

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/080541 A1

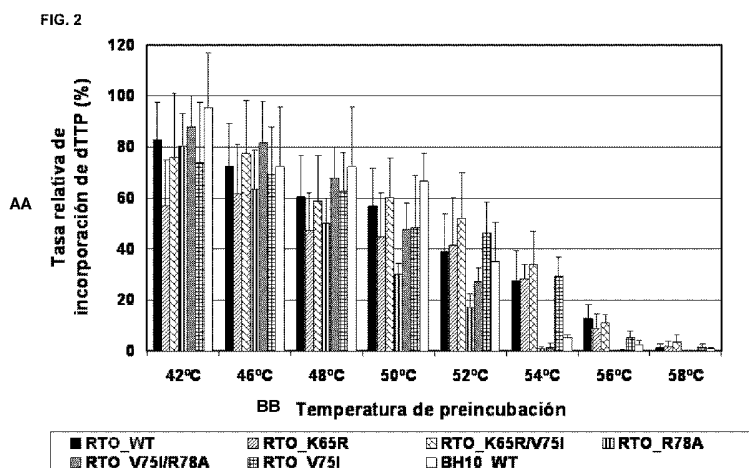
(43) Fecha de publicación internacional
21 de junio de 2012 (21.06.2012) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 9/12 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2011/070801
- (22) Fecha de presentación internacional:
21 de noviembre de 2011 (21.11.2011)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201031864
16 de diciembre de 2010 (16.12.2010) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; 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, Nicolás Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **BARRIOLUENGO FERNÁNDEZ, Verónica** [ES/ES]; Instituto de Biología Molecular Eladio Viñuela, Nicolás Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **ÁLVAREZ GARCÍA, María del Mar** [ES/ES]; Instituto de Biología Molecular Eladio Viñuela, Nicolás Cabrera, 1, Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).
- (74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 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, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, 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,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: NOVEL REVERSE TRANSCRIPTASES OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 2 GROUP O

(54) Título : NUEVAS RETROTRANSCRIPTASAS DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 GRUPO O



AA... Relative inclusion rate of dTTP (%)
BB... Preincubation temperature

(57) Abstract: The invention relates to reverse transcriptases isolated from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), group O, and altered at position 65 and/or position 75, which have a high copying fidelity and thermostability, as well as to use thereof for performing the reverse transcription, amplification or sequencing of a template nucleic acid. The invention also relates to a method for obtaining said reverse transcriptases. The invention further relates to a reverse transcription method, an amplification method, a sequencing method using the reverse transcriptases of the invention and to a kit comprising the elements necessary for carrying out said methods.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]



WO 2012/080541 A1



HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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))

— antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

— con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

La presente invención se refiere a retrotranscriptasas aisladas de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) de grupo O y modificadas en la posición 65 y/o en la posición 75, 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. También se refiere a un método de retrotranscripción, a un método de amplificación, a un método de secuenciación utilizando las retrotranscriptasas de la presente invención y a un kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo dichos métodos.

Nuevas retrotranscriptasas del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 grupo O

La presente invención se refiere a retrotranscriptasas aisladas de un virus de la
5 inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) de grupo O y modificadas en las
posiciones 65 y/o 75, que presentan una elevada fidelidad de copia y que
mantienen una termoestabilidad elevada (similar a la de la retrotranscriptasa no
mutada), así como a su uso para llevar a cabo la retrotranscripción,
amplificación o secuenciación de un ácido nucleico molde.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

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
15 familia *Retroviridae* (retrovirus) y se caracterizan por presentar una enorme
diversidad genética. El VIH-1 se ha clasificado en cuatro grupos: M, N, O y P.
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). El primer aislado del VIH-1 grupo O se obtuvo de pacientes infectados
20 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 puede obtener
información sobre el genoma completo de variantes del VIH-1 grupo O en
bases de datos de secuencias de nucleótidos como GenBank (por ejemplo, en
esta base de datos la cepa MVP5180/91 tiene el número de acceso L20571).

25

En los retrovirus, la retrotranscriptasa (RT) (o transcriptasa inversa) es la
enzima responsable de la replicación del genoma viral. La RT convierte el ácido
ribonucleico (ARN) genómico monocatenario en ácido desoxirribonucleico
(ADN) bicatenario capaz de integrarse en el genoma de la célula hospedadora
30 (Herschhorn y Hizi. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 2717-2747). Las RTs son ADN
polimerasas capaces de utilizar como molde tanto ARN como ADN.

La RT del VIH-1 es un heterodímero constituido por dos subunidades, denominadas p66 y p51. En aislados del VIH-1 de grupo M – subtipo B, se sabe que la subunidad p51 posee 440 aminoácidos mientras que la subunidad 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. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que los homodímeros p66/p66 y los heterodímeros p66/p51 de la RT tienen actividad ADN polimerasa sobre complejos ARN/ADN y ADN/ADN, mientras que la p51 (monomérica u homodimérica) tiene muy poca o carece de dicha actividad (Herschhorn y Hizi. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 2717-2747).

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 de la p66 de la HIV-1 grupo M subtipo B, en una de las dos cadenas que forman el homodímero.

Las RTs son enzimas que carecen de actividad exonucleasa correctora de errores y por tanto, tienen una elevada tasa de error (alrededor de 10^{-4}), lo que explicaría en parte la enorme variabilidad genética observada en algunos

retrovirus como el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Menéndez-Arias. *Viruses* 2009; 1: 1137-1165). A pesar de ello, las RTs se utilizan de forma generalizada en tecnología de ADN recombinante, como por ejemplo para la síntesis de ADN copia a partir de ARN mensajero (ARNm),
5 como es el caso de la RT del virus Moloney de la leucemia de ratón (MLV) y la RT del virus de la mieloblastosis de aves (AMV) (Gerard *et al. Nucleic Acids Res* 2002; 30: 3118-3129; Yasukawa *et al. J Biochem (Tokyo)* 2008; 143: 261-268).

10 En relación a RTs del VIH-1, se ha visto que en reacciones de síntesis de ADN complementario, la RT del VIH-1 de grupo M – subtipo B muestra una eficacia similar a la de las RTs de MLV o AMV a 37 y 42 °C, pero retiene una actividad mayor a 50 °C. Por otra parte, se ha demostrado que la RT “wild-type” (salvaje o WT) del VIH-1 de grupo O presenta una mayor termoestabilidad en
15 comparación con la RT de MLV y con una RT “wild-type” del VIH-1 grupo M – subtipo B (WO20101130864).

Las RTs del VIH-1 grupo O 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). Además, las RTs del VIH-1 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). Mutantes V75I y V75I/E478Q de la RT del
25 VIH-1 grupo O proporcionan rendimientos más altos que los obtenidos con la RT “wild-type” del VIH-1 subtipo B en reacciones de amplificación por RT-PCR, cuando la retrotranscripción se lleva a cabo a 57 – 69 °C (Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884). A pesar de su elevada termostabilidad, las RTs “wild-type” del VIH-1, tanto las del grupo M – subtipo B, como las del grupo O, son
30 aproximadamente 7 a 15 veces menos fieles que las RTs del MLV y AMV, en ensayos genéticos basados en la síntesis de ADN utilizando como molde el

gen *lacZ* presente en el fago M13mp2 (Roberts *et al. Science* 1988; 242: 1171-1173; Roberts *et al. Mol Cell Biol* 1989; 9: 469-476; Menéndez-Arias. *Viruses* 2009; 1: 1137-1165; patente WO20101130864).

