

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
18 de noviembre de 2010 (18.11.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2010/130864 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
C12N 9/12 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2010/070320

(22) Fecha de presentación internacional:  
13 de mayo de 2010 (13.05.2010)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P 200930166 13 de mayo de 2009 (13.05.2009) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES];  
C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):  
**MENÉNDEZ ARIAS, Luis** [ES/ES]; Instituto de Biología Molecular Eladio Viñuela (IBMEV), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **MATAMOROS GRANDE, Tania** [ES/ES]; Instituto de Biología Molecular Eladio Viñuela (IBMEV), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **ÁLVAREZ GARCÍA, M<sup>a</sup> del Mar** [ES/ES]; Instituto de Biología Molecular Eladio Viñuela (IBMEV), C/ Nicolas Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Dario, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):  
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: MODIFIED REVERSE TRANSCRIPTASE OF HIV-1 GROUP O

(54) Título : RETROTRANSCRIPTASA DEL VIH-1 DE GRUPO O MODIFICADA

(57) Abstract: The present invention relates to the field of biotechnology. Specifically, the invention relates to isolated reverse transcriptases of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group O, with mutations V75I and E478Q, which have high copying fidelity and thermostability, as well as to the use thereof for the reverse transcription, amplification, and sequencing of a template nucleic acid. The invention also relates to a method for producing said reverse transcriptases.

(57) Resumen: La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Más concretamente, se refiere a retrotranscriptasas aisladas de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-I) de grupo O, con las mutaciones V75I y E478Q, que presentan una elevada fidelidad de copia y termoestabilidad, así como a su uso para llevar a cabo la retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ácido nucleico molde. La invención se refiere, además, a un método para obtener dichas retrotranscriptasas.



WO 2010/130864 A1

**RETROTRANSCRIPTASA DEL VIH-1 DE GRUPO O MODIFICADA.**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Más concretamente, se refiere a retrotranscriptasas aisladas de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) de grupo O y modificadas que presentan una elevada fidelidad de copia y termoestabilidad, así como a su uso para llevar a cabo la retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ácido nucleico molde. La invención se refiere, además, a un método para obtener dichas retrotranscriptasas.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La enzima responsable de la replicación del genoma de los retrovirus se denomina retrotranscriptasa (RT) (o transcriptasa inversa). Esta enzima convierte el ARN genómico monocatenario en ADN bicatenario capaz de integrarse en el genoma de la célula hospedadora [revisado por Telesnitsky y Goff. En Retroviruses. Coffin et al. (ed.), p. 121-160, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview EE.UU., 1997]. Se trata de una polimerasa capaz de sintetizar ADN, utilizando como molde ARN ó ADN, indistintamente. Además, la RT posee actividad endonucleasa (RNasa H), que le permite degradar el molde ARN durante el proceso de síntesis de ADN dependiente de ARN.

Por tanto, las RTs de retrovirus son enzimas útiles para la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero, que una vez amplificado por técnicas convencionales [reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por ejemplo] puede utilizarse para detectar expresión génica en organismos o tejidos. A partir de librerías de ADNc es posible seleccionar transcritos de genes que una vez amplificados por PCR pueden ser clonados en plásmidos o vectores virales. Para estas aplicaciones resulta interesante disponer de RTs que presenten una mayor estabilidad térmica, es decir, que retengan actividad polimerasa a temperaturas relativamente elevadas, ya que en estas condiciones disminuirían los niveles de estructura secundaria en el ARN y

mejoraría el proceso de amplificación. Por otro lado, las RTs son enzimas que carecen de actividad exonucleasa y por tanto, son polimerasas con una tasa de error relativamente alta, por lo que un aumento de su fidelidad sería deseable si lo que se pretende es clonar los productos derivados del ADNc generado durante la retrotranscripción.

Se han aislado y purificado RTs de diversos retrovirus. Entre ellas podemos citar, las del virus de mieloblastosis de aves (AMV), del virus Moloney de la leucemia de ratón (MLV) (Coté y Roth. Virus Res 2008; 134: 186-202), del virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), del virus de la inmunodeficiencia de felinos (FIV), del virus de la inmunodeficiencia de bóvidos (BIV), del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), del virus de la leucemia de bóvidos (BLV), y de espuma-retrovirus (revisado en Hizi y Herschhorn. Virus Res 2008; 134: 203-220); además de las RTs de virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y tipo 2 (VIH-2) y de la inmunodeficiencia de simios (SIV).

Desde un punto de vista metodológico las RTs más utilizadas comercialmente en reacciones de amplificación son las de MLV, AMV y VIH-1. En el caso de la RT del VIH-1, la enzima de referencia en este tipo de análisis es una variante “wild-type”, que se clasifica filogenéticamente como perteneciente a subtipo B (grupo M). La RT del VIH-1 (subtipo B) es más estable que la RT del MLV a temperaturas superiores a 45°C.

La expansión de la epidemia del SIDA y la caracterización de aislados virales del VIH en diferentes partes del mundo ha permitido constatar su gran heterogeneidad y ha conducido a la identificación de variantes de la RT alejadas filogenéticamente de la RT del VIH-1 de subtipo B. Entre ellas, las más alejadas son las pertenecientes al grupo O, que se caracterizan por presentar alrededor de un 20% de aminoácidos distintos cuando se comparan con secuencias prototipo “wild-type” de subtipo B (Quiñones-Mateu et al. Virology 1997; 236: 364-373). Las RTs “wild-type” de grupo O son resistentes naturales a nevirapina y otros inhibidores no análogos a nucleósido y presentan

mayor estabilidad en presencia de urea que las RTs de subtipo B (Menéndez-Arias et al. J. Biol. Chem. 2001; 276: 27470-27479). Sin embargo, su expresión y purificación es difícil debido al escaso rendimiento de los procedimientos descritos hasta la fecha.

5

La caracterización de RTs obtenidas mediante mutagénesis dirigida ha permitido estudiar el papel de distintos cambios de aminoácido sobre la fidelidad de copia, así como la inactivación de la actividad RNasa H de la RT del VIH-1 (subtipo B). Sin embargo, el contexto de la secuencia ha demostrado ser de gran importancia (Taube et al. Eur. J. Biochem. 1997; 250: 106-114), por lo que no parece probable que una mutación analizada en la RT del VIH-1 subtipo B pueda ejercer el mismo efecto en una variante del VIH-1 filogenéticamente alejada como la RT del VIH-1 de grupo O.

## 15 **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a retrotranscriptasas (RTs) aisladas de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) de grupo O y modificadas que presentan una elevada fidelidad de copia y termoestabilidad, así como a su uso para llevar a cabo la retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ácido nucleico molde. La invención se refiere, además, a un método para obtener dichas RTs.

Las RTs de retrovirus son enzimas útiles, por ejemplo, para la obtención de ADN complementario a partir de ARN mensajero, que una vez amplificado puede ser clonado en un vector. Es deseable que las RTs que se utilicen con este fin presenten elevada estabilidad térmica, ya que en estas condiciones disminuirían los niveles de estructura secundaria en el ARN y mejoraría el proceso de amplificación. Sin embargo, las RTs son enzimas que carecen de actividad exonucleasa correctora de errores y por tanto, tienen una tasa de error relativamente alta, por lo que un aumento de su fidelidad sería deseable para poder ser empleadas con este fin.

En los ejemplos de la presente invención se describen mutantes de una RT aislada de un VIH-1 de grupo O (RT del VIH-1 de grupo O) cuya subunidad p66 ha sido modificada mediante la sustitución de la valina 75 por isoleucina (mutación V75I), de manera que se observa un incremento en su fidelidad de copia con respecto a la de la RT no modificada. Es importante tener en cuenta que las RTs del VIH-1 de grupo O portadoras de esta mutación presentan mayor fidelidad de copia y termoestabilidad que las RTs presentes en aislados o cepas del VIH-1 de grupo M subtipo B (RT del VIH-1 de subtipo B), empleadas actualmente con el mismo fin.

10

Sin embargo, la mutación V75I en la RT del VIH-1 de grupo O conduce a una pérdida de termoestabilidad con respecto a la RT no modificada. En los ejemplos de la presente invención se demuestra como la introducción de un segundo cambio de aminoácido (mutación) consistente en la sustitución del ácido glutámico de la posición 478 de la subunidad p66 por glutamina permite aumentar su termoestabilidad con respecto a la RT que únicamente presenta la mutación V75I. Por tanto, la presente invención, proporciona RTs con elevada termoestabilidad y fidelidad de copia, apropiadas para llevar a cabo la retrotranscripción, amplificación o secuenciación de un ácido nucleico molde.

20

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una RT del VIH-1 de grupo O modificada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación que modifica dicha secuencia de aminoácidos en el residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1, en el que la RT modificada tiene una fidelidad de copia incrementada, con relación a la RT no modificada correspondiente.

25

Preferiblemente, dicha RT comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación de manera que el residuo que se corresponde con la posición 75 de la SEQ ID NO: 1 de esta secuencia de aminoácidos es isoleucina.

30

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una RT

del VIH-1 de grupo O modificada, que comprende una secuencia de aminoácidos, mutada según se ha descrito anteriormente, y que además tiene otra mutación que modifica dicha secuencia de aminoácidos en el residuo que corresponde a la posición 478 de la SEQ ID NO: 1, en el que la RT modificada  
5 tiene una termoestabilidad incrementada con relación a la RT modificada en el residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1.

Preferiblemente, dicha RT comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación de manera que el residuo que se corresponde con la posición  
10 478 de la SEQ ID NO: 1 de esta secuencia de aminoácidos es glutamina.

De ahora en adelante utilizaremos la expresión “RT de la invención” para referirnos a una RT modificada según cualquiera de las características descritas anteriormente en la presente descripción.

15 Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos comprendida por la RT de la invención presenta una identidad de, al menos, un 90%, más preferiblemente, de, al menos, un 95% y, aún más preferiblemente, de, al menos un 98% con la SEQ ID NO: 1.

20 Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una RT del VIH-1 de grupo O modificada que comprende la SEQ ID NO: 2.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una RT  
25 del VIH-1 de grupo O modificada que comprende la SEQ ID NO: 3.

