



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 194 029**

⑤① Int. Cl.⁷: C12N 15/49, C12N 7/00

C07K 14/155, G01N 33/569

A61K 39/21, A61K 39/395

C12N 5/10

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **95100149.4**

⑧⑥ Fecha