

# CARACTERITZACIÓ DE L'ACTIVITAT I EL FENOTIP DE LA PROTEASA DEL VIH-1 MITJANÇANT UN SISTEMA DE CRIBRATGE GENÈTIC BASAT EN EL BACTERIÒFAG LAMBDA

Marta Cabana  
Badalona, 2002

Fundació irsiCaixa

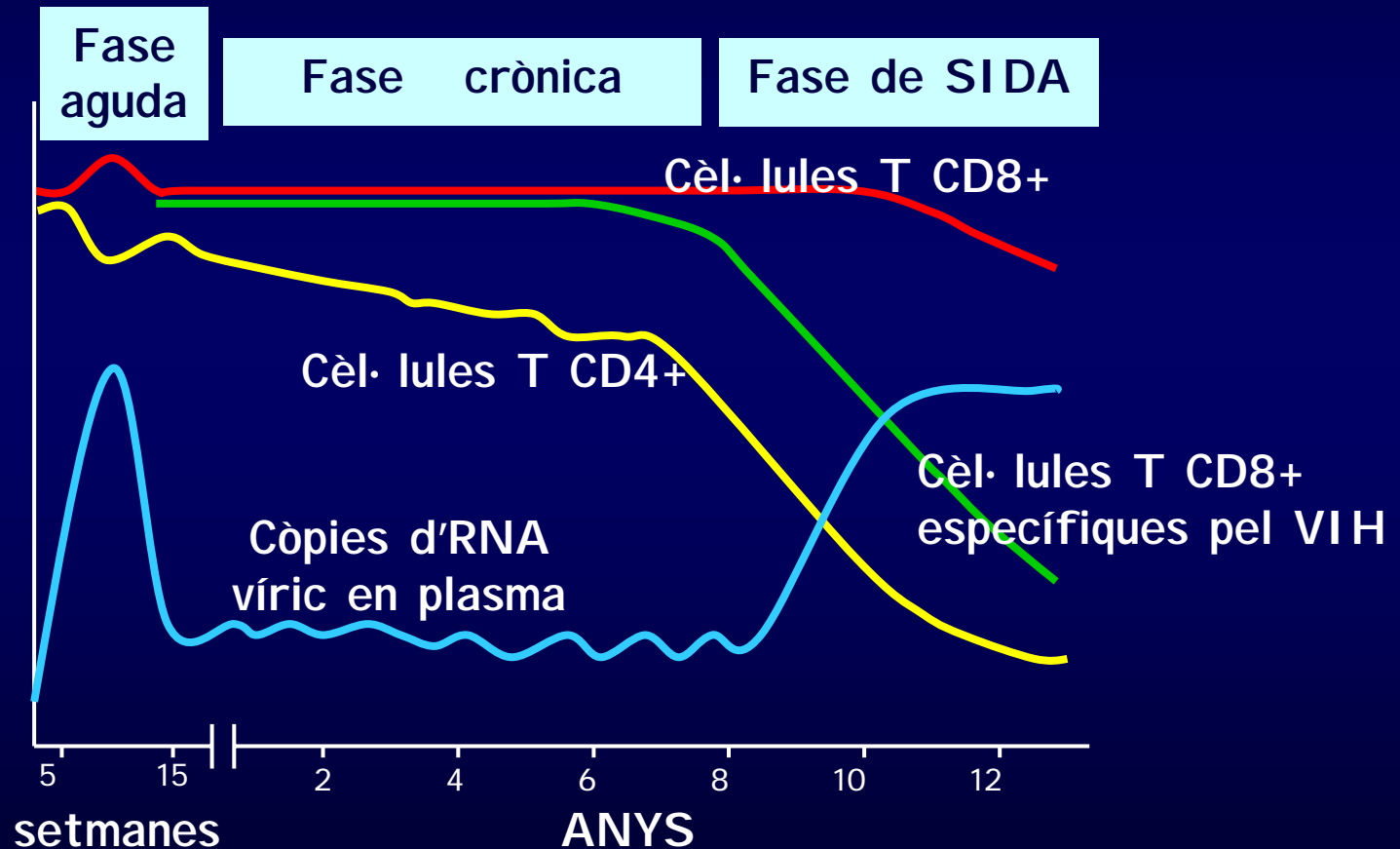
Laboratori de Retrovirologia  
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol

# NOMBRE ESTIMAT D'ADULTS I NENS VIVINT AMB EL VIH/SIDA A FINALS DEL 2001



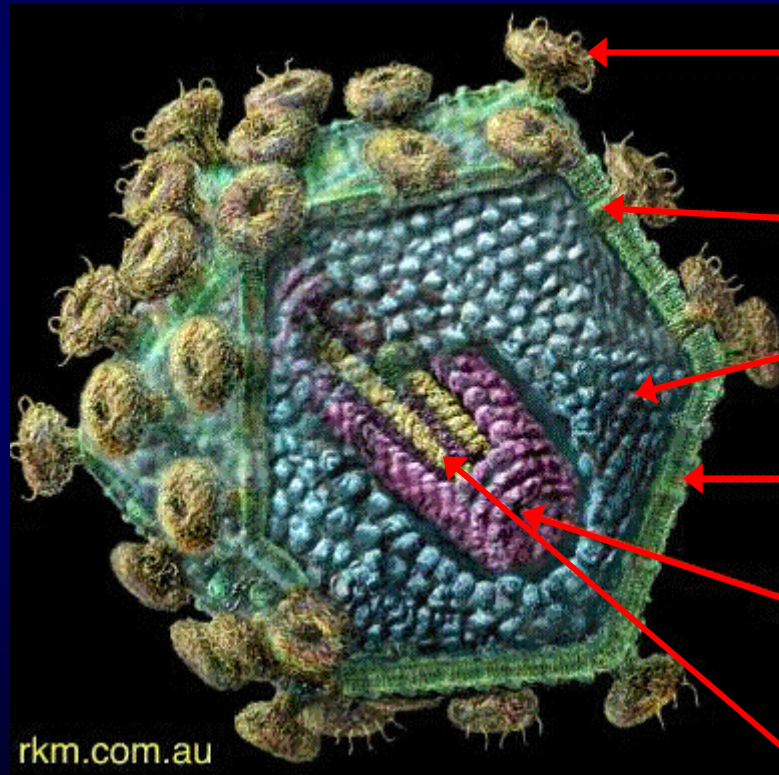
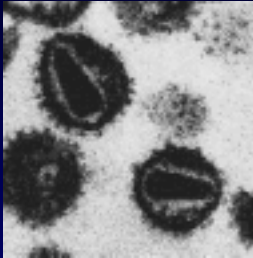
**Total: 40 milions**

# CURS NATURAL DE LA INFECCIÓ PEL VIH-1



# ESTRUCTURA DEL VIH-1

---



**SU** (gp120)

**TM** (gp41)

**MA** (proteines  
de la matriu, p17)

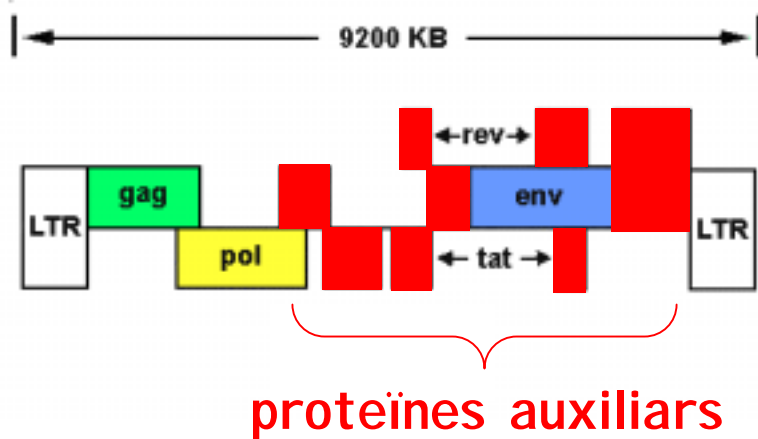
**Embolcall**

**Càpsida**  
(CA o p24)

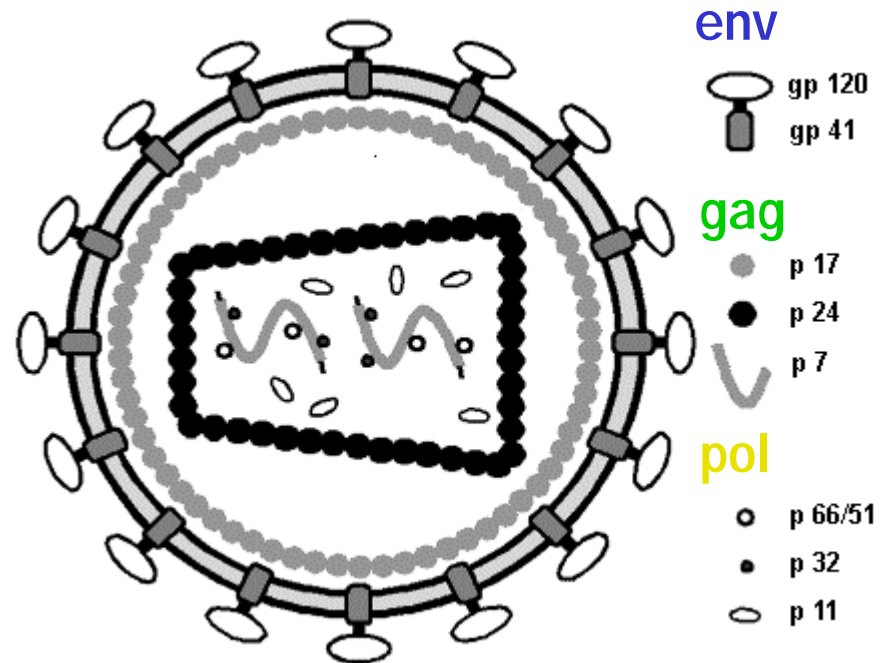
**RNA i NC** (p7)

# GENOMA DEL VIH-1

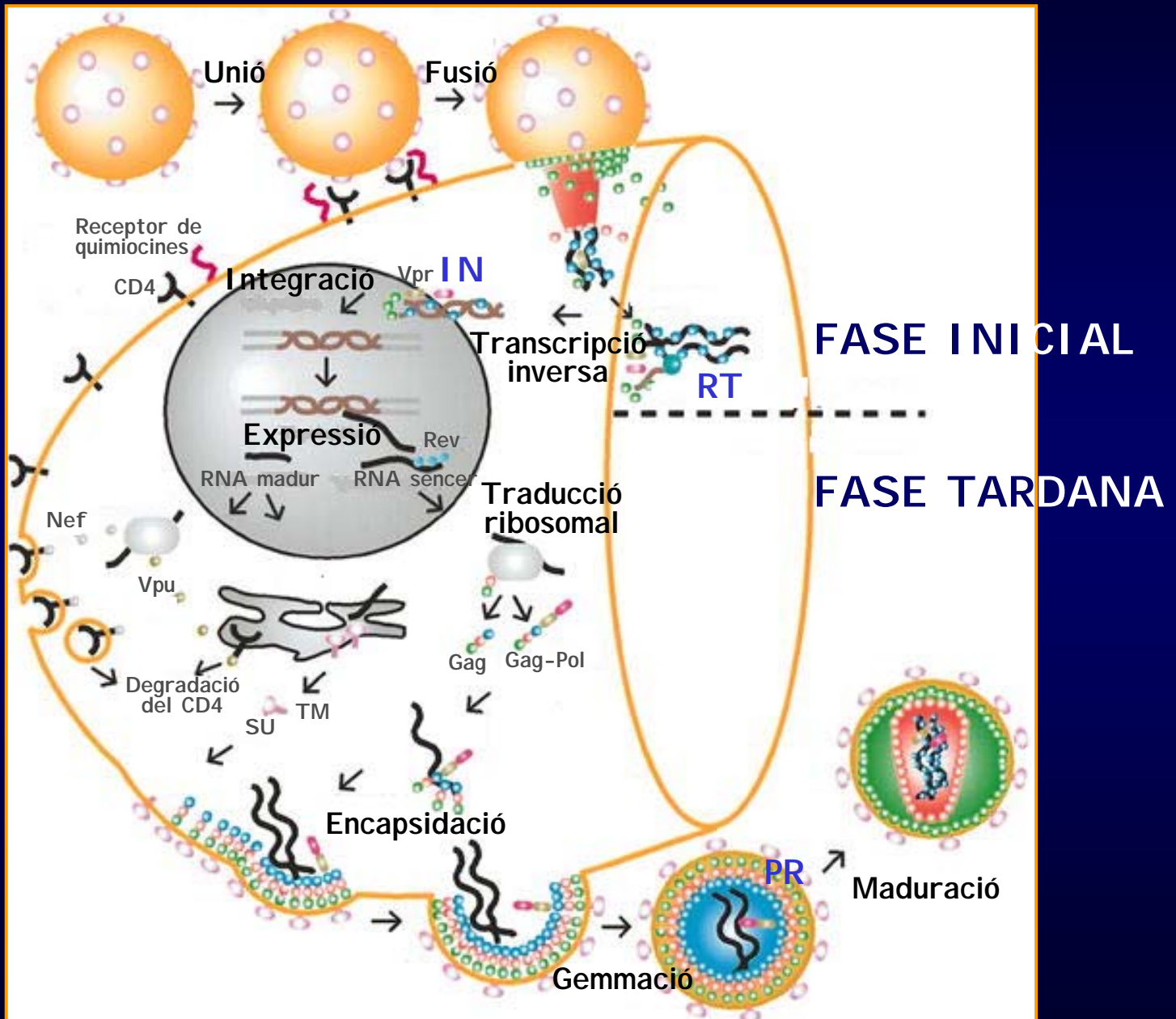
## DNA PROVIRAL DEL HIV-1



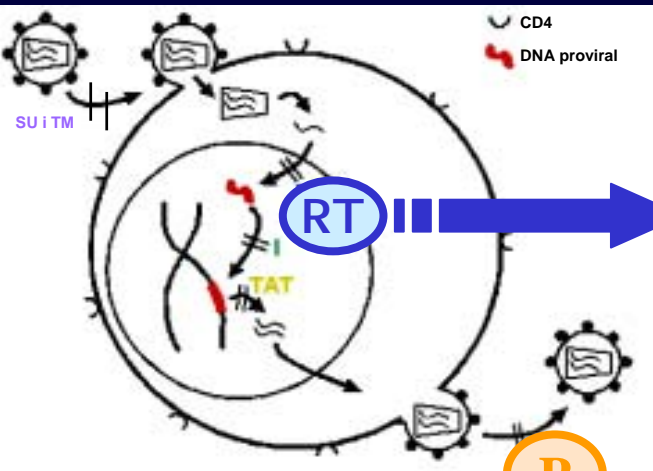
## PARTÍCULA DEL HIV-1



# CICLE DE REPLICACIÓ DEL VIH-1



# DIANES DE LA TERÀPIA ANTIRETROVIRAL



## INHIBIDORS DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA ANÀLEGS DE NUCLEÒSIDS (ITIAN)

- Zidovudina (AZT)
- Didanosina (ddI)
- Lamivudina (3TC)