Los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2) son los agentes etiológicos del SIDA en el hombre. Pertenecen al género *lentivirus* dentro de la familia *Retroviridae* (retrovirus), que poseen como una de sus principales  
30 características una enorme diversidad genética. El VIH-1 se ha clasificado en tres grupos: M, O y N. Del grupo M se conocen al menos 10 subtipos A-K, además de múltiples recombinantes de dichos subtipos (Buonaguro et al. J.

Virol. 2007; 81: 10209-10219; Ramírez et al. Virus Res. 2008; 134: 64-73). El primer aislado de VIH-1 grupo O se obtuvo de pacientes infectados en 1987, y su secuencia de nucleótidos se publicó tres años más tarde (De Leys et al. J. Virol. 1990; 64: 1207-1216). Actualmente, se pueden obtener variantes del VIH-1 grupo O (por ejemplo, la cepa MVP5180/91) a través del NIH AIDS Research & Reference Reagent Program (<http://www.aidsreagent.org>) (Germantown, Maryland, EE.UU.)

La RT del VIH-1 es una enzima multifuncional que presenta actividades ADN polimerasa dependiente de ARN y de ADN y actividad endonucleasa o ribonucleasa H (RNasa H). Es un heterodímero constituido por dos subunidades, denominadas p66 y p51. La subunidad p51 posee 440 aminoácidos mientras que la p66 tiene 560. Aunque p51 y p66 comparten idéntica estructura primaria en sus primeros 440 residuos, los distintos subdominios contenidos en sus secuencias respectivas se orientan de forma diferente en ambas subunidades. La subunidad p66 participa de forma importante en la formación del surco en el que interacciona el complejo molde-cebador ya sea ARN/ADN o ADN/ADN, además del centro activo que interviene en la catálisis que conduce a la formación de enlaces fosfodiéster entre desoxirribonucleótidos 5'-trifosfato (dNTP) libres y el extremo 5' de la cadena de ADN que está siendo sintetizada. Por el contrario, la subunidad p51 tiene una función principalmente estructural.

Las subunidades p51 y p66 se generan a partir del procesamiento de la poliproteína Gag-Pol. Aunque no se conoce con exactitud cuáles son los intermediarios en el procesamiento de Gag-Pol que llevan a la formación del heterodímero funcional p66/p51, se sabe que *in vitro*, homodímeros p66/p66 pueden convertirse en heterodímeros p66/p51 por acción de la proteasa viral. Esta enzima realiza un corte endoproteolítico, entre los aminoácidos 440 y 441, en una de las dos cadenas que forman el homodímero.

El término "RT del VIH-1 de grupo O", tal y como se utiliza en la presente

descripción se refiere a una retrotranscriptasa aislada de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 de grupo O. El término "RT del VIH-1 de subtipo B" se refiere a una retrotranscriptasa aislada de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 de grupo M subtipo B.

5

El término "retrotranscriptasa aislada del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1" se refiere a una proteína con actividad retrotranscriptasa que se encuentra sustancialmente o completamente libre de los componentes que normalmente lo acompañan o interactúan con ella en su forma natural. Puede obtenerse, por ejemplo, por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de la subunidad p66 de la retrotranscriptasa a partir del ARN viral obtenido de un aislado del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, y posterior clonaje en un vector de expresión.

10

15

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos de la subunidad p66 de la RT aislada de una cepa o de un aislado del VIH-1 grupo O. La subunidad p66 de la RT aislada de otras cepas u otros aislados del VIH-1 de grupo O presenta una identidad en su secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 de hasta el 90 %.

20

Los términos "secuencia de aminoácidos" o "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

25

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

30

El término “fidelidad de copia” se refiere a la precisión de la polimerización, o la capacidad de la RT para discriminar entre los sustratos correctos e incorrectos (por ejemplo, nucleótidos) cuando está sintetizando moléculas de ácido nucleico que son complementarias a un ácido nucleico molde.

5

La fidelidad de la RT de la presente invención puede ser analizada mediante diferentes tipos de análisis, como por ejemplo, pero sin limitarnos, ensayos de fidelidad en cultivos celulares o ensayos de fidelidad *in vitro* (genéticos o bioquímicos).

10

Los ensayos de fidelidad en cultivos celulares se basan en el uso de un vector retroviral que contiene un gen marcador (como por ejemplo, pero sin limitarnos, *lacZα*, *timidina quinasa* o *neomicina*), además de todos los elementos necesarios para que tenga lugar la transcripción de las proteínas virales, su encapsidación, y la síntesis del ADN proviral. Este vector, del que se han eliminado genes esenciales como *gag*, *pol*, *env*, y/o genes accesorios, se introduce en una línea celular empaquetadora que le proporciona estos genes en *trans*, y el virus producido se utiliza para infectar células diana. En estas células, el vector es capaz de completar una ronda de replicación y de integrarse en el genoma de la célula diana para formar provirus. Una única ronda de replicación implica una etapa de transcripción de ARN por la ARN polimerasa II celular, y una etapa de retrotranscripción que incluye la síntesis de ADN dependiente de ARN de una cadena del ADN proviral, y la síntesis posterior de la segunda cadena del ADN proviral a través de la actividad ADN polimerasa dependiente de ADN de la RT. Dado que el provirus es incapaz de expresar proteínas virales esenciales, no ocurren ciclos adicionales de replicación. Seleccionando un cultivo celular apropiado, se pueden detectar los fenotipos natural o mutante del gen marcador, y obtener así frecuencias de mutación.

30

En los ensayos bioquímicos se utiliza la RT purificada para la determinación de constantes cinéticas sobre un molde ARN o ADN, bajo unas condiciones

determinadas (pH, concentración de sustrato, etc...). De esta manera se pueden obtener los parámetros cinéticos de la fidelidad de copia de ADN (dependiente de ARN o ADN) de la RT, tanto en estado estacionario como preestacionario.

5

Los ensayos bioquímicos de incorporación errónea en el estado estacionario, se basan en la determinación de las constantes cinéticas ( $k_{cat}$  y  $K_m$ ) para la incorporación de nucleótidos en el extremo 3' de un cebador y proporcionan una estimación de la selectividad de la RT por el nucleótido. La determinación de los parámetros cinéticos se lleva a cabo midiendo la incorporación de nucleótidos en el extremo 3' del cebador, previamente marcado en su extremo 5' con [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP, en presencia de distintas concentraciones de dNTP, una vez formado el complejo binario RT/molde-cebador. Los productos resultantes son analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Los datos obtenidos se ajustan a la ecuación de Michaelis-Menten, y los parámetros  $k_{cat}$  (tasa de incorporación) y  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) son determinados para los nucleótidos correctos e incorrectos. La eficiencia de incorporación errónea ( $f_{inc}$ ) se define como la relación entre la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ ) obtenida para el nucleótido incorrecto y la eficacia catalítica obtenida para el nucleótido correcto. Así, una mayor fidelidad de la RT implica una menor eficiencia de incorporación errónea.

Para que se produzca la fijación de un error en el ADN naciente, no es suficiente la incorporación de un nucleótido incorrecto, la RT debe ser capaz además, de elongar el extremo desapareado que se genera como consecuencia de esta incorporación errónea. Esta medida de fidelidad se lleva a cabo mediante ensayos de extensión de extremos desapareados. En estos ensayos se calculan las constantes cinéticas en estado estacionario para la incorporación de un nucleótido correcto sobre dos tipos de complejo molde-cebador: el complejo con el extremo 3' correctamente apareado y el mismo complejo con el extremo 3' desapareado. La eficiencia de extensión de extremos desapareados ( $f_{ext}$ ) se define como la relación entre  $k_{cat}/K_m$  obtenida

para la extensión del extremo desapareado y la obtenida para la extensión del extremo correctamente apareado.

Los ensayos bioquímicos en el estado preestacionario examinan la capacidad de la RT para unirse e incorporar el dNTP a tiempos muy cortos (como por ejemplo, del orden de milisegundos). De esta forma, es posible el cálculo de la constante de afinidad ( $K_d$ ) para la interacción entre el dNTP y el complejo binario RT/molde-cebador, y de la constante de polimerización ( $k_{pol}$ ). La eficiencia de incorporación errónea y de extensión de extremos desapareados se determina a partir de los valores de  $k_{pol} / K_d$  obtenidos para la incorporación de nucleótidos correctos o incorrectos, o los obtenidos para la incorporación de nucleótidos correctos sobre complejos molde-cebador que contienen un extremo 3'OH apareado o desapareado.

Los ensayos genéticos más utilizados, denominados “forward mutation assays”, se suelen llevar a cabo usando como molde-cebador de la reacción de síntesis de ADN, el ADN bicatenario del fago M13mp2, del cual se ha eliminado la zona correspondiente al gen *lacZ* de una de las hebras. La reacción de síntesis de ADN se realiza en presencia de la RT y de concentraciones altas de los dNTPs. Tras la transformación bacteriana con el producto de la reacción, los mutantes se identifican como placas azules/blancas en medio de cultivo que contiene X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -galactopiranosido) e IPTG (isopropil- $\beta$ -tio-galactopiranosido). De este modo, si en la reacción de síntesis de ADN no se producen errores, el resultado es una placa azul oscuro. Por el contrario, la introducción de uno o varios errores implica la pérdida parcial o total de la  $\alpha$ -complementación, lo que se traduce en placas azul claro o blancas. El ADN recuperado de estas placas puede ser secuenciado, para determinar exactamente el número, el tipo y la posición en el genoma de las mutaciones introducidas por la RT.

30

Otro tipo de ensayos genéticos son los ensayos de reversión. Estos ensayos se basan en el uso de moldes que contienen una mutación inactivante

(típicamente, codones de terminación o inserciones de un nucleótido). La reversión de la mutación se traduce en la corrección del error y por lo tanto en la restauración de la actividad del gen marcador.

- 5 El “incremento en la fidelidad de copia” puede medirse mediante la comparación de parámetros indicativos de la fidelidad de copia de las RTs de la invención y la RT no modificada. Estos parámetros pueden analizarse, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante cualquiera de los métodos anteriormente descritos en este documento.

