



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 854**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C07K 7/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98938310 .4**

86 Fecha de presentación : **31.07.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1000177**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.2000**

54 Título: **Antígenos sintéticos para la detección de anticuerpos que tienen inmunorreactividad frente al virus HIV.**

30 Prioridad: **01.08.1997 US 904826**

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-RAD LABORATORIES, Inc.**
Corporate Offices, 1000 Alfred Nobel Drive
Hercules, California 94547, US

72 Inventor/es: **Coleman, Patrick, F.;**
Chong-Dug Su, Peter;
Monji, Nobuo;
Cole, Carol-Ann y
Goshorn, Alice, Kamp

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Antígenos sintéticos para la detección de anticuerpos que tienen inmunorreactividad frente al virus HIV.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a polipéptidos sintéticos, polipéptidos recombinantes y secuencias de polinucleótidos recombinantes que los codifican, útiles para detectar anticuerpos asociados con el virus de la inmunodeficiencia humana (abreviadamente HIV en lo sucesivo por la expresión inglesa *human immunodeficiency virus*)¹ de tipo 1 y/o tipo 2 (HIV-2) (tal como se usa en la presente memoria, "HIV" usado sin referencia al tipo significará cualquiera de ambos tipos), y se refiere particularmente a polipéptidos sintéticos que mimetizan epítomos antigénicos de los productos del gen de la región de la polimerasa del HIV.

15 **Fundamento de la invención**

Se sabe que los tipos 1 y 2 del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1 y HIV-2) provocan el síndrome de la inmunodeficiencia humana (SIDA) adquirido. Ambos virus exhiben aparentemente modos similares de transmisión. El HIV-1 y el HIV-2 se aislaron ambos en los primeros años de la década de 1980 en pacientes africanos que padecían SIDA. Desde entonces, se han encontrado casos en la mayoría de los países del mundo. Debido a que los virus HIV exhiben una rápida deriva genética, están emergiendo cepas ampliamente divergentes. Por tanto, la detección y el tratamiento de las cepas variantes está siendo un reto difícil.

Los individuos con anticuerpos reactivos con HIV-1 y/o HIV-2 se determinan mediante inmunoensayos del formato ELISA de tipo sándwich convencional. Estos ensayos comprenden un antígeno viral inmovilizado, que puede estar constituido por un lisado viral, proteínas del retrovirus o polipéptidos naturales o sintéticos, que se ponen en contacto con los componentes de suero o sangre sospechosos de contener anticuerpos contra el HIV. Aunque los ensayos comercialmente existentes parecen haber disminuido significativamente la transmisión del virus HIV en productos de sangre, cada configuración de ensayo puede tener ciertas desventajas.

Las posibles desventajas de los ensayos con lisados virales incluyen: la necesidad de cultivar y manejar grandes cantidades de virus infecciosos vivos; la posibilidad de que el virus vivo pueda ser incorporado en los materiales de ensayo; la naturaleza variable del lisado viral resultante; y el número importante de resultados falsos positivos y falsos negativos que requieren ensayos confirmativos adicionales. Estas desventajas también pueden estar asociadas con el uso de proteínas virales aisladas.

El uso de polipéptidos sintéticos (tal como se usa en la presente memoria "polipéptido sintético" y "polipéptido" significarán uno cualquiera, todos o una combinación de los siguientes: polipéptido sintético, polipéptido recombinante o polipéptido) que pueden ser manipulados por ingeniería genética para mimetizar inmunológicamente epítomos antigénicos de los virus HIV, pudiendo evitar algunas de las desventajas antes mencionadas. Un motivo de preocupación con el uso de polipéptidos sintéticos (de longitud menor o igual a 60 residuos) en ensayos de diagnóstico es la consideración de que la deriva antigénica viral podría dar como resultado un fracaso en detectar sueros infectados con HIV-1 o HIV-2 usando estos ensayos, debido presumiblemente a la presentación limitada de epítomos virales. Un método de protegerse contra tales sucesos es incluir polipéptidos de diferentes regiones inmunodominantes del genoma viral. Así, los polipéptidos sintéticos que mimetizan inmunológicamente las regiones de los productos de los genes *pol* de HIV-1 y HIV-2 son importantes adiciones a los polipéptidos ya descritos que mimetizan las proteínas *env*, *gag*, y *pol* proteínas de HIV-1 y HIV-2. Las Patentes de EE.UU. N°4.629.783 y 5.075.211 describen polipéptidos sintéticos que mimetizan los determinantes antigénicos del HIV-1.

La Patente de EE.UU. N° 5.075.211 de Cosand describe polipéptidos sintéticos que mimetizan inmunológicamente epítomos antigénicos de proteínas del HIV-1 de la región *pol*, incluyendo dos polipéptidos que son similares a los polipéptidos de esta invención. En los análisis de sangre para detectar el HIV, cuanto mayor es la inmunoreactividad de los antígenos usados en el método de ensayo, menos probable serán los anticuerpos para una nueva variante o subtipo de HIV-1 o HIV-2, presentes en una muestra de pacientes, que quedarán sin detectar.

La patente de EE.UU. N° 5.306.466 describe un "retrovirus HIV-3" que se creyó inicialmente que se separaba y se distinguía del HIV-1 y HIV-2. Los investigadores han determinado desde entonces que el retrovirus HIV-3 es simplemente un subtipo particular de HIV-1, ahora denominado subtipo O, o Grupo O (*R. De Leys, et. al., J. Virol.: 1207-1216 (1990); L.G. Gürtler, et. al., J. Virol.: 1581-1585 (1994)*).

Comparando diversos aislados de HIV-1 los investigadores han demostrado que algunas regiones del genoma son altamente variables, mientras que otras están razonablemente bien conservadas. Polimorfismos similares se han observado también para el HIV-2.

65

¹ Por razones de conveniencia en el presente texto se emplea el acrónimo inglés HIV en lugar de VIH que es la abreviatura española usual para el virus de la inmunodeficiencia humana (N. del T.)

A pesar de las aparentes similitudes en el estado de la enfermedad y transmisión de los virus HIV-1 y HIV-2, los tipos de virus han sido diferenciados basándose en su divergencia genética. En base al análisis genético los aislados virales pueden ser agrupados de acuerdo con su homología genética a aislados previos. Actualmente, HIV-1 y HIV-2 forman las dos ramas principales del árbol genético HIV. Estudios de hibridación con DNA sugieren que, aunque existen regiones de amplia homología entre HIV-1 y HIV-2, otras regiones parecen muy divergentes. (*Clavel et al, Science 233: 343 (1986)*). De hecho, el HIV-2 ha demostrado tener, globalmente, solo aproximadamente 40% de homología con el HIV-1, y existen estudios que han mostrado poca reactividad cruzada inmunológica entre las glicoproteínas de las envolturas. La limitada actividad serológica cruzada entre estos virus hace que sean insuficientes los ensayos basados en antígenos del HIV-1 para escrutar o diagnosticar infecciones por HIV-2 en sueros humanos.

Sumario de la invención

Se han identificado secuencias de polipéptidos capaces de mimetizar (imitar) las regiones inmunodominantes de las proteínas del HIV-1 o HIV-2, codificadas en la región de polimerasa. Estos polipéptidos sintéticos, polipéptidos recombinantes y secuencias de polinucleótidos recombinantes que los codifican, son útiles en la preparación de reactivos para escrutar la sangre y los productos de sangre en cuanto a la exposición a los virus HIV. Los polipéptidos se pueden usar en diversos ensayos de unión específicos para la detección de anticuerpos para el virus HIV-1 y/o HTV-2, para la detección de antígenos de HIV-1 y/o HIV-2, o como agentes inmunógenos en composiciones de vacunas.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa un mapa de plásmido de una de las construcciones recombinantes de la presente invención, más específicamente la de pGEX/pol23.

La Fig. 2 representa un mapa de plásmido de una de las construcciones recombinantes de la presente invención, más específicamente la de pGEX/pol7.

La Fig. 3 representa un mapa de plásmido de una de las construcciones recombinantes de la presente invención, más específicamente la de pQE/pol23.

La Fig. 4 representa un mapa de plásmido de una de las construcciones recombinantes de la presente invención, más específicamente la de pQE/pol7.

La Fig. 5 representa un mapa de plásmido de una de las construcciones recombinantes de la presente invención, más específicamente la de pThioHis/pol23.

La Fig. 6 representa un mapa de plásmido de una de las construcciones recombinantes de la presente invención, más específicamente la de pThioHis/pol7.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Se proporcionan nuevos polipéptidos que mimetizan inmunológicamente las proteínas codificadas por los retrovirus HIV-1 o HIV-2, respectivamente, particularmente las proteínas codificadas en la región de polimerasa del genoma viral. Cada polipéptido de la invención puede ser modificado introduciendo sustituciones conservativas o no conservativas en el polipéptido, cambiándose usualmente menos que 20 por ciento en número, y más usualmente menos de 10 por ciento en número de los aminoácidos. En aquellas situaciones en las que se encuentran regiones que son estructuralmente polimórficas, puede ser deseable variar uno o más aminoácidos particulares para mimetizar más eficazmente los epítomos de las diferentes cepas retrovirales. En muchos casos para proporcionar estabilidad química, la metionina puede reemplazarse por norleucina (Nor).

Un medio particularmente útil de elegir sustituciones apropiadas de aminoácidos en un polipéptido de la invención sería una sustitución que ocurriera naturalmente en uno o más aislados del virus.

En general, el término "polipéptido" o "péptido" usado en la presente memoria significará una cadena de moléculas de aminoácidos que posee actividad biológica. Los términos no se refieren a un producto de cualquier longitud específica.

Debe entenderse que el polipéptido empleado en la presente invención no necesita ser idéntico a ninguna secuencia de polipéptido particular de HIV-1 o HIV-2, siempre y cuando el compuesto en cuestión sea capaz de mimetizar inmunológicamente un epítomo de la región pol de al menos una de las cepas de los retrovirus HIV-1 o HIV-2. Por lo tanto, el polipéptido objeto puede ser modificado para incluir diversos cambios, como se ha mencionado antes, tales como inserciones, deleciones, y sustituciones, bien sean conservativas o no conservativas, donde tales cambios podrían proporcionar ciertas ventajas en su uso. Por sustituciones conservativas se entienden sustituciones con grupos tales como gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; phe, tyr; y nor, met. Usualmente, la secuencia no diferirá en más que 20% de la secuencia de al menos una cepa de los retrovirus HIV-1 o HIV-2 excepto cuando pueden añadirse aminoácidos adicionales en cualquier extremo con el fin de proporcionar un "brazo" mediante el cual el polipéptido de esta invención puede inmovilizarse convenientemente. El brazo tendrá usualmente una longitud de al menos 1 aminoácido y puede tener 50 o más aminoácidos, más frecuentemente 1 a 10 aminoácidos. Un polipéptido en

el cual está modificada la secuencia de aminoácidos por sustitución, adición o delección de residuos de aminoácidos debe retener sustancialmente la totalidad de la reactividad inmunológica del polipéptido no modificado, que puede medirse convenientemente por radioinmuno-precipitación, inmunofluorescencia o ensayos de inmuno-absorbente unido a enzimas.

Además, pueden añadirse a los extremos de un oligopéptido o polipéptido uno o más aminoácidos para proporcionar facilidad de unir polipéptidos entre sí, para acoplarse a un soporte o a un polipéptido mayor, para modificar las propiedades físicas y químicas del polipéptido u oligopéptido o similares.

En los extremos N- o C- del polipéptido pueden introducirse aminoácidos, tales como tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico o aspártico o similares para proporcionar una funcionalidad útil para el enlace. La cisteína es particularmente preferida para facilitar el acoplamiento covalente a otros polipéptidos o, por ejemplo, para formar dímeros por oxidación. Para formar polímeros, se prefiere tener al menos dos residuos de cisteína presentes en las moléculas que se unen, utilizando preferiblemente residuos de cisteína añadidos a las porciones terminales de los polipéptidos. Las combinaciones de cisteína con aminoácidos espaciadores intermedios también son útiles. Por ejemplo dos residuos de cisteína pueden estar separados por uno o más residuos de aminoácidos. Los residuos de glicina son particularmente útiles y pueden emplearse de uno a tres residuos de glicina entre los aminoácidos. Los residuos de lisina también se ha encontrado que son útiles como enlazadores y pueden usarse de uno a tres residuos de lisina para acoplar los polipéptidos a una fase sólida o en combinación con otros aminoácidos.

