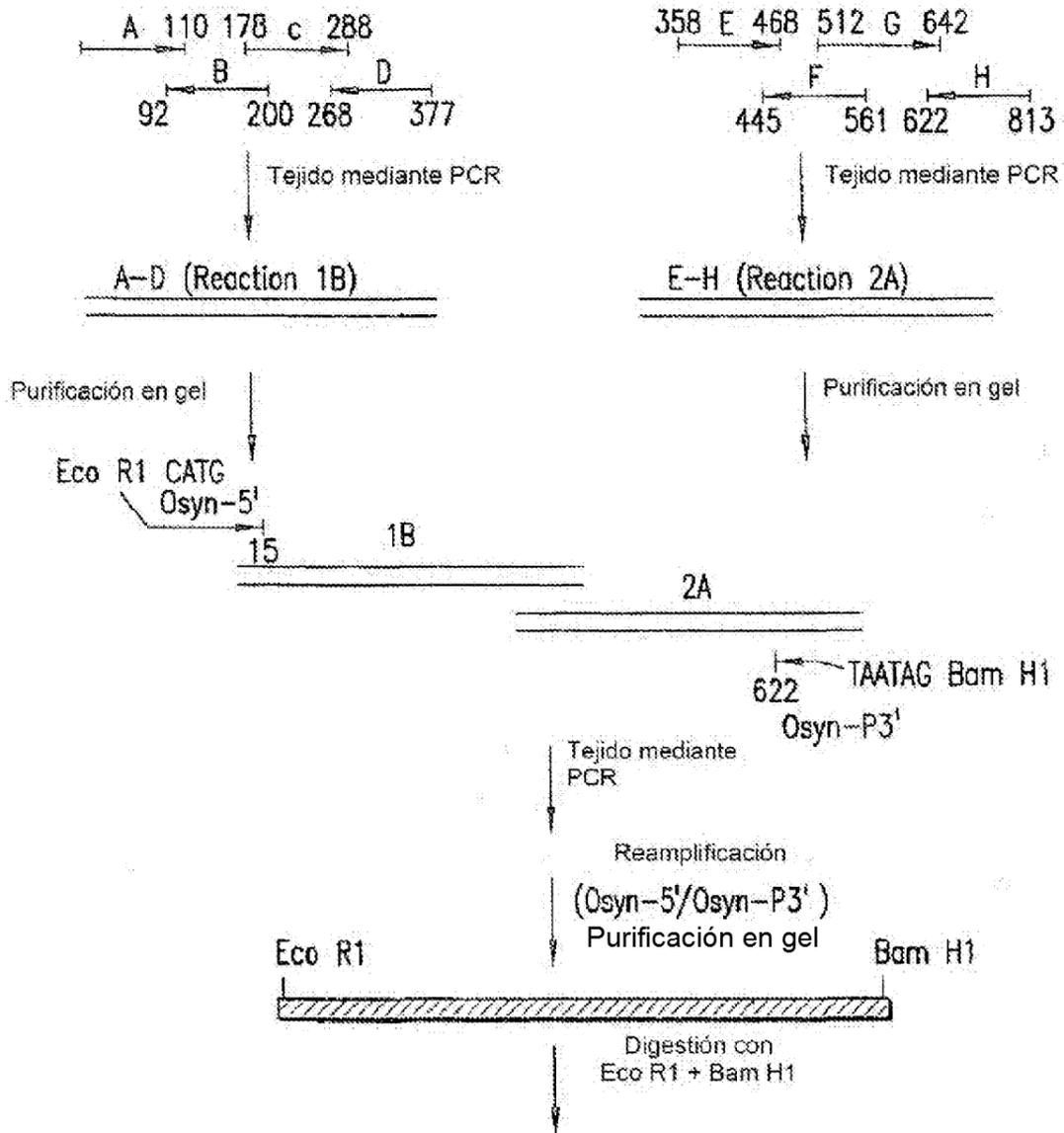


FIG.3A

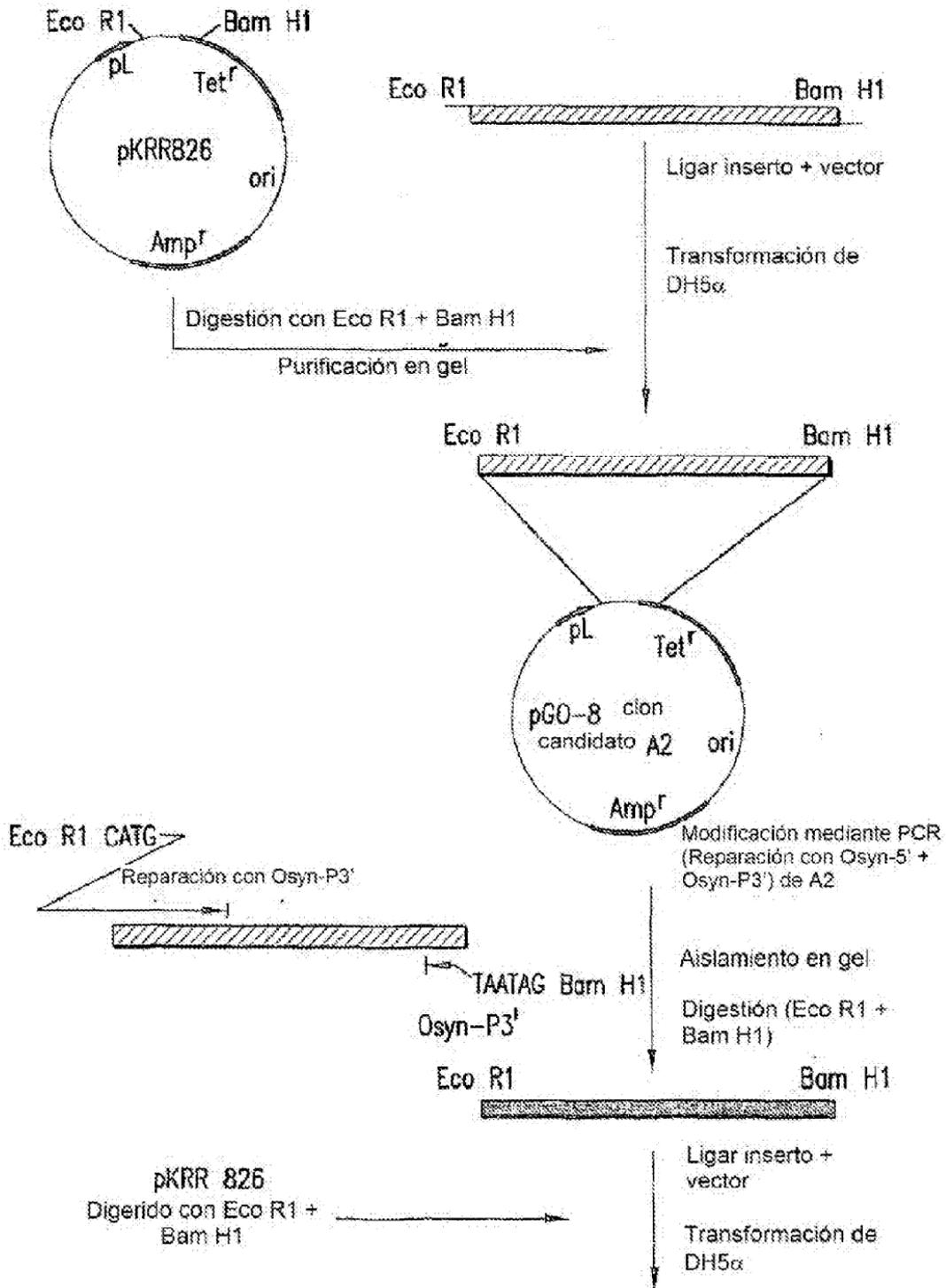


FIG.3B

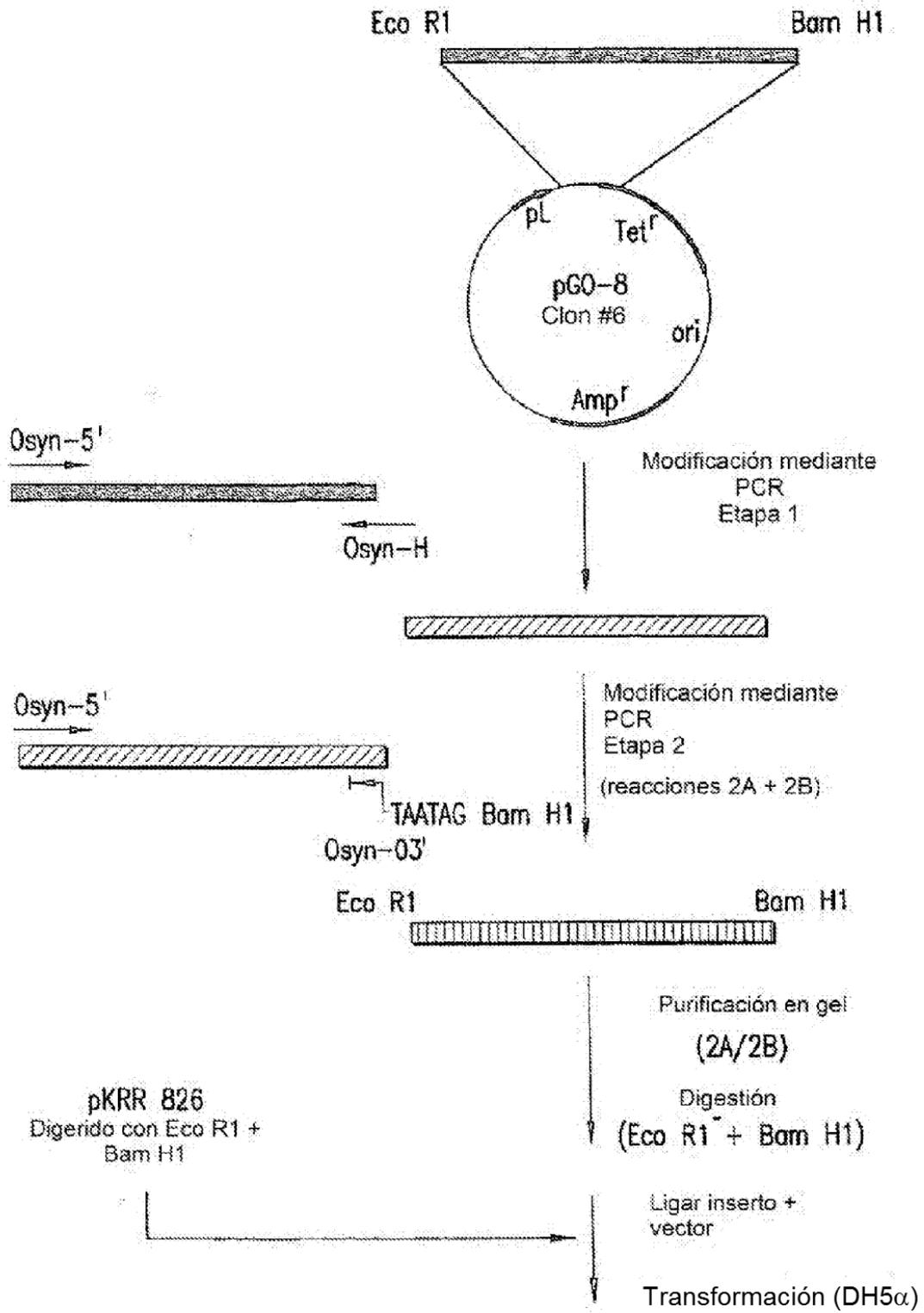


FIG.3C

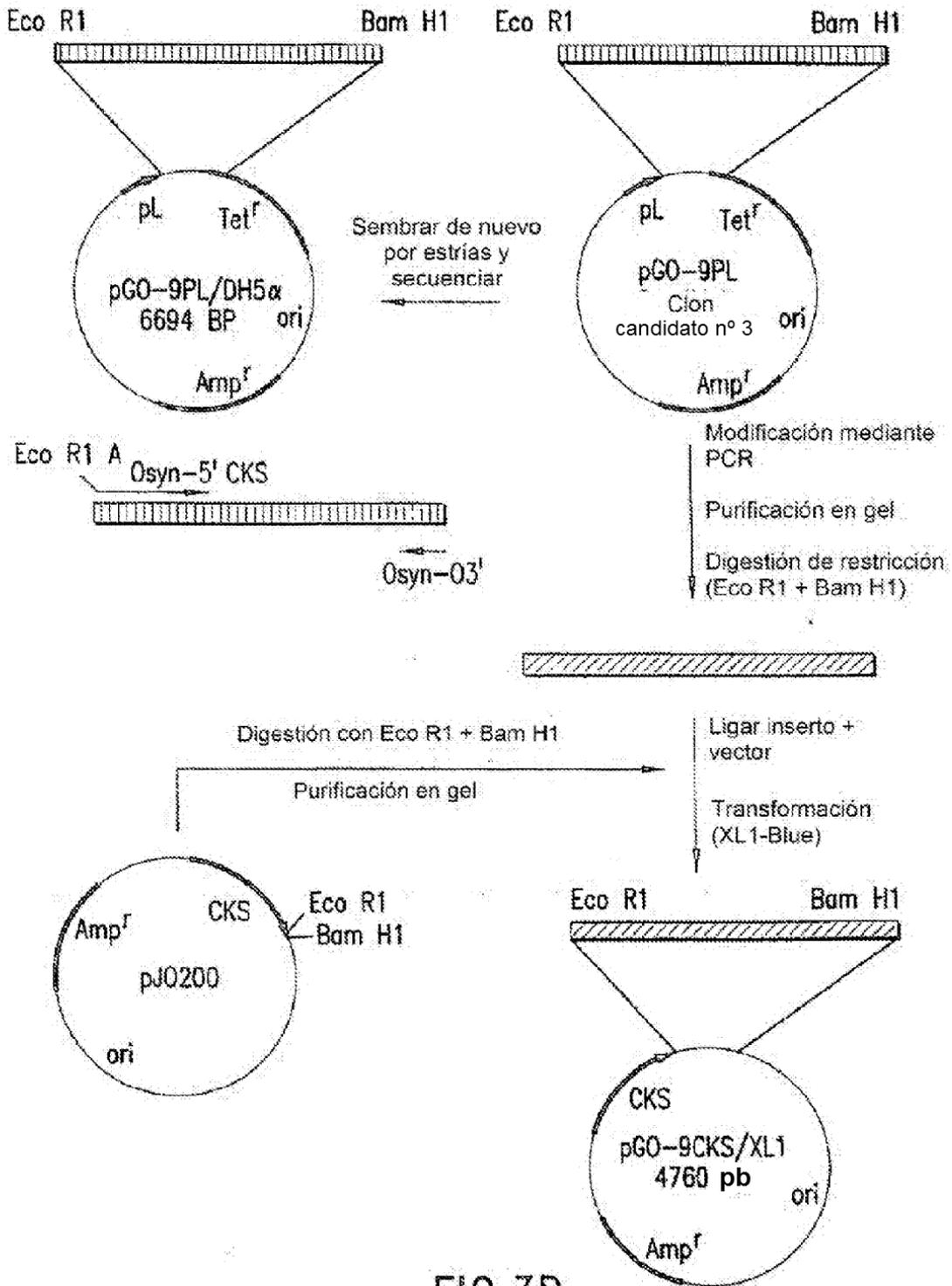


FIG.3D

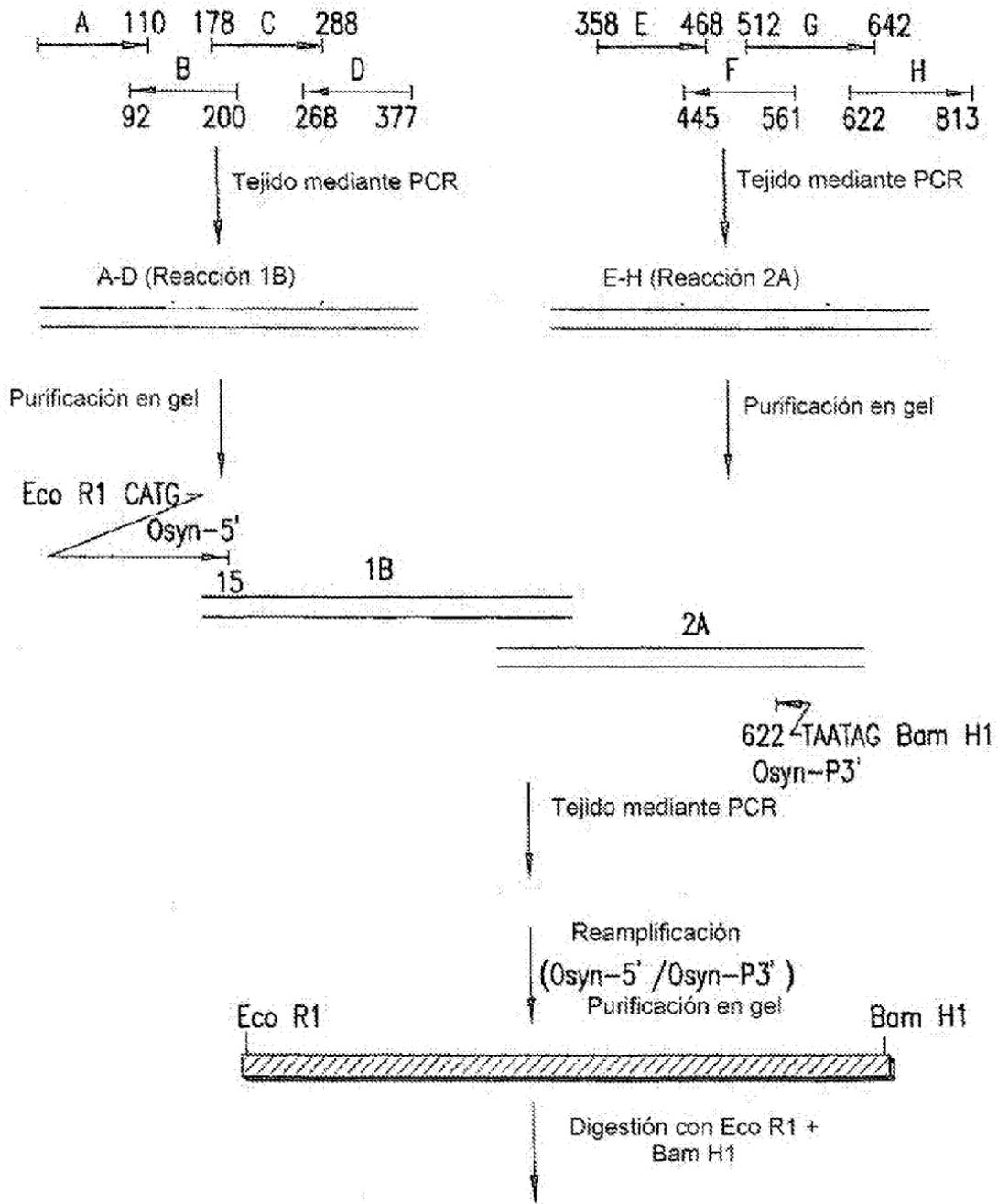


FIG.4A

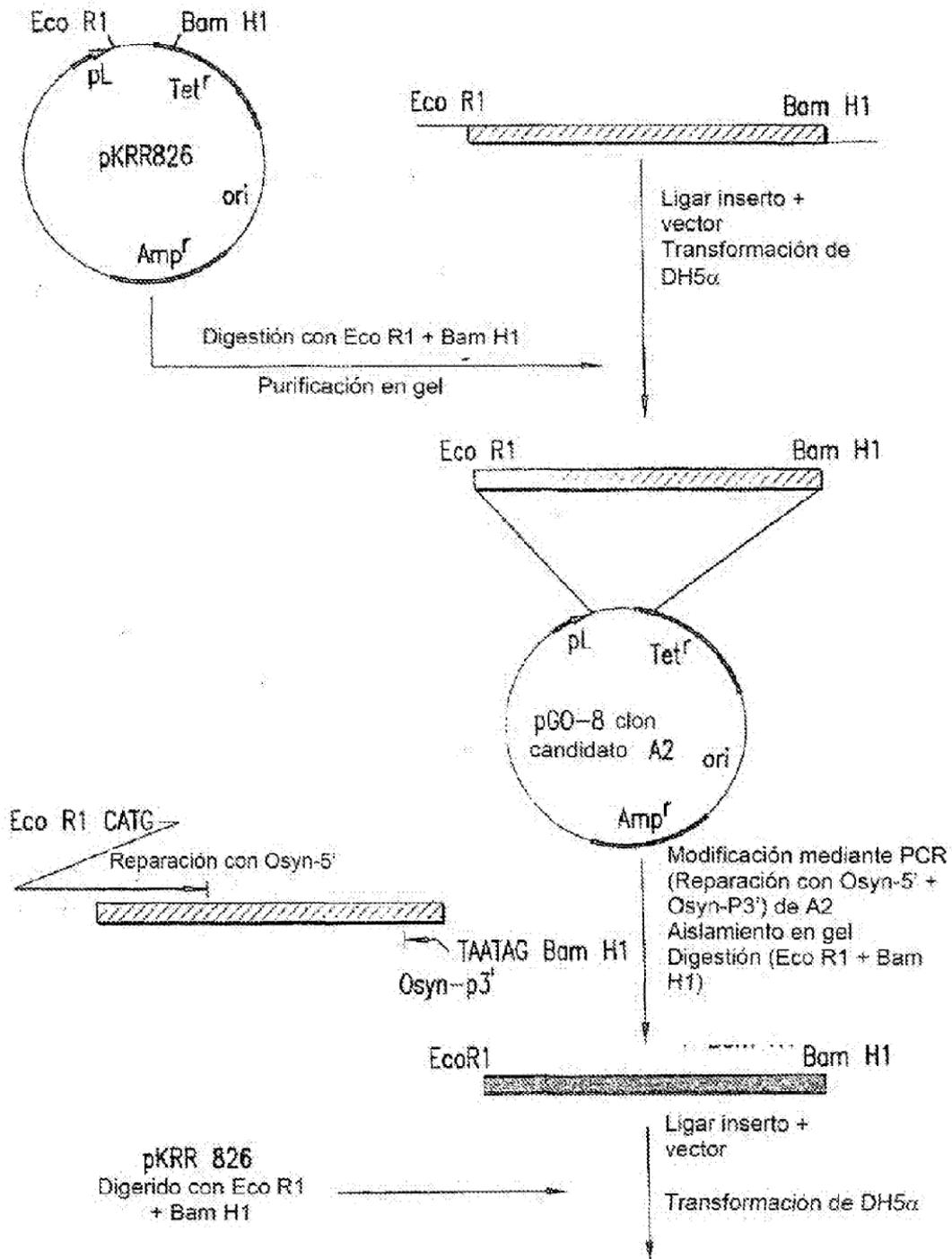


FIG.4B

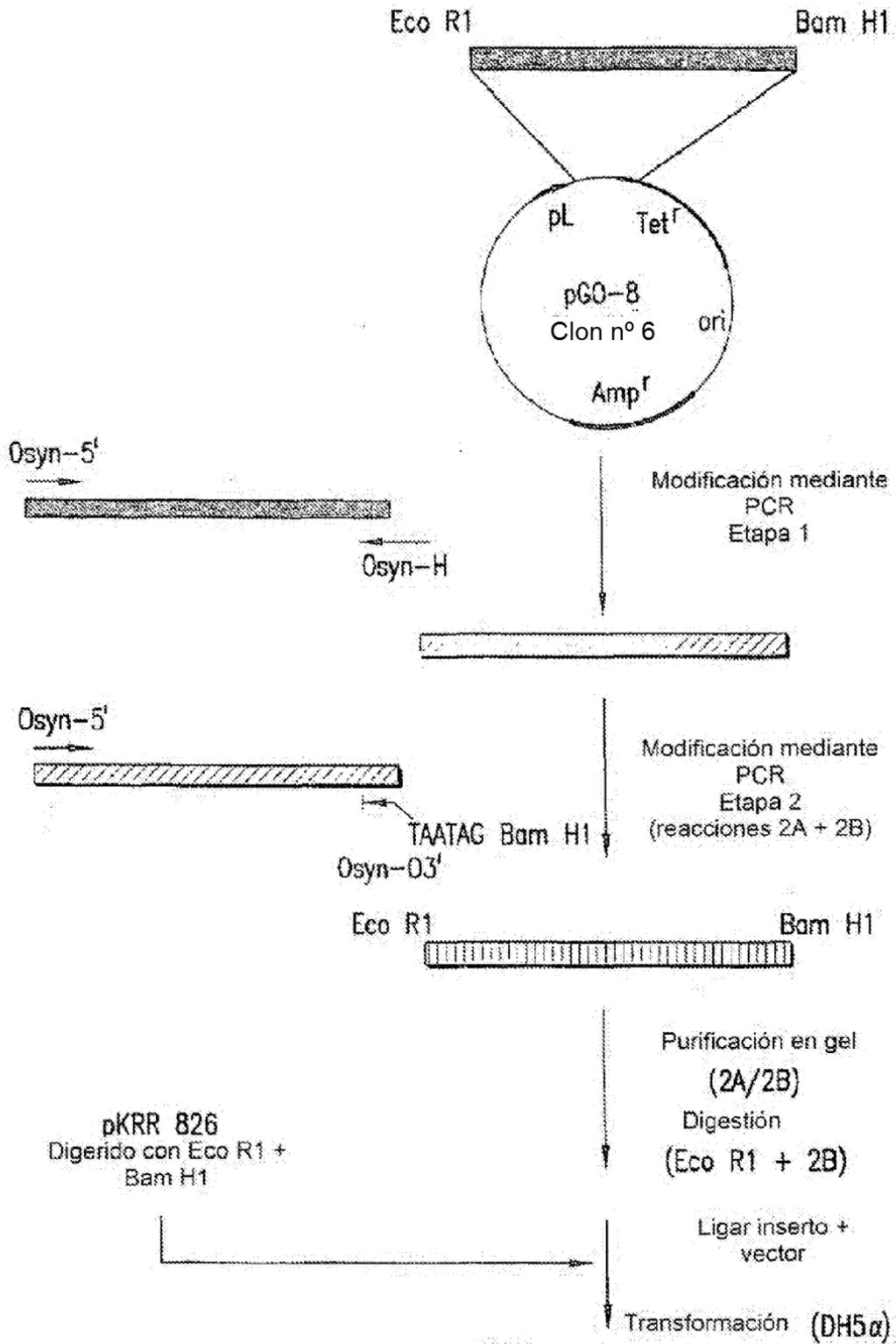


FIG.4C

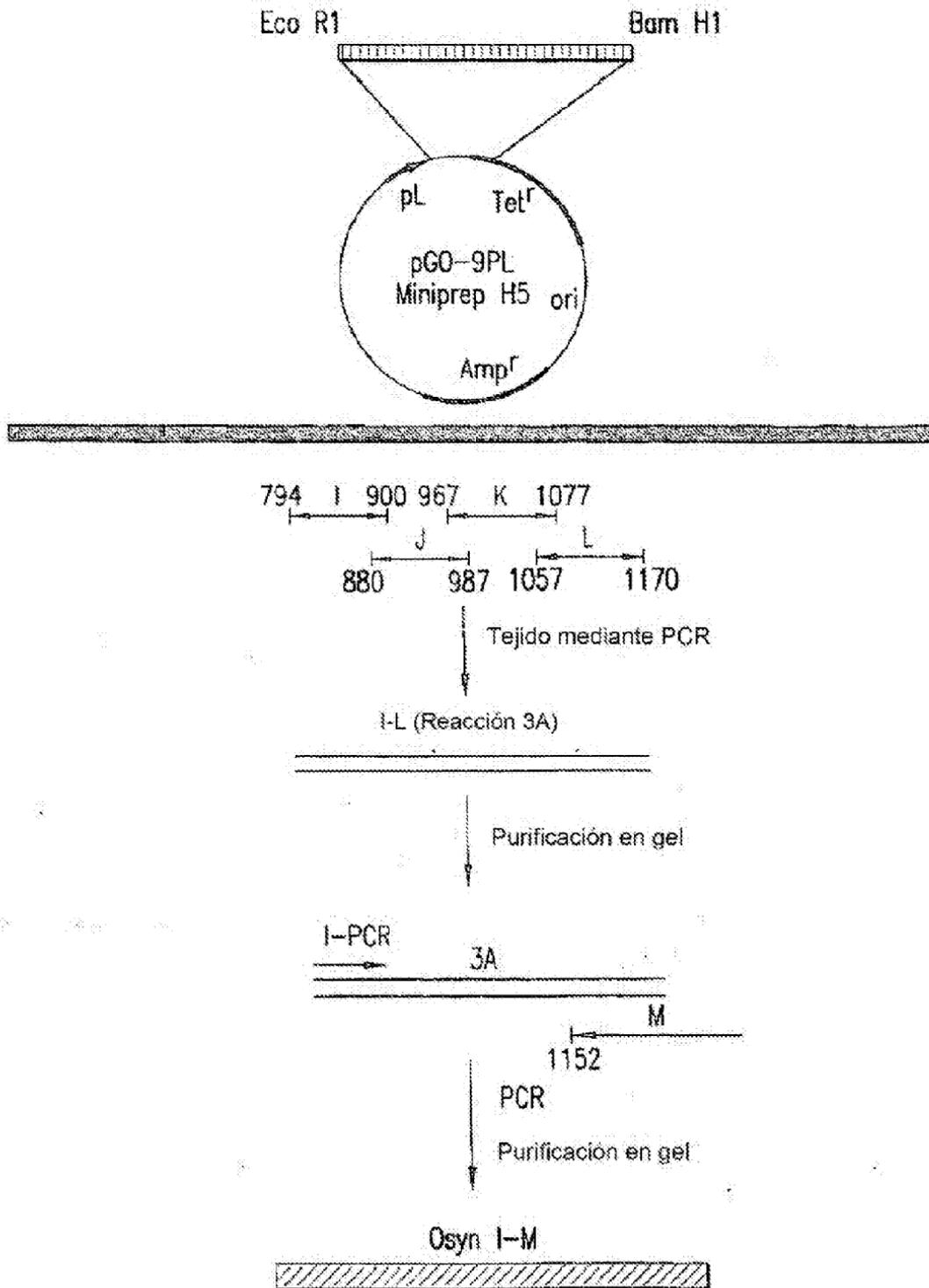


FIG.4D

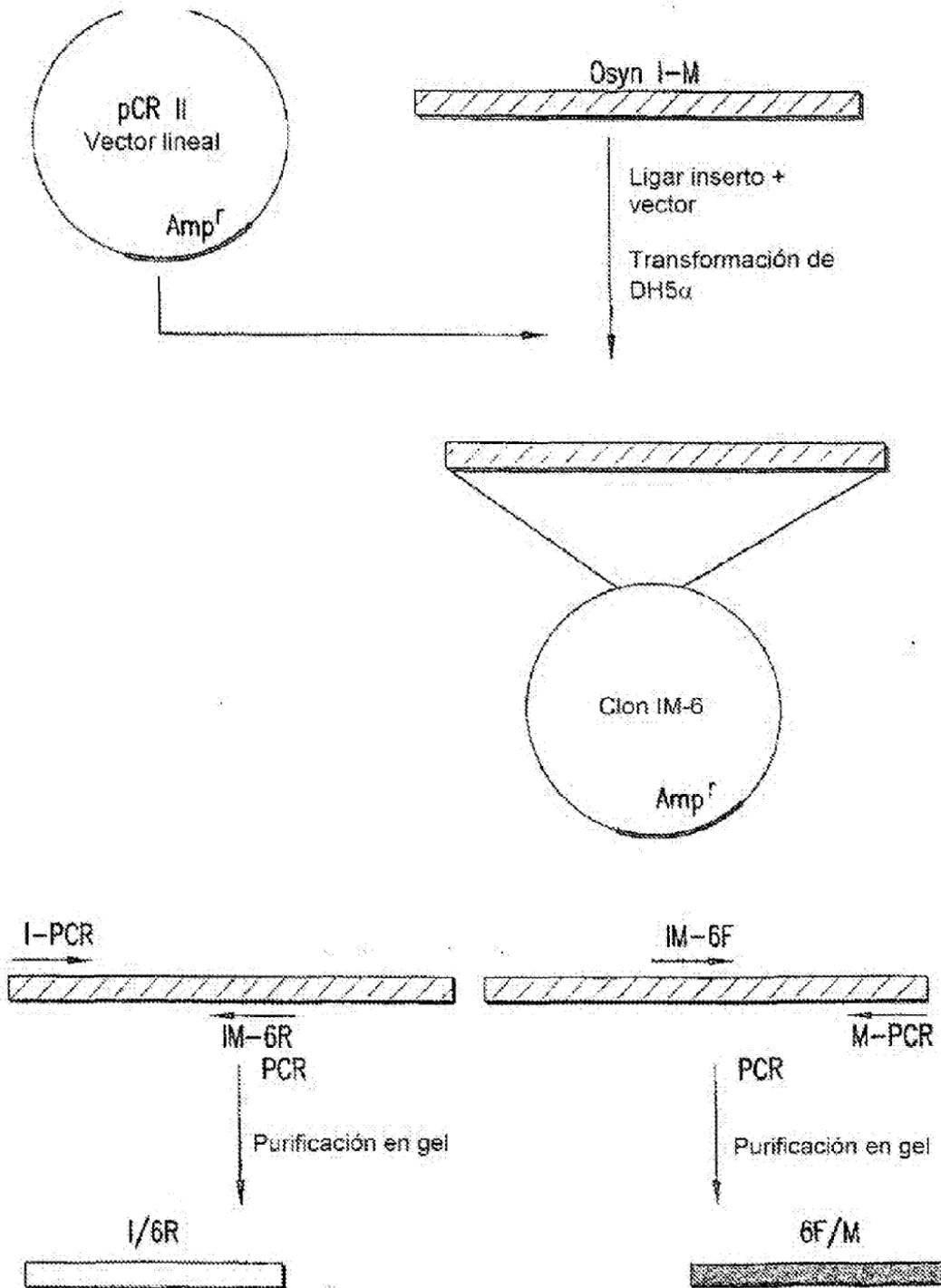


FIG.4E

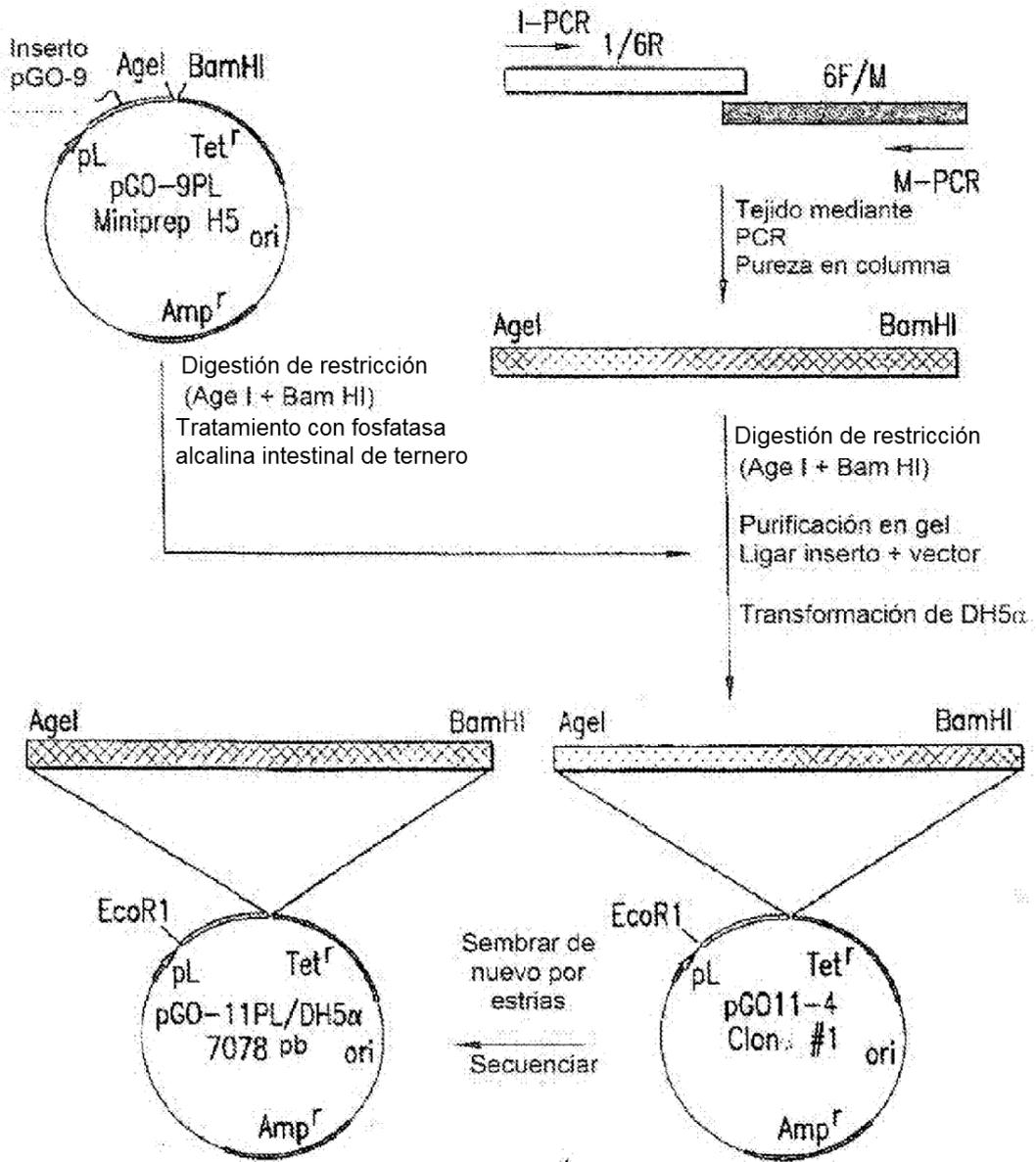


FIG.4F

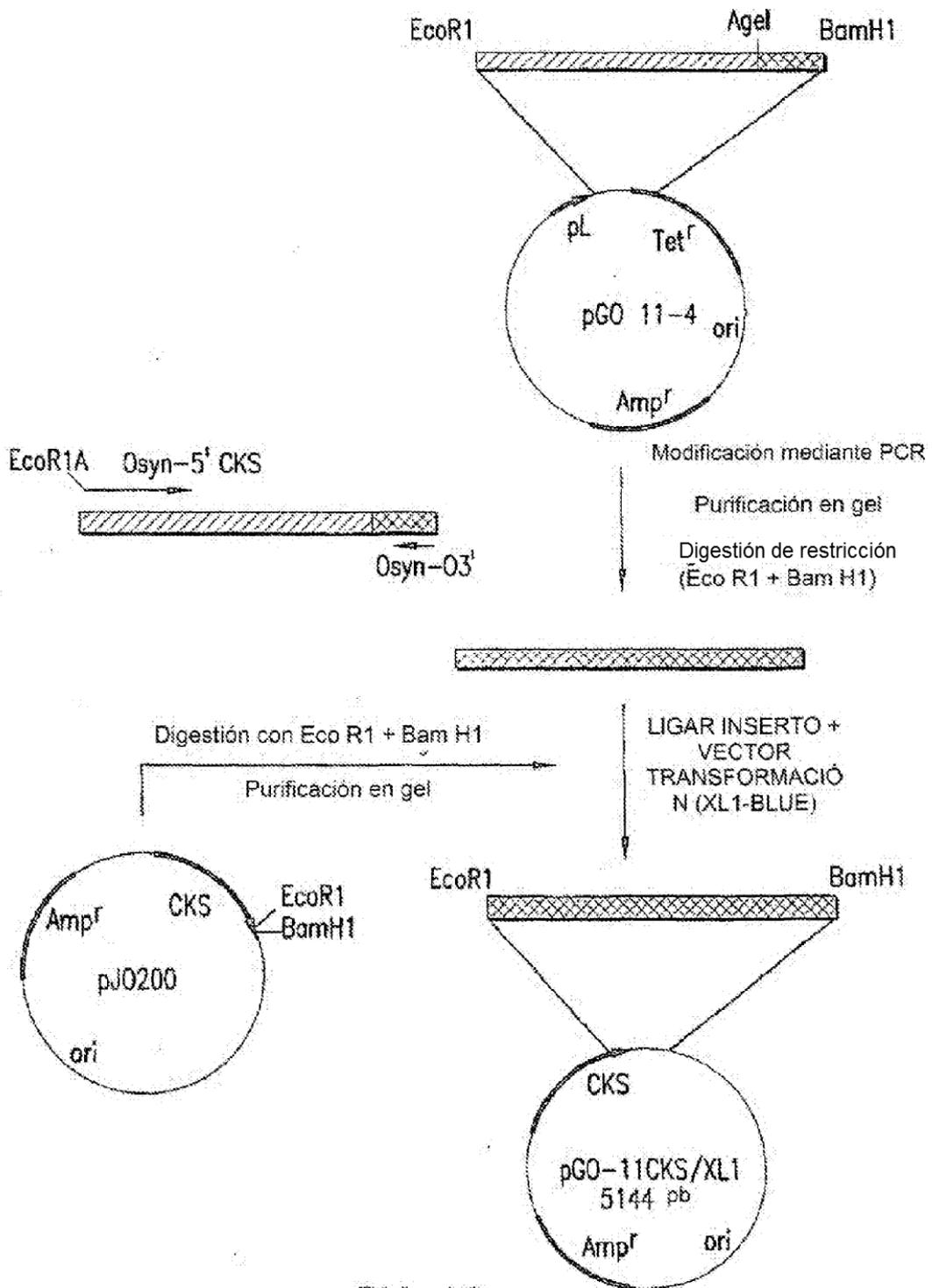


FIG.4G

↖ gp120  
 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 A T A L T V Q T H S V I K G I V Q Q D N L L R A I Q A Q Q E L 100  
 L R L S 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 215

FIG.5

↖ CKS  
 M S F V V I I P A R Y A S T R L P G K P L V D I N G K P M I V H V L E R A R E S G A E R I I V A T D 50  
 H E D V A R A V E A A G G E V C M T R A D H Q S G T E R L A E V V E K C A F S D D T V I V N V Q G D 100  
 E P M I P A T I I A Q V A D N L A Q R Q V G M T T L A V P I H N A E E A F N P N A V K V V L D A E G 150  