10

- Una RT con una fidelidad de copia “incrementada” o “aumentada” se define como una RT que tiene un incremento o un aumento significativo (aplicando criterios estadísticos) en la fidelidad de copia con respecto a la RT no modificada, típicamente de, al menos, 1,5 veces, más preferiblemente de, al menos, 2 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 3 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 4 veces. Por ejemplo, en ensayos bioquímicos de incorporación de nucleótido, se considera un aumento de fidelidad cuando el valor obtenido para la RT modificada es significativamente superior al de la no modificada (aplicando criterios estadísticos), típicamente, de al menos, 1,5 veces, preferiblemente, de al menos, 2 veces, más preferiblemente de, al menos, 3 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 4 veces. Por ejemplo, en ensayos genéticos (“forward mutation assays”) se considera fidelidad incrementada cuando hay un aumento significativo (aplicando criterios estadísticos) en la frecuencia de mutante obtenida por la RT modificada, típicamente de, al menos, un 50% (1,5 veces), preferiblemente, de al menos, 2 veces, más preferiblemente de, al menos, 3 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 4 veces.

- La temperatura a la cual la actividad polimerasa (dependiente de ARN o ADN) de una RT es máxima se denomina temperatura óptima. Por encima de esta temperatura, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la

desnaturalización térmica de la RT, de manera que su actividad polimerasa (dependiente de ADN o ARN) decrece. El término “termoestabilidad” se refiere a la estabilidad mostrada por una RT cuando se encuentra sometida a una temperatura elevada, por ejemplo, típicamente, una temperatura de, al menos, 45°C, preferiblemente de, al menos, 55 °C, más preferiblemente de, al menos, 60 °C y aún más preferiblemente de, al menos 65 °C.

La termoestabilidad de la RT de la presente invención puede ser analizada mediante diferentes tipos de análisis. La termoestabilidad de la RT de la presente invención, puede estimarse, por ejemplo, pero sin limitarse, midiendo la actividad específica ADN polimerasa a distintas temperaturas elevadas, utilizando un complejo molde-cebador, analizando la actividad RT residual después de someter a la enzima a una incubación a temperatura elevada durante distintos intervalos de tiempo, analizando la vida media de la RT o midiendo la cantidad y/o la longitud del producto sintetizado por la RT a una elevada temperatura.

La “vida media” de una proteína es un parámetro que permite medir su termoestabilidad. Por ejemplo, la vida media de la actividad RT se refiere al tiempo en que la actividad polimerasa (dependiente de ARN o ADN) se reduce a la mitad cuando la reacción de síntesis (dependiente de ARN o ADN) se realiza a una elevada temperatura.

Otros parámetros indicativos de la termoestabilidad de una RT son la cantidad y/o la longitud del producto sintetizado por la RT cuando la reacción de síntesis se realiza a una elevada temperatura. Por ejemplo, se puede obtener una estimación de la estabilidad de la RT, analizando la cantidad del producto obtenido mediante la RT en una RT-PCR. Para ello, se puede realizar primero una reacción de retrotranscripción empleando como ácido nucleico molde ARN total a una temperatura elevada, y después el ADN complementario obtenido de la retrotranscripción se puede amplificar el producto de reacción mediante PCR. La cantidad de producto obtenido en estas reacciones constituye una

medida de la estabilidad de la RT, a la temperatura en la que se ha llevado a cabo la reacción de retrotranscripción.

Una “reacción de síntesis a elevada temperatura”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una reacción y, más preferiblemente, una  
5 reacción de retrotranscripción (o transcripción inversa), que se realiza a una temperatura de, al menos, 45°C, preferiblemente de, al menos, 55 °C, más preferiblemente de, al menos 60 °C y aún más preferiblemente de, al menos, 65 °C.

10

En algunas circunstancias, la RT de la invención puede mostrar un incremento de la termoestabilidad en presencia o en ausencia del ácido nucleico molde. Es conocido en el estado de la técnica que las RTs son, típicamente, más estables en presencia del ácido nucleico molde.

15

La expresión “termoestabilidad incrementada”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a que la RT del VIH-1 de grupo O modificada, que comprende una secuencia de aminoácidos, mutada en los residuos que corresponden a la posiciones 75 y 478 de la SEQ ID NO: 1, conserva su  
20 actividad a una temperatura de reacción de síntesis más elevada, o actúa más tiempo a la misma temperatura, que la RT que únicamente tiene una mutación en el residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1.

Una RT con termoestabilidad “incrementada” o “aumentada” se define como  
25 una RT que tiene un incremento o un aumento significativo (aplicando criterios estadísticos) en la termoestabilidad, típicamente de, al menos, 1,5 veces, más preferiblemente de, al menos, 2 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 3 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 4 veces, con respecto a la RT que únicamente tiene una mutación en el residuo que  
30 corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, cuando se estima la termoestabilidad mediante la cantidad del producto obtenido mediante la RT en una RT-PCR, se considera que la RT tiene una fidelidad de copia

incrementada cuando la cantidad de producto obtenido mediante la RT-PCR tiene un incremento o un aumento significativo (aplicando criterios estadísticos), típicamente de, al menos 1,5 veces, preferiblemente de, al menos, 3 veces, y aún más preferiblemente de, al menos, 4 veces, con respecto a la RT que únicamente tiene una mutación en el residuo que  
5 corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1.

Tal y como se utiliza en la presente descripción, el término “mutación” se refiere a una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido distinto. Los  
10 aminoácidos individuales en una secuencia se representan aquí como XN, en la que X es el aminoácido en la secuencia (designado mediante el código de una letra universalmente aceptado en la nomenclatura de aminoácidos), y N es la posición en la secuencia. Las mutaciones puntuales tipo sustitución en una secuencia de aminoácidos se representan aquí como  $X_1NX_2$ , en la que  $X_1$  es el  
15 aminoácido en la secuencia de proteína no mutada,  $X_2$  es el aminoácido en la secuencia de proteína mutada, y N es la posición en la secuencia de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos comprendida por la RT de la invención puede  
20 obtenerse mediante técnicas de ingeniería genética o recombinante bien conocidas en el estado de la técnica. Pueden obtenerse, por ejemplo, mutando el gen de la RT mediante mutagénesis dirigida o al azar. Preferiblemente, la mutación se introduce en la secuencia de aminoácidos mediante un cambio de codón adecuado en el polinucleótido que codifica para la RT. Más  
25 preferiblemente, los mutantes de la presente invención pueden obtenerse mediante la técnica de mutagénesis dirigida por oligonucleótido. Esta técnica consiste en el anillamiento de un oligonucleótido complementario (excepto por la presencia de uno o más nucleótidos desapareados) con la secuencia nucleotídica de la RT del VIH-1 de grupo O. El oligonucleótido parcialmente  
30 desapareado es entonces extendido por una ADN polimerasa, generando una molécula de ADN de cadena doble que contiene el cambio deseado en la secuencia de una de las cadenas. Los cambios introducidos en la secuencia

5 tienen como consecuencia el cambio de un aminoácido por otro. El polinucleótido de doble cadena puede ser entonces insertado en un vector de expresión apropiado y el polipéptido mutante producido. La mutagénesis dirigida por oligonucleótido puede ser llevada a cabo, por ejemplo, mediante PCR.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención.

10 Los términos “secuencia nucleotídica”, “secuencia de nucleótidos”, “ácido nucleico”, “oligonucleótido” y “polinucleótido” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que pueden estar, o no, química o bioquímicamente modificados.

15

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un vector que comprende el polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención.

20 El vector puede ser, por ejemplo un vector de clonación o un vector de expresión. Preferiblemente, dicho vector es un vector apropiado para la expresión y purificación de la RT de la invención.

25 El término “vector de clonación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una molécula de ADN en la que se puede integrar otro fragmento de ADN, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Ejemplos de vectores de expresión son, pero sin limitarse, plásmidos, cósmidos, fagos de ADN o cromosomas artificiales de levadura.

30 El término vector de “expresión”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un vector de clonaje adecuado para expresar un ácido nucleico que ha sido clonado en el mismo tras ser introducido en una célula,

denominada célula huésped. Dicho ácido nucleico se encuentra, por lo general, unido operativamente a secuencias de control.

5 El termino “expresión” se refiere al proceso por el cuál se sintetiza un polipéptido a partir de un polinucleótido. Incluye la transcripción del polinucleótido en un ARN mensajero (ARNm) y la traducción de dicho ARNm en una proteína o un polipéptido.

10 El término “célula huésped”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier organismo procariota o eucariota que es recipiente de un vector de expresión, de clonación o de cualquier otra molécula de ADN.

15 El término “secuencia de control”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a secuencias nucleotídicas que son necesarias para efectuar la expresión de las secuencias a las que están ligadas. Se pretende que el término “secuencias de control” incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa. Ejemplos de secuencias de control, son por ejemplo, pero sin limitarse, promotores, señales de inicio de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, señales de poliadenilación o activadores transcripcionales.

25 La expresión “unidos operativamente”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes así descritos tienen una relación que les permite funcionar en la manera intencionada. Una secuencia de control “unida de forma operativa” a un polinucleótido, está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

30

Como se usa aquí, el término “promotor” hace referencia a una región del ADN, generalmente “aguas arriba” o “upstream” del punto de inicio de la

transcripción, que es capaz de iniciar la transcripción en una célula. Este término incluye, por ejemplo, pero sin limitarse, promotores constitutivos, promotores específicos de tipo celular o de tejido o promotores inducibles o reprimibles.

5

Las secuencias de control dependen del origen de la célula en la que se quiere expresar el ácido nucleico. Ejemplos de promotores procariotas incluyen, por ejemplo, pero sin limitarnos, los promotores de los genes *trp*, *recA*, *lacZ*, *lacI*, *tet*, *gal*, *trc*, o *tac* de *E. coli*, o el promotor del gen  $\alpha$ -amylase de *B. subtilis*. Para la expresión de un ácido nucleico en una célula procariota también es necesaria la presencia de un sitio de unión ribosomal situado "upstream" de la secuencia codificante. Secuencias de control apropiadas para la expresión de un polinucleótido en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica.

10

15

Utilizando técnicas bien conocidas, un experto en la materia será capaz de obtener un vector adecuado para la expresión de la secuencia de aminoácidos que comprende la RT de la invención en cualquier célula procariota o eucariota.

20

Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un vector que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención, donde dicho polinucleótido está unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:

25

- a) un promotor,
- b) una señal de inicio de la transcripción,
- c) una señal de terminación de la transcripción,
- d) una señal de poliadenilación, o
- e) un activador transcripcional.