5 Se ha observado que algunos cambios de aminoácido pueden producir un incremento de fidelidad en algunas RTs, como por ejemplo las mutaciones K65A, K65R, V75I, D76V, R78A, V148I y Q151N, en el contexto de secuencia de la RT del VIH-1 de subtipo B (Menéndez-Arias. *Viruses*, 2009; 1: 1137-1165; Garforth *et al. J Mol Biol* 2010; 401: 33-44). Sin embargo, no es posible *a priori*
10 conocer si la misma mutación ejerce el mismo efecto en una variante del VIH-1 filogenéticamente alejada del subtipo B como es el caso de las variantes de grupo O. De hecho, el mismo cambio puede tener efectos distintos según el contexto de secuencia. Por ejemplo, la sustitución E89G en la RT del VIH-1 del grupo M - subtipo B produce un aumento de fidelidad en ensayos de
15 incorporación errónea y en ensayos de extensión de extremos desapareados (Drosopoulos y Prasad. *J Virol* 1996; 70: 4834-4838; Hamburg *et al. Nucleic Acids Res* 1998; 26: 4389-4394; Rubinek *et al. Eur J Biochem* 1997; 247: 238-247). Sin embargo, en el contexto de secuencia de la RT del VIH-2, E89G tiene un efecto mínimo sobre la fidelidad de copia, medida con el mismo tipo de
20 ensayos (Taube *et al. Eur J Biochem* 1997; 250: 106-114). Otro ejemplo es la mutación L74V, que en la RT del VIH-1 del grupo M subtipo B produce un aumento de fidelidad medida en ensayos de incorporación errónea y en ensayos de extensión de extremos desapareados (Rubinek *et al. Eur J Biochem* 1997; 247: 238-247), aunque estos efectos no se observaron cuando
25 la mutación se introdujo en la RT del VIH-2 (Taube *et al. Eur J Biochem* 1997; 250: 106-114).

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

30 El problema técnico que resuelve la invención es el de proporcionar retrotranscriptasas (RTs) de retrovirus con mayor fidelidad de copia y por lo

tanto menor tasa de error y que además sean estables a temperaturas elevadas, mayores de 54 °C.

La presente invención se refiere a RTs aisladas de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) de grupo O y modificadas en una o en más posiciones, 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.

10 Con el fin de obtener nuevas RTs modificadas del VIH-1 de grupo O se han generado 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 lisina 65 por arginina (mutación K65R); o mediante la sustitución de lisina 65 y valina 75 por arginina e isoleucina, respectivamente (mutaciones K65R y
15 V75I). Estas nuevas RTs muestran un incremento en su fidelidad de copia con respecto a la de la RT no modificada, sin que disminuya su termoestabilidad. Además se han comparado las RTs de la invención con otras RTs ya conocidas en el estado de la técnica. Las RTs del VIH-1 de grupo O portadoras de la mutación K65R o de las mutaciones K65R y V75I presentan mayor
20 fidelidad de copia y termoestabilidad que las RTs de aislados o cepas del VIH-1 de grupo M subtipo B (RT del VIH-1 de subtipo B), y que la RT de MLV, empleadas con el mismo fin.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una RT aislada de un VIH-1 de grupo O y modificada para que comprenda una secuencia de aminoácidos en la que el residuo que corresponde a la posición 65 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por una arginina o por otro aminoácido que suponga una sustitución conservativa respecto a la arginina, donde dicha RT modificada tiene una fidelidad de copia incrementada con relación a la RT no modificada
30 correspondiente, a la vez que mantiene la estabilidad a temperaturas elevadas de la enzima no modificada.

Dado que la p66 puede ser proteolizada, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos comprendida por la RT de la invención presenta una identidad de, al menos, un 70%, más preferiblemente, de, al menos, un 80% y, aún más preferiblemente, de al menos un 90% con la SEQ ID NO: 1.

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.

10 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 sustitución del residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1 por una isoleucina o por otro aminoácido que suponga una sustitución conservativa respecto a la isoleucina, y donde dicha RT modificada tiene una fidelidad de copia incrementada con relación a la RT no modificada y conserva la estabilidad de ésta a temperaturas elevadas.

Otra 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: 3.

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.

25 El término "retrotranscriptasa aislada del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1" (o "human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase", o "HIV-1 RT") se refiere a una proteína retrotranscriptasa con actividad ADN polimerasa dependiente de ADN y ARN, 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 RT a partir del ARN viral obtenido de un aislado del VIH-1, y posterior clonación en un vector de expresión.

5

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.

- 10 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.

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

El término "sustitución conservativa" se refiere a una sustitución que se realice
20 con aminoácidos que se considerarían por un experto en la materia como similares, por ejemplo en propiedades fisico-químicas de hidrofobicidad, polaridad, carga o volumen de su cadena lateral, y que conllevaran a una actividad similar a la descrita para los mutantes de la presente invención. En la presente invención "amino ácidos similares" hace referencia a aminoácidos
25 similares a arginina en el caso de la sustitución en el residuo de la posición 65 o similares a isoleucina en el caso de la sustitución en el residuo de la posición 75.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a
30 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.

- 5 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.

- 10 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).

- 15 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, *lacZ*, *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
20 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
25 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
30 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.

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

10

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
15 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 [γ ³²P]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
20 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
25 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
30 además, de extender 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
5 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.

10 Los ensayos bioquímicos en el estado pre-estacionario 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
15 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.

20

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 que se ha eliminado la región correspondiente al gen *lacZ* de una de sus hebras. La reacción de
25 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- β -galactopiranosido) e IPTG (isopropil- β -tio-galactopiranosido). De este modo, si en la reacción de síntesis de ADN no
30 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 α -

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.

5

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.

10

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.

15

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,

25

30

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.

5 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
10 (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, 50 °C, más preferiblemente de, al menos, 55 °C y aún más preferiblemente de, al menos 60 °C.

15

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,
20 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.

25

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
30 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
5 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
10 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
15 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.

20 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.

25 Una RT con termoestabilidad "incrementada" o "aumentada" se define como 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
30 respecto a la RT del VIH-1 grupo O "wild-type" (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 termostabilidad incrementada cuando la cantidad de producto obtenido mediante 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 del VIH-1 grupo O "wild-type" (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 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 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 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 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 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 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.

Un segundo 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 "polinucleótido", "secuencia nucleotídica", "secuencia de nucleótidos", "ácido nucleico" y "oligonucleótido" 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

Un tercer 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.

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 clonación 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.

El término "expresión" se refiere al proceso por el cual 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.

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

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.

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.

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.

10

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 α -*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 codificadora. Secuencias de control apropiadas para la expresión de un polinucleótido en células eucariotas son conocidas en el estado de la técnica.

20

Utilizando técnicas bien conocidas, un experto en la materia sería 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.

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:

30

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.

5

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.

10

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 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 etiqueta de purificación consiste en al menos 6 residuos de histidina.

15

20

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 cualquiera de las características descritas anteriormente en la presente descripción.

25

Otra 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 y que, además, comprende un

30

polinucleótido que codifica para una proteasa capaz 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. De ahora en adelante utilizaremos la expresión “vector segundo 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.

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 un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente.

El término “proteasa del 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, o en posiciones próximas, y 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 proteasa a partir del ARN viral obtenido de un aislado del VIH-1, y posterior

clonación en un vector de expresión. 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 (cepa NL4-3). En el virus, dicha proteasa
5 forma homodímeros mediante la unión no covalente de sus subunidades.

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

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a la
15 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 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%.

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.

25

La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que la proteína o el fragmento de la proteína en cuestión mantiene la capacidad de realizar un corte endoproteolítico en o alrededor de la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT de la invención entre los residuos que
30 corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a una célula que comprende el 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.

5

Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a una célula que comprende el 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.

10

Otra realización preferida de este aspecto de la 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, o entre residuos próximos a éstos. De ahora en adelante utilizaremos la expresión "célula tercera de la invención" para referirnos a una célula con dichas características.

15

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.

20

Un quinto 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:

25

a) cultivar la célula de la invención, y

30

b) aislar la secuencia de aminoácidos comprendida en la RT expresada en el paso (a) por dicha célula.

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

- 5 a) cultivar la célula de la invención, y
- b) aislar la RT expresada en el paso (a) por dicha célula y preservarla en condiciones que permitan a la RT estar activa.

Las condiciones que permitirían la actividad de la RT aislada en el método
10 descrito en el sexto aspecto de la invención son las aplicables a cualquier proteína y conocidas para cualquier experto en la materia, por ejemplo condiciones que permitan que la proteína se pliegue correctamente y que sea funcionalmente activa (por ejemplo, que posea actividad catalítica, en el caso de enzimas). Ejemplos de factores a tener en cuenta para mantener la
15 funcionalidad de la proteína incluyen, pero sin limitarnos, condiciones adecuadas de pH, concentración de electrolitos y sales adecuado, presencia de agentes reductores como el ditiotreitól a concentraciones apropiadas, o la adición de agentes estabilizantes.

20 Un séptimo 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.

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

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

Un décimo aspecto de la presente invención se refiere a un método de

retrotranscripción de un ácido nucleico molde, preferiblemente ARNm, que comprende:

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

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

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

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

- 20 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,
y
- c) separar dicha población de moléculas de ADN complementario para
25 determinar la secuencia de nucleótidos.