## INHIBIDORS DE LA PROTEASA(IP)

- Zalcitabina (ddC)
- Saquinavir (SQV)
- Abacavir (ABC)
- Ritonavir (RTV)
- Indinavir (IDV)

## INHIBIDORS DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA NO ANÀLEGS DE NUCLEÒSIDS (ITINN)

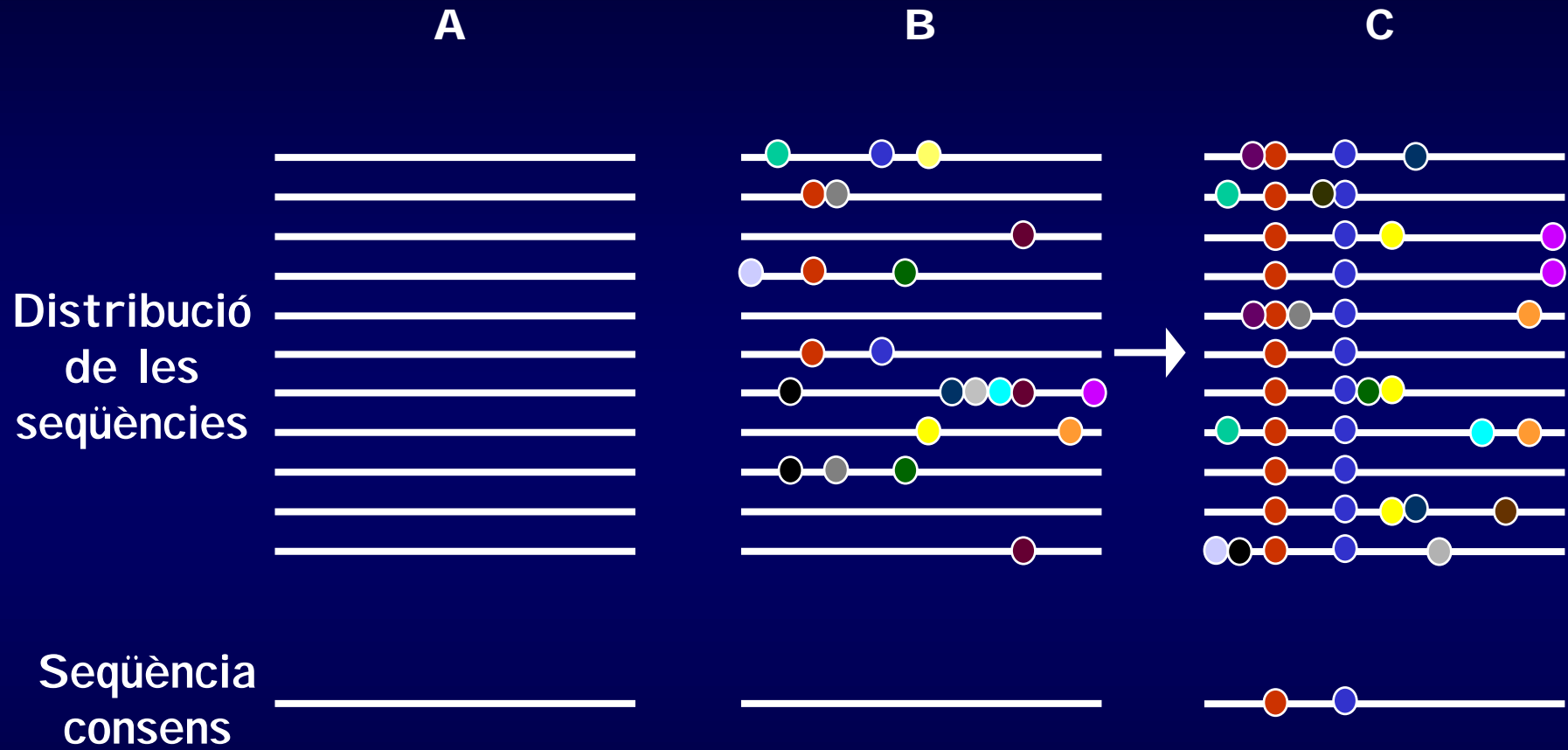
- Nevirapina (NVP)
- Lopinavir
- Delavirdina (DLV)
- Efavirenz (EFV)

# DINÀMICA DE DESENVOLUPAMENT DE RESISTÈNCIES DEL VIH

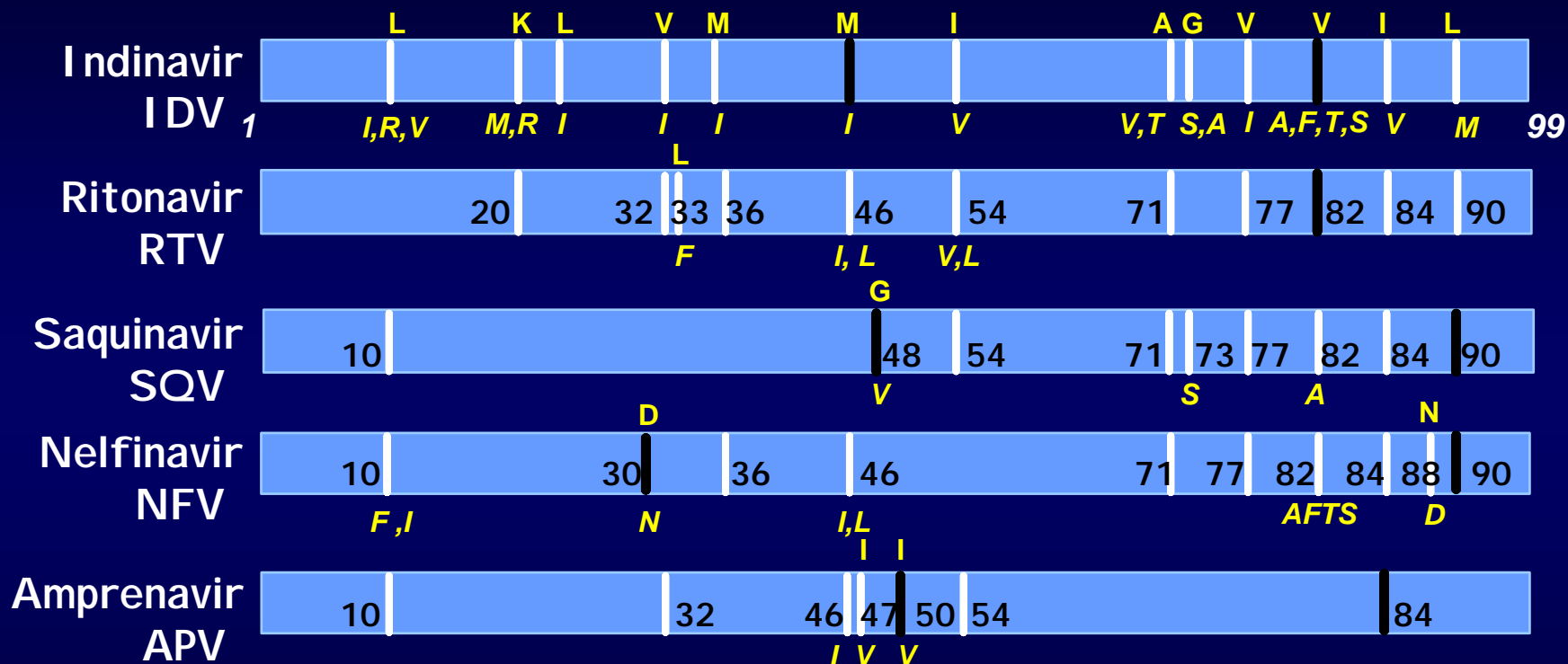
---

- La RT del VIH no posseeix activitat de correcció de còpia, sent la taxa de mutació a cada cicle de replicació de  $3 \times 10^{-5}$  mutacions/nt (Mansky and Temin. J. Virol.,1995).
- La taxa de generació del VIH és de  $10^8$ - $10^{10}$  nous virions per dia ( Wei et al. Nature,1995; Ho et al. Nature, 1995).
- El genoma del VIH conté  $10^4$  nt.
- Així, diàriament poden generar-se variants amb mutacions individuals o dobles mutacions.



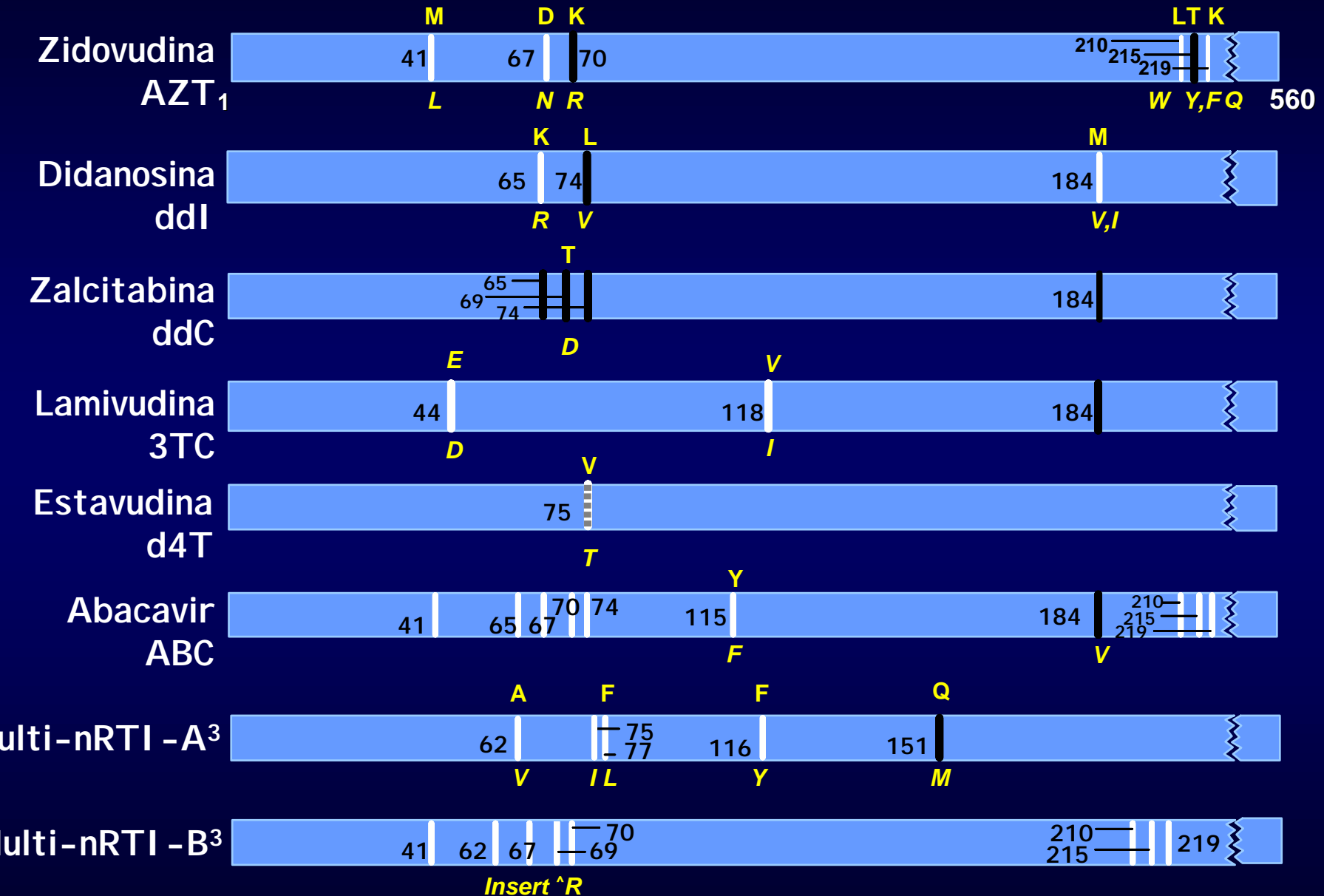


# MUTACIONS EN EL GEN DE LA PROTEASA DEL VIH-1 ASSOCIADES A LA RESISTÈNCIA ALS INHIBIDORS

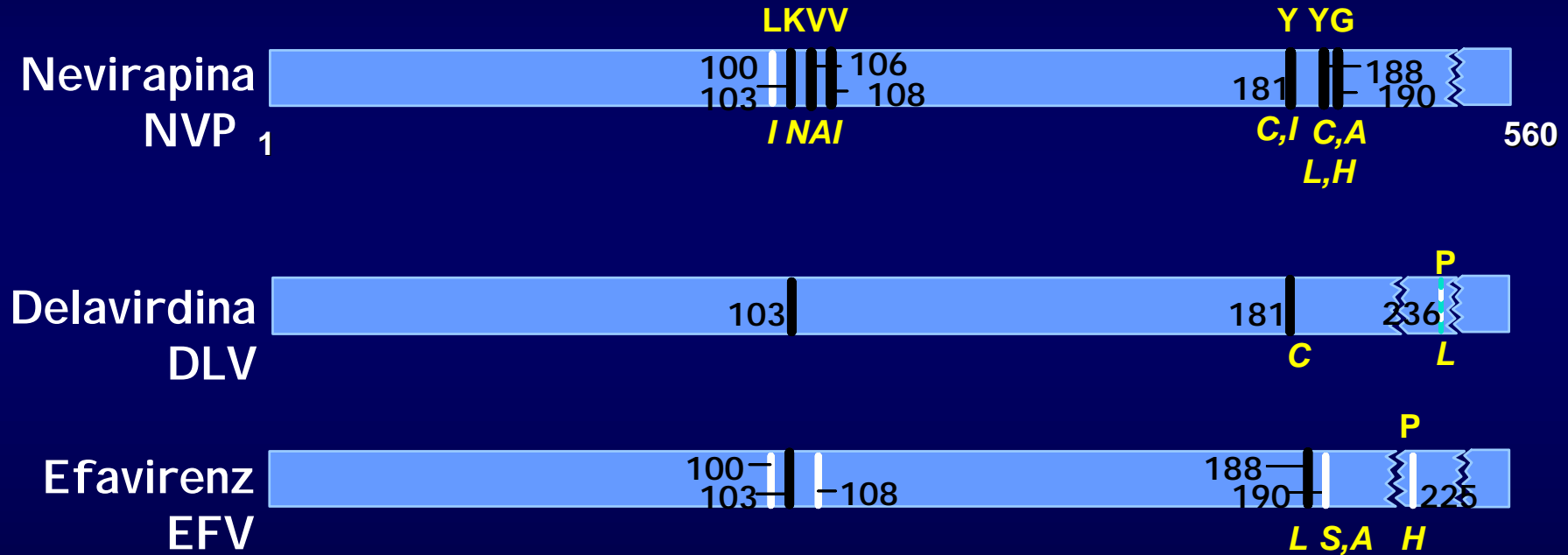


Adapted from: Hirsch, et al. *JAMA*. 2000.