30

Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un vector

que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida por la RT de la invención, donde dicho polinucleótido está unido en fase de lectura a una secuencia nucleotídica que codifica para una etiqueta de purificación.

5

La expresión “etiqueta de purificación” o “etiqueta de afinidad”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una secuencia de aminoácidos que ha sido incorporada (generalmente, por ingeniería genética) a una proteína para facilitar su purificación. La etiqueta, que puede ser otra proteína o una  
10 secuencia corta de aminoácidos, permite la purificación de la proteína, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad. Algunos ejemplos de etiquetas de purificación conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse a: el péptido de unión a calmodulina (CBP), la enzima glutatión-S-transferasa (GST) o una cola de residuos de histidina. Preferiblemente, la  
15 etiqueta de purificación consiste en al menos 6 residuos de histidina.

De ahora en adelante utilizaremos la expresión “vector primero de la invención” para referirnos a un vector que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia comprendida en la RT de la invención, donde dicho vector presenta  
20 cualquiera de las características descritas anteriormente en la presente descripción.

Otra realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un vector que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de  
25 aminoácidos comprendida por la RT de la invención y que, además, comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1. De ahora en adelante utilizaremos la expresión “vector segundo  
30 de la invención” para referirnos a un vector que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia comprendida en la RT de la invención, donde dicho vector presenta cualquiera de las características del vector primero de la

invención, y que además comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.

5

En una realización preferida, la proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1 es la proteasa del VIH-1, una variante de la proteasa del VIH-1 o  
10 un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente.

El término "proteasa de VIH-1", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una proteasa aislada de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1. El término "proteasa aislada del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1" se refiere a una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1, que se encuentra sustancialmente o completamente libre de los  
15 componentes que normalmente lo acompañan o interactúan con ella en su forma natural. Puede obtenerse, por ejemplo, por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos de la proteasa a partir del ARN viral obtenido de un aislado del VIH-1, y posterior clonaje en un vector de expresión.  
20 Preferiblemente, la proteasa del VIH-1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4. La SEQ ID NO: 4 corresponde a la secuencia de la proteasa del VIH-1 aislada de la cepa prototípica de grupo M-subtipo B NL4-3. En el virus, dicha proteasa forma homodímeros mediante la unión no covalente de sus subunidades.

25  
30

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteasa del VIH-1. En general, una

variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

5

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a la proteasa del VIH-1 cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la

10 secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%.

15 El término "fragmento", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de la proteasa del VIH-1 o de una sus variantes.

La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que la proteína o el fragmento de la proteína en cuestión mantiene la capacidad

20 de realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende el

25 vector primero de la invención. De ahora en adelante utilizaremos la expresión "célula primera de la invención" para referirnos a una célula que comprende el vector primero de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende el

30 vector segundo de la invención. De ahora en adelante utilizaremos la expresión "célula segunda de la invención" para referirnos a una célula que comprende el vector segundo de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende el vector primero de la invención y que, además, comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1. De ahora en adelante utilizaremos la expresión “célula tercera de la invención” para referirnos a una célula con dichas características.

De ahora en adelante utilizaremos la expresión “célula de la invención” para referirnos a la célula primera, a la célula segunda o a la célula tercera de la invención. La célula de la invención puede ser una célula procariota o eucariota. Preferiblemente, la célula de la invención es una célula procariota.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención que comprende:

- a) cultivar la célula de la invención, y
- b) aislar la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT expresada en el paso (a) por dicha célula.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir la RT de la invención que comprende:

- a) cultivar la célula de la invención, y
- b) aislar la RT expresada en el paso (a) por dicha célula.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la RT de la invención para la RT de un ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la RT de la invención para la amplificación de un ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la RT de la invención para la secuenciación de un ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de RT de un  
5 ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm, que comprende:

- a) mezclar dicho ácido nucleico molde con la RT de la invención, e
- b) incubar la mezcla del paso (a) en condiciones que permitan la síntesis de ADN complementario al ácido nucleico molde.

10

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de amplificación de un ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm, que comprende:

- a) mezclar dicho ácido nucleico con la RT de la invención y con, al menos,  
15 una ADN polimerasa dependiente de ADN, e
- b) incubar la mezcla del paso (a) en condiciones que permitan la amplificación de ADN complementario al ácido nucleico molde.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de secuenciación  
20 de un ácido nucleico, preferiblemente ARNm, que comprende:

- a) poner en contacto dicho ácido nucleico con la RT de la invención,
- b) incubar dicha mezcla en condiciones que permitan la síntesis de una población de moléculas de ADN complementario al ácido nucleico molde,  
25 y
- c) separar dicha población de moléculas de ADN complementario para determinar la secuencia de nucleótidos.

El término “retrotranscripción” o “transcripción inversa”, tal y como se utiliza en  
30 la presente descripción, se refiere a la síntesis de un ADN complementario a un ARN.

El término “amplificación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al aumento del número de copias de un ácido nucleico molde. En una realización preferida, la amplificación tiene lugar mediante PCR.

- 5 El término “secuenciación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a la determinación del orden de los nucleótidos de un ácido nucleico molde.

- 10 El término “ácido nucleico molde”, “ácido nucleico templado”, “molde” o “templado”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico de cadena simple o de doble cadena que va a ser retrotranscrita, amplificada o secuenciada.

- 15 La expresión “condiciones que permitan la síntesis de ADN complementario” se refiere a las condiciones en las que puede tener lugar la incorporación de los nucleótidos a un ADN naciente mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde.

- 20 Generalmente las condiciones en las que tiene lugar la síntesis de ADN incluyen: (a) poner en contacto dicho ácido nucleico molde con la RT de la invención en una mezcla que además comprende un cebador, un catión bivalente, por ejemplo,  $Mg^{2+}$ , y nucleótidos, y (b) someter dicha mezcla a una temperatura suficiente para que una polimerasa de ADN, por ejemplo, la RT de la invención, inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante  
25 complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y de lugar una población de moléculas de ADN complementario de diferente tamaño. La separación de dicha población de moléculas de ADN complementario permite determinar la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico molde.

- 30 La incorporación de nucleótidos mal apareados durante la síntesis del ADN complementario puede resultar en una o más bases desapareadas. Por tanto, la cadena de ADN sintetizada puede no ser exactamente complementaria al

ácido nucleico molde.

La expresión “condiciones que permitan la síntesis de una población de moléculas de ADN complementario al ácido nucleico molde” se refiere a las

5 condiciones en las cuáles se realiza la secuenciación, y que generalmente incluyen (a) poner en contacto dicho ácido nucleico molde con la RT de la invención en una mezcla que además comprende un cebador, un catión bivalente, (por ejemplo,  $Mg^{2+}$ ), y nucleótidos, generalmente, dNTPs y, al menos, un ddNTP, y (b) someter dicha mezcla a una temperatura suficiente

10 para que una polimerasa de ADN, por ejemplo, la RT de la invención, inicie la incorporación de los nucleótidos al cebador mediante complementariedad de bases con el ácido nucleico molde, y de lugar a una población de moléculas de ADN complementario de diferente tamaño. La separación de dicha población de moléculas de ADN complementario, generalmente, mediante electroforesis,

15 permite determinar la secuencia de nucleótidos.

El término “cebador”, como se utiliza aquí, se refiere a un oligonucleótido capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando hibrida con el ácido nucleico molde. Preferiblemente, el cebador es un oligonucleótido de

20 desoxirribosa.

Los cebadores pueden prepararse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y la síntesis química directa. Los cebadores pueden

25 diseñarse para hibridar con secuencias específicas de nucleótidos en el ácido nucleico molde (cebadores específicos) o pueden ser sintetizados al azar (cebadores arbitrarios).

El término “cebador específico”, tal y como se utiliza en la presente descripción,

30 se refiere a un cebador cuya secuencia es complementaria a una secuencia específica de nucleótidos en el ácido nucleico molde que se quiere retrotranscribir, amplificar o secuenciar.

El término “cebador arbitrario” se refiere a un cebador cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ácido nucleico molde que se quiere retrotranscribir, amplificar o secuenciar. Con frecuencia se emplea una población de distintos cebadores arbitrarios. El término “cebadores arbitrarios” se refiere a un conjunto de cebadores cuya secuencia es sintetizada al azar y que se usa para iniciar la síntesis del ADN en posiciones aleatorias del ácido nucleico molde que se quiere retrotranscribir, amplificar o secuenciar.

El término “hibridación”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al apareamiento de dos moléculas de ácido nucleico (de ADN y/o ARN) de cadena simple complementarias para dar una molécula de doble cadena. Preferiblemente, la complementariedad es del 100%. Esto es, en la región de complementariedad cada nucleótido de una de las dos moléculas de ácido nucleico puede formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido presente en la otra molécula de ácido nucleico. Sin embargo, aquellos con una experiencia normal en el campo reconocerán que dos moléculas de ácido nucleico que posean una región con complementariedad menor al 100% también pueden hibridar.

El término “nucleótido”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a un molécula orgánica formada por la unión covalente de una pentosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. El término nucleótido incluye desoxirribonucleósidos trifosfato como, por ejemplo, pero sin limitarse, dATP, dCTP, dITP, dUTP, dGTP, dTTP, o derivados de los mismos. El término nucleótido incluye también dideoxirribonucleósidos trifosfato (ddNTPs), como por ejemplo, ddATP, ddCTP, ddGTP, ddITP, ddTTP o derivados de los mismos.

De acuerdo con la presente invención un “nucleótido” o un “cebador” puede ser marcado o etiquetado mediante técnicas bien conocidas en el estado de la técnica. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas

bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

El término “ADN polimerasa dependiente de ADN”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a una ADN polimerasa capaz de catalizar la  
5 polimerización de desoxinucleótidos utilizando ADN como ácido nucleico molde. Ejemplos de ADN polimerasa dependientes de ADN que pueden se empleadas en el método de amplificación de la siguiente invención son, pero sin limitarnos, las ADN polimerasas de *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermotoga neapolitana* (Tne), *Thermotoga maritima* (Tma),  
10 *Thermococcus litoralis* (Tli or VENTTM), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Pyrococcus species GB-D* (Deep Vent<sup>TM</sup>), *Pyrococcus woosii* (Pwo), *Bacillus stearothermophilus* (Bst), *Bacillus caldophilus* (Bca), *Sulfolobus acidocaldarius* (Sac), *Thermoplasma acidophilum* (Tac), *Thermus flavus* (Tfl/Tub), *Thermus ruber* (Tru), *Thermus brockianus* (DyNAzyme<sup>TM</sup>), *Methanobacterium*  
15 *thermoautotrophicum* (Mth) o *Mycobacterium sp.* (Mtb, Mlep).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos anteriormente en la presente descripción.