 Y A L Y F S R A T I P W D R D R F A E G L E T V G D N F L R H L G I Y G Y R A G F I R R Y V N W Q P 200  
 S P L E H I E M L E Q L R V L W Y G E K I H V A V A Q E V P G T G V D T P E D L D P S T N S I G G D 250  
 ↖ gp120  
 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 I G T H R E K R A V G L G M L F L 300  
 ↖ gp41  
 G V L S A A G S T M G A 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 L R L S V 350  
 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 N T T N I 400  
 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 E W A S L 450  
 W N W L D I T K W L 460

FIG.6

↖gp120  
 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  
 ↖gp41  
 G M L F L G V L S A A G S T M G A 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 O I P T R Q Q S E A E T P G R T G E 245

FIG.7

↖CKS  
 M S F V W I I P A R Y A S T R L P G K P L V D I N G K P M I V H V L E R A R E S G A E R I I V A T D 50  
 H E D V A R A V E A A G G E V C M T R A D H Q S G T E R L A E V V E K C A F S D D T V I V N V Q G D 100  
 E P M I P A T I I R Q V A D N L A Q R Q V G M T T L A V P I H N A E E A F N P N A V K V V L D A E G 150  
 Y A L Y F S R A T I P W D R D R F A E G L E T V G D N F L R H L G I Y G Y R A G F I R R Y V N W Q P 200  
 S P L E H I E M L E Q L R V L W Y G E K I H V A V A Q E V P G T G V D T P E D L D P S T N S I G G D 250  
 ↖gp120  
 ↖gp41  
 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 G M L F L 300  
 G V L S A A G S T M G A 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 L R L S V 350  
 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 N T T N I 400  
 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 E W A S L 450  
 W N W L D I T K W L R N I R Q G Y O P L S L O I P T R Q Q S E A E T P G R T G E 490

FIG.8

←gp120
←gp41  
 MGGDMKDIW RNELFKYKVV RVKPFVAPT PIARPVIGTG THREKRAVGL 50  
 GMLFLGVLSA AGSTMGAAAT ALTVQTHSVI KGIVQQQDNL LRAIQAOQEL 100  
 LRLSVNGIRQ LRKRLLALET LIQNQQLLNL WGCKGRLICY TSVKINETWR 150  
 NTTNINQIWG NLTWQEWDOQ IDNVSSTIYE EIQAQVQQE QNEKKLLELD 200  
 EWASLWNWLD ITKWLRNIRQ GYQPLSLOIP TRQOSEAETP GRTGEGGGDE 250  
 GRPRLIPSPQ GFLPLLYTDL RTIILWSYHL LSNLISGTQT VISHLRLGLW 300  
 ILGQKIIDAC RICA AVIHYW LQELOKSATS LIDTFAVAVA NWTDDIILGI 350  
 QRLGRGILNI PRRVRQGFER SLL 373

FIG.9

↖CKS  
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERTIVATD 50  
