(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 286 030**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **00949555 .7**
(86) Fecha de presentación : **21.06.2000**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1185713**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **13.03.2002**

(54) Título: **Procedimiento de búsqueda de una resistencia frente a las antiproteasas de una cepa del virus VIH-2 procedente de una muestra biológica tomada de un paciente.**

(30) Prioridad: **21.06.1999 FR 99 07855**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

(73) Titular/es: **BIO MERIEUX**
69280 Marcy l'Etoile, FR
ASSISTANCE PUBLIQUE, HOPITAUX DE PARIS

(72) Inventor/es: **Telles, Jean-Nol;**
Brun-Vezinet, Françoise y
Descamps, Diane

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de búsqueda de una resistencia frente a las antiproteasas de una cepa del virus VIH-2 procedente de una muestra biológica tomada de un paciente.

La presente invención se refiere a un procedimiento de búsqueda de una resistencia del virus VIH-2 frente a un tratamiento mediante una antiproteasa, en un paciente contaminado por el VIH-2, así como a sondas nucleotídicas utilizables en una búsqueda de este tipo.

Dos virus son la causa del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida): VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 está presente en todo el mundo mientras que el VIH-2 está presente principalmente en África occidental.

Desde 1996 se utilizan ampliamente tratamientos antivirales eficaces en los países desarrollados en los que el virus presente es el VIH-1. El coste de estos tratamientos no permite su utilización en los países en vías de desarrollo en los que está presente el VIH-2.

Los tratamientos antirretrovirales se dividen en 3 clases: antiproteasa (indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir y amprenavir), inhibidores nucleosídicos de transcriptasa inversa, denominada RT (zidovudina, didanosina, zalcitabina, lamivudina, estavudina, abacavir, FTC y adefovir) e inhibidores no nucleosídicos de RT (nevirapina, delavirdina y efavirenz). Estos tratamientos se realizan a menudo conjuntamente; en ese caso se habla de multiterapias.

Las antiproteasas inducen mutaciones primarias que confieren un grado elevado de resistencia pero alteran la capacidad de replicación del virus. El virus necesita seleccionar mutaciones secundarias para ser resistente y a la vez poder replicarse activamente. Además, se han descrito mutaciones de la transcriptasa inversa en el caso de la utilización conjunta de inhibidores nucleosídicos de la RT.

Durante el tratamiento de la infección por VIH-1, especialmente si la concentración circulante de los agentes de tratamiento es insuficiente, la replicación viral no resulta lo suficientemente inhibida o vuelve a aumentar por encima del umbral de detección de las técnicas de carga viral disponibles (la "carga viral" es la medida de la cantidad de los genomas de virus circulantes). Debido a la tasa de error elevada de la transcripción inversa, esto se traduce en la aparición de mutaciones en los genes que son la diana de los tratamientos: la proteasa y la transcriptasa inversa. Ciertas mutaciones conllevan la aparición de resistencias, en diversos grados, frente a agentes antivirales. Se llega a situaciones de fracaso virológico en del 20 al 40% de los pacientes tratados mediante las multiterapias puestas en práctica actualmente.

La detección de virus resistentes frente a una o varias moléculas en un paciente antes del tratamiento o durante un nuevo aumento de la carga viral permite elegir la mejor asociación de moléculas para tratar el VIH-1.

Por ejemplo, se describen procedimientos de identificación de mutantes del virus VIH-1 resistentes frente a los tratamientos mediante antiproteasas que comprenden la identificación de mutaciones en la secuencia peptídica de la proteasa del VIH-1 implicada en la resistencia en el documento WO96/08580, por Melnick *et al*. (Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 1998, 42(12): 3256-65) y Maschera *et al*. (Journal of Virology, 1995, 69(9): 5431-6). Estos procedimientos se basan en la construcción y la exploración de una biblioteca de variantes de proteasas del VIH-1 que comprenden diferentes mutaciones.

Igualmente se han desarrollado otros procedimientos, basados en el análisis de la sensibilidad de una enzima de restricción, Hind II (Vasudevachari *et al*. (Anti Microbial Agent and Chemotherapy, 1996, 40(11): 2535-41).

Estos procedimientos han permitido la identificación de mutantes, por ejemplo en la posición 82 ó 90 que presentan una resistencia aumentada frente a los inhibidores de proteasas.

Actualmente no hay datos publicados referentes a la presencia de mutaciones en el genoma del VIH-2, debidas a la utilización de antiproteasas.

Los tratamientos mediante los agentes antiproteasas, activos para VIH-1, también lo son para VIH-2. No obstante, no hay ningún procedimiento disponible para ayudar al médico a determinar la resistencia frente a los tratamientos mediante antiproteasas en los pacientes contaminados por el VIH-2.

Se conoce la secuencia de ácidos aminados de la proteasa de VIH-2. En la presente solicitud, la numeración de los ácidos aminados de esta secuencia puede deducirse a partir de la descrita en Human Retroviruses and Aids, 1997, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, Nuevo México, Capítulo II, págs. B10 y B11. El primer ácido aminado de la secuencia de la proteasa, que se considera como la posición 1 en la presente solicitud, es la prolina en la posición 86 de la poliproteína PoL de la cepa ROD.

Actualmente se ha descubierto que los tratamientos con antiproteasas son susceptibles de hacer aparecer mutaciones en las posiciones 45, 54, 64, 84 y 90, así como en las posiciones 10, 46 y 82 de la proteasa de VIH-2, y que las

cepas virales mutadas que aparecen de ese modo son generalmente resistentes frente a por lo menos uno de los agentes antiproteasas utilizados.

El objeto de la presente invención es por tanto un procedimiento de búsqueda de una eventual resistencia de una cepa viral VIH-2 frente a un tratamiento mediante un agente antiproteasa.

En una fase preliminar de la búsqueda, se trata de un procedimiento en el que:

a) se busca, según los procedimientos conocidos, la presencia de por lo menos una mutación en una de las posiciones 45, 54, 64, 84 y 90 o en una de las posiciones 10, 46 y 82 de la secuencia proteica de la proteasa de dicha cepa viral procedente de una muestra biológica tomada de un paciente contaminado por VIH-2,

b) se selecciona, de las mutaciones encontradas en a), las que, tras la clonación en un virus VIH-2, no impiden que el clon viral obtenido se multiplique en cultivo en presencia de dicho agente antiproteasa, y

c) en el caso en el que se selecciona por lo menos una mutación en la etapa b), se concluye la existencia de una resistencia frente a dicho agente antiproteasa mencionado en b).