Además las secuencias de polipéptido de la invención pueden diferir de la secuencia natural después de ser modificadas por acilación de NH₂ terminal, por ejemplo acetilación o amidación con ácido tioglicólico, amidación del grupo carboxi terminal, por ejemplo con amoniaco o metilamina para proporcionar estabilidad, mayor hidrofobicidad para unirse o fijarse a un soporte u otra molécula o para polimerización.

Los polipéptidos descritos y parcialmente reivindicados en la presente solicitud que se derivan de la región de polimerasa del HIV-1 se describen más adelante. La familia de los polipéptidos de HIV-1 está codificada por las secuencias de polinucleótidos genómicos (aislado de LAI o BRU) que abarcan desde el par de bases (pb) 4448 hasta el par de bases (pb) 4585 (numeración del *Genbank* HIVBRUCG; Acceso K02013, aislado BRU) o está codificada en el marco de lectura abierto pol desde aproximadamente los números de residuos de aminoácido 940 hasta aproximadamente 985.

El polipéptido I (no de acuerdo con la presente invención) tiene la siguiente de secuencia de polipéptido:

(I) BRU124E

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-
Ser-Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-
Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo amino terminal NH₂ del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adicional(es) unido(s) al grupo amino terminal NH₂ del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos adicionales para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly ó Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH₂.

Otro polipéptido descrito en la presente memoria el polipéptido II, también denominado BRU124EX, tiene la siguiente secuencia de polipéptido:

(II) BRU124EX

W-X-Leu-Gln-Lys-Gln-Ile-Thr-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-
Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-
Pro-Ala-Lys-Leu -Leu-Trp -Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo amino terminal NH₂ del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adiciona(les) unido(s) al grupo amino terminal NH₂ del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos adicionales para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly ó Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno más aminoácidos añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH₂.

ES 2 286 854 T3

Un polipéptido de la invención, el polipéptido III, también denominado RU124F1X, tiene la siguiente secuencia de polipéptido:

(III) BRU 124F1X

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-
Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-
Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Ser-Asp-
Ile-Lys-Y-Z

en donde W es bien sea H del grupo amino terminal NH₂ del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adicional(es) unido(s) al grupo amino terminal NH₂ del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos adicionales para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly o Lys-Lys, Y está ausente, Cys o uno o más aminoácidos añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH₂.

Otro polipéptido de la invención, el polipéptido IV, también denominado BRU124F3X, tiene la siguiente secuencia de polipéptido:

(IV)BR 124F3X

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-
Ser-Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-
Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-
Gln-Asp-Asn-Y-Z

en donde W es bien sea H del grupo amino terminal NH₂ del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adicional(es) unido(s) al grupo amino terminal NH₂ del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos adicionales para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly o Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH₂.

Los polipéptidos descritos en la presente memoria que derivan de la región de polimerasa de HIV-2 se describen más adelante. El polipéptido V, también denominado ROD124E1, está codificado por la secuencia de polinucleótido del genoma del HIV-2 que abarca desde el par de bases (pb) 4694 hasta el par de bases (pb4861) (numeración de Genbank HIV2ROD; Acceso M15390, aislado HIV-2ROD) o está codificado en el marco de lectura abierto pol desde aproximadamente los números de residuos de aminoácidos 956 hasta 1001.

El polipéptido V tiene la siguiente secuencia de polipéptido:

(IV) ROD124E1

W-X-Lys-Leu-Lys-Asp-Phe-Arg-Val-
Tyr-Phe-Arg-Glu-Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-
Lys-Gly-Pro-Gly-Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-
Glu-Gly-Ala-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo amino terminal NH₂ del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adicional(es) unidos al grupo amino terminal NH₂ del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos adicionales para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly o Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH₂.

ES 2 286 854 T3

Otro polipéptido descrito el polipéptido VI, también denominado ROD124EX, tiene la siguiente secuencia de polipéptido:

(VI) RGD124EX

W-X-Leu-Gln-Ala-Lys-Asn-Ser-Lys-
Leu-Lys-Asp-Phe-Arg-Val-Tyr-Phe-Arg-Glu-
Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Gly-
Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo aminoterminal NH_2 del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adicional(es) unido(s) al grupo amino terminal NH_2 del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos adicionales para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly o Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH o NH_2 .

Otro polipéptido descrito el polipéptido VII, también denominado ROD124C2X, tiene la siguiente secuencia de polipéptido:

(VII) ROD 124C2X

W-X-Lys-Leu-Lys-Asp-Phe-Arg-Val-
Tyr-Phe-Arg-Glu-Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-
Lys-Gly-Pro-Gly-Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-
Glu-Gly-Ala-Val-Leu-Val-Lys-Val-Gly-Thr-
Asp-Ile-Lys-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo amino terminal NH_2 del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adicional(es) unido(s) al grupo amino terminal NH_2 del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly o Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos adicionales añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH_2 .

Otro polipéptido descrito, el polipéptido VIII, también denominado ROD124C1X, tiene la siguiente secuencia de polipéptido:

(VIII) ROD124C1X

W-X-Tyr-Phe-Arg-Glu-Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Gly-
Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Leu-Val-Lys-
Val-Gly-Thr-Asp-Ile-Lys-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo amino terminal NH_2 del polipéptido o uno o más aminoácido(s) adicional(es) unido(s) al grupo amino terminal NH_2 del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly o Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos adicionales añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH_2 .

Otro polipéptido descrito, el Polipéptido IX, también denominado ROD123C3X, tiene la siguiente secuencia de polipéptido:

(IX) ROD123C3X

X-Lys-Leu-Lys-Asp-Phe-Arg-Val-Tyr-Phe-Arg-
Glu-Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-
Gly-Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-
Val-Leu-Val-Lys-Val-Gly-Thr-Asp-Ile-Lys-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo amino terminal NH_2 del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adicional(es) unido(s) al grupo amino terminal NH_2 del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos adicionales añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH_2 .

Otro polipéptido descrito, el polipéptido X, también denominado POL2A1, tiene la siguiente secuencia de polipéptido:

(X) POL2A1

W-X-Lys-Gly-Pro-Gly-Glu-Leu-Leu-
Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Leu-Val-Lys-
Val-Gly-Thr-Asp-Ile-Lys-Ile-Ile-Pro-Arg-
Arg-Lys-Ala-Lys-Ile-Ile-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo amino terminal NH_2 del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adicional(es) unido(s) al grupo amino terminal NH_2 del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly o Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos adicionales añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH_2 .

Otro polipéptidos descrito, el polipéptido XI, también denominado ROD124C5X, tiene la siguiente de secuencia polipéptido:

(XI) ROD124C5X

W-X-Lys-Leu-Lys-Asp-Phe-Arg-Val-
Tyr-Phe-Arg-Glu-Gly-Arg-Asp-Gln-Leu-Trp-
Lys-Gly-Pro-Gly-Glu-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-
Glu-Gly-Ala-Val-Leu-Val-Lys-Val-Gly-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo amino terminal NH_2 del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adicionales unido(s) al grupo amino terminal NH_2 del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly o Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos adicionales añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH_2 .

De interés particular es el uso del grupo mercaptano de cisteínas o ácido tioglicólico usado para acilar los grupos amino terminales o similares para unir dos de los polipéptidos u oligopéptidos o sus combinaciones mediante un enlace disulfuro o un enlace mayor. Para conseguir esto, se pueden emplear compuestos que tienen grupos bis-haloacetilo, nitroarilhaluros o similares cuando los reactivos son específicos para el grupo tio. Por tanto, la unión entre dos grupos mercapto de los diferentes polipéptidos u oligopéptidos puede ser un enlace sencillo o grupo de unión de al menos 2, usualmente al menos 4, y no más que aproximadamente 16, usualmente no más que aproximadamente 14 átomos de carbono.

Alternativamente, la región del genoma viral que codifica el polipéptido de la invención puede ser clonada y expresada por técnicas convencionales de DNA recombinante. Estas técnicas incluyen clonación mediada por PCR, así como, síntesis de cadenas monocatenarias de polinucleótido que codifican el polipéptido de interés. Véase generalmente, *Maniatis et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, CSH, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982*.

Los fragmentos de una secuencia de polinucleótido pueden emplearse para la expresión de fragmentos de polipéptido, pudiendo hacerse cambios conservativos de bases cambios, cuando el (los) codón(es) modificado(s) codifica(n) el (los) mismo(s) aminoácido(s), o pueden hacerse cambios no conservativos en la secuencia de codificación, cuando el aminoácido resultante sea un cambio conservativo o no conservativo en la de secuencia aminoácidos, que se ha analizado previamente.

La secuencia codificadora puede extenderse en cualquiera de los extremos 5'- o 3'- o en ambos extremos para extender el polipéptido, mientras que retiene su(s) sitios epitópico(s). La extensión puede proporcionar un brazo para unión, por ejemplo a un marcador, tal como una enzima, para unir este y otros polipéptidos conjuntamente en la misma cadena, para proporcionar actividad antigénica o similar

Para la expresión, la secuencia codificadora será proporcionada con codones de iniciación y de parada, regiones de promotor y terminador y usualmente un sistema de replicación para proporcionar un vector de expresión para la expresión en un hospedante celular, por ejemplo, procariota o eucariota, bacteriano, levadura, mamífero, etc.

La secuencia de DNA por si misma, sus fragmentos o secuencias mayores, usualmente al menos 15 bases, preferiblemente al menos 18 bases, pueden usarse para la detección de RNA retroviral o DNA proviral. Están descritas numerosas técnicas tales como, la técnica Grunstein-Hogness, la técnica Southern, la técnica Northern, transferencia de puntos, sus mejoras, así como otra metodología. Véase, por ejemplo, WO 83/02277 y *Berent et al, Biotechniques (1985) 1:208*.

Convenientemente, el polipéptido puede prepararse como una proteína de fusión, en donde el polipéptido puede ser el extremo N- o C- del polipéptido fusionado. Comúnmente, el polipéptido de interés se expresa como una "fusión traduccional" que significa que la proteína expresada tendrá su extremo amino unido a una proteína "compañera" que se expresa fácilmente en *E. coli*, u otros sistemas de expresión bien conocidos. La fusión también puede incluir una etiqueta o "asa" de purificación.

Un ejemplo de tal sistema de fusión es el uso de una porción del gen de glutathion S-transferasa que codifica una proteína que puede usarse en purificación por afinidad sobre resina de glutathion-agarosa. Este sistema de fusión se encuentra en el plásmido pGEX comercialmente disponible (Pharmacia). Un segundo ejemplo es el uso de una porción del gen de la dihidrofolato-reductasa como compañero de fusión y una secuencia que codifica seis residuos de histidina como el asa. La etiqueta de "His" permite que la proteína de fusión resultante sea purificada por cromatografía de Ni-NTA (níquel). Este sistema de fusión se encuentra en el plásmido pQE42 comercialmente disponible (QIAGEN). Similarmente, una porción del gen de la tiorredoxina de *E. coli* que tiene un "parche de His" que consiste en tres residuos de histidina introducidos por técnicas de ingeniería genética en la secuencia codificadora de tiorredoxina permite la purificación de las proteínas expresadas por cromatografía de Ni-NTA. Este sistema de fusión se encuentra en el plásmido PThioHisA comercialmente disponible (Invitrogen).

Una proteína fusionada resultante podría usarse directamente por si misma como reactivo, o el polipéptido objeto puede escindirse de la totalidad o una porción de la secuencia restante de la proteína fusionada. Con un polipéptido que no contiene metioninas internas, por introducción de una metionina en el sitio de fusión, el polipéptido puede escindirse empleando bromuro de cianógeno. Cuando hay una metionina interna, sería necesario proporcionar un sitio de escisión proteolítico, por ejemplo, polilisina y/o arginina o una de sus combinaciones. Alternativamente, la metionina interna pudiera ser substituida por un aminoácido, tal como leucina y una metionina N-terminal añadida para la escisión con bromuro de cianógeno. Podrían introducirse en el sitio adecuado una amplia variedad de proteasas, incluyendo dipeptidasas, que son bien conocidas, y la señal de procesamiento adecuada. La señal de procesamiento puede tener repeticiones en tandem para asegurar, la escisión, puesto que la presencia de un o más aminoácidos extraños no interferirá con la utilidad de los polipéptidos objeto de la invención.