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

30

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.

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.

El término "ácido nucleico molde" o "molde" 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.

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.

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 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.

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 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 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, permite determinar la secuencia de nucleótidos.

15

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 desoxirribosa.

20

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 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, 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.

30

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.

10

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.

20

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.

25

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

30

técnica. Etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, etiquetas fluorescentes, etiquetas quimioluminiscentes, etiquetas bioluminiscentes o etiquetas enzimáticas.

5 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 polimerización de desoxirribonucleótidos utilizando ADN como ácido nucleico molde. Ejemplos de ADN polimerasa dependientes de ADN que pueden ser empleadas en el método de amplificación de la siguiente invención son, pero
10 sin limitarnos, las ADN polimerasas de *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermotoga neapolitana* (Tne), *Thermotoga maritima* (Tma), *Thermococcus litoralis* (Tli or VentTM), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Pyrococcus* species GB-D (Deep VentTM), *Pyrococcus woosii* (Pwo), *Bacillus stearothermophilus* (Bst), *Bacillus caldophilus* (Bca), *Sulfolobus acidocaldarius* (Sac),
15 *Thermoplasma acidophilum* (Tac), *Thermus flavus* (Tfl/Tub), *Thermus ruber* (Tru), *Thermus brockianus* (DyNAzymeTM), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth) o *Mycobacterium* sp. (Mtb, Mlep).

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

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
25 presente descripción, que comprende:

- 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.

Un decimocuarto aspecto de la invención se refiere al uso del kit del
5 decimotercer aspecto de la invención para la retrotranscripción, la amplificación
o la secuenciación de un ácido nucleico molde, donde preferiblemente éste es
ARN mensajero.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus
10 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
15 presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Electroforesis de las RTs analizadas. Muestra la pureza de las
20 distintas RTs obtenidas. La electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS
muestra: 1, marcadores de peso molecular (de arriba hacia abajo: 97,4 kDa,
66,2 kDa, 45 kDa y 31 kDa); 2, RT del VIH-1 grupo O "wild-type" (WT); 3, RT
del VIH-1 grupo O portadora de la mutación K65R; 4, RT del VIH-1 grupo O
portadora de las mutaciones K65R y V75I; 5, RT del VIH-1 grupo O portadora
25 de la mutación R78A; pocillos 6 y 7: albúmina de suero bovino (66,2 kDa) (1 y 2
µg respectivamente).

Figura 2. Termoestabilidad de las RTs analizadas. Muestra la estabilidad
térmica de variantes de la RT del VIH-1 grupo O en comparación con la RT del
30 VIH-1 grupo M - subtipo B (BH10_WT). Para cada enzima, se representa la
actividad específica residual ADN polimerasa ARN-dependiente, determinada

tras preincubar la enzima con el molde-iniciador durante 5 min a la temperatura indicada, y relativa a la obtenida cuando la preincubación se realiza a 37 °C. Las reacciones de polimerización se llevan a cabo con poli(rA)/oligo(dT)₁₆ como molde-iniciador y [³H]dTTP como sustrato. Las velocidades de incorporación de nucleótido obtenidas para las distintas enzimas a 37 °C (valores de referencia) fueron: 0.72 ± 0.28 s⁻¹ para RTO_WT (RT del VIH-1 grupo O "wild-type"), 0.92 ± 0.25 s⁻¹ para RTO_K65R (RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación K65R), 0.61 ± 0.26 s⁻¹ para RTO_K65R/V75I (RT del VIH-1 grupo O portadora de las mutaciones K65R y V75I), 0.45 ± 0.06 s⁻¹ para RTO_R78A (RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación R78A, donde la arginina de la posición 78 se sustituyó por una alanina), 0.25 ± 0.06 s⁻¹ para RTO_V75I/R78A (RT del VIH-1 grupo O portadora de las mutaciones V75I y R78A), 0.57 ± 0.06 s⁻¹ para RTO_V75I (RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación V75I) y 1.17 ± 0.4 s⁻¹ para BH10_WT (RT del VIH-1 grupo M – subtipo B BH10).

15

Figura 3. Actividad ADN polimerasa dependiente de ARN de las RTs analizadas. Muestra la amplificación por RT-PCR de fragmentos de ARN codificante para actina de 900 pares de bases (A) y para tubulina de 1200 pares de bases (B), a partir de ARN total de hígado de ratón. La amplificación se llevó a cabo con las siguientes RTs: pocillo 2, RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación K65R (RTO_K65R); pocillo 3, RT del VIH-1 grupo O portadora de las mutaciones K65R y V75I (RTO_K65R/V75I); pocillo 4, RT del VIH-1 grupo O portadora de la mutación R78A (RTO_R78A); pocillo 5, RT del VIH-1 grupo O portadora de las mutaciones V75I y R78A (RTO_V75I/R78A); pocillo 6, RT del VIH-1 grupo O "wild-type" (RTO_WT); pocillo 7, V75I en el contexto de O_WT RT (RTO_V75I); pocillo 8, RT del VIH-1 subtipo B BH10 (RT BH10_WT); y pocillo 9, RT del virus Moloney de la leucemia de ratón (RT MLV) (pocillo 8). En los pocillos 1 y C se muestran marcadores de peso molecular (digerido de ADN de fago Φ29, llevado a cabo con HindIII) y un control negativo realizado en ausencia de ADN complementario, respectivamente. Las temperaturas indicadas se refieren a la reacción de síntesis del ADN copia.

30

Figura 4. Fidelidad de copia de las RTs analizadas. Muestra la eficiencia de incorporación de nucleótidos incorrectos (A) y la eficiencia de extensión de extremos desapareados (B), obtenida con dos de las tres RTs mutantes caracterizadas (RTO_K65R y RTO_K65R/V75I), en comparación con las de la RT del VIH-1 grupo O "wild-type" (RTO_WT) y la RT portadora de la mutación V75I (RTO_V75I).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

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 a continuación ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

15

EJEMPLO 1: Generación, expresión y purificación de variantes de la RT del VIH de tipo 1 de grupo O.

20

La expresión y purificación de las RTs se llevó a cabo con una versión modificada del plásmido p66RTB utilizando las herramientas moleculares descritas en la bibliografía, que pasamos a describir brevemente (Boretto *et al. Anal Biochem* 2001; 292: 139-147; Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884; patente WO20101130864). La expresión y purificación de las RTs se llevó a cabo con una versión modificada del plásmido p66RTB que contiene el gen de resistencia a ampicilina y en el que se clonó la región codificante de la subunidad p66 de la RT de un aislado del VIH-1 de grupo O. La secuencia de nucleótidos que comprende la región que codifica para la 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

25
30

plásmido se indica en la SEQ ID NO: 6. Utilizando esta construcción se produjo la subunidad p66, modificada en el extremo N-terminal (amino terminal) por la presencia de tres aminoácidos: Met-Asn-Ser, y en el extremo C-terminal (carboxilo terminal) por la presencia de una cola de 9 aminoácidos (Glu-Ser-Thr-His-His-His-His-His), que contenía los seis residuos de histidina, que facilitan su purificación. La subunidad p51 se generó 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).

10

Los plásmidos para la expresión de las RTs mutantes RTO_K65R y RTO_K65R/V75I 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 K65R. Como molde para la introducción de K65R, se empleó el plásmido portador de la secuencia que codifica para la p66 del VIH-1 (grupo O) ("wild-type"), descrito anteriormente. La mutación K65R también se introdujo en el plásmido portador de V75I, para obtener el doble mutante K65R/V75I. Tras la mutagénesis se comprobó por secuenciación que la región codificadora de p66 en dichos plásmidos era correcta y que contenía únicamente las mutaciones introducidas. Las secuencias de nucleótidos de los insertos portadores de las mutaciones K65R y K65R/V75I se muestran en las SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, respectivamente. SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 contienen nucleótidos en los extremos 5' y 3' que codifican para aminoácidos adicionales del extremo N-terminal (Met-Asn-Ser) y del extremo C-terminal (Glu-Ser-Thr-His-His-His-His-His) de la subunidad p66 de la RT. Las secuencias de aminoácidos de las RTs que se obtuvieron de la expresión de los plásmidos mutantes se indican en las SEQ ID NO: 11 (K65R) y SEQ ID NO: 12 (K65R/V75I). Dichas secuencias contienen los aminoácidos adicionales de los extremos N- y C-terminales indicados anteriormente.