Se selecciona, de entre las mutaciones halladas en a), las que, cuando están presentes en un gen clonado en un virus VIH-2, confieren al clon viral la propiedad de no resultar significativamente afectado en su capacidad de multiplicarse en presencia de dicho agente antiproteasa. Para poner en práctica la etapa b), puede trabajarse tal como se indica a continuación. Las mutaciones que van a someterse a prueba se introducen individualmente en un clon de virus mediante mutagénesis dirigida según el procedimiento descrito en el artículo de Kemp *et al*, J. Virol., 72(6), págs. 5093-5098, 1998. Los clones así obtenidos se ponen en cultivo con un clon de tipo natural del virus como referencia, es decir no mutado, en presencia de los diferentes fármacos antiproteasas susceptibles de actuar contra el virus VIH-2. Una medición de la CI_{50}, por ejemplo con una prueba colorimétrica (véase la publicación de Kemp mencionada anteriormente), permite determinar la importancia de la mutación (menor o mayor) frente a diferentes fármacos sometidos a prueba. De ese modo pueden seleccionarse las mutaciones que permiten al virus multiplicarse en presencia de un agente antiproteasa, haciendo surgir estas mutaciones cepas resistentes frente a esta antiproteasa.

Obviamente, en el caso previsto en c), debe considerarse el tratamiento del paciente, en el futuro, con un agente antiproteasa distinto a aquel para el que se ha revelado de este modo la existencia de una resistencia en el paciente considerado.

En el caso en el que la etapa b) no ha permitido seleccionar una mutación encontrada en la etapa a), puede concluirse que la mutación considerada no ha inducido una resistencia del virus VIH-2 frente al agente antiproteasa sometido a prueba en el paciente considerado.

Resulta evidente que, cuando la etapa b) ha permitido identificar una mutación que genera una resistencia frente a un agente antiproteasa dado, no es necesario poner en práctica posteriormente la etapa b) del procedimiento descrito anteriormente. En ese caso, la etapa a) es suficiente ya que, habiéndose establecido la relación entre la mutación y la resistencia frente al agente antiproteasa, de una vez para todas, puede pasarse directamente a la etapa c) y concluir la existencia de una resistencia frente al agente antiproteasa estudiado.

La invención se refiere especialmente a un procedimiento de búsqueda de una eventual resistencia de una cepa viral VIH-2 frente a un tratamiento mediante un agente antiproteasa, en el que se busca la presencia de por lo menos una mutación seleccionada de las mutaciones siguientes:

K 45 R, I 54 M, I 64 V, I 84 L y L 90 M, o bien incluso V 10 I, I 46 V e I 82 M,

en la secuencia proteica de la proteasa de dicha cepa viral, y en el que se concluye la existencia de dicha resistencia en caso de presencia de dicha mutación o de dichas mutaciones.

La representación convencional utilizada en la presente solicitud para describir una mutación es la siguiente: el número indica la posición en la secuencia de ácidos aminados de la proteasa de VIH-2. La letra situada a la izquierda del número indica el ácido aminado de la cepa de tipo natural según la clasificación internacional, con el código de una letra. La letra situada a la derecha del número indica el ácido aminado, según la misma clasificación, que resulta de la aparición de una mutación.

Por "cepa" de tipo natural, se entiende una cepa de virus que no se ha mutado tras un tratamiento con una antiproteasa.

Para buscar una mutación de la secuencia proteica de la proteasa de la cepa viral considerada, se trabaja preferentemente buscando una mutación correspondiente en la secuencia nucleotídica del gen de dicha proteasa. La búsqueda de estas mutaciones puede realizarse en el ADN o el ARN. Obviamente, en esta búsqueda de una mutación en la secuencia proteica mediante búsqueda de mutación en la secuencia nucleotídica, se tendrá en cuenta la degeneración del código genético, es decir que un mismo ácido aminado puede estar codificado por codones diferentes. Puede realizarse

esta búsqueda de mutación en la secuencia nucleotídica según los procedimientos conocidos, en particular mediante las técnicas de hibridación o de secuenciación.

En un primer modo de realización de la invención, se pone en práctica un procedimiento de hibridación con ayuda de sondas específicas para la búsqueda de la o las mutación/mutaciones.

Un modo de realización particular que utiliza un procedimiento de hibridación consiste en obtener un polinucleótido que contiene todo o parte del gen de la proteasa, y que comprende la secuencia de interés correspondiente a la región que contiene la mutación que se busca. Un polinucleótido de este tipo puede obtenerse especialmente mediante amplificación enzimática. El procedimiento utilizado comprende entonces las etapas que consisten a poner en contacto dicho polinucleótido con una sonda nucleotídica, fijada o susceptible de fijarse sobre un soporte sólido, y que puede hibridarse específicamente con un polinucleótido de este tipo únicamente en el caso en el que el polinucleótido comprende la mutación estudiada; después revelar, según los procedimientos conocidos, la presencia eventual del polinucleótido, fijado al soporte sólido especialmente por medio de la sonda de captura. Para ello, puede someterse el soporte sólido a una etapa de lavado, tras lo cual se revela la presencia del polinucleótido, en estado fijado sobre el soporte, o bien mediante un procedimiento físico, o bien con ayuda de un marcador apropiado.

La fijación de la sonda puede realizarse directamente mediante adsorción o mediante covalencia. La fijación también puede realizarse indirectamente por medio de una reacción del tipo ligando/antiligando tal como el par biotina/estreptavidina o hapteno/anticuerpo, estando el antiligando fijado, por ejemplo, sobre el soporte sólido y estando el ligando fijado sobre la sonda.

El polinucleótido también puede marcarse durante la etapa de amplificación enzimática, por ejemplo utilizando un nucleósido trifosfato marcado para la reacción de amplificación. El nucleótido marcado será un desoxirribonucleótido en los sistemas de amplificación que generan un ADN, tales como la PCR, o un ribonucleótido en las técnicas de amplificación que generan un ARN, tales como las técnicas TMA o NASBA.