Las secuencias de polinucleótidos recombinantes que codifican un número de polipéptidos, derivadas de la región de polimerasa de HIV-1 se describen a continuación. Las secuencias se derivan de las secuencias de polinucleótidos genómicos de HIV-1 (aislado LA1) que abarca desde el par de bases (pb) 2549 hasta el par de bases (pb) 3139, y desde el par de bases (pb) 4391 hasta el par de bases (pb) 4648 como se encuentra en el lisado viral de HIV-1.

ES 2 286 854 T3

La secuencia de polinucleótido I, también denominada *pol23*, tiene la siguiente secuencia:

(I) *pol23*

5

10

15

20

25

30

CCA GGG ATT AGA TAT CAG TAC AAT GTG CTT CCA CAG GGA TGG
AAA GGA TCA CCA GCA ATA TTC CAA AGT AGC ATG ACA AAA ATC
TTA GAG CCT TTT AGA AAA CAA AAT CCA GAC ATA GTT ATC TAT
GGG CAG CAT AGA ACA AAA ATA GAG GAG CTG AGA CAA CAT CTG
TTG AGG TGG GGA CTT ACC ACA CCA GAC AAA AAA CAT CAG AAA
GAA CCT CCA TTC CTT TGG ATG GGT TAT GAA CTC CAT CCT GAT AAA
TGG ACA GTA GAG CCT ATA GTG CTG CCA GAA AAA GAC AGC TGG
ACT GTC AAT GAC ATA CAG AAG TTA GTG GGA AAA TTG AAT TGG
GCA AGT CAG ATT TAC CCA GGG ATT AAA GTA AGG GAA GTA TGT
AAA CTC CTT AGA GGA ACC AAA GCA CTA ACA GAA GTA ATA CCA
CTA ACA GAA GAA GCA GAG CTA GAA CTG GCA GAA AAC AGA GAG
ATT CTA AAA GAA CCA CTA CAT GGA GTG TAT TAT GAC CCA TCA
AAA GAC TTA ATA GCA GAA ATA CAG AAG CAG GGG CAA GGC CAA

35

Esta secuencia codifica la siguiente secuencia de aminoácidos. (Sin la intención de ser influido por esta enseñanza se cree que los aminoácidos escritos en letra cursiva representan residuos particularmente importantes para la inmunoreactividad del polipéptido resultante.)

(XII) *pol23*-aa Polipéptido codificado por la secuencia de polinucleótido (I)

40

pol23

45

50

55

60

65

Pro-Gly-Ile-Arg-Tyr-Gln-Tyr-Asn-Val-Leu-Pro-Gln-Gly-Trp-Lys-Gly-Ser-Pro-Ala-Ile-Phe-
Gln-Ser-Ser-Met-Thr-Lys-Ile-Leu-Glu-Pro-Phe-Arg-Lys-Gln-Asn-Pro-Asp-Ile-Val-Ile-Tyr-
Gln-Tyr-Met-Asp-Asp-Leu-Tyr-Val-Gly-Ser-Asp-Leu-Glu-Ile-Gly-Gln-His-Arg-Thr-Lys-Ile-
Glu-Glu-Leu-Arg-Gln-His-Leu-Leu-Arg-Trp-Gly-Leu-Thr-Thr-Pro-Asp-Lys-Lys-His-Gl?-
Lys-Glu-Pro-Pro-Phe-Leu-Trp-Met-Gly-Tyr-Glu-Leu-His-Pro-Asp-Lys-Trp-Thr-Val-Gln-
Pro-Ile-Val-Leu-Pro-Glu-Lys-Asp-Ser-Trp-Thr-Val-Asn-Asp-Ile-Gln-Lys-Leu-Val-Gly-Lys-
Leu-Asn-Trp-Ala-Ser-Gln-Ile-Tyr-Pro-Gly-Ile-Lys-Val-Arg-Gln-Leu-Cys-Lys-Leu-Leu-
Arg-Gly-Thr-Lys-Ala-Leu-Thr-Glu-Val-Ile-Pro-Leu-Thr-Glu-Glu-Ala-Glu-Leu-Glu-Leu-
Ala-Glu-Asn-Arg-Glu-Ile-Leu-Lys-Glu-Pro-Val-His-Gly-Val-Tyr-Tyr-Asp-Pro-Ser-Lys-
Asp-Leu-Ile-Ala-Glu-Ile-Gln-Lys-Gln-Gly-Gln-Gly-Gln.

La secuencia de polinucleótido de la invención, secuencia de polinucleótido II, también denominada *pol7*, tiene la siguiente secuencia:

(II) *pol7Y*

TAC AGT GCA GGG GAA AGA ATA GTA GAC ATA ATA GCA ACA GAC
ATA CAA ACT AAA GAA TTA CAA AAA CAA ATT ACA AAA ATT CAA
AAT TTT CGG GTT TAT TAC AGG GAC AGC AGA GAT CCA CTT TGG
AAA GGA CCA GCA AAG CTC CTC TGG AAA GGT GAA GGG GCA GTA
GTA ATA CAA GAT AAT AGT GAC ATA AAA GTA GTG CCA AGA AGA
AAA GCA AAG ATC ATT AGG GAT TAT GGA AAA CAG ATG GCA GGT
GAT GAT

Esta secuencia codifica la siguiente secuencia de aminoácidos. (Los aminoácidos escritos en letra cursiva representan el polipéptido BRU124F3X también descrito en la presente memoria).

(XIII) *pal7-aa*, polipéptido codificado por la secuencia de polinucleótido (II) *pol7*

Tyr-Ser-Ala-Gly-Glu-Arg-Ile-Val-Asp-Ile-Ile-Ala-Thr-Asp-Ile-Gln-Thr-Lys-Glu-Leu-Gln-
Lys-Gln-Ile-Thr-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-
Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Ser-Asp-
Ile-Lys-Val-Val-Pro-Arg-Arg-Lys-Ala-Lys-Ile-Ile-Arg-Asp-Tyr-Gly-Lys-Gln-Met-Ala-Gly-
Asp-Asp

Los polipéptidos objeto de la invención pueden emplearse unidos a un portador o vehículo macromolecular soluble (por ejemplo, no menor que 5 kDal). Convenientemente, el portador puede ser un poli(aminoácido), bien natural o sintético, para el cual es improbable encontrar anticuerpos en el suero humano. Los polipéptidos ilustrativos incluyen poli-L-lisina, seroalbúmina bovina, hemocianina de lapa bocallave, gamma-globulina bovina, etc. La elección se hace principalmente por motivos de conveniencia y disponibilidad.

Con dichos conjugados, habrá al menos una molécula de al menos un polipéptido objeto de la invención por macromolécula y no más que aproximadamente 1 por 0,5 kDal, usualmente no más que aproximadamente 1 por 2 kDal de la macromolécula. Uno o más polipéptidos diferentes pueden estar unidos a la misma macromolécula.

El modo de unión es convencional, empleando reactivos tales como ácido p-maleimido-benzoico, ácido metiliditio-benzoico, anhídrido del ácido maleico, anhídrido del ácido succínico, glutaraldehído, etc. La unión puede ocurrir en el extremo N-, el extremo C- o en cualquier sitio intermedio entre los extremos de la molécula. El polipéptido objeto de la invención puede derivatizarse mediante unión, puede unirse mientras está unido a un soporte o similares.

Los polipéptidos de la invención pueden usarse como reactivos en ensayos para detectar anticuerpos para HIV-1 o HIV-2 o sus antígenos. Los polipéptidos pueden emplearse como reactivos marcados o no marcados dependiendo de su uso. (Por marcador se denomina una molécula que, directamente o indirectamente proporciona una señal detectable). Puede emplearse diversos marcadores, tales como radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, sustratos de enzimas, cofactores o inhibidores, partículas, por ejemplo, partículas magnéticas, combinaciones de ligandos y receptores, por ejemplo, biotina y avidina o similares. Además los polipéptidos pueden ser modificados en una variedad de modos para unirse a una superficie, por ejemplo, placas de micropocillos, perlas de vidrio, superficies cromatográficas, por ejemplo, papel, celulosa, gel de sílice o similares. El modo particular mediante el cual los polipéptidos se unen a otro compuesto o superficie es convencional y se encuentra amplia ilustración en la bibliografía. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.371.515; 4.487.715; y patentes citadas en ellas.

Pueden emplearse diversos protocolos de ensayo para detectar la presencia de cualesquiera anticuerpos para proteínas retrovirales o de las propias proteínas retrovirales. De particular interés es usar el polipéptido como el reactivo marcado, en donde el agente marcador permite detectar una señal detectable, o unir el polipéptido, bien sea directamente o bien sea indirectamente a una superficie, en donde el anticuerpo o el polipéptido de la muestra llegarán a quedar unido al polipéptido sobre la superficie. La presencia de anticuerpos humanos unidos al polipéptido pue-

de detectarse luego empleando un anticuerpo xenogeneico específico para la inmunoglobulina humana, normalmente tanto IgM como IgG humanas, o una proteína marcada específica para complejos inmunes, por ejemplo, factor RF o Proteína A de *S. aureus*.

5 Pueden emplearse diversos protocolos heterogéneos, bien competitivos o no competitivos. El polipéptido puede estar unido a una superficie o soporte y el anticuerpo marcado dejado competir con el anticuerpo de la muestra para la cantidad limitada de anticuerpo unido. La cantidad de marcador unido al soporte estaría relacionada con la cantidad de anticuerpo competitivo en la muestra.

10 El anticuerpo anti-humano xenogeneico, por ejemplo, los anticuerpos para la región Fc de IgG y IgM (inmunoglobulinas), podrían estar unidos a un soporte. La muestra podría estar en contacto con las inmunoglobulinas y el polipéptido marcado, con lo cual la cantidad de polipéptido marcado unido al soporte sería indicativa de la presencia de los anticuerpos correspondiente.

15 Alternativamente, pueden emplearse ensayos homogéneos en donde el polipéptido está unido a una enzima, un agente fluorescente u otro marcador, donde la unión del anticuerpo al polipéptido da como resultado la posibilidad de discriminar entre el marcador implicado con un complejo de pareja de unión específica y el marcador que no está implicado en el complejo. Para ensayos que implican dichas técnicas, véase por ejemplo las patentes de EE.UU. N° 3.817.837; 3.850.752; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; y 4.098.876.

20 Como una ilustración de la presente invención el polipéptido objeto de la invención puede estar conjugado con una molécula fluorescente, tal como fluoresceína, rodamina o umbeliferona. En este ensayo la polarización fluorescente es diferente entre conjugado de polipéptido complejoado y no complejoado. Están disponibles aparatos para medir cambios en la polarización fluorescente, por ejemplo, TDx suministrado por Abbott Laboratories, Chicago, Illinois.

25 Un ejemplo de una técnica de ensayo es el uso de un recipiente de muestra, por ejemplo, pocillos de placas de micropocillos, en donde el polipéptido de la invención o sus conjugados se adhieren al fondo y/o las paredes del recipiente ya sea covalentemente o ya sea no covalentemente. La muestra normalmente sangre humana o suero diluido en un medio tamponado apropiado, se añade al recipiente y se deja un tiempo suficiente para la formación del complejo entre el(los) polipéptido(s) y cualquier anticuerpo relacionado de la muestra. El líquido sobrenadante se retira y el
30 recipiente se lava para retirar las proteínas no unidas específicamente.

Para la detección se emplea una proteína de unión específicamente marcada que se une específicamente al complejo. Al recipiente pueden añadirse antisueros xenogeneicos para la inmunoglobulina humana, particularmente anti-(IgM e IgG humanas) en un medio apropiadamente tamponado. Los antisueros xenogeneicos normalmente estarán marca-
35 dos con un marcador detectable, por ejemplo, peroxidasa de rábano silvestre. El marcador puede detectarse luego. Por ejemplo, con una enzima, después de la eliminación del marcador enzimático no específicamente unido, se añade una solución de revelador. La solución de revelador contendrá un sustrato enzimático y posiblemente cofactores enzimáticos, cromógenos, etc., que por reacción, proporcionan un producto coloreado, fluorescente, o quimioluminiscente que
40 puede ser detectado colorimétricamente, fluorimétricamente o por recuento de protones, respectivamente.