30

La subunidad p66 (con sus extremos modificados) se co-expresó 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-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 20-24 horas.

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 P11 (Whatman)] y de afinidad [en columnas de Ni²⁺-nitriloacético-agarosa (ProBondTM, Invitrogen)]. En la cromatografía en fosfocelulosa, la RT se eluyó con un gradiente de NaCl (0 a 2 M) en tampón fosfato sódico 50 mM (pH 6.8). En la cromatografía de afinidad la RT se eluyó con un gradiente de imidazol (de 0 a 500 mM) en fosfato sódico 50 mM (pH 6,0). Las fracciones que contenían la RT se reunieron y se dializaron tres veces frente a tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), que contenía NaCl 25 mM, ditiotretitol 1 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y glicerol al 10% y posteriormente se concentraron utilizando dispositivos tipo Centriprep-30 y Centricon-30 (Amicon, Millipore).

El rendimiento obtenido a partir de 3 litros de cultivo (aproximadamente 10 g de células), estimado a partir del coeficiente de extinción molar de la RT a 280 nm ($\epsilon_{280} = 260450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), fue superior a 10 mg para la RT con la mutación K65R y superior a 20 mg para el doble mutante K65R/V75I. La pureza de las RTs obtenidas fue superior al 95% de acuerdo a estimaciones llevadas a cabo con geles de poliacrilamida y SDS (Figura 1).

EJEMPLO 2: Efecto de la mutación K65R por sí sola o combinada con V75I (mutante K65R/V75I) sobre la termoestabilidad y la eficiencia de la reacción de retrotranscripción acoplada con amplificación por PCR.

5

La estabilidad térmica de las RTs se determinó midiendo la actividad ADN polimerasa ARN-dependiente residual, obtenida tras preincubar las enzimas durante 5 minutos a diferentes temperaturas en el rango de 37 a 58 °C, en presencia del complejo molde-iniciador. A continuación, se llevaron a cabo reacciones de polimerización a 37 °C, en presencia de poli(rA)/oligo(dT)₁₆ 1 μM y [³H]dTTP 50 μM, en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) que contenía NaCl 20 mM, MgCl₂ 10 mM y ditiotreitól 8 mM. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 0.2 – 1 pmol de enzima (en 30 μl de volumen de reacción) y se incubaron durante 0 – 10 min, para calcular la tasa de incorporación de dTTP. Las reacciones se detuvieron añadiendo 20 μl de EDTA a 0.5 M (Quiñones-Mateu *et al. Virology* 1997; 236: 364-373; Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884).

Los ensayos de estabilidad térmica demostraron que todas las RTs del VIH-1 grupo O (al igual que la RT “wild-type” del VIH-1 subtipo B) retenían más del 60% de su actividad tras ser incubadas a 46 °C durante 5 min (Figura 2). Cuando la preincubación se realiza a 50 °C, todas ellas, excepto el mutante R78A, retenían más del 40% de la actividad inicial. El estudio comparado de las distintas enzimas reflejó diferencias importantes a 54 °C. Cuando la preincubación se hacía a esta temperatura, solo retenían actividad significativa (25-35%) cuatro variantes de la RT del VIH-1 grupo O: la enzima “wild-type” y las mutantes K65R, V75I y K65R/V75I. En estas condiciones la RT “wild-type” del VIH-1 subtipo B, retiene alrededor de un 5%, mientras que los mutantes R78A y V75I/R78A no presentan actividad significativa.

30

Para analizar los efectos de las mutaciones sobre la eficiencia de la reacción de retrotranscripción acoplada con amplificación por PCR se llevaron a cabo reacciones de retrotranscripción a diferentes temperaturas, y posteriormente los productos de reacción (ADN complementario, ADNc) se amplificaron por PCR en condiciones estándar (Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884).
5 Típicamente, la reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen de 20 μ l [4 μ l de tampón Tris-HCl 250 mM (pH 8,3 at 25 °C) que contenía KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM y ditioneitol 50 mM; 1 μ l de ARN total aislado de hígado de ratón (1 μ g/ μ l) (Stratagene); 4 μ l de una mezcla de los 4 dNTPs (a 2,5 mM cada uno de ellos); 1 μ l de oligo-dT (100 μ M); 0,5 μ l de inhibidor de RNasa (40 unidades/ μ l) (RNasin® Plus, Promega); la RT a una concentración aproximada de 150 nM y el resto hasta 20 μ l de agua]. Inicialmente se incubó el ARN de hígado de ratón y el oligo-dT a 68 °C durante 3 min. Después se añadieron los demás componentes de la reacción (incluida la RT) y se incubó durante 1 hora
10 a la temperatura deseada para ver termostabilidad. Finalmente, la reacción se detuvo incubando 10 min a 92 °C, para obtener el ADNc. El ADNc se amplificó por PCR en condiciones estándar, utilizando Taq polimerasa u otras enzimas similares (por ejemplo, Expand High Fidelity ADN polimerasa, Roche).

20 La eficiencia de la reacción de retrotranscripción a diferentes temperaturas se determinó tras amplificación por PCR del ADN copia obtenido. La RT "wild-type" del VIH-1 grupo O y los mutantes K65R, V75I y K65R/V75I resultaron ser eficaces en la amplificación de un fragmento de ARN de aproximadamente 900 pares de bases derivado del gen de actina, a partir de reacciones de retrotranscripción llevadas a cabo a distintas temperaturas (Figura 3A). Resultados similares se obtuvieron en la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1200 pares de bases de un ARN que codifica para tubulina (Figura 3B). Los cebadores utilizados para la amplificación del ADN copia de actina (ACT1 y ACT3) o de tubulina (TUB1 y TUB2) han sido descritos con
25 anterioridad (Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884). La eficacia de las
30

cuatro enzimas fue similar a la obtenida con la RT "wild-type" del VIH-1 grupo M - subtipo B (cepa BH10), y superior a la de la RT de MLV.

EJEMPLO 3: Efecto de la mutación K65R por sí sola o combinada con V75I (mutante K65R/V75I) sobre la fidelidad de copia de la RT de grupo O.

La fidelidad de copia de las RTs se determinó mediante ensayos genéticos utilizando el plásmido M13mp2 *lacZ* α (Bebenek y Kunkel. *Methods Enzymol* 1995; 262: 217-232). Además se llevaron a cabo ensayos cinéticos de incorporación de nucleótido y ensayos cinéticos de extensión de extremos desapareados, en condiciones de estado pre-estacionario, a fin de determinar la capacidad de las distintas enzimas para discriminar entre nucleótidos correctos e incorrectos o complejos molde-iniciador correcta o incorrectamente apareados. Para ello se utilizó el complejo molde-iniciador 31T/21P, o derivados de éste, en los que el extremo 3'OH del cebador 21P podría estar desapareado.

La fidelidad de copia de las distintas RTs se midió en ensayos de complementación en los que se utilizaron derivados del fago M13mp2 portadores del gen *lacZ*. Con estos ensayos se determinó la frecuencia con que se obtenían mutantes cuando el proceso de síntesis se realizaba con las distintas RTs recombinantes (Tabla 1). Un aumento de fidelidad de copia se refleja en la aparición en el ensayo de un número menor de placas mutantes. La RTs portadoras de las mutaciones K65R y K65R/V75I mejoraron la fidelidad de copia de la RT "wild-type" del VIH-1 grupo O en 10,8 y 9,3 veces, respectivamente. Su fidelidad es además superior en 1,5 a 1,8 veces a la obtenida con la RT del MLV.

Tabla 1. Fidelidad de la RT del VIH-1 grupo O "wild-type" (RTO_WT) comparada con las del VIH-1 grupo M - subtipo B ("wild-type" BH10)

(BH10_WT) y del MLV (RT_MLV) y de distintos mutantes de la RT del VIH-1 grupo O: K65R (RTO_K65R), K65R/V75I (RTO_K65R/V75I), V75I (RTO_V75I), R78A (RTO_R78A) y E478Q (RTO_E478Q, en la que se substituyó el residuo de ácido glutámico de la posición 478 por glutamina), estimada mediante ensayos genéticos de complementación (M13mp2 *lacZ*α “forward mutation assay”).