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTIVINVQGD 100  
 EPMIPATIIR QVADNLAQRQ VGM TTLAVPI HNAEEAFNPN AVKVV LDAEG 150  
 YALYFSRATI PWDRORFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRAG FIRRYVNWQP 200  
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEVPTGTGVDTPEDL DPSTNSIGGD 250  
 ↖gp120  
 MKDIWRNELF KYKVV RVKPF SVAPTP IARP VIGTGTHREK RAVGLGMLFL 300  
 ↖gp41  
 GVL SAAGSTM GAAATALTVQ THSVIKGIVQ QQDNLLRAIQ AQQELLRLSV 350  
 WGI RQLRARI LALETLIQNO QLLNLWGCKG RLICYTSVKW NETWRNTTNI 440  
 NQIWGNLTWQ EWDQQIDNVS STIYEEIQKA QVOQEQNEKK LLELDEWASL 450  
 WNWLDITKWL RNIROGYQPL SLOIPTRQGS EAETPGRTGE GCGDEGRPRL 500  
 IPSPGGFLPL LYD LRTIIL WSYHLLSNLI SGTQTVISHL RLGLWILGQK 550  
 ITDACRICA AVIHYWLQELQ KSATSLIDTF AVAVANWTDD IILGIQRLGR 600  
 GILNIPRRVR QGFERSLL 618

FIG.10

↖CKS  
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERIIVATD 50  
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVQGD 100  
 EPMIPATIIR QVADNLAQRQ VGMTTLAVPI HNAEEAFNPN AVKVVLD AEG 150  
 YALYFSRATI PWRDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRSG FIRRYVNWQP 200  