El polinucleótido también puede marcarse tras la etapa de amplificación, por ejemplo hibridando una sonda marcada según la técnica de hibridación de tipo sándwich descrita en el documento WO 91/19812.

Un modo particular de marcaje de polinucleótidos se describe en la solicitud FR 98 07870 del solicitante.

Como variante, puede prepararse el polinucleótido que comprende todo o parte del gen de la proteasa mediante amplificación enzimática, procediendo mediante alargamiento de cebadores que comprenden un ligando. El polinucleótido obtenido, que comprende por tanto el ligando, puede fijarse sobre el soporte sólido mediante interacción con un antiligando correspondiente. A continuación se pone en contacto el soporte sólido, sobre el cual está fijado el polinucleótido, con por lo menos una sonda que puede fijarse sobre el polinucleótido de manera específica, únicamente si contiene la mutación estudiada o buscada. En el caso en el que esta mutación esté presente, la sonda se encuentra fijada al soporte sólido por medio del híbrido que forma con el propio polinucleótido fijado. Por tanto falta revelar la presencia del híbrido así formado, según los procedimientos conocidos.

En otro modo de realización, se utiliza un procedimiento de hibridación que comprende las etapas que consisten en amplificar enzimáticamente todo o parte del gen de la proteasa con ayuda de cebadores que llevan un ligando para generar un polinucleótido que comprende por lo menos un ligando, en fijar el polinucleótido sobre un soporte sólido mediante interacción con un antiligando tal como se describió anteriormente, en poner en contacto dicho polinucleótido fijado con por lo menos una sonda que puede hibridarse específicamente con el mismo, y en revelar el híbrido eventualmente formado. La sonda sólo debe hibridarse si el polinucleótido contiene la mutación buscada.

Pueden considerarse otros procedimientos de detección mediante hibridación tal como se describe en Kricka *et al*., Clinical Chemistry, 45(4), págs. 453-458, 1999, o Keller G.H. *et al*., DNA Probes, 2ª Ed., Stockton Press, 1993, secciones 5 y 6, págs. 173-249.

El término "soporte" sólido tal como se utiliza en la presente memoria incluye todos los materiales sobre los que puede inmovilizarse un polinucleótido. Pueden utilizarse materiales de síntesis, o materiales naturales, eventualmente modificados químicamente, como soporte sólido, especialmente los polisacáridos tales como los materiales basados en celulosa, por ejemplo papel, derivados de celulosa tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa, o dextrano; polímeros, copolímeros, especialmente basados en monómeros de tipo estireno, fibras naturales tales como el algodón, y fibras sintéticas tales como el nilón; materiales minerales tales como la sílice, el cuarzo, vidrios, cerámicas; látex; partículas magnéticas; derivados metálicos, geles, etc. El soporte sólido puede estar en forma de placa de microtitulación, de membrana tal como se describe en la solicitud WO 9412670, de partícula o de biochip.

Por "biochip", se entiende un soporte sólido de dimensión reducida en el que se fija una multitud de polinucleótidos en posiciones predeterminadas.

Ejemplos de estos biochips se facilitan por ejemplo en las publicaciones de G. Ramsay. Nature Biotechnology, 16, págs. 40-44, 1998: F. Ginot, Human Mutation, 10, págs. 1-10. 1997; J. Cheng *et al*, Molecular diagnosis, 1(3), págs. 183-200, 1996; T. Livache *et al*, Nucleic Acids Research, 22(15), págs. 2915-2921, 1994; J. Cheng *et al*, Nature Biotechnology, 16, págs. 541-546, 1998. La propiedad principal del soporte sólido debe ser conservar las características de

hibridación de las sondas sobre la diana y permitir un ruido de fondo mínimo para el procedimiento de detección. Una ventaja de los biochips es que simplifican la utilización de numerosas sondas que tienen en cuenta el polimorfismo del virus en las zonas próximas a la mutación que va a buscarse. Un biochip que permite verificar la presencia o ausencia de mutaciones puede realizarse según el procedimiento descrito por Kozal M. *et al*. Nature Medicine, 2, págs. 753-759, 1996, en función de las alineaciones de las secuencias conocidas para las diferentes cepas del VIH-2.

Por "marcador", se entiende un trazador que puede generar una señal. Una lista no limitativa de estos trazadores comprende las enzimas que producen una señal detectable por ejemplo mediante colorimetría, fluorescencia o luminiscencia, tales como la peroxidasa del rábano, la fosfatasa alcalina, la betagalactosidasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; los cromóforos tales como los compuestos fluorescentes, luminescentes o colorantes; los agrupamientos con densidad electrónica detectables mediante microscopía electrónica o mediante sus propiedades eléctricas tales como la conductividad, mediante los procedimientos de amperometría o de voltimetría, o mediante mediciones de impedancia; los agrupamientos detectables mediante procedimientos ópticos tales como la difracción, la resonancia de plasmón superficial, la variación de ángulo de contacto o mediante procedimientos físicos tales como la espectroscopia de fuerza atómica, el efecto túnel, etc.; las moléculas radioactivas tales como ^{32}P, ^{35}S o ^{125}I.

Pueden utilizarse sistemas de amplificación de la señal tal como se describe en el documento WO/9508000 y en este caso, la reacción preliminar de amplificación enzimática puede no ser necesaria.

El término "cebador" designa una secuencia oligonucleotídica que puede hibridarse con una secuencia nucleica de interés y servir como punto de partida para una reacción de alargamiento enzimático para producir un fragmento de ácido nucleico complementario de una diana de interés, tal como el gen de la proteasa o una parte de este gen. El cebador tiene un tamaño comprendido por ejemplo entre 5 y 50 nucleótidos, en particular entre 10 y 30 nucleótidos. Preferentemente, los cebadores se seleccionarán en regiones conservadas del virus VIH-2 para permitir la amplificación de todas las cepas del virus susceptibles de encontrarse en un paciente, y por tanto hacer frente al polimorfismo inherente al virus VIH-2.