El polipéptido puede prepasarse por una amplia variedad de modos. El polipéptido, debido a su longitud relativamente corta, puede sintetizarse en solución o sobre un soporte sólido de acuerdo con protocolos conocidos. Véase, por ejemplo, *Stewart and Young, Solid Phase Polypeptide Synthesis, 2nd ed., Pierce Chemical Co., 1984; and Tam et al.,*
45 *J. Am. Chem. Soc. (1983) 105:6442.*

Alternativamente, como se estudia en la presente memoria, puede emplearse tecnología de DNA recombinante en donde puede prepararse una secuencia de polinucleótido recombinante empleando cadenas sencillas que codifiquen el polipéptido o sus cadenas sustancialmente complementarias. (Véase, por ejemplo, Maniatis, *supra*.)

50 Dependiendo de la naturaleza del ensayo, la muestra fisiológica, por ejemplo, saliva, sangre, plasma o suero puede tratarse previamente por dilución en un medio de ensayo, que usualmente será un medio tamponado acuoso que emplea una variedad de tampones, tales como fosfato, Tris, o similares. Un diluyente preferido es leche seca no grasa al 5% en p/v, Proclina 300 al 0,01%, antiespumante A al 0,005% en citrato sódico 150 mM. Usualmente el pH estará en el
55 intervalo de 6 a 9. La muestra se combinará luego con el reactivo de acuerdo con el protocolo apropiado y se dejará un tiempo suficiente para la unión. Cuando se use un sistema heterogéneo, usualmente las etapas de unión irán seguidas por lavados para minimizar la unión no específica. Al final del método, el agente marcador se detectará de acuerdo con los métodos convencionales.

60 Además el uso del polipéptido objeto de la invención y sus análogos en ensayos, el polipéptido objeto de la invención también se puede usar por si mismo o en combinación en vacunas. Los polipéptidos pueden formularse de una manera conveniente, generalmente a concentraciones en el intervalo de 1 µg a 20 mg/kg de organismo hospedante. Pueden usarse como portadores medios fisiológicamente aceptables, tales como agua estéril, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, y similares. Pueden emplearse coadyuvantes, tales como gel de hidróxido de aluminio o
65 similares. La administración puede ser por inyección, por ejemplo, intramuscularmente, intraperitonealmente, subcutáneamente, intravenosamente, etc. La administración puede ser una o una pluralidad de veces, usualmente a intervalos de una a cuatro semanas.

Se examinó la inmunoreactividad de los polipéptidos de I-IV antes mencionados, que mimetizan inmunológicamente los antígenos de HIV-1, para ocho sueros conocidos positivos al HIV-1 (es decir, GS91-[034, 037, 042, 046, 049, 052, 056 y 067], 11230, 11424, 11527, 11532 y 11535; todas las bandas fueron positivas en transferencia Western), y los resultados se muestran en la Tabla 1A del Ejemplo 2. Todos los polipéptidos listados anteriormente eran altamente reactivos para estas muestras.

Análogamente, se examinó la inmuno-reactividad de cada uno de los polipéptidos antes mencionados, que mimetizan inmunológicamente los antígenos de HIV-2, para cinco sueros conocidos positivos al HIV-2 (es decir, 92099, 92100, P-83, P-84, y P-86; todas las bandas fueron positivas en transferencia Western), y los resultados se muestran en la Tabla 1B del Ejemplo 2. El polipéptido, la glicoproteína (gp), 41-2-3GC (un polipéptido no glicosilado que es el objeto de la solicitud de patente de EE.UU. en tramitación 08/268388) era altamente reactivo para todas las cinco muestras. Todos los polipéptidos listados antes eran reactivos para al menos dos de estas cinco muestras. Los polipéptidos más reactivos fueron ROD 124C2X y ROD 124C5X que eran reactivos para todas las cinco muestras.

Ejemplo 1

Síntesis de polipéptidos pol de HIV

Se sintetizaron polipéptidos de la serie de pol de HIV cada uno por acoplamiento secuencial de aminoácido protegidos con t-butiloxycarbonilo sobre 0,35 mmol de resina de p-metilbenzildrilamina (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). La protección de la cadena lateral de los aminoácidos se hizo por grupos estándares basados en bencilo. El residuo de triptófano se protegió con un resto de formilo. Una vez completados los polipéptidos se desprotegeron y escindieron de la resina por el método estándar con alta concentración de HF concentrado o el método con baja concentración de HF de Tam et al., (J. Amer. Chem. Soc. 105:6442, 1983). El polipéptido escindido se extrajo de la resina en ácido acético al 50% y se sometió a cromatografía sobre Sephadex G-25, usando ácido acético al 20% como disolvente de elución. Las fracciones que contienen polipéptido se reunieron y liofilizaron.

Ejemplo 2

Inmuno-reactividad de los polipéptidos Pol

Los polipéptidos de la invención se ensayaron en cuanto a la reactividad inmunológica por ELISA como se ha descrito previamente en la Patente de EE.UU. 4.629.783. Explicado en pocas palabras, se prepararon soluciones madre de los polipéptidos de la invención a 0,5 mg/ml en urea 2M/ácido acético al 5%. Doce mililitros del ácido acético al 1,2% se colocaron en un tubo de polipropileno de 15 mililitros y se añadieron 48 microlitros de la solución madre del polipéptido al tubo y se mezclaron (la "solución de revestimiento"). Los pocillos de microplacas de titulación se llenaron con 100 μ l de la solución de revestimiento de los polipéptidos y se añadieron 100 μ l/pocillo de carbonato 0,24M /NaOH 0,2 N para elevar la solución hasta un pH alcalino. La placa se cubrió y se dejó reposar durante una noche a temperatura ambiente. La solución de revestimiento se retiró por aspiración y se añadieron 300 μ l/pocillo de solución de bloqueo de la placa (que contenía por litro: 25 g de leche seca no grasa, 14,7 g de citrato sódico dihidratado, 8,47 g de cloruro de sodio y 0,05 ml de antiespumante A, 1,0 ml de Kathon GC/ICP) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo se retiró por aspiración y las placas se usaron inmediatamente o se dejaron secar al aire y conservar para uso posterior. Para llevar a cabo el inmunoensayo, las muestras de plasma se diluyeron 20 veces en diluyente de muestra (que contenía por litro: 44,1 g de citrato de sodio dihidratado, 1,2 ml de Tween 20, 50 g de leche no grasa, 0,05 ml de antiespumante A, 50 ml de suero de cabra, 58,6 g de ácido 2-[N-morfolino]etanosulfónico, 92,9 g de hidrocloreuro de trietanolamina, 1 ml de Proclina 300) y se añadieron 100 μ l a los pocillos individuales. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C, luego se retiraron y los pocillos se lavaron cinco veces con NaCl 0,1M/Tween 20 al 0,05% (350 μ l/lavado). Cien microlitros de conjugado de Ig anti-humana-peroxidasa de rábano silvestre diluido en tampón de citrato, pH 7,0, que contenía 1% de suero de cabra normal se añadieron a cada pocillo durante 30 minutos a 37°C antes de lavar cinco veces como antes. El ensayo ELISA se desarrolló añadiendo 100 μ l/pocillo de solución sustrato (80 μ g/ml de tetrametilbencidina, peróxido de hidrógeno al 0,0015% en tampón de citrato/fosfato, pH 6,0) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron con la adición de 100 μ l de H₂SO₄ 1N por pocillo, y se determinó el cociente entre la densidad óptica a 450 nm y a 630 nm en un aparato lector ELISA automatizado. El valor de corte para un resultado positivo se estableció a 0,200 unidades por encima de absorbancia por encima de la absorbancia media obtenida de al menos tres muestras negativas conocidas.

Los resultados de la Tabla 1A muestran la reactividad de los polipéptidos de la invención con muestras de HIV-1 positivas y negativas en donde las muestras de HIV-1 positivas son GS91-(034, 037, 042, 046, 049, 052, 056, 067), 11230, 11424, 11527, 11532 y 11535, y las muestras negativas son PS1059 -PS1062, PS1068, PS1071 y D21-D25.

ES 2 286 854 T3

TABLA 1A

Absorbancia (450 nm/630 nm)**

Muestra*	BRU124E	BRU124F1X	BRU124F3X	BRU124EX***
GS91-034	0,606	1,000	0,945	n.d.
GS91-037	0,507	1,584	1,551	n.d.
GS91-042	1,860	1,899	1,888	n.d.
GS91-046	1,598	1,848	1,831	n.d.
GS91-049	1,034	1,955	1,991	n.d.
GS91-052	1,606	1,852	1,917	n.d.
GS91-056	1,848	1,966	1,957	n.d.
GS91-067	1,960	2,110	2,110	n.d.
PS1071	0,036	0,040	0,046	n.d.
PS1062	0,041	0,047	0,046	n.d.
PS1070	0,034	0,039	0,043	n.d.
PS1061	0,020	0,023	0,021	n.d.
PS1069	0,034	0,039	0,039	n.d.
PS1060	0,027	0,052	1,044	n.d.
PS1068	0,028	0,039	0,037	n.d.
PS1069	0,043	0,046	0,049	n.d.
11535	n.d.	n.d.	n.d.	1,652
11527	n.d.	n.d.	n.d.	2,595
11532	n.d.	n.d.	n.d.	2,912
11424	n.d.	n.d.	n.d.	2,676
11230	n.d.	n.d.	n.d.	0,759
D21	n.d.	n.d.	n.d.	0,096
D22	n.d.	n.d.	n.d.	0,045
D23	n.d.	n.d.	n.d.	0,053
D24	n.d.	n.d.	n.d.	0,044
D25	n.d.	n.d.	n.d.	0,034

* Las muestras se diluyeron 1/40, en lugar de 1/20, para poder comparar la absorbancia entre diferentes polipéptidos. Los GS91-(034, 037, 042, 046, 049, 052, 056, 067), 11230, 11424, 11527, 11532 y 11535) son muestras conocidas positivas al HIV-1; las muestras PS1059-PS1062, PS1068, PS1071 y D21-25 son muestras conocidas negativas al HIV-1.

** Los valores resaltados en letra negrita son valores positivos basados en el valor de corte establecido por 0,200 + media de valores negativos. Corte = 0,238 (excepto BRU124EX). El valor de corte para BRU124EX = 0,254.

*** El ensayo para la reactividad de BRU124EX se hizo separadamente en una fecha diferente usando diferentes muestras.
n.d. = no hecho (o ensayado)

Los resultados de la Tabla 1B muestran la reactividad de los polipéptidos de la invención con muestras positivas y negativas al HIV-2 en donde las muestras positivas al HIV-1 son 92099, 92100, P-83, P-84 y P-86 y las muestras negativas NBD1, NBD2, NBD3, Y NBD4.

ES 2 286 854 T3

TABLA 1B

Absorbancia (450 nm/630 nm)*

Mues- tra	41-2- 3GC	E1	EX	C1X	C2X	C3X	C5X	2A1
92099	>3,00	0,41	0,73	0,24	1,61	0,78	1,77	1,91
92100	>3,00	0,47	0,75	0,26	1,91	0,88	1,82	1,86
P-83	2,82	0,44	1,05	0,10	1,02	0,45	1,06	0,08
P-84	>3,00	0,47	1,04	0,27	0,75	0,40	0,73	0,18
P-86	>3,00	0,16	0,23	0,16	0,35	0,20	0,34	0,13
NBD1	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,09
NBD2	0,11	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,12	0,11
NBD3	0,04	0,03	0,05	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03
NBD4	0,07	0,05	0,06	0,05	0,04	0,05	0,07	0,05

*** Los valores resaltados en letra negrita son valores positivos basados en los valores de corte establecidos por 0,200 + media del valores negativos. Corte = 0,256.

Las muestras positivas conocidas son 92099, 92100, P-83, P-84 y P-86 y las muestras conocidas negativas son NBD1, NBD2, NBD3, AND NBD4.