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEVP GTGVDTPEDL DPSTNSMEGE 250  
 ↖gp120  
 LTCNSTVTSI IANIDSDGNO TNITFSAEVA ELYRLELGDY KLIEVTPIGF 300  
 ↖gp36  
 APTKEKRYSS APVRNKRGVF VLGFLGFLAT AGSAMGAASL TLSAQSRILL 350  
 AGIVQQQQQL LDVVKRQEM LRLTVWGTKN LQARVTATEK YLKDQAQLNS 400  
 WCAFRQVCH TTPWVWVDSL TPDWVNMWQ EWEKRVHYLE ANISQSLEQA 450  
 QIQQEKMYE LQKLNS 466

FIG. 11

┌CKS  
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERIIVATD 50  
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVQGD 100  
 EPMIPATIIR QVADNLAQRQ VGMATLAVPI HNAEEAFNPN AVKVVLD AEG 150  
 YALYFSRATI PWDRDRFAEG LETVGDNFLR HLGTYGYRAG FIRRYVNWQP 200  
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAOEVP GTGVDTPEDP STALMKIPGD 250  
 ┌gp120  
 PGGDMRDNW RSELYKYKV KIEPLGVAPT KAKRRVVORE ┌gp41  
 KRAVGICALF 300  
 LGFLGAAGST MGAASMTLV QARQLLSGIV QQQNLLRAI EAQQHLLQLT 350  
 VWGIKQLQAR ILAVERYLKD QQLLGIWGCS GKLICTTAVP WNASWSNKSL 400  
 EQIWNMTWM EWDREINNYT SLIHSLTEES ONQOEKNEQE LLELDKWVNR 450  
 VROGYSPLSF QTHLP IPRGP DRPEGIEEEG GERDRDRSIR LVNGSLALIW 500  
 DDLRSLCLFS YHRLRDLILI VTRIVELLGR RGWEALKYWW NLLQYWSQEL 550  
 KNSAVSLLNA TAIVAEGTD RVIEVVOGAY RAIRHIPRRI ROGLERILL 599