Enzima	Placas totales	Placas mutantes	Frecuencia de mutantes	Incremento de la fidelidad		
				(respecto a RTO_WT)	(respecto a BH10_WT)	(respecto a RT_MLV)
RTO_WT ^a	7579	63	0,00831	-	2,5	
RTO_K65R	75474	58	0,00077	10,8	26,8	1,8
RTO_K65R/V75I	55657	50	0,00089	9,3	23,2	1,5
RTO_V75I ^a	9894	47	0,00475	1,7	4,3	
RTO_R78A	80664	48	0,00059	14,1	35,0	2,3
RTO_E478Q	30634	44	0,00144	5,8	14,4	
BH10_WT ^b	6736	139	0,02064		-	
RT_MLV	29648	40	0,00135	6,2	15,3	-

^a Datos para RTO_WT y RTO_V75I tomados de Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884.

^b Datos para BH10_WT tomados de Matamoros *et al. J Mol Biol* 2008; 375: 1234-1248.

Los ensayos de incorporación de nucleótido (ensayos bioquímicos basados en la utilización de geles) demostraron que las variantes de la RT de grupo O K65R y K65R/V75I (es decir, RTO_K65R y RTO_K65R/V75I) presentaban una eficacia catalítica similar o incluso un poco superior (en el caso de K65R) a la de la enzima “wild-type” (RTO_WT). Los ensayos de incorporación errónea de nucleótido demostraron que el mutante K65R era de 3,9 a 8 veces más fiel que la enzima “wild-type” para la incorporación al DNA de C [citidina (monofosfato)], G [guanosina (monofosfato)] o A [adenosina (monofosfato)] en lugar de T [timidina (monofosfato)]; mientras que el mutante K65R/V75I presentaba una fidelidad incluso superior en ensayos de incorporación de C o A en lugar de T

(Tabla 2). Ambas enzimas mejoraban la fidelidad del mutante V75I para la incorporación de C o A en lugar de T.

En ensayos de extensión de extremos desapareados, los dos mutantes (K65R y K65R/V75I) eran más fieles que la enzima "wild-type" en reacciones de extensión de extremos desapareados, aunque las diferencias con el mutante V75I eran pequeñas (Tabla 3). En cualquier caso, el doble mutante K65R/V75I exhibía una fidelidad 5,2 veces superior a la de la RT "wild-type" para la extensión de extremos G:A, 9,5 veces superior para la extensión de G:T y 22,8 veces superior para la extensión de G:C. Las diferencias entre las cuatro RTs aparecen reflejadas gráficamente en la Figura 4.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de incorporación errónea de nucleótidos sobre el complejo molde-iniciador 31T/21P para la RT del VIH-1 grupo O "wild-type" (RTO_WT) y los mutantes K65R (RTO_K65R), K65R/V75I (RTO_K65R/V75I) y V75I (RTO_V75I), determinados en el estado pre-estacionario.

Enzima	Nucleótido	k_{pol} (s^{-1})	K_d (μM)	k_{pol}/K_d ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	Eficiencia de incorporación errónea (f_{inc}) ^b
RTO_WT ^a	dTTP	14,7 ± 1,0	11,8 ± 2,9	1,25 ± 0,32	
	dCTP	0,72 ± 0,10	7652 ± 2083	(9,5 ± 2,9) × 10 ⁻⁵	7,57 × 10 ⁻⁵
	dGTP	0,15 ± 0,03	11730 ± 3750	(1,3 ± 0,5) × 10 ⁻⁵	1,03 × 10 ⁻⁵
	dATP	(7,3 ± 0,2) × 10 ⁻³	1485 ± 150	(4,9 ± 2,2) × 10 ⁻⁶	3,94 × 10 ⁻⁶
RTO_V75I ^a	dTTP	13,9 ± 1,2	14,6 ± 4,3	0,96 ± 0,30	
	dCTP	0,27 ± 0,05	11023 ± 3792	(2,4 ± 0,9) × 10 ⁻⁵	2,54 × 10 ⁻⁵ (3,0)
	dGTP	(6,3 ± 0,9) × 10 ⁻²	7481 ± 2307	(8,4 ± 2,9) × 10 ⁻⁶	8,76 × 10 ⁻⁶ (1,2)
	dATP	(2,2 ± 0,2) × 10 ⁻³	2308 ± 720	(9,5 ± 3,1) × 10 ⁻⁷	9,98 × 10 ⁻⁷ (3,9)
RTO_K65R	dTTP	10,7 ± 0,9	5,8 ± 1,9	1,82 ± 0,60	
	dCTP	0,17 ± 0,02	9559 ± 1908	(1,7 ± 0,4) × 10 ⁻⁵	9,51 × 10 ⁻⁶ (8,0)
	dGTP	(3,1 ± 1,9) × 10 ⁻²	6452 ± 857	(4,8 ± 0,7) × 10 ⁻⁶	2,66 × 10 ⁻⁶ (3,9)
	dATP	(4,8 ± 0,1) × 10 ⁻³	3680 ± 178	(1,3 ± 0,1) × 10 ⁻⁶	7,09 × 10 ⁻⁷ (5,6)
RTO_	dTTP	12,7 ± 1,3	13,3 ± 3,7	0,95 ± 0,28	

K65R/V75I	dCTP	$(3,3 \pm 0,3) \times 10^{-2}$	5686 ± 995	$(5,8 \pm 1,1) \times 10^{-6}$	$6,06 \times 10^{-6}$ (12,5)
	dGTP	$0,11 \pm 0,02$	13430 ± 4605	$(8,3 \pm 3,3) \times 10^{-6}$	$8,70 \times 10^{-6}$ (1,2)
	dATP	$(3,3 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	5290 ± 553	$(6,2 \pm 0,7) \times 10^{-7}$	$6,52 \times 10^{-7}$ (6,0)

^a Datos para RTO_WT y RTO_V75I tomados de Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884.

^b El valor de eficiencia de incorporación errónea (f_{inc}) se define como:

- 5 $f_{inc} = [k_{pol}(incorrecto)/K_d(incorrecto) / k_{pol}(correcto)/K_d(correcto)]$, donde los nucleótidos incorrectos fueron dCTP, dGTP o dATP, mientras que el nucleótido correcto fue dTTP. Los números entre paréntesis representan el aumento relativo de fidelidad obtenido para cada nucleótido incorrecto, a partir de la expresión: f_{inc} (RTO_WT) / f_{inc} (RT mutante).

10

Tabla 3. Parámetros cinéticos de extensión de extremos desapareados sobre el complejo molde-iniciador 31T/21P para la RT del VIH-1 grupo O "wild-type" (RTO_WT) y los mutantes K65R (RTO_K65R), K65R/V75I (RTO_K65R/V75I) y

15 V75I (RTO_V75I), determinados en el estado pre-estacionario.

Enzima	Par de bases en posición 3'	k_{pol} (s ⁻¹)	K_d (μM)	k_{pol}/K_d (μM ⁻¹ •s ⁻¹)	Eficiencia de extensión de extremos desapareados (f_{ext}) ^b
RTO_WT ^a	G:C	$14,7 \pm 1,0$	$11,8 \pm 2,9$	$1,25 \pm 0,32$	
	G:T	$7,6 \pm 0,9$	2638 ± 785	$(2,9 \pm 0,9) \times 10^{-3}$	$2,30 \times 10^{-3}$
	G:G	$0,56 \pm 0,07$	1132 ± 316	$(4,9 \pm 1,5) \times 10^{-4}$	$3,95 \times 10^{-4}$
	G:A	$(2,1 \pm 0,3) \times 10^{-2}$	7817 ± 2334	$(2,7 \pm 0,9) \times 10^{-6}$	$2,17 \times 10^{-6}$
RTO_V75I ^a	G:C	$13,9 \pm 1,2$	$14,6 \pm 4,3$	$0,96 \pm 0,30$	
	G:T	$2,8 \pm 0,2$	4400 ± 789	$(6,3 \pm 1,2) \times 10^{-4}$	$6,56 \times 10^{-4}$ (3,5)
	G:G	$0,32 \pm 0,01$	2426 ± 178	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$1,39 \times 10^{-4}$ (2,8)
	G:A	$(6,8 \pm 0,8) \times 10^{-3}$	12110 ± 2536	$(5,6 \pm 1,3) \times 10^{-7}$	$5,86 \times 10^{-7}$ (3,7)
RTO_K65R	G:C	$10,7 \pm 0,9$	$5,8 \pm 1,9$	$1,82 \pm 0,60$	
	G:T	$3,1 \pm 0,5$	2214 ± 1058	$(1,4 \pm 0,7) \times 10^{-3}$	$7,80 \times 10^{-4}$ (2,9)
	G:G	$0,19 \pm 0,02$	$1416 \pm 328,4$	$(1,3 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$7,25 \times 10^{-5}$ (5,4)
	G:A	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^{-2}$	15180 ± 4239	$(8,7 \pm 2,9) \times 10^{-7}$	$4,78 \times 10^{-7}$ (4,5)
RTO_	G:C	$12,7 \pm 1,3$	$13,3 \pm 3,7$	$0,95 \pm 0,28$	