Una mejora de la especificidad de la detección de anticuerpos para HIV-1 y HIV-2 por la incorporación de polipéptidos *pol* (BRU124F3X y ROD124C5X) se ilustra en los resultados del estudio mostrado en la Tabla 1C. En este estudio, Los polipéptidos *pol* estaban revestidos en la placa de micropocillos individualmente o juntamente con polipéptidos específicos de la envoltente, como se ha mencionado en la Patente de EE.UU. N° 5.439.792, cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria como referencia. Para el revestimiento de la placa con polipéptidos *pol* individuales, el polipéptido se revistió a 1,0 µg/ml. Para el revestimiento de la mezcla de polipéptidos HIV-1 y HIV-2, los polipéptidos se mezclaron junto a las concentraciones siguientes en el tampón de revestimiento: 1,23 µg/ml para el polipéptido de la envoltente de HIV-1 (denominado MNGC), 0,64 µg/ml para el polipéptido de la envoltente de HIV-2 (denominado 41-2-3GC), 0,25 ng/ml para BRU124F3X y 0,125 µg/ml para ROD124C5X. El método de revestimiento con el polipéptido fue el mismo que se ha descrito anteriormente en el apartado "inmuno-reactividad". Las muestras ensayadas son muestras conocidas de HIV-1 (todas las bandas de transferencia Western positivas) (es decir, SAL040, SAL041, SAL059, SAL063, SAL064), muestras de HIV-2 conocidas (todas las bandas de transferencia Western positivas) (es decir, 52, GB92000128, GB92000152, GB92000154, GB92000158), muestras indeterminadas de HIV-1 (es decir, B3113, B5813, B5885, B7045, C000127, C000214, C000455) y muestras indeterminadas de HIV-2 (es decir, B3123, B5605, B5810, B5826, B5832, B5875, B6312). También se incluyen muestras de control usadas en el kit de inmunoensayo enzimático (abreviadamente EIA del inglés *Enzyme Immunoassay*) del péptido HIV-1/HIV-2 de The Genetic Systems® (disponible de Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc., Redmond, Washington), concretamente control positivo (PC-1), de HIV-1 control positivo (PC-2) de HIV-2 y control negativo [(PC = *positive control*, NC = *negative control*)]. Tanto las muestras positivas conocidas como las indeterminadas se ensayaron en un ensayo basado en lisado viral comercialmente disponible, ensayo inmunoenzimático para HIV-1/HIV-2 de The Genetic Systems® (Sanofi Diagnostics Pasteur, Inc., Redmond).

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1C

COMPARACIÓN DE TODAS LAS BANDAS POSITIVAS DE TRANSFERENCIA WESTERN DE HIV-1/2 Y REACTIVIDADES DE MUESTRAS INDETERMINADAS EN ENSAYO ELISA CON PLACAS REVESTIDAS SOLAMENTE CON POL Y PLACAS REVESTIDAS CON CUATRO PÉPTIDOS

Muestra	4 Péptidos*				HIV-1 pol(BRU124F3X) solamente				HIV-2 pol (RODI24C5X) solamente				H1V-1/2 Lisado viral ***	
	A450/A630	S/CO	Pos/Neg**		A450/A630	S/CO	Pos/Neg**		A450/A630	S/CO	Pos/Neg**		S/CO	Pos/Neg**
PC-1	1,610	4,8	P		1,503	3,0	P		0,441	0,8	N		N.A.	N.A.
PC-2	1,639	4,9	P		1,539	3,1	P		0,451	0,9	N		N.A.	N.A.
	1,259	3,8	P		0,307	0,6	N		0,438	0,8	N		N.A.	N.A.
NC	1,221	3,7	P		0,301	0,6	N		0,560	1,1	P		N.A.	N.A.
	0,093	0,3	N		0,254	0,5	N		0,279	0,5	N		N.A.	N.A.
Corte	0,091	0,3	N		0,265	0,5	N		0,302	0,6	N		N.A.	N.A.
	0,332	N.A.	-		0,500	N.A.	-		0,531	N.A.			N.A.	N.A.
HIV-1 WB Pos.														
SAL040	2,985	9,0	P		2,956	5,9	P		2,709	5,1	P		>8,0	P
SAL041	3,028	9,1	P		2,876	5,8	P		2,555	4,8	P		>8,0	P
SAL059	2,957	8,9	P		2,796	5,6	P		2,238	4,2	P		>8,0	P
SAL063	3,009	9,1	P		2,790	5,6	P		2,714	5,1	P		>8,0	P
SA1064	2,934	8,8	P		2,893	5,8	P		2,865	5,4	P		>8,0	P
HIV-2 WB Pos.52	2,972	9,0	P		2,738	5,5	P		2,669	5,0	P		>8,0	P
GB92000128	2,939	8,9	P		2,698	5,4	P		2,872	5,4	P		>8,0	P
GB92000152	2,904	8,7	P		2,533	5,3	P		2,743	5,2	P		>8,0	P
GB92000154	3,011	9,1	P		2,677	5,4	P		2,857	5,4	P		>8,0	P
GB92000158	3,061	9,2	P		2,723	5,5	P		2,930	5,5	P		>8,0	P

TABLA 1 CONTINUACIÓN)

COMPARACIÓN DE TODAS LAS BANDAS POSITIVAS DE TRANSFERENCIA WESTERN DE HIV-1/2 Y REACTIVIDADES DE MUESTRAS INDETERMINADAS EN ENSAYO ELISA CON PLACAS REVESTIDAS SOLAMENTE CON POL Y PLACAS REVESTIDAS CON CUATRO PÉPTIDOS

Muestra	4 Péptidos*				HIV-1 pol(BRU124F3X) solamente			HIV-2 pol (ROD124C5X) solamente			HIV-1/2 Lisado viral ***	
	A450/A630	S/CO	Pos/Neg**	A450/A630	S/CO	Pos/Neg**	A450/A630	S/CO	Pos/Neg**	S/CO	Pos/Neg**	
HIV-1 Indeterminados												
83113	0,094	0,3	N	0,346	0,7	N	0,253	0,5	N	3,2	FP	
85813	0,063	0,2	N	0,303	0,6	N	0,244	0,5	N	3,0	FP	
B5885	0,063	0,2	N	0,152	0,3	N	0,154	0,3	N	3,1	FP	
B7045	0,062	0,2	N	0,241	0,5	N	0,208	0,4	N	3,5	FP	
C000127	0,050	0,2	N	0,172	0,3	N	0,177	0,3	N	3,1	FP	
C000214	0,056	0,2	N	0,157	0,3	N	0,155	0,3	N	5,4	FP	
C000455	0,065	0,2	N	0,136	0,3	N	0,179	0,3	N	5,4	FP	
HIV-2 Indeterminados												
B3123	0,051	0,2	N	0,142	0,3	N	0,188	0,4	N	3,2	FP	
85805	0,074	0,2	N	0,203	0,4	N	0,276	0,5	N	3,8	FP	
65810	0,053	0,2	N	0,204	0,4	N	0,205	0,4	N	4,3	FP	
85826	0,049	0,1	N	0,145	0,3	N	0,177	0,3	N	3,0	FP	
85832	0,057	0,2	N	0,183	0,4	N	0,195	0,4	N	3,2	FP	
85875	0,056	0,2	N	0,254	0,5	N	0,286	0,5	N	3,8	FP	
B6312	0,027	0,1	N	0,150	0,3	N	0,155	0,3	N	2,8	FP	

*4 péptidos = MNGC (1,23 µg/ml); 41-2-3GC (0,64 µg/ml); BRU124F3X (0,25 µg/ml); ROD124C5X (0,125 µg/ml)

HIV-1 pol((BRU124F3X) solamente y HIV-2 pol(124C5X) solamente = 1,0 µg/ml cada uno.

HIV-1 y HIV-2 WB Pos. = Todas las bandas de la transferencia Western fueron muestras positivas

HIV-1 y HIV-2 Indeterminados = Transferencias Western indeterminadas

** En las columnas Pos./Neg.: P = Positivo; N = Negativo; FP = Falso Positivo

***Inmunoensayo enzimático para HIV-1/2 de Genetic Systems® (aprobado por The Federal Drug Administration)

La Tabla 1C muestra que todas las muestras conocidas positivas a HIV-1 y HIV-2 mostraron resultados positivos cuando se usa bien sea una placa revestida con solo polipéptido *pol* o bien sea la placa revestida con todos los cuatro polipéptidos. Todas las muestras indeterminadas de HIV-1 y HIV-2 mostraron resultados negativos cuando se usó bien sea una placa revestida con un solo polipéptido *pol* o la placa revestida con todos los cuatro polipéptidos. Las muestras indeterminadas mostraron resultados altamente positivos (falsos positivos) cuando se ensayaron usando el inmunoensayo enzimático (EIA) para HIV-1/HIV-2 basado en lisado vital. Estos resultados mostraron muy claramente que el EIA basado en el polipéptido que incorpora los polipéptidos *pol* de la invención es altamente sensible y específico en detectar muestras positivas al HIV.

Ejemplo 3

*Clonación del *pol23* y *pol7**

Ambos *pol23* y *pol7* recombinantes se clonaron inicialmente en el sistema pGEX (Pharmacia). Los insertos clonados se movieron luego a otros vectores de expresión que proporcionan “asas de purificación” para simplificar el análisis de la expresión de genes.

pGEX/pol23 recombinante

Se generó un producto de PCR usando DNA viral de HIV-1 aislado del lisado viral de la cepa LAI de HIV-1 como un molde, y el par cebador 5'-AGCACCATGGGGATCCCAGGGATTAGATATCAGTACAATG-3' (SEQ ID NO: 16) y 5'-AGTCAGAATTCATTGGCCTTGCCCTGCTT-3' (SEQ ID NO. 17). Las reacciones de la PCR usando DNA-polimerasa de *UITma* (Perkin Elmer) para minimizar la posibilidad de mutación debida a error de la polimerasa. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI* y se insertó en pGEX 5X-1 digerido con *BamHI*, *EcoRI* (Pharmacia). La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH11S y colonias seleccionadas resistentes a la ampicilina (véase Maniatis, *supra*).

Las colonias que contienen insertos se identificaron inicialmente por PCR de colonias. Esto fue seguido por crecimiento, aislamiento de plásmido¹, y análisis de restricción para demostrar que los clones candidatos contenían los sitios de restricción predichos (véase, Maniatis, *supra*). En la Figura 1 se representa el mapa del plásmido resultante.

pGEX/pol7.0 recombinante

Como se ha descrito antes, se generó un producto de PCR usando un molde de DNA viral de HIV, y el par cebador 5'-AGCACCATGGGGATCCCCTACAGTGCAGGGGAAAGAATA-3' (SEQ ID NO. 18) y 5'-GACTAGTCGACTCAATCATCACCTGCCATCTG-3' (SEQ ID NO.19). Las reacciones de PCR usaron DNA-polimerasa de *UITma* (Perkin-Elmer) para minimizar la posibilidad de mutación debida a error de la polimerasa. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *BamHI* y *SalI* y se insertó en pGEX 5X-1 digerido con *BamHI*, *SalI*. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH11S y colonias seleccionadas resistentes a la ampicilina.

Las colonias que contenían insertos se identificaron inicialmente por PCR de colonias. Esto fue seguido por crecimiento, aislamiento de plásmido, y análisis de restricción para demostrar que los clones candidatos contenían los sitios de restricción predichos (véase, Maniatis, *supra*). En la Figura 2 se representa el mapa del plásmido resultante.

Subclonación de pGEX/pol23 y pGEX/pol7.0 en vectores de expresión pQE42 y pThioHisA

El DNA del inserto se preparó a partir de *pGEX/pol23* y *pGEX/pol7.0* por digestión con las enzimas *BamHI* y *SalI*. Los vectores de expresión comercial pThioHisA (Invitrogen) y pQE42 (QIAGEN) fueron digeridos cada uno con las enzimas *BglII*² y *SalI*. En reacciones de ligación separadas, cada inserto se unió a cada vector (véase Maniatis, *supra*). De nuevo, se seleccionaron los transformantes resistentes a ampicilina en la cepa hospedante *E. coli* DH11 S. La identidad de los clones se verificó por PCR de colonias y análisis de restricción del DNA del plásmido purificado. Los recombinantes resultantes se denominaron pQE/*pol23*, pQE/*pol7.0*, pThioHis/*pol23* y pThioHis/*pol7.0*. (Los mapas de los plásmidos de los clones resultantes se representan en las Figuras 3 a 6 respectivamente).

Ejemplo 4

Expresión de las proteínas de los clones del Ejemplo 3

Todos los sistemas de expresión de los tres plásmidos, pGEX, pThioHisA y pQE42, que emplean el promotor *tac* están regulados negativamente (desconectados) por glucosa y regulados positivamente (conectados) por IPTG análogo de lactosa.