FIG.12

←CKS  
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERTIVATD 50  
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVOGD 100  
 EPMIPATIIR QVADNLAQRQ VGMATLAVPJ HNAEEAFNPN AVKVVLD AEG 150  
 YALYFSRATI PWDRDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRAG FIRRYVNWQP 200  
 SPLEHIEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEVV GTGVDTPEDP STALMKIPGD 250  
 ←gp120 (HXB2R) ←gp41 (HXB2R)  
 PGGDMRDNW RSELYKYKVV KIEPLGVAPT KAKRRVVQRE KRAVGIGALF 300  
 LGFLGAAGST MGAASMTLTV QARQLLSGIV QQQNLLRAI EAQQHLLQLT 350  
 VWGIKQLQAR ILAVERYLKD QQLLGIWCCS GKLICTTAVP WNASWSNKSL 400  
 EQIWNMTWM EWDREINNYT SLIHSLIEES ONQCEKNEQE LLELDKVVNR 450  
 VRQYSPLSF QTHLP IPRGP DRPEGIEEEG GERDRDRSIR LVIGGDMKDI 500  
 ←gp120 (HAM112) ←gp41 (HAM112)  
 WRNELFKYKV VRVKPFSVAP TPIARPVIGT GTHREKRAVG LGMLFLGVLS 550  
 AAGSTMGAAA TALTVQTHSV IKGIVQQQDN LLRATQAQOE LLRLSVWGIR 600  
 QLRARLLALE TLIQNQQLLN LWGCKGR LIC YTSVKWNETW RNTTNINQIW 650  
 GNLTWQEWQ QIDNVSSTIY EEIQKAQVQQ EQNEKKLLEL DEWASLWNWL 700  
 DITKWL RNIR OGYQPLSLQI PTRQOSEAET PGRTGE 736

FIG.13

CKS  
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERIIVATD 50  
 HEDVARAVEA AGGEVCMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSD DTVIVNVQGD 100  
 EPMIPATIIR QVADNLAQRQ VGMATLAVPI HNAEEAFNPN AVKVVLD AEG 150  
 YALYFSRATI PWORDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRAG FIRRYVNNQP 200  
 SPLEHTEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAGEVP GTGVDTPEDP STALMKIPGD 250  
 gp120 (HXB2R) gp41 (HXB2R)  
 PGGGDMRDNW RSELYKYKVV KIEPLGVAPT KAKRRYVQRE KRAVGIGALF 300  
 LGFLGAAGST MGAASMTLV QARQLLSGIV QQQNLLRAI EAQQHLLQLT 350  
 VWGIKQLQAR TLAVERYLKD QQLLGIWGCS GKLICTTAVP WNASWSNKSL 400  
 EQIWNMTWM EWDREINNYT SLIHS LIEES ONQOEKNEOE LLELDKWWNR 450  
 VROGYSPLSF QTHLP IPRGP DRPEGIEEEG GERDRDRSIR LVIGGDMKDI 500  
 gp120 (HAM112) gp41 (HAM112)  
 WRNELFKYKV VRVKPFSVAP TPIARPVIGT GTHREKRAVG LGMLFLGVLS 550  
 AAGSTMGAAA TALTVQTHSV IKGIVQQODN LLRAIQAOQE LLRLSVWGI R 600  
 QLRARLLALE TLIQNQQLLN LWGCKGRLIC YTSVKWNETW RNTTNINQIW 650  
 GNLTWQEWQ QIDNVSSTIY EETOKAQVOQ EQNEKKLLEL DEWASLWNWL 700  
 DITKWL 706

FIG.14

└─gp120 (HAM112) └─gp41 (HAM112)  
 MTCGDMKDIW RNELFKYKVV RVKPFVAPT PIARPVIGTG THREKRAVGL 50  
 GMLFLGVLSA AGSTMGAAAT ALTVQTHSVI KGIVQQQDNL LRAIQAQQEL 100  
 LRLSVWGIRQ LRARLLALET LIQNQQLLNL WGCKGRICY TSVKWNETWR 150  
 NTTNINQIWG NLTWQEWDOQ IDNVSSTIYE EIQKAQVQCE QNEKKLLELD 200  
 EWASLWNWLD ITKWLNRNIRQ GYQPLSLQIP TRQOSEAETP GRTGEGPGGG 250  
└─gp120 (HXB2R)  
 DMRDNWRSEL YKYKVVKIEP LGVAPTKAKR RVVQREKRAV GIGALFLGFL 300  
└─gp41 (HXB2R)  
 GAAGSTMGAA SMTLTVQARQ LLSGIVQQQN NLLRAIEAQQ HLLQLTWGT 350  
 KQLOARILAV ERYLKDQQLL GIWCCSGKLI CTTAVPWNAS WSNKSLEQIW 400  
 NNMTWMEWOR EINNYTSLIH SLIEESONOO EKNEQELLEL DKWVNRVRQG 450  
 YSPLSFQTHL PIPRGPDRPE GIEEEGGERD RDRSIRLV 488

FIG.15

CKS  
 MSFVVIIPAR YASTRLPGKP LVDINGKPMI VHVLERARES GAERTIVATD 50  
 HEDVARAVEA AGGEVOMTRA DHQSGTERLA EVVEKCAFSO DTVIVNVQGD 100  
 EPMIPATIIR QVADNLAORO VGM TTLAVPI HNAEEAFNPN AVKVV LDAEG 150  
 YALYFSRATI PWDRDRFAEG LETVGDNFLR HLG IYGYRAG FIRRYVNWQP 200  
 SPLEHTEMLE QLRVLWYGEK IHVAVAQEVV GTGVDTPEDL DPSTNSIGGD 250 gp120 (HAM112)  
 MKDIWRNELF KYKVV RVKPF SVAPTPIARP VIGTGTHREK RAVGLGMLFL 300 gp41 (HAM112)  
 GVLSAAGSTM GAAATALTVQ THSVIKGIVO QODNLLRAIQ AQQELLRLSV 350  
 WGI RQLRRL LALET LIONQ QLLNLWGCKG RLICYTSVKW NETWRNTTNI 400  
 NOTWGNLTWQ EWDQQIDNVS STIYEEIQKA QVQEQNEKK LLELDEWASL 450  
 NNWLDITKWL RNIROGYOPL SLQIPTRQQS EAETPGRTGE GGGSRLLALE 500 conector -IDR (HAM112)  
 TLIONQQLLN LWGCKGRLIC YTSVKW 526

FIG.16

gp120 (HAM112) gp41 (HAM112)  
 MFGGDMKDIW RNELFKYKVV RVKPF SVAPT PIARPVIGTG THREKRAVGL 50  
 GMLFLGVLSA AGSTMGAAAT ALTVOTHSVI KGIVQODNL LRAIQAQQEL 100  
 LRLSVWGIRO LRARLLALET LIONQQLNL WGCKGRLICY TSVKWNETWR 150  
 NTTNINQIWG NLTWQEWDDQ IDNVSSTIYE ETQKAQVQGE QNEKKLLELD 250  
 EWASLNNWLD ITKWL RNIRO GYOPLSLQIP TRQQSE AETP GRTGEGGSR 250 conector -IDR (HAM112)  
 LLALET LION QLLNLWGCK GRLICYTSVK W 281