Las sondas que permiten detectar una mutación en las posiciones 45 y/o 54 y/o 64 y/o 84 y/o 90, así como las que permiten detectar una mutación en las posiciones 10 y/o 46 y/o 82 hibridándose en todo o parte del gen de la proteasa del virus VIH-2 presente en una muestra biológica, también son un objeto de la presente invención.

El término "sonda" hace referencia a una secuencia oligonucleotídica que puede hibridarse específicamente con una secuencia nucleica de interés. En este caso, al ser el objetivo de la presente invención distinguir una mutación puntual en el gen de la proteasa del VIH-2, la sonda debe permitir, en las condiciones de hibridación o de lavado predeterminadas, diferenciar una mutación puntual. El tamaño de estas sondas está comprendido entre 5 y 40 nucleótidos, y especialmente entre 9 y 25 nucleótidos. Se describen procedimientos de determinación de estas sondas por ejemplo en la solicitud de patente WO 97/27332. La sonda se construirá por ejemplo de tal manera que la posición de la mutación que va a detectarse esté sensiblemente en el centro de la sonda.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores o sondas pueden comprender nucleótidos naturales o modificados tales como fosforotioatos, H-fosfonatos, alquilfosforotioatos, o análogos de nucleótidos que contienen bases tales como la inosina o la nebularina en lugar de las bases púricas o pirimídicas presentes en los nucleótidos A, T, C, G, U.

Estos cebadores o sondas también pueden estar compuestos total o parcialmente por nucleósidos de anomería alfa o beta o por isómeros de la serie D o L, o incluso por PNA (Nielsen *et al*, Nucleic Acid Research, 21(2), págs. 197-200, 1993).

En otro modo de realización de la invención, se busca la o las mutaciones mediante secuenciación de todo o parte del gen de la proteasa.

Los diferentes procedimientos de secuenciación se conocen bien: pueden utilizarse especialmente los procedimientos de secuenciación de Sanger, los procedimientos de secuenciación que utilizan 4 pocillos para la reacción de las secuencias estudiadas con los cebadores de secuenciación marcados mediante 4 fluoróforos diferentes (Procedimiento "ABI Prism Dye Primer" de Perkin Elmer), o el procedimiento descrito en la patente US nº 5.795.722 (Visible Genetics), o bien el procedimiento que no utiliza cebadores marcados sino nucleótidos marcados (procedimiento "ABI Prism Dye Terminator", Perkin Elmer). Los procedimientos de secuenciación se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 13.

En un modo particular de realización de la invención, se busca únicamente la presencia de una o varias mutaciones dadas. En otro modo de realización de la invención, se busca a la vez la secuencia nucleotídica mutada y la secuencia nucleotídica de tipo natural (no mutada). En el caso en el que se pone en práctica un procedimiento de hibridación, se definen entonces para cada posición susceptible de mutar por lo menos dos tipos de sondas: un tipo de sondas específico de la secuencia mutada y un tipo de sondas específico de la secuencia de tipo natural. La utilización de estos dos tipos de sondas permite controlar el procedimiento, ya que por lo menos uno de los dos tipos de sondas debe reaccionar. Otra ventaja es detectar, dado el caso, la presencia a la vez de cepas mutadas y de cepas de tipo natural en un paciente.

Preferentemente, el ácido nucleico diana se somete a una reacción preliminar de amplificación enzimática para aumentar la sensibilidad de la prueba, pero puede considerarse detectar directamente el ácido nucleico diana. Los artículos de Lewis (1992. Genetic Engineering News, 12, 1-9) por una parte, y de Abramson y Myers (1993. Curr. Opin. Biotechnol., 4, 41-47), por otra parte, facilitan ejemplos de amplificación de diana. Por ejemplo, se selecciona la técnica de amplificación enzimática de las técnicas NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), TMA (Transcription Mediated Amplification), RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction), SDA (Strand Displacement Amplification) o LCR (Ligase Chain Reaction).

La búsqueda de cepas virales mutantes se realiza a partir de una muestra biológica eventualmente tratada de manera previa. Por "tratamiento previo", se entienden las diferentes etapas de tratamiento de la muestra para hacer accesible el ácido nucleico diana, es decir el gen de la proteasa, tales como por ejemplo, la lisis, la fluidificación, la concentración, la captura (véanse por ejemplo las patentes US nº 5.750.338 y US nº 5.766.849) según los procedimientos conocidos en sí mismos.

Para extraer el ARN viral, puede utilizarse por ejemplo el reactivo comercializado por la sociedad Boeringher Mannheim (High Pure Viral RNA, referencia 1858882) o el kit Quiagen (Viral RNA, referencia 29504). Se describen otros procedimientos en Maniatis *et al*., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. La muestra biológica puede ser una toma de muestras cualquiera del cuerpo humano o eventualmente una toma de muestras enriquecida mediante cultivo, tal como por ejemplo, sangre, esperma, tejido cutáneo, lavado broncoalveolar, biopsia, orina, colonias, cultivo líquido, etc.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se ha realizado un estudio sobre tres pacientes contaminados por el VIH-2. Los pacientes 1 y 2 no habían recibido nunca antiproteasas. El paciente 3 ya había recibido Ritonavir durante 8 meses, y este tratamiento se había detenido 5 meses antes del comienzo del estudio. La primera muestra estudiada se tomó antes del comienzo del tratamiento, en los pacientes 1 y 2, y 6 semanas tras el comienzo del tratamiento mediante Ritonavir en el paciente 3. En los pacientes 1 y 2, se estudiaron muestras tomadas respectivamente 2 meses y 5 meses tras el comienzo del tratamiento. Para el paciente 3, se analizaron dos muestras (8 meses y 11 meses). El tratamiento estaba compuesto por Ritonavir para el paciente 2 y por Ritonavir/Saquinavir para los pacientes 1 y 3, a las dosis recomendadas.

Procedimientos

Los plasmas se obtuvieron mediante centrifugación de la sangre total a 800 x g durante 10 minutos y se clarificaron mediante una segunda centrifugación a 3.000 x g durante 15 minutos.