¹ El DNA del plásmido se preparó a partir de cultivos bacterianos recombinantes crecidos durante una noche a 37°C en caldo de Luria más 100 mg/ml de ampicilina usando el kit de plásmidos *QUIA well 8 plus* (QIAGEN).

² Adviértase que las enzimas *BamHI* y *BglII* producen extremos cohesivos que pueden unirse por ligación.

ES 2 286 854 T3

Cultivos de 25 ml de cada uno de los recombinantes *pThioHis/pol23* y *pThioHis/pol7.0* se hicieron crecer en caldo T completo más 100 mg/ml de ampicilina, glucosa al 1,0% a 37°C (con agitación) hasta que la densidad óptica a 600 nm estaba entre 2 y 6. Las células se sedimentaron luego y se resuspendieron en medio libre de glucosa de nueva aportación que contenía IPTG 1 mM para inducir la expresión de la proteína de fusión recombinante. Después de 2 horas adicionales de incubación, los cultivos inducidos se cosecharon por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos. El medio sobrenadante resultante se desechó y los sedimentos de células se congelaron a -70°C.

Los sedimentos congelados se descongelaron y resuspendieron en 2,0 ml de un medio acuoso de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,8 y NaCl 500 mM. Las células se lisaron por dos ciclos de congelación en un baño de hielo seco/etanol seguidos por descongelación en agua templada y 10 cortos tratamientos con ultrasonidos. El lisado resultante se centrifugó luego en una microcentrífuga Eppendorf a máxima velocidad hasta sedimentación. Los sobrenadantes del lisado y los sedimentos se usaron para más purificación.

pQE/pol23, pQEpol7.0: Purificación con Ni-NTA

Para estos recombinantes, los sedimentos del lisado se disolvieron en un tampón acuoso que comprende fosfato sódico 20 mM, pH 7,8 y urea 8M. Esta suspensión se unió a Ni-NTA-agarosa (QIAGEN) que estaba pre-equilibrada en el mismo tampón. El material no unido se separó por lavado usando el mismo tampón. La proteína unida se eluyó luego con tampón acuoso que comprendía fosfato de sodio 20 mM, urea 6,4 M y EDTA 100 mM. Las proteínas de fusión resultantes se analizaron por SDS-PAGE.

Los sobrenadantes del lisado también se purificaron, usando métodos detallados más adelante, sin embargo en los sedimentos del lisado se encontraron niveles superiores de proteína recombinante.

pThioHis/pol23, pThioHis/pol7.0: Purificación con Ni-NTA

Para estos lisados recombinantes, los sobrenadantes del lisado se unieron a Ni-NTA que estaba pre-equilibrado en un tampón acuoso que comprendía fosfato sódico 20 mM, pH 7,8 y NaCl 500 mM. El material no unido se separó por lavado con el mismo tampón, y luego de nuevo con tampón de lavado acuoso (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,0, NaCl 500 mM).

La proteína unida se eluyó en cuatro etapas sucesivas usando concentraciones crecientes de imidazol en el tampón de lavado (50 mM, 200 mM, 350 mM, 500 mM). El análisis por SDS-PAGE mostró que el imidazol 350 mM era la condición de elución óptima para estos recombinantes.

SDS-PAGE y análisis por transferencia Western

Usando técnicas estándares de laboratorio, las muestras de las proteínas de fusión parcialmente resultantes se separaron por SDS-PAGE. Se usaron geles de gradientes de Novex-poliacrilamida al 4-20%.

En todos los casos se observó que las proteínas de fusión recombinantes migraban cerca de los tamaños predichos como se ve en la Tabla 2.

TABLA 2

Polipéptido recombinante	Peso molecular predicho de la proteína de fusión	Forma purificada
<i>pQE/pol23</i>	46 kD	Sedimento de lisado
<i>pQE/pol7.0</i>	33.5 kD	Sedimento de lisado
<i>pThioHis/pol23</i>	37 kD	Sobrenadante del lisado
<i>pThioHis/pol7.0</i>	24 kD	Sobrenadante del lisado

Las proteínas separadas también se transfirieron a un soporte de nitrocelulosa para análisis por transferencia Western. El método de transferencia electroforética semi-seca (*Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual* pp. 488-489) se usó para transferir proteínas que han sido sometidas a electroforesis a membranas de nitrocelulosa.

Después de transferencia, las membranas se bloquearon con Blotto (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, leche seca no grasa al 5,0%, Tween-20 al 0,1%) durante la noche a 4°C o una hora a temperatura ambiente. Después de separar el agente de bloqueo la membrana se incubó con el anticuerpo primario³ diluido en Blotto, durante una hora a temperatura ambiente. La solución de anticuerpo primario se desechó luego y la mancha se lavó cuatro veces durante 5 minutos cada vez con Botto. El conjugado secundario anticuerpo-enzima⁴ se añadió luego durante un periodo de 30 minutos a la temperatura de incubación. Después de 30 minutos, el anticuerpo secundario se desechó y la mancha de transferencia se lavó de nuevo cuatro veces como antes. Esto va seguido por un lavado con agua y luego la adición de la solución de sustrato de color⁵.

El desarrollo de color se detuvo lavando con agua después de que aparecieran las bandas. Las bandas de las proteínas *pQE/pol23* y *pThioHis/pol23* se hicieron reaccionar ambas en transferencias Western usando uno de los anticuerpos monoclonales, mientras que las bandas de proteínas *pQE/pol7.0* y *pThioHis/pol7.0* reaccionaban ambas con la otra. Todas las cuatro bandas fueron detectadas con el suero humano positivo al HIV-1.

Ejemplo 5

Ensayo inmunoenzimático (EIA)

Las placas del EIA se revistieron con las proteínas de fusión recombinantes parcialmente purificadas. Cada muestra se revistió a una dilución de 1:500 en tampón de revestimiento carbonato 15 mM/bicarbonato 35 mM, pH 9,6 durante una noche a temperatura ambiente. Las placas revestidas fueron luego bloqueadas "ON/OFF" (leche seca no grasa al 2,5%), "ON/OFF" revestidas con una solución de sacarosa al 4%, y secadas al aire durante una noche. Tal como se prepararon las placas se conservaron a en una bolsa herméticamente cerrada con desecante.

Cada proteína de fusión recombinante se ensayó para reactividad con 16 muestras positivas al HIV-1, 8 muestras de donantes normales, y 4 muestras reactivas con *E. coli*. Las muestras reactivas con *E. coli* eran muestras que previamente habían mostrado tener una alta reactividad para proteínas procedentes del lisado de *E. coli*. Estas se incluyeron para asegurar que la reactividad que observamos las muestras positivas al HIV-1 es específica para el polipéptido recombinante y no están dirigidas hacia proteínas contaminantes de *E. coli*.

Expresado en pocas palabras, las muestras se diluyeron 1:101 en un diluyente de muestras (que contenía por litro, 44,1 g de citrato de sodio dihidratado, 1,2 ml de Tween 20, 50 g de leche seca no grasa, 0,05 ml de antiespumante A, 50 ml de suero de cabra, 58,6 g de ácido 2-[morfolino]etanosulfónico, 92,9 g de hidrocloreto de trietanolamina, 1 ml de Proclin 300) y 200 µl de las mezclas resultantes se añadieron a cada pocillo de las placas previamente preparadas. Las placas se cubrieron y se incubaron a 37 ± 1°C durante 60 minutos. El fluido se aspiró de cada pocillo y la placa se lavó un mínimo de 5 veces con una solución de lavado (NaCl 0,1M/Tween 20 al 0,05%).

A cada pocillo se añadió 100 µl de una solución de conjugado (conjugado de Ig anti-humana de cabra-peroxidasa de rábano silvestre en tampón de citrato, pH 7,0 que contenía suero de cabra normal al 1%). Las placas se cubrieron luego y se incubaron durante 60 minutos a 37 ± 1°C. Después de incubación, el fluido se aspiró de cada pocillo y la placa se lavó un mínimo de 5 veces con la solución de lavado.

Se añadieron a cada pocillo 100 µl de una solución de cromógeno (80 µg/ml de tetrametilbencidina, peróxido de hidrógeno al 0,0015% en tampón de citrato/fosfato, pH 6,0). Las placas se cubrieron luego y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de retirar la tapa y añadir 100 µl de reactivo de detención (H₂SO₄ 1N) las placas se leyeron a una absorbancia de 450 nm con 615 nm a 630 nm como referencia. Se calculó el cociente entre las densidades ópticas a 450 nm y a 630 nm. El valor de corte para un resultado positivo fue establecido a 0,200 unidades de absorbancia por encima de la absorbancia media obtenida de al menos tres muestras negativas conocidas. Los resultados de estos métodos se presentan en la Tabla 3.

³Se usaron dos anticuerpos monoclonales de ratón contra *pol* de HIV a diluciones de 1:4000. Se usó un suero humano positivo al HIV a una dilución de 1:500.

⁴El conjugado secundario de anticuerpo fue anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (1:2000) en Blotto si el anticuerpo primario fue anticuerpo monoclonal de ratón o anticuerpo anti-humano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (1:2000) en Blotto si el anticuerpo primario era de suero humano.

⁵La tetrametilbencidina (TMB) (Vector Labs) fue el sustrato usado con el conjugado de anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano silvestre, mientras que se usó un sustrato de un componente BCIP/NBT (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc.) con el conjugado de anticuerpo secundario con fosfatasa alcalina

TABLA 3

Muestras	Placas revestidas			
	pQE/pol23	pQE/pol7.0	pTH/pol23	pTH/pol7.0
87095	2,122	1,903	0,557	1,68
C000218	1,553	2,11	0,046	2,042
C000582	1,557	1,618	0,208	1,219
B3137	2,075	2,155	0,949	1,933
B5878	2,142	0,107	0,732	0,064
B5879	2,255	2,13	1,075	2,14
B5847	0,042	0,132	0,01	0,049
C000024	0,051	2,278	0,018	2,225
85853	1,671	2,212	0,509	2,154
B3138	0,916	1,732	0,2	1,295
B5895	0,944	0,717	0,027	0,587
C000130	0,438	0,598	0,021	0,299
C000136	0,947	1,622	0,08	1,385
B5889	1,438	1,139	0,25	0,649
B5822	0,331	0,05	0,051	0,031
SAL054	2,044	1,802	0,955	1,771
PSBC1171	0,07	0,021	0,019	0,014
PSBC1265	0,033	0,019	0,014	0,018
PSBC1341	0,014	0,01	0,009	0,01
PSBC7398	0,028	0,015	0,013	0,013
PSBC1481	0,027	0,017	0,014	0,016
PSBC1521	0,021	0,023	0,013	0,014
PSBC1657	0,028	0,017	0,014	0,011
PS8C1566	0,017	0,012	0,011	0,01
EC+1	0,039	0,028	0,015	0,025
EC+2	0,046	0,074	0,021	0,03
EC+3	0,048	0,024	0,014	0,03
EC+4	0,022	0,015	0,011	0,023

Es evidente de los resultados anteriores que empleando uno o una combinación de polipéptidos de la presente invención, se obtiene un ensayo sensible y seguro para detectar la presencia de anticuerpos para el HIV. Los polipéptidos de la invención pueden usarse solos o en combinación con un ensayo de escrutinio o confirmatorio, mientras que el lisado completo o los antígenos completos pueden emplearse como un método independiente. Los polipéptidos de la invención también pueden combinarse con polipéptidos o proteínas derivados de las regiones de la envoltura o las regiones *gag* de HIV-1 o HIV-2 en un ensayo de escrutinio o un ensayo confirmatorio. Además, debido a las especificidades de los polipéptidos, se podría anticipar que las secuencias de DNA que codifican los polipéptidos encontrarían una especificidad similar en un ensayo de hibridación de DNA.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia de anticuerpos para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) en un fluido corporal, que comprende:

(a) poner en contacto, en condiciones que permitan la unión inmuno-específica para formar una mezcla de reacción, el fluido corporal con una composición que contiene al menos un polipéptido o proteína que consisten las siguientes secuencias de aminoácidos:

(III) BRU 124F1X

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-
Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-
Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Ser-Asp-
Ile-Lys-Y-Z

(IV) BR 124F3X

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-
Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-
Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Y-Z

(XIII) pol7-aa

W-S-Tyr-Ser-Ala-Gly-Glu-Arg-Ile-Val-Asp-Ile-Ile-Ala-Thr-
Asp-Ile-Gln-Thr-Lys-Glu-Leu-Gln-Lys-Gln-Ile-Thr-Lys-Ile-
Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-Arg-Asp-Pro-
Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-
Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Ser-Asp-Ile-Lys-Val-Val-
Pro-Arg-Arg-Lys-Ala-Lys-Ile-Ile-Arg-Asp-Tyr-Gly-Lys-Gln-
Met-Ala-Gly-Asp-Asp-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo amino terminal NH₂ del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adicional(es) unido(s) al grupo amino terminal NH₂ del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos adicionales para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly ó Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH₂.