FIG.17

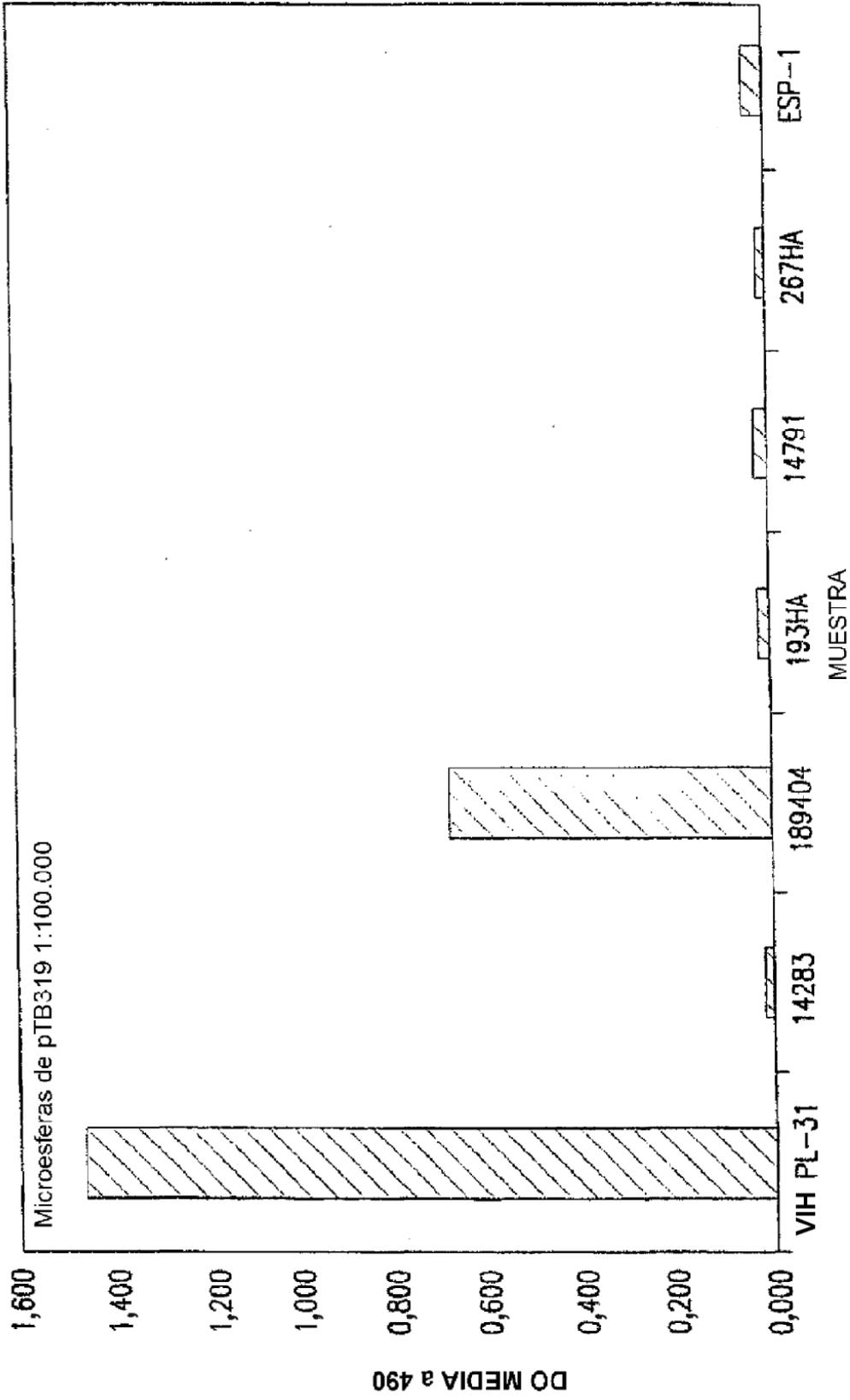


FIG.18

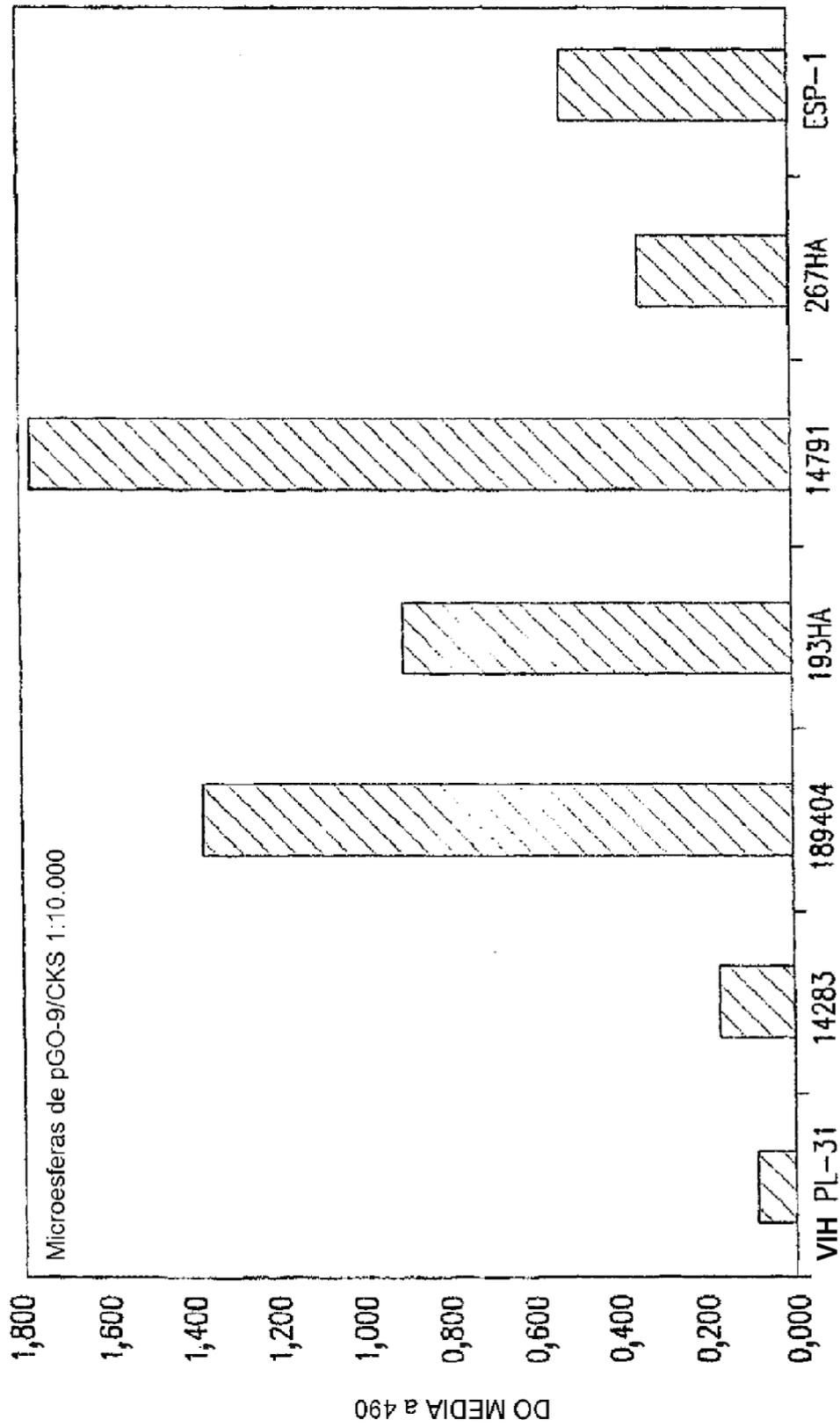


FIG.19

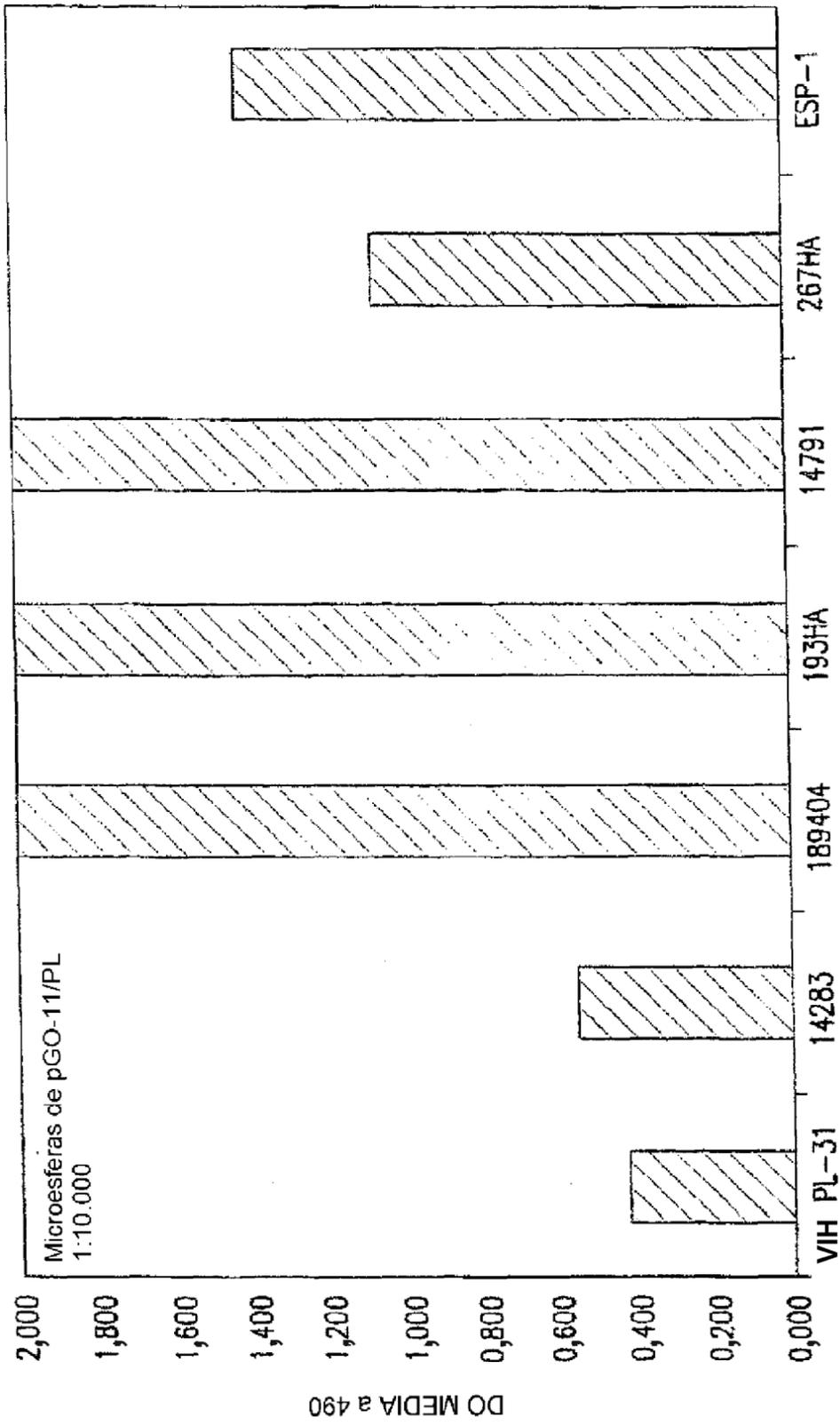