K65R/V75I	G:T	$2,4 \pm 0,2$	10450 ± 1644	$(2,3 \pm 0,4) \times 10^{-4}$	$2,43 \times 10^{-4}$ (9,5)
	G:G	$(8,7 \pm 0,9) \times 10^{-2}$	5213 ± 1096	$(1,7 \pm 0,4) \times 10^{-5}$	$1,77 \times 10^{-5}$ (22,3)
	G:A	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	3578 ± 786	$(3,9 \pm 0,9) \times 10^{-7}$	$4,15 \times 10^{-7}$ (5,2)

^a Datos para RTO_WT y RTO_V75I tomados de Álvarez *et al. J Mol Biol* 2009; 392: 872-884.

^b El valor de eficiencia de extensión de extremos desapareados (f_{ext}) se define como:

$f_{\text{ext}} = [k_{\text{pol}}(\text{desapareado})/K_{\text{d}}(\text{desapareado}) / k_{\text{pol}}(\text{apareado})/K_{\text{d}}(\text{apareado})]$, donde los pares de bases desapareados fueron G:T, G:G y G:A, mientras que el par correctamente apareado fue G:C. Los números entre paréntesis representan el aumento relativo de fidelidad obtenido para cada par de bases, a partir de la

10 expresión: $f_{\text{ext}}(\text{RTO_WT}) / f_{\text{ext}}(\text{RT mutante})$.

REIVINDICACIONES

1. Retrotranscriptasa aislada de un virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 de grupo O y modificada para que comprenda una secuencia de aminoácidos en la que el residuo que corresponde a la posición 65 de la SEQ ID NO: 1 está sustituido por una arginina o por otro aminoácido que suponga una sustitución conservativa respecto a la arginina.
2. Retrotranscriptasa según la reivindicación 1, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 70% con la SEQ ID NO: 1.
3. Retrotranscriptasa según la reivindicación 2, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 80% con la SEQ ID NO: 1.
4. Retrotranscriptasa según la reivindicación 3, donde la secuencia de aminoácidos presenta una identidad de, al menos, un 90% con la SEQ ID NO: 1.
5. Retrotranscriptasa según las reivindicaciones 1 a 4, donde la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 2.
6. Retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la secuencia de aminoácidos además tiene otra sustitución del residuo que corresponde a la posición 75 de la SEQ ID NO: 1 por una isoleucina o por otro aminoácido que suponga una sustitución conservativa respecto a la isoleucina.
7. Retrotranscriptasa según la reivindicación 6, donde la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 3.

8. Polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de una retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Vector que comprende el polinucleótido según la reivindicación 8.
10. Vector según la reivindicación 9, donde el polinucleótido 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.
11. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 donde el polinucleótido está unido en fase de lectura a una secuencia que codifica para una etiqueta de purificación.
12. Vector según la reivindicación 11 donde la etiqueta de purificación consiste en una cola de residuos de histidina.
13. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que además comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz de realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos de una retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 entre, o alrededor de, los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.
14. Célula que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12.

15. Célula según la reivindicación 14, que además comprende otro vector que comprende un polinucleótido que codifica para una proteasa capaz realizar un corte endoproteolítico en la secuencia de aminoácidos de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 entre o alrededor de los residuos que corresponden a las posiciones 440 y 441 de la SEQ ID NO: 1.

16. Célula que comprende el vector según la reivindicación 13.

17. Método para producir la secuencia de aminoácidos de una retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:

- a) cultivar la célula según cualquiera de las reivindicaciones 14, 15 ó 16, y
- b) aislar la secuencia de aminoácidos de la retrotranscriptasa expresada en el paso (a) por dicha célula.

18. Método para producir la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende:

- a) cultivar la célula según cualquiera de las reivindicaciones 14, 15 ó 16, y
- b) aislar la retrotranscriptasa expresada en el paso (a) por dicha célula.

19. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la retrotranscripción de un ácido nucleico molde.

20. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la amplificación de un ácido nucleico molde.

21. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la secuenciación de un ácido nucleico molde.
22. Uso de la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 donde el ácido nucleico molde es ARNm.
23. 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 7, e
 - b) incubar la mezcla del paso (a) en condiciones que permitan la síntesis de ADN complementario al ácido nucleico molde.
24. 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 7 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.
25. 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 7,
 - 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.

26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25 donde el ácido nucleico molde es ARNm.
27. Kit que comprende:
- a) la retrotranscriptasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, 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.
28. Uso de un kit según la reivindicación 27, para la retrotranscripción, la amplificación o la secuenciación de un ácido nucleico molde.
29. Uso de un kit según la reivindicación 28 donde el ácido nucleico es ARN mensajero.