# MUTACIONS ASSOCIADES A LA RESISTÈNCIA ALS ITIANs



# MUTACIONS AL GEN DE LA TRANSCRIPTASA INVERSA ASSOCIADES A LA RESISTÈNCIA ALS ITINNS



Adaptat de: Hirsch, et al. *JAMA*. 2000.

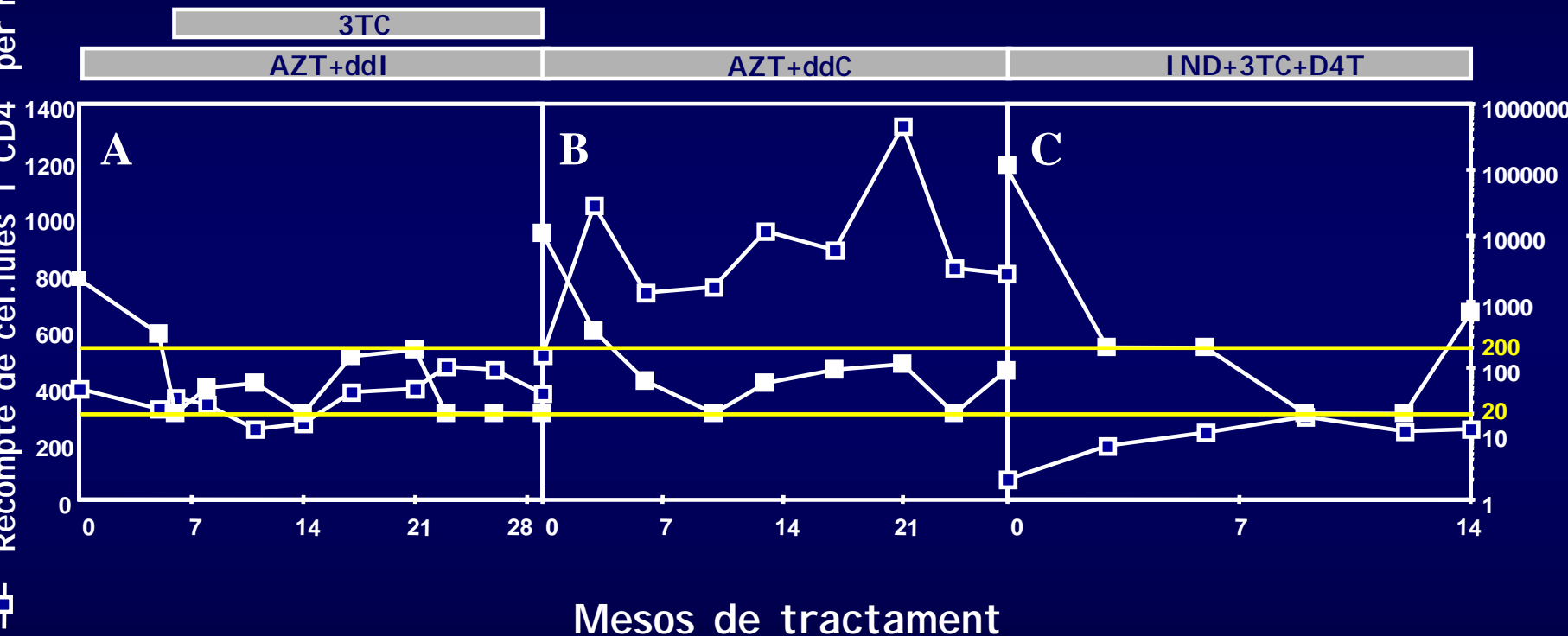
## OBJECTIUS I:

---

- Determinar, en pacients que responien durant llargs períodes de temps a diverses teràpies de combinació, els canvis genètics observats en les poblacions víriques i detectar l'aparició de mutacions associades a la resistència als diferents fàrmacs.
- Avaluar l'aparició de resistències genotípiques en els gens de la transcriptasa inversa i la proteasa a partir de mostres de pacients infectats amb el VIH-1 que clínicament no responien a múltiples teràpies antivirals de combinació.