20

Una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere a un kit para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos anteriormente en la presente descripción, que comprende:

25

- a) la RT de la invención, y
- b) al menos, un elemento de la lista que comprende:

30

- i) un tampón,
- ii) un cebador,
- iii) una ADN polimerasa dependiente de ADN, y
- iv) un nucleótido.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

10

**Figura 1.** Muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS de la RT del VIH-1 grupo O "wild-type" resultante de la purificación. M, marcadores de peso molecular, pocillos 1–4: albúmina de suero bovino (66,2 kDa) (0,5, 1, 2 y 4 µg respectivamente); pocillos 5–7: alícuotas de la RT de VIH-1 grupo O purificada. El rendimiento de la purificación fue superior a 3 mg de RT por litro de cultivo procesado.

20

**Figura 2.** Muestra la eficiencia de extensión de extremos desapareados obtenida con los tres mutantes analizados.

**Figura 3.** Muestra la amplificación por RT-PCR de fragmentos de ARN codificante para actina, de **(A)** 500 y **(B)** 1000 pares de bases, a partir de ARN total de hígado de ratón. La amplificación se llevó a cabo con las enzimas indicadas [RT de VIH-1 grupo O "wild-type" (RTO), RT de VIH-1 subtipo B BH10 (RTB), mutante V75I en el contexto de RTO (RTO V75I) y el doble mutante V75I/E478Q en el contexto de RTO (RTO V75I/E478Q)]. Las temperaturas indicadas se refieren a la reacción de síntesis del ADN copia. La eficiencia de estas enzimas se compara también con la de la RT de virus Moloney de la leucemia de ratón carente de actividad RNasa H (MLV) (véanse reacciones de retrotranscripción a temperaturas superiores a 65°C). Act neg, control negativo (sin ADNc); Esc, marcadores de peso molecular.

**Figura 4.** Muestra la actividad RNasa H de distintas RTs: RT de VIH-1 grupo O “wild-type” (RTO\_WT), RT de VIH-1 subtipo B BH10 (BH10\_WT), mutante V75I en el contexto de RTO (RTO\_V75I), mutante E478Q en el contexto de RTO (RTO\_E478Q) y el doble mutante V75I/E478Q en el contexto de RTO (RTO\_V75I/E478Q). En la parte inferior se indican las secuencias del molde y del cebador utilizado, indicándose con un asterisco la posición del extremo marcado radiactivamente.

## EJEMPLOS

10

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

### EJEMPLO 1. Generación, expresión y purificación la RTs del virus VIH de tipo 1 de grupo O “wild type” y mutantes.

20

La expresión y purificación de las RTs se llevó a cabo con una versión modificada del plásmido p66RTB (Boretto et al. Anal. Biochem. 2001; 292: 139-147; Matamoros et al. J. Mol. Biol. 2005; 349: 451-463), que contiene el gen de resistencia a ampicilina y en el que clonamos la región codificante de la subunidad p66 de la RT de un aislado del VIH-1 de grupo O (Menéndez-Arias et al. J. Biol. Chem. 2001; 276: 27470-27479). Para ello se digirió el plásmido p66RTB portador de la enzima SS RT (descrito en Matamoros et al. J. Mol. Biol. 2005; 349: 451-463) con las enzimas EcoRI y XhoI y se clonó el inserto que codifica para la subunidad p66 de la RT de VIH-1 grupo O, derivado de la digestión con las mismas enzimas del plásmido pRT6 (portador de la variante ESP49) (Menéndez-Arias et al. J. Biol. Chem. 2001; 276: 27470-27479). La secuencia de nucleótidos que comprende la región que codifica para la

30

subunidad p66 del VIH-1 (grupo O) en el plásmido de expresión se muestra en la SEQ ID NO: 5, mientras que la secuencia de aminoácidos de la RT obtenida con dicho plásmido se indica en la SEQ ID NO: 6. Utilizando esta construcción se produce la subunidad p66, modificada en el extremo N-terminal por la presencia de tres aminoácidos: Met-Asn-Ser, y en el extremo C-terminal por la presencia de una cola de 9 aminoácidos (Glu-Ser-Thr-His-His-His-His-His), que contiene los seis residuos de histidina, que facilitan su purificación. La subunidad p51 se genera por el procesamiento proteolítico de p66, por parte de la proteasa del VIH-1 co-expresada mediante la utilización del plásmido pATproteasa (Boretto et al. Anal. Biochem. 2001; 292: 139-147).

Los plásmidos para la expresión de las RTs mutantes RTO\_V75I y RTO\_V75I/E478Q se obtuvieron por mutagénesis dirigida utilizando el kit "Quik-Change Site-Directed Mutagenesis" de Stratagene, siguiendo las instrucciones del fabricante. Como oligonucleótidos mutagénicos se emplearon: SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8 para introducir la mutación V75I, y SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 para E478Q. Como molde para la introducción de V75I, se empleó el plásmido portador de la secuencia que codifica la p66 de VIH-1 (grupo O), descrito anteriormente. La mutación E478Q se introdujo en el plásmido portador de V75I. Tras la mutagénesis se comprobó por secuenciación que la región codificante de p66 en dichos plásmidos era correcta y contenía únicamente las mutaciones introducidas. Las secuencias de nucleótidos de los insertos portadores de las mutaciones V75I y V75I/E478Q se muestran en las SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, y las secuencias de aminoácidos de las RTs obtenidas de la expresión de los plásmidos mutantes se indican las SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14.

La subunidad p66 (con sus extremos modificados) se coexpresa en *E. coli* XL1 Blue con la proteasa del VIH-1 (subtipo B) empleando el vector pATprotease (Boretto et al. Anal. Biochem. 2001; 292: 139-147), portador de resistencia a kanamicina. Se obtuvieron 3 cultivos de 1 litro cada uno (medio estándar Luria-Broth con ampicilina 100 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml) de *E. coli* portadora de

los plásmidos de expresión de RT grupo O ("wild-type" o los mutantes correspondientes) y pATproteasa, en fase exponencial de crecimiento, y se indujo la expresión de RT con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 20-24 horas.

5

Al cabo de ese tiempo se recogieron las bacterias y se procesaron siguiendo el procedimiento descrito por Boretto et al. (Anal. Biochem. 2001; 292: 139-147), en el que se incluye una etapa de lisis bacteriana y homogenización, seguida de cromatografías de intercambio iónico (en fosfocelulosa) y de afinidad (en columnas de  $\text{Ni}^{2+}$ -nitriloacético-agarosa).

10

El rendimiento obtenido a partir de 3 litros de cultivo (10 g de células) fue de 10 mg, estimado a partir del coeficiente de extinción molar de la RT a 280 nm ( $\epsilon_{280} = 260450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Kati et al. J. Biol. Chem. 1992; 267: 25988-25997). La proporción de enzima activa obtenida fue igual o superior al 40%. La pureza de la RT obtenida fue superior al 95% de acuerdo a estimaciones llevadas a cabo con geles de poliacrilamida y SDS (Figura 1). Estos rendimientos son sensiblemente superiores a los obtenidos utilizando protocolos anteriormente descritos, en los que el rendimiento no superaba los 50-100  $\mu\text{g}$  para el mismo volumen de cultivo de partida (Quiñones-Mateu et al. Virology 1997; 236: 364-373).

15

20

## **EJEMPLO 2. Efecto de las mutaciones V75I y V75I/E478Q sobre la fidelidad de copia.**

25

La fidelidad de copia de las RTs se ha determinado mediante ensayos cinéticos de incorporación de nucleótido en el estado pre-estacionario, utilizando complejos molde-cebador 31T/21P en los que el extremo 3'OH puede estar correcta o incorrectamente apareado (Matamoros et al. J. Mol. Biol. 2008; 375: 1234-1248), y mediante ensayos genéticos utilizando el plásmido M13mp2 *lacZ $\alpha$*  (Bebenek y Kunkel. Methods Enzymol. 1995; 262: 217-232; Matamoros et al. J. Mol. Biol. 2008; 375: 1234-1248).

30

La RT de grupo O portadora del cambio V75I retiene actividad catalítica similar a la RT “wild-type” y presenta una menor capacidad para extender cebadores que contienen un extremo 3’ desapareado (Tabla 1; Figura 2). En ensayos cinéticos en los que se determina la eficacia catalítica de la reacción con distintos complejos molde-cebador, se observó que la presencia de la mutación V75I produce un descenso de la eficiencia de extensión de extremos desapareados de 3,5 veces para el par G:T; 2,9 veces para el par G:G y de 3,7 veces para el par G:A, cuando se compara con la RT de VIH-1 grupo O “wild-type”, y de 2 a 6 veces cuando se compara con la RT de VIH-1 subtipo B (cepa prototipo BH10).

Por otro lado se midió la fidelidad en ensayos de complementación que utilizan derivados del fago M13mp2 en los que está presente el gen *lacZ*. Se determinó la frecuencia con que se obtenían mutantes cuando el proceso de síntesis se realiza con las distintas RTs recombinantes (Tabla 2). Un aumento de fidelidad de copia se refleja en la aparición en el ensayo de un número menor de placas mutantes. La RT del VIH-1 grupo O “wild-type” presentaba un incremento de fidelidad de 2,5 veces con respecto a la RT del VIH-1 subtipo B (“wild-type” BH10), mientras que la presencia de la mutación V75I en el contexto de la RT de VIH-1 grupo O mejoraba la fidelidad de copia en 4,7 veces respecto a la RT de subtipo B. En el contexto de secuencia de la RT de VIH-1 grupo O, el doble mutante V75I/E478Q presenta una fidelidad de copia similar a la de V75I, en ensayos de complementación que utilizan derivados del fago M13mp2 en los que está presente el gen *lacZ*.

25

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de extensión de extremos desapareados sobre el complejo molde-cebador 31T/21P para la RT del VIH-1 subtipo B “wild-type” BH10 (BH10\_WT), comparada con la del VIH-1 grupo O “wild-type” (RTO\_WT) y con el mutante V75I en el contexto de secuencia de VIH-1 grupo O (RTO\_V75I), determinados en el estado pre-estacionario.