Se añadieron 500 microlitros de plasma puro a 1,5 mililitros de cultivo de linfocitos frescos estimulados mediante PHA (10^6 células/placa). Se realizó un seguimiento de la replicación viral en el sobrenadante dos veces por semana mediante la medición de la concentración de antígeno P 24 de VIH (ELAVIA Ag I, Sanofi Diagnostics Pasteur). Se almacenaron los sobrenadantes positivos a - 80ºC. Tras la ultracentrifugación de 1 mililitro de sobrenadante (23-500 x g durante 1 hora), se extrajo el ARN de VIH-2 con ayuda del kit Amplicor HCV Spécimen Préparation (Roche).

Se retrotranscribió el gen de la proteasa a partir de 10 microlitros de la disolución de ARN viral y se amplificó con el kit Titan One Tube RT-PCR (Roche Molecular Diagnostics). La transcripción inversa y la primera amplificación se realizaron con los cebadores 3' Prot y 5' RT 3 (véase a continuación). La reacción a 50ºC durante 30 minutos se sigue por una etapa de desnaturalización a 94ºC durante 5 minutos y después 40 ciclos (30 segundos a 94ºC, 30 segundos a 55ºC, 90 segundos a 68ºC) y finalmente a 68ºC durante 7 minutos. La segunda etapa de la PCR se realizó con 5 microlitros del producto de la primera etapa con los cebadores 3' RTD y 5' Prot 2.1, con una desnaturalización de 5 minutos a 94ºC, seguida por 30 ciclos (30 segundos a 94ºC, seguido de 30 ciclos a 55ºC y 30 segundos a 72ºC) y finalmente 10 minutos a 72ºC. La secuencia de los cebadores es la siguiente:

3' Prot: CAGGGGCTGACACCAACAGCACCCCC
5' RT 3: CCATTTTTTCACAGATCTCTTTTAATGCCTC
3' RTD: ATGTGGGGGTATTATAAGGATTT
5' Prot 2.1: GAAAGAAGCCCCGCAACTTC

Se purificaron los productos de amplificación con el kit QUIACQUICK PCR purification (Quiagen) y se secuenciaron directamente con ayuda de los cebadores 3' RTD y 5' Prot 2.1 con ayuda del kit ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystem). Se analizaron con el secuenciador automático Applied Biosystem 377 y se alinearon las secuencias con las secuencias consenso de VIH-2 (subtipos A y B).

Resultados

Antes del tratamiento, no se detectó ninguna mutación con respecto a las secuencias consenso VIH-2 A y B.

Tras el tratamiento, se observaron las mutaciones siguientes:

- posición 45: en los pacientes 1 y 2, se observó la coexistencia de una población no mutada (lisina; codón AAA) y de una población mutada (arginina; codón AGA), es decir, la mutación K45K/R;
- posición 54: se observó en los pacientes 1 y 2, la sustitución de la isoleucina (codón ATA) par la metionina (codón ATG): es decir, la mutación I54M;
- posición 64: se observó una población no mutada y una población en la que la isoleucina (codón ATA) está sustituido por una valina (codón GTA): es decir, la mutación 164I/V;
- posición 84: en el paciente 3 se observó una población no mutada (isoleucina; codón ATC) y una población mutada con sustitución de la isoleucina por una leucina (codón CTC): es decir, la mutación I84I/L;
- posición 90: en los 3 pacientes, se observó la sustitución de la leucina (codón CTG) par una metionina (codón ATG): es decir, la mutación L90M.

De manera análoga, se observaron las mutaciones siguientes:

- posición 10: la sustitución de la valina (codón: GTA) por una isoleucina (codón: ATA): es decir, la mutación V 10 I, durante el tratamiento de un paciente mediante Ritonavir;
- posición 46: la sustitución de la isoleucina (codón: ATA) por una valina (codón: GTA): es decir, la mutación I 46 V, durante el tratamiento de un paciente mediante Ritonavir; y
- posición 82: la sustitución de la isoleucina (codón: ATA) por una metionina (codón: ATG): es decir, la mutación I 82 M, durante el tratamiento de un paciente mediante Indinavir.

Ejemplo 2

Ejemplo de sondas utilizables para detectar las mutaciones en el gen de la proteasa de VIH-2

Las sondas utilizables para buscar la eventual existencia de mutaciones, de acuerdo con la invención, según las técnicas de hibridación, pueden definirse a partir de las alineaciones publicadas por Myers G *et al*., 1997, Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and aminoacid sequences, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos; Nuevo México.

Por supuesto, además de las sondas definidas de manera expresa a continuación, la invención comprende igualmente las sondas nucleotídicas equivalentes, es decir, sondas que permiten detectar las mismas mutaciones, en la secuencia proteica de la proteasa que las detectadas por las sondas definidas a continuación, teniendo en cuenta la degeneración del código genético, dicho de otra manera, teniendo en cuenta el hecho de que un mismo ácido aminado puede codificarse por diferentes codones.

Por tanto, por la expresión “secuencias nucleotídicas equivalentes”, se entienden todas las secuencias nucleotídicas que difieren entre sí por al menos un nucleótido pero cuya traducción conduce a la misma secuencia proteica, en otros términos todas las secuencias nucleotídicas que codifican para la misma secuencia proteica.

Evidentemente, esta observación es válida para cada uno de los codones de cada una de las sondas. Así, por ejemplo, el ácido aminado en la posición 53 de la proteasa de VIH-2 es una fenilalanina que puede codificarse o bien por el codón TTT o bien por el codón TTC. Por supuesto, las sondas correspondientes a cada una de estas posibilidades forman parte de la invención.

En función de las condiciones particulares de la hibridación, y especialmente de la temperatura y de la composición de los tampones de hibridación y de lavado, pueden definirse sondas que deberán comprender por lo menos una de las secuencias mínimas a continuación, o sus complementarias. Las sondas que contienen estas secuencias permiten distinguir las mutaciones en un procedimiento de hibridación. Por supuesto, las sondas análogas, obtenidas especialmente introduciendo análogos de bases, tales como inosina o nebularina, en posiciones en las que está presente un polimorfismo debido a una variabilidad intrínseca del virus, permiten obtener un resultado similar y también forman parte de la invención.

Estas secuencias se facilitan en el sentido 5' hacia 3':

CCA AAA ATA para una forma de tipo natural de la posición 45.