FIG. 1

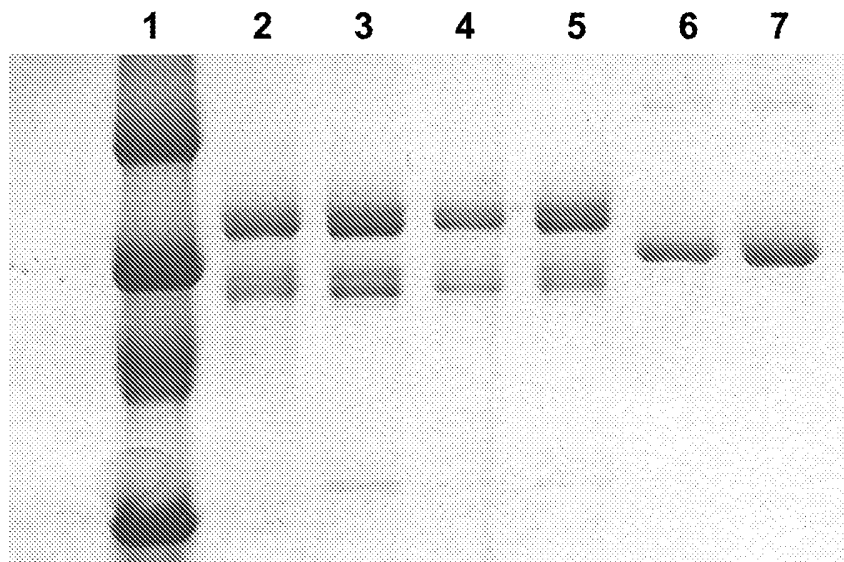


FIG. 2

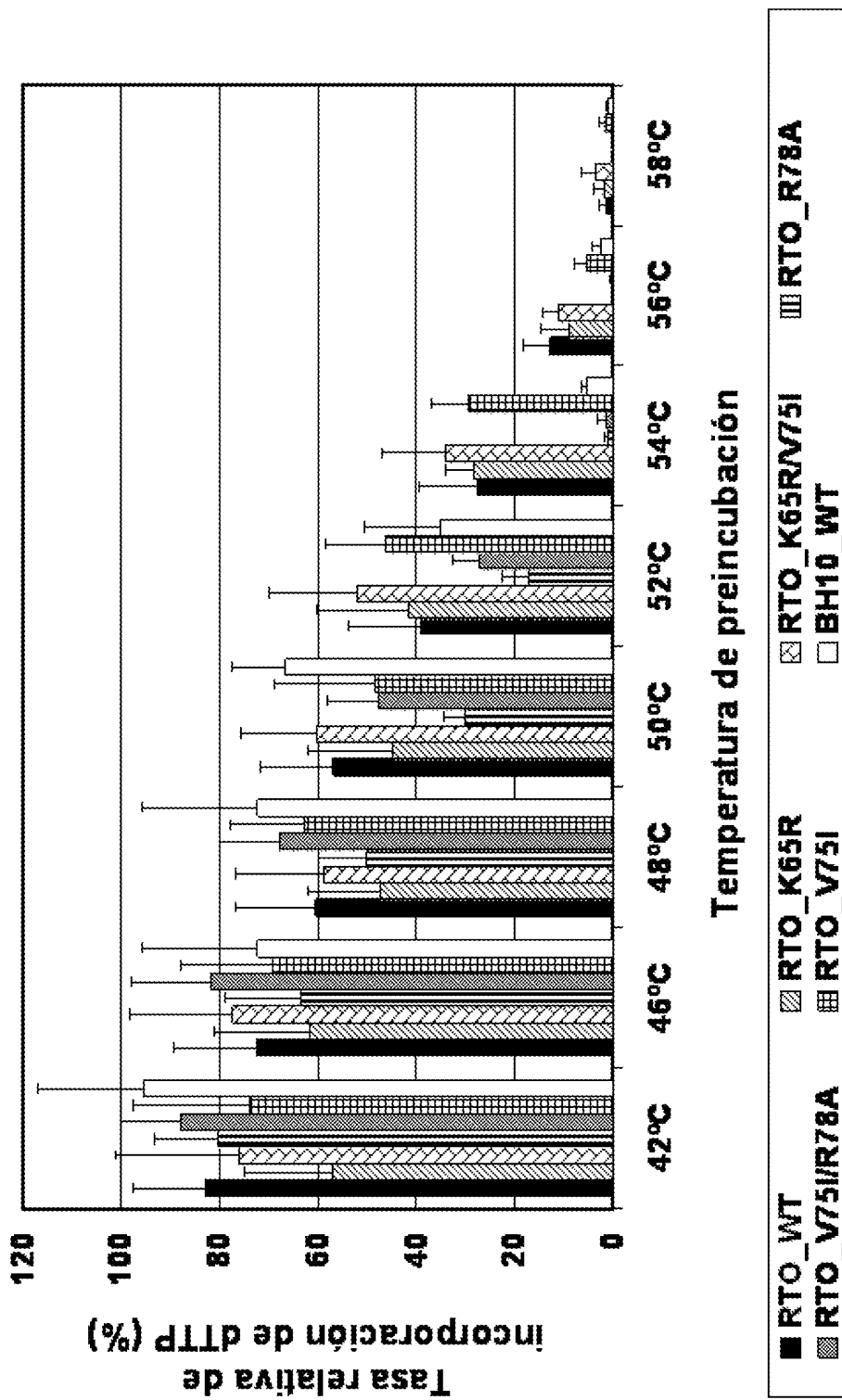


FIG. 3 A

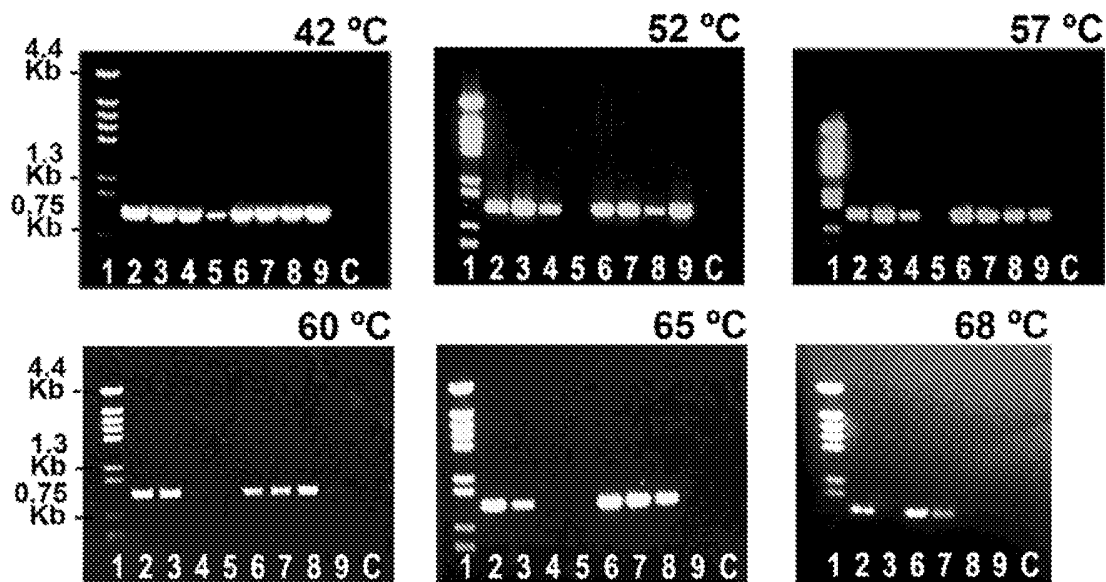


FIG 3 B

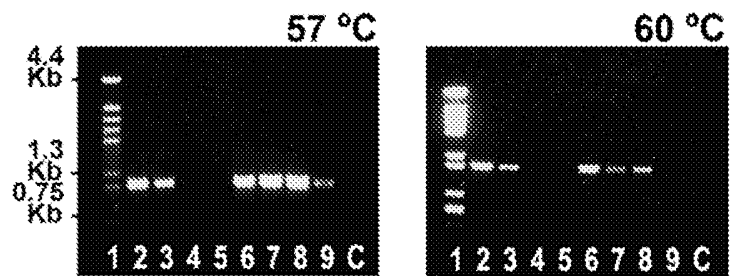
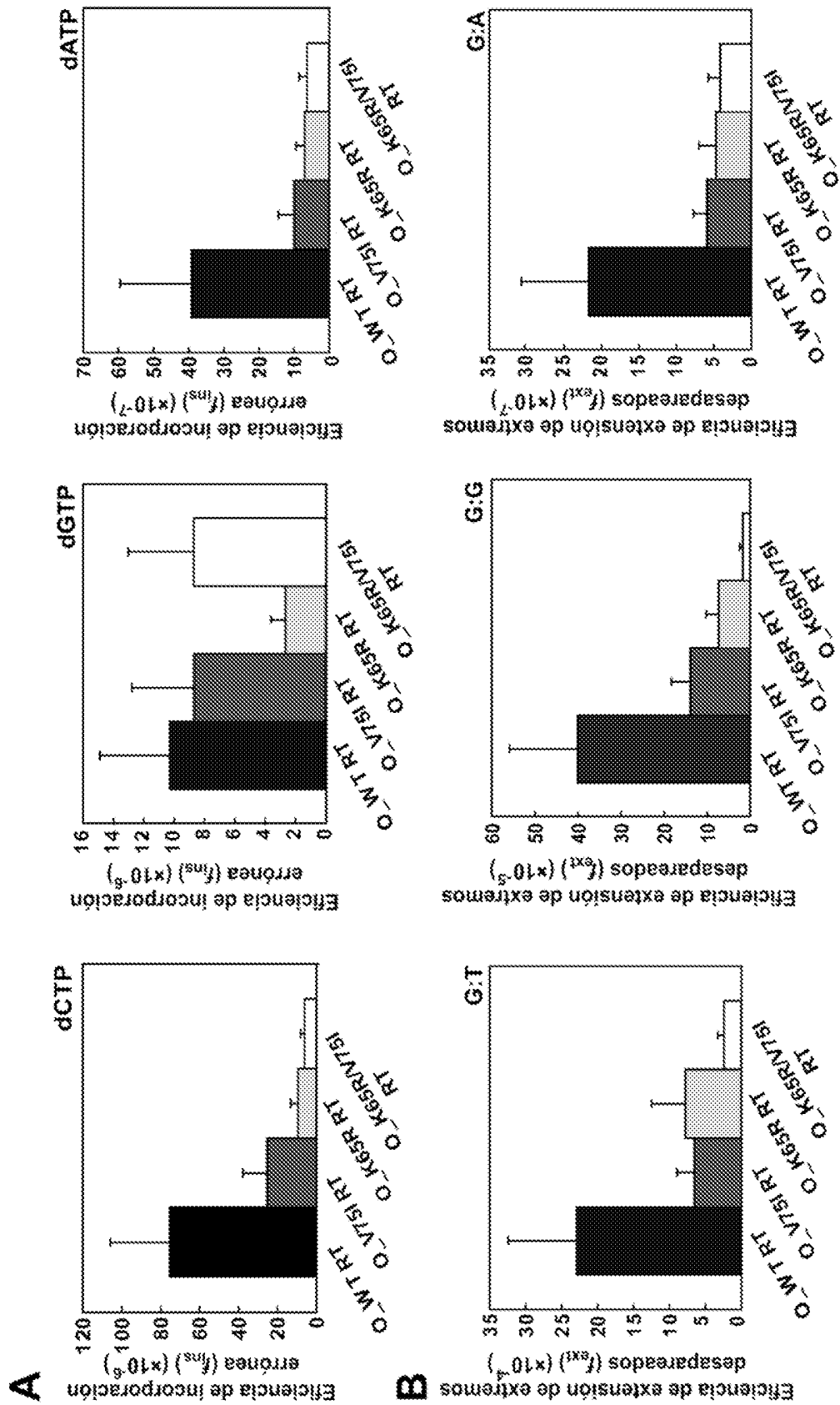