30

| Enzima   | Par de bases en 3' | $k_{pol}$ ( $s^{-1}$ ) | $K_d$ ( $\mu M$ ) | $k_{pol}/K_d$ ( $\mu M^{-1} s^{-1}$ ) | Eficiencia de extensión de extremos desapareados ( $f_{ext}$ ) |
|----------|--------------------|------------------------|-------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| BH10_WT  | G:C                | $11,57 \pm 0,49$       | $13,40 \pm 1,88$  | $0,863 \pm 0,126$                     | $(11,2 \pm 2,03) \times 10^{-4}$                               |
|          | G:T                | $2,54 \pm 0,13$        | $2628 \pm 252$    | $(9,66 \pm 1,04) \times 10^{-4}$      | $(3,05 \pm 0,75) \times 10^{-4}$                               |
|          | G:G                | $0,266 \pm 0,020$      | $1014 \pm 188$    | $(2,62 \pm 0,52) \times 10^{-4}$      | $(3,59 \pm 0,77) \times 10^{-6}$                               |
|          | G:A                | $0,0158 \pm 0,0009$    | $5110 \pm 755$    | $(3,09 \pm 0,49) \times 10^{-6}$      |                                                                |
| RTO_WT   | G:C                | $14,69 \pm 0,98$       | $11,75 \pm 2,94$  | $1,25 \pm 0,32$                       | $(23,0 \pm 9,46) \times 10^{-4}$                               |
|          | G:T                | $7,59 \pm 0,92$        | $2638 \pm 785$    | $(28,8 \pm 9,24) \times 10^{-4}$      | $(4,01 \pm 1,58) \times 10^{-4}$                               |
|          | G:G                | $0,559 \pm 0,071$      | $1132 \pm 316$    | $(4,94 \pm 1,51) \times 10^{-4}$      | $(2,17 \pm 0,90) \times 10^{-6}$                               |
|          | G:A                | $0,0211 \pm 0,0030$    | $7817 \pm 2334$   | $(2,71 \pm 0,89) \times 10^{-6}$      |                                                                |
| RTO_V75I | G:C                | $13,95 \pm 1,22$       | $14,60 \pm 4,33$  | $0,955 \pm 0,295$                     | $(6,56 \pm 2,40) \times 10^{-4}$                               |
|          | G:T                | $2,76 \pm 0,21$        | $4400 \pm 789$    | $(6,27 \pm 1,22) \times 10^{-4}$      | $(1,39 \pm 0,44) \times 10^{-4}$                               |
|          | G:G                | $0,322 \pm 0,007$      | $2426 \pm 178$    | $(1,33 \pm 0,10) \times 10^{-4}$      | $(0,59 \pm 0,23) \times 10^{-6}$                               |
|          | G:A                | $0,0068 \pm 0,0008$    | $12110 \pm 2536$  | $(0,56 \pm 0,13) \times 10^{-6}$      |                                                                |

Tabla 2. Fidelidad de la RT del VIH-1 subtipo B "wild-type" BH10 (BH10\_WT), comparada con la del mutante V75I (en el contexto de secuencia de BH10), con la del VIH-1 grupo O "wild-type" (RTO\_WT) y con los mutantes V75I y V75I/E478Q en el contexto de secuencia de VIH-1

5

grupo O (RTO\_V75I y RTO\_V75I/E478Q), estimada mediante ensayos genéticos (M13mp2 *lacZ* "forward mutation assay").

| Enzima                 | Placas<br>totales | Placas<br>mutantes | Frecuencia<br>de mutantes | Incremento de la fidelidad |                           |
|------------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                        |                   |                    |                           | (respecto a<br>BH10_WT)    | (respecto<br>a<br>RTO_WT) |
| BH10_WT <sup>a</sup>   | 6736              | 139                | 0,0206                    | -                          |                           |
| BH10_V75I <sup>a</sup> | 6033              | 42                 | 0,0069                    | 3,0                        |                           |
| RTO_WT                 | 7579              | 63                 | 0,0083                    | 2,5                        | -                         |
| RTO_V75I               | 9894              | 43                 | 0,0043                    | 4,7                        | 1,9                       |
| RTO_V75I/E478Q         | 2046              | 10                 | 0,0049                    | 4,2                        | 1,7                       |

<sup>a</sup> Datos para BH10\_WT y BH10\_V75I, tomados de Matamoros *et al. J. Mol. Biol.* 2008; 375: 1234-1248.

5

### EJEMPLO 3. Efecto de las mutaciones V75I y V75I/E478Q sobre la termoestabilidad.

Para analizar la termostabilidad de los mutantes se llevaron a cabo reacciones de retrotranscripción a diferentes temperaturas, y posteriormente los productos de reacción (ADNc) se amplificaron por PCR en condiciones estándar. Típicamente, la reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen de 20 µl [4 µl de tampón Tris-HCl 250 mM (pH 8,3 at 25°C) que contiene KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM y ditiotreitól 50 mM; 1 µl de ARN total aislado de hígado de ratón (1 µg/µl); 4 µl de una mezcla de los 4 dNTPs (a 2,5 mM cada uno de ellos); 1 µl de oligo-dT (100 µM); 0,5 µl de inhibidor de RNasa (40 unidades/µl); la RT a una concentración aproximada de 150 nM y el resto hasta 20 µl de agua]. Inicialmente se incubó el ARN y el oligo dT a 68°C durante 3 min. Después se añaden los demás componentes de la reacción y se incubó durante 1 hora a la temperatura deseada para ver termostabilidad. Finalmente, la reacción se detiene incubando 10 min a 92°C, para obtener el ADNc. Este se amplifica por PCR en condiciones estándar, utilizando Taq polimerasa y los cebadores ACT1 y ACT2 (fragmento de 500 pares de bases) o ACT1 y ACT3 (fragmento de 1000 pares de bases). Las secuencias de los cebadores utilizados son: ACT1: SEQ ID NO: 15, ACT2: SEQ ID NO: 16, y ACT3: SEQ ID

NO: 17.

**EJEMPLO 4: Pérdida de la actividad RNasa H en las RTs portadoras del cambio E478Q.**

5

Los estudios de termostabilidad llevados a cabo con las cuatro RTs de VIH-1 (VIH-1 grupo O "wild-type", VIH-1 grupo O mutante V75I, VIH-1 grupo O mutante V75I/E478Q y VIH-1 subtipo B "wild-type BH10") y la RT del virus Moloney de la leucemia de ratón (MLV) demostraron que las tres enzimas  
10 derivadas de VIH-1 grupo O eran las más termoestables (Figura 3). Sin embargo la presencia de V75I disminuía la termostabilidad de la enzima, mientras que cuando iba acompañada por el cambio E478Q, se producía una mejora en su estabilidad que se reflejaba en un aumento en la intensidad de la banda amplificada. Esto se debe a que la presencia de la mutación E478Q  
15 conduce a la pérdida de actividad RNasa H de la enzima (Figura 4), lo que facilita la estabilidad del ARN en reacciones de amplificación.

La actividad RNasa H de los mutantes generados se determinó con un complejo molde-cebador, cuya estructura aparece en la parte inferior. El molde  
20 ARN se encuentra marcado en su extremo 5' con  $^{32}\text{P}$  y la reacción se lleva a cabo a 37°C, en presencia de molde-cebador ARN/ADN a 50 nM y la RT correspondiente a 100 nM, en un tampón que contenía: Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), NaCl 50 mM y  $\text{MgCl}_2$  5 mM. Las reacciones se iniciaron tras añadir 1 µl de la RT concentrada y  $\text{MgCl}_2$ . Se tomaron alícuotas a 0, 15, 60, 120, 240 y 480 s,  
25 y la reacción se detuvo añadiendo EDTA 10 mM disuelto en formamida al 90%. Las muestras se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida y urea. Los fragmentos de 26 y 25 nucleótidos se generan como consecuencia de la ruptura del molde ARN por parte de la actividad RNasa H de la RT. La ausencia de degradación del molde de 31 nucleótidos demuestra la pérdida de  
30 actividad RNasa H por parte de los mutantes portadores del cambio E478Q.

## REIVINDICACIONES

1. Retrotranscriptasa aislada de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 de grupo O y modificada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una mutación que modifica dicha secuencia de aminoácidos en el residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1, en el que la retrotranscriptasa modificada tiene una fidelidad de copia incrementada con relación a la retrotranscriptasa no modificada correspondiente.
2. Retrotranscriptasa según la reivindicación 1, donde el residuo que se corresponde con la posición 75 de la SEQ ID NO: 1 es isoleucina.
3. Retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 90 % con la SEQ ID NO: 1.
4. Retrotranscriptasa según la reivindicación 3, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 95 % con la SEQ ID NO: 1.
5. Retrotranscriptasa según la reivindicación 4, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 98 % con la SEQ ID NO: 1.
6. Retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la secuencia de aminoácidos además tiene otra mutación que modifica dicha secuencia de aminoácidos en el residuo que corresponde a la posición 478 de la SEQ ID NO: 1, en el que la retrotranscriptasa modificada tiene una termoestabilidad incrementada con relación a la retrotranscriptasa modificada en el residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1.

7. Retrotranscriptasa según la reivindicación 6, donde el residuo que se corresponde con la posición 478 de la SEQ ID NO: 1 es glutamina.
8. Retrotranscriptasa según las reivindicaciones 1 a 5, donde la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 2.
9. Retrotranscriptasa según las reivindicaciones 6 ó 7, donde la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 3.
10. Polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida en la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
11. Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 10.
12. Vector según la reivindicación 11 donde el polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida en la retrotranscriptasa está unido operativamente a, al menos, una secuencia de control de la lista que comprende:
- a) un promotor,
  - b) una señal de inicio de la transcripción,
  - c) una señal de terminación de la transcripción,
  - d) una señal de poliadenilación, o
  - e) un activador transcripcional.
13. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12 donde el polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos comprendida en la retrotranscriptasa está unido en fase de lectura a una secuencia que codifica para una etiqueta de purificación.
14. Vector según la reivindicación 13 donde la etiqueta de purificación consiste en una cola de residuos de histidina.

15. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que además comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos comprendida en la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 entre los  
5 residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.

16. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 que, además, comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de  
10 aminoácidos comprendida en la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 entre los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.

17. Célula que comprende el vector según la reivindicación 15.  
15

18. Método para producir la secuencia de aminoácidos comprendida en la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende:

20 a) cultivar la célula según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17,  
y  
b) aislar la secuencia de aminoácidos comprendida en la retrotranscriptasa expresada en el paso (a) por dicha célula.

25 19. Método para producir la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende:

a) cultivar la célula según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17,  
y  
30 b) aislar la retrotranscriptasa expresada en el paso (a) por dicha célula.

20. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la retrotranscripción de un ácido nucleico molde.
21. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la amplificación de un ácido nucleico molde.
22. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la secuenciación de un ácido nucleico molde.
23. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22 donde el ácido nucleico molde es ARNm.
24. Método de retrotranscripción de un ácido nucleico molde que comprende:
- a) mezclar dicho ácido nucleico molde con la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, e
  - b) incubar la mezcla del paso (a) en condiciones que permitan la síntesis de ADN complementario al ácido nucleico molde.
25. Método de amplificación de un ácido nucleico molde que comprende:
- a) mezclar dicho ácido nucleico con la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y con, al menos, una ADN polimerasa dependiente de ADN, e
  - b) incubar la mezcla del paso (a) en condiciones que permitan la amplificación de ADN complementario al ácido nucleico molde.
26. Método de secuenciación de un ácido nucleico molde que comprende:
- a) poner en contacto dicho ácido nucleico con la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9,

- b) incubar dicha mezcla en condiciones que permitan la síntesis de una población de moléculas de ADN complementario al ácido nucleico molde, y
- c) separar dicha población de moléculas de ADN complementario para determinar la secuencia de nucleótidos.

27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26 donde el ácido nucleico molde es ARNm.

28. Kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27 que comprende:

a) la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y

b) al menos, un elemento de la lista que comprende:

- i) un tampón,
- ii) un cebador,
- iii) una ADN polimerasa dependiente de ADN, y
- iv) un nucleótido.

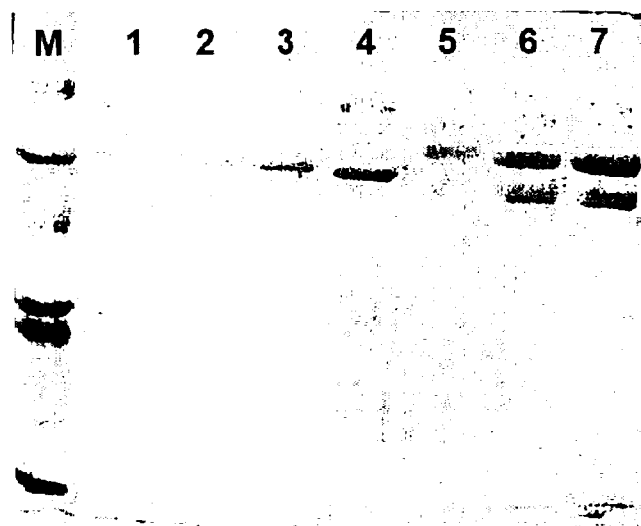
**FIG. 1**

FIG. 2

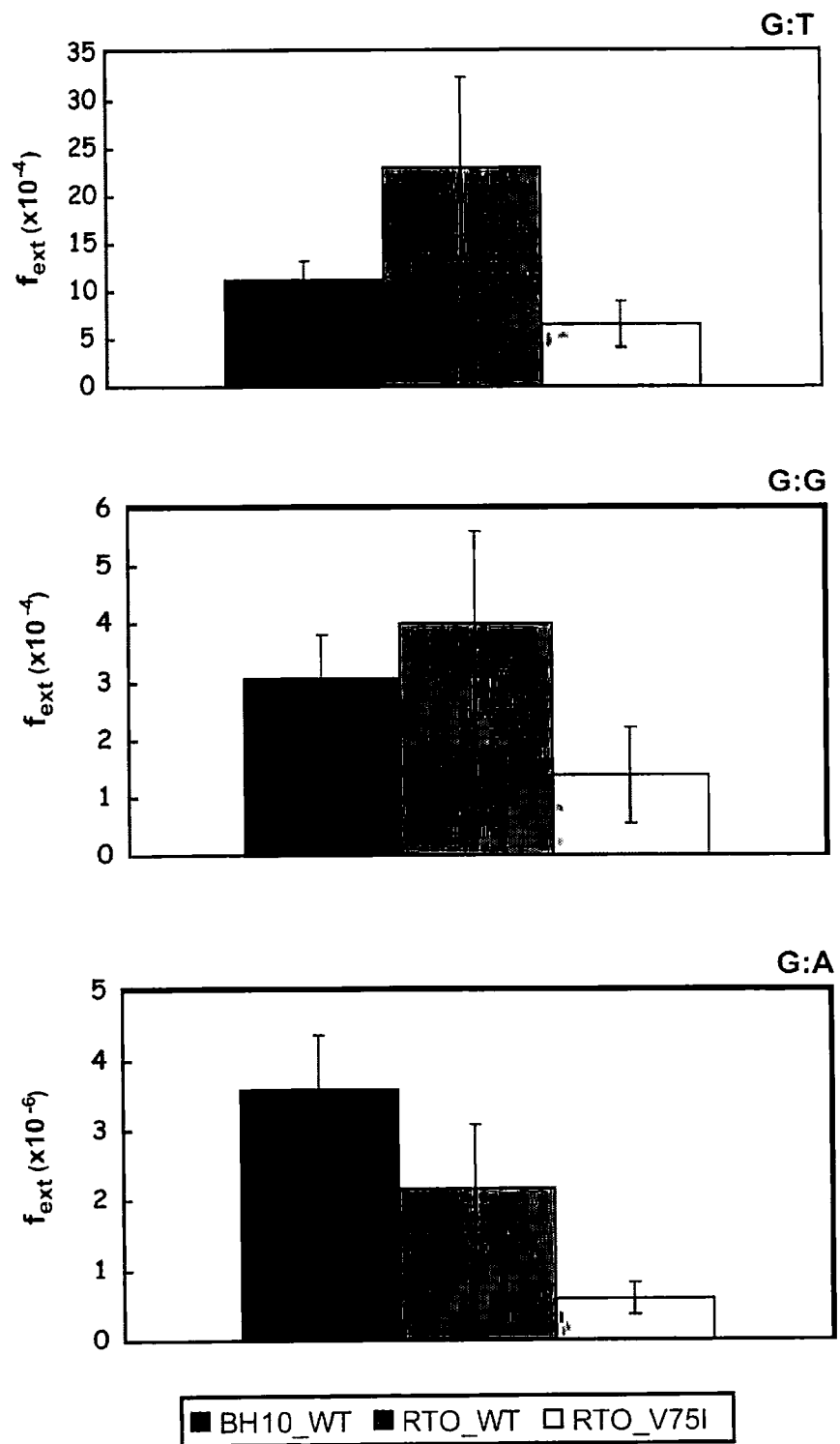


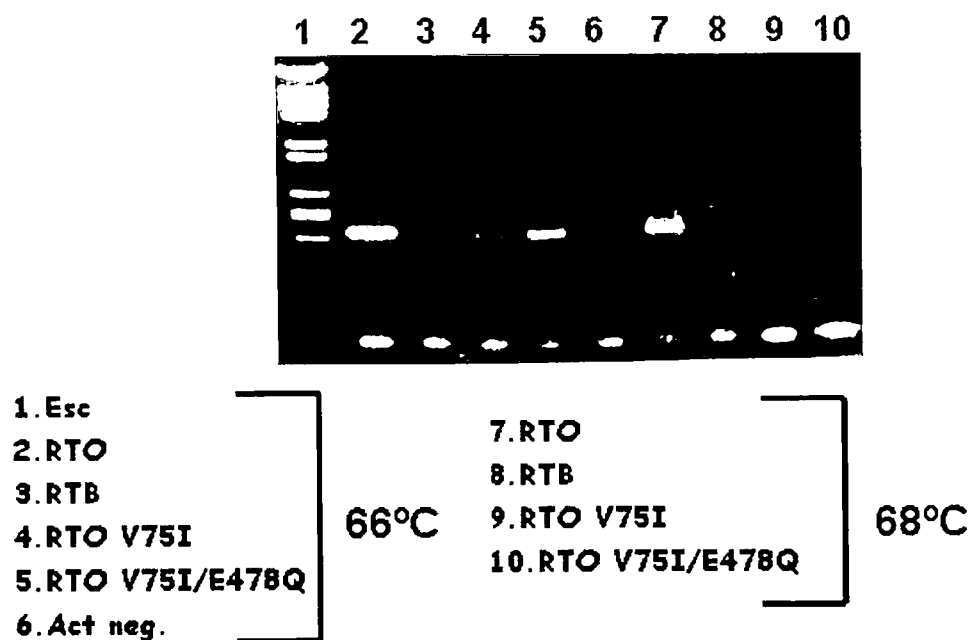
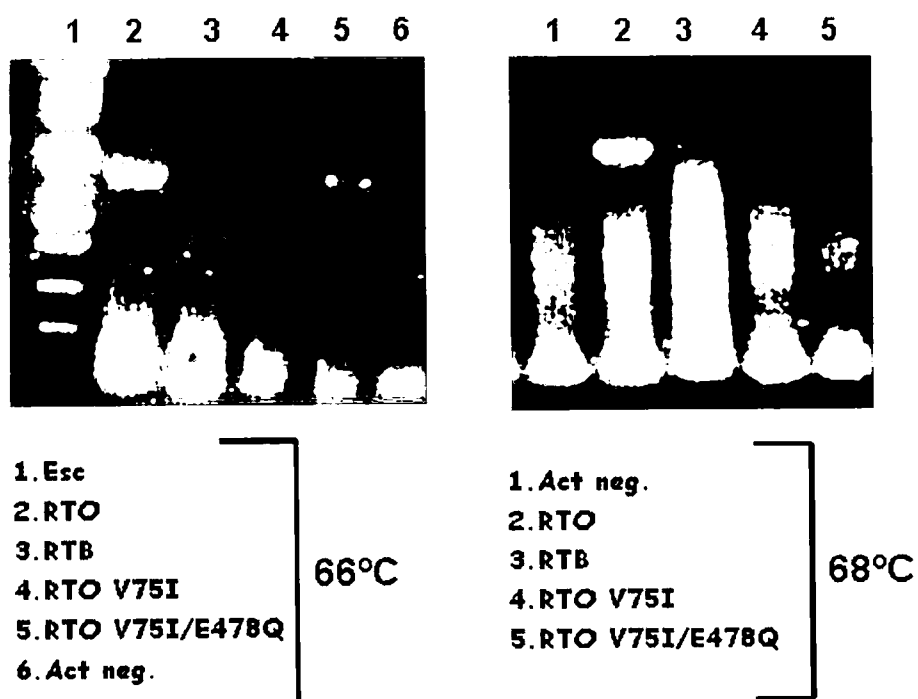
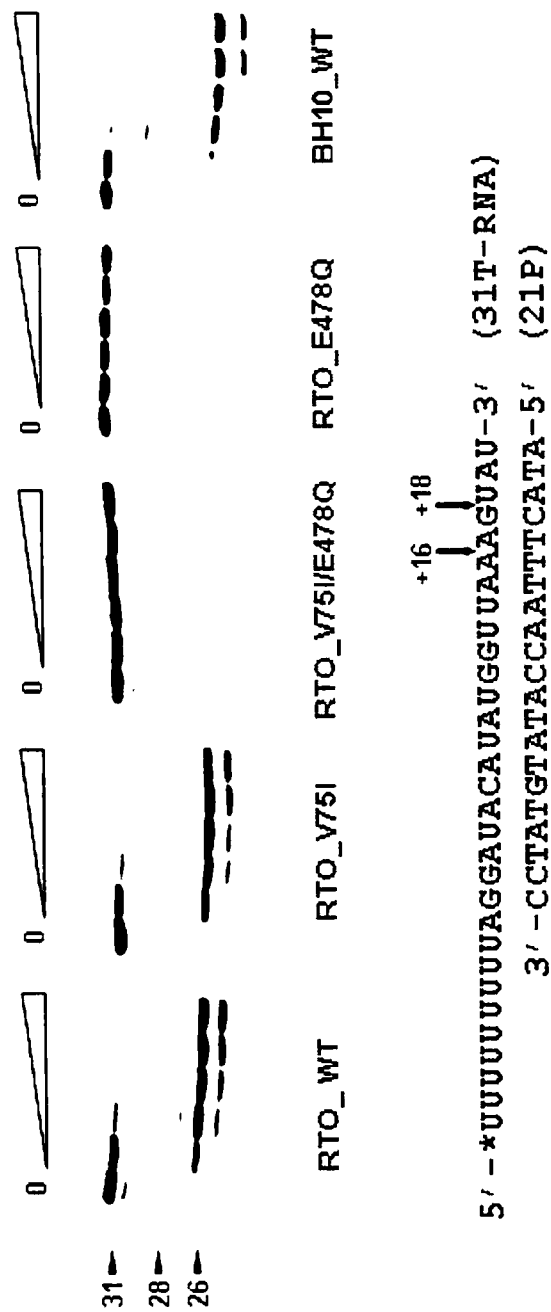
**FIG. 3****A.****B.**