CCA AAA GTA para una forma de tipo natural de la posición 45.

CCT AAA ATA para una forma de tipo natural de la posición 45.

CCA AGA ATA para una forma mutada de la posición 45.

CCA AGA GTA para una forma mutada de la posición 45.

CCT AGA ATA para una forma mutada de la posición 45.

TTT ATA AAC para una forma de tipo natural de la posición 54.

TTT ATA AAT para una forma de tipo natural de la posición 54.

TTT ATG AAC para una forma mutada de la posición 54.

TTT ATG AAT para una forma mutada de la posición 54.

GAA ATA AAA para una forma de tipo natural de la posición 64.

GAA ATA GAA para una forma de tipo natural de la posición 64.

GAA GTA AAA para una forma mutada de la posición 64.

GAA GTA GAA para una forma mutada de la posición 64.

AAC ATC TTT para una forma de tipo natural de la posición 84.

AAC ATT TTT para una forma de tipo natural de la posición 84.

AAC CTC TTT para una forma mutada de la posición 84.

ATT CTG ACA para una forma de tipo natural de la posición 90.

ATC CTG ACA para una forma de tipo natural de la posición 90.

ATT CTA ACA para una forma de tipo natural de la posición 90.

ATC CTA ACA para una forma de tipo natural de la posición 90.

ATT ATG ACA para una forma mutada de la posición 90.

ATC ATG ACA para una forma mutada de la posición 90.

o incluso:

CCA GTA GTC para una forma de tipo natural de la posición 10.

CCA ATA GTC para una forma mutada de la posición 10.

AAA ATA GTA para una forma de tipo natural de la posición 46.

AAA GTA GTA para una forma mutada de la posición 46.

CCA ATC AAC para una forma de tipo natural de la posición 82.

CCA ATA AAC para una forma de tipo natural de la posición 82.

CCA ATG AAC para una forma mutada de la posición 82.

Por supuesto, para obtener sondas más largas que las que tienen las secuencias mínimas de 9 nucleótidos representadas anteriormente, deben seleccionarse los nucleótidos complementarios de manera que se respete la secuencia de las regiones adyacentes por ambas partes de la secuencia mínima en el gen de la proteasa de una cepa de VIH-2. Estas secuencias pueden obtenerse en los bancos de datos.

Por ejemplo, pueden utilizarse las sondas que se indican a continuación, o sus complementarias.

(a) posición 45:

Puede utilizarse una sonda que comprende por ejemplo de 9 a 25 nucleótidos (preferentemente repartidos simétricamente alrededor del codón mutado AGA), cuya secuencia está incluida en una de las secuencias siguientes:

ATTACACTCCAAGAATAGTAGGGGG
ATTATAGCCCAAGAATAGTAGGGGG
ATTATAGTCCAAGAATAGTAGGGGG
ATTATACCCCAAGAATAGTAGGGGG
ATTATAGTCCAAGAATAGTAGGAGG
ATTATACCCCAAGAATAGTAGGAGG

(b) posición 54:

Puede utilizarse una sonda que comprende por ejemplo de 9 a 25 nucleótidos (preferentemente repartidos simétricamente alrededor del codón mutado ATG), cuya secuencia está incluida en una de las secuencias siguientes:

TAGGGGGATTTATGAACACCAAAGA
TAGGGGGATTCATGAACACCAAAGA
TAGGAGGATTCATGAACACCAAAGA
AGGAGGGTTCATGAACACCAAAGA

(c) posición 64:

Puede utilizarse una sonda que comprende por ejemplo de 9 a 25 nucleótidos (preferentemente repartidos simétricamente alrededor del codón mutado GTA), cuya secuencia está incluida en una de las secuencias siguientes:

AAAATGTAGAAGTAAAAGTACTAAA
AAAATATAGAAGTAAAAGTACTAAA
AAGATGTAGAAGTAAAGGTACTAAA
AAAATGTAGAAGTAGAAGTTCTAAA
AAAATGTAGAAGTAGAAGTCCTGGA
AAAGTGTAGAAGTAAGAGTGCTAAA

(d) posición 84:

Puede utilizarse una sonda que comprende por ejemplo de 9 a 25 nucleótidos (preferentemente repartidos simétricamente alrededor del codón mutado CTC), cuya secuencia está incluida en la secuencia siguiente:

CCCCAATCAACCTCTTTGGCAGAAA

(e) posición 90:

Puede utilizarse una sonda que comprende por ejemplo de 9 a 25 nucleótidos (preferentemente repartidos simétricamente alrededor del codón mutado ATG), cuya secuencia está incluida en una de las secuencias siguientes:

GCAGAAATATTATGACAGCCTTAGG
GCAGAAATATTATGGCAACCTTAGG
GCAGAAATGTTATGACAGCTTTAGG
GCAGAAATATCATGACAGCCTTGGG
GCAGAAACATTATGACAGCCTTA

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de búsqueda, en una muestra biológica tomada de un paciente contaminado por VIH-2 que contiene por lo menos una cepa viral de VIH-2, de una eventual resistencia de dicha cepa viral de VIH-2 frente a un tratamiento mediante un agente antiproteasa, en el que se busca, según los procedimientos conocidos, la presencia de por lo menos una mutación en una de las posiciones 45, 54, 64, 84 y 90 de la secuencia proteica de la proteasa de dicha cepa viral, habiéndose reconocido previamente dicha mutación como que induce dicha resistencia, y en el que se concluye, en el caso en el que se encuentra una mutación de este tipo, la existencia de una cepa viral resistente frente a dicho agente antiproteasa en el paciente considerado.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que:

a) se busca, según los procedimientos conocidos, la presencia de por lo menos una mutación en una de dichas posiciones de la secuencia proteica de la proteasa de dicha cepa viral procedente de una muestra biológica tomada de un paciente contaminado por VIH-2,

b) se selecciona, entre las mutaciones encontradas en a), las que, tras la clonación en un virus VIH-2, no impiden que el clon viral obtenido se multiplique en cultivo en presencia de dicho agente antiproteasa, y

c) en el caso en el que se selecciona por lo menos una mutación en la etapa b), se concluye la existencia de una resistencia frente a dicho agente antiproteasa mencionado en b).