FIG. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070801

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N9/12 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

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)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, XPESP, XPESP2, XPOAC, XPSRNG, UniProt, aaGeneSeq, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents, PDB

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BARRIOLUENGO, V., ÁLVAREZ, M., BARBIERI, D., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Thermostable HIV-1 group O reverse transcriptase variants with the same fidelity as murine leukaemia virus reverse transcriptase. The Biochemical journal. June 2011, Vol. 436, N° 3, pages 599-607. ISSN 1470-8728. <Doi: 10.1042/BJ20101852>	1-29
P,X	BARRIOLUENGO, V., ÁLVAREZ, M., BARBIERI, D., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Influencia de los cambios de aminoácido K56R, V75I y R78A en la fidelidad de copia y termoestabilidad de la retrotranscriptasa del VIH-1 de grupo O. XI Congreso Nacional de Virología. Granada 29 of May-1 of June. Online [Retrieved 22.03.2012] Retrieved from internet: < http://www.cbm.uam.es/sev/14-1/SParalela%28I%29.pdf >	1-29

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
28/03/2012

Date of mailing of the international search report
(10/04/2012)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
E. Relaño Reyes

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498504

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070801

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GARFORTH, S. J., DOMAOAL, R. A., LWATULA, C. et al. K65R and K65A Substitutions in HIV-1 reverse transcriptase enhance polymerase fidelity by decreasing both dNTP misinsertion and mispaired primer extension efficiencies. <i>Journal of Molecular Biology</i> . August 2010, Vol 401, N° 1, pages 33-44. ISSN 0022-2836. <doi:10.1016/j.jmb.2010.06.001>	1-5, 8-29
A		6, 7
Y	QUIÑONES-MATEU, M. E., SORIANO, V., DOMINGO, E., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Characterization of the reverse transcriptase of a human immunodeficiency virus type 1 group O isolate. <i>Virology</i> . September 1997, Vol. 236, N° 2, pages 364-373. ISSN 0042-6822. <Doi:10.1006/viro.1997.8748>	1-29
A		6, 7
A	WO 2010/130864 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)) 18.11.2010, the whole document.	1-4, 6-29
A	ÁLVAREZ, M., MATAMOROS, T., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Increased thermostability and fidelity of DNA synthesis of wild-type and mutant HIV-1 group O reverse transcriptases. <i>Journal of Molecular Biology</i> . October 2009, Vol. 392, N° 4, pages 872 - 884. ISSN 1089-8638. <Doi:10.1016/j.jmb.2009.07.081>	1, 6-29
A	MATAMOROS, T., KIM, B., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Mechanistic insights into the role of Val75 of HIV-1 reverse transcriptase in misinsertion and mispair extension fidelity of DNA synthesis. <i>Journal of Molecular Biology</i> . November 2007, Vol. 375, N° 5, pages 1234-1248. ISSN 0022-2836. <Doi:10.1016/j.jmb.2007.11.021>	6-29
A	SHAH, F. S., CURR, K. A., HAMBURGH, M. E. et al. Differential influence of nucleoside analog-resistance mutations K65R and L74V on the overall mutation rate and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> . September 2000, Vol. 275, N° 35, pages 27037-27044. ISSN 1359-6535.	1, 8-12, 14, 17-29
A	DAS, K., BANDWAR, R. P., WHINE, K. L. et al. Structural basis for the role of the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase polymerization, excision antagonism, and tenofovir resistance. <i>Journal of Biological Chemistry</i> . December 2009, Vol. 284, N° 50, pages 35092-35100. ISSN 1083-351X.	1, 8-12, 14, 17-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070801

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010/130864 A1 -----	18.11.2010 -----	ES 2358824 A1,B -----	16.05.2011 -----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070801

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/12 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

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)

EPODOC, INVENES, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, COMPDX, NPL, XPESP, XPESP2, XPOAC, XPSRNG, UniProt, aaGeneSeq, Euro Patents, Japan Patents, Korea Patents, US Patents, PDB

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	BARRIOLUENGO, V., ÁLVAREZ, M., BARBIERI, D., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Thermostable HIV-1 group O reverse transcriptase variants with the same fidelity as murine leukaemia virus reverse transcriptase. The Biochemical Journal. Junio 2011, Vol. 436, Nº 3, páginas 599-607. ISSN 1470-8728. <Doi: 10.1042/BJ20101852>	1-29
P,X	BARRIOLUENGO, V., ÁLVAREZ, M., BARBIERI, D., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Influencia de los cambios de aminoácido K56R, V75I y R78A en la fidelidad de copia y termoestabilidad de la retrotranscriptasa del VIH-1 de grupo O. XI Congreso Nacional de Virología. Granada 29 de Mayo-1 de Junio. [en línea] [recuperado el 22.03.2012] Recuperado de Internet: < http://www.cbm.uam.es/sev/14-1/SParalela%28I%29.pdf >	1-29

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"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).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"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.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"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.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
28/03/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
10 de abril de 2012 (10/04/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
E. Relaño Reyes

Nº de teléfono 91 3498504

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2011/070801

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
Y	GARFORTH, S. J., DOMAOAL, R. A., LWATULA, C. et al. K65R and K65A substitutions in HIV-1 reverse transcriptase enhance polymerase fidelity by decreasing both dNTP misinsertion and mispaired primer extension efficiencies. <i>Journal of Molecular Biology</i> . Agosto 2010, Vol. 401, N° 1, páginas 33-44. ISSN 0022-2836. <Doi:10.1016/j.jmb.2010.06.001>	1-5, 8-29
A		6, 7
Y	QUIÑONES-MATEU, M. E., SORIANO, V., DOMINGO, E., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Characterization of the reverse transcriptase of a human immunodeficiency virus Type 1 Group O isolate. <i>Virology</i> . Septiembre 1997, Vol. 236, N° 2, páginas 364-373. ISSN 0042-6822. <Doi:10.1006/viro.1997.8748>	1-5, 8-29
A		6, 7
A	WO 2010/130864 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)) 18.11.2010, todo el documento.	1-4, 6-29
A	ÁLVAREZ, M., MATAMOROS, T., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Increased thermostability and fidelity of DNA synthesis of wild-type and mutant HIV-1 group O reverse transcriptases. <i>Journal of Molecular Biology</i> . Octubre 2009, Vol. 392, N° 4, páginas 872-884. ISSN 1089-8638. <Doi:10.1016/j.jmb.2009.07.081>	1, 6-29
A	MATAMOROS, T., KIM, B., MENÉNDEZ-ARIAS, L. Mechanistic insights into the role of Val75 of HIV-1 reverse transcriptase in misinsertion and mispair extension fidelity of DNA synthesis. <i>Journal of Molecular Biology</i> . Noviembre 2008, Vol. 375, N° 5, páginas 1234-1248. ISSN 0022-2836. <Doi:10.1016/j.jmb.2007.11.021>	6-29
A	SHAH, F. S., CURR, K. A., HAMBURGH, M. E. et al. Differential influence of nucleoside analog-resistance mutations K65R and L74V on the overall mutation rate and error specificity of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> . Septiembre 2000, Vol. 275, N° 35, páginas 27037-27044. ISSN 1359-6535.	1, 8-12, 14, 17-29
A	DAS, K., BANDWAR, R. P., WHINE, K. L. et al. Structural basis for the role of the K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase polymerization, excision antagonism, and tenofovir resistance. <i>Journal of Biological Chemistry</i> . Diciembre 2009, Vol. 284, N° 50, páginas 35092 - 35100. ISSN 1083-351X.	1, 8-12, 14, 17-29

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2011/070801

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2010/130864 A1	18.11.2010	ES 2358824 A1,B	16.05.2011