(b) detectar si ha ocurrido la unión inmuno-específica entre el polipéptido y un componente de anticuerpo del fluido corporal en el cual se forma un complejo inmune en el cual la detección del complejo inmune indica la presencia de anticuerpos para el HIV en el fluido corporal.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el polipéptido está conjugado a una macromolécula portadora.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el polipéptido está inmovilizado.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la unión inmuno-específica es detectada por inmunoprecipitación.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la composición incluye al menos un polipéptido seleccionado de una proteína polimerasa de HIV-1 y uno seleccionado de una proteína polimerasa de HIV-2.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la unión inmuno-específica entre el polipéptido o proteína y el componente anticuerpo del fluido corporal se detecta por las etapas siguientes:

ES 2 286 854 T3

(i) retirar los componentes no unidos de los complejos inmunes formados en la mezcla de inmuno-reacción;

(ii) añadir un anticuerpo marcado a la mezcla de inmuno-reacción, siendo capaz el anticuerpo marcado de unirse inmuno-específicamente a un componente de los complejos inmunes y proporcionar la marca una señal detectable; y

(iii) determinar si el anticuerpo marcado se une a los complejos inmunes.

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual el marcador comprende un marcador fluorescente.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual el marcador comprende una enzima que se detecta por la adición del sustrato enzimático.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual el marcador comprende un marcador fluorescente.

10. Un método para determinar la presencia de anticuerpos para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) en un fluido corporal, que comprende:

(a) poner en contacto, en condiciones que permitan la unión inmuno-específica para formar una mezcla de reacción, el fluido corporal con una composición que contiene al menos un polipéptido o proteína que consiste en las siguientes secuencias de aminoácidos:

(III) BRU 124F1X

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-
Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-
Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Ser-Asp-
Ile-Lys-Y-Z

(IV) BR 124F3X

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-
Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-
Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Y-Z

(XIII) pol7-aa

W-S-Tyr-Ser-Ala-Gly-Glu-Arg-Ile-Val-Asp-Ile-Ile-Ala-Thr-
Asp-Ile-Gln-Thr-Lys-Glu-Leu-Gln-Lys-Gln-Ile-Thr-Lys-Ile-
Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-Arg-Asp-Pro-
Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-
Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Ser-Asp-Ile-Lys-Val-Val-
Pro-Arg-Arg-Lys-Ala-Lys-Ile-Ile-Arg-Asp-Tyr-Gly-Lys-Gln-
Met-Ala-Gly-Asp-Asp-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo amino terminal NH_2 del polipéptido o bien sea uno o más aminoácido(s) adicional(es) unido(s) al grupo amino terminal NH_2 del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos adicionales para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly ó Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH_2 .

(b) determinar si ha ocurrido la unión inmuno-específica entre el polipéptido y un componente de anticuerpo del fluido corporal en el cual la detección del complejo inmune indica la presencia de anticuerpos para el HIV en el fluido corporal.

11. Una composición de polipéptido inmuno-reactiva a anticuerpos para el HIV, que consiste en una o más de las secuencias de aminoácidos:

(III) BRU 124F1X

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-
Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-
Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Ser-Asp-
Ile-Lys-Y-Z

(IV) BR 124F3X

W-X-Lys-Ile-Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-
Arg-Asp-Pro-Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-
Lys-Gly-Glu-Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Y-Z

(XIII) pol7-aa

W-S-Tyr-Ser-Ala-Gly-Glu-Arg-Ile-Val-Asp-Ile-Ile-Ala-Thr-
Asp-Ile-Gln-Thr-Lys-Glu-Leu-Gln-Lys-Gln-Ile-Thr-Lys-Ile-
Gln-Asn-Phe-Arg-Val-Tyr-Tyr-Arg-Asp-Ser-Arg-Asp-Pro-
Leu-Trp-Lys-Gly-Pro-Ala-Lys-Leu-Leu-Trp-Lys-Gly-Glu-
Gly-Ala-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Asn-Ser-Asp-Ile-Lys-Val-Val-
Pro-Arg-Arg-Lys-Ala-Lys-Ile-Ile-Arg-Asp-Tyr-Gly-Lys-Gln-
Met-Ala-Gly-Asp-Asp-Y-Z

en donde W es bien sea un H del grupo amino terminal NH₂ del polipéptido o uno o más aminoácido(s) adicional(es) unido(s) al grupo amino terminal NH₂ del polipéptido, seleccionándose los aminoácidos adicionales para facilitar el acoplamiento del polipéptido a una proteína portadora o a un soporte; X está ausente o es Cys-Gly-Gly ó Lys-Lys, Y está ausente o es Cys o uno o más aminoácidos añadidos para facilitar el acoplamiento; y Z es OH ó NH₂.

12. La composición de polipéptido de la reivindicación 11, en donde dicho polipéptido tiene la fórmula (III) BRU124F1X.

13. La composición de polipéptido de la composición 11, en donde dicho polipéptido la fórmula (IV) BRU124F3X.

14. La composición de polipéptido de la reivindicación 11, en donde dicho polipéptido tiene la fórmula (XIII) pol7-aa.

15. Una composición de polipéptido inmuno-reactiva con HIV-1, que comprende un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido, en donde dicha secuencia de polinucleótido es:

TAC AGT GCA GGG GAA AGA ATA GTA GAC ATA ATA GCA ACA GAC
ATA CAA ACT AAA GAA TTA CAA AAA CAA ATT ACA AAA ATT CAA
AAA GGA CCA GCA AAG CTC CTC TGG AAA GGT GAA GGG GCA GTA
GTA ATA CAA GAT AAT AGT GAC ATA AAA GTA GTG CCA AGA AGA
AAA GAC AAG ATC ATT AGG GAT TAT GGA AAA CAG ATG GCA GGT
GAT GAT

ES 2 286 854 T3

16. Un kit de ensayo para determinar la presencia de anticuerpos para el HIV en un fluido corporal, que comprende un antígeno y reactivos auxiliares adecuados para uso en detectar la presencia de anticuerpos para el antígeno en dicho fluido; en donde dicho antígeno es el polipéptido de la reivindicación 11.

5 17. El kit de ensayo de la reivindicación 16, en donde dicho antígeno es el polipéptido de la reivindicación 15.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