FIG.20

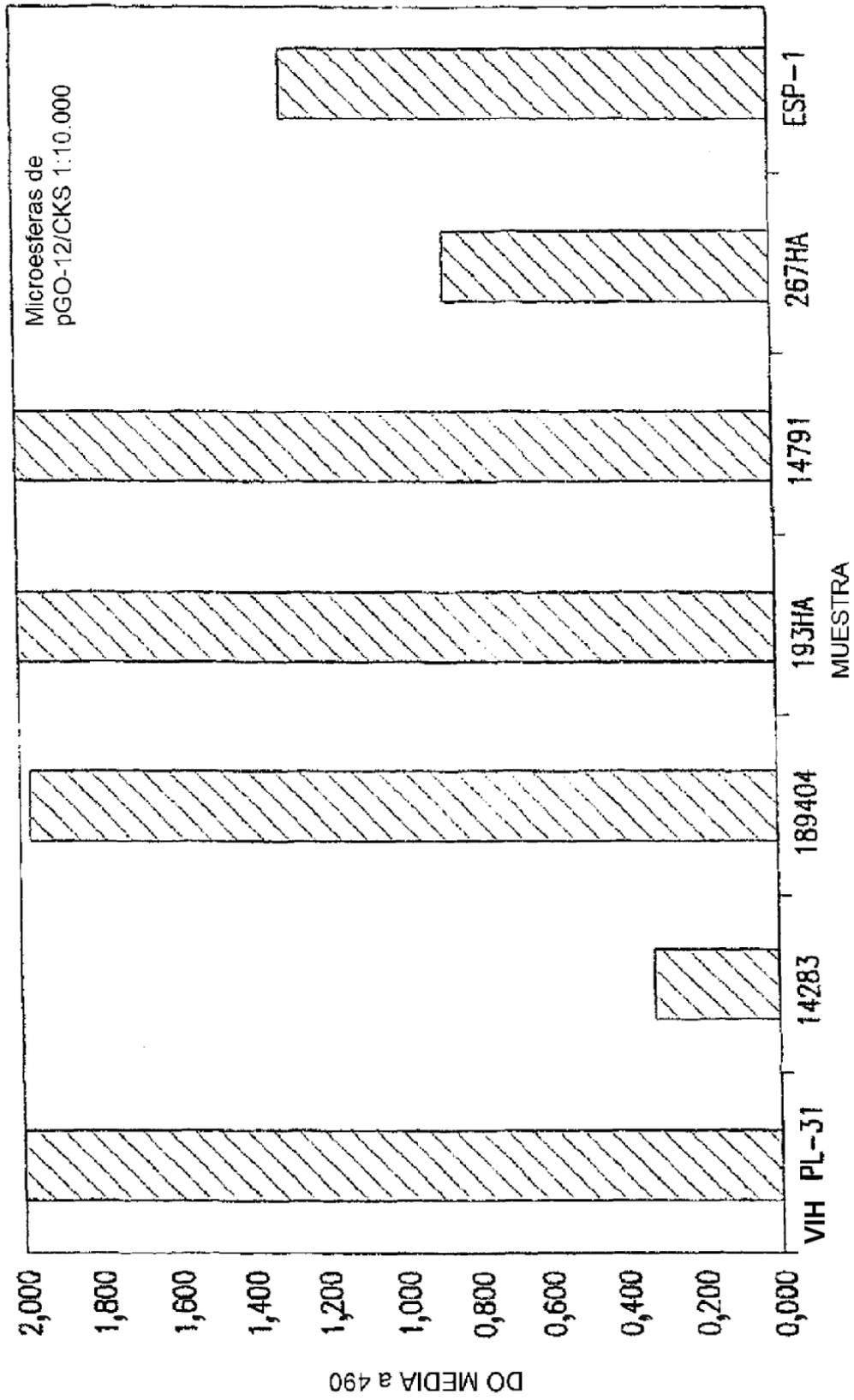


FIG.21

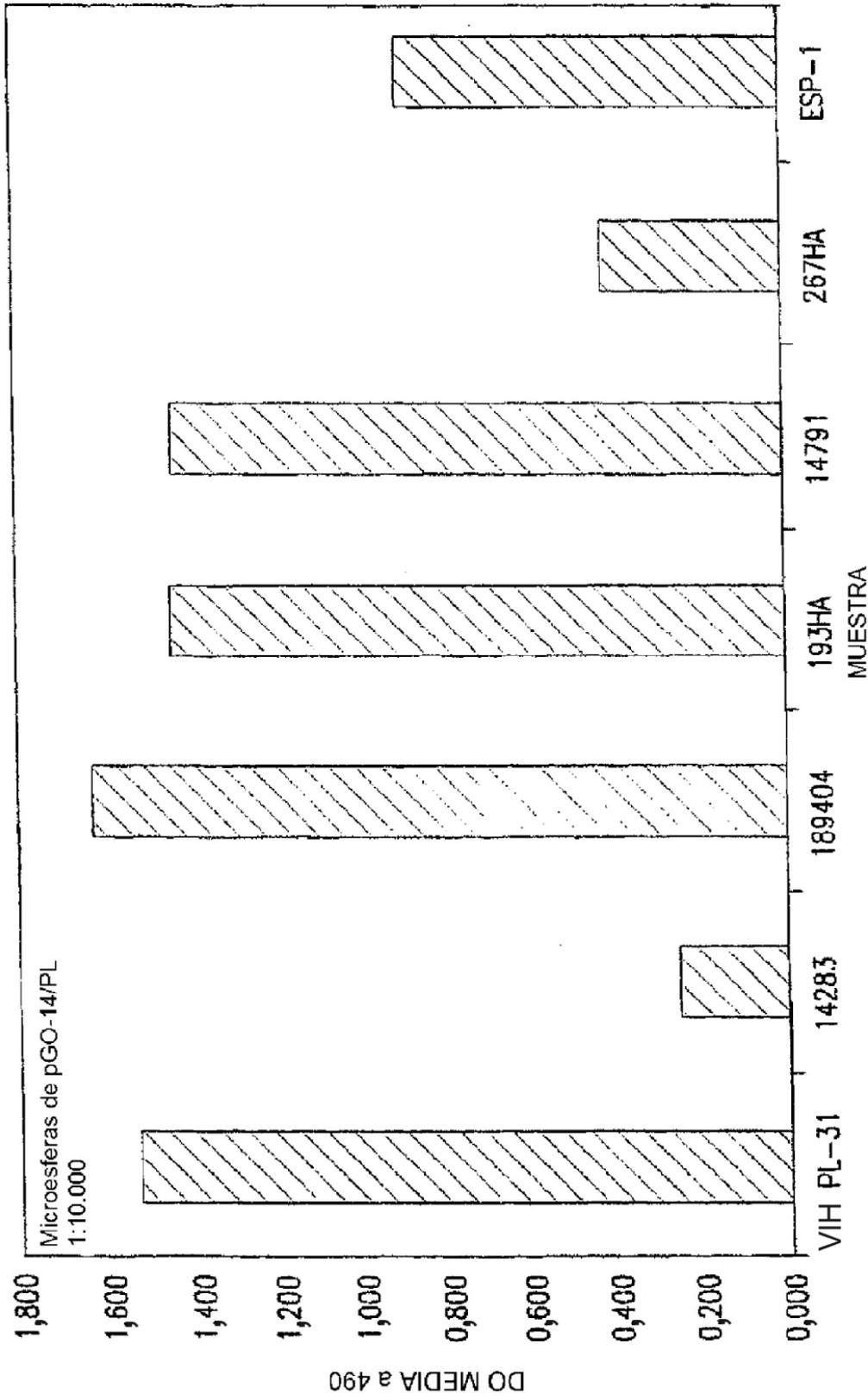


FIG.22

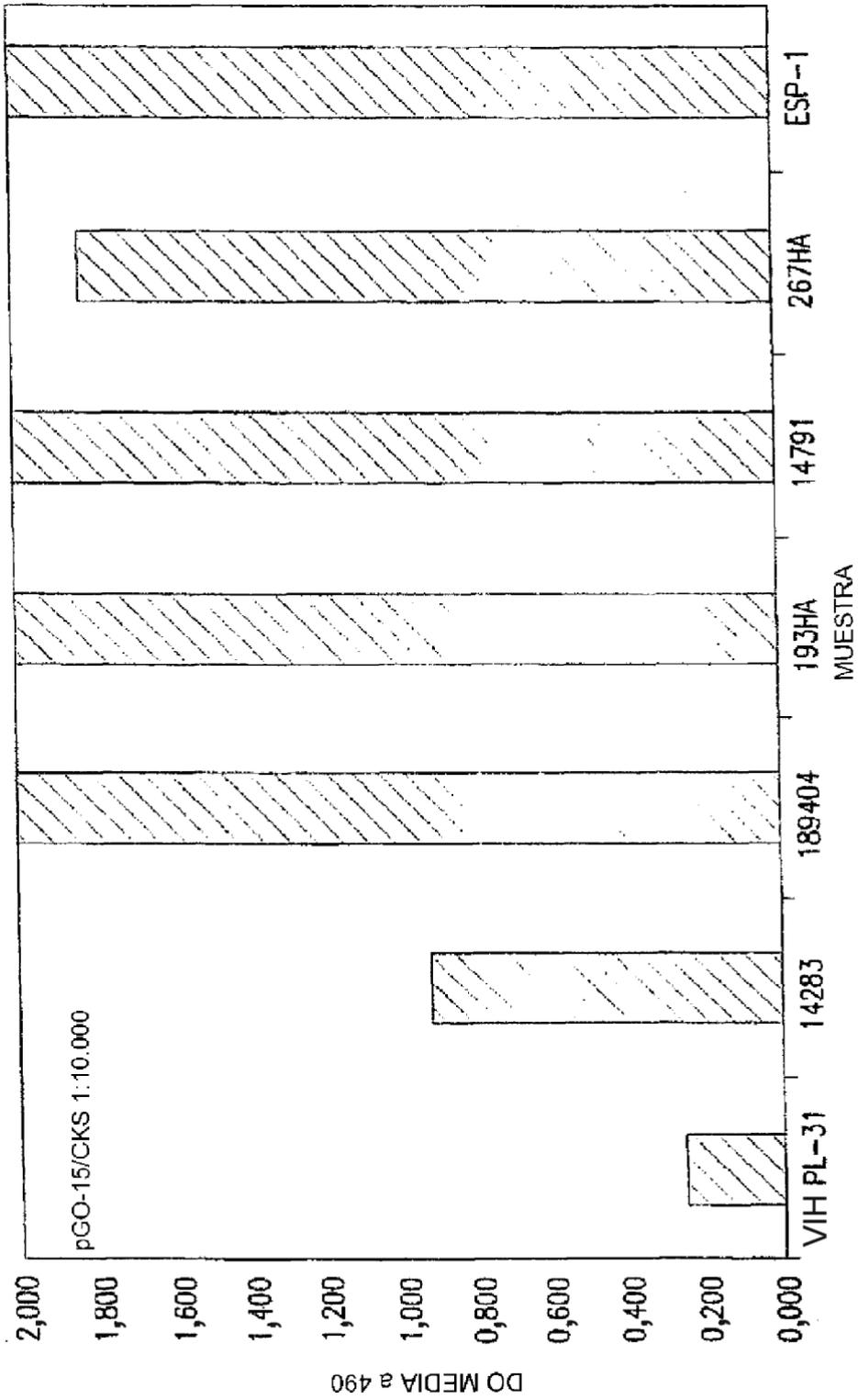


FIG.23