FIG. 4



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2010/070320

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, NPL, BIOSIS, COMPENDX, COMPENDX, INSPEC, XPESP, XPOAC, UniProt, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents, aaGeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| P,X       | ÁLVAREZ, M., MATAMOROS, T., MENÉNDEZ-ARIAS, L.<br>Increased thermostability and fidelity of DNA synthesis of wild-type and mutant HIV-1 group O reverse transcriptases. Journal of Molecular Biology. October 2009, Vol. 392, N° 4, pages 872-884. ISSN 1089-8638. <DOI:10.1016/j.jmb.2009.07.081>                                                                 | 1-28                  |
| P,X       | MATAMOROS, T., NEVOT, M., MARTÍNEZ, M. A., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Thymidine analogue resistance suppression by V75I of HIV-1 reverse transcriptase: effects of substituting valine 75 on stavudine excision and discrimination. The Journal of Biological Chemistry. November 2009, Vol. 284, N° 47, pages 32792-32802. ISSN 1083-351X. <DOI: 10.1074/jbc.M109.038885> | 1-5, 8, 10-19         |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |     |                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                         |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.                                                               |     |                                                                                                                                                                                                                                         |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date                                                                                            |     |                                                                                                                                                                                                                                         |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "X" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                |
| "O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means                                                                                            | "Y" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  |     |                                                                                                                                                                                                                                         |
|                                                                                                                                                                         | "&" | document member of the same patent family                                                                                                                                                                                               |

Date of the actual completion of the international search

27.July.2010 (27.07.2010)

Date of mailing of the international search report

(30/07/2010)

Name and mailing address of the ISA/  
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

E. Relaño Reyes

Telephone No. +34 91 349 85 04

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2010/070320

| C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                        |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Category*                                             | Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                         | Relevant to claim No.  |
| X                                                     | MATAMOROS, T., KIM, B., MENÉNDEZ-ARIAS, L.<br>Mechanistic insights into the role of Val75 of HIV-1 reverse transcriptase in misinsertion and mispair extension fidelity of DNA synthesis. The Journal of Molecular Biology. February 2008, Vol. 375, N° 5, pages 1234-1248. ISSN 1089-8638. <DOI:10.1016/j.jmb.2007.11.021> | 1-5, 8, 10-28          |
| A                                                     | SISMOUR, A. M., LUTZ, S., PARK, J.-H. et al. PCR amplification of DNA containing non-standard base pairs by variants of reverse transcriptase from Human Immunodeficiency Virus-1. Nucleic Acids Research. 2004, Vol. 32, N° 2, pages 728-735. ISSN 1362-4962. <DOI: 10.1093/nar/gkh241>                                    | 6, 7, 9-14, 16, 18-28  |
| A                                                     | ABBONDANZIERI, E. A., BOKINSKY, G., RAUSCH, J. W., et al. Dynamic binding orientations direct activity of HIV reverse transcriptase. Nature. May 2008, Vol. 453, N° 7192 pages 184-189. ISSN 1476-4687. <DOI:10.1038/nature06941>                                                                                           | 6, 7, 9-12, 16, 18, 19 |
| A                                                     | RODES, B., MENDOZA, C., RODGERS, M. et al. Treatment response and drug resistance in patients infected with HIV type 1 group O viruses. AIDS Research and Human Retroviruses. July 2005, Vol. 21, N° 7, pages 602-607. ISSN 0889-2229. <DOI:10.1089/aid.2005.21.602>                                                        | 1-5, 8, 10             |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2010/070320

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

***C12N 9/12*** (2006.01)

***C12Q 1/68*** (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/ ES 2010/070320

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, NPL, BIOSIS, COMPENDX, INSPEC, XPESP, XPOAC, UniProt, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents, aaGeneSeq

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

| Categoría* | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Relevante para las reivindicaciones N° |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| P,X        | ÁLVAREZ, M., MATAMOROS, T., MENÉNDEZ-ARIAS, L.<br>Increased thermostability and fidelity of DNA synthesis of wild-type and mutant HIV-1 group O reverse transcriptases. Journal of Molecular Biology. Octubre 2009, Vol. 392, N° 4, páginas 872-884. ISSN 1089-8638. <DOI:10.1016/j.jmb.2009.07.081>                                                                  | 1-28                                   |
| P,X        | MATAMOROS, T., NEVOT, M., MARTÍNEZ, M. A., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Thymidine analogue resistance suppression by V75I of HIV-1 reverse transcriptase: effects of substituting valine 75 on stavudine excision and discrimination. The Journal of Biological Chemistry. Noviembre 2009, Vol. 284, N° 47, páginas 32792-32802. ISSN 1083-351X. <DOI: 10.1074/jbc.M109.038885> | 1-5, 8, 10-19                          |

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

|                                                                                                                                                                                              |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Categorías especiales de documentos citados:                                                                                                                                               | "T" | documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.     |
| "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.                                                                                      | "X" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.                                                                                    |
| "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.                                                                   | "Y" | documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. |
| "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). | "&" | documento que forma parte de la misma familia de patentes.                                                                                                                                                                                                                 |
| "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.                                                                           |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.                                                         |     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

27.Julio.2010 (27.07.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

30-JULIO-2010 (30/07/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

E. Relaño Reyes

N° de teléfono +34 91 349 85 04

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/ES 2010/070320

| C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                        |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Categoría*                                           | Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes                                                                                                                                                                                                                                                     | Relevante para las reivindicaciones N° |
| X                                                    | MATAMOROS, T., KIM, B., MENÉNDEZ-ARIAS, L.<br>Mechanistic insights into the role of Val75 of HIV-1 reverse transcriptase in misinsertion and mispair extension fidelity of DNA synthesis. The Journal of Molecular Biology. Febrero 2008, Vol. 375, N° 5, páginas 1234-1248. ISSN 1089-8638. <DOI:10.1016/j.jmb.2007.11.021> | 1-5, 8, 10-28                          |
| A                                                    | SISMOUR, A. M., LUTZ, S., PARK, J.-H. et al. PCR amplification of DNA containing non-standard base pairs by variants of reverse transcriptase from Human Immunodeficiency Virus-1. Nucleic Acids Research. 2004, Vol. 32, N° 2, páginas 728-735. ISSN 1362-4962. <DOI: 10.1093/nar/gkh241>                                   | 6, 7, 9-14, 16, 18-28                  |
| A                                                    | ABBONDANZIERI, E. A., BOKINSKY, G., RAUSCH, J. W., et al. Dynamic binding orientations direct activity of HIV reverse transcriptase. Nature. Mayo 2008, Vol. 453, N° 7192 páginas 184-189. ISSN 1476-4687. <DOI:10.1038/nature06941>                                                                                         | 6, 7, 9-12, 16, 18, 19                 |
| A                                                    | RODES, B., MENDOZA, C., RODGERS, M. et al. Treatment response and drug resistance in patients infected with HIV type 1 group O viruses. AIDS Research and Human Retroviruses. Julio 2005, Vol. 21, N° 7, páginas 602-607. ISSN 0889-2229. <DOI:10.1089/aid.2005.21.602>                                                      | 1-5, 8, 10                             |

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

***C12N 9/12*** (2006.01)

***C12Q 1/68*** (2006.01)