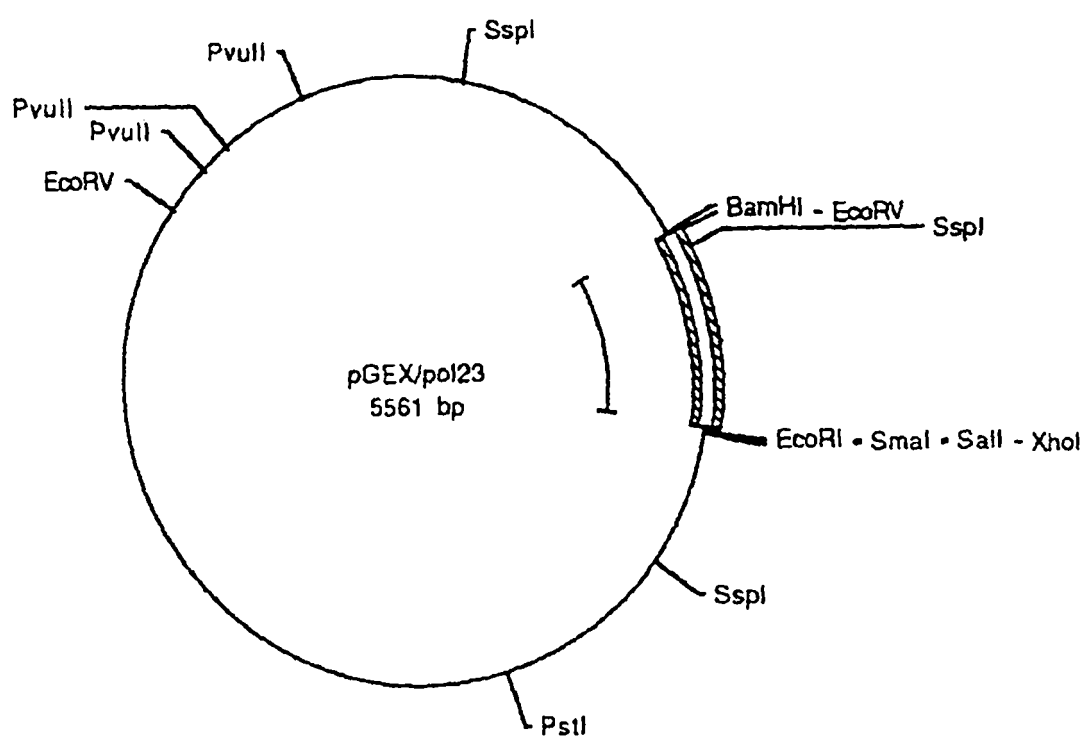


Figura 1

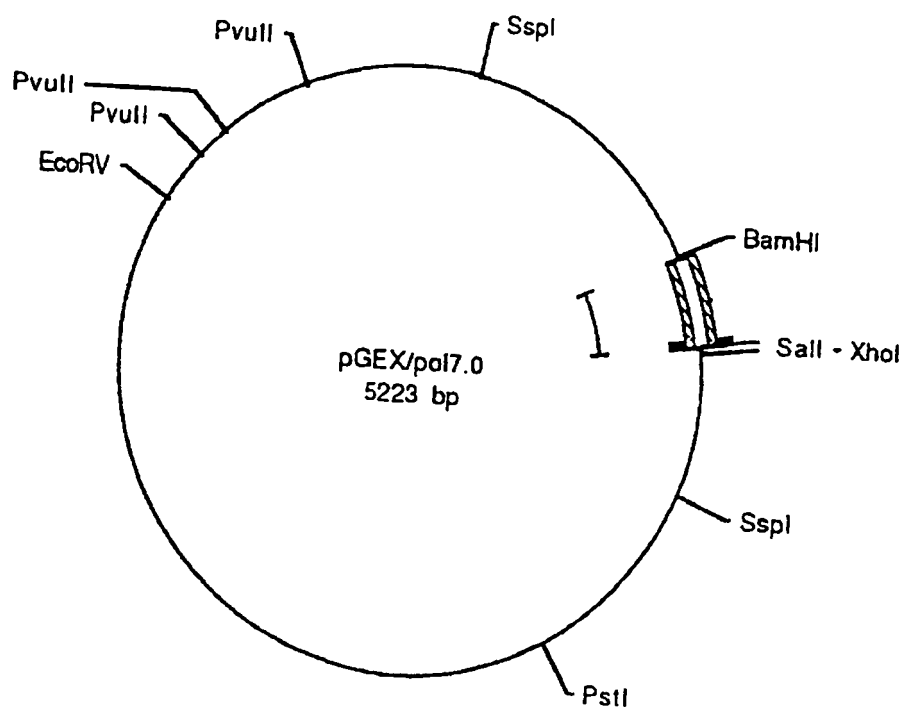


Figura 2

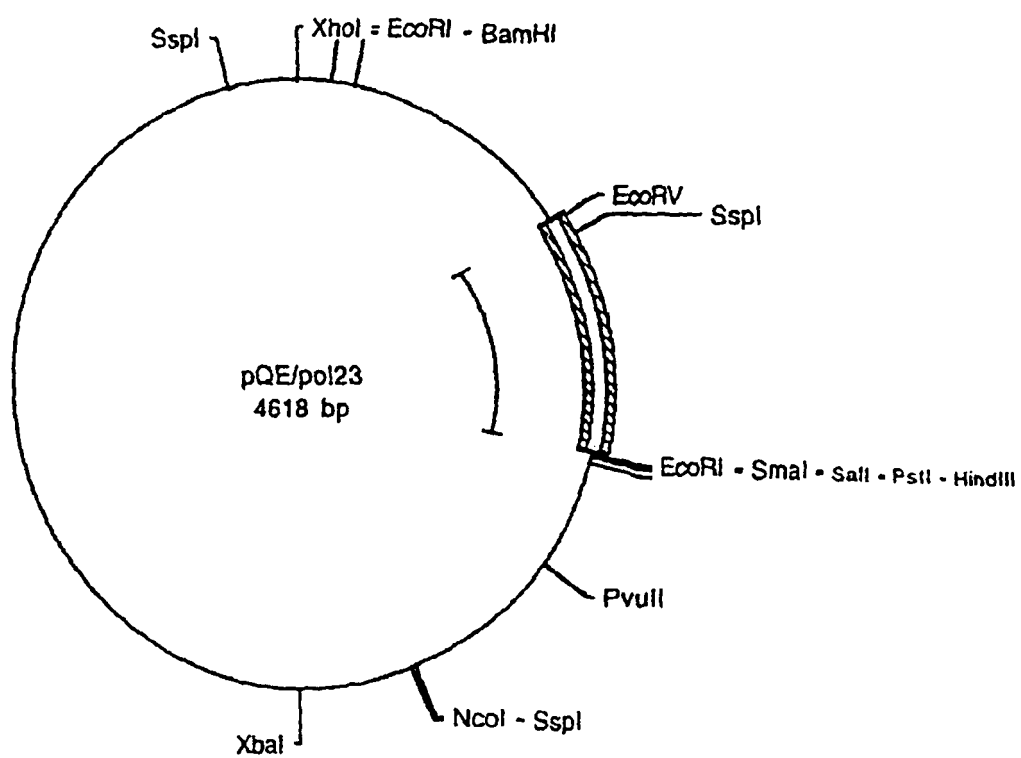


Figura 3

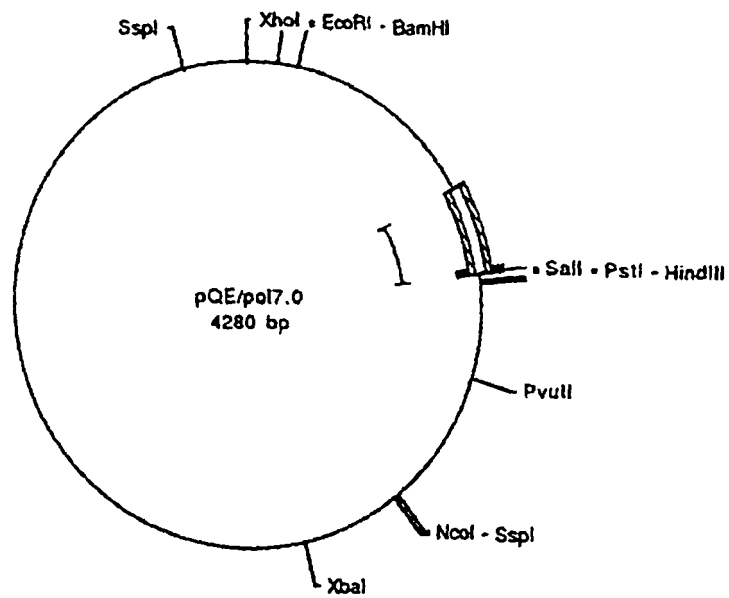


Figura 4

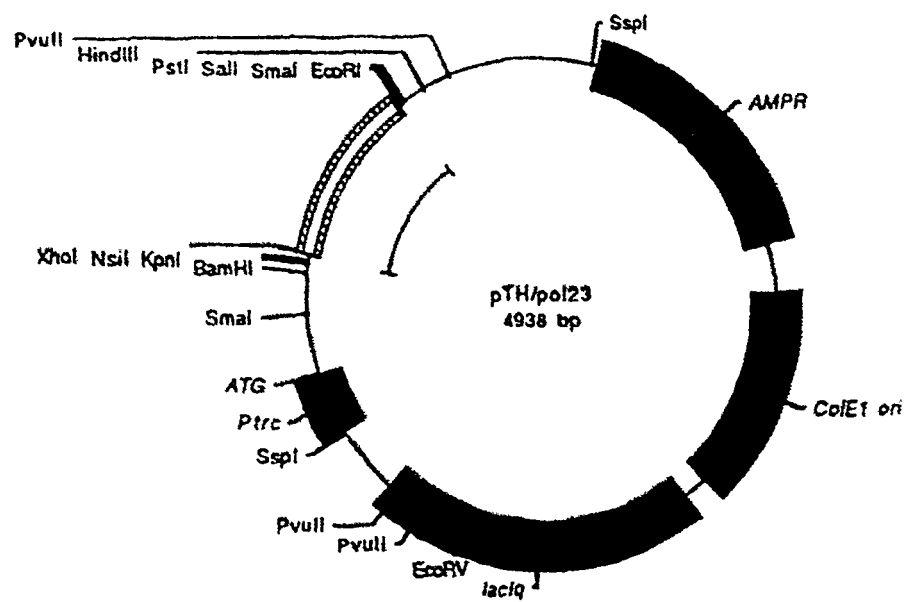


Figura 5

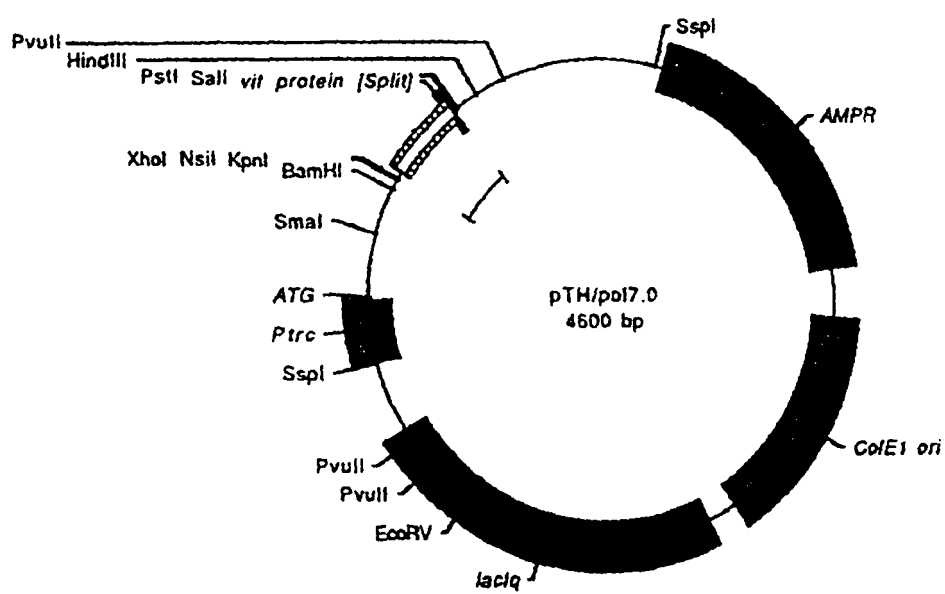


Figura 6

ES 2 286 854 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genetic Systems Corporation

5 <120> ANTÍGENO SINTÉTICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS INMUNOREACTIVOS CON EL VIRUS HIV

10 <130> 9197-88PC

<140> PCT/US9B/16160

<141> 1998-07-31

15 <150> 08/904,826

<151> 1997-08-01

20 <160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

25 <211> 36

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

30 <400> 1

Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp Pro Leu
1 5 10 15
35 Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala
20 25 30

<210> 2

40 <211> 36

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

45 <400> 2

Leu Gln Lys Gln Ile Thr Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg
1 5 10 15
50 Asp Ser Arg Asp Pro Leu Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys
20 25 30
Gly Glu Gly Ala
35

55 <210> 3

<212> 40

<212> PAT

60 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

65

ES 2 286 854 T3

<400> 3

1 Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp Pro Leu
5 1 5 10 15
Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Val
20 25 30
Ile Gln Asp Asn Ser Asp Ile Lys
35 40

10

<210> 4

<211> 36

<212> PRT

15

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 4

20 1 Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp Pro Leu
1 5 10 15
Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Val
20 25 30
25 Ile Gln Asp Asa
35

<210> 5

<211> 30

30

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2

<400> 5

35

1 Lys Lau Lys Asp Phe Arg Val Tyr The Arg Glu Gly Arg Asp Gln Leu
1 5 10 15
Trp Lys Gly Pro Gly Glu Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala
20 25 30

40

<210> 6

<211> 30

45

<212> AT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2

<400> 6

50

1 Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp Pro Leu
1 5 10 15
Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala
20 25 30

55

<210> 7

<211> 40

60

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2

65

ES 2 286 854 T3

<400> 7

1 Lys Leu Lys Asp Phe Arg Val Tyr Phe Arg Glu Gly Arg Asp Gln Leu
5 Trp Lys Gly Pro Gly Glu Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Leu
Val Lys Val Gly Thr Asp Ile Lys

<210> 8

<211> 33

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2

<400> 8

1 Tyr Phe Arg Gln Gly Arg Asp Gln Leu Trp Lys Gly Pro Gly Glu Leu
20 Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Leu Val Lys Val Gly Thr Asp Ile
Lys

<210> 9

<211> 40

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2

<400> 9

1 Lys Leu Lys Asp Phe Arg Val Tyr Phe Arg Glu Gly Arg Asp Gln Leu
40 Trp Lys Gly Pro Gly Glu Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Leu
Val Lys Val Gly Thr Asp Ile Lys

<210> 10

<211> 33

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2

<400> 10

1 Lys Gly Pro Gly Glu Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Leu Val
55 Lys Val Gly Thr Asp Ile Lys Ile Ile Pro Arg Arg Lys Ala Lys Ile
Ile

<210> 11

<211> 36

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2

ES 2 286 854 T3

<400> 11

Lys Leu Lys Asp Phe Arg Val Tyr Phe Arg Glu Gly Arg Asp Gln Leu
 1 5 10 15
 5 Trp Lys Gly Pro Gly Glu Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Leu
 20 25 30
 Val Lys Val Gly
 35

10

<210> 12

<211> 591

<212> DNA

15

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 12

20

ccagggatta gatcagta caatgtgctt ccacagggat ggaaaggatc accagcaata 60
 ttccaaagta gcatgacaaa aatcttagag ccttttagaa aacaaaatcc agacatagtt 120
 atctatcaat acatggatga ttgtatgta ggarctgact tagaaatagg gcagcataga 180
 acaaaaatag aggagctgag acaacatctg ttgaggtggg gacttaccac accagacaaa 240
 25 aaacatcaga aagaacctcc attccttttg atgggttatg aactccatcc tgataaatgg 300
 acagtcacagc ctatagtgtc gccagaaaaa gacagctgga ctgtceatga catecagaag 360
 ttagtgggaa aattgaattg ggcaagtcag atttaccag ggattaaagt aaggcaatta 420
 30 tgtaaatccc ttagaggaac caaagcacta ecagaagtaa taccactaac agaagaagca 480
 ggcctagaac tggcagaaaa cagcgagatt ctaaaagzac cagtcacatgg agtgtattat 540
 gaccatcaa aagacttaat agcagaaata cagaagcagg ggcaaggcca a 591

35

<210> 13

<211> 197

<212> PRT

40

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

45

50

55

60

65

ES 2 286 854 T3

<400> 13

```

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

```

<210> 14

<211> 258

<212> CNA

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 14

```

tacagtgcag gggaaagaat agtagacata atagcaacag acatacaaac taagaatta 60
caaaaacaaa ttacaaaaat tcaaaatttt cgggtttatt acagggacag cagagatcca 120
ctttggaaag gaccagcææa gctcctctgg aaaggtgaag gggcagtagt aatacaagat 180
aatagtgaca taaaagtagt gccaaagaaga aaagcaaaga tcattaggga ttatggæaaa 240
cagatggcag gtgatgat                                     250
65

```

ES 2 286 854 T3

<210> 15

<211> 86

<212> PRT

5 <215> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 15

```

10      Tyr Ser Ala Gly Glu Arg Ile Val Asp Ile Ile Ala Thr Asp Ile Gln
        1             5             10             15

      Thr Lys Glu Leu Gln Lys Gln Ile Thr Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val
15              20             25             30

      Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp Pro Leu Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu
              35             40             45

20      Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Val Ile Gln Asp Asn Ser Asp Ile
        50             55             60

      Lys Val Val Pro Arg Arg Lys Ala Lys Ile Ile Arg Asp Tyr Gly Lys
25      65             70             75             80

      Gln Met Ala Gly Asp Asp
30              85

35

40

45

50

55

60

65

```