# EVOLUCIÓ DELS PARÀMETRES CLÍNICS EN TRES PACIENTS DURANT UNA TERÀPIA DE COMBINACIÓ

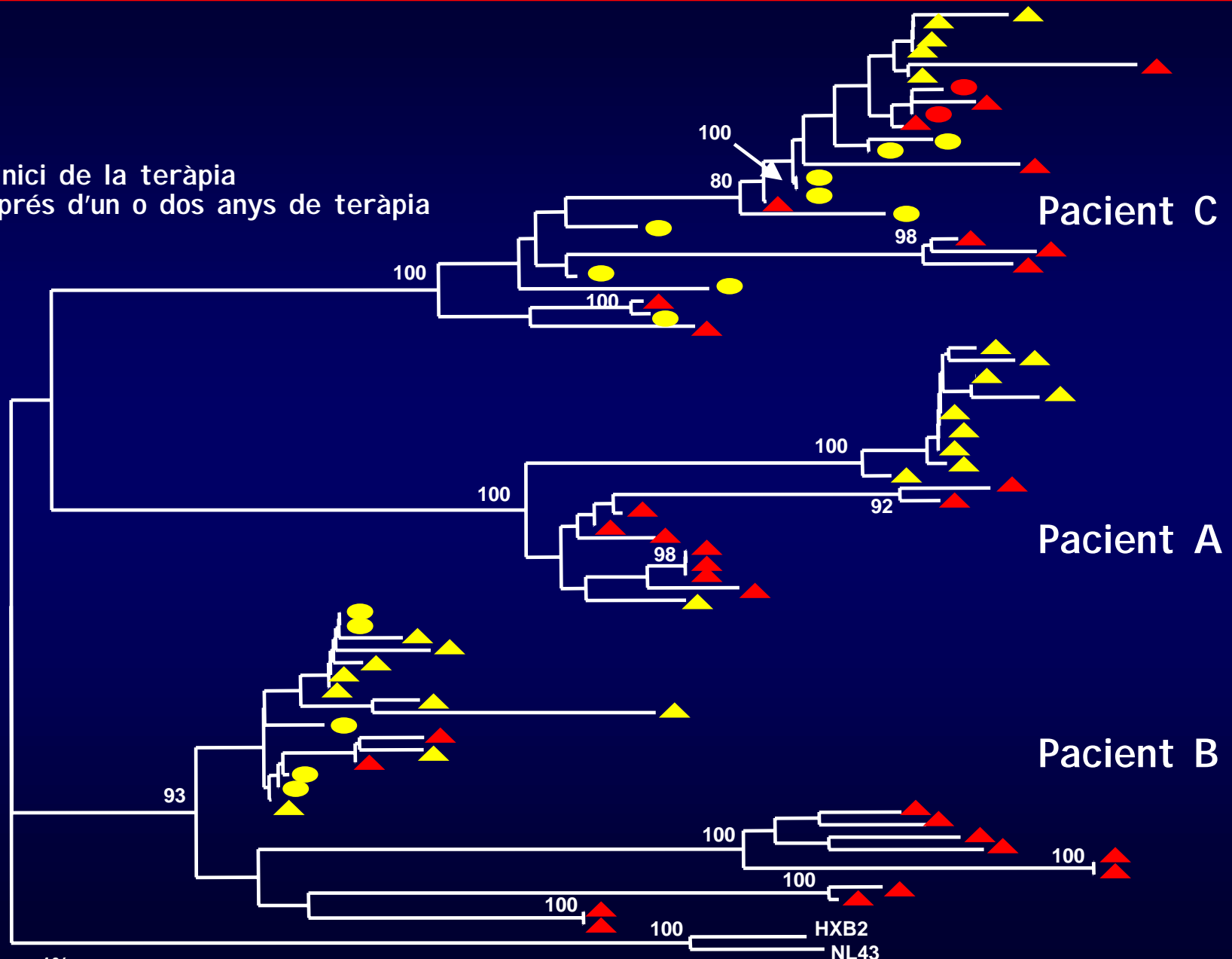
Recompte de cèl·lules T CD4 per ml



# ANÀLISI FIOGÈNICA DE LES SEQUÈNCIES DEL GEN *env* OBTINGUES DE PBMCS DELS TRES PACIENTS

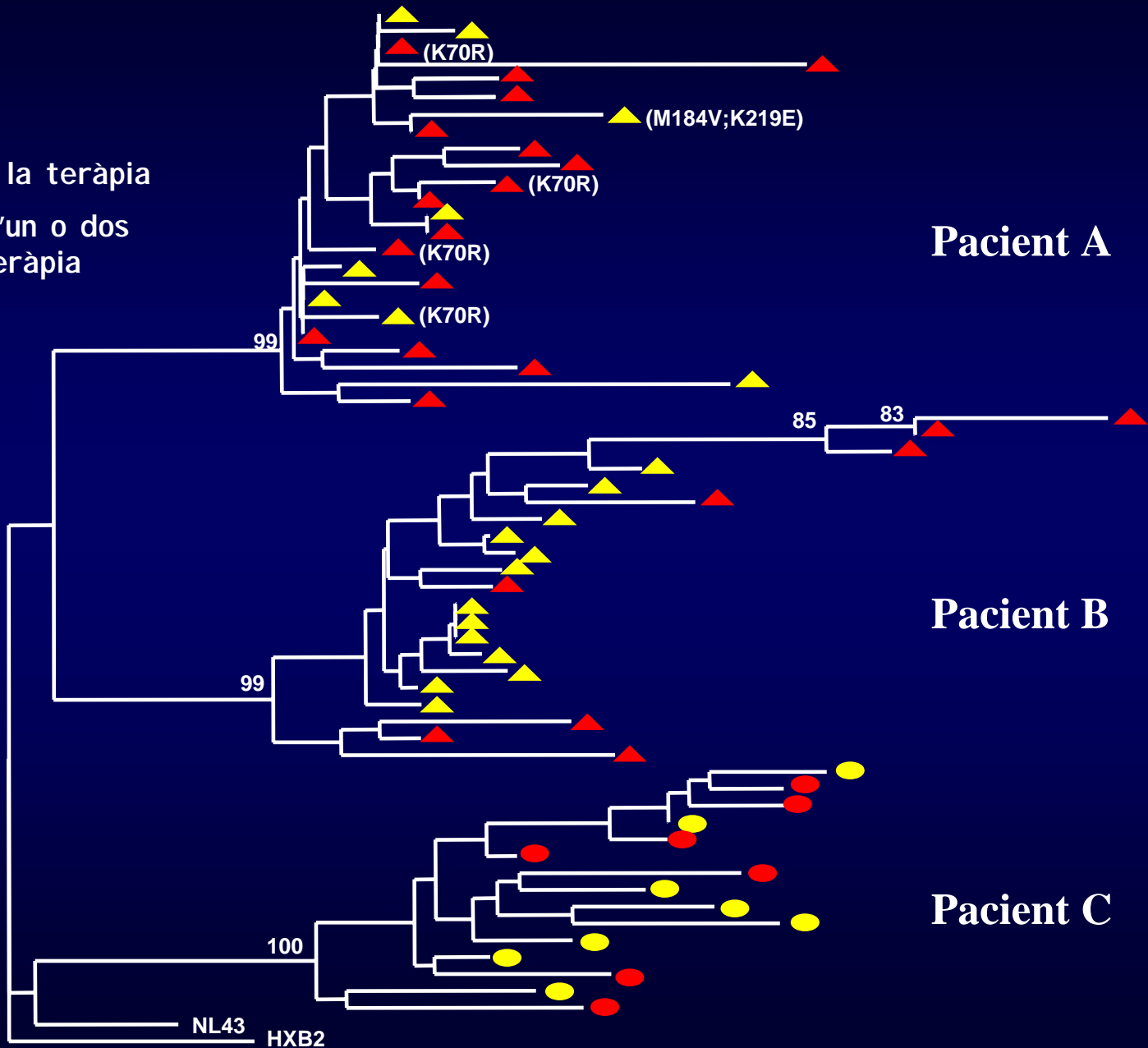
▲ A l'inici de la teràpia

▲ Després d'un o dos anys de teràpia



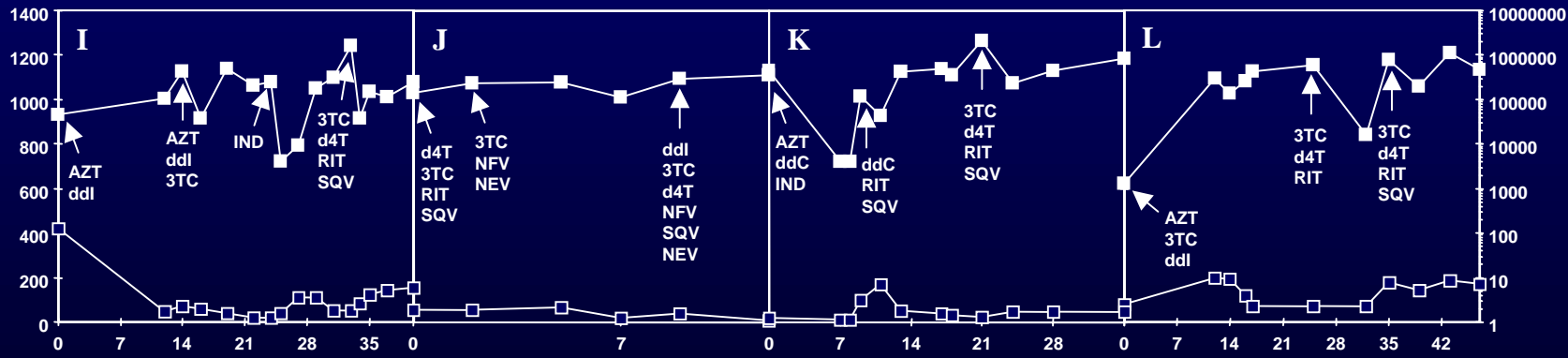
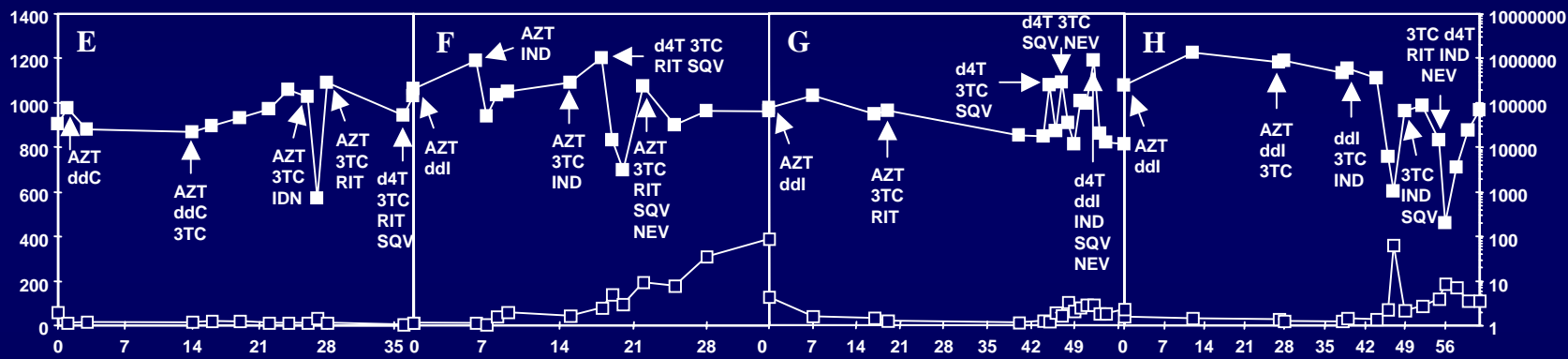
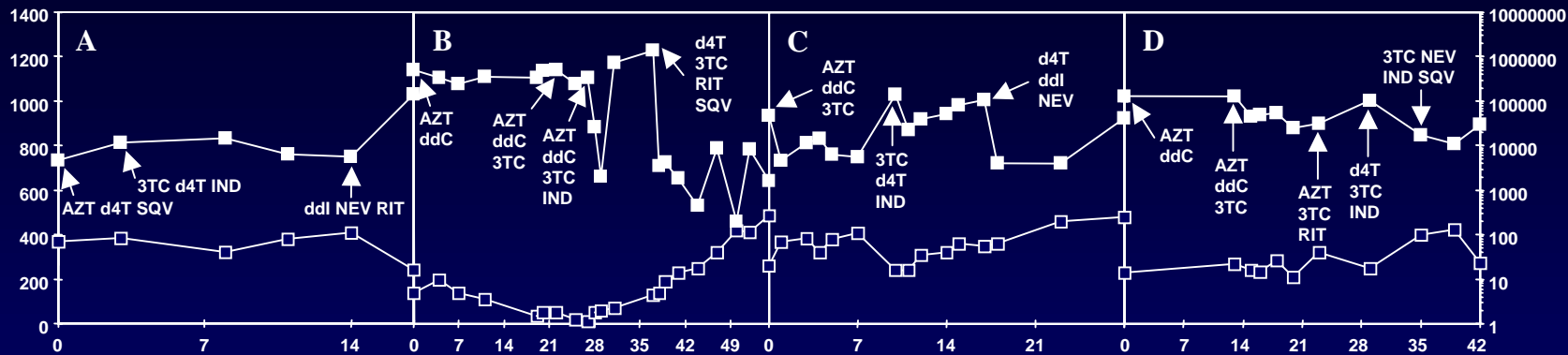
# ANÀLISI FILOGENÈTIC DE SEQUÈNCIES DEL GEN *pol* DEL DNA PROVIRAL

- ▲ Al'inici de la teràpia
- ▲ Després d'un o dos anys de teràpia





Recpte de cèl·lules T CD4



Mesos

RNA del VIH en plasma (còpies/ml)

—▲—

—■—

# Proteasa

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
onB:	PQITLWQRPLVTIKIGGQQLKEALLDTGADDTVLEEMNLPGRWKPKMIGGIGGFIKVRQYDQILIEICGHKAIGTVLVGPTPVNIIGRNLLLTQIGCTLN								
- 0:	.....I.....			.....K.....					.....L.....
-38:	.....I.....		.....I.....	.....K.....		.....V.....			
-41:	.....I.....		.....I.....	.....K.....	.....L.....	.....V.....	.....V.....	.....A.....	.....L.....
-44:	.....I.....		.....I.....	.....K.....	.....L.....	.....V.....	.....V.....	.....A.....	.....L.....
-51:	.....I.....	.....I.....	.....I.....	.....K.....	.....L.....	.....LV.....	.....V.....	.....V.....	.....A.....
-58:	.....I.....	.....I.....	.....DI.....	.....K.....	.....L.A.....	.....LV.....	.....V.....	.....V.....	.....A.....
-60:	.....I.....	.....I.....	.....DID.....	.....K.....	.....L.T.....	.....V.....	.....V.....	.....VV.....	.....A.....

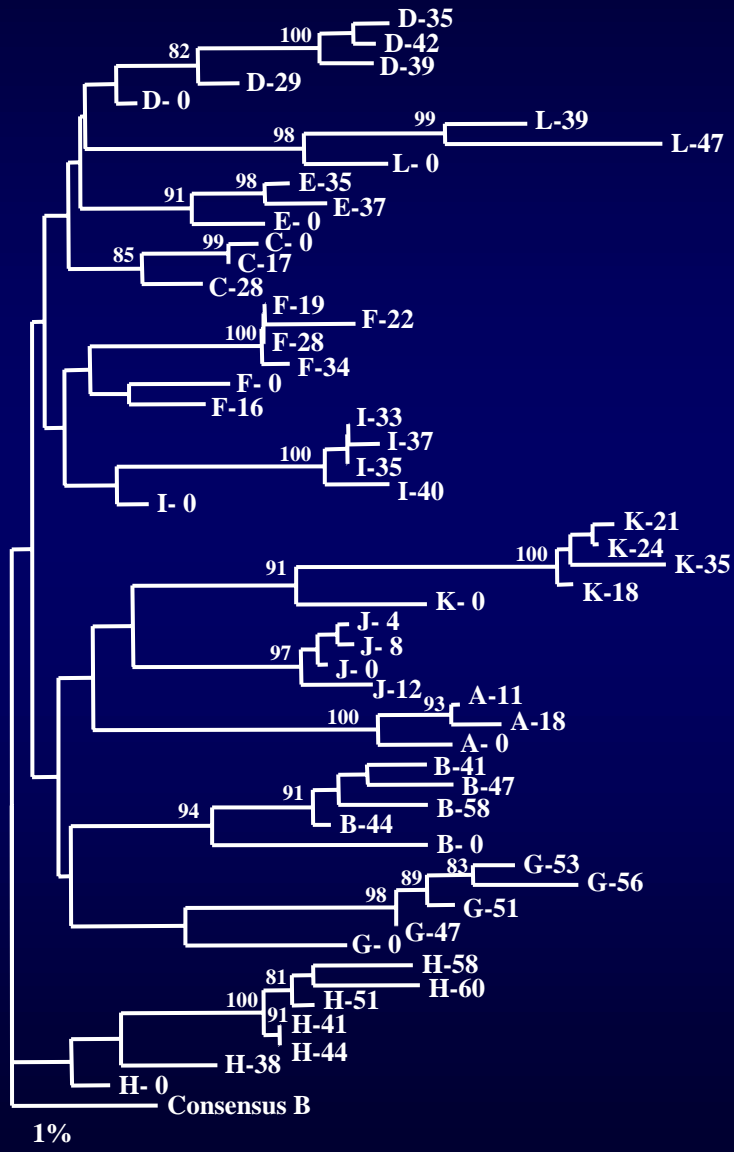
# Transcriptasa inversa

	41	50	60	70	80	90	100	110	120	130
onB:	TEMEKEGKISKIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLVDVGDAYFSVPLDKDFRKYTAFTIPSIN									
- 0:	..L.....			.....V.....						.....T.....
-44:	..L.....			.....V.....			.....S.....			.....T.....
-51:	..LK.....			.....V.....	.....K.....		.....S.....	.....N.....		.....T.....
-58:	..L.....			.....V.....	.....K.....		.....P.....	.....N.....	.....P.....	.....T.....
-60:	..L.....			.....V.....	.....K.....		.....S.....	.....N.....		.....T.....

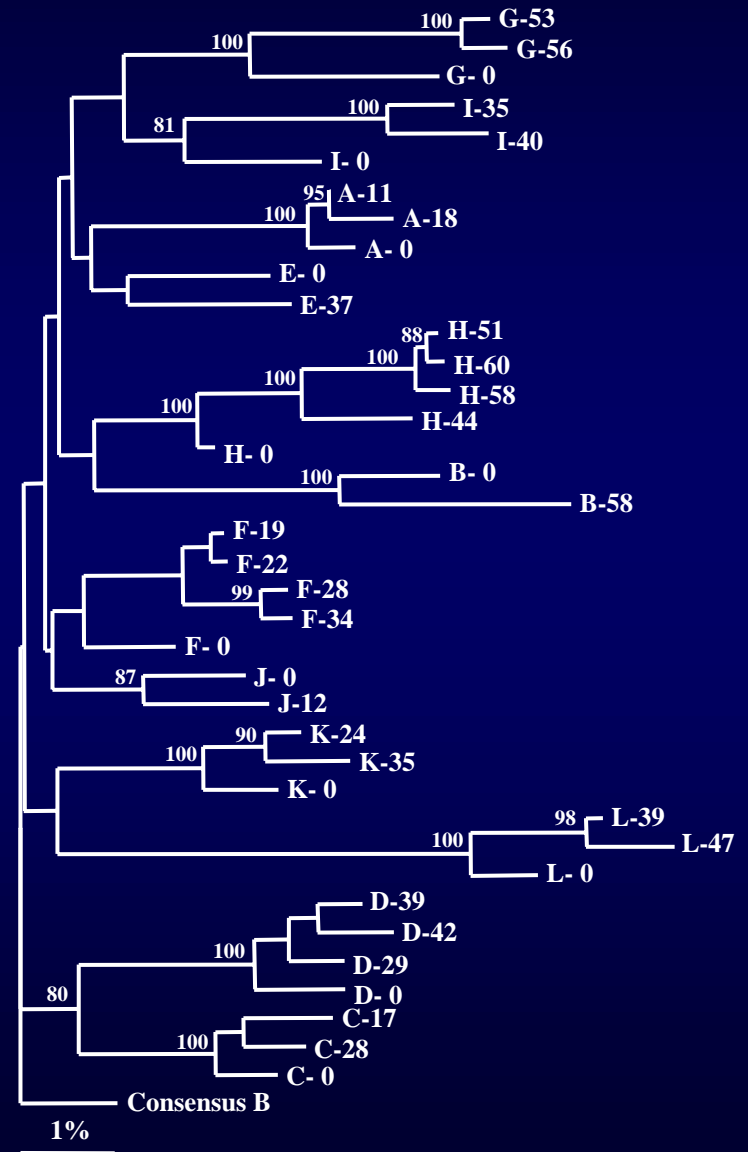
  

	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230
onB:	TPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYMDDLYVGSdleIGQHRTKIEELRQHLLRWGFTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHP									
- 0:	.....	.....C.....						.....WK.....	.....Y.....	
-44:	.....	.....C.....		.....V.....	.....SV.N.....			.....WK.....	.....Y.....	.....Q.....
-51:	.....V.....	.....C.....		.....C.....	.....V.....			.....WK.....	.....Y.....	.....Q.....
-58:	.....V.....	.....C.....		.....C.....	.....V.....			.....WK.....	.....Y.....	.....Q.....
-60:	.....V.....	.....C.....		.....TC.....	.....V.....			.....WK.....	.....Y.....	.....Q.....

# PROTEASA



# TRANSCRIPTASA INVERSA



# RESULTATS DE L'ANÀLISI ESTADÍSTIC :

## TAXA D'EVOLUCIÓ ( mitja):

Proteasa.....  $1.7 \times 10^{-3} \pm 0.5 \times 10^{-3}$  sub/nt/mes

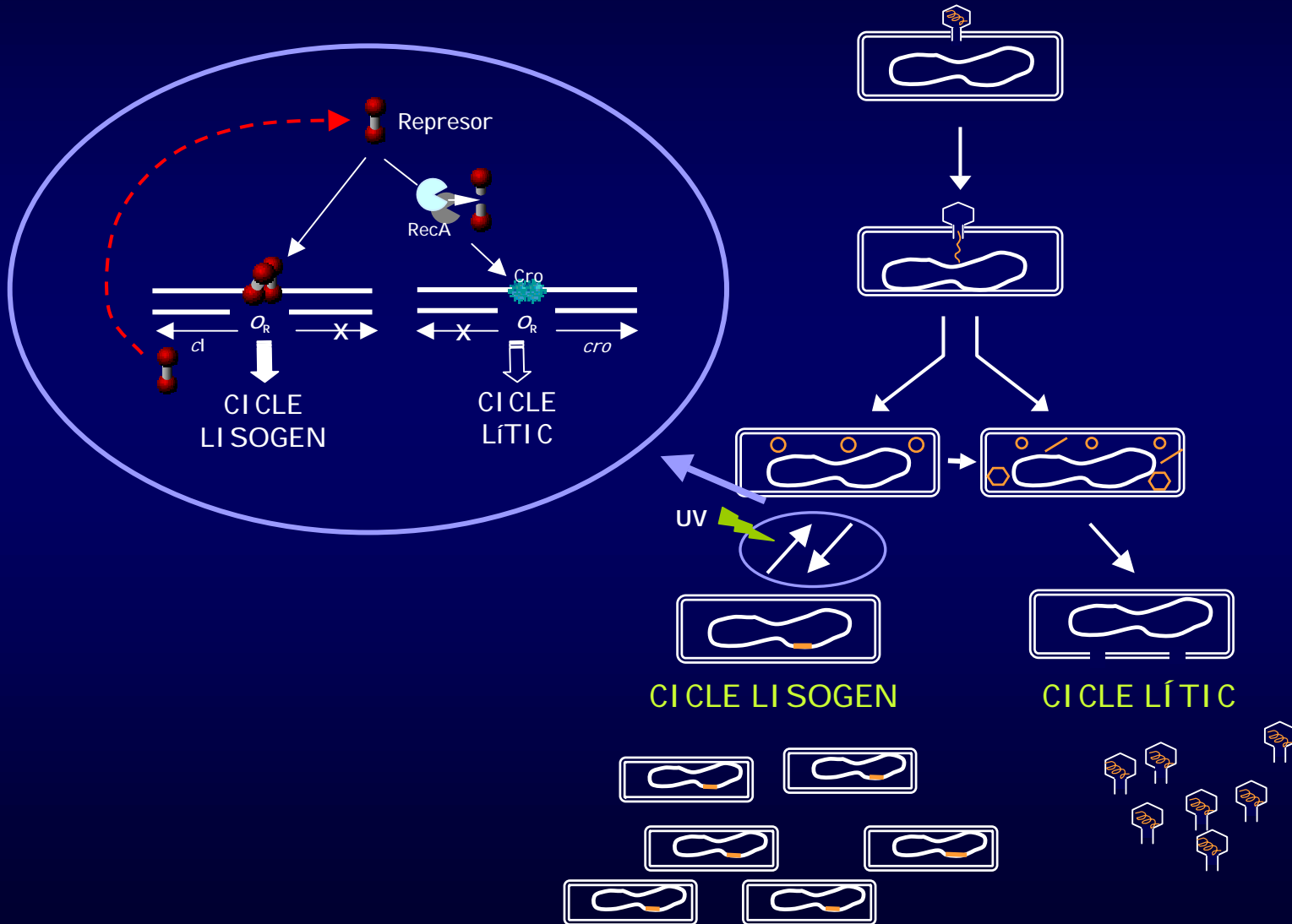
Transcriptasa inversa....  $0.8 \times 10^{-3} \pm 0.4 \times 10^{-3}$  sub/nt/mes

## DISTRIBUCIÓ DE LES DISTÀNCIES GENÈTIQUES:

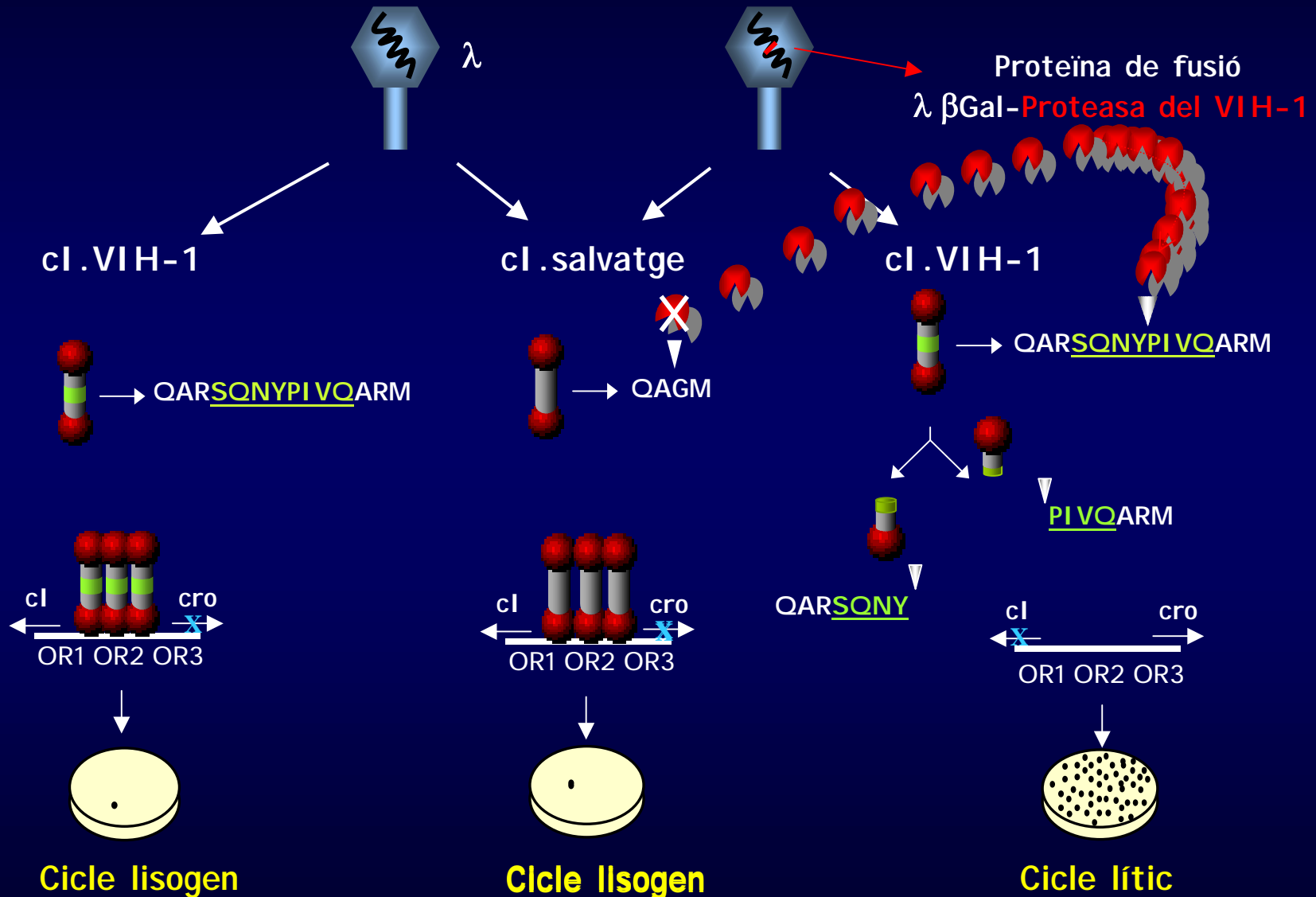
Regió codificant	Distància de l'ADN (mitja $\pm$ SD) <sup>a</sup>			Sin. b(mitja $\pm$ SD)			No sin. b(mitja $\pm$ SD)		
	Al l'inici de l'estudi	Al final de l'estudi	ValorP <sub>c</sub>	Al l'inici de l'estudi	Al final de l'estudi	valorP <sub>c</sub>	Al l'inici de l'estudi	Al final de l'estudi	valorP <sub>c</sub>
Proteasa	0,057 $\pm$ 0,017	0,089 $\pm$ 0,021	<0,001	0,118 $\pm$ 0,044	0,122 $\pm$ 0,044	0,934	0,035 $\pm$ 0,013	0,071 $\pm$ 0,015	<0,001
Transcriptasa inversa	0,059 $\pm$ 0,014	0,077 $\pm$ 0,017	<0,001	0,146 $\pm$ 0,037	0,169 $\pm$ 0,032	<0,001	0,034 $\pm$ 0,003	0,046 $\pm$ 0,014	<0,001



# REGULACIÓ DEL CANVI LÍTIC-LISOGEN EN EL CICLE DE REPLICACIÓ DEL BACTERIÒFAG LAMBDA



# SISTEMA DE CRIBRATGE GENÈTIC DE LA PROTEASA DEL VIH-1 BASAT EN EL BACTERIÒFAG LAMBDA



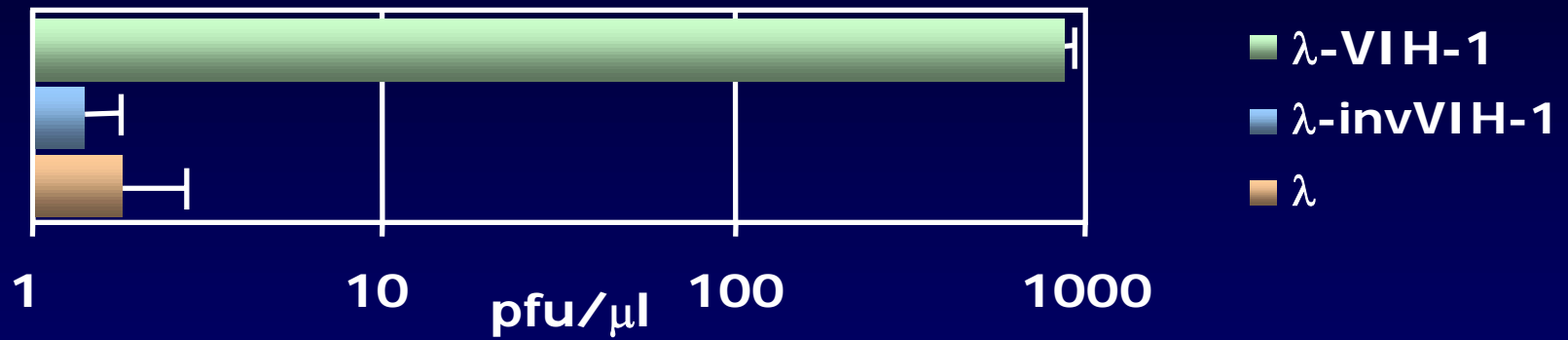
## OBJECTIUS II:

---

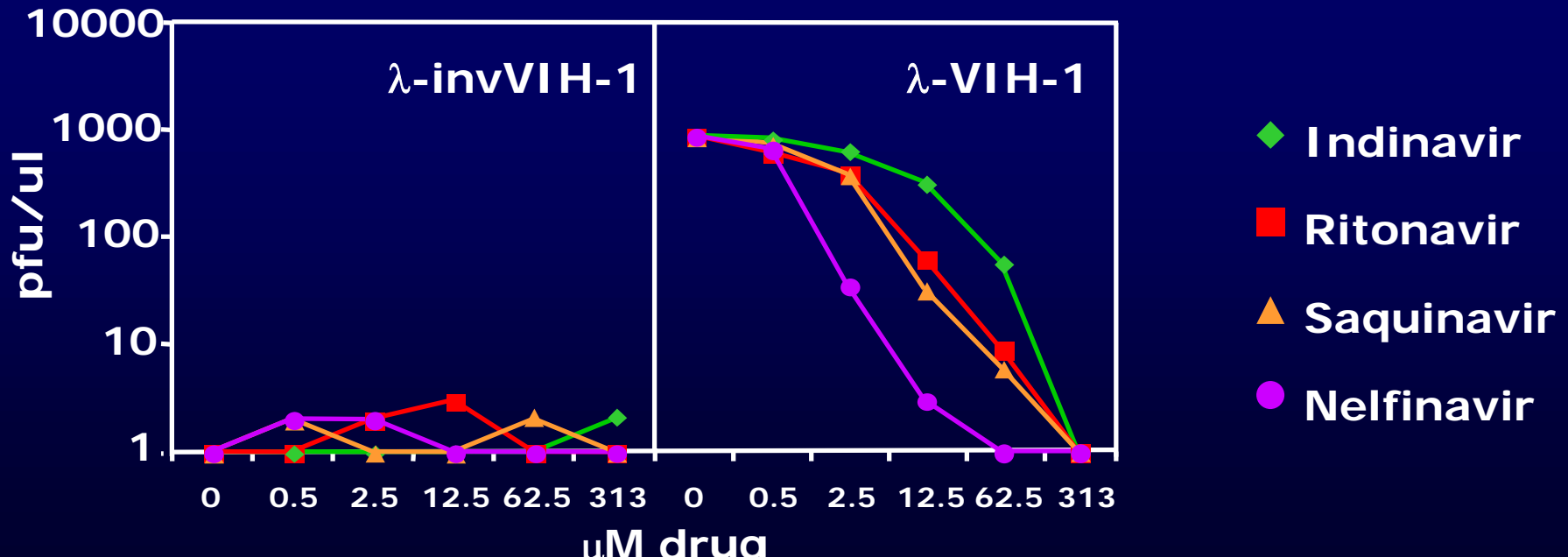
- Avaluar el sistema de cribratge genètic de proteases específiques pel lloc de tall basat en el bacteriòfag lambda, com a sistema alternatiu i senzill per caracteritzar l'activitat de la proteasa del VIH-1 i el seu fenotip.
- Caracteritzar proteases del VIH-1 obtingudes de mostres de pacients que clínicament no responien a la teràpia amb inhibidors de la proteasa.
- Determinar i caracteritzar l'activitat i el fenotip de set proteases del VIH-1 cadascuna de les quals presenta una única mutació primària de resistència als inhibidors de la proteasa.



CREIXEMENT SELECTIU DE FAGS RECOMBINANTS ( $\lambda$ -proteasa del VIH-1)  
 EN CÈL·LULES QUE EXPRESSEN LA CONSTRUCCIÓ *ci.HIV-1-cro*



Inhibició dels  $\lambda$ -proteasa-VIH-1 per quatre inhibidors de la proteasa





# CARACTERÍSTIQUES CLÍNiques I HISTÒRIA DEL TRACTAMENT DELS TRES PACIENTS INCLOSOS A L'ESTUDI

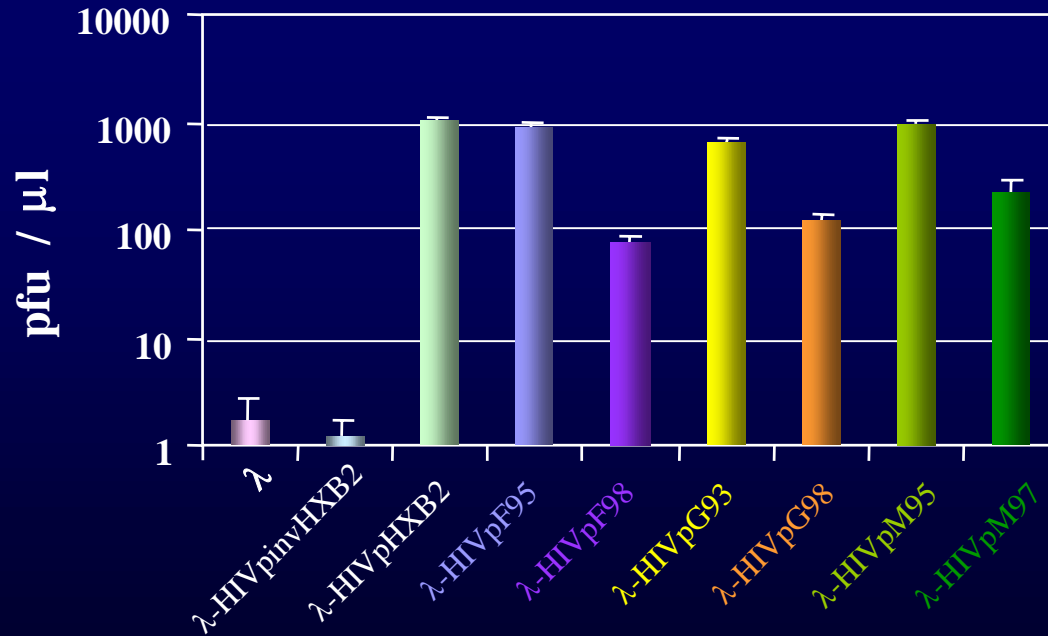
Pacient	Mostra	Cèl·lules CD4+ / ml	Còpies d'RNA del VIH-1 / ml	Història del tractament amb inhibidors de la proteasa
F	95	54	140000	naïf
	98	6	363344	11m IND, 19m RIT, 19m SQV
G	93	128	76823	naïf
	98	71	11798	24m RIT, 10m SQV, 4m IND
M	95	630	81771	naïf
	97	327	1996	3m RIT, 10m IND

IND, indinavir; RIT, ritonavir; SQV, saquinavir; NFV, nelfinavir.

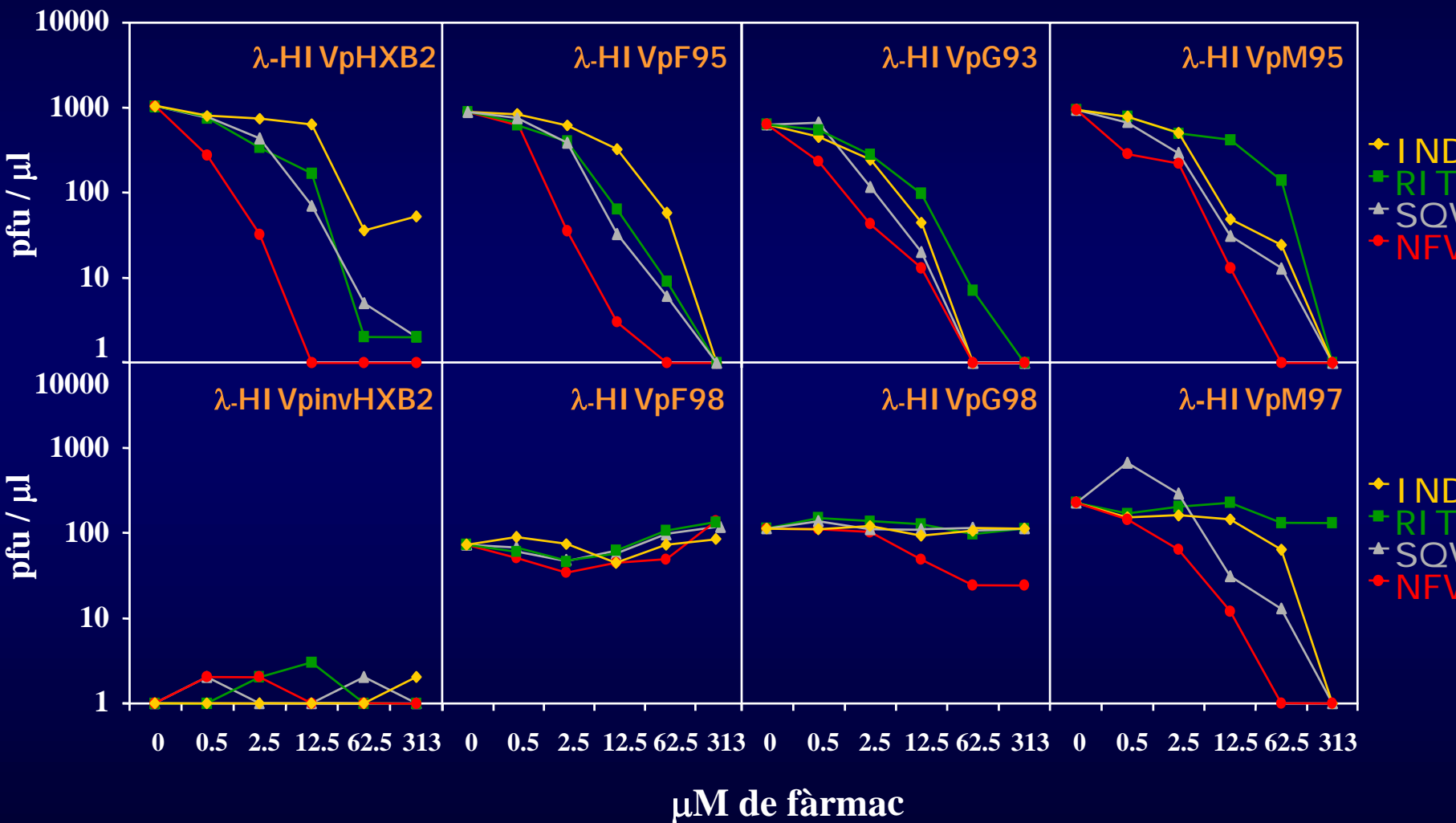
# ACTIVITAT CATALÍTICA DE LES PROTEASES OBTINGUDES DE MOSTRES DE PACIENTS

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      99
ConsensusB : P Q I T L W Q R P L V T I K I G G Q L K E A L L D T G A D D T V L E E M N L P G R W K P K M I G G I G G F I K V R Q Y D Q I L L E I C G H K A I G T V L V G P T P V N I I G R N L L T Q I G C T L N F
λ HIVpHXB2 : .....S.....
λ HIVpF95  : .....D.....P.....I.....
λ HIVpF98  : .....I.....D.D.....V.....V.....P.....V.....A.....M..L.
λ HIVpG93  : .....P.....
λ HIVpG98  : .....I.V.....F..I.C.....V.....P..F..V.M.S..I...A.V...M.
λ HIVpM95  : .....V.....R.....P.V.....I.....
λ HIVpM97  : .....V.....R.....I.....P.V.....V.....A.
    
```



# INHIBICIÓ DEL CREIXEMENT DE FAGS RECOMBINANTS ( $\lambda$ -proteasa del VIH-1) PER DIVERSOS INHIBIDORS DE LA PROTEASA

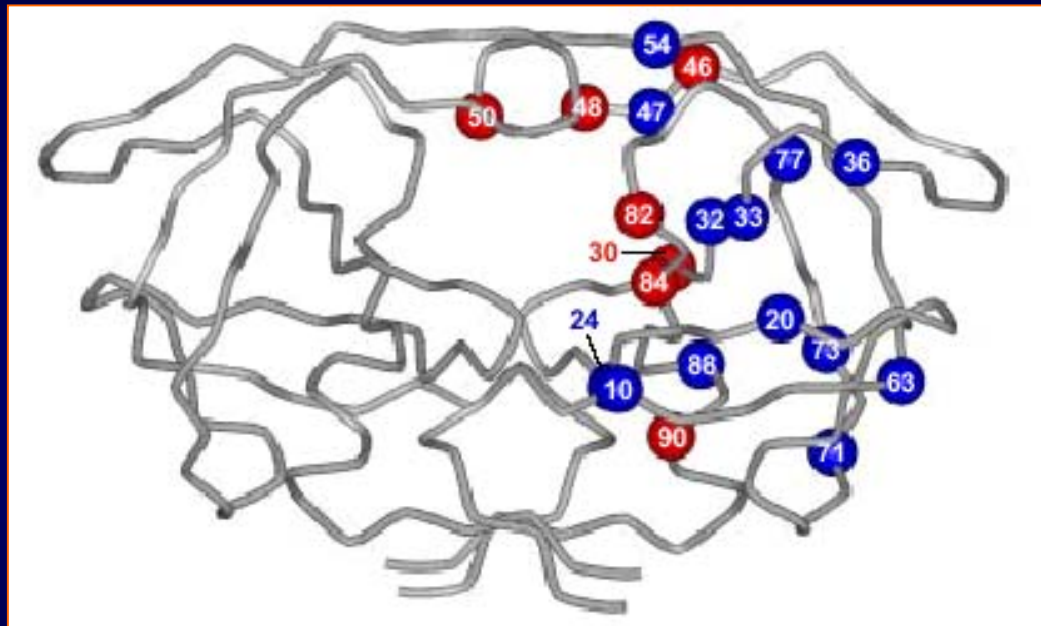


# FENOTIPS I GENOTIPS DELS FAGS QUE CODIFIQUEN LES PROTEASES PROVINENTS DE MOSTRES DELS TRES PACIENTS

Mostra	Patró mutacional de les proteases	IC <sub>50</sub> (μM) (increment respecte el naíf)			
		IND	RIT	SOV	NFV
λ-HI VpHXB2	37S	17.5	1.28	1.69	0.30
λ-HI VpF95	35D, 63P, 77I	6.31	1.78	1.88	0.17
λ-HI VpF98	10I, 35D, 37D, 48V, 54V, 63P, 71V, 82A, 90M, 93L	>313 (>50)	>313 (>176)	>313 (>166)	>313 (>1043)
λ-HI VpG93	63P	1.43	1.97	1.38	0.35
λ-HI VpG98	10I, 14V, 33F, 36M, 37C, 54V, 63P, 67F, 71V, 72M, 73S, 77I, 82A, 84V, 90M	>313 (>219)	>313 (>159)	>313 (>227)	10.13 (29)
λ-HI VpM95	14V, 20R, 63P, 64V, 77I	2.76	3.73	1.16	0.28
λ-HI VpM97	14V, 20R, 32I, 63P, 64V, 71V, 82A	23.37 (8)	>313 (>84)	0.93 (0)	1.3 (5)

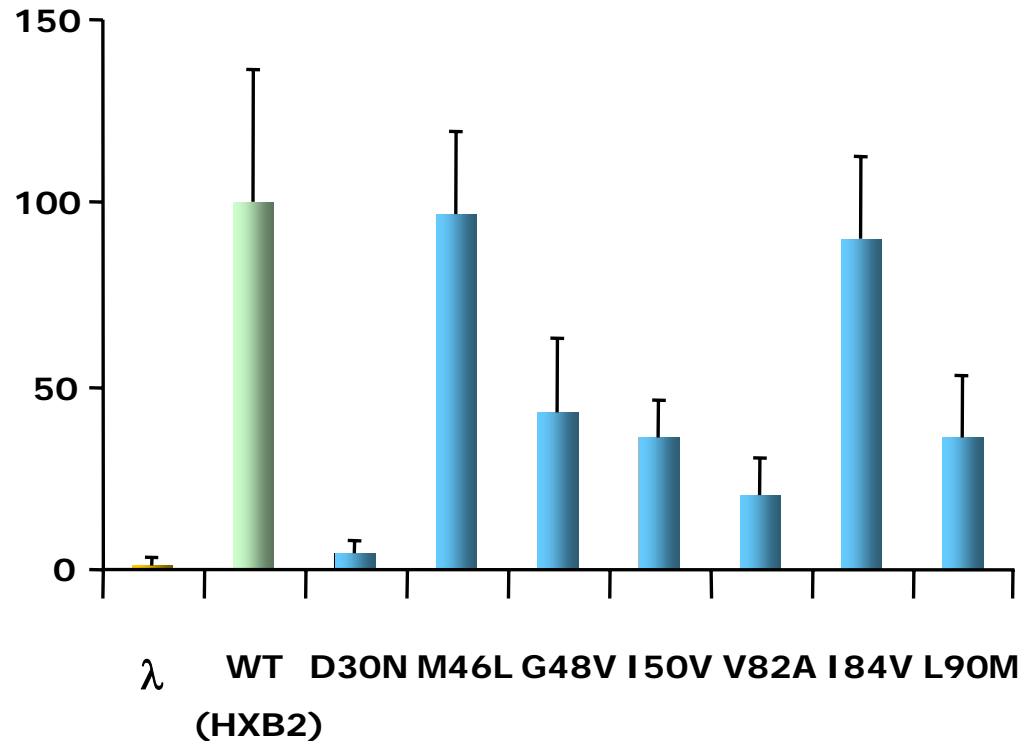
# MUTACIONES EN EL GEN DE LA PROTEASA DEL VIH-1 ASOCIADAS A LA RESISTENCIA ALS INHIBIDORS

---



# Catalytic efficiency of phages encoding laboratory generated single mutants of the HIV-1 protease

Phage growth  
relative to WT  $\lambda$ -  
HIVpHXB2



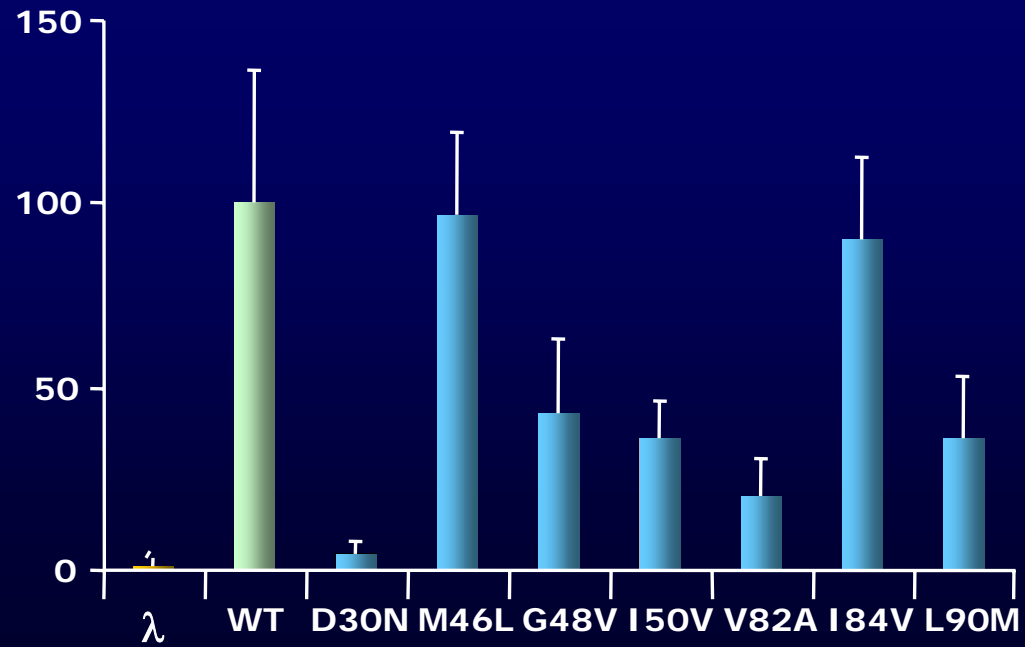


# ACTIVITAT CATALÍTICA DE LES PROTEASES AMB UNA ÚNICA MUTACIÓ PRIMÀRIA DE RESISTÈNCIA

	-40	*	-20	*	0	*	20	*								
WT-HXB2 :	KAREFSSEQ	TRANSP	TRELRQ	VWGRD	NNSPSE	AGADRQ	CTVVS	FNFPQ	ITLWQR	PLVTIK	IGGQL	KEALL	DTGAD	DTVL	:	78
C3063 :	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	N.....	:	78
C4622 :	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	78
C4832 :	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	78
C5082 :	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	78
C8291 :	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	78
C8412 :	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	78
C9071 :	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	78

	40	*	60	*	80	*	100	*									
WT-HXB2 :	EEMSLP	PGRWK	PKMIG	GIGGF	IKVRQ	YDQIL	IEICG	HKAIG	TVLVG	PTPVNI	IGRNLL	TQIGC	TLNFP	ISPIET	VPVKL	:	156
C3063 :	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	156
C4622 :	.....	L.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	156
C4832 :	.....	V.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	156
C5082 :	.....	V.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	156
C8291 :	.....	.....	.....	.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	156
C8412 :	.....	.....	.....	.....	.....	V.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	156
C9071 :	.....	.....	.....	.....	.....	.....	M.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	:	156

Creixement dels fags  
relatiu al salvatge  
( $\lambda$ -HI VpHXB2)



# Phenotype of recombinant phages containing HIV-1 proteases with one primary resistance mutation

Clone name	Site-directed <sup>a</sup> PR mutation	IC <sub>50</sub> (μM) (fold increase) <sup>b</sup>			
		SQV	RTV	IDV	NFV
C10.021	WT	1.29± 0.24	3.97± 2.13	3.31± 2.39	1.87± 0.71
C3063	D30N	0.75± 0.34 (0.6)	0.25± 0.02 (0.06)	0.84± 0.36 (0.25)	5.77± 1.67 (3.1)
C4622	M46L	2.01± 0.76 (1.6)	19.36 ± 8.40 (5)	10.97±7.95 (3.3)	3.48 ±0.48 (1.9)
C4834	G48V	13.17± 5.17 (0.2)	7.68 ±5.09 (1.9)	13.20±8.35 (4)	1.52 ±0.32 (0.8)
C5082	I50V	4.44± 3.11 (3.5)	6.53 ±7.17 (1.6)	4.26±2.47 (1.3)	1.39 ±0.32 (0.7)
C8291	V82A	0.79± 0.39 (0.6)	10.87±6.87 (2.7)	24.49±11.48 (7.4)	3.00 ±2.18 (1.6)
C8412	I84V	17.89± 7.64 (4)	29.81±1.47 (7.5)	22.90±7.1 (7)	1.93 ±1.13 (1)
C9071	L90M	3.35± 1.40 (2.6)	25.46±3.00 (6.4)	2.72±0.72 (0.8)	5.20 ±1.49 (2.8)

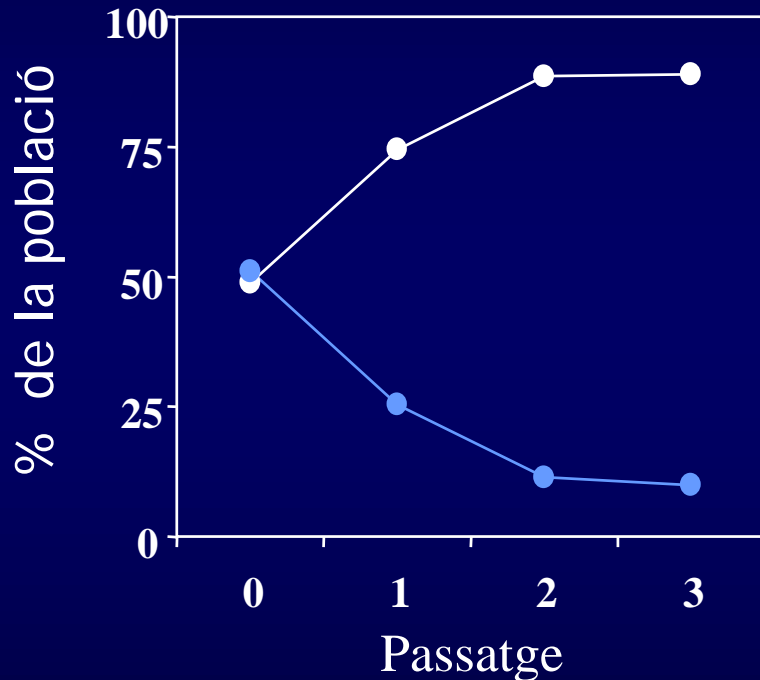
-Resistant  
-Hipersensible

# FENOTIP DELS FAGS QUE CODIFIQUEN PROTEASES AMB UNA ÚNICA MUTACIÓ PRIMÀRIA DE RESISTÈNCIA

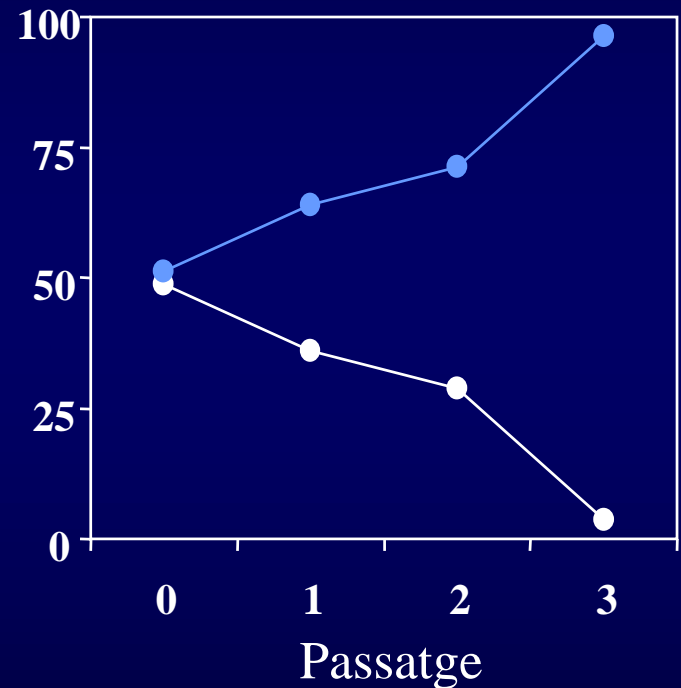
Bacteriòfags recombinants	Mutacions	I C <sub>50</sub> (μM) (increment) <sup>a</sup>			
		SOV <sup>b</sup>	RTV <sup>b</sup>	IDV <sup>b</sup>	NFV <sup>b</sup>
λ-HI VpHXB2	WT	1.9±1.5	3.8±2.3	2.4±2.3	1.8±0.9
λ-HI VpD30N	D30N	0.7±0.3 (0.4)	0.2±0.02 (0.07)	0.9±0.4 (0.4)	5.3±3.2 (2.9)
λ-HI VpM46L	M46L	1.8±0.8 (1.0)	19.4±8.4 (5.0)	7.4±1.2 (3.2)	3.4±0.2 (1.9)
λ-HI VpG48V	G48V	12.8±5.3 (6.8)	7.4±5.4 (2.0)	10.0±5.3 (4.3)	1.6±0.4 (0.9)
λ-HI VpI 50V	I 50V	4.9±2.2 (2.6)	1.1±0.6 (0.3)	4.3±2.5 (1.8)	1.4±0.4 (0.8)
λ-HI VpV82A	V82A	1.0±0.4 (0.5)	10.9±6.9 (2.7)	17.5±17.1 (7.4)	2.7±1.6 (1.5)
λ-HI VpI 84V	I 84V	17.3±6.5 (9.2)	30.2±1.5 (8.0)	22.9±7.2 (9.7)	2.1±1.3 (1.2)
λ-HI VpL90M	L90M	2.9±1.5 (1.5)	17.3±14.3 (4.6)	2.7±0.7 (1.2)	3.9±1.5 (2.2)

# ASSAIG DE COMPETICIÓ ENTRE BACTERIÒFAGS RECOMBINANTS AMB DIVERSES PORTEASES DEL VIH-1

Sense fàrmac

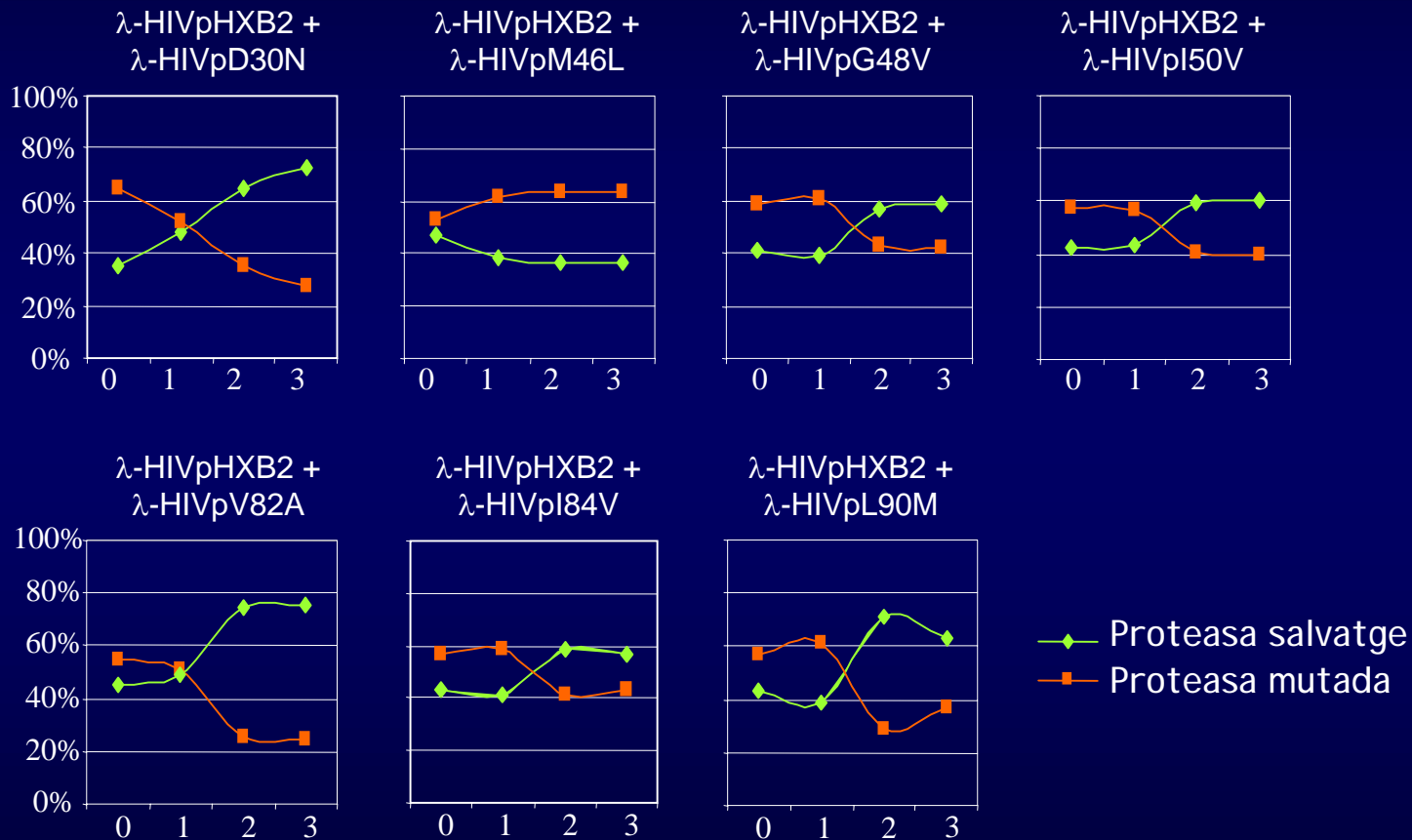


62.5  $\mu$ M SQV



- $\lambda$ -HI VpG93
- $\lambda$ -HI VpG98

# COMPETICIÓ DELS FAGS QUE CODIFIQUEN PROTEASES AMB UNA ÚNICA MUTACIÓ CONTRA EL $\lambda$ -HIVpHXB2



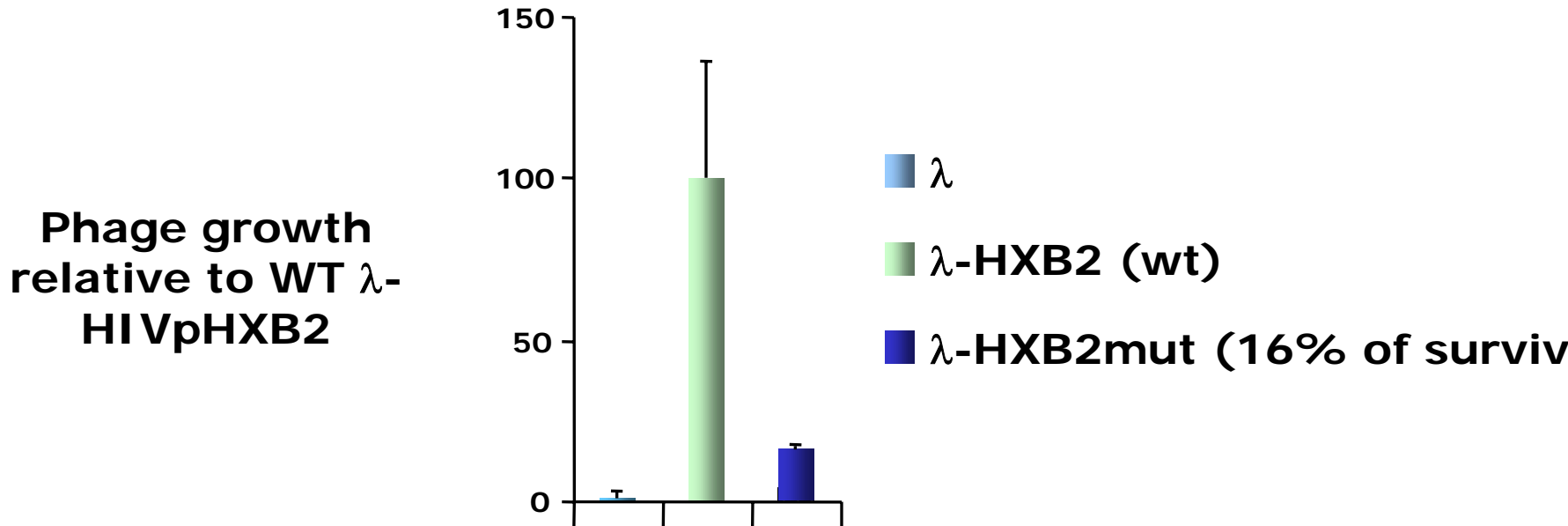


# DISTRIBUCIÓ DE MUTANTS OBTINGUTS DESPRÉS D'UNA RONDA D'HIPERMUTAGÈNESI *IN VITRO*

	*	20	*	40	*	60	*	80	*								
	PQITLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGADDTVLEEMSLPGRWPKMKMIGGIGGFIKVRQYDQILIEICGHKAIGTVLVGPTPVNIIGRNLLTQIGCTLNF																
10c3	:									:	99						
10c6	:									:	99						
10c52	:	R									:	99					
10c55	:									V	:	99					
10c35	:									K	:	99					
10c51	:									G	:	99					
30c04	:									A	:	99					
30c6	:									I	:	99					
10c43	:									R	:	99					
10c28	:	A									E	:	99				
10c36	:									S	L	:	99				
10c40	:	R									M	:	99				
10c54	:									P	R	:	99				
10c47	:									G	V	:	99				
30c01	:									S	A	:	99				
10c1	:	M									A	:	99				
10c10	:									T	V	:	99				
30c2	:									RT	:	99					
30c10	:									E	D	:	99				
10c2	:									M	V	A	:	99			
10c5	:									G	L	S	:	99			
10c7	:									*	E	E	:	98			
10c8	:									G	E	:	99				
10c4	:	H	V									G	R	:	99		
10c26	:									G	V	G	E	:	99		
10c9	:	V	H	*									R	:	98		
30c1	:									T	T	I	K	:	99		
30c7	:	R	R									G	R	:	99		
30c9	:	A	P									R	V	S	:	99	
30c3	:	R	R									R	T	R	:	99	
30c4	:									R	E	T	M	S	:	99	
30c8	:	M	M									V	E	V	Y	:	99

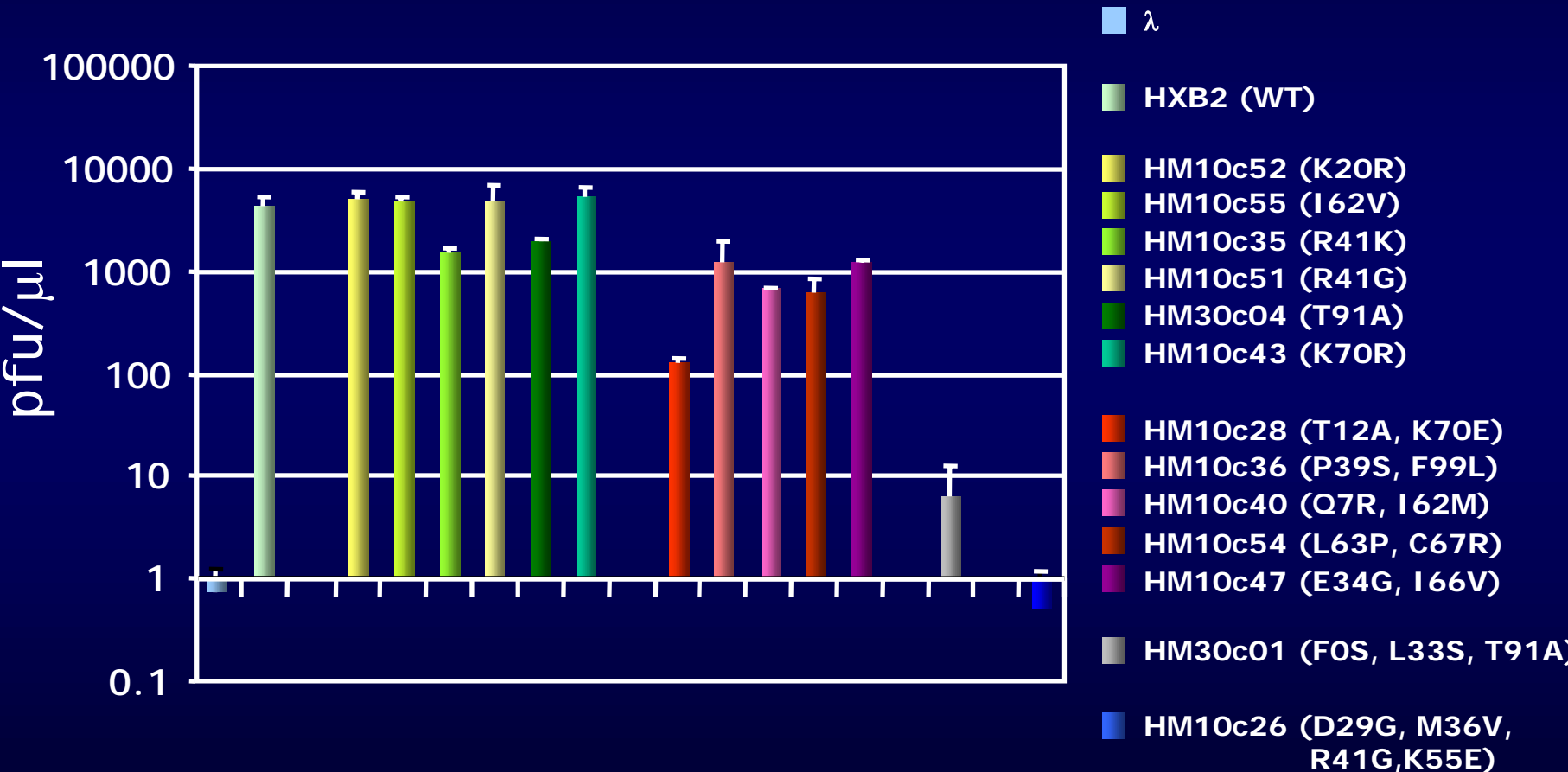
51 residus mutats en 33 clons seqüenciats

# Selective growth of $\lambda$ -HIV-1 protease mutant library in cells expressing the *cl.HIV-1-cro* construct





# CREIXEMENT SELECTIU DE CLONS INDIVIDUALS DE $\lambda$ -proteasa-VIH-1 OBTINGUTS D'UNA LLIBRERIA DE MUTANTS GENERADA in vitro



# CONCLUSIONS I:

---

- En pacients en que es mantenien els nivells d'RNA víric reduïts durant llargs períodes de temps, vam confirmar l'evolució de la quasiespècie vírica amb una reducció de la diversitat genètica en el gen *env*, i vam detectar l'aparició de mutacions de resistència a *pol* tan sols en un pacient.

- Una manca de resposta a successius tractaments antiretrovirals, permet l'acumulació de mutacions de resistència enfront als diversos inhibidors tant en el gen de la proteasa com en el de la transcriptasa inversa, sense existir cap base genètica que limiti o predisposi, a l'evolució vírica o al desenvolupament de les mutacions de resistència.

➤ El nivell de supressió de la replicació vírica condiciona la facilitat d'aparició de mutacions associades a resistència malgrat l'existència d'evolució genètica.

## CONCLUSIONS II:

---

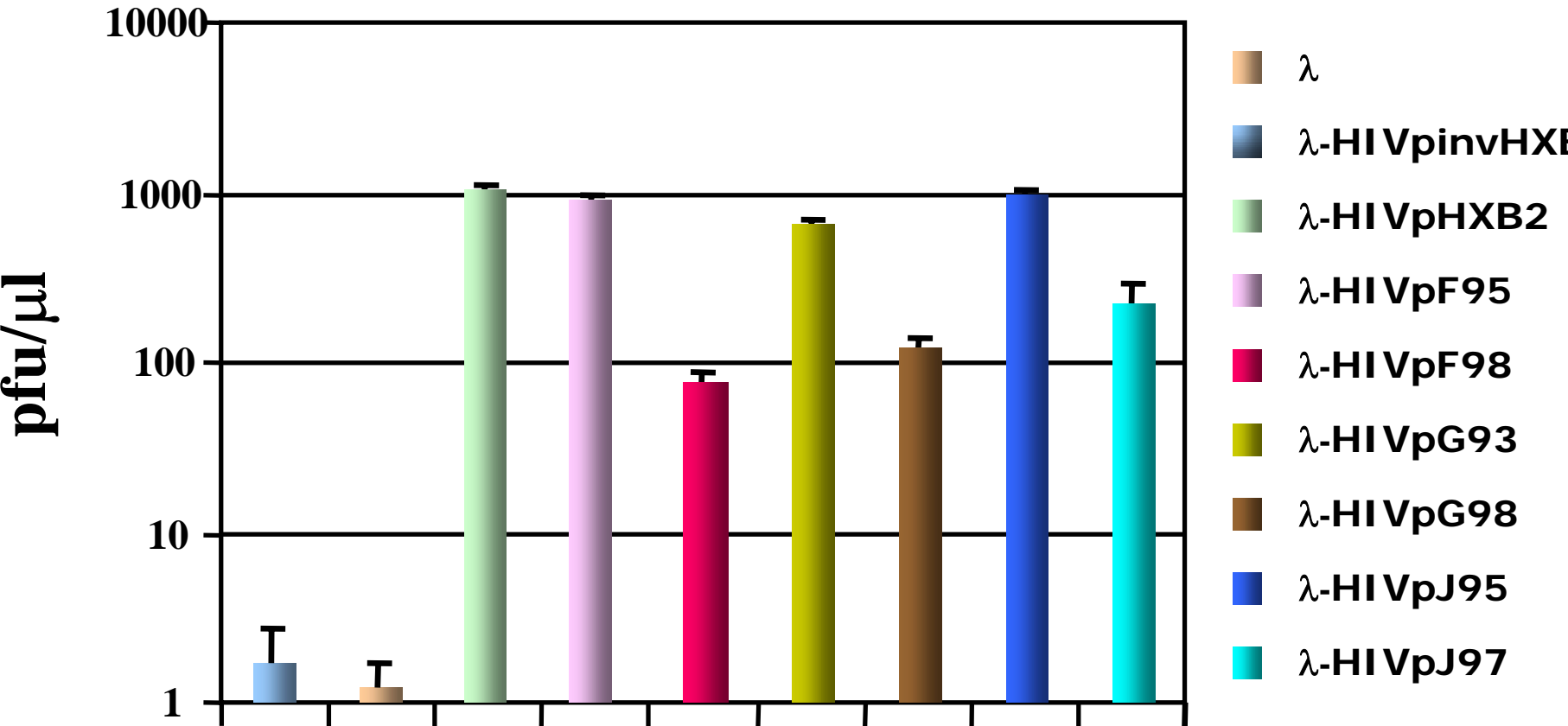
- El sistema de cribratge genètic basat en el bacteriòfag lambda permet la caracterització de proteases del VIH-1 mostrant diferències en l'activitat catalítica o la susceptibilitat als inhibidors associades a determinats genotips.
- L'anàlisi de proteases aïllades de mostres de pacients durant el tractament permet pronosticar la resposta a posteriors canvis de teràpia.
- Una manca d'un nivell elevat de resistència i un compromís de l'activitat proteolítica associats a la presència d'una única mutació primària de resistència a la proteasa del VIH-1, davant l'àmplia i elevada resistència dels mutants múltiples argumenten la rara aparició de les mutacions primàries d'una forma aïllada.

## CONCLUSIONS II:

---

- L'elevada especificitat del sistema, fa que sigui efectiu en determinar petites variacions en l'activitat o el fenotip de les proteases, a l'hora, que permet la competició dels bacteriòfags recombinants per identificar aquella més avantatjosa en determinades condicions.
- El sistema de cribratge basat en el bacteriòfag lambda constituïx una bona eina per a la caracterització de proteases del VIH-1 rellevants clínicament, així com per la profundització en l'estudi i caracterització d'aquesta proteïna i les seves variants.

# Selective growth of $\lambda$ -HIV-1 proteases in cells expressing the *cl.HIV-1-cro* construct



# Inhibition of patient F, G, and J $\lambda$ -HIV-1 protease in the presence of four different protease inhibitors