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que se busca la presencia de por lo menos una mutación seleccionada de entre las mutaciones siguientes:

K 45 R, I 54 M, I 64 V, I 84 L, L 90 M,

en la secuencia proteica de la proteasa de dicha cepa viral, y en el que se concluye la presencia de dicha resistencia en caso de presencia de dicha mutación o de dichas mutaciones.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, para buscar una mutación de la secuencia proteica de la proteasa, se realiza la búsqueda de una mutación correspondiente en la secuencia nucleotídica del gen de dicha proteasa.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que se realiza dicha búsqueda con ayuda de técnicas de hibridación, según los procedimientos conocidos.

6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que se realiza dicha búsqueda con ayuda de técnicas de secuenciación, según los procedimientos conocidos.

7. Sonda nucleotídica utilizable en el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, presentando dicha sonda como máximo 40 nucleótidos y que comprende como secuencia mínima una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por:

(a)

CCA AGA ATA para una forma mutada de la posición 45,

CCA AGA GTA para una forma mutada de la posición 45,

CCT AGA ATA para una forma mutada de la posición 45,

TTT ATG AAC para una forma mutada de la posición 54,

TTT ATG AAT para una forma mutada de la posición 54,

GAA GTA AAA para una forma mutada de la posición 64,

GAA GTA GAA para una forma mutada de la posición 64,

AAC CTC TTT para una forma mutada de la posición 84,

ATT ATG ACA para una forma mutada de la posición 90,

ATC ATG ACA para una forma mutada de la posición 90,

eventualmente completada por la secuencia nucleotídica de una región adyacente del gen de dicha proteasa, por ambas partes de la secuencia mínima,

(b) una secuencia nucleotídica diferente de una secuencia definida en (a) por al menos un nucleótido pero cuya traducción conduce a una misma secuencia proteica, y

(c) una secuencia complementaria de una secuencia definida en (a) o en (b).

8. Sonda nucleotídica según la reivindicación 7, **caracterizada** porque se selecciona de entre las siguientes:

ATTACACTCCAAGAATAGTAGGGGG
ATTATAGCCCAAGAATAGTAGGGGG
ATTATAGTCCAAGAATAGTAGGGGG
ATTATACCCCAAGAATAGTAGGGGG
ATTATAGTCCAAGAATAGTAGGAGG
ATTATACCCCAAGAATAGTAGGAGG
TAGGGGGATTTATGAACACCAAAGA
TAGGGGGATTCATGAACACCAAAGA
TAGGAGGATTCATGAACACCAAAGA
TAGGAGGGTTCATGAACACCAAAGA
AAAATGTAGAAGTAAAAGTACTAAA
AAAATATAGAAGTAAAAGTACTAAA
AAGATGTAGAAGTAAAGGTACTAAA
AAAATGTAGAAGTAGAAGTTCTAAA
AAAATGTAGAAGTAGAAGTCCTGGA
AAAGTGTAGAAGTAAGAGTGCTAAA
CCCCAATCAACCTCTTTGGCAGAAA
GCAGAAATATTATGACAGCCTTAGG
GCAGAAATATTATGGCAACCTTAGG
GCAGAAATGTTATGACAGCTTTAGG
GCAGAAATATCATGACAGCCTTGGG
GCAGAAACATTATGACAGCCTTA

o una secuencia complementaria.

9. Procedimiento de búsqueda, en una muestra biológica tomada de un paciente contaminado por VIH-2 que contiene por lo menos una cepa viral de VIH-2, de una eventual resistencia de dicha cepa viral de VIH-2 frente a un tratamiento mediante un agente antiproteasa, en el que se busca, según los procedimientos conocidos, la presencia de por lo menos una mutación en una de las posiciones 10, 46 u 82 de la secuencia proteica de la proteasa de dicha cepa viral, habiéndose reconocido previamente dicha mutación como inductora de dicha resistencia, y en el que se concluye, en el caso en el que se encuentra una mutación de este tipo, la presencia de una cepa viral resistente frente a dicho agente antiproteasa en el paciente considerado.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que:

a) se busca, según los procedimientos conocidos, la presencia de por lo menos una mutación en una de dichas posiciones de la secuencia proteica de la proteasa de dicha cepa viral procedente de una muestra biológica tomada de un paciente contaminado por VIH-2,

b) se selecciona, de entre las mutaciones halladas en a), las que, tras la clonación en un virus VIH-2, no impiden que el clon viral obtenido se multiplique en cultivo en presencia de dicho agente antiproteasa, y

c) en el caso en el que se selecciona por lo menos una mutación en la etapa b), se concluye la existencia de una resistencia frente a dicho agente antiproteasa mencionado en b).

11. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que se busca la presencia de por lo menos una mutación seleccionada de entre las mutaciones siguientes:

V 10 I, I 46 V e I 82 M,

en la secuencia proteica de la proteasa de dicha cepa viral, y en el que se concluye la presencia de dicha resistencia en caso de presencia de dicha mutación o de dichas mutaciones.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que, para buscar una mutación de la secuencia proteica de la proteasa, se realiza la búsqueda de una mutación correspondiente en la secuencia nucleotídica del gen de la proteasa.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que se realiza dicha búsqueda con ayuda de las técnicas de secuenciación, según los procedimientos conocidos.

14. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que se realiza dicha búsqueda con ayuda de las técnicas de hibridación, según los procedimientos conocidos.

15. Sonda nucleotídica utilizable en el procedimiento según la reivindicación 14, presentando dicha sonda como máximo 40 nucleótidos y que comprende como secuencia mínima una secuencia de entre el grupo constituido por:

(a)

CCA ATA GTC para una forma mutada de la posición 10,

AAA GTA GTA para una forma mutada de la posición 46,

CCA ATG AAC para una forma mutada de la posición 82,

eventualmente completada por la secuencia nucleotídica de una región adyacente del gen de dicha proteasa, por ambas partes de la secuencia mínima,

(b) una secuencia nucleotídica diferente de la definida en (a), por al menos un nucleótido pero cuya traducción conduce a una misma secuencia proteica, y

(c) una secuencia complementaria de una secuencia definida en (a) o en (b).

