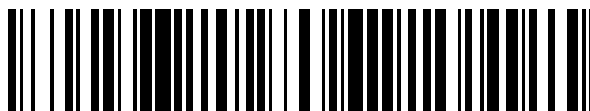


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 568**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2008 PCT/EP2008/050778**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2008 WO08090185**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2008 E 08701654 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2126137**

54 Título: **Método para diseñar un régimen farmacológico para pacientes infectados con el VIH**

30 Prioridad:

**23.01.2007 EP 07101037
15.02.2007 EP 07102423**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.10.2017

73 Titular/es:

**JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE**

72 Inventor/es:

**VAN BAELEN, KURT;
STUYVER, LIEVEN JOZEF y
ARIËN, KEVIN KAREL FLORENTINA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 639 568 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para diseñar un régimen farmacológico para pacientes infectados con el VIH

Millones y millones de personas se han infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH"), el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida ("SIDA"), desde principios de los años 80. El VIH/SIDA es ahora la causa principal de muerte en el África subsahariana, y es el cuarto asesino más importante a nivel mundial. Al final de 2001, aproximadamente 40 millones de personas vivían con el VIH a nivel global.

Actualmente, se usan cinco clases de fármacos antirretrovirales para tratar la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), es decir, inhibidores de la proteasa (PIs), dos clases de inhibidores de la transcriptasa inversa (inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos, abreviados como N-RTI, e inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos, abreviados como NN-RTI), inhibidores de la entrada (inhibidores de la fusión (FIs) y antagonistas correceptores), e inhibidores de la integrasa (INIs). Los inhibidores de la integrasa son una nueva clase prometedora de antirretrovirales que interfieren con la replicación del VIH al bloquear la capacidad del virus para integrarse en el material genético de células humanas.

Los fármacos anti-VIH modernos se dirigen a diferentes etapas del ciclo de vida del VIH y a una variedad de enzimas esenciales para la replicación y/o supervivencia del VIH. Entre los fármacos que se han aprobado hasta ahora para la terapia contra el SIDA están los inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos ("NRTIs") tales como AZT, ddl, ddC, d4T, 3TC, y abacavir; inhibidores de la transcriptasa inversa nucleotídicos, tales como tenofovir; inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos ("NNRTIs"), tales como nevirapina, efavirenz, y delavirdina; inhibidores de la proteasa ("PIs"), tales como darunavir, saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir y atazanavir; inhibidores de la fusión, tales como enfuvirtida, antagonistas correceptores tales como maraviroc, e inhibidores de la integrasa tales como raltegravir.

No obstante, en la inmensa mayoría de sujetos, ninguno de los fármacos antivirales actualmente aprobados, ya sea solos o en combinación, demuestra ser eficaz para prevenir la progresión eventual de infección crónica por VIH a SIDA, o para tratar SIDA agudo. Este fenómeno es debido, en parte, a la velocidad elevada de mutación del VIH y a la aparición rápida de VIH mutante que es resistente a sustancias terapéuticas antivirales al administrar tales fármacos a individuos infectados.

La proteína de la integrasa representa así una diana interesante para la investigación de inhibidores del VIH. La integrasa del VIH es necesaria para la integración del genoma vírico en el genoma de la célula hospedante, una etapa en el ciclo replicativo del virus. La integrasa del VIH es una proteína de alrededor de 32 KDa codificada por el gen *pol*, y es producida *in vivo* mediante escisión por proteasas de la proteína precursora de gag-pol durante la producción de partículas virales. El proceso de integración tiene lugar tras la transcripción inversa del ARN viral. En primer lugar, la integrasa viral se une al ADN viral y elimina dos nucleótidos del extremo 3' de las secuencias de repetición terminal larga (LTR) viral en cada hebra. Esta etapa se denomina procesamiento del extremo 3', y ocurre en el citoplasma en un complejo nucleoproteico denominado el complejo pre-integración (PIC). En segundo lugar, en un proceso denominado transferencia de hebra, las dos hebras del ADN celular en el que se insertará el ADN viral, el ADN diana, se escinden de una manera escalonada. Los extremos 3' del ADN viral se ligan a los extremos 5' del ADN diana escindido. Finalmente, las enzimas del hospedante probablemente reparan los espacios vacíos que quedan.

Al incrementar el número de compuestos anti-VIH disponibles como se mencionó anteriormente, aumentará continuamente el número de protocolos de tratamiento potenciales para pacientes infectados con el VIH. Muchos de los compuestos actualmente disponibles se administran como parte de una terapia de combinación. La elevada complejidad de las opciones de tratamiento, acoplado con la capacidad del virus para desarrollar resistencia a inhibidores del VIH, requiere la evaluación frecuente de las estrategias de tratamiento. La capacidad para monitorizar de forma exacta la capacidad replicativa del virus en pacientes con un régimen farmacológico, y para usar esos datos para modificar las dosis o combinaciones de inhibidores, permite a los médicos reducir eficazmente la formación de virus resistente al fármaco y proporcionar un tratamiento óptimo, personalizado para cada paciente.

En consecuencia, a medida que existen nuevos fármacos que se dirigen a nuevos polipéptidos del VIH, son muy necesarios los ensayos fenotípicos y genotípicos para determinar la resistencia o susceptibilidad del VIH que infecta a un paciente a tales nuevos fármacos anti-VIH.

Aunque los ensayos de fenotipado y de genotipado se han desarrollado y comercializado para genes de transcriptasa inversa y de proteasa, los protocolos y ensayos para la evaluación de la resistencia farmacéutica frente al gen de la integrasa no se han desarrollado con éxito.

Por ejemplo, el amplicón usado en el Antivirogram[®] comercializado contiene los sitios de escisión de gag (p1/p7 y p1/p6), secuencias codificantes de PR (codón 1-99) y de RT (codón 1-400) respectivamente, dejando sin detectar al resto del gen de transcriptasa inversa del VIH relevante, y de forma más importante, al gen de la integrasa del VIH.

D1 (Fikkert et al, J. of Virol 77, p 11459-11470, 2003) describe un método para la identificación de mutaciones en la región codificante de la integrasa. En esta referencia, solamente se ha amplificado la secuencia codificante de la

integrasa.

5 La actual descripción describe un nuevo ensayo de genotipo y fenotipo para elucidar y/o evaluar nuevos inhibidores de la integrasa del VIH, pero también compuestos actualmente aprobados y experimentales que se dirigen contra la maduración, proteasa, transcriptasa inversa, y ARNasaH. Este ensayo permite estudiar mutaciones enlazadas y patrones mutacionales que ocurren bajo las terapias de HAART y experimentales. La selección de los cebadores usados para la preparación del amplicón apropiado es debida a mutaciones y patrones mutacionales presentes en la secuencia del VIH, de la máxima importancia para desarrollar además un ensayo de genotipo y de fenotipo fiable y sensible.

10 En contraste con el amplicón mencionado anteriormente como se usa en el Antivirogram, el amplicón descrito en la actual invención y denominado fragmento de 5' LTR-Vif contiene la región codificante de gag completa y de pol completa (PR-RT-INT) (4588 pb en HXB2D, número de acceso de GenBank K03455).

Gag es una proteína del antígeno específico de grupo, que codifica las proteínas de la cápside estructurales. Las proteínas se producen como una poliproteína precursora de GAG, que es procesada por la proteasa viral.

15 Otros amplicones usados en la actual invención son el amplicón que abarca los sitios de escisión de Gag p1/p7 y p1/p6, PR, RT, ARNasaH e INT (3202 pb), denominado como el fragmento de Pol, el amplicón que contiene la secuencia codificante de Gag y PR (1980 pb), denominado como fragmento de Gag-PR, y el amplicón que contiene la secuencia codificante completa de RT, ARNasaH e INT (2898 pb), denominado fragmento de RT-INT.

La presente descripción comprende un método in vitro para diseñar un régimen farmacológico para un paciente infectado por VIH determinando la susceptibilidad fenotípica al VIH a al menos un fármaco, que comprende:

20 i) usar al menos una muestra que comprende ARN de VIH procedente de un paciente, en el que la muestra comprende la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH;

25 ii) transcribir de forma inversa y amplificar el ARN de VIH con cebadores específicos para la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa para obtener al menos un amplicón que comprende la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa, en el que al menos un cebador se selecciona de SEQ ID NO: 4-7;

iii) generar un plásmido que comprende una secuencia de VIH de referencia con una supresión de la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa;

30 iv) preparar al menos un virus recombinante mediante recombinación o ligación entre al menos un amplicón obtenido en la etapa ii) y el plásmido que comprende la secuencia de VIH de referencia con una supresión de la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa obtenida en la etapa iii), y

v) monitorizar el al menos un virus recombinante en presencia del al menos un fármaco para determinar la susceptibilidad fenotípica de VIH a al menos un fármaco,

en el que dicha susceptibilidad se determina mediante la fitopatogenicidad de dicho virus recombinante a células, o determinando la capacidad replicativa de dicho virus recombinante en presencia de al menos un fármaco.

35 La descripción también comprende un método in vitro para diseñar un régimen farmacológico para un paciente infectado por VIH determinando la susceptibilidad fenotípica del VIH a al menos un fármaco, que comprende:

i) usar al menos una muestra que comprende ADN de VIH, en el que la muestra comprende la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa;

40 ii) amplificar el ADN de VIH con cebadores específicos para la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa para obtener al menos un amplicón que comprende la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa, en el que al menos un cebador se selecciona de SEQ ID NO: 4-7;

iii) generar un plásmido que comprende una secuencia de VIH de referencia con una supresión de la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa;

45 iv) preparar al menos un virus recombinante mediante recombinación o ligación entre al menos un amplicón obtenido en la etapa ii) y el plásmido que comprende la secuencia de VIH de referencia con una supresión de la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa obtenida en la etapa iii), y

v) monitorizar el al menos un virus recombinante en presencia del al menos un fármaco para determinar la susceptibilidad fenotípica de VIH a al menos un fármaco,

50 en el que dicha susceptibilidad se determina mediante la fitopatogenicidad de dicho virus recombinante a células, o determinando la capacidad replicativa de dicho virus recombinante en presencia de al menos un fármaco.

En la parte experimental se describen plásmidos, o algunas veces denominados vectores. La secuencia de VIH incorporada en el plásmido o vector se puede basar en la secuencia K03455. Se puede incorporar la secuencia de VIH completa, o solamente una parte de la misma. Un esqueleto plasmídico adecuado se puede seleccionar del grupo que incluye pUC, pSV o pGEM.

- 5 Para preparar un vector que contiene la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH recombinante, el ARN de transcriptasa inversa-integrasa derivado del paciente se transcribe de forma inversa y se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), después se inserta en un vector que contiene la secuencia genómica de VIH de tipo salvaje, pero que carece de la región codificante de transcriptasa inversa-integrasa. Inicialmente se usaron diferentes combinaciones de cebadores para obtener las secuencias de ADN
10 amplificadas a partir de muestras de pacientes. Las secuencias de 5' a 3' y los cebadores identificados como SEQ ID NO: 4-7 usados con éxito para transcribir de forma inversa y amplificar mediante PCR la región codificante de transcriptasa inversa-integrasa se dan más abajo en la Tabla 7.

- 15 La transcripción inversa y la amplificación se pueden realizar con un único conjunto de cebadores. Como alternativa, se puede usar más de un conjunto de cebadores en un enfoque semianidado para transcribir de forma inversa y amplificar el material genético. Particularmente, en un enfoque anidado se usa más de un conjunto de cebadores. Tras la generación del constructo recombinante, el virus quimérico se puede hacer crecer, y el título viral se puede determinar (expresado como dosis infecciosa del 50% del cultivo celular, CCID50) antes de proceder a la determinación de la susceptibilidad fenotípica.

- 20 “Quimérico” significa un constructo que comprende material de ácido nucleico de diferente origen, tal como, por ejemplo, una combinación de VIH de tipo salvaje con un virus de VIH de laboratorio, una combinación de secuencia de VIH de tipo salvaje y una secuencia de VIH derivada de un paciente. El gen indicador, que codifica una señal indicativa de la replicación del virus en presencia de un fármaco, o indicativa de la susceptibilidad del virus en presencia de un fármaco, puede estar presente en las células que se cultivan, tales como células MT-4. Además,
25 dicho gen indicador se puede incorporar en el constructo quimérico introducido en las células que se cultivan, o se puede introducir de forma separada. Los genes indicadores adecuados codifican proteínas fluorescentes, particularmente proteína fluorescente verde (GFP) o mutantes de la misma, tal como eGFP (GFP potenciada).

El material genético se puede introducir en las células usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo precipitación con fosfato de calcio, liposomas, infección viral, y electroporación. La monitorización se puede llevar a cabo en rendimiento elevado.

- 30 Un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), como se usa aquí, se refiere a cualquier VIH, incluyendo cepas del VIH de laboratorio, cepas del VIH de tipo salvaje, cepas del VIH mutantes, y cualquier muestra biológica que comprenda VIH, tal como un aislado clínico de VIH. Las cepas del VIH compatibles con la presente invención son aquellas cepas capaces de infectar mamíferos, particularmente seres humanos, tales como VIH-1 y VIH-2. Un paciente puede tener VIH en su cuerpo con diferentes mutaciones en el gen de la integrasa (IN). Se ha de entender
35 que una muestra puede contener una variedad de diferentes VIH que contienen diferentes perfiles mutacionales en el gen de IN. Una muestra se puede obtener, por ejemplo, de un individuo, de cultivos celulares, o se puede generar usando tecnología recombinante, o clonación. Las cepas virales usadas para obtener un plásmido son preferiblemente secuencias de tipo salvaje del VIH, tales como LAI o HXB2D. LAI, también conocida como IIIB, es una cepa del VIH de tipo salvaje. Un clon particular de la misma, esto significa una secuencia, es HXB2D. Esta
40 secuencia se puede incorporar en un plásmido.

- En lugar de ARN viral, para los métodos descritos aquí se puede usar ADN de VIH, por ejemplo ADN proviral. En el caso de que se use ARN, es necesaria la transcripción inversa en ADN mediante una transcriptasa inversa adecuada. Los protocolos que describen el análisis del ARN también están abiertos al análisis del ADN. Sin embargo, si un protocolo comienza a partir de ADN, la persona experta en la técnica sabrá que no se necesita
45 ninguna transcripción inversa. Los cebadores diseñados para amplificar la hebra de ARN también se hibridan a y amplifican el ADN. La transcripción inversa y la amplificación también se pueden llevar a cabo con un único conjunto de cebadores. Adecuadamente, se puede usar un enfoque semianidado, y más adecuadamente un enfoque anidado, para transcribir de forma inversa y amplificar el material genético. El ácido nucleico se puede amplificar mediante técnicas tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación a base de secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación a base de transcripción (TAS), reacción en cadena de la ligasa (LCR). Preferiblemente se usa la reacción en cadena de la polimerasa.
50

- Se puede usar un tipo de muestra de paciente para obtener el gen de integrasa, tal como suero o tejido. El ARN viral se puede aislar usando métodos conocidos, como se describe en Boom, R. et al. (J. Clin. Microbiol. 28(3): 495-503 (1990)). Como alternativa, se puede usar un número de métodos comerciales, tales como el kit de ARN viral QIAAMP® (Qiagen, Inc.) o la plataforma de extracción de ARN EasyMag (Biomérieux, Boxtel, Países Bajos), para
55 obtener ARN viral de fluidos corporales tales como plasma, suero, o fluidos libres de células. El ADN se puede obtener mediante procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, Maniatis, 1989) y procedimientos comerciales (por ejemplo Qiagen).

“Amplicón” se refiere a la secuencia de transcriptasa inversa-integrasa amplificada y, cuando sea necesario,

transcrita de forma inversa.

Se debería entender que esta secuencia completa de transcriptasa inversa-integrasa puede ser de origen diverso, incluyendo plásmidos y material del paciente. Adecuadamente, el amplicón se obtiene de material del paciente.

5 Para los fines de la presente invención, el amplicón se denomina algunas veces como "constructo de ADN". Una secuencia viral puede contener una o múltiples mutaciones frente a la secuencia de referencia de consenso dada por HXB2D, número de acceso de GenBank K03455. Dicha secuencia, K03455, está presente en GenBank y está disponible a través de Internet. Una única mutación o una combinación de mutaciones se puede correlacionar con un cambio en la eficacia farmacéutica. Esta correlación puede ser indicativa de una susceptibilidad alterada, es decir, disminuida o incrementada, del virus para un fármaco. Dichas mutaciones también pueden influir en la capacidad de replicación.

10 Un "fármaco" significa cualquier agente, tal como una sustancia quimioterapéutica, péptido, anticuerpo, antisentido, ribozima, y cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de fármacos incluyen inhibidores de proteasa, incluyendo darunavir, ritonavir, amprenavir, nelfinavir; inhibidores de la transcriptasa inversa, tales como nevirapina, delavirdina, AZT, zidovudina, didanosina; inhibidores de la integrasa; agentes que interfieren con la cubierta (tal como T-20).

15 Tratamiento o régimen de tratamiento se refiere al manejo terapéutico de un individuo mediante la administración de fármacos. Para tratar a un individuo se pueden usar diferentes dosis de fármaco, esquemas de administración, vías de administración, y combinaciones.

20 Una alteración en la sensibilidad viral al fármaco se define como un cambio en la susceptibilidad de una cepa viral a dicho fármaco. La susceptibilidad se expresa generalmente como relaciones de valores de EC_{50} o EC_{90} (siendo el valor de EC_{50} o EC_{90} la concentración de fármaco a la que el 50% o 90% respectivamente de la población viral es inhibida de replicarse) de una cepa viral bajo investigación, en comparación con la cepa de tipo salvaje. Por tanto, la susceptibilidad de una cepa viral frente a cierto fármaco se puede expresar como un cambio en número de veces en la susceptibilidad, en el que el cambio en número de veces deriva de la relación de, por ejemplo, los valores de EC_{50} de la cepa viral mutante en comparación con los valores de EC_{50} de tipo salvaje. En particular, la susceptibilidad de una cepa o población viral también se puede expresar como resistencia de una cepa viral, en el que el resultado se indica como un incremento en número de veces en EC_{50} en comparación con EC_{50} de tipo salvaje.

La IC_{50} es la concentración de fármaco a la que se inhibe el 50% de la actividad enzimática.

30 La susceptibilidad del VIH a un fármaco se evalúa determinando la citopatogenicidad del virus recombinante para las células, o determinando la capacidad replicativa del virus recombinante en presencia de al menos un fármaco, con respecto a la capacidad replicativa de un VIH de tipo salvaje o de referencia.

35 En el contexto de esta invención, el efecto citopatogénico significa la viabilidad de las células en el cultivo en presencia de virus quiméricos. Las células se pueden escoger de células T, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células de Langerhans, células madre hematopoyéticas o células precursoras, células MT4 y células PM-1. La citopatogenicidad se puede seguir, por ejemplo, microscópicamente, o la replicación se puede monitorizar mediante la presencia de cualquier molécula informadora, incluyendo genes informadores. Un gen informador se define como un gen cuyo producto tiene capacidades informadoras. Las moléculas informadoras adecuadas incluyen sales de tetrazolio, proteínas fluorescentes verdes, beta-galactosidasa, cloranfenicol transferasa, fosfatasa alcalina, y luciferasa. En la bibliografía se describen varios métodos de evaluación citopatogénica, incluyendo evaluación fenotípica, que comprenden el ensayo de virus recombinante (Kellam y Larder, Antimicrob. Agents Chemotherap. 1994, 38, 23-30, Hertogens et al. Antimicrob. Agents Chemotherap. 1998, 42, 269-276; Pauwels et al. J. Virol Methods 1988, 20, 309-321).

45 La susceptibilidad del VIH a un fármaco también se puede determinar mediante la capacidad replicativa del virus recombinante en presencia de al menos un fármaco, con respecto a la capacidad replicativa de un VIH de referencia o de tipo salvaje. La capacidad replicativa significa la capacidad del virus o constructo quimérico para crecer bajo condiciones de cultivo. Esto se denomina algunas veces como capacidad de replicación. Las condiciones de cultivo pueden contener inductores que influyen en el crecimiento del virus, cuyos ejemplos son los fármacos. Los métodos para determinar la susceptibilidad pueden ser útiles para diseñar un régimen de tratamiento para un paciente infectado con el VIH. Por ejemplo, un método puede comprender determinar la capacidad replicativa de un aislado clínico de un paciente, y usar dicha capacidad replicativa para determinar un régimen farmacológico apropiado para el paciente.

50 Los ensayos de fenotipado de la presente invención se pueden llevar a cabo con un rendimiento elevado usando, por ejemplo, una placa de microtitulación que contiene una variedad de fármacos anti-VIH. Los presentes ensayos se pueden usar para analizar la influencia de los cambios en el gen de gag-pol del VIH a cualquier tipo de fármaco útil para tratar VIH. Los ejemplos de fármacos anti-VIH que se pueden evaluar en este ensayo incluyen inhibidores nucleosídicos y no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores nucleotídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la maduración, inhibidores de ARNasaH e inhibidores de la integrasa, pero aquellos expertos en la técnica apreciarán que también se pueden evaluar otros tipos de compuestos antivirales. Los

resultados se pueden monitorizar mediante varios enfoques, incluyendo, pero sin limitarse a, cribado de la morfología, microscopía, y métodos ópticos, tales como, por ejemplo, absorbancia y fluorescencia. En estos ensayos se puede obtener un valor de IC_{50} para cada fármaco, y se puede usar para determinar la capacidad replicativa viral en presencia del fármaco. Aparte de la IC_{50} , también se puede usar, por ejemplo, IC_{90} . La capacidad replicativa de los virus se puede combinar con la de un virus de VIH de tipo salvaje para determinar un valor de la capacidad replicativa relativo. Los datos procedentes de los ensayos fenotípicos se pueden usar posteriormente para predecir el comportamiento de un aislado de VIH particular frente a un fármaco dado en base a su genotipo.

Los ensayos de la presente invención se pueden usar para monitorización de fármacos terapéuticos. Dicho enfoque incluye una combinación de evaluación de la susceptibilidad, determinación del nivel de fármaco, y cálculo de un umbral. Dicho umbral se puede derivar a partir de un modelización farmacocinética a base de población (documento WO 02/23186). El umbral es una concentración de fármaco necesaria para obtener un efecto terapéutico beneficioso *in vivo*. El nivel de fármaco *in vivo* se puede determinar usando técnicas tales como cromatografía de líquidos de altas prestaciones, cromatografía de líquidos, espectrometría de masas, o combinaciones de las mismas. La susceptibilidad del virus se puede derivar de fenotipado o interpretación de los resultados del genotipado, es decir, fenotipado virtual (documento WO 01/79540).

Los ensayos de la presente invención pueden ser útiles para discriminar un fármaco eficaz de un fármaco ineficaz al establecer cortes, es decir, cortes biológicos (véase, por ejemplo, el documento WO 02/33402). Un corte biológico es específico del fármaco. Estos cortes se determinan tras fenotipar una gran población de individuos que contienen virus de tipo salvaje. El corte se deriva de la distribución del incremento en número de veces en la resistencia del virus para un fármaco particular.

El genotipo de la región codificante de gag-pol derivada del paciente se puede determinar directamente a partir del ADN amplificado, es decir, el constructo de ADN, llevando a cabo la secuenciación del ADN. Como alternativa, la secuencia se puede obtener tras la subclonación en un vector adecuado. En este proceso se puede usar una variedad de enzimas y equipo de secuenciación comerciales. La eficiencia se puede incrementar determinando la secuencia de la región codificante de gag-pol en varias reacciones paralelas, cada una con un conjunto diferente de cebadores. Tal proceso se podría llevar a cabo con un gran rendimiento sobre una placa de múltiples pocillos, por ejemplo. Se pueden usar sistemas de detección y análisis comercialmente disponibles para determinar y almacenar la información de secuencia para un análisis posterior.

La secuencia nucleotídica se puede obtener usando varios enfoques, incluyendo secuenciación de ácidos nucleicos. Esta secuenciación se puede llevar a cabo usando técnicas que incluyen enfoques a base de gel, espectrometría de masas e hibridación. Sin embargo, a medida que se identifican más mutaciones relacionadas con la resistencia, se puede obtener la secuencia en ácidos nucleicos, codones o secuencias cortas particulares. Si se conoce una mutación asociada a una resistencia particular, la secuencia nucleotídica se puede determinar usando ensayos de hibridación (incluyendo biomatrices, ensayo LipA), espectrometría de masas, PCR específica de los alelos, o usando sondas o cebadores que discriminan entre la secuencia mutante y la de tipo salvaje. Un conjunto selecto de cebadores de secuenciación incluye SEQ ID Nos: 11-44 y 55-58 respectivamente (Tabla 10). Esta selección particular tiene la ventaja de que permite la secuenciación de la secuencia codificante de gag-pol de VIH completa. En consecuencia, usando este conjunto de cebadores, se pueden detectar todas las posibles mutaciones que pueden aparecer en el gen de gag o pol del VIH.

El genotipo de gag-pol del paciente proporciona un medio adicional para determinar la susceptibilidad al fármaco de una cepa vírica. El fenotipado es un proceso largo que requiere a menudo 2 o más semanas para lograrlo. Por lo tanto, se han desarrollado sistemas que permiten la predicción del fenotipo basado en los resultados genotípicos. Los resultados del genotipado se pueden interpretar junto con el fenotipado, y eventualmente se pueden someter a interrogación en bases de datos. Un sistema adecuado es el fenotipado virtual (documento WO 01/79540). En el proceso de fenotipado virtual, se pueden usar los genes de gag-pol completos. Como alternativa, se pueden usar porciones de los genes. También se pueden usar combinaciones de mutaciones, preferentemente mutaciones indicativas de un cambio en la susceptibilidad del fármaco. Una combinación de mutaciones se denomina a veces como un punto caliente (véase, por ejemplo, el documento WO 01/79540). De forma breve, en el proceso de fenotipado virtual, el genotipo de una secuencia de gag-pol derivada de un paciente se puede correlacionar con la respuesta fenotípica de dicha secuencia de gag-pol derivada del paciente. Si no se lleva a cabo el fenotipado, la secuencia se puede cribar frente a una colección de secuencias presentes en una base de datos. Se pueden recuperar secuencias idénticas, y la base de datos se interroga posteriormente para identificar si se conoce un fenotipo correspondiente para cualquiera de las secuencias recuperadas. En este último caso, se puede determinar un fenotipo virtual. Se puede preparar un informe que incluye la IC_{50} de la cepa viral para una o más terapias, la secuencia de la cepa bajo investigación, y los cortes biológicos.

Según los métodos descritos aquí, se puede construir una base de datos que comprende datos genotípicos y fenotípicos de las secuencias de gag-pol del VIH, en el que la base de datos proporciona además una correlación entre genotipos y fenotipos, en el que la correlación es indicativa de la eficacia de un régimen farmacológico dado. Una base de datos de secuencias de gag-pol se puede crear y usar como se describe en el documento WO 01/79540. Por ejemplo, tal base de datos se puede analizar en combinación con la información de la secuencia de gag, pol, proteasa, transcriptasa inversa, o integrasa, y los resultados se pueden usar en la determinación de

estrategias de tratamiento apropiadas. Dicha base de datos que contiene una colección de genotipos, fenotipos y muestras para las que están disponibles el genotipo/fenotipo combinado, se puede usar para determinar el fenotipo virtual (véase más arriba). Además, en lugar de interrogar las secuencias de gag-pol completas, en tales bases de datos se pueden interrogar codones particulares que se correlacionan con un cambio en la susceptibilidad del virus al fármaco.

Un cebador se puede escoger de SEQ ID N° 1-10, 53 y 54. Un conjunto particular de cebadores es SEQ ID 1-4 y 53 y 54. Para llevar a cabo el ensayo según la invención, se describen cebadores específicos para la región de gag-pol del genoma del VIH, tales como los cebadores descritos aquí, y sus homólogos. Las secuencias de cebadores enumeradas aquí se pueden marcar. De forma adecuada, este marcador se puede detectar usando fluorescencia, luminiscencia o absorbancia. El cebador para crear un constructo de supresión puede contener una porción que no se hibride a una secuencia del VIH. Esa porción se puede usar para introducir un sitio de restricción único. De forma interesante, se pueden diseñar cebadores en los que el sitio de restricción único está parcialmente presente en la secuencia del VIH. Los cebadores se escogen de aquellos enumerados aquí, o tienen al menos 80% de homología según se determina mediante métodos conocidos por el experto en la técnica, tales como BLAST o FASTA. Específicamente, la homología es al menos 90%, más específicamente, al menos 95%. Además, los cebadores situados en la región de 50 nucleótidos (nt) en dirección 5' o en dirección 3' de las secuencias dadas aquí constituyen parte de la invención. Especialmente, dicha región está 20 nucleótidos en dirección 5' o en dirección 3' de la posición en el genoma del VIH de las secuencias cebadoras dadas aquí. Como alternativa, los cebadores que comprenden al menos 8 bases consecutivas presentes en cualquiera de los cebadores descritos aquí constituyen una realización de la invención. De forma interesante, los cebadores comprenden al menos 12 bases consecutivas presentes en cualquiera de los cebadores descritos aquí.

Ejemplos

Resumen general

Se generó un amplicón a partir de ARN viral de plasma derivado del paciente, mediante RT-PCR y PCR anidada. Este amplicón, denominado posteriormente como fragmento de 5'LTR-Vif, contiene la región codificante de Gag completa y de Pol completa (PR-RT-INT) (4588 pb). Las secuencias de cebadores a lo largo del extremo 5' del VIH-1 permiten la determinación de la secuencia nucleotídica y al análisis genotípico de la resistencia a fármacos.

Se obtuvo un esqueleto de delta[Gag-Pol] (SEQ ID NO: 49) partiendo de un vector de VIH-1 que contiene eGFP en la región codificante de Nef. La clonación in vitro (usando BD In-Fusion™, Clontech Laboratories Inc.) entre el amplicón generado mediante PCR y el esqueleto de delta[Gag-Pol] dio como resultado un VIH-1 totalmente competente en la replicación que se usó en experimentos para evaluar la resistencia fenotípica a fármacos.

Además, un amplicón que abarca los sitios de escisión de Gag p1/p7 y p1/p6, PR, RT, ARNasaH e INT (3202 pb), denominado como fragmento de Pol, se evaluó junto con un amplicón que contiene la secuencia codificante de Gag y PR (1980 pb) denominado como fragmento de Gag-PR, y un amplicón que contiene la secuencia codificante de RT, ARNasaH e INT completa (2898 pb), denominado fragmento de RT-INT.

Para la evaluación fenotípica, se diseñaron respectivamente los esqueletos de VIH-1 delta[Pol] (SEQ ID NO: 52), delta[Gag-PR] (SEQ ID NO: 50) y delta[RT-INT] (SEQ ID NO: 51), que también contienen eGFP (proteína fluorescente verde potenciada) en Nef.

Protocolo para la amplificación del fragmento de 5'LTR-VIF

Partiendo de ARN recientemente preparado, derivado de un paciente, se mezclaron 5 µl con 0,2 µM de cebador externo directo (5LTR_IF1 = SEQ ID NO: 1) y 0,2 µM de cebador externo inverso (VIF_R2 = SEQ ID NO: 2), amortiguador de reacción Superscript™ 1x (que contiene 0,4 mM de cada dNTP y 2,5 mM de MgSO₄) y 0,5 µl de mezcla enzimática Superscript™ III HIFI, en un volumen total de 25 µl (Tabla 1). La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo a 53°C durante 30 min., seguido de una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min. A esto le siguió 30 ciclos de [desnaturalización a 92°C durante 15 s, hibridación a 55°C durante 30 s, y elongación a 68°C durante 5 min.]. La etapa de elongación final fue 10 min. a 68°C (Tabla 2).

Subsiguientemente, se mezcló 1 µl de producto de la PCR externa con 0,304 µM de cebador interno directo (5LTR_F2 = SEQ ID NO: 3) y 0,304 µM de cebador interno inverso (VIF_R5 = SEQ ID NO: 4), amortiguador de reacción Expand™ HIFI 1x, 0,2 µl de dNTPs (0,2 mM) y 0,3 µl de mezcla enzimática Expand™ HIFI (= 1,05 U) en un volumen total de 25 µl (Tabla 1).

La reacción de PCR interna consiste en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min., seguido de 35 ciclos de [desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 61°C durante 30 s, y elongación a 68°C durante 5 min.]. La etapa de elongación final fue 10 min. a 68°C (Tabla 2).

Todas las mezclas de reacción y muestras se mantuvieron en hielo durante la preparación. Los cebadores internos y externos usados para generar este amplicón se pueden encontrar en la Tabla 7.

ES 2 639 568 T3

Finalmente, se mezclaron 4 μl de producto de la PCR con 2 μl de colorante de carga, se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio para la visualización.

Tabla 1: Composición de la mezcla de RT-PCR externa y de la mezcla de PCR interna para la amplificación del fragmento de 5'LTR-VIF.

Mezcla de RT-PCR externa	
componente	volumen/muestra (μl)
Agua DEPC	6,5
Amortiguador de reacción 2 x	12,5
Cebador 5LTR_IF1 (20 μM)	0,25
Cebador VIF_R2 (20 μM)	0,25
Superscript III HiFi	0,5
ARN	5
volumen total (μl)	25
Mezcla de PCR interna	
componente	volumen/muestra (μl)
Agua DEPC	20,24
Amortiguador de reacción 10 x	2,5
Cebador 5LTR_F2 (20 μM)	0,38
Cebador VIF_R5 (20 μM)	0,38
dNTP's (25 mM)	0,2
Expand HiFi (3,5 U/ μl)	0,3
Muestra OUT	1
volumen total (μl)	25

5

Tabla 2: Condiciones de ciclaje térmico para la PCR externa e interna para amplificación del fragmento de 5'LTR-VIF.

Fragmento de 5'LTR-VIF de PCR externa				Fragmento de 5'LTR-VIF de PCR interna			
etapa	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	tiempo	ciclos	etapa	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	tiempo	ciclos
1	53	30 min		1	94	2 min	
2	94	2 min		2	94	15 s	35
3	92	15 s	30	3	61	30 s	
4	55	30 s		4	68	5 min	
5	68	5 min		5	68	10 min	
6	68	10 min		6	4	mantener	
7	4	mantener					

ES 2 639 568 T3

Protocolo para la amplificación del fragmento de Pol

5 Partiendo de ARN recientemente preparado derivado de un paciente, se mezclaron 5 μl con 0,2 μM de cebador externo directo (5'OUT = SEQ ID NO: 53) y 0,2 μM de cebador externo inverso (VIF_R2 = SEQ ID NO: 2), amortiguador de reacción Superscript™ 1x (que contiene 0,4 mM de cada dNTP y 2,5 mM de MgSO_4) y 0,5 μl de mezcla enzimática Superscript™ III HIFI, en un volumen total de 25 μl (Tabla 12). La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo a 53°C durante 30 min., seguido de una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min. Esto fue seguido de 30 ciclos de [desnaturalización a 92°C durante 15 s, hibridación a 55°C durante 30 s, y elongación a 68°C durante 3 min. 30 s]. La etapa de elongación final fue 10 min. a 68°C (Tabla 13).

10 Subsiguientemente, se mezcló 1 μl de producto de la PCR externa con 0,304 μM de cebador interno directo (5'IN = SEQ ID NO: 54) y 0,304 μM de cebador interno inverso (VIF_R5 = SEQ ID NO: 4), amortiguador de reacción Expand™ HIFI 1x, 0,2 μl de dNTPs (0,2 mM) y 0,3 μl de mezcla enzimática Expand™ HIFI (= 1,05 U) en un volumen total de 25 μl (Tabla 12).

15 La reacción de PCR interna consiste en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min., seguido de 35 ciclos de [desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 58°C durante 30 s, y elongación a 68°C durante 3 min. 30 s]. La etapa de elongación final fue 10 min. a 68°C (Tabla 13).

Todas las mezclas de reacción y muestras se mantuvieron en hielo durante la preparación. Los cebadores externos e internos usados para generar este amplicón se pueden encontrar en la Tabla 7.

Finalmente, se mezclaron 4 μl de producto de la PCR con 2 μl de colorante de carga, se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se tñeron con bromuro de etidio para la visualización.

20 Tabla 12: Composición de la mezcla de RT-PCR externa y de la mezcla de PCR interna para la amplificación del fragmento de Pol.

Mezcla de RT-PCR externa	
componente	volumen/muestra (μl)
Agua DEPC	6,5
Amortiguador de reacción 2 x	12,5
Cebador 5LTR_IF1 (20 μM)	0,25
Cebador VIF_R2 (20 μM)	0,25
Superscript III HiFi	0,5
ARN	5
volumen total (μl)	25
Mezcla de PCR interna	
componente	volumen/muestra (μl)
Agua DEPC	20,24
Amortiguador de reacción 10 x	2,5
Cebador 5LTR_F2 (20 μM)	0,38
Cebador VIF_R5 (20 μM)	0,38
dNTP's (25 mM)	0,2
Expand HiFi (3,5 U/ μl)	0,3
Muestra OUT	1
volumen total (μl)	25

Tabla 13: Condiciones de ciclaje térmico para la PCR externa e interna para amplificación del fragmento de Pol.

Fragmento de Pol de PCR externa				Fragmento de Pol de PCR interna			
etapa	temperatura (°C)	tiempo	ciclo	etapa	temperatura (°C)	tiempo	ciclos
1	53	30 min		1	94	2 min	
2	94	2 min		2	94	15 s	35
3	92	15 s	30	3	58	30 s	
4	55	30 s		4	68	3 min 30 s	
5	68	3 min 30 s		5	68	10 min	
6	68	10 min		6	4	mantener	
7	4	mantener					

Protocolo para la amplificación del fragmento de RT-INT

5 Partiendo de ARN recientemente preparado derivado de un paciente, se mezclaron 5 µl con 0,2 µM de cebador externo directo (PR_F1 = SEQ ID NO: 5) y 0,2 µM de cebador externo inverso (VIF_R3 = SEQ ID NO: 6), amortiguador de reacción Superscript™ 1x (que contiene 0,4 mM de cada dNTP y 2,5 mM de MgSO₄) y 0,5 µl de mezcla enzimática Superscript™ III HIFI, en un volumen total de 25 µl (Tabla 3). La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo a 56°C durante 30 min., seguido de una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min. Esto fue seguido de 30 ciclos de [desnaturalización a 92°C durante 15 s, hibridación a 62°C durante 30 s, y elongación a 68°C durante 3 min. 30 s]. La etapa de elongación final fue 10 min. a 68°C (Tabla 4).

10 Subsiguientemente, se mezcló 1 µl de producto de la PCR externa con 0,304 µM de cebador interno directo (PR_F3 = SEQ ID NO: 7) y 0,304 µM de cebador interno inverso (VIF_R5 = SEQ ID NO: 4), amortiguador de reacción Expand™ HIFI 1x, 0,2 µl de dNTPs (0,2 mM) y 0,3 µl de mezcla enzimática Expand™ HIFI (= 1,05 U) en un volumen total de 25 µl (Tabla 3).

15 La reacción de PCR interna consiste en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min., seguido de 35 ciclos de [desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 60°C durante 30 s, y elongación a 68°C durante 3 min.]. La etapa de elongación final fue 10 min. a 68°C (Tabla 4).

Todas las mezclas de reacción y muestras se mantuvieron en hielo durante la preparación. Los cebadores externos e internos usados para generar este amplicón se pueden encontrar en la Tabla 7.

20 Finalmente, se mezclaron 4 µl de producto de la PCR con 2 µl de colorante de carga, se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio para la visualización.

Tabla 3: Composición de la mezcla de RT-PCR externa y de la mezcla de PCR interna para la amplificación del fragmento de RT-INT.

Mezcla de RT-PCR externa	
componente	volumen/muestra (µl)
Agua DEPC	6,5
Amortiguador de reacción 2 x	12,5
PR_F1 (20 µM)	0,25
VIF_R3 (20 µM)	0,25
Superscript III HiFi	0,5
ARN	5
volumen total (µl)	25

Mezcla de PCR interna	
componente	volumen/muestra (μl)
Agua DEPC	20,24
Amortiguador de reacción 10 x	2,5
PR_F3 (20 μM)	0,38
VIF_R5 (20 μM)	0,38
dNTP's (25 mM)	0,2
Expand HiFi (3,5 U/μl)	0,3
Muestra OUT	1
volumen total (μl)	25

Tabla 4: Condiciones de ciclaje térmico para la PCR externa e interna para amplificación del fragmento de RT-INT.

Fragmento de RT-INT de PCR externa				Fragmento de RT-INT de PCR interna			
etapa	temperatura (°C)	tiempo	ciclos	etapa	temperatura (°C)	tiempo	ciclos
1	53	30 min		1	94	2 min	
2	94	2 min		2	94	15s	35
3	92	15s	30	3	60	30s	
4	55	30s		4	68	3 min	
5	68	3 min 30 s		5	68	10 min	
6	68	10 min		6	4	mantener	
7	4	mantener					

Protocolo para la amplificación del fragmento de GAG-PR

- 5 Partiendo de ARN recientemente preparado derivado de un paciente, se mezclaron 5 μl con 0,2 μM de cebador externo directo (EF1 = SEQ ID NO: 8) y 0,2 μM de cebador externo inverso (Gaprou-R3 = SEQ ID NO: 9), amortiguador de reacción Superscript™ 1x (que contiene 0,4 mM de cada dNTP y 2,5 mM de MgSO₄) y 0,5 μl de mezcla enzimática Superscript™ III HIFI, en un volumen total de 25 μl (Tabla 5). La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo a 53°C durante 30 min., seguido de una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min. Esto fue
- 10 seguido de 30 ciclos de [desnaturalización a 92°C durante 15 s, hibridación a 55°C durante 30 s, y elongación a 68°C durante 2 min. 30 s]. La etapa de elongación final fue 10 min. a 68°C (Tabla 6).

- Subsiguientemente, se mezcló 1 μl de producto de la PCR externa con 0,304 μM de cebador interno directo (5LTR_IF1 = SEQ ID NO:1) y 0,304 μM de cebador interno inverso (Gaprou-R1 = SEQ ID NO: 10), amortiguador de reacción Expand™ HIFI 1x, 0,2 μl de dNTPs (0,2 mM) y 0,3 μl de mezcla enzimática Expand™ HIFI (= 1,05 U) en un
- 15 volumen total de 25 μl (Tabla 5). La reacción de PCR interna consiste en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min., seguido de 35 ciclos de [desnaturalización a 94°C durante 15 s, hibridación a 60°C durante 30 s, y elongación a 72°C durante 2 min.]. La etapa de elongación final fue 10 min. a 72°C (Tabla 6).

Todas las mezclas de reacción y muestras se mantuvieron en hielo durante la preparación. Los cebadores externos e internos usados para generar este amplicón se pueden encontrar en la Tabla 7.

- 20 Finalmente, se mezclaron 4 μl de producto de la PCR con 2 μl de colorante de carga, se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio para la visualización.

ES 2 639 568 T3

Tabla 5: Composición de la mezcla de RT-PCR externa y de la mezcla de PCR interna para la amplificación del fragmento de GAG-PR.

Mezcla de RT-PCR externa	
componente	volumen/muestra (μl)
Agua DEPC	6,5
Amortiguador de reacción 10 x	12,5
EF1 (20 μM)	0,25
Gaprout-R3 (20 μM)	0,25
Superscript III HiFi	0,5
ARN	5
volumen total (μl)	25
Mezcla de PCR interna	
componente	volumen/muestra (μl)
Agua DEPC	20,24
Amortiguador de reacción 10 x	2,5
5LTR_IF1 (20 μM)	0,38
Gaprout-R1 (20 μM)	0,38
dNTP's (25 mM)	0,2
Expand HiFi (3,5 U/μl)	0,3
Muestra OUT	1
volumen total (μl)	25

Tabla 6: Condiciones de ciclaje térmico para la PCR externa e interna para amplificación del fragmento de GAG-PR.

Fragmento de Gag-PR de PCR externa				Fragmento de Gag-PR de PCR interna			
etapa	temperatura (°C)	tiempo	ciclos	etapa	temperatura (°C)	tiempo	ciclos
1	53	30 min		1	94	2 min	
2	94	2 min		2	94	15 s	35
3	92	15 s	30	3	60	30 s	
4	55	30 s		4	72	2 min	
5	68	2 min 30 s		5	72	10 min	
6	68	10 min		6	4	mantener	
7	4	mantener					

Tabla 7: Secuencias de cebadores de todos los cebadores de amplificación y su posición en la referencia HXB2.

nombre del cebador	secuencia del cebador de 5' a 3'	posición en HXB2
EF1	CAA GTA GTG TGT GCC CGT CTG T	550 - 571
5LTR_IF1	TGG AAA ATC TCT AGC AGT GGC G	619 - 640
5LTR_F2	TCT CTA GCA GTG GCG CCC GAA CA	626 - 648
PR_F1	CCC TCA AAT CAC TCT TTG GCA ACG AC	2252 - 2277
PR_F3	GCT CTA TTA GAT ACA GGA GCA GAT G	2316 - 2340
VIF_R2	AGT GGG ATG TGT ACT TCT GAA C	5195 - 5216
VIF_R3	CTC CTG TAT GCA GAC CCC AAT ATG	5243 - 5266
VIF_R5	GGG ATG TGT ACT TCT GAA CTT	5193 - 5213
Gaprout-R3	CCA TTG TTT AAC TTT TGG GCC ATC C	2597 - 2621
Gaprout-R1	CCA TTC CTG GCT TTA ATT TTA CTG G	2574 - 2598
5'OUT	GCC CCT AGG AAA AAG GGC TGT TGG	2008 - 2031
5'IN	CTA GGA AAA AGG GCT GTT GGA AAT G	2012 - 2036

SEC ID Nº 1: (5LTR_IF1) TGG AAA ATC TCT AGC AGT GGC G

SEC ID Nº 2: (VIF_R2) AGT GGG ATG TGT ACT TCT GAA C

5 SEC ID Nº 3: (5LTR_F2) TCT CTA GCA GTG GCG CCC GAA CA

SEC ID Nº 4: (VIF_R5) GGG ATG TGT ACT TCT GAA CTT

SEC ID Nº 5: (PR_F1) CCC TCA AAT CAC TCT TTG GCA ACG AC

SEC ID Nº 6: (VIF_R3) CTC CTG TAT GCA GAC CCC AAT ATG

SEC ID Nº 7: (PR_F3) GCT CTA TTA GAT ACA GGA GCA GAT G

10 SEC ID Nº 8: (EF1) CAA GTA GTG TGT GCC CGT CTG T

SEC ID Nº 9: (Gaprout-R3) CCA TTG TTT AAC TTT TGG GCC ATC C

SEC ID Nº 10: (Gaprout-R1) CCA TTC CTG GCT TTA ATT TTA CTG G

SEC ID Nº 53 (5'OUT) GCC CCT AGG AAA AAG GGC TGT TGG

SEC ID Nº 54 (5'IN) CTA GGA AAA AGG GCT GTT GGA AAT G

15 Protocolo de secuenciación para todos los fragmentos mencionados antes

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con el kit de secuenciación Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems). Cada mezcla de reacción (11,5 µl) contenía: el amplicón (1 µl), agua libre de ADNasa y ARNasa (3 µl), mezcla de terminador Big Dye (1 µl), cebador (4 µl, 4 µM), y amortiguador de dilución 1x (1,0 M de Tris HCl, 1,0 M de MgCl₂ y H₂O) (Tabla 8). Todos los cebadores usados para la secuenciación nucleotídica de los diferentes fragmentos se dan en la Tabla 10.

20 Las condiciones de la PCR fueron 25 ciclos de [10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C, y 4 minutos a 60°C], seguido de un mantenimiento final a 4°C y usando un ABI 9800 Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems) (Tabla 9).

25 La purificación de las mezclas de reacción de secuenciación se llevó a cabo usando el kit de purificación DyeEX (Qiagen), según el protocolo del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo usando un ABI3730 XL (Applied Biosystems), y las secuencias generadas se alinearon y se analizaron usando el software SeqScape v2.5 (Applied Biosystems).

Tabla 8: Composición de la mezcla de reacción de secuenciación.

composición de la mezcla para secuenciación	
componente	vol/muestra (μl)
Agua DEPC	3
Amortiguador de dilución 2,5x	2,5
Mezcla de terminador Big Dye	1
cebador (4 μM)	4
molde	1
volumen total (μl)	11,5

Tabla 9: Condiciones de ciclaje térmico para la reacción de secuenciación.

programa de ciclaje térmico			
etapa	temp.	tiempo	nº de ciclos
1	96°C	10 s	25
2	50°C	5 s	
3	60°C	4 min	
4	4°C	mantener	

5 Tabla 10: Secuencias de cebadores de todos los cebadores de secuenciación y su posición en la referencia HXB2.

	Nombre del cebador	Secuencia nucleotídica (5' → 3')	Posición en HXB2
Cebadores directos			
SEC ID Nº 11	5'LTR_F_631	AGCAGTGGCGCCCGAACAG	631-649
SEC ID Nº 12	F0 gag	TTTGACTAGCGGGAGGCTAGAAG	761-782
SEC ID Nº 13	GAG_F_1070	TAAAAGACACCAAGGAAGC	1070-1088
SEC ID Nº 14	F10 gag	AAGACACCAAGGAAGC	1073-1088
SEC ID Nº 15	F3 gag	CATAGCAGGAACTACTAGTA	1494-1513
SEC ID Nº 16	GAG_F_1602	TAAAATAGTAAGAATGTATAGCCC	1602-1625
SEC ID Nº 17	F5 gag	ATGACAGCATGTCAGGGAGT	1828-1847
SEC ID Nº 18	F1	GAGAGCTTCAGTTTGGGG	2170-2188
SEC ID Nº 19	F5	CACTCTTTGGCAACGACCC	2261-2279
SEC ID Nº 20	PR_F2376	TGGAAACCAAAAATGATAGG	2376-2395
SEC ID Nº 21	F2	AATTGGGCTGAAAATCC	2696-2713
SEC ID Nº 22	F3	CCTCCATTCTTTGGATGGG	3222-3241
SEC ID Nº 23	RT_F_3681	GAAAGCATAGTAATATGGG	3681-3699
SEC ID Nº 24	IN_F_4074	CAACCAGATAAAAAGTGAATCAG	4074-4095

ES 2 639 568 T3

SEC ID N° 25	IN-F-4540	TAGCAGGAAGATGGCCAGT	4540-4558
SEC ID N° 26	Inseq3F	GTAGACATAATAGCAACAGAC	4830-4850
SEC ID N° 55	F7	GTACTGGATGTGGGTGATGC	2871-2890
SEC ID N° 56	F8	GTGGGAAAATTGAATTGGG	3330-3348
SEC ID N° 57	F3771	GCCACCTGGATTCCTGAGTG	3771-3790
Cebadores inversos			
SEC ID N° 27	R8 gag	TCTTGTGGGGTGGCTCCTTC	1337-1318
SEC ID N° 28	GAG_R_1316	TCTTGTGGGGTGGCTCCTTCTG	1337-1316
SEC ID N° 29	R3 gag	TCTACATAGTCTCTAAAGGG	1682-1663
SEC ID N° 30	GAG_R_1825	ACTCCCTGACATGCTGTCATCAT	1847-1825
SEC ID N° 31	R7 gag	GTGGGGCTGTTGGCTCTGGT	2164-2145
SEC ID N° 32	PR_R_2382	ATTCCCCCTATCATTTTTGG	2401-2382
SEC ID N° 33	R8	GATAAAACCTCCAATTCC	2414-2397
SEC ID N° 34	R3	CTTCCCAGAAGTCTTGAGTTC	2817-2797
SEC ID N° 35	R6	GGAATATTGCTGGTGATCC	3030-3012
SEC ID N° 36	RT_R_3304	TGTATGTCATTGACAGTCC	3322-3304
SEC ID N° 37	R5	GGGTCATAATACACTCCATG	3511-3492
SEC ID N° 38	R1	CTCCCACTCAGGAATCC	3794-3778
SEC ID N° 39	RT_R_3964	CAGTCTTCTGATTTGTTG	3981-3964
SEC ID N° 40	RT_R_4150	CTTTGTGTGCTGGTACCCATG	4170-4150
SEC ID N° 41	RT_R_4380a	GGACTACAGTCTACTTGCCAATG	4402-4380
SEC ID N° 42	Inseq2R	CTGCCATTTGACTGCTGTC	4767-4748
SEC ID N° 43	IN_R_5042	ATCACCTGCCATCTGTTTTCCA	5063-5042
SEC ID N° 44	VIF_R_5193	ATGTGTA CTTCTGAACTT	5210-5193
SEC ID N° 58	IN_R_4348	CTCCTTTTAGCTGACATTTATCAC	4371-4348

Creación de un esqueleto de HXB2D_eGFP_delta[GAG-POL] (SEQ ID NO: 49)

Este esqueleto contiene todos los elementos genéticos del VIH-1, excepto la región de GAG y POL completa. La recombinación entre este esqueleto de supresión de GAG-POL y el amplicón de 5'LTR-VIF dio como resultado un vector viral de VIH-1 totalmente funcional, que se usó en experimentos de transfección/infección.

5

En primer lugar, pUC18 se digirió con las enzimas de restricción PstI y EcoRI. Subsiguientemente, se ligó un enlazador sintético de 35 pb, que contiene los sitios de restricción HpaI, SpeI, y Sall, en el plásmido pUC18 linealizado con PstI/EcoRI, creando pUC18-LINK. A continuación, HXB2D_eGFP (el vector original de VIH-1 totalmente competente en la replicación, que contiene eGFP en Nef) se digirió con HpaI y Sall (denominado vector C), cortando la parte de 5' del genoma del VIH-1 (5'LTR, GAG, POL, VIF) (desde el nucleótido 15223 hasta 5786, en comparación con la referencia HXB2), denominado fragmento A. El fragmento A se clonó entonces en el plásmido pUC18-LINK digerido con HpaI/Sall. Se diseñaron cebadores de la PCR que son complementarios a los extremos de 5' y 3' del amplicón de 5'LTR-Vif, y se usaron en una reacción de "PCR inversa" (iPCR) para "volver a crear" la secuencia nucleotídica que se eliminó en exceso durante la digestión con HpaI/Sall (es decir, la secuencia entre el sitio de unión al cebador y el sitio de restricción). Estos cebadores de la PCR inversa se extendieron con las

10

15

secuencias nucleotídicas de dos sitios de restricción (es decir, PaeI y SnaBI) para la linealización posterior del esqueleto. Finalmente, se llevó a cabo la digestión con HpaI/SalI sobre el producto de la iPCR, y el fragmento de HpaI/SalI cortado (fragmento B) se clonó nuevamente en el vector HXB2D-eGFP original digerido con HpaI/SalI (vector C) (véase la Figura 1, 2, 3).

5 Creación del esqueleto de HXB2D_eGFP_delta[POL] (SEQ ID NO: 52)

Este esqueleto contiene todos los elementos genéticos de VIH-1, excepto la región de Pol completa. La recombinación entre el esqueleto de supresión de Pol y el amplicón de Pol dio como resultado un vector viral de VIH-1 totalmente funcional, que se usó en experimentos de transfección/infección.

10 En primer lugar, pUC18 se digirió con las enzimas de restricción PstI y EcoRI. Subsiguientemente, se ligó un enlazador sintético de 35 pb, que contiene los sitios de restricción HpaI, SpeI, y SalI, en el plásmido pUC18 linealizado con PstI/EcoRI, creando pUC18-LINK. A continuación, HXB2D_eGFP (el vector original de VIH-1 totalmente competente en la replicación, que contiene eGFP en Nef) se digirió con HpaI y SalI (denominado vector C), cortando la parte de 5' del genoma del VIH-1 (5'LTR, GAG, POL, VIF) (desde el nucleótido 15223 hasta 5786, en comparación con la referencia HXB2), denominado fragmento A. El fragmento A se clonó entonces en el plásmido pUC18-LINK digerido con HpaI/SalI. Se diseñaron cebadores de la PCR que son complementarios a los extremos de 5' y 3' del amplicón de Pol, y se usaron en una reacción de "PCR inversa" (iPCR) para "volver a crear" la secuencia nucleotídica que se eliminó en exceso durante la digestión con HpaI/SalI (es decir, la secuencia entre el sitio de unión al cebador y el sitio de restricción). Estos cebadores de la PCR inversa se extendieron con las secuencias nucleotídicas de dos sitios de restricción (es decir, PaeI y SnaBI) para la linealización posterior del esqueleto. Finalmente, se llevó a cabo la digestión con HpaI/SalI sobre el producto de la iPCR, y el fragmento de HpaI/SalI cortado (fragmento P) se clonó nuevamente en el vector HXB2D-eGFP original digerido con HpaI/SalI (vector C) (véase la Figura 12 y 13).

15 Creación del esqueleto de HXB2D_eGFP_delta[RT-INT] (SEQ ID NO: 51)

25 Este esqueleto contiene todos los elementos genéticos de VIH-1, excepto la región de RT e INT completa. La recombinación entre el esqueleto de supresión de RT-INT y el amplicón de RT-INT dio como resultado un vector viral de VIH-1 totalmente funcional, que se usó en experimentos de transfección/infección.

30 En primer lugar, pUC18 se digirió con las enzimas de restricción PstI y EcoRI. Subsiguientemente, se ligó un enlazador sintético de 35 pb, que contiene los sitios de restricción HpaI, SpeI, y SalI, en el plásmido pUC18 linealizado con PstI/EcoRI, creando pUC18-LINK. A continuación, HXB2D_eGFP (el vector original de VIH-1 totalmente competente en la replicación, que contiene eGFP en Nef) se digirió con SpeI y SalI (denominado vector Z), cortando la mayoría de POL y de VIF del genoma del VIH-1 (desde el nucleótido 1507 hasta 5786, en comparación con la referencia HXB2), denominado fragmento X. El fragmento X se clonó entonces en el plásmido pUC18-LINK digerido con SpeI/SalI. Se diseñaron cebadores de la PCR que son complementarios a los extremos de 5' y 3' del amplicón de RT-INT, y se usaron en una reacción de "PCR inversa" (iPCR) para "volver a crear" la secuencia nucleotídica que se eliminó en exceso durante la digestión con SpeI/SalI (es decir, la secuencia entre el sitio de unión al cebador y el sitio de restricción).

35 Finalmente, se llevó a cabo la digestión con SpeI/SalI sobre el producto de la iPCR, y el fragmento de SpeI/SalI cortado (fragmento Y) se clonó nuevamente en el vector HXB2D-eGFP original digerido con SpeI/SalI (vector Z) (véase la Figura 4, 5, 6).

40 Creación del esqueleto de HXB2D_eGFP_delta[GAG-PR] (SEQ ID NO: 50)

Este esqueleto contiene todos los elementos genéticos de VIH-1, excepto la región de GAG y PR completa. La recombinación entre el esqueleto de supresión de GAG-PR y el amplicón de GAG-PR dio como resultado un vector viral de VIH-1 totalmente funcional, que se usó en experimentos de transfección/infección.

45 En primer lugar, pUC18 se digirió con las enzimas de restricción PstI y EcoRI. Subsiguientemente, se ligó un enlazador sintético de 35 pb, que contiene los sitios de restricción HpaI, SpeI, y SalI, en el plásmido pUC18 linealizado con PstI/EcoRI, creando pUC18-LINK. A continuación, HXB2D_eGFP (el vector original de VIH-1 totalmente competente en la replicación, que contiene eGFP en Nef) se digirió con HpaI y SalI (denominado vector C), cortando la parte de 5' del genoma del VIH-1 (5'LTR, GAG, POL, VIF) (desde el nucleótido 15223 hasta 5786, en comparación con la referencia HXB2), denominado fragmento A. El fragmento A se clonó entonces en el plásmido pUC18-LINK digerido con HpaI/SalI. Se diseñaron cebadores de la PCR que son complementarios a los extremos de 5' y 3' del amplicón de GAG-PR, y se usaron en una reacción de "PCR inversa" (iPCR) para "volver a crear" la secuencia nucleotídica que se eliminó en exceso durante la digestión con HpaI/SalI (es decir, la secuencia entre el sitio de unión al cebador y el sitio de restricción). Finalmente, se llevó a cabo la digestión con HpaI/SalI sobre el producto de la iPCR, y el fragmento de HpaI/SalI cortado (fragmento ALFA) se clonó nuevamente en el vector HXB2D-eGFP original digerido con HpaI/SalI (vector C) (véase la Figura 7, 8, 9).

55 Enfoque de ensayo fenotípico

Tras la linealización del esqueleto de HXB2D_eGFP_delta Gag-Pol, Gag-PR y RT-INT descrita anteriormente, el amplicón purificado respectivo se clonó en el esqueleto apropiado usando la tecnología In-Fusion™ (Clontech, Mountain view, California), y se transformó subsiguientemente en células MAX Efficiency® Stb12™ (Invitrogen, Merelbeke, Bélgica). Tras la preparación del ADN ya sea a partir de clones o de la placa completa, los genomas del VIH recombinantes de longitud completa se transfectaron a células MT4. A un CPE completo, los lotes de virus recombinante se cosecharon, se titularon y se sometieron a un experimento antiviral.

En la siguiente sección se describen los 3 ensayos de fenotipado (GAG-POL, GAG-PR y RT-INT). En la Figura 10 se muestra el diseño de los experimentos.

Los tres esqueletos, HXB2D_eGFP_delta [GAG-POL] (SEQ ID NO: 49), HXB2D_eGFP_delta [GAG-PR] (SEQ ID NO: 50) y HXB2D_eGFP_delta [RT-INT] (SEQ ID NO: 51), se linealizaron mediante digestión con SnaBI y PaeI. Tras la purificación, para cada esqueleto, se recombinaron 100 ng de vector linealizado con tres amplicones de la PCR diferentes (3x amplicones 5'LTR-VIF, 3x amplicones GAG-PR o 3x amplicones RT-INT) en una relación molar de vector/inserto de 1/10 usando reactivos In-Fusion. Después, las mezclas de In-Fusion se transformaron con células MAX Efficiency Stb12 y se incubaron durante 24 h a 30°C. El día después, las colonias se cribaron en busca de la presencia del plásmido recombinante total mediante una PCR de colonia dúplex usando los cebadores mostrados en la Tabla 11 (SEQ ID NOs: 45-48).

Como ejemplo, los recombinantes completos generaron dos fragmentos (493 pb y 217 pb), mientras que los vectores recircularizados que no contienen insertos, generaron solamente un fragmento (300 pb para delta_[GAG-POL], 200 pb para delta_[GAG-PR] y 500 pb para delta_[RT-INT]).

En general, los recombinantes del VIH de longitud completa se obtuvieron para todos los esqueletos y para todos los amplicones ensayados.

Para el ensayo de GAG-POL, se obtuvieron dos recombinantes completos para la muestra 1 y 2, y tres recombinantes para la muestra 3.

Para el esqueleto de GAG-PR, se generaron dos recombinantes para la muestra 1, un recombinante para la muestra 2, y ocho recombinantes para la muestra 3.

Para el esqueleto de RT-INT, se generaron cinco recombinantes completos para la muestra 1, siete recombinantes para la muestra 2, y dos para la muestra 3.

Todos los clones recombinantes (con un máximo de cinco por muestra) se hicieron crecer toda la noche en LB-ampicilina a 30°C para preparar ADN a partir de (27 en total). Se preparó ADN miniprep usando el miniprep Qiaprep Spin (Qiagen), y se comprobó mediante digestión con la enzima de restricción HindIII. Comparando el patrón de digestión con HindIII de los clones con el de los esqueletos de supresión y con el del vector HXB2D_eGFP parental de longitud completa, los 27 clones contenían genomas del VIH de longitud completa. Los 27 clones se transfectaron a células MT4 usando la técnica de nucleofección Amaxa, y se evaluaron para determinar su efecto citopático (CPE). En total, 18 clones alcanzaron un CPE completo (efecto citopatógeno) durante el tiempo de evaluación (11 días), y se usaron para experimentos de infección posteriores: 16 clones generaron CPE completo después de 4 días, 1 clon después de 5 días, y 1 clon después de 11 días. Los otros 9 clones no mostraron infección sustancial después de 11 días, y no se usaron para análisis posterior. Los 18 RVS (lotes de virus recombinante) cosechados se titularon y se sometieron a un experimento antiviral (AVE) a una MOI (multiplicidad de infección) estandarizada usando inhibidores de proteasa y de RT aprobados por la FDA, e inhibidores de la maduración (PA-457) y de la integrasa (GS-9137, L870.810 y L731.988) experimentales. Después de 3 días de infección, se cuantificaron las señales de infección de la GFP (proteína fluorescente verde), y se calcularon las curvas de respuesta frente a la dosis. Solamente 1 de 18 muestras no generó expresión significativa de GFP por encima del fondo; los otros 17 RVS se fenotiparon con éxito para todos los fármacos ensayados. Como ejemplo, la Figura 11 muestra las curvas de respuesta frente a la dosis de 1 RVS de GAG-POL para todos los fármacos ensayados.

Tabla 11: Secuencias de cebadores de los cebadores usados para la PCR de colonia, y su posición en la referencia HXB2.

nombre del cebador	secuencia del cebador de 5' a 3'	Posición en HXB2
SEC ID N° 45: HXB2_5LTR_F_422	CTG CAT ATA AGC AGC TGC TTT TTG	422-445
SEC ID N° 46: GAG_R_895	TCT AGC TCC CTG CTT GCC CA	895-914
SEC ID N° 47: IN_F_5052	ATG GCA GGT GAT GAT TGT GTG G	5052-5073
SEC ID N° 48: HXB2_VIF_R_5247	TTC TCC TGT ATG CAG ACC CCA A	5247-5268

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Virco BVBA
- <120> Método para diseñar un régimen farmacológico para pacientes infectados con el VIH
- <130> VIP 027 PCT
- <150> EP07101037.5
- 5 < 151> 2007-01-23
- <150> EP07102423.6
- < 151> 2007-02-15
- <160> 58
- <170> PatentIn version 3.3
- 10 <210> 1
- < 211> 22
- < 212> ADN
- < 213> Artificial
- <220>
- 15 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
- <400> 1
- tggaatatct cttagcagtgg cg 22
- <210> 2
- < 211> 22
- 20 < 212> ADN
- < 213> Artificial
- <220>
- < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
- <400> 2
- 25 agtgggatgt gtacttctga ac 22
- <210> 3
- < 211> 23
- < 212> ADN
- < 213> Artificial
- 30 <220>
- < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
- <400> 3
- tctctagcag tggcgcccga aca 23
- <210> 4
- 35 < 211> 21
- < 212> ADN
- < 213> Artificial

<220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 4
gggatgtgta cttctgaact t 21
5 <210> 5
< 211> 26
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
10 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 5
ccctcaaact actcttggc aacgac 26
<210> 6
< 211> 24
15 < 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 6
20 ctctgtatg cagaccccaa tatg 24
<210> 7
< 211> 25
< 212> ADN
< 213> Artificial
25 <220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 7
gctctattag atacaggagc agatg 25
<210> 8
30 < 211> 22
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
35 <400> 8
caagtagtgt gtgccgtct gt 22
<210> 9

< 211> 25
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
5 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 9
ccattgttta actttgggc catcc 25
<210> 10
< 211> 25
10 < 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 10
15 ccattcctgg cttaatttt actgg 25
<210> 11
< 211> 19
< 212> ADN
< 213> Artificial
20 <220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 11
agcagtggcg cccgaacag 19
<210> 12
25 < 211> 23
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
30 <400> 12
tttgactagc gggaggctag aag 23
<210> 13
< 211> 19
< 212> ADN
35 < 213> Artificial
<220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores

<400> 13
 taaaagacac caaggaagc 19
 <210> 14
 < 211> 16
 5 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 14
 10 aagacaccaa ggaagc 16
 <210> 15
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 15 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 15
 catagcagga actactagta 20
 <210> 16
 20 < 211> 24
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 25 <400> 16
 taaaatagta agaattgata gcc 24
 <210> 17
 < 211> 20
 < 212> ADN
 30 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 17
 atgacagcat gtcaggagat 20
 35 <210> 18
 < 211> 19
 < 212> ADN

< 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 18
 5 gagagctca ggttgggg 19
 <210> 19
 < 211> 19
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 10 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 19
 cactcttgg caacgacc 19
 <210> 20
 15 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 20 <400> 20
 tggaaccaa aaatgatagg 20
 <210> 21
 < 211> 18
 < 212> ADN
 25 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 21
 aattggcct gaaaatcc 18
 30 <210> 22
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 35 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 22
 cctccattcc tttgatggg 20

- <210> 23
< 211> 19
< 212> ADN
< 213> Artificial
- 5 <220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 23
gaaagcatag taatatggg 19
<210> 24
- 10 < 211> 22
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
- 15 <400> 24
caaccagata aaagtgaatc ag 22
<210> 25
< 211> 19
< 212> ADN
- 20 < 213> Artificial
<220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 25
tagcaggaag atggccagt 19
- 25 <210> 26
< 211> 21
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
- 30 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 26
gtagacataa tagcaacaga c 21
<210> 27
< 211> 20
- 35 < 212> ADN
< 213> Artificial
<220>

< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 27
 tcttggtggg tggctcctc 20
 <210> 28
 5 < 211> 22
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 10 <400> 28
 tcttggtggg tggctcctc tg 22
 <210> 29
 < 211> 20
 < 212> ADN
 15 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 29
 tctacatagt ctctaaagg 20
 20 <210> 30
 < 211> 23
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 25 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 30
 actccctgac atgctgtcat cat 23
 <210> 31
 < 211> 20
 30 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 31
 35 gtggggctgt tggctctggt 20
 <210> 32
 < 211> 20

< 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 5 <400> 32
 attcccccta tcattttgg 20
 <210> 33
 < 211> 18
 < 212> ADN
 10 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 33
 gataaaacct ccaattcc 18
 15 <210> 34
 < 211> 21
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 20 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 34
 ctcccagaa gtcttgagtt c 21
 <210> 35
 < 211> 19
 25 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 35
 30 ggaatattgc tggatgcc 19
 <210> 36
 < 211> 19
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 35 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 36

tgatgtcat tgacagtcc 19
 <210> 37
 < 211> 20
 < 212> ADN
 5 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 37
 ggtcataat acactccatg 20
 10 <210> 38
 < 211> 17
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 15 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 38
 ctcccactca ggaatcc 17
 <210> 39
 < 211> 18
 20 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 39
 25 cagtctctg attgttg 18
 <210> 40
 < 211> 21
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 30 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 40
 ctttgtgtgc tggtagccat g 21
 <210> 41
 35 < 211> 24
 < 212> ADN
 < 213> Artificial

<220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 41
 ggactacagt ctactgtcc aatg 24
 5 <210> 42
 < 211> 20
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 10 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 42
 ctgccattg tactgctgc 20
 <210> 43
 < 211> 22
 15 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 43
 20 atcacctgcc atctgtttc ca 22
 <210> 44
 < 211> 18
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 25 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 <400> 44
 atgtgtactt ctgaact 18
 <210> 45
 30 < 211> 24
 < 212> ADN
 < 213> Artificial
 <220>
 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
 35 <400> 45
 ctgcatataa gcagctgctt ttg 24
 <210> 46

- < 211> 20
- < 212> ADN
- < 213> Artificial
- <220>
- 5 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
- <400> 46
- tctagctccc tgctgcca 20
- <210> 47
- < 211> 22
- 10 < 212> ADN
- < 213> Artificial
- <220>
- < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
- <400> 47
- 15 atggcagtg atgattgtg gg 22
- <210> 48
- < 211> 22
- < 212> ADN
- < 213> Artificial
- 20 <220>
- < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
- <400> 48
- ttctcctgta tgcagacccc aa 22
- <210> 49
- 25 < 211> 10992
- < 212> ADN
- < 213> Artificial
- <220>
- < 223> Ácido nucleico de VIH-1 circular
- 30 <400> 49

ES 2 639 568 T3

tggaagggt aattcactcc caaagaagac aagatattct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tagcagaact acacaccagg gccagggtca gatatccact 120
gacctttgga tgggtgtaca agctagtacc agttgagcca gataaggtag aagaggccaa 180
taaaggagag aacaccagct tgttacacc tgtgagcctg catgggatgg atgaccgga 240
gagagaagtg ttagagtgga ggtttgacag ccgcctagca tttcatcacg tggcccgaga 300
gctgcatccg gagtacttca agaactgctg atatcgagct tgctacaagg gactttccgc 360
tggggacttt ccagggaggc gtggcctggg cgggactggg gagtggcgag ccctcagatc 420
ctgcatataa gcagctgctt ttgacctgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag 480
cctgggagct ctctggctaa ctaggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgcctt 540

ES 2 639 568 T3

gagtgcttca agtagtgtgt gcccgctctgt t gtgtgactc tggtaactag agatccctca	600
gaccctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagtggcgt taattaaccg tacgcgtact	660
acgtaagaag tacacatccc actaggggat gctagattgg taataacaac atattgggggt	720
ctgcatacag gagaagaga ctggcatttg ggtcagggag tctccataga atggaggaaa	780
aagagatata gcacacaagt agaccctgaa ctagcagacc aactaattca tctgtattac	840
tttgactgtt tttcagactc tgctataaga aaggccttat taggacacat agttagccct	900
aggtgtgaat atcaagcagg acataacaag gtaggatctc tacaatactt ggcactagca	960
gcat taataa caccaaaaa gataaagcca cctttgccta gtgttacgaa actgacagag	1020
gatagatgga acaagcccca gaagaccaag ggccacagag ggagccacac aatgaatgga	1080
cactagagct ttttagaggag cttagaatg aagctgttag acattttcct aggatttggc	1140
tccatggcct agggcaacat atctatgaaa cttatgggga tacttgggca ggagtggaag	1200
ccataataag aattctgcaa caactgctgt ttatccattt tcagaattgg gtgtcgacat	1260
agcagaatag gcgttactcg acagaggaga gcaagaaatg gagccagtag atcctagact	1320
agagccctgg aagcatccag gaagtcagcc taaaactgct tgtaccaatt gctattgtaa	1380
aaagtgttgc tttcattgcc aagtttgttt cataacaaaa gccttaggca tctcctatgg	1440
caggaagaag cggagacagc gacgaagagc tcatcagaac agtcagactc atcaagcttc	1500
tctatcaaa g cagtaagtag tacatgtaac gcaacctata ccaatagtag caatagtagc	1560
attagtagta gcaataataa tagcaatagt t gtgtggtcc atagtaatca tagaatatag	1620
gaaaatatta agacaagaa aaatagacag gttaattgat agactaatag aaagagcaga	1680
agacagtggc aatgagagtg aaggagaaat atcagcactt gtggagatgg gggtgagat	1740
ggggcaccat gctccttggg atgttgatga tctgtagtgc tacagaaaaa ttgtgggtca	1800
cagtctatta tggggtacct gtgtggaagg aagcaaccac cactctat tt tgtgcatcag	1860
atgctaaagc atatgataca gaggtacata atgtttgggc cacacatgcc tgtgtacca	1920
cagaccccaa cccacaagaa gtagtattgg taaatgtgac agaaaat ttt aacatgtgga	1980
aaaatgacat ggtagaacag atgcatgagg atataatcag tttatgggat caaagcctaa	2040
agccatgtgt aaaattaacc cactctgtg ttagtttaa gtgcactgat ttgaagaatg	2100
atactaatac caatagtagt agcgggagaa tgataatgga gaaaggagag ataaaaaact	2160
gctctttcaa tatcagcaca agcataagag gtaaggtgca gaaagaatat gcattttttt	2220
ataaacttga tataatacca atagataatg atactaccag ctataagttg acaagttgta	2280
acacctcagt cattacacag gcctgtccaa aggtatcctt tgagccaatt cccatacatt	2340
attgtgcccc ggctggtttt gcgattctaa aatgtaataa taagacgttc aatggaacag	2400
gaccatgtac aaatgtcagc acagtacaat gtacacatgg aattaggcca gtagtatcaa	2460
ctcaactgct gttaaatggc agtctagcag aagaagaggt agtaattaga tctgtcaatt	2520
tcacggacaa tgctaaaacc ataatagtac agctgaacac atctgtagaa attaattgta	2580
caagacccaa caacaataca agaaaaagaa tccgtatcca gagaggacca gggagagcat	2640

ES 2 639 568 T3

ttgttacaat aggaaaaata ggaatatga gacaagcaca ttgtaacatt agtagagcaa	2700
aatggaataa cactttaaaa cagatagcta gcaaattaag agaacaatth ggaataata	2760
aaacaataat ctttaagcaa tcctcaggag gggacccaga aattgtaacg cacagtttta	2820
attgtggagg ggaatthttc tactgtaatt caacacaact gtttaatagt acttggttta	2880
atagtacttg gagtactgaa ggtcaaaata aactggaagg aagtgcacaca atcacctcc	2940
catgcagaat aaaacaaatt ataaacatgt ggcagaaagt aggaaaagca atgtatgccc	3000
ctcccatcag tggacaaatt agatgttcat caaatattac agggctgcta ttaacaagag	3060
atgggtgtaa tagcaacaat gagtccgaga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg	3120
acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag	3180
caccaccaa ggcaagaga agagtgtgc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag	3240
ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgcagcg tcaatgacgc	3300
tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtgca gcagcagaac aatttgctga	3360
gggctattga ggcgcaacag catctgttg aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc	3420
aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg	3480
gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata	3540
aatctctgga acagatttgg aatcacacga cctggatgga gtgggacaga gaaattaaca	3600
attacacaag cttatacac tccttaattg aagaatcgca aaaccagcaa gaaaagaatg	3660
aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagtttgtg gaattggttt aacataacaa	3720
attggctgtg gtatataaaa ttattcataa tgatagtagg aggcttgga ggtttaagaa	3780
tagtttttgc tgtactttct atagtgaata gagttaggca gggatattca ccattatcgt	3840
ttcagacca cctccaacc ccgaggggac ccgacaggcc cgaaggaata gaagaagaag	3900
gtggagagag agacagagac agatccattc gattagttaa cggatcctta gcacttatct	3960
gggacgatct gcgagcctg tgcctcttca gctaccaccg cttgagagac ttactcttga	4020
ttgtaacgag gattgtgaa cttctgggac gcagggggtg ggaagccctc aaatattggt	4080
ggaatctcct acaatattgg agtcaggagc taaagaatag tgctgttagc ttgctcaatg	4140
ccacagccat agcagtagct gaggggacag atagggttat agaagtagta caaggagctt	4200
gtagagctat tcgccacata cctagaagaa taagacaggg cttggaagg attttgctat	4260
aagatgggtg gcgcgccgc aatggtgagc aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg	4320
cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag	4380
ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac caccggaag	4440
ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accctgacct acggcgtgca gtgcttcagc	4500
cgctaccctg accacatgaa gcagcagcag ttcttcaagt ccgccatgcc cgaaggctac	4560
gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagaccct cgcgaggtg	4620
aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga cttcaaggag	4680

ES 2 639 568 T3

```

gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa cgtctatatc 4740
atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gcgaacttca agatccgcca caacatcgag 4800
gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg cgacggcccc 4860
gtgctgtgctc cgcacaacca ctacctgagc acccagtcgg ccctgagcaa agaccccaac 4920
gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgcccggat cactctcggc 4980
atggacgagc tgtacaagta agaattctga ctcgagacct agaaaaacat ggagcaatca 5040
caagtagcaa tacagcagct accaatgctg attgtgcctg gctagaagca caagaggagg 5100
aggagggtggg ttttccagtc acacctcagg tacctttaag accaatgact tacaaggcag 5160
ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa aggggggact ggaagggcta attcactccc 5220
aacgaagaca agatattcct gatctgtgga tctaccacac acaaggctac ttccttgatt 5280
ggcagaacta cacaccaggg ccagggatca gatattcact gacctttgga tgggtgtaca 5340
agctagtacc agttgagcaa gagaaggtag aagaagccaa tgaaggagag aacacccgct 5400
tgttacaccc tgtgagcctg catgggatgg atgaccgga gagagaagta ttagagtgga 5460
ggtttgacag ccgcctagca tttcatcaca tggcccgaga gctgcatccg gagtacttca 5520
agaactgctg acatcgagct tgctacaagg gactttccgc tggggacttt ccagggaggc 5580
gtggcctggg cgggactggg gagtggcgag ccctcagatg ctgcatataa gcagctgctt 5640
tttgcttgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa 5700
ctagggaaac cactgcttaa gcctcaataa agcttgctt gagtgttca agtagtgtgt 5760
gcccgctgtg tgtgtgactc tggcgcgcct ctagaattaa ttccgtgtat tctatagtgt 5820
cacctaaatc gtatgtgtat gatacataag gttatgtatt aattgtagcc gcgttctaac 5880
gacaatatgt acaagcctaa ttgtgtagca tctggcttac tgaagcagac cctatcatct 5940
ctctcgtaaa ctgccgtcag agtcggtttg gttggacgaa ccttctgagt ttctggtaac 6000
gccgtcccgc acccggaaat ggtcagcga ccaatcagca gggtcacgc tagccagatc 6060
ctctacgccg gacgcatcgt ggcggcatc accggcgcca cagggtcggg tgctggcgcc 6120
tatatcgccg acatcaccga tggggaagat cgggctcgcc acttcgggct catgagcgct 6180
tgtttcggcg tgggtatggt ggcaggcccc gtggccgggg gactgttggg cgccatctcc 6240
ttgcatgcac cattccttgc ggcggcggtg ctcaacggcc tcaacctact actgggctgc 6300
ttcctaatgc aggagtgcga taaggagag cgtcgaatgg tgcactctca gtacaatctg 6360
ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgcca acacccgctg acgcgccctg 6420
acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg 6480
catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat 6540
acgcctatct ttataggtta atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt cagggtggcag 6600
ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatct ttctaaatac attcaaatat 6660
gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag 6720
tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc 6780

```


ES 2 639 568 T3

tgTTTTGct caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc	6840
acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc	6900
cgaagaacgt tttccaatga tgagactttt taaagtctg ctatgtggcg cggattatc	6960
ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt	7020
ggttgagtac tcaccagtca cagaaaaagca tcttacggat ggcattgacag taagagaatt	7080
atgcagtgct gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat	7140
cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgctt	7200
tgatcgttg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccagat	7260
gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc	7320
ttcccgcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg	7380
ctcggccctt ccggtggtt ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc	7440
tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tccggtatcg tagttatcta	7500
cacgacggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc	7560
ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga	7620
tttaaaactt cattttaat ttaaaaggat ctagtgaag atcctttttg ataatctcat	7680
gacaaaaac ccttaacgtg agttttcgtt cactgagcg tcagacccc tagaaaagat	7740
caaaggatct tcttgagatc cttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaa	7800
accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa	7860
ggttaactggc ttcagcagag cgagatacc aaatactgtt cttctagtgt agccgtagtt	7920
aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctggt	7980
accagtggct gctgccagt gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata	8040
gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggt tcgtgcacac agcccagctt	8100
ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggcac	8160
gcttccgaa gggagaaagg cggacaggt tccgtaagc ggcagggtcg gaacaggaga	8220
gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg	8280
ccacctctga cttgagcgtc gatTTTTgtg atgctcgtca gggggcgya gcctatggaa	8340
aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggcctt tgctggcctt ttgctcacat	8400
gttctttctt gcggtatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc	8460
tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcag tcagtgagcg aggaagcggg	8520
agagcgcca atacgaaac cgctctccc cgcgcttg ccgattcatt aatgcagctg	8580
tggaatgtgt gtcagttagg gtgtgaaag tcccaggct ccccagcagg cagaagtatg	8640
caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtcccagg ctcccagca	8700
ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gccctaact	8760
ccgccatcc cgcccctaac tccgccagt tccgccatt ctccgcccc tggtgacta	8820

ES 2 639 568 T3

```

atTTTTTTta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt ccagaagtag 8880
tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc ttggacacaa gacaggcttg 8940
cgagatatgt ttgagaatac cactttatcc cgcgtcaggg agaggcagtg cgtaaaaaga 9000
cgcggactca tgtgaaatac tggTTTTtag tgcgccagat ctctataatc tcgCGcaacc 9060
tattttcccc tcgaacacct tttAagccgt agataaacag gctgggacac ttcacatgag 9120
cgaaaaatac atcgtcacct gggacatggt gcagatccat gcacgtaaac tcgcaagccg 9180
actgatgcct tctgaacaat gaaagggcat tattgccgta agccgtggcg gtctggtacc 9240
gggtgcgtta ctggcgcgtg aactgggtat tcgTcatgtc gataccgttt gtatttccag 9300
ctacgatcac gacaaccagc gcgagcttaa agtgctgaaa cgcgcagaag gcgatggcga 9360
aggcttcatc gttattgatg acctgggtga taccgggtgt actgcggttg cgattctgta 9420
aatgtatcca aaagcgcact ttgtcaccat cttcGcaaaa ccggctggtc gtccgctggt 9480
tgatgactat gttgttgata tcccGcaaga tacctggatt gaacagccgt gggatatggg 9540
cgtcgtattc gtcccGcaaa tctccggtcg ctaatctttt caacgcctgg cactgcccgg 9600
cgtgtttctt tttAacttca ggcgggttac aatagtttcc agtaagtatt ctggaggctg 9660
catccatgac acaggcaaac ctgagcgaaa ccctgttcaa accccgcttt aaacatcctg 9720
aaacctgcac gctagtccgc cgcttAatc acggcgaca accgcctgtg cagtccggccc 9780
ttgatgtaa aaccatccct cactggtatc gcatgattaa ccgtctgatg tggatctggc 9840
gcggcattga cccacGcgaa atcctcgacg tccaggcacg tattgtgatg agcgatgccg 9900
aacgtaccga cgatgattta tacgatacgg tgattggcta ccgtggcggc aactggattt 9960
atgagtgggc cccggatctt tgtgaaggaa cttacttct gtggtgtgac ataattggac 10020
aaactaccta cagagattta aagctctaag gtaaataata aatttttaag tgtataatgt 10080
gttaaactac tgattctaata tgtttgtgta ttttagattc caacctatgg aactgatgaa 10140
tgggagcagt ggtggaatgc ctTtaatgag gaaaacctgt tttgctcaga agaaatgcca 10200
tctagtgatg atgaggctac tgctgactct caacattcta ctctccaaa aaagaagaga 10260
aaggtagaag accccaagga ctttcttca gaattgctaa gttttttgag tcatgctgtg 10320
tttagtaata gaactcttgc ttgctttgct atttacacca caaaggaaaa agctgcaactg 10380
ctatacaaga aaattatgga aaaatattct gtaaccttta taagtaggca taacagttat 10440
aatcataaca tactgttttt tcttactcca cacaggcata gagtgtctgc tattaataac 10500
tatgctcaaa aattgtgtac ctttagcttt ttaatttgta aaggggttaa taaggaatat 10560
ttgatgtata gtgccttgac tagagatcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt 10620
acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat 10680
tgtttgtgtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac 10740
aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat 10800
caatgtatct tatcatgtct ggatcaactg gataactcaa gctaaccaa atcatcccaa 10860
acttcccacc ccatacccta ttaccactgc caattacctg tggtttcatt tactctaaac 10920

```

ctgtgattcc tctgaattat tttcatttta aagaaattgt atttgttaaa tatgtactac 10980

aaacttagta gt 10992

<210> 50

5 < 211> 13600

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

ES 2 639 568 T3

< 223> Ácido nucleico de VIH-1 circular

<400> 50

tggaaggct aattcactcc caaagaagac aagatatacct tgatctgtgg atctaccaca	60
cacaaggcta cttccctgat tagcagaact acacaccagg gccagggtca gatatccact	120
gacctttgga tgggtctaca agctagtacc agttgagcca gataaggtag aagaggccaa	180
taaaggagag aacaccagct tgttacaccc tgtgagcctg catgggatgg atgaccgga	240
gagagaagtg ttagagtgga ggtttgacag ccgcctagca tttcatcacg tggcccgaga	300
gctgcatacc gagtacttca agaactgctg atatcgagct tgctacaagg gactttccgc	360
tggggacttt ccagggaggc gtggcctggg cgggactggg gagtggcgag ccctcagatc	420
ctgcatataa gcagctgctt tttgcctgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag	480
cctgggagct ctctggctaa ctaggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgctt	540
gagtgcctca agtagtgtgt gccctctctgt tgtgtgactc tggtaaactag agatccctca	600
gaccttttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcttaattaa ccgtacgct actacgtata	660
aagccaggaa tggatggccc aaaagttaaa caatggccat tgacagaaga aaaaataaaa	720
gcattagtag aaattgtac agagatggaa aaggaagga aaatttcaa aattggcct	780
gaaaatccat acaatactcc agtatttgcc ataaagaaaa aagacagtac taaatggaga	840
aaattagtag atttcagaga acttaataag agaactcaag acttctggga agttcaatta	900
ggaataccac atcccgaggc gttaaaaag aaaaatcag taacagtact ggatgtgggt	960
gatgcatatt tttcagttcc cttagatgaa gacttcagga aatatactgc atttaccata	1020
cctagtataa acaatgagac accagggatt agatatcagt acaatgtgct tccacagga	1080
tggaaaggat caccagcaat attccaaagt agcatgacaa aaatcttaga gccttttaga	1140
aaacaaaatc cagacatagt tatctatcaa tacatggatg atttgtatgt aggatctgac	1200
ttagaaatag ggcagcatag aacaaaaata gaggagctga gacaacatct gttgaggtgg	1260
ggacttacca caccagacaa aaaacatcag aaagaacctc cattcctttg gatgggttat	1320
gaactccatc ctgataaatg gacagtacag cctatagtgc tgccagaaaa agacagctgg	1380
actgtcaatg acatacagaa gttagtgggg aaattgaatt gggcaagtca gatttacca	1440
gggattaaag taaggcaatt atgtaaacct cttagaggaa ccaaagcact aacagaagta	1500
ataccactaa cagaagaagc agagctagaa ctggcagaaa acagagagat tctaaaagaa	1560
ccagtacatg gagtgtatta tgacctatca aaagacttaa tagcagaaat acagaagcag	1620

ES 2 639 568 T3

gggcaaggcc aatggacata tcaaatttat caagagccat ttaaaaatct gaaaacagga	1680
aaatatgcaa gaatgagggg tgcccacact aatgatgtaa aacaattaac agaggcagtg	1740
caaaaaataa ccacagaaaag catagtaata tggggaaaaga ctccctaaatt taaactgccc	1800
atacaaaaagg aaacatggga aacatggtgg acagagtatt ggcaagccac ctggattcct	1860
gagtgggagt ttgttaatac ccctccttta gtgaaattat ggtaccagtt agagaaaaga	1920
cccatagtag gagcagaaaac ctctcatgta gatggggcag ctaacagggg gactaaatta	1980
ggaaaagcag gatatgttac taatagagga agacaaaaag ttgtcacctc aactgacaca	2040
acaaatcaga agactgagtt acaagcaatt tatctagctt tgcaggattc gggattagaa	2100
gtaaacatag taacagactc acaatatgca ttaggaatca ttcaagcaca accagatcaa	2160
agtgaatcag agttagtcaa tcaataata gagcagttaa taaaaaagga aaaggtctat	2220
ctggcatggg taccagcaca caaaggaatt ggaggaaatg aacaagtaga taaattagtc	2280
agtgctggaa tcagaaaagt actattttta gatggaatag ataaggcca agatgaacat	2340
gagaaatac acagtaattg gagagcaatg gctagtgatt ttaacctgcc acctgtagta	2400
gcaaaagaaa tagtagccag ctgtgataaa tgtcagctaa aaggagaagc catgcatgga	2460
caagtagact gtagtccagg aatatggcaa ctagattgta cacatttaga aggaaaagtt	2520
atcctgtag cagttcatgt agccagtgga tatatagaag cagaagttat tccagcagaa	2580
acagggcagg aaacagcata ttttctttta aaattagcag gaagatggcc agtaaaaaca	2640
atacatacag acaatggcag caatttcacc agtgctacgg ttaaggccgc ctgttggtgg	2700
gcgggaatca agcaggaatt tggaaatccc tacaatcccc aaagtcaagg agtagtagaa	2760
tctatgaata aagaattaa gaaaattata ggacaggtaa gagatcaggc tgaacatctt	2820
aagacagcag tacaatggc agtattcatc cacaatttta aaagaaaagg ggggattggg	2880
gggtacagtg caggggaaaag aatagtagac ataatagcaa cagacataca aactaaagaa	2940
ttcaaaaac aaattacaaa aattcaaaat tttcgggttt attacagggg cagcagaaat	3000
ccactttgga aaggaccagc aaagctcctc tggaaagggt aaggggcagt agtaatacaa	3060
gataatagtg acataaaagt agtgccaaga agaaaagcaa agatcattag ggattatgga	3120
aaacagatgg caggtgatga ttgtgtggca agtagacagg atgaggatta gaacatggaa	3180
aagtttagta aaacaccata tgtatgtttc agggaaagct aggggatggt tttatagaca	3240
tcactatgaa agccctcatc caagaataag ttcagaagta cacatcccac taggggatgc	3300
tagattggtg ataacaacat attgggtctt gcatacagga gaaagagact ggcatttggg	3360
tcagggagtc tccatagaat ggaggaaaa gagatatagc acacaagtag accctgaact	3420
agcagaccaa ctaattcatc tgtattactt tgactgtttt tcagactctg ctataagaaa	3480
ggccttatta ggacacatag ttagccctag gtgtgaatat caagcaggac ataacaaggt	3540
aggatctcta caatacttgg cactagcagc attaataaca ccaaaaaaga taaagccacc	3600
tttgctagtg gttacgaaac tgacagagga tagatggaac aagcccaga agaccaaggg	3660
ccacagaggg agccacacaa tgaatggaca ctagagcttt tagaggagct taagaatgaa	3720

ES 2 639 568 T3

```

gctgttagac attttcctag gatttggctc catggccttag ggcaacatat ctatgaaact 3780
tatggggata cttgggcagg agtgggaagcc ataataagaa ttctgcaaca actgctgttt 3840
atccattttc agaattgggt gtcgacatag cagaataggc gttactcgac agaggagagc 3900
aagaaatgga gccagtagat cctagactag agccctggaa gcatccagga agtcagccta 3960
aaactgcttg taccaattgc tattgtaaaa agtggttgctt tcattgccaa gtttgtttca 4020
taacaaaagc cttaggcatc tcctatggca ggaagaagcg gagacagcga cgaagagctc 4080
atcagaacag tcagactcat caagcttctc tatcaaagca gtaagtagta catgtaacgc 4140
aacctatacc aatagtagca atagtagcat tagtagtagc aataataata gcaatagtgt 4200
tgtgttccat agtaatcata gaatatagga aaatattaag acaaagaaaa atagacaggt 4260
taattgatag actaatagaa agagcagaag acagtggcaa tgagagtgaa ggagaaatat 4320
cagcacttgt ggagatgggg gtggagatgg ggcacatgc tccttgggat gttgatgatc 4380
tgtagtgcta cagaaaaatt gtgggtcaca gtctattatg ggtacctgt gtggaaggaa 4440
gcaaccacca ctctattttg tgcatacagat gctaaagcat atgatacaga ggtacataat 4500
gtttgggcca cacatgcctg tgtaccaca gacccaacc cacaagaagt agtattggtg 4560
aatgtgacag aaaattttaa catgtggaaa aatgacatgg tagaacagat gcatgaggat 4620
ataatcagtt tatgggatca aagcctaaag ccatgtgtaa aattaacccc actctgtgtt 4680
agtttaaagt gcactgattt gaagaatgat actaatacca atagtagtag cgggagaatg 4740
ataatggaga aaggagagat aaaaaactgc tctttcaata tcagcacaag cataagaggt 4800
aaggtgcaga aagaatatgc atttttttat aaacttgata taataccaat agataatgat 4860
actaccagct ataagttgac aagttgtaac acctcagtca ttacacaggc ctgtccaaag 4920
gtatcctttg agccaattcc catacattat tgtgccccgg ctggttttgc gattctaaaa 4980
tgtaataata agacgttcaa tggaacagga ccatgtacaa atgtcagcac agtacaatgt 5040
acacatggaa ttaggccagt agtatcaact caactgctgt taaatggcag tctagcagaa 5100
gaagaggtag taattagatc tgtaatttc acggacaatg ctaaaacccat aatagtacag 5160
ctgaacacat ctgtagaaat taattgtaca agaccaaca acaatacaag aaaagaatc 5220
cgtatccaga gaggaccagg gagagcattt gttacaatag gaaaaatagg aaatatgaga 5280
caagcacatt gtaacattag tagagcaaaa tggaataaca ctttaaaaca gatagctagc 5340
aaattaagag aacaatttgg aaataataaa acaataatct ttaagcaatc ctcaggaggg 5400
gaccagaaa ttgtaacgca cagttttaat tgtggagggg aatttttcta ctgtaattca 5460
acacaactgt ttaatagtac ttggtttaat agtacttggg gtaactgaagg gtcaataaac 5520
actgaaggaa gtgacacaat caccctccca tgcagaataa aacaaattat aaacatgtgg 5580
cagaaagtag gaaaagcaat gtatgccct cccatcagtg gacaaattag atgttcatca 5640
aatattacag ggctgctatt aacaagagat ggtggtaata gcaacaatga gtccgagatc 5700
ttcagacctg gaggaggaga tatgagggac aattggagaa gtgaattata taaatataaa 5760

```

ES 2 639 568 T3

gtagtaaaaa	ttgaaccatt	aggagtagca	cccaccaagg	caaagagaag	agtgggtgcag	5820
agagaaaaaa	gagcagtggg	aataggagct	ttgttccttg	ggttccttggg	agcagcagga	5880
agcactatgg	gcgcagcgtc	aatgacgctg	acgggtacagg	ccagacaatt	attgtctggt	5940
atagtgcagc	agcagaacaa	tttctgtagg	gctattgagg	cgcaacagca	tctgttgcaa	6000
ctcacagtct	ggggcatcaa	gcagctccag	gcaagaatcc	tggctgtgga	aagataccta	6060
aaggatcaac	agtccttggg	gatttggggg	tgctctggaa	aactcatttg	caccactgct	6120
gtgccttggg	atgctagtty	gagtaataaa	tctctggaac	agatttggaa	tcacacgacc	6180
tggatggagt	gggacagaga	aattaacaat	tacacaagct	taatacactc	cttaattgaa	6240
gaatcgaaa	accagcaaga	aaagaatgaa	caagaattat	tggaattaga	taaatgggca	6300
agtttgtgga	attggtttaa	cataacaaat	tggctgtggt	atataaaatt	attcataatg	6360
atagtaggag	gcttggtagg	tttaagaata	gtttttgctg	tactttctat	agtgaataga	6420
gtaggcagc	gatattcacc	attatcgttt	cagaccacc	tccaacccc	gaggggacc	6480
gacaggccc	aaggaataga	agaagaaggt	ggagagagag	acagagacag	atccattcga	6540
ttagtgaacg	gatccttagc	acttatctgg	gacgatctgc	ggagcctgtg	cctcttcagc	6600
taccaccgct	tgagagactt	actcttgatt	gtaacgagga	ttgtggaact	tctgggacgc	6660
agggggtggg	aagccctcaa	atattggtgg	aatctcctac	aatattggag	tcaggagcta	6720
aagaatagtg	ctgttagcct	gctcaatgcc	acagccatag	cagtagctga	ggggacagat	6780
agggttatag	aagtagtaca	aggagcttgt	agagctattc	gccacatacc	tagaagaata	6840
agacagggct	tggaaaggat	tttgcataaa	gatgggtggc	gcggccgcaa	tggtagcaaa	6900
gggagaggag	ctgttcaccg	gggtgtgccc	catcctggtc	gagctggacg	gcgacgtaaa	6960
cgccacaag	ttcagcgtgt	ccggcgaggg	cgagggcgat	gccacctacg	gcaagctgac	7020
cctgaagttc	atctgcacca	ccggcaagct	gcccgtgccc	tggcccaccc	tcgtgaccac	7080
cctgacctac	ggcgtgcagt	gcttcagccc	ctaccccgac	cacatgaagc	agcagcactt	7140
cttcaagtcc	gccatgcccg	aaggctacgt	ccaggagcgc	accatcttct	tcaaggacga	7200
cggcaactac	aagaccgcg	ccgaggtgaa	gttcgagggc	gacaccctgg	tgaaccgcat	7260
cgagctgaag	ggcatcgact	tcaaggagga	cggcaacatc	ctggggcaca	agctggagta	7320
caactacaac	agccacaacg	tctatatcat	ggccgacaag	cagaagaacg	gcatcaaggc	7380
gaacttcaag	atccgccaca	acatcgagga	cggcagcgtg	cagctcgccc	accactacca	7440
gcagaacacc	cccctcggcg	acggccccgt	gctgctgccc	gacaaccact	acctgagcac	7500
ccagtccgcc	ctgagcaaa	accccaacga	gaagcgcgat	cacatgggcc	tgctggagtt	7560
cgtgaccgcc	gccgggatca	ctctcggcat	ggacgagctg	tacaagtaag	aattctgact	7620
cgagacctag	aaaaacatgg	agcaatcaca	agtagcaata	cagcagctac	caatgctgat	7680
tgtgcctggc	tagaagcaca	agaggaggag	gaggtggggt	ttccagtcac	acctcaghta	7740
cctttaagac	caatgactta	caaggcagct	gtagatctta	gccacttttt	aaaagaaaag	7800
gggggactgg	aagggtcaat	tactcccaa	cgaagacaag	atatacctga	tctgtggatc	7860

ES 2 639 568 T3

taccacacac aaggctactt ccctgattgg cagaactaca caccagggcc agggatcaga	7920
tatccactga cctttggatg gtgtacaag ctagtaccag ttgagcaaga gaaggtagaa	7980
gaagccaatg aaggagagaa cacccgcttg ttacaccctg tgagcctgca tgggatggat	8040
gacccggaga gagaagtatt agagtggagg tttgacagcc gcctagcatt tcatcacatg	8100
gcccgagagc tgcattccgga gtacttcaag aactgctgac atcgagcttg ctacaaggga	8160
ctttccgctg gggactttcc agggaggcgt ggcctgggcg ggactgggga gtggcgagcc	8220
ctcagatgct gcatataagc agctgctttt tgcttgactt gggctctctt ggtagacca	8280
gatctgagcc tgggactctt ctggctaact agggaacca ctgcttaagc ctcaataaag	8340
cttgccctga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gcgcgcctct	8400
agaattaatt ccgtgtattc tatagtgtca cctaaatcgt atgtgtatga tacataaggt	8460
tatgtattaa ttgtagccgc gttctaacga caatatgtac aagcctaatt gtgtagcatc	8520
tggcttactg aagcagacc tatcatctct ctcgtaaac gccgtcagag tcggtttggt	8580
tggacgaacc ttctgagttt ctggtaacgc cgtcccgcac ccggaatgg tcagcgaacc	8640
aatcagcagg gtcattcgta gccagatcct ctacccgga cgcattcgtg ccggcatcac	8700
cggcgccaca ggtgctggtg ctggcgccca tatcgcgcac atcaccgatg gggagatcg	8760
ggctcgccac ttcgggctca tgagcgttg tttcggcgtg ggtatgggtg caggccccgt	8820
ggccggggga ctggtgggcg ccatctcctt gcatgcacca ttcccttgcg cggcggtgct	8880
caacggctc aacctactac tgggctgctt cctaattgag gaggcgcata agggagagcg	8940
tcgaatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac	9000
accgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca	9060
gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttaccg tcatcaccga	9120
aacgcgcgag acgaaaggcg ctctgtgata gcctatcttt ataggtaat gtcattgataa	9180
taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt	9240
gtttatcttt ctaaatacat tcaaataatg atccgctcat gagacaataa ccctgataaa	9300
tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttccgt gtcgccctta	9360
ttcccttttt tgcgycattt tgccttctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag	9420
taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca	9480
gcggtaaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcactttta	9540
aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc	9600
gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc	9660
ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgtctc cataaccatg agtgataaca	9720
ctgcgcccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc	9780
acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg aatgaagcca	9840
taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac	9900

ES 2 639 568 T3

tattaactgg cgaactactt actctagcct cccggcaaca attaatagac tggatggagg 9960
cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg 10020
ataaatctgg agccggtag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg 10080
gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact atggatgaac 10140
gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc 10200
aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca tttttaattt aaaaggatct 10260
aggatgaagat cctttttgat aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc 10320
actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc 10380
gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt tgtttgccgg 10440
atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa 10500
atactgttct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc 10560
ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt 10620
gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcgg tcgggctgaa 10680
cggggggttc gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc 10740
tacagcgtga gctatgagaa agcggccgc ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc 10800
cggtaagcgg caggtcggga acaggagagc gcacgagga gcttccaggg gaaacgcct 10860
ggtatcttta tagtctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat 10920
gctcgtcagg gggcgagc ctatggaaaa acgcccagca cgcggccttt ttacggttcc 10980
tggccttttg ctggcctttt gtcacatgt tctttcctgc gttatcccct gattctgtgg 11040
ataaccgtat taccgctttt gtagtgagct ataccgctc cgcagaccga acgaccgagc 11100
gcagcagtc agtgagcag gaagcgaag agcggccaat acgcaaaccg cctctccccg 11160
cgcgttgcc gattcattaa tgcagctgtg gaatgtgtgt cagttagggt gtggaaagtc 11220
cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag 11280
gtgtggaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta 11340
gtcagcaacc atagtcccc ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc 11400
cgcccattct ccgccccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc 11460
ctcggcctct gagctattcc agaagtatg aggaggcttt ttggaggcc taggcttttg 11520
caaaaagctt ggacacaaga caggcttgcg agatatgttt gagaatacca ctttatcccg 11580
cgtcaggag aggcagtgcg taaaaagacg cggactcatg tgaataactg gtttttagtg 11640
cgccagatct ctataatctc gcgcaacctt ttttcccctc gaacctttt taagccgtag 11700
ataaacaggc tgggacactt cacatgagcg aaaaatacat cgtcacctgg gacatgttgc 11760
agatccatgc acgtaaactc gcaagccgac tgatgccttc tgaacaatgg aaaggcatta 11820
ttgccgtaag ccgtggcggg ctggtaccgg gtgcgttact ggcgctgaa ctgggtattc 11880
gtcatgtcga taccgtttgt atttccagct acgatcacga caaccagcgc gagcttaaag 11940
tgctgaaacg cgcagaaggc gatggcgaag gcttcatcgt_ tattgatgac ctggtggata 12000

ES 2 639 568 T3

ccggtggtac tgcggttcg attcgtgaaa tgtatccaaa agcgcacttt gtcaccatct 12060
 tcgcaaaacc ggctggctgt cgcgtggttg atgactatgt tgttgatadc cgcgaagata 12120
 cctggattga acagccgtgg gatatgggcg tcgtattcgt cccgccaatc tccggtcgtc 12180
 aatcttttca acgcttgga ctgccgggcg ttgttctttt taacttcagg cgggttacia 12240
 tagtttccag taagtattct ggaggctgca tccatgacac aggcaaacct gagcgaaacc 12300
 ctgttcaaac cccgctttaa acatcctgaa acctcgacgc tagtccgccc ctttaatcac 12360
 ggcgcacaac cgcctgtgca gtcggccctt gatggtaaaa ccatccctca ctggtatcgc 12420
 atgattaacc gtctgatgtg gatctggcgc ggcattgacc cacgcgaaat cctcgacgtc 12480
 caggcacgta ttgtgatgag cgatgccgaa cgtaccgacg atgatttata cgatacggtg 12540
 attggctacc gtggcggcaa ctggatttat gaggggccc cggatctttg tgaaggaacc 12600
 ttacttctgt ggtgtgacat aattggacaa actacctaca gagattttaa gctctaaggt 12660
 aaatataaaa tttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg tttgtgtatt 12720
 ttagattcca acctatgaa ctgatgaatg ggagcagtgg tggaatgcct ttaatgagga 12780
 aaacctgttt tgctcagaag aaatgccatc tagtgatgat gaggctactg ctgactctca 12840
 acattctact cctccaaaaa agaagagaaa ggtagaagac cccaaggact ttccttcaga 12900
 attgctaagt tttttgagtc atgctgtgtt tagtaataga actcttgctt gctttgctat 12960
 ttaccaccaca aaggaaaaag ctgcaactgct atacaagaaa attatggaaa aatattctgt 13020
 aacctttata agtaggcata acagttataa tcataacata ctgttttttc ttactccaca 13080
 caggcataga gtgctgcta ttaataacta tgctcaaaaa ttgtgtacct ttagcttttt 13140
 aattttgaaa ggggttaata aggaatattt gatgtatagt gccttgacta gagatcataa 13200
 tcagccatac cacatttgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctcca cacctcccc 13260
 tgaacctgaa acataaaaat aatgcaattg ttgttgttaa cttgtttatt gcagcttata 13320
 atggttacia ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttcaactgc 13380
 attctagtgt tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atcaactgga 13440
 taactcaagc taacccaaat catcccaaac tcccccccc ataccctatt accactgcca 13500
 attacctgtg gtttcattta ctctaaacct gtgattcctc tgaattattt tcattttaaa 13560
 gaaattgtat ttgttaaata tgtactacia acttagtagt 13600

<210> 51

< 211> 12682

< 212> ADN

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> Ácido nucleico de VIH-1 circular

<400> 51

tggaagggct aattcactcc caaagaagac aagatatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
 cacaaggcta cttcctgat tagcagaact acacaccagg gccagggtca gatatccact 120

--

ES 2 639 568 T3

gacctttgga tgggtgctaca agctagtacc agttgagcca gataaggtag aagaggccaa	180
taaaggagag aacaccagct tgttacacc tgtgagcctg catgggatgg atgacccgga	240
gagagaagtg ttagagtgga ggtttgacag ccgcctagca tttcatcacg tggcccgaga	300
gctgcatccg gagtacttca agaactgctg atatcgagct tgctacaagg gactttccgc	360
tggggacttt ccagggaggc gtggcctggg cgggactggg gagtggcgag ccctcagatc	420
ctgcatataa gcagctgctt tttgcctgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag	480
cctgggagct ctctggctaa ctaggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgctt	540
gagtgcttca agtagtgtgt gcccgctgtg tgtgtgactc tggtaactag agatccctca	600
gaccttttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagtggcgc ccgaacaggg acttgaaagc	660
gaaagggaaa ccagaggagc tctctcgacg caggactcgg cttgctgaag cgcgcacggc	720
aagaggcgag gggcggcgac tggtagtac gccaaaaatt ttgactagcg gaggctagaa	780
ggagagagat gggtagcaga gcgtcagtat taagcggggg agaattagat cgatgggaaa	840
aaattcggtt aaggccaggg gaaagaaaa aatataaatt aaaacatata gtatgggcaa	900
gcagggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt agaaacatca gaaggctgta	960
gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg atcagaagaa cttagatcat	1020
tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcatcaaag gatagagata aaagacacca	1080
aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaa taagaaaaaa gcacagcaag	1140
cagcagctga cacaggacac agcaatcagg tcagccaaaa ttaccctata gtgcagaaca	1200
tccaggggca aatggtacat caggccatat cacctagaac tttaaatgca tgggtaaaag	1260
tagtagaaga gaaggctttc agcccagaag tgatacccat gttttcagca ttatcagaag	1320
gagccacccc acaagattta acaccatgc taaacacagt ggggggacat caagcagcca	1380
tgcaaatggt aaaagagacc atcaatgagg aagctgcaga atgggataga gtgcatccag	1440
tgcatgcagg gcctattgca ccaggccaga tgagagaacc aaggggaagt gacatagcag	1500
gaactactag tacccttcag gaacaaatag gatggatgac aaataatcca cctatcccag	1560
taggagaaat ttataaaaga tggataatcc tgggattaaa taaaatagta agaatgtata	1620
gccctaccag cattctggac ataagacaag gaccaaaga accctttaga gactatgtag	1680
accggttcta taaaactcta agagccgagc aagcttcaca ggaggtaaaa aattggatga	1740
cagaaacctt gttggtccaa aatgcgaacc cagattgtaa gactatttta aaagcattgg	1800
gaccagcggc tacactagaa gaaatgatga cagcatgtca gggagtagga ggacccggcc	1860
ataaggcaag agttttggct gaagcaatga gccaaagtaac aaattcagct accataatga	1920
tgcagagagg caattttagg aaccaaagaa agattgttaa gtgtttcaat tgtggcaaag	1980
aagggcacac agccagaaat tgcaaggccc ctaggaaaaa gggctgttgg aaatgtggaa	2040
aggaaggaca ccaaatgaaa gattgtactg agagacaggc taatttttta gggagatct	2100
ggccttcta caaggaagg ccaggaatt ttcttcagag cagaccagag ccaacagccc	2160
caccagaaga gagcttcagg tctgggtag agacaacaac tccccctcag aagcaggagc	2220

ES 2 639 568 T3

cgatagacaa ggaactgtat cctttaactt ccctcagatc actctttggc aacgaccctt 2280
 cgtcacaata aagatagggg ggcaactaaa ggaagctcta ttagatacat taattaaccg 2340
 tacgcgtact acgtaagaag tacacatccc actaggggat gctagattgg taataacaac 2400
 atattggggt ctgcatacag gaaaaagaga ctggcatttg ggtcagggag tctccataga 2460
 atggaggaaa aagagatata gcacacaagt agaccctgaa ctagcagacc aactaattca 2520
 tctgtattac tttgactgtt tttcagactc tgctataaga aaggccttat taggacacat 2580
 agttagccct aggtgtgaat atcaagcagg acataacaag gtaggatctc tacaatactt 2640
 ggactagca gcattaataa caccaaaaaa gataaagcca cctttgccta gtgttacgaa 2700
 actgacagag gatagatgga acaagcccca gaagaccaag ggccacagag ggagccacac 2760
 aatgaatgga cactagagct tttagaggag cttagaatg aagctgttag acattttcct 2820
 aggatttggc tccatggcct agggcaacat atctatgaaa cttatgggga tacttgggca 2880
 ggagtggaag ccataataag aattctgcaa caactgctgt ttatccattt tcagaattgg 2940
 gtgtcgacat agcagaatag gcgttactcg acagaggaga gcaagaaatg gagccagtag 3000
 atcctagact agagccctgg aagcatccag gaagtcagcc taaaactgct tgtaccaatt 3060
 gctattgtaa aaagtgttc tttcattgcc aagtttgttt cataacaaaa gccttaggca 3120
 tctcctatgg caggaagaag cggagacagc gacgaagagc tcatcagaac agtcagactc 3180
 atcaagcttc tctatcaaag cagtaagtag tacatgtaac gcaacctata ccaatagtag 3240
 caatagtagc attagtagta gcaataataa tagcaatagt tgtgtggtcc atagtaatca 3300
 tagaatatag gaaaatatta agacaaagaa aaatagacag gttaattgat agactaatag 3360
 aaagagcaga agacagtggc aatgagagtg aaggagaaat atcagcactt gtggagatgg 3420
 ggggtggagat ggggcaccat gctccttggg atgttgatga tctgtagtgc tacagaaaaa 3480
 ttgtgggtca cagtctatta tggggtacct gtgtggaagg aagcaaccac cactctattt 3540
 tgtgcatcag atgctaaagc atatgataca gaggtacata atgtttgggc cacacatgcc 3600
 tgtgtacca cagaccccaa cccacaagaa gtagtattgg taaatgtgac agaaaatttt 3660
 aacatgtgga aaaatgacat ggtagaacag atgcatgagg atataatcag tttatgggat 3720
 caaagcctaa agccatgtgt aaaattaacc ccaactctgt ttagtttaaa gtgcactgat 3780
 ttgaagaatg atactaatac caatagtagt agcgggagaa tgataatgga gaaaggagag 3840
 ataaaaaact gctctttcaa tatcagcaca agcataagag gtaaggtgca gaaagaatat 3900
 gcattttttt ataaacttga tataatacca atagataatg atactaccag ctataagttg 3960
 acaagttgta acacctcagt cattacacag gcctgtcca aaggatcctt tgagccaatt 4020
 cccatacatt attgtgcccc ggctggtttt gcgattctaa aatgtaataa taagacgttc 4080
 aatggaacag gaccatgtac aaatgtcagc acagtacaat gtacacatgg aattaggcca 4140
 gtagtatcaa ctcaactgct gttaaattggc agtctagcag aagaagaggt agtaattaga 4200
 tctgtcaatt tcacggacaa tgctaaaacc ataatagtagt agctgaacac atctgtagaa 4260

ES 2 639 568 T3

attaattgta caagacccaa caacaatata agaaaaagaa tccgtatcca gagaggacca	4320
gggagagcat ttgttacaat aggaaaaata ggaaatatga gacaagcaca ttgtaacatt	4380
agtagagcaa aatggaataa cactttaaaa cagatagcta gcaaattaag agaacaattt	4440
ggaataataa aaacaataat ctttaagcaa tcctcaggag gggaccaga aattgtaacg	4500
cacagtttta attgtggagg ggaatttttc tactgtaatt caacacaact gttaataagt	4560
acttggttta atagtacttg gagtactgaa gggtaaata acaactgaagg aagtgcaca	4620
atcacctcc catgcagaat aaaacaatt ataacatgt ggcagaaagt aggaaaagca	4680
atgtatgcc ctcccatcag tggacaatt agatgttcat caaatattac agggctgcta	4740
ttaacaagag atggtggtaa tagcaaat gagtccgaga tcttcagacc tggaggagga	4800
gatatgaggg acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca	4860
ttaggagtag caccaccaa ggcaaagaga agagtgtgc agagagaaaa aagagcagtg	4920
ggaataggag cttgttcct tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcg	4980
tcaatgacgc tgacggata ggccagaca ttattgtctg gtatagtgc gacgcagaac	5040
aattgtctga gggctattga ggcgaacag catctgttc aactcacagt ctggggcatc	5100
aagcagctcc aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg	5160
gggatttggg gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt	5220
tggagtaata aatctctgga acagatttg aatcacacga cctggatgga gtgggacaga	5280
gaaattaaca attacacaag ctttaatacac tccttaattg aagaatcgca aaaccagcaa	5340
gaaaagaatg aacaagaatt attggaatta gataaatggg caagtgtgtg gaattggttt	5400
aacatacaa attggctgtg gtatataaaa ttattcataa tgatagtagg aggcttgta	5460
ggttaagaa tagtttttc tgtactttct atagtgaata gaggtaggca gggatattca	5520
ccattatcgt ttcagaccca cctcccaacc ccgaggggac ccgacaggcc cgaaggaata	5580
gaagaagaag gtggagagag agacagagac agatccattc gattagtga cggatcctta	5640
gcacttatct gggacgatct gcggagcctg tgcctcttca gctaccaccg cttgagagac	5700
ttactcttga ttgtaacgag gattgtggaa cttctgggac gcaggggggtg ggaagccctc	5760
aaatattggt ggaatctcct acaatattgg agtcaggagc taaagaatag tgctgttagc	5820
ttgctcaatg ccacagccat agcagtagct gaggggacag atagggttat agaagtagta	5880
caaggagcct gtagagctat tcgccacata cctagaagaa taagacaggg cttggaaagg	5940
atthtctat aagatgggtg gcgcgccgc aatggtgagc aagggcgagg agctgttcac	6000
cgggttggg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt	6060
gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcactgcac	6120
caccggcaag ctgccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accctgacct acggcgtgca	6180
gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc	6240
cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagaccg	6300
cgccgaggtg aagttcgagg gcgacacct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga	6360

ES 2 639 568 T3

cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa	6420
cgtctatatac atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gcgaacttca agatccgcca	6480
caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcg	6540
cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc acccagtcg ccctgagcaa	6600
agacccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat	6660
cactctcggc atggacgagc tgtacaagta agaattctga ctcgagacct agaaaaacat	6720
ggagcaatca caagtagcaa tacagcagct accaatgctg attgtgcctg gctagaagca	6780
caagaggagg aggaggtggg ttttccagtc acacctcagg tacctttaag accaatgact	6840
tacaaggcag ctgtagatct tagccacttt ttaaaagaaa aggggggact ggaagggcta	6900
attcactccc aacgaagaca agatatcctt gatctgtgga tctaccacac acaaggctac	6960
ttccctgatt ggcagaacta cacaccaggg ccagggatca gatatccact gacctttgga	7020
tggtgctaca agctagtacc agttgagcaa gagaaggtag aagaagccaa tgaaggagag	7080
aacacccgct tgttacacc tgtgagcctg catgggatgg atgaccgga gagagaagta	7140
ttagagtgga ggtttgacag ccgcctagca tttcatcaca tggcccgaga gctgcatccg	7200
gagtacttca agaactgctg acatcgagct tgctacaagg gactttccgc tggggacttt	7260
ccagggaggc gtggcctggg cgggactggg gagtggcgag ccctcagatg ctgcatataa	7320
gcagctgctt tttgcttcta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct	7380
ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgctt gagtgcttca	7440
agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc tggcgcgcct ctagaattaa ttccgtgtat	7500
tctatagtgt cacctaaatc gtatgtgtat gatacataag gttatgtatt aattgtagcc	7560
gcgttctaac gacaatatgt acaagcctaa ttgtgtagca tctggcttac tgaagcagac	7620
cctatcatct ctctcgtaaa ctgccgtcag agtcggtttg gttggacgaa cctctgagt	7680
ttctggtaac gccgtcccgc acccggaat ggtcagcga ccaatcagca gggtcatcgc	7740
tagccagatc ctctacgccg gacgcacgtt ggccggcatc accggcgcca caggtgcggt	7800
tgtggcgcc tatatcgccg acataccga tggggaagat cgggctcgcc acttcgggct	7860
catgagcgtt tgtttcggcg tgggtatggt ggcaggcccc gtggccggg gactgttggg	7920
cgccatctcc ttgcatgcac cttccttgc ggcgcggtg ctcaacggcc tcaacctact	7980
actgggctgc ttcctaattgc aggagtcgca taagggagag cgtcgaatgg tgcactctca	8040
gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgcca acacccgctg	8100
acgcccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct	8160
ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg	8220
gcctcgtgat acgcctatct ttataggta atgtcatgat aataatgggt tcttagacgt	8280
caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaaccctat ttgtttatct ttctaaatac	8340
attcaaatat gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa	8400

ES 2 639 568 T3

```

aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgcctt tttcccttt tttgcggcat 8460
tttgccttcc tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc 8520
agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga 8580
gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg 8640
cggattatc ccgattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgata cactattctc 8700
agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag 8760
taagagaatt atgcagtgtc gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc 8820
tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg 8880
taactcgctt tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg 8940
acaccagat gcctgtagca atggcaaca cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac 9000
ttactctagc tttccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac 9060
cacttctgcy ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg 9120
agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgatcgc 9180
tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg 9240
agataggtgc ctactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac 9300
tttagattga tttaaaactt ctttttaat ttaaaggat ctaggatgag atcctttttg 9360
ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt cactgagcg tcagaccccg 9420
tagaaaagat caaaggatct tcttgatgc cttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc 9480
aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc 9540
ttttccgaa ggtaactgcy ttcagcagag cgcagatacc aaatactggt cttctagtgt 9600
agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gccacatac ctcgctctgc 9660
taatcctggt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact 9720
caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac 9780
agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag 9840
aaagcgcac gcttcccga gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggctc 9900
gaacaggaga gcgcacgagg gacttccag ggggaaacgc ctggatctt tatagtcctg 9960
tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatTTTTgtg atgctcgtca ggggggcgga 10020
gcctatgaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt 10080
ttgctcatat gttcttctc gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct 10140
ttgagtgagc tgataccgct cgcgcagcc gaacgaccga gcgcagcag tcagtgagcg 10200
aggaagcggg agagcgcaca atacgcaaac cgcctctccc cgcgcgttgg ccgattcatt 10260
aatgcagctg tggaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag tccccaggct cccagcagg 10320
cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg 10380
ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcattctaat tagtcagcaa ccatagtccc 10440
gccctaact ccgcccattc cgccttaac tccgcccagt tccgcccatt ctccgccc 10500

```

ES 2 639 568 T3

```

tggtgacta attttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt 10560
ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc ttggacacaa 10620
gacaggcttg cgagatatgt ttgagaatac cactttatcc cgcgtcaggg agaggcagtg 10680
cgtaaaaaga cgcggactca tgtgaaatac tggtttttag tgcgccagat ctctataatc 10740
tcgcgcaacc tttttcccc tcgaacactt ttttaagccgt agataaacag gctgggacac 10800
ttcacatgag cgaaaaatac atcgtcacct gggacatggt gcagatccat gcacgtaaac 10860
tcgcaagccg actgatgcct tctgaacaat ggaaagccat tattgccgta agccgtggcg 10920
gtctggtacc ggggtcgtta ctggcgcgtg aactgggtat tcgtcatgtc gataccgttt 10980
gtatttcag ctacgatcac gacaaccagc gcgagcttaa agtgctgaaa cgcgcagaag 11040
gcatggcga aggcttcac gttattgatg acctgggtga taccgggtgt actcgggttg 11100
cgattcgtga aatgatcca aaagcgcact ttgtcacctat cttcgcaaaa ccggctggtc 11160
gtccgctggt tgatgactat gttgttgata tcccgaaga tacctggatt gaacagccgt 11220
gggatatggg cgctgtattc gtcccgccaa tctccggctg ctaatctttt caacgcctgg 11280
cactgccggg cgttgttctt ttaacttca ggcgggttac aatagtttcc agtaagtatt 11340
ctggaggctg catccatgac acaggcaaac ctgagcgaaa ccctgttcaa accccgcttt 11400
aaacatcctg aaacctcgac gctagtccgc cgctttaatc acggcgcaca accgcctgtg 11460
cagtcggccc ttgatggtaa aaccatccct cactggatc gcatgattaa ccgtctgatg 11520
tggatctggc gcggcattga cccacgcgaa atcctcgacg tccaggcacg tattgtgatg 11580
agcgtgccc aacgtaccga cgatgattta tacgatacgg tgattggcta ccgtggcggc 11640
aactggattt atgagtgggc cccggatcct tgtgaaggaa ccttacttct gtggtgtgac 11700
ataattggac aaactaccta cagagattta aagctctaag gtaaatataa aatttttaag 11760
tgtataatgt gttaaactac tgattcta atgtttgtgta ttttagattc caacctatgg 11820
aactgatgaa tgggagcagt ggtggaatgc ctttaatgag gaaaacctgt tttgctcaga 11880
agaatgcc aactagtatg atgaggctac tgctgactct caacattcta ctctccaaa 11940
aaagaagaga aaggtagaag accccaagga ctttcttca gaattgctaa gttttttgag 12000
tcagtctgtg tttagtaata gaactcttgc ttgctttgct atttacacca caaaggaaaa 12060
agctgcactg ctatacaaga aaattatgga aaaatattct gtaaccttta taagtaggca 12120
taacagttat aatcataaca tactgttttt tcttactcca cacaggcata gagtgtctgc 12180
tattaataac tatgtcaaaa aattgtgtac ctttagcttt ttaatttgta aaggggttaa 12240
taaggaatat ttgatgtata gtgccttgac tagagatcat aatcagccat accacatttg 12300
tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 12360
tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 12420
atagcatcac aaattcaca aataaagcat ttttttact gcattctagt tgtggtttgt 12480
ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct ggatcaactg gataactcaa gctaaccaaa 12540

atcatcccaa acttcccacc ccatacccta ttaccactgc caattacctg tggtttcatt 12600
tactctaaac ctgtgattcc tctgaattat tttcatttta aagaattgt atttgttaa 12660
tatgtactac aaacttagta gt 12682

```

<210> 52

5 < 211> 12378

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

ES 2 639 568 T3

< 223> Ácido nucleico de VIH-1 circular

<400> 52

```

gaatgcaatt gttgttgtta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa      60
tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc     120
caaaactcatc aatgtatctt atcatgtctg gatcaactgg ataactcaag ctaacccaaaa     180
tcatcccaaa cttcccacc cataccctat taccactgcc aattacctgt ggtttcattt     240
actctaaacc tgtgattcct ctgaattatt ttcattttaa agaaattgta tttgttaaat     300
atgtactaca aacttagtag ttggaagggc taattcactc ccaaagaaga caagatatcc     360
ttgatctgtg gatctaccac acacaaggct acttccctga ttagcagaac tacacaccag     420
ggccagggtc agatatccac tgacctttgg atggtgctac aagctagtac cagttgagcc     480
agataaggta gaagaggcca ataaaggaga gaacaccagc ttgttacacc ctgtgagcct     540
gcatgggatg gatgaccgag agagagaagt gttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc     600
atttcatcac gtggcccag agctgcatcc ggagtacttc aagaactgct gatatcgagc     660
ttgctacaag ggactttccg ctggggactt tccagggagg cgtggcctgg gcgggactgg     720
ggagtggcga gccctcagat cctgcatata agcagctgct ttttgctgt actgggtctc     780
tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac cactgctta     840
agcctcaata aagcttgctt tgagtgtctc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact     900
ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg     960
cccgaacagg gacttgaag cgaaagggaa accagaggag ctctctcgac gcaggactcg    1020
gcttgctgaa gcgcgcacgg caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat    1080
ttgactagc ggaggctaga aggagagaga tgggtgagag agcgtcagta ttaagcgggg    1140
gagaattaga tcgatgggaa aaaattcggg taaggccagg gggaaagaaa aaatataaat    1200
taaaacatat agtatgggca agcaggggagc tagaacgatt cgagttaat cctggcctgt    1260
tagaaacatc agaaggctgt agacaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag    1320
gatcagaaga acttagatca ttatataata cagtagcaac cctctattgt gtgcatcaaa    1380
ggatagagat aaaagacacc aaggaagctt tagacaagat agaggaagag caaaacaaaa    1440
gtaagaaaaa agcacagcaa gcagcagctg acacaggaca cagcaatcag gtcagccaaa    1500
attaccctat agtgcagaac atccaggggc aaatggtaca tcaggccata tcacctagaa    1560
ctttaaagtc atgggtaaaa gtagtagaag agaaggcttt cagcccagaa gtgatacca    1620

```


ES 2 639 568 T3

tgttttcagc attatcagaa ggagccaccc cacaagattt aaacaccatg ctaaaccacag	1680
tggggggaca tcaagcagcc atgcaaatgt taaaagagac catcaatgag gaagctgcag	1740
aatgggatag agtgcaccca gtgcatgcag ggcctattgc accaggccag atgagagaac	1800
caaggggaag tgacatagca ggaactacta gtacccttca ggaacaaata ggatggatga	1860
caaataatcc acctatccca gtaggagaaa tttataaaag atggataatc ctgggattaa	1920
ataaaatagt aagaatgtat agccctacca gcattctgga cataagacaa ggacccaaaag	1980
aaccctttag agactatgta gaccggttct ataaaactct aagagccgag caagcttcac	2040
aggaggtaaa aaattggatg acagaaacct tgttggcca aaatgcgaac ccagattgta	2100
agactatttt aaaagcattg ggaccagcgg ctacactaga agaaatgatg acagcatgtc	2160
agggagtagg aggacccggc cataaggcaa gagttttggc tgaagcaatg agccaagtaa	2220
caaattcagc taccataatg atgcagagag gcaattttag gaaccaaaga aagattgtta	2280
agtgtttcaa ttgtggcaaa gaagggcaca cagccagaaa ttgcagggcc cctaggaaaa	2340
agggctttaa ttaaccgtac gcgtactacg taagaagtac acatcccact aggggatgct	2400
agattggtaa taacaacata ttgggtctg catacaggag aaagagactg gcatttgggt	2460
cagggagtct ccatagaatg gaggaaaaag agatatagca cacaagtaga ccctgaacta	2520
gcagaccaac taattcatct gtattacttt gactgttttt cagactctgc tataagaaag	2580
gccttattag gacacatagt tagccctagg tgtgaatata aagcaggaca taacaaggta	2640
ggatctctac aatacttggc actagcagca ttaataacac caaaaaagat aaagccacct	2700
ttgcctagtg ttacgaaact gacagaggat agatggaaca agccccagaa gaccaagggc	2760
cacagagggg gccacacaat gaatggacac tagagctttt agaggagctt aagaatgaag	2820
ctgttagaca ttttcttagg atttggctcc atggcttagg gcaacatata tatgaaactt	2880
atggggatagc ttgggcagga gtggaagcca taataagaat tctgcaacaa ctgctgttta	2940
tccattttca gaattgggtg tcgacatagc agaataggcg ttactcgaca gaggagagca	3000
agaaatggag ccagtagatc ctagactaga gccctggaag catccaggaa gtcagcctaa	3060
aactgcttgt accaattgct attgtaaaaa gtgttgcttt cattgccaag tttgtttcat	3120
aacaaaagcc ttagycatct cctatggcag gaagaagcgg agacagcgcac gaagagctca	3180
tcagaacagt cagactcadc aagcttctct atcaaagcag taagtagtac atgtaacgca	3240
acctatacca atagtagcaa tagtagcatt agtagtagca ataataatag caatagttgt	3300
gtggtccata gtaatcatag aatataggaa aatattaaga caaagaaaaa tagacaggtt	3360
aattgataga ctaatagaaa gaggagaaga cagtggcaat gagagtgaag gagaatatc	3420
agcacttgtg gagatggggg tggagatggg gcaccatgct ccttgggatg ttgatgatct	3480
gtagtgctac agaaaaattg tgggtcacag tctattatgg ggtacctgtg tggaggaag	3540
caaccaccac tctattttgt gcatcagatg ctaaagcata tgatacagag gtacataatg	3600
tttggggcac acatgcctgt gtaccacagc accccaaccc acaagaagta gtattgtaa	3660

ES 2 639 568 T3

atgtgacaga	aaattttaac	atgtggaaaa	atgacatggt	agaacagatg	catgaggata	3720
taatcagttt	atgggatcaa	agcctaaagc	catgtgtaa	attaaccca	ctctgtgtta	3780
gtttaaagtg	cactgatttg	agaatgata	ctaatacaca	tagtagtagc	gggagaatga	3840
taatggagaa	aggagagata	aaaaactgct	ctttcaatat	cagcacaagc	ataagaggta	3900
aggtgcagaa	agaatatgca	ttttttata	aacttgatat	aataccaata	gataatgata	3960
ctaccagcta	taagttgaca	agttgtaaca	cctcagtcac	tacacaggcc	tgtccaaagg	4020
tatcctttga	gccaattccc	atacattatt	gtgccccggc	tggttttgcg	attctaaaat	4080
gtaataataa	gacgttcaat	ggaacaggac	catgtacaaa	tgctcagcaca	gtacaatgta	4140
cacatggaat	taggccagta	gtatcaactc	aactgctggt	aaatggcagt	ctagcagaag	4200
aagaggtagt	aattagatct	gtcaatttca	cggacaatgc	taaaaccata	atagtacagc	4260
tgaacacatc	tgtagaaatt	aattgtacaa	gaccaacaca	caatacaaga	aaaagaatcc	4320
gtatccagag	aggaccaggg	agagcatttg	ttacaatagg	aaaaatagga	aatatgagac	4380
aagcacattg	taacattagt	agagcaaaat	ggaataacac	tttaaacag	atagctagca	4440
aattaagaga	acaatttgga	aataataaaa	caataatctt	taagcaatcc	tcaggagggg	4500
accagaaat	tgtaacgcac	agttttaatt	gtggagggga	atctttctac	tgtaattcaa	4560
cacaactgtt	taatagtact	tggtttaata	gtacttgagg	tactgaaggg	tcaataaca	4620
ctgaaggaag	tgacacaatc	accctcccat	gcagaataaa	acaattata	aacatgtggc	4680
agaaagtagg	aaaagcaatg	tatgccctc	ccatcagtg	acaattaga	tgttcatcaa	4740
atattacagg	gctgctatta	acaagagatg	gtggtaatag	caacaatgag	tccgagatct	4800
tcagacctgg	aggaggagat	atgagggaca	attggagaag	tgaattatat	aatataaag	4860
tagtaaaaat	tgaaccatta	ggagtagcac	ccaccaaggc	aaagagaaga	gtggtgcaga	4920
gagaaaaaag	agcagtggga	ataggagctt	tgttccttgg	gttcttggga	gcagcaggaa	4980
gcactatggg	cgagcgtca	atgacgctga	cggtacaggc	cagacaatta	ttgtctggta	5040
tagtgcagca	gcagaacaat	ttgttgaggg	ctattgaggc	gcaacagcat	ctgttgcaac	5100
tcacagtctg	gggcatcaag	cagctccagg	caagaatcct	ggctgtggaa	agatacctaa	5160
aggatcaaca	gctcctgggg	atctgggggt	gctctggaaa	actcatttgc	accactgctg	5220
tgcttggaa	tgctagtttg	agtaataaat	ctctggaaca	gatttggaa	cacacgacct	5280
ggatggagtg	ggacagagaa	attaacaatt	acacaagctt	aatacactcc	ttaattgaag	5340
aatcgcaaaa	ccagcaagaa	agaatgaac	agaattatt	ggaattagat	aaatgggcaa	5400
gtttgtggaa	ttggtttaac	atacaaat	ggctgtggta	tataaatta	ttcataatga	5460
tagtaggagg	cttggtaggt	ttaagaatag	tttttgctgt	actttctata	gtgaatagag	5520
ttaggcaggg	atattcacca	ttatcgtttc	agaccacct	cccaaccccg	aggggacccg	5580
acaggcccga	aggaatagaa	gaagaagggt	gagagagaga	cagagacaga	tccattcgat	5640
tagtgaacgg	atccttagca	cttatctggg	acgatctg	gagcctgtgc	ctcttcagct	5700
accaccgctt	gagagactta	ctcttgattg	taacgaggat	tgtggaactt	ctgggacgca	5760

ES 2 639 568 T3

gggggtgga agccctcaa tattggtgga atctcctaca atattggagt caggagctaa	5820
agaatagtgc tgttagcttg ctcaatgcca cagccatagc agtagctgag gggacagata	5880
gggttataga agtagtacia ggagcttgta gagctattcg ccacatacct agaagaataa	5940
gacagggcct ggaaaggatt ttgctataag atgggtggcg cggccgcaat ggtgagcaag	6000
ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac	6060
ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gaggcgatg ccacctacgg caagctgacc	6120
ctgaagtcca tctgcaccac cggaagctg cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc	6180
ctgacctagc gcgtgcatg cttcagccg taccgccgac acatgaagca gcacgacttc	6240
ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccattcttct caaggacgac	6300
ggcaactaca agacccgcg cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc	6360
gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacia gctggagtac	6420
aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg catcaaggcg	6480
aacttcaaga tccgccacia catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga cactaccag	6540
cagaacaccc ccatcgcgca cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc	6600
cagtccgccc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgac acatggtcct gctggagttc	6660
gtgaccgccc cgggatacac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaaga attctgactc	6720
gagacctaga aaaacatgga gcaatcacia gtagcaatac agcagctacc aatgctgatt	6780
gtgcctggct agaagcacia gaggaggagg aggtgggttt tccagtcaca cctcaggtag	6840
ctttaagacc aatgacttac aaggcagctg tagatcttag ccacttttta aaagaaaagg	6900
ggggactgga agggctaatt cactcccaac gaagacaaga taccctgat ctgtggatct	6960
accacacaca aggctacttc cctgattggc agaactacac accagggcca gggatcagat	7020
atccactgac ctttgatggt tgctacaagc tagtaccagt tgagcaagag aaggtagaag	7080
aagccaatga aggagagaac acccgcttgt tacaccctgt gagcctgcat gggatggatg	7140
accggagagc agaagtatta gagtggagg ttgacagccg cctagcattt catcacatgg	7200
cccgagagct gcatccggag tacttcaaga actgctgaca tcgagcttgc tacaagggac	7260
ttcccgctgg ggactttcca gggaggcgtg gcctgggcyg gactggggag tggcgagccc	7320
tcagatgctg catataagca gctgcttttt gcttgactg ggtctctctg gttagaccag	7380
atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaaccac tgcttaagcc tcaataaagc	7440
ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg cgcgcctcta	7500
gaattaatc cggtattctt atagtgtcac ctaaactgta tgtgtatgat acataagggt	7560
atgtattaat ttagccgcyg ttctaacgac aatatgtaca agcctaattg ttagcatct	7620
ggcttactga agcagaccct atcatctctc tcgtaaacct cgtcagagt cggtttggt	7680
ggacgaacct tctgagtttc tggtaacgcc gtcccgcacc cggaaatggt cagcgaacca	7740
atcagcaggg tcacgcgtag ccagatcctc tacgcccggac gcatcgtggc cggcatcacc	7800

ES 2 639 568 T3

```

ggcgccacag gtgcggttgc tggcgcttat atcgccgaca tcaccgatgg ggaagatcgg 7860
gctcgccact tcgggctcat gagcgcttgt ttcggcgttg gtatggtggc aggccccgtg 7920
gccgggggac tgttgggagc catctccttg catgcacat tccttgcggc ggcggtgctc 7980
aacggcctca acctactact gggctgcttc ctaatgcagg agtcgcataa gggagagcgt 8040
cgaatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca tagttaagcc agccccgaca 8100
cccgccaaca cccgctgacg cgcctgacg ggcttgtctg ctccccgcat ccgcttacag 8160
acaagctgtg accgctctccg ggagctgcat gtgtcagagg ttttcaccgt catcaccgaa 8220
acgcgcgaga cgaaagggcc tcgtgatagc cctattttta taggttaatg tcatgataat 8280
aatggtttct tagacgtcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg 8340
tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat 8400
gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat 8460
tccctttttt gcggcatttt gccttctgt ttttctcac ccagaaacgc tggtgaaagt 8520
aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag 8580
cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa 8640
agtctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg 8700
ccgcatacac tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct 8760
tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtctgcc ataaccatga gtgataacac 8820
tgcggccaac ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca 8880
caacatgggg gatcatgtaa ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat 8940
accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact 9000
attaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc 9060
ggataaagtt gcaggaccac ttctgcgctc ggccttccg gctggctggt ttattgctga 9120
taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg 9180
taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg 9240
aaatagacag atcgctgaga taggtgcctc actgattaag cattgtaac tgtcagacca 9300
agtttactca tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta 9360
ggtgaagatc ctttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca 9420
ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt ttttctgcy 9480
cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaac accgctacca gcggtgggtt gtttgccgga 9540
tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa 9600
tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc 9660
tacatactc gctctgctaa tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg 9720
tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg cgggctgaac 9780
ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct 9840
acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc 9900

```

ES 2 639 568 T3

ggtaagcggc agggtcggaa caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg 9960
 gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg 10020
 ctcgctcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct 10080
 ggcctttttg tggccttttg ctcacatggt ctttctgctg ttatccccctg attctgtgga 10140
 taaccgtatt accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg 10200
 cagcgagtca gtgagcgagg aagcggaaga gcgcccaata cgcaaaccgc ctctccccgc 10260
 gcgttgccg attcattaat gcagctgtgg aatgtgtgtc agttaggggtg tggaaagtcc 10320
 ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcatc tcaattagtc agcaaccagg 10380
 tgtggaaagt ccccaggctc ccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag 10440
 tcagcaacca tagtcccgc cctaactccg cccatccccg ccctaactcc gccagttcc 10500
 gccctttctc cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc cgaggccgcc 10560
 tcggcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct aggcttttgc 10620
 aaaagcttg gacacaagac aggcttgcca gatatgtttg agaataccac tttatccccg 10680
 gtcagggaga ggcagtgcgt aaaaagacgc ggactcatgt gaaatactgg tttttagtgc 10740
 gccagatctc tataatctcg cgcaacctat tttcccctcg aacacttttt aagccgtaga 10800
 taaacaggct gggacacttc acatgagcga aaaatacatc gtcacctggg acatgttgca 10860
 gatccatgca cgtaaacctc caagccgact gatgccttct gaacaatgga aaggcattat 10920
 tgcgtaagc cgtggcggtc tggtagcggg tgcgttactg gcgcgtgaac tgggtattcg 10980
 tcatgtcgat accgtttcta tttccagcta cgatcacgac aaccagcgcg agcttaaagt 11040
 gctgaaacgc gcagaaggcg atggcgaaag cttcatcggt attgatgacc tggtaggatac 11100
 cggtaggtact gcggttgcca ttcgtgaaat gtatccaaaa gcgcactttg tcaccatctt 11160
 cgcaaaaccg gctggtcgtc cgctggttga tgactatggt gttgatatcc cgcaagatac 11220
 ctggattgaa cagccgtggg atatggcgtc cgtattcgtc ccgccaatct ccggtcgtca 11280
 atcttttcaa cgcctggcac tgcggggcgt tgttcttttt aacttcaggc gggttacaat 11340
 agtttccagt aagtattctg gaggctgcat ccatgacaca ggcaaacctg agcgaaccc 11400
 tgttcaaacc ccgctttaa catcctgaaa cctcgacgct agtccgccgc tttaatcacg 11460
 gcgcacaacc gcctgtgcag tcggcccttg atggtaaac catccctcac tggatcgcga 11520
 tgattaaccg tctgatgtgg atctggcgcg gcattgacc acgcgaaatc ctcgacgtcc 11580
 aggcacgtat tgtgatgagc gatgccgaac gtaccgacga tgatttatac gatacgggtga 11640
 ttggctaccg tggcggaac tggatttatg agtgggcccc ggatctttgt gaaggaaacct 11700
 tacttctgtg gtgtgacata attggacaaa ctacctacag agatttaaag ctctaaggta 11760
 aatataaaat ttttaagtgt ataatgtgtt aaactactga ttctaattgt ttgtgtattt 11820
 tagattccaa cctatggaac tgatgaatgg gagcagtggg ggaatgcctt taatgaggaa 11880
 aacctgtttt gctcagaaga aatgccatct agtgatgatg aggctactgc tgacttctca 11940

cattctactc ctcaaaaaa gaagagaaag gtagaagacc ccaaggactt tccttcagaa 12000
 ttgctaagtt ttttgagtca tgctgtgttt agtaatagaa ctcttgcttg ctttgctatt 12060
 tacaccacaa aggaaaaagc tgcactgcta tacaagaaaa ttatggaaaa atattctgta 12120
 acctttataa gtaggcataa cagttataat cataacatac tgttttttct tactccacac 12180
 aggcatagag tgtctgctat taataactat gctcaaaaat tgtgtacctt tagcttttta 12240
 atttgtaaag gggtaataa ggaatatttg atgtatagtg ccttgactag agatcataat 12300
 cagccatacc acattttag aggttttact tgctttaaaa aacctccac acctccccct 12360
 gaacctgaaa cataaaat 12378

< 211> 24
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
5 < 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 53
gccccctagga aaaagggctg ttgg 24
<210> 54
< 211> 25
10 < 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 54
15 ctaggaaaaa gggctgttg aaatg 25
<210> 55
< 211> 20
< 212> ADN
< 213> Artificial
20 <220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
<400> 55
gtactggatg tgggtgatgc 20
<210> 56
25 < 211> 19
< 212> ADN
< 213> Artificial
<220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores
30 <400> 56
gtgggaaaat tgaattggg 19
<210> 57
< 211> 20
< 212> ADN
35 < 213> Artificial
<220>
< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores

ES 2 639 568 T3

<400> 57

gccacctgga ttctgagtg 20

<210> 58

< 211> 24

5 < 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> Ácido nucleico de VIH-1 lineal/cebadores

<400> 58

10 ctcttttag ctgacatta tcac 24

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para diseñar un régimen farmacológico para un paciente infectado por VIH determinando la susceptibilidad fenotípica del VIH a al menos un fármaco, que comprende:

- 5 i) usar al menos una muestra que comprende ARN de VIH procedente de un paciente, en el que la muestra comprende la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH;
- ii) transcribir de forma inversa y amplificar el ARN de VIH con cebadores específicos para la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa para obtener al menos un amplicón que comprende la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa, en el que al menos un cebador se selecciona de SEQ ID NO: 4-7;
- 10 iii) generar un plásmido que comprende una secuencia de VIH de referencia con una supresión de la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa;
- iv) preparar al menos un virus recombinante mediante recombinación o ligación entre al menos un amplicón obtenido en la etapa ii) y el plásmido que comprende la secuencia de VIH de referencia con una supresión de la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa obtenida en la etapa iii), y
- 15 v) monitorizar al menos un virus recombinante en presencia de al menos un fármaco para determinar la susceptibilidad fenotípica de VIH a al menos un fármaco,

en el que dicha susceptibilidad se determina mediante la fitopatogenicidad de dicho virus recombinante a células, o determinando la capacidad replicativa de dicho virus recombinante en presencia de al menos un fármaco.

20 2. Un método in vitro según la reivindicación 1, para diseñar un régimen farmacológico para un paciente infectado por VIH determinando la susceptibilidad fenotípica del VIH a al menos un fármaco, que comprende:

- i) usar al menos una muestra que comprende ADN de VIH, en el que la muestra comprende la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa;
- 25 ii) amplificar el ADN de VIH con cebadores específicos para la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa para obtener al menos un amplicón que comprende la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa, en el que al menos un cebador se selecciona de SEQ ID NO: 4-7;
- iii) generar un plásmido que comprende una secuencia de VIH de referencia con una supresión de la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa;
- 30 iv) preparar al menos un virus recombinante mediante recombinación o ligación entre al menos un amplicón obtenido en la etapa ii) y el plásmido que comprende la secuencia de VIH de referencia con una supresión de la secuencia codificante de transcriptasa inversa-integrasa de VIH completa obtenida en la etapa iii), y
- v) monitorizar al menos un virus recombinante en presencia de al menos un fármaco para determinar la susceptibilidad fenotípica de VIH a al menos un fármaco,

35 en el que dicha susceptibilidad se determina mediante la fitopatogenicidad de dicho virus recombinante a células, o determinando la capacidad replicativa de dicho virus recombinante en presencia de al menos un fármaco.

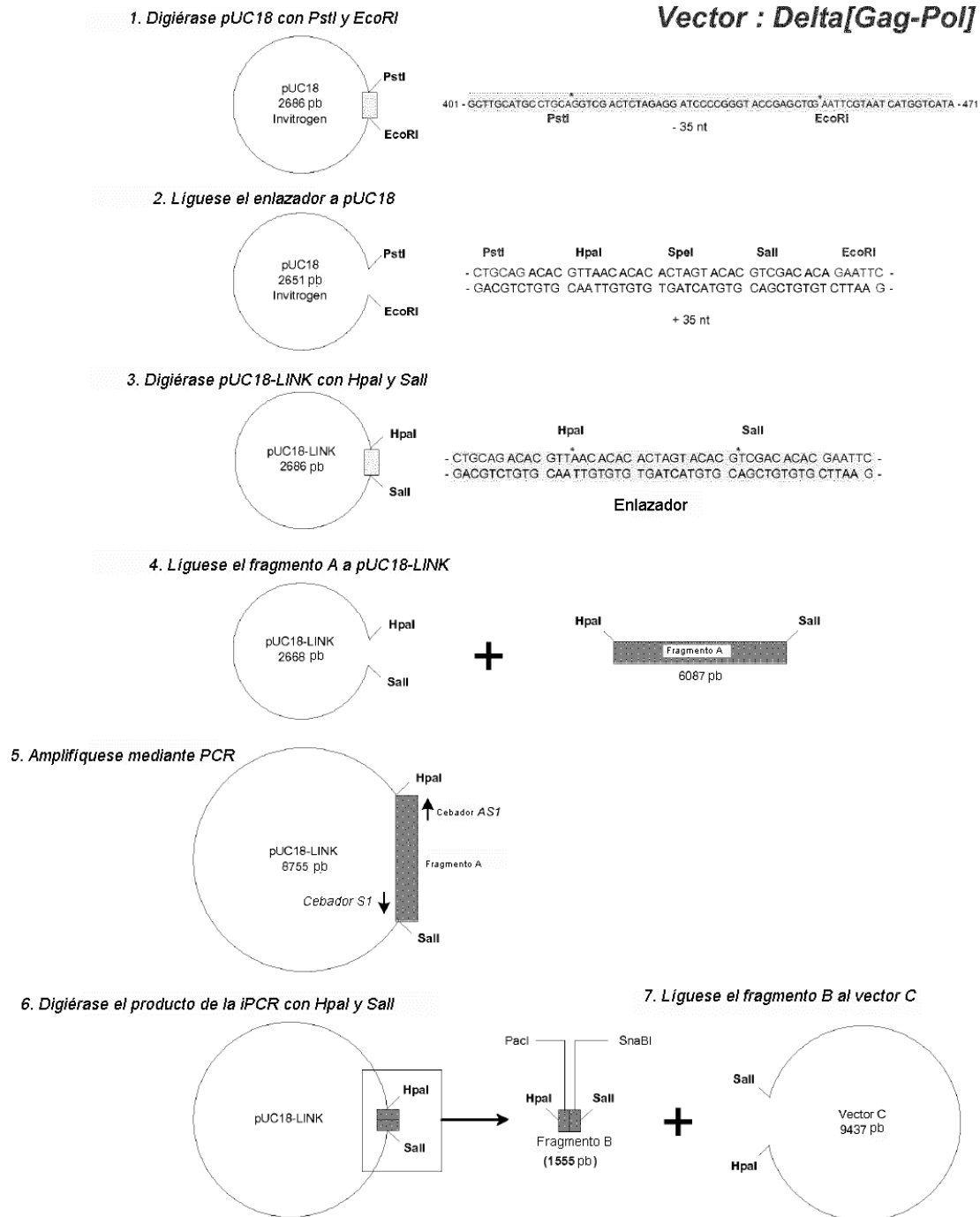


Figura 1: Creación del esqueleto de delta[GAG-POL] basado en el vector de VIH-1 HXB2D_eGFP.

Detalle de las etapas 5, 6 y 7

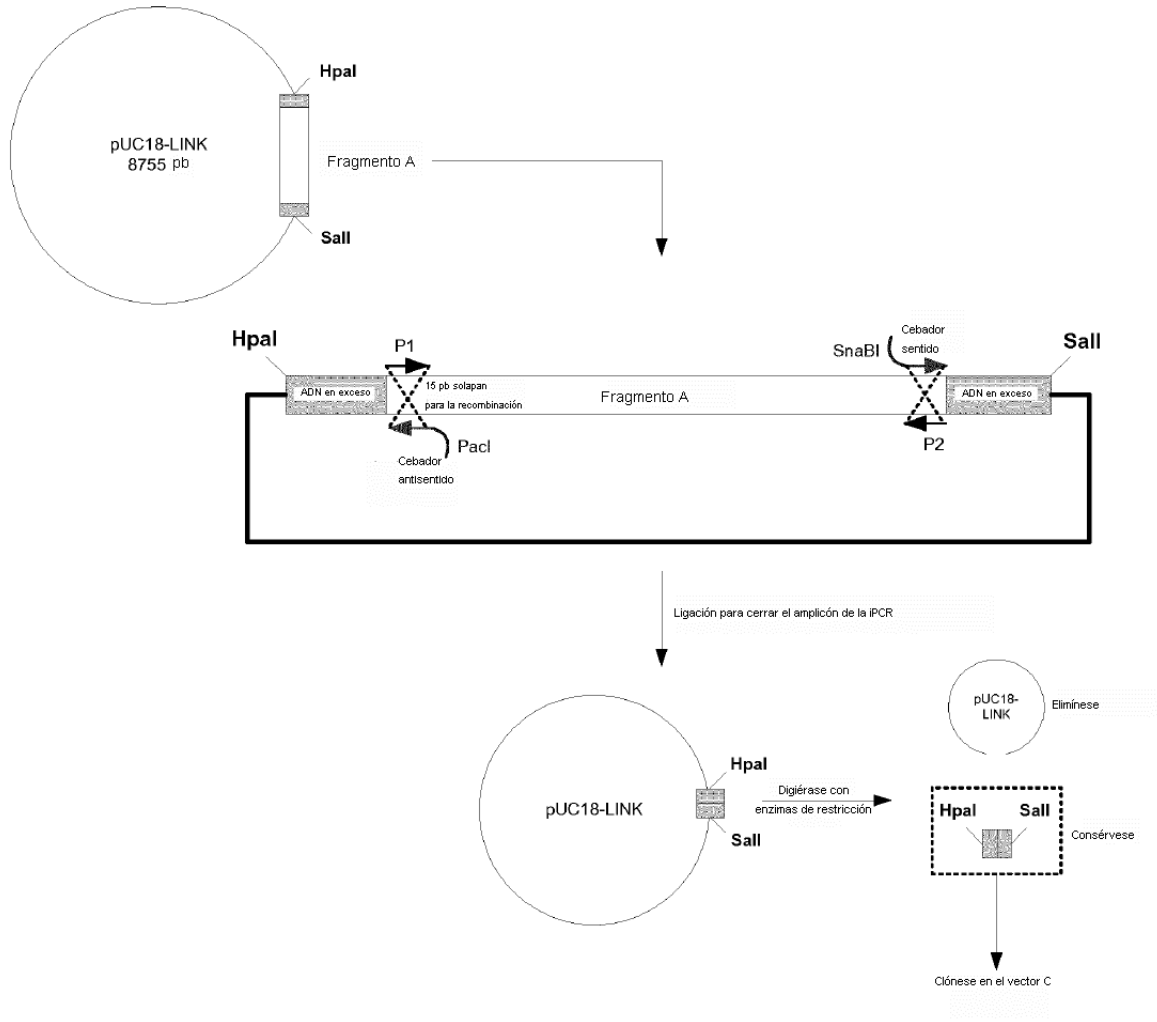


Figura 2: Detalle de la descripción de la reacción de "PCR inversa"

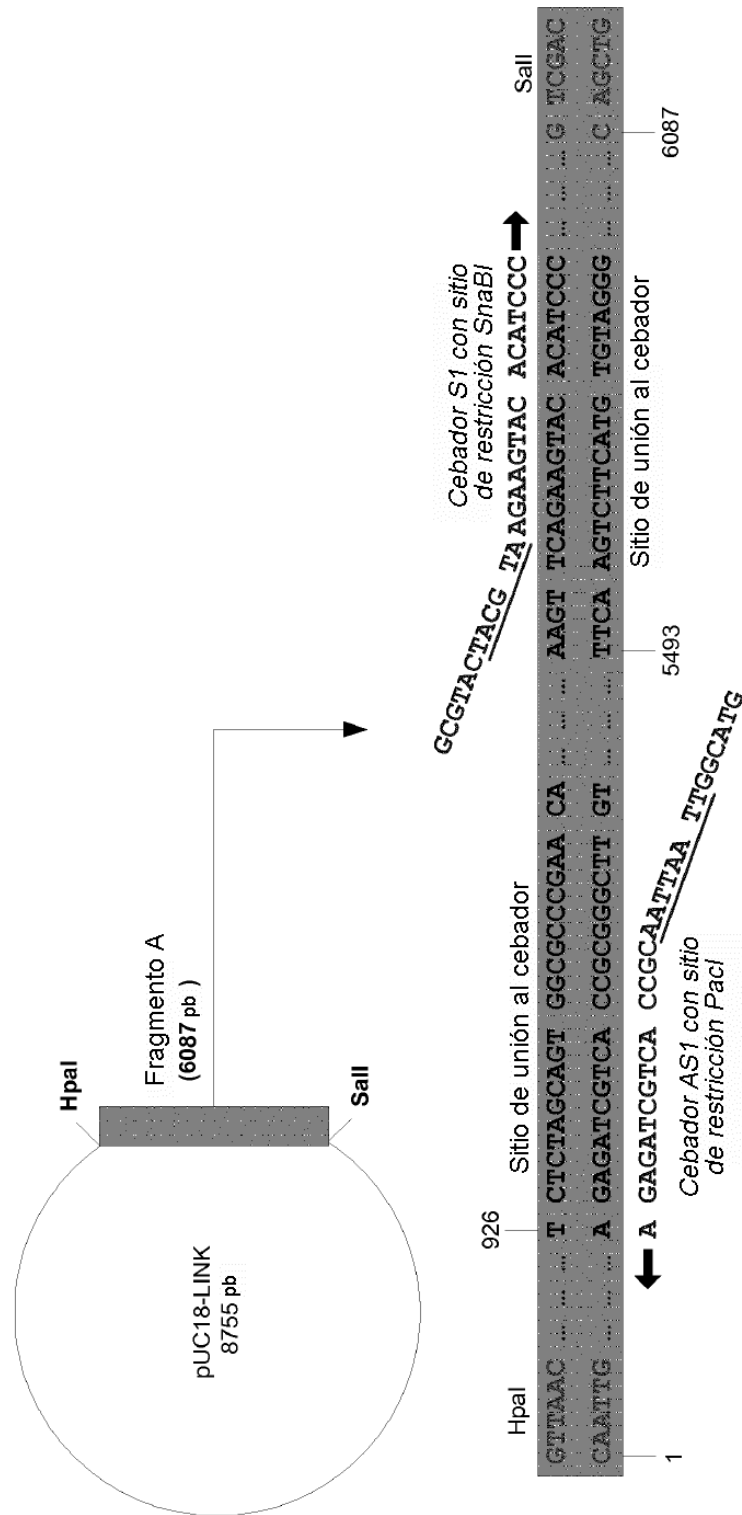


Figura 3: Cebadores para "PCR inversa" que contienen los sitios de restricción PacI y SnaBI.

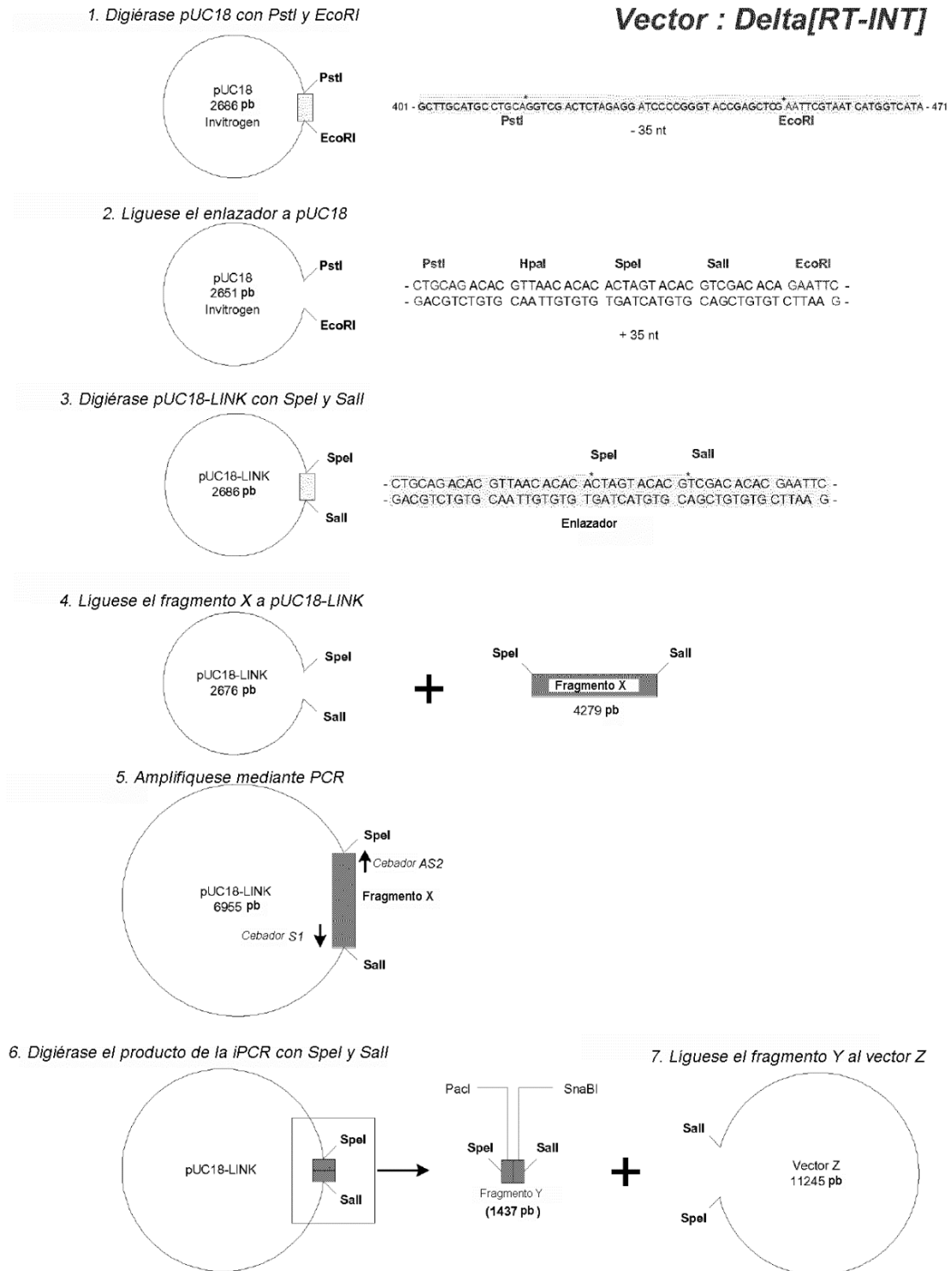


Figura 4: Creación del esqueleto de delta[RT-INT] basado en el vector de VIH-1 HXB2D_eGFP.

Detalle de las etapas 5, 6 y 7

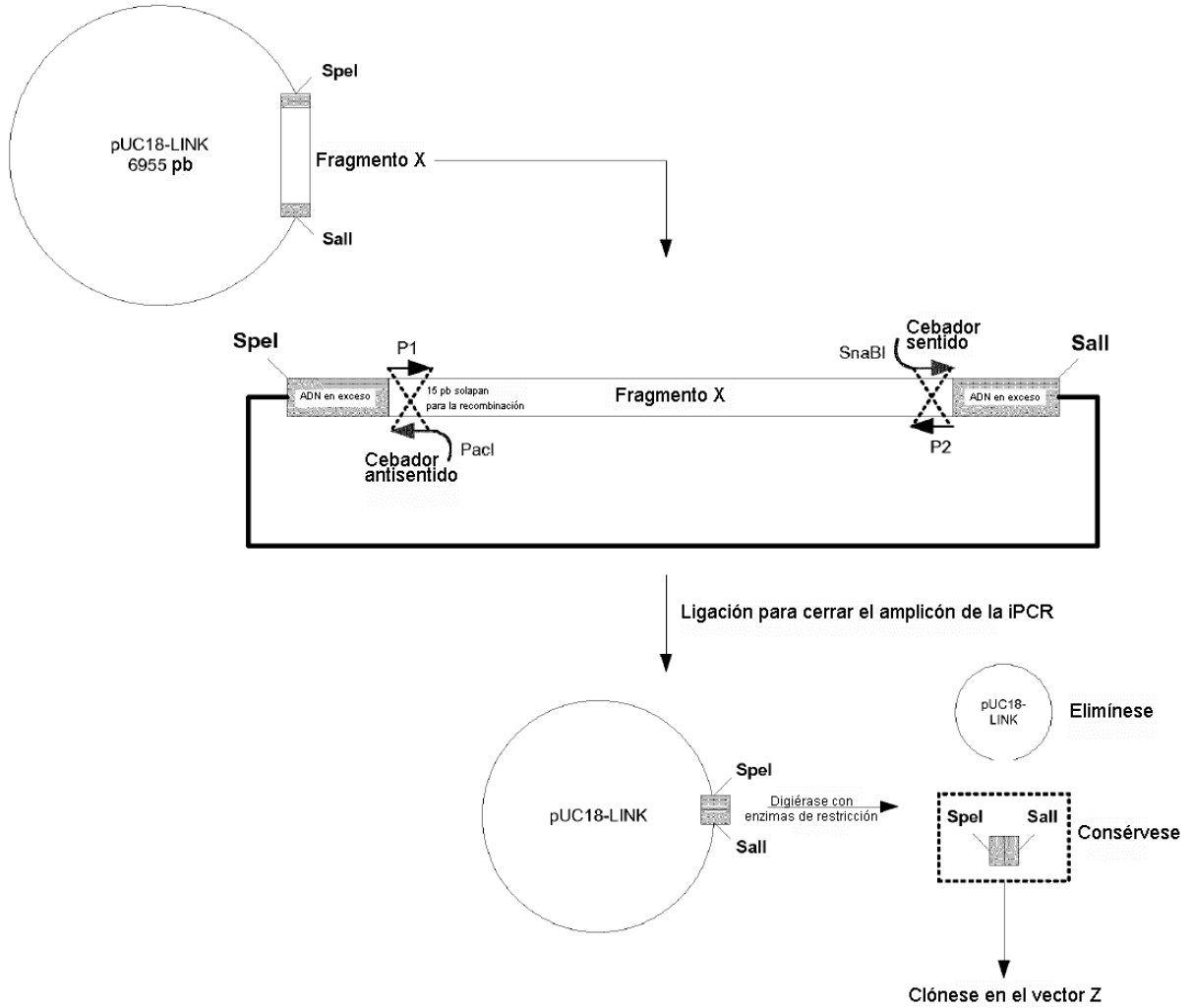


Figura 5: Descripción detallada de la reacción de "PCR inversa".

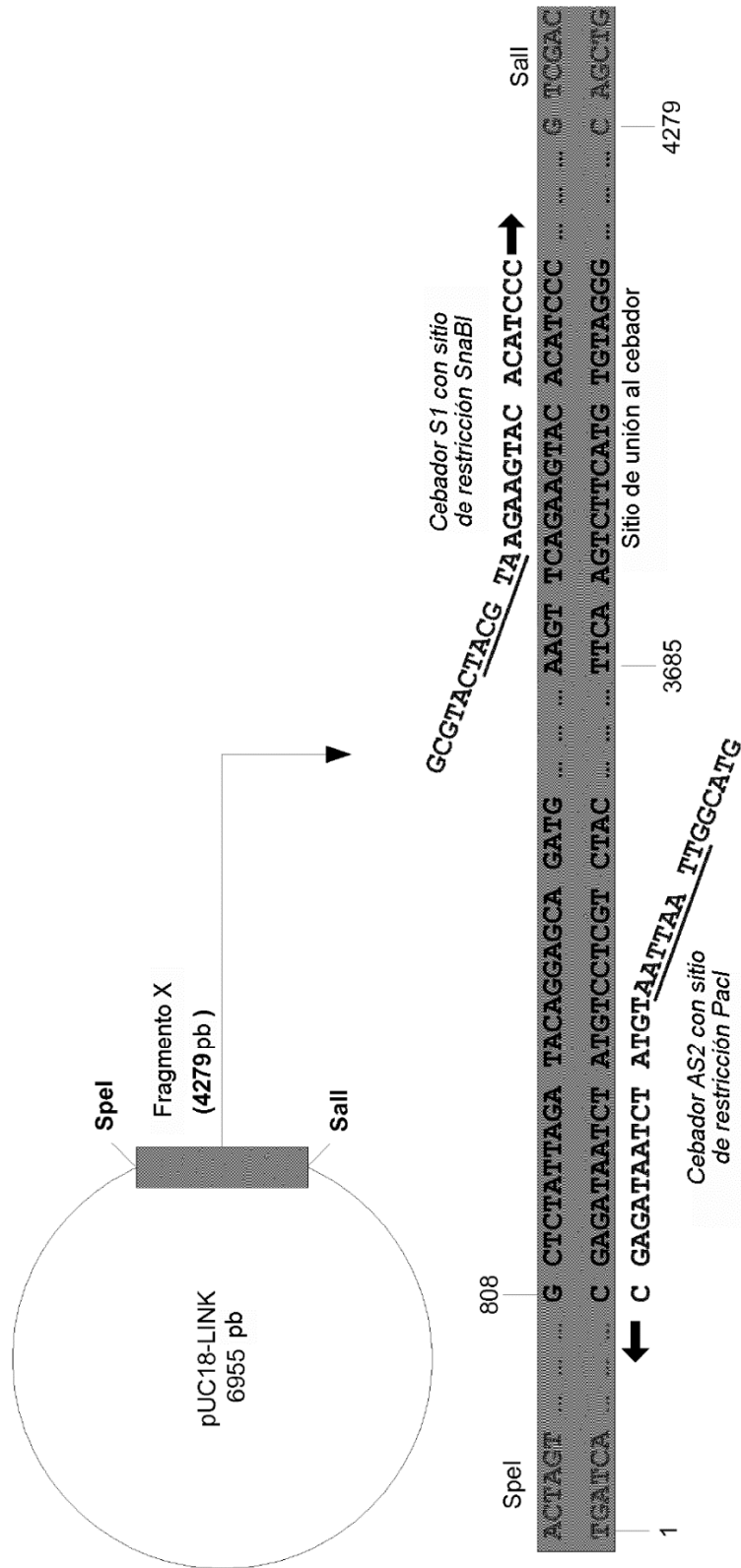


Figura 6: Cebadores para "PCR inversa" que contienen los sitios de restricción Pacl y SnaBI.

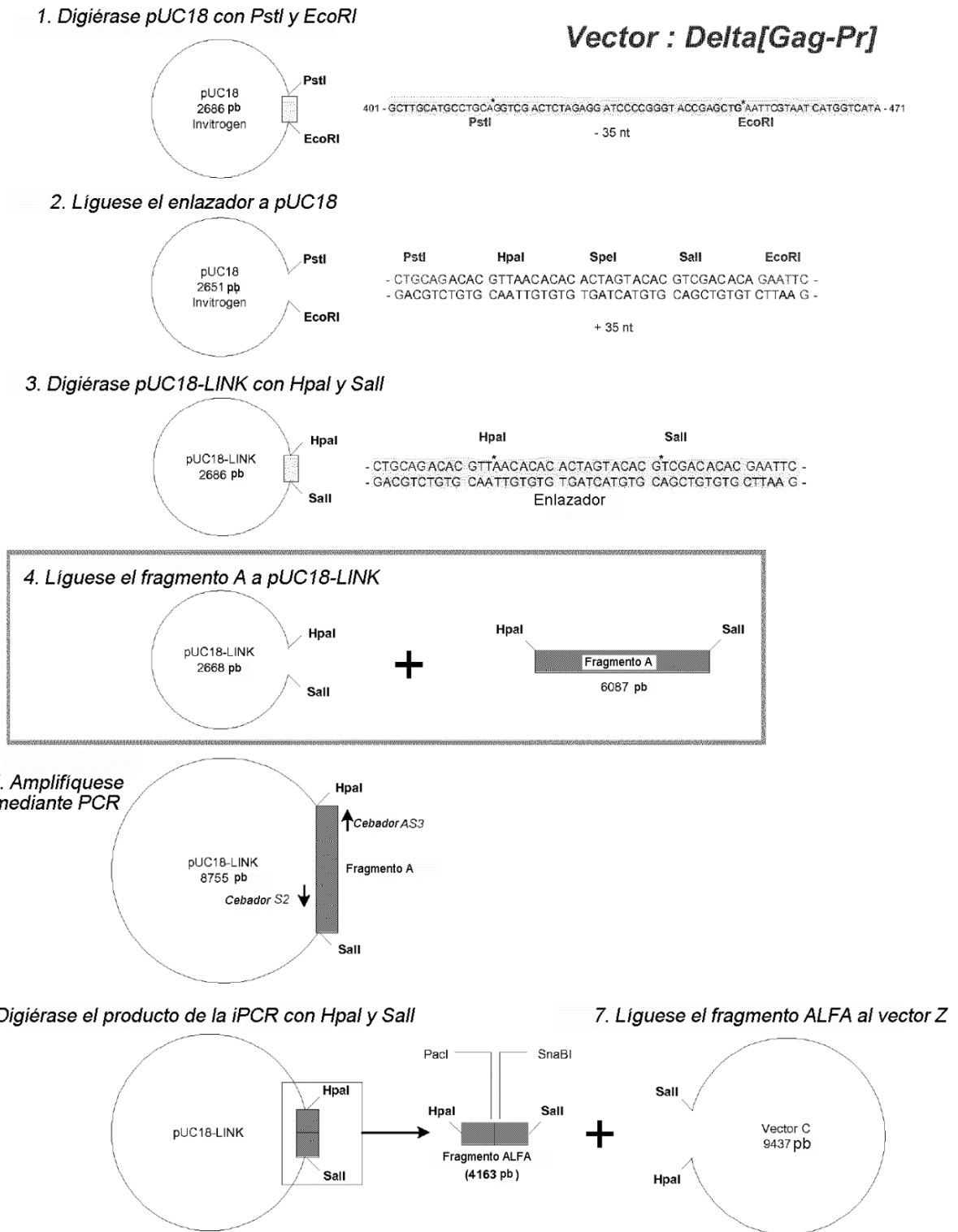


Figura 7: Creación del esqueleto de delta[GAG-PR] basado en el vector de VIH-1 HXB2D_eGFP.

Detalle de las etapas 5, 6 y 7

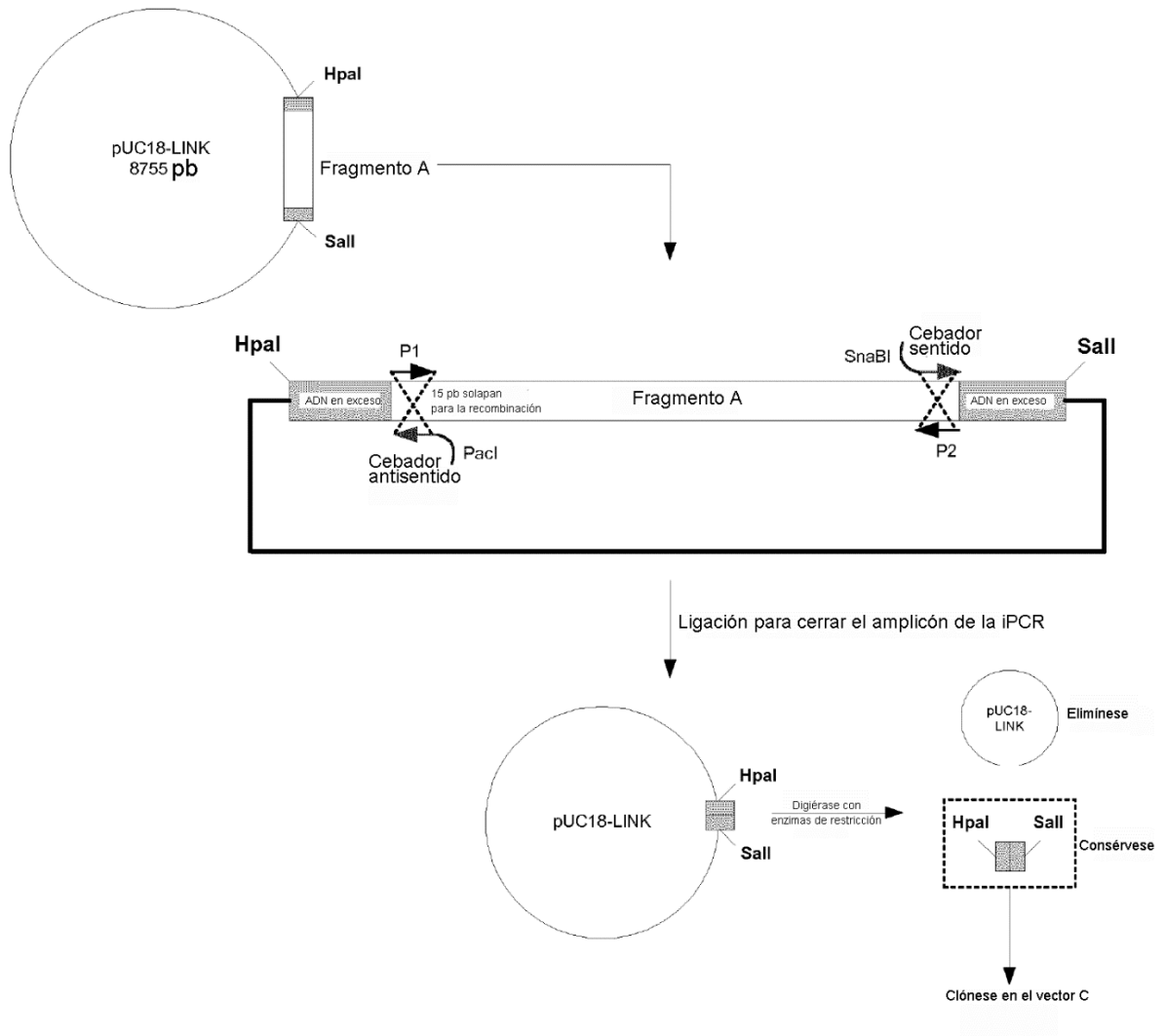


Figura 8: Descripción detallada de la reacción de "PCR inversa".

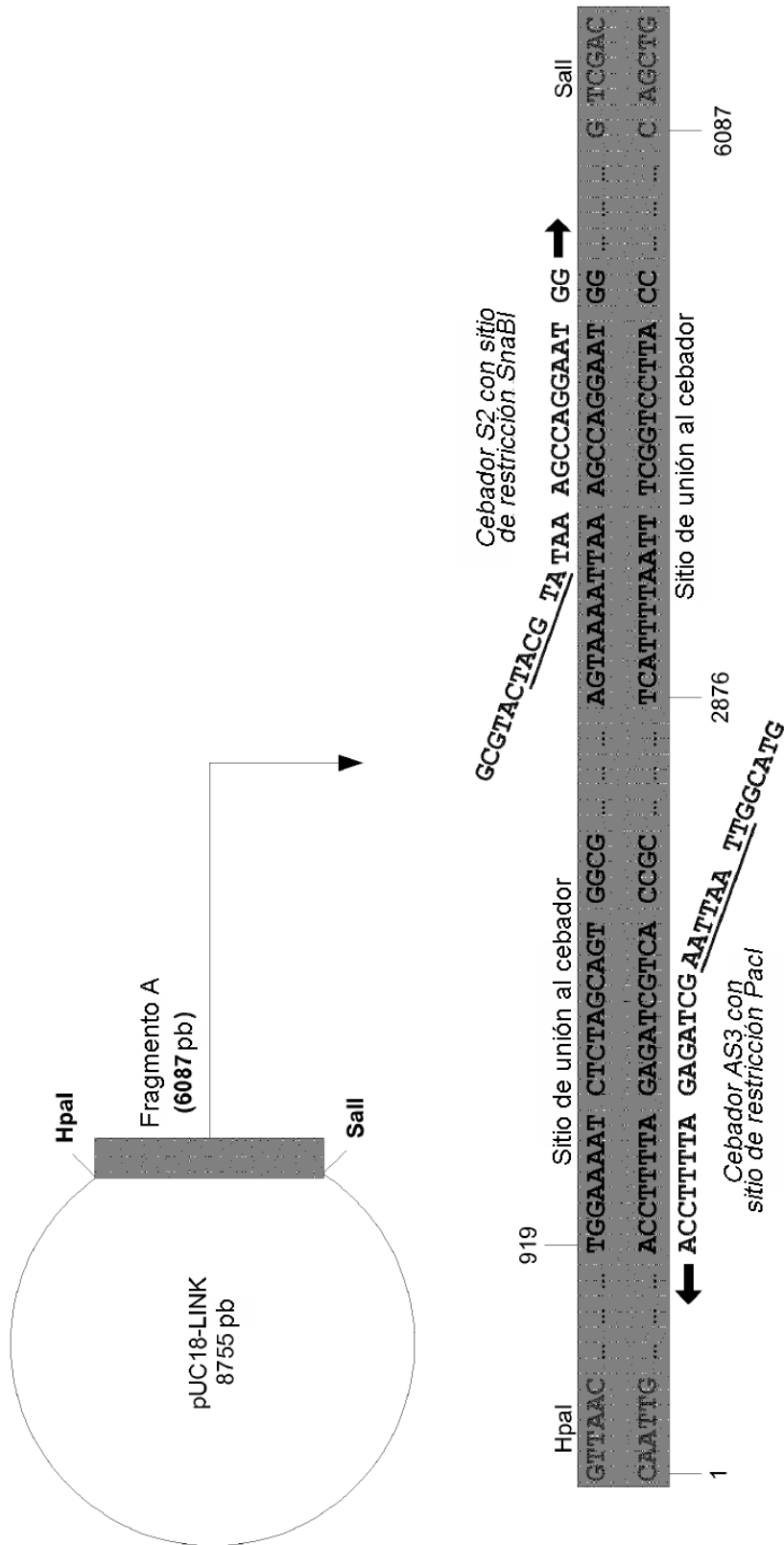


Figura 9: Cebadores para "PCR inversa" que contienen los sitios de restricción PacI y SnaBI

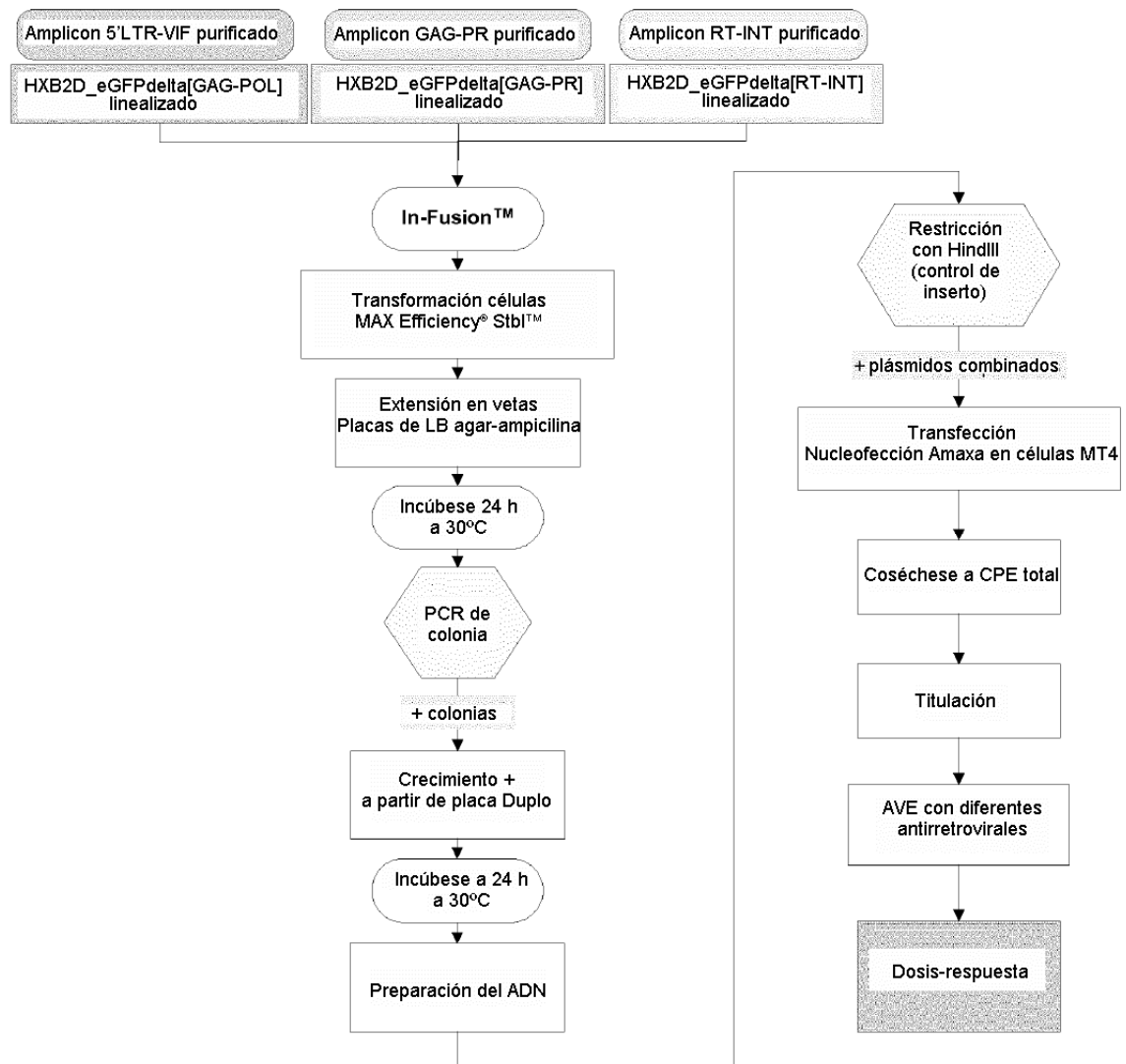
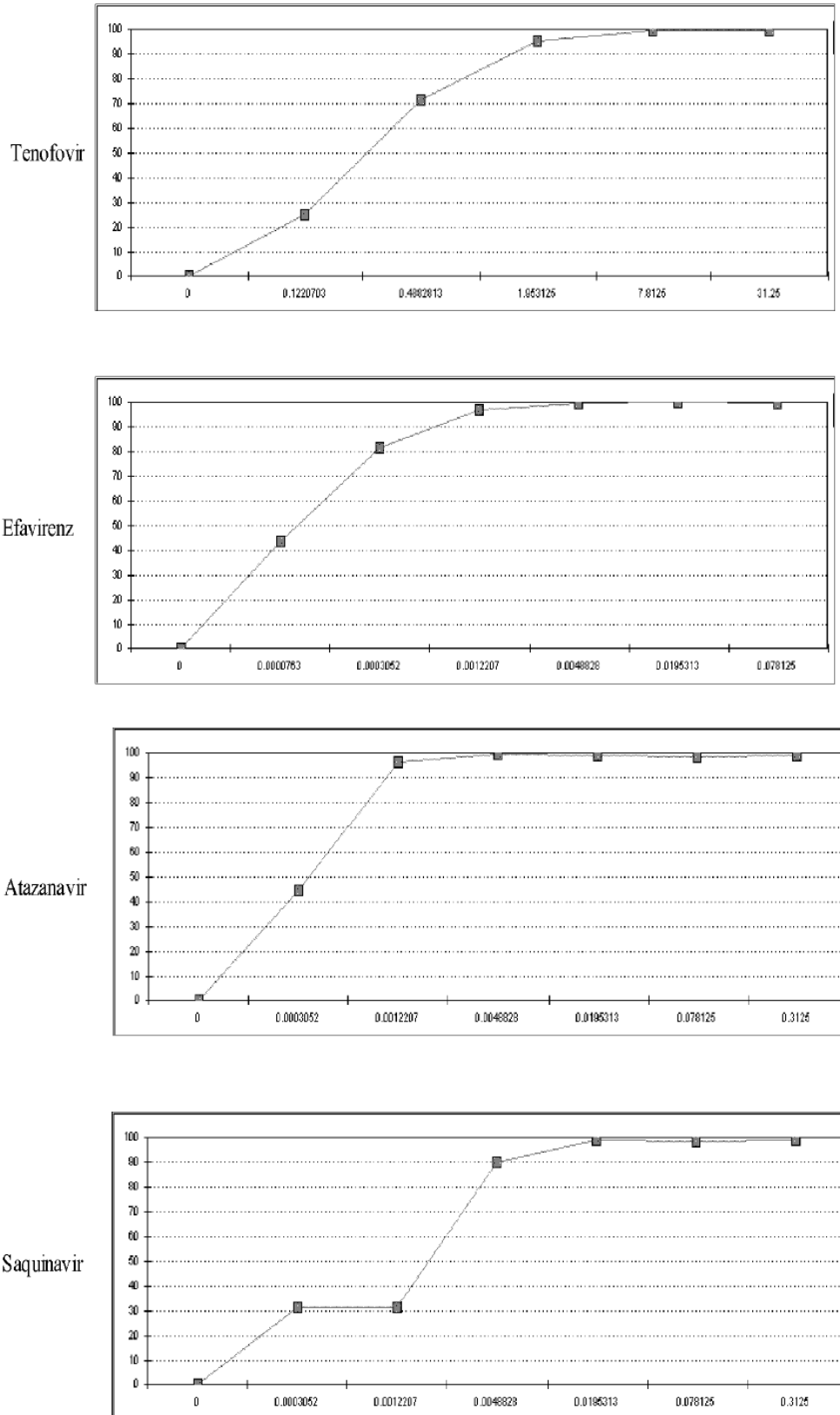
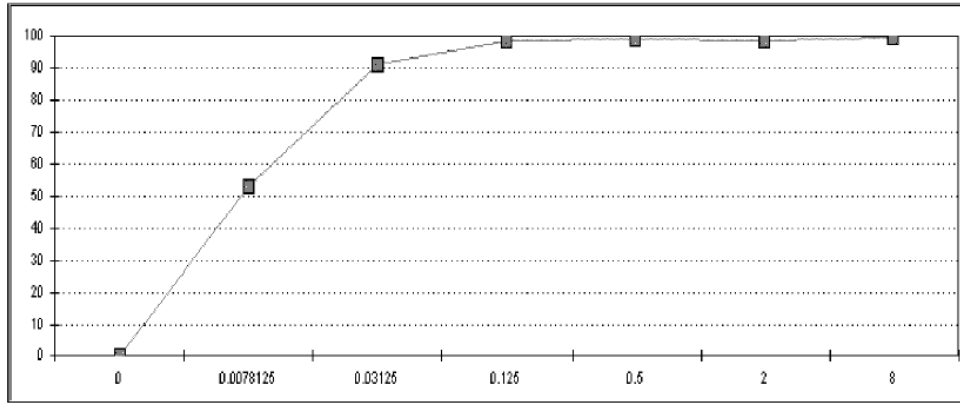


Figura 10: Diagrama de producción fenotípica

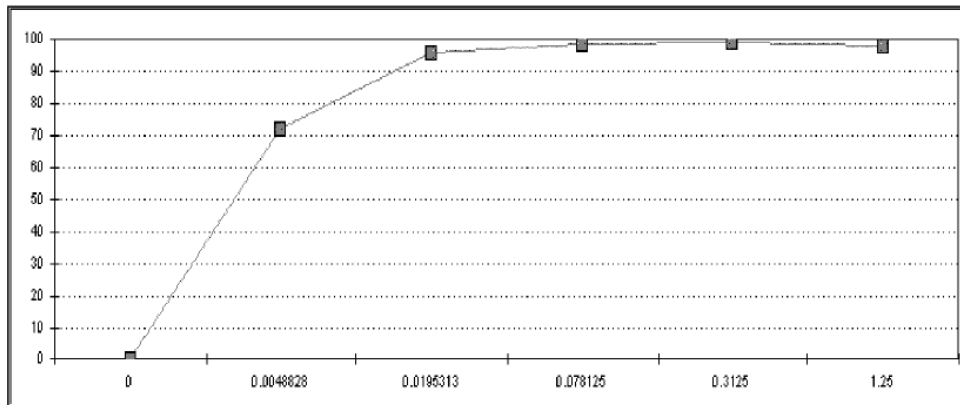
Figura 11: Curvas de respuesta frente a la dosis para 1 lote de virus recombinante de GAG-POL.



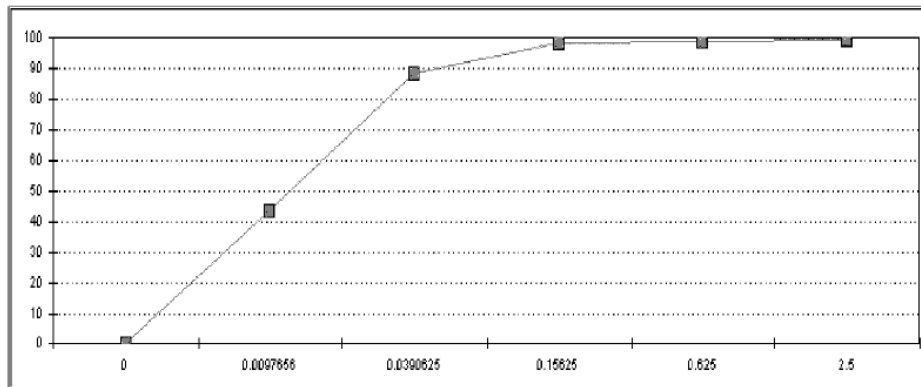
PA457



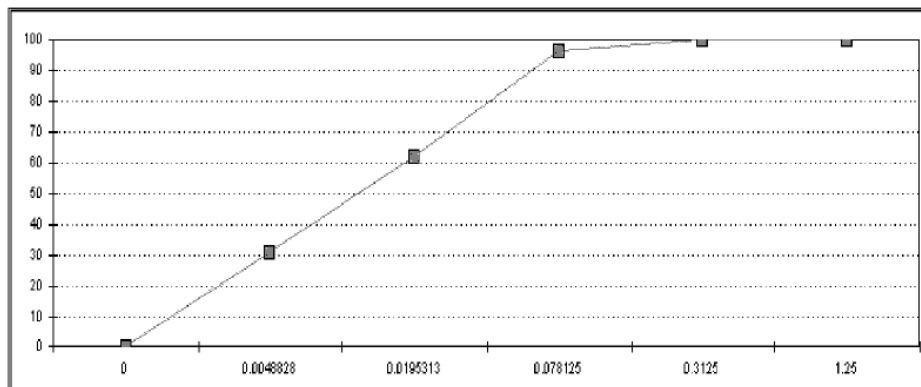
Indinavir



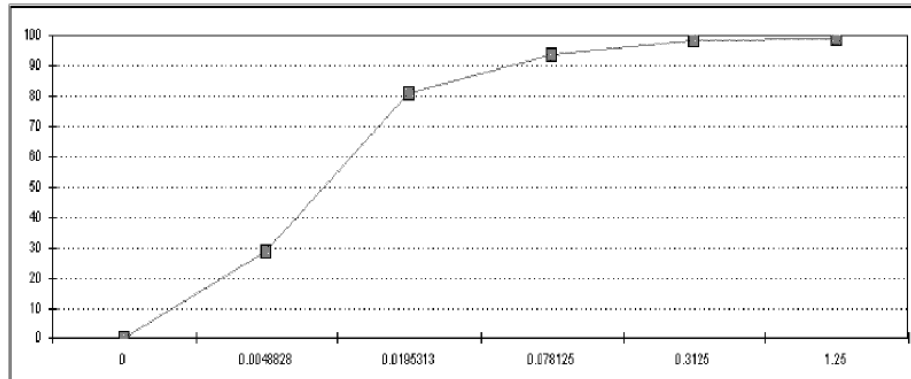
Ritonavir



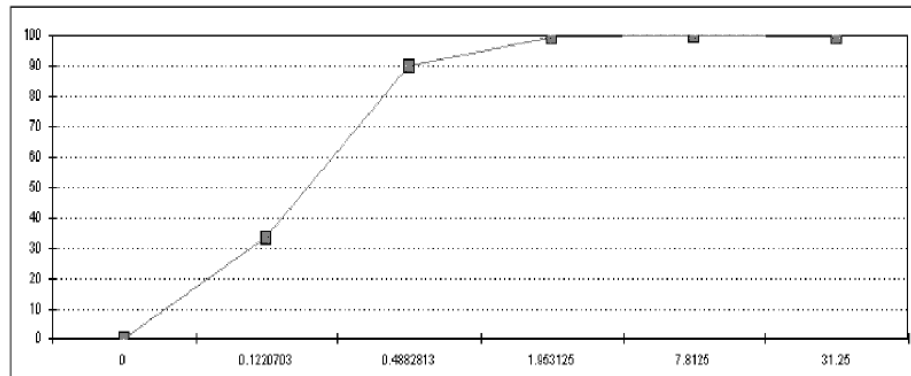
Nevirapina



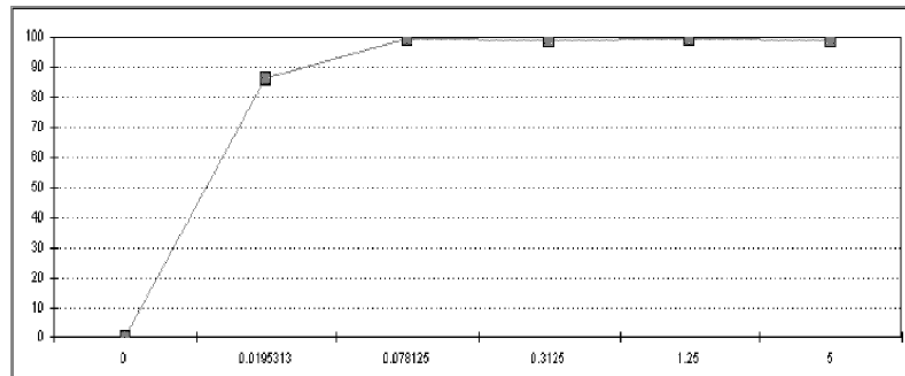
Nelfinavir



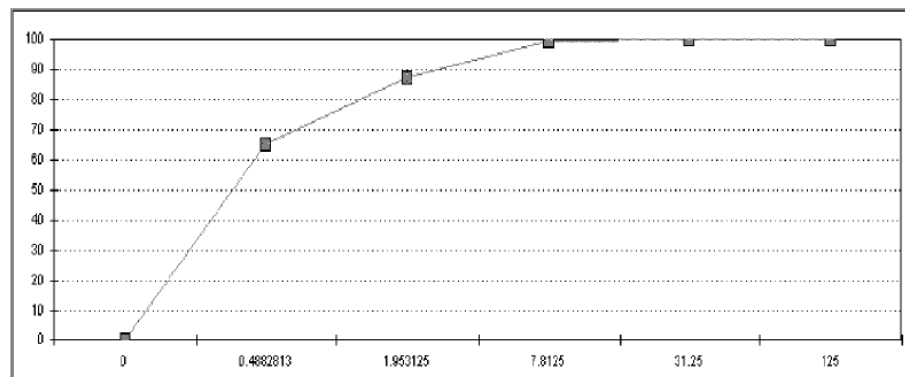
Lamivudina



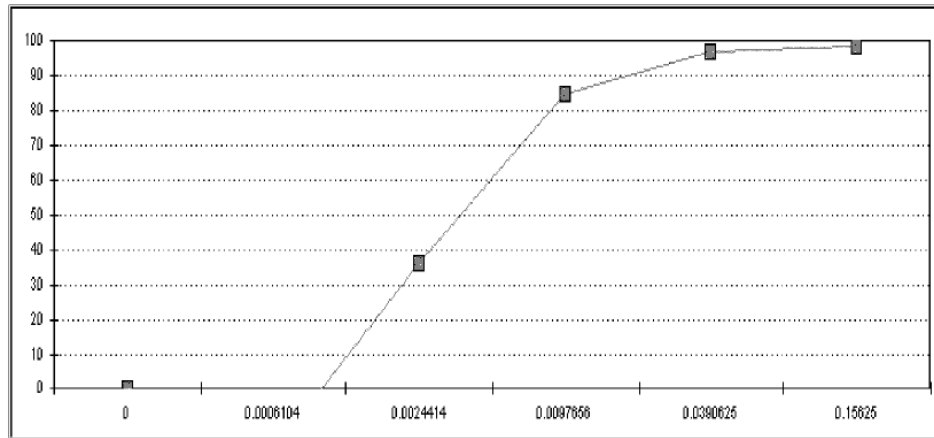
Tipranavir



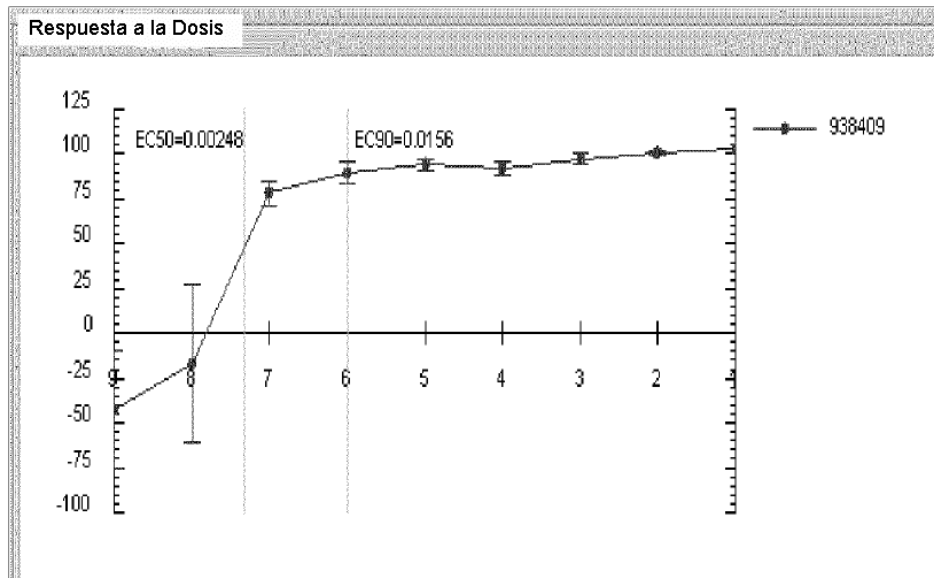
Abacavir



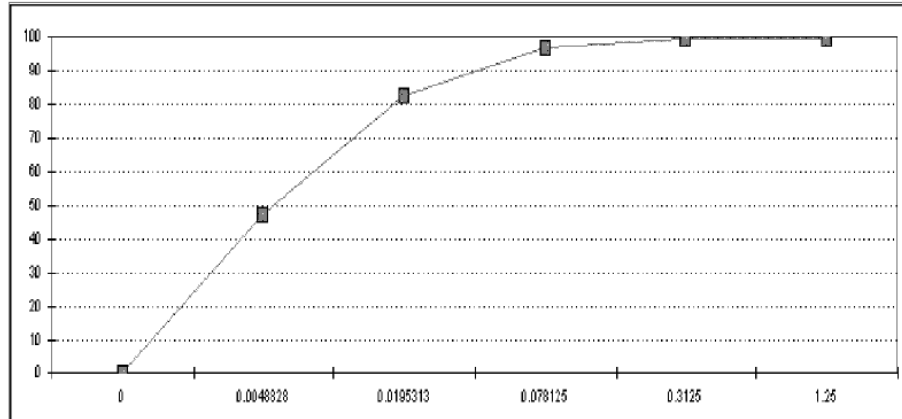
Lopinavir



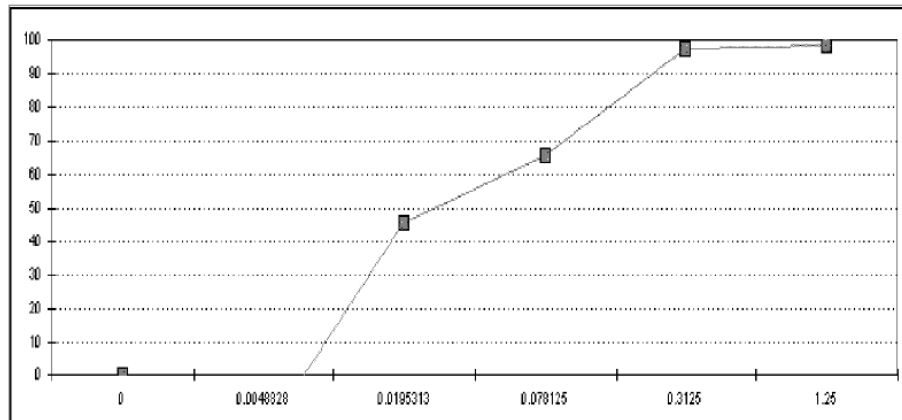
GS9137



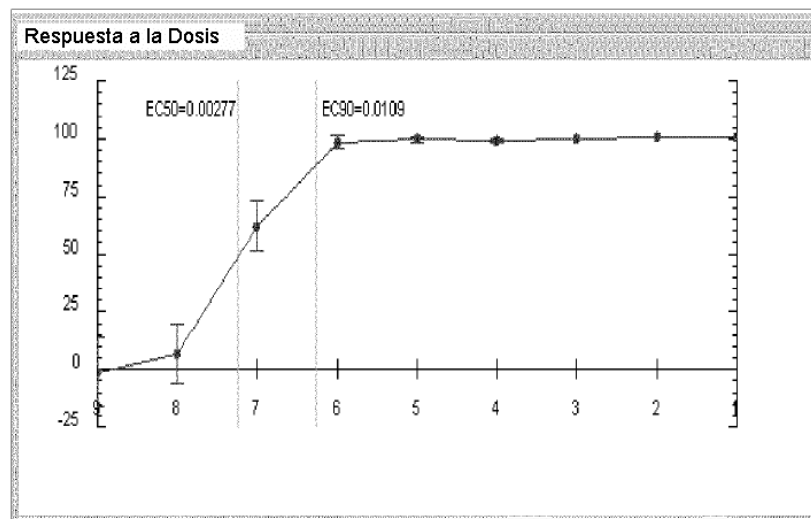
Zidovudina



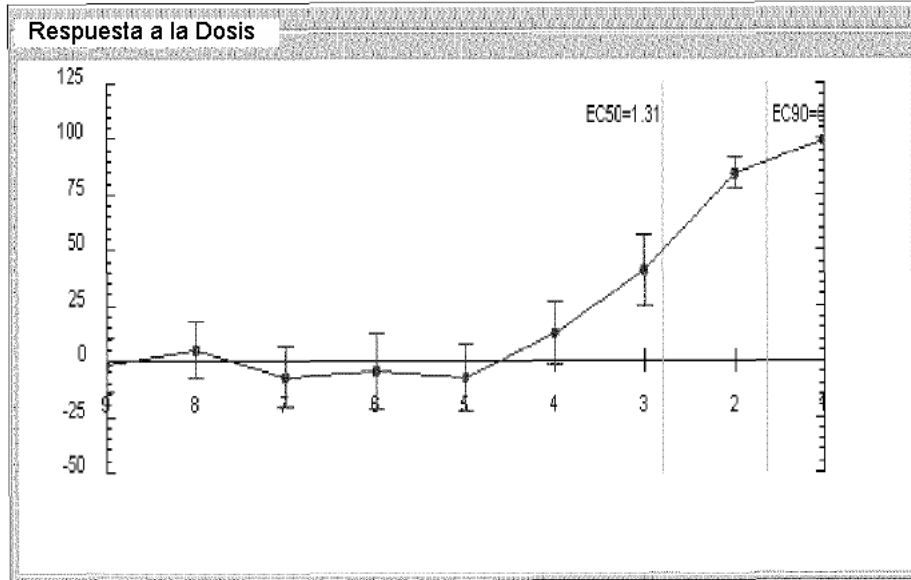
Amprenavir



Merck L870,810

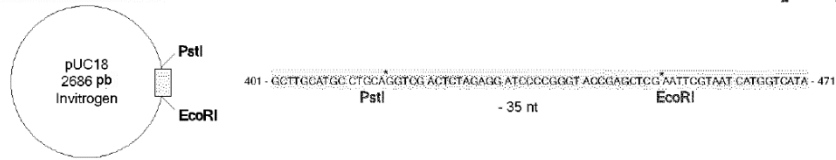


Merck L731,988

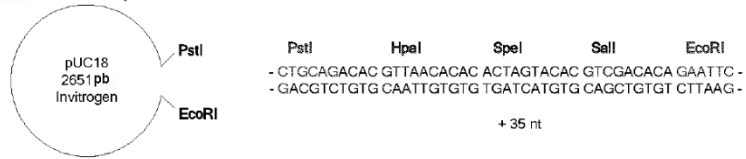


1. Digiérase pUC18 con PstI y EcoRI

Vector: Delta[Pol]



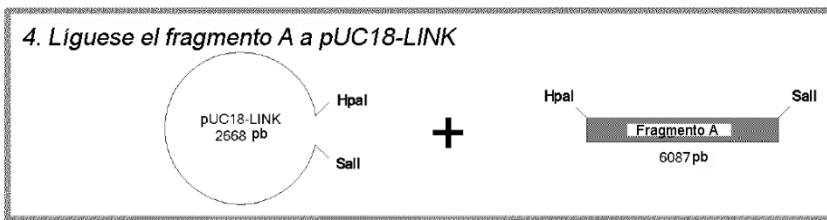
2. Liguense el enlazador a pUC18



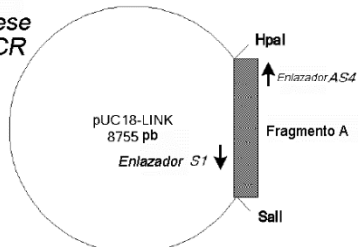
3. Digiérase pUC18-LINK con HpaI y Sall



4. Liguense el fragmento A a pUC18-LINK



5. Amplifíquese mediante PCR



6. Digiérase el producto de la iPCR con HpaI y Sall

7. Liguense el fragmento P al vector C

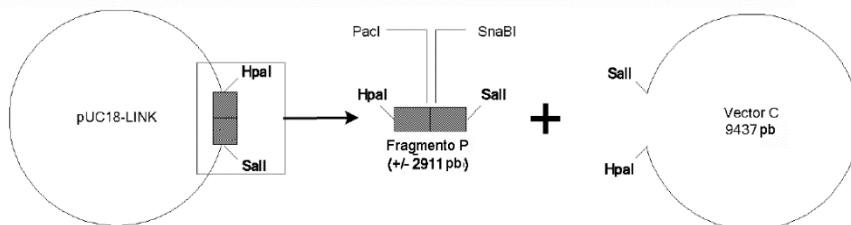


Figura 12: Creación del esqueleto de delta[Pol] basado en el vector de VIH-1 HXB2D_eGFP.

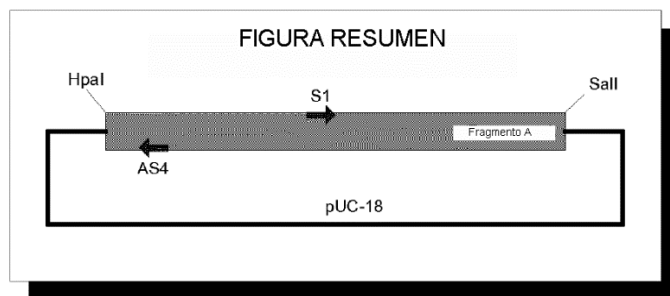
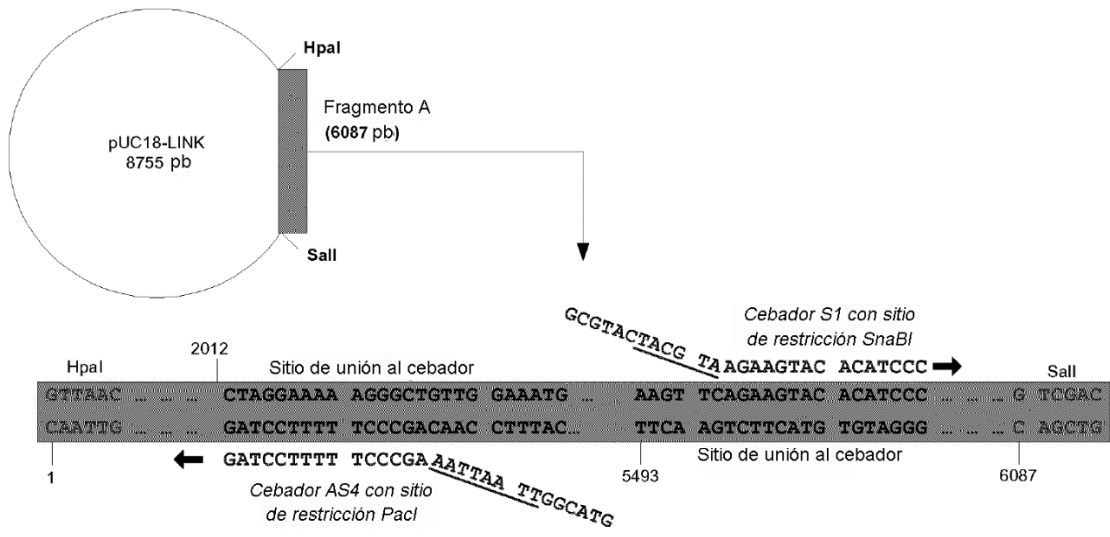


Figura 13: Cebadores para "PCR inversa" que contienen los sitios de restricción PacI y SnaBI.