16. Utilización de una sonda nucleotídica para buscar en una muestra biológica tomada de un paciente contaminado por VIH-2 que contiene por lo menos una cepa viral de VIH-2, la presencia de por lo menos una mutación en una de las posiciones 45, 54, 64, 84 y 90 de la secuencia proteica de la proteasa de dicha cepa viral, habiéndose reconocido previamente dicha mutación como inductora de una resistencia de dicha cepa viral VIH-2 frente a un tratamiento mediante un agente antiproteasa, presentando dicha sonda como máximo 40 nucleótidos y que comprende como secuencia mínima una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por:

(a)

CCA AGA ATA para una forma mutada de la posición 45,

CCA AGA GTA para una forma mutada de la posición 45,

CCT AGA ATA para una forma mutada de la posición 45,

TTT ATG AAC para una forma mutada de la posición 54,

TTT ATG AAT para una forma mutada de la posición 54,

GAA GTA AAA para una forma mutada de la posición 64,

GAA GTA GAA para una forma mutada de la posición 64,

AAC CTC TTT para una forma mutada de la posición 84,

ATT ATG ACA para una forma mutada de la posición 90,

ATC ATG ACA para una forma mutada de la posición 90,

eventualmente completada por la secuencia nucleotídica de una región adyacente del gen de dicha proteasa, por ambas partes de la secuencia mínima, y

(b) una secuencia complementaria de una secuencia definida en (a).

17. Utilización de una sonda nucleotídica para buscar en una muestra biológica tomada de un paciente contaminado por VIH-2 que contiene por lo menos una cepa viral de VIH-2, la presencia de por lo menos una mutación seleccionada de entre las mutaciones siguientes:

V 10 I, I 46 V e I 82 M

en la secuencia proteica de la proteasa de dicha cepa viral, habiéndose reconocido previamente dicha mutación como inductora de una resistencia de dicha cepa viral VIH-2 frente a un tratamiento mediante un agente antiproteasa, presentando dicha sonda como máximo 40 nucleótidos y que comprende como secuencia mínima una secuencia seleccionada de entre el grupo constituido por:

(a)

CCA ATA GTC para una forma mutada de la posición 10,

AAA GTA GTA para una forma mutada de la posición 46,

CCA ATG AAC para una forma mutada de la posición 82,

eventualmente completada por la secuencia nucleotídica de una región adyacente del gen de dicha proteasa, por ambas partes de la secuencia mínima, y

(b) una secuencia complementaria de una secuencia en (a).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BIO MERIEUX
ASSISTANCE PUBLIQUE, HOPITAUX DE PARIS

<120> Procedimiento de búsqueda de una resistencia frente a las antiproteasas de una cepa del virus VIH-2 procedente de una muestra biológica tomada de un paciente

<130> BR34443/CR/HG/klp

<140> 00 949555.7

<141> 21-06-2000

<150> FR 99 07855

<151> 21-06-1999

<160> 52

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia de listeria

<400> 1

ccaaaaata 9

<210> 2

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia de listeria

<400> 2

ccaaaagta 9

<210> 3

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia de listeria

<400> 3

cctaaaata 9

<210> 4

<211> 9

<212> ADN

<213> Secuencia de listeria

<400> 4

ccaagaata 9

<210> 5
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 5

ccaagagta 9

<210> 6
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 6

cctagaata 9

<210> 7
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 7

tttataaac 9

<210> 8
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 8

tttataaat 9

<210> 9
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 9

tttatgaac 9

<210> 10
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 10

tttatgaat 9

<210> 11
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 11

gaaataaaa 9

<210> 12
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 12

gaaatagaa 9

<210> 13
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 13

gaagtaaaa 9

<210> 14
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 14

gaagtagaa 9

<210> 15
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 15

aacatcttt 9

<210> 16
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 16

aacattttt 9

<210> 17
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 17

aacctcttt 9

<210> 18
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 18

attctgaca 9

<210> 19
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 19

atcctgaca 9

<210> 20
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 20

attctaaca 9

<210> 21
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 21

atcctaaca 9

<210> 22
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 22

attatgaca 9

<210> 23
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 23

atcatgaca 9

<210> 24
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 24

ccagtagtc 9

<210> 25
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 25

ccaatagtc 9

<210> 26
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 26

aaaatagta 9

<210> 27
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 27

aaaatagta 9

<210> 28
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 28

ccaatcaac 9

<210> 29
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 29

ccaataaac 9

<210> 30
<211> 9
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 30

ccaatgaac 9

<210> 31
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 31

attacactcc aagaatagta ggggg 25

<210> 32
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 32

attatagccc aagaatagta ggggg 25

<210> 33
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 33

attatagtcc aagaatagta ggggg 25

<210> 34
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 34

attatacccc aagaatagta ggggg 25

<210> 35
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 35

attatagtcc aagaatagta ggagg 25

<210> 36
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 36

attatacccc aagaatagta ggagg 25

<210> 37
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 37

taggggatt tatgaacacc aaaga 25

<210> 38
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 38

taggggatt catgaacacc aaaga 25

<210> 39
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 39

taggaggatt catgaacacc aaaga 25

<210> 40
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 40

taggagggtt catgaacacc aaaga 25

<210> 41
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 41

aaaatgtaga agtaaaagta ctaaa 25

<210> 42
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 42

aaaatataga agtaaaagta ctaaa 25

<210> 43
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 43

aagatgtaga agtaaaggta ctaaa 25

<210> 44
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 44

aaaatgtaga agtagaagtt ctaaa 25

<210> 45
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 45

aaaatgtaga agtagaagtc ctgga 25

<210> 46
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 46

aaagtgtaga agtaagagtg ctaaa 25

<210> 47
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 47

ccccaatcaa cctctttggc agaaa 25

<210> 48
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 48

gcagaaatat tatgacagcc ttagg 25

<210> 49
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 49

gcagaaatat tatggcaacc ttagg 25

<210> 50
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 50

gcagaaatgt tatgacagct ttagg 25

<210> 51
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 51

gcagaaatat catgacagcc ttggg 25

<210> 52
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia de listeria

<400> 52

gcagaaacat tatgacagcc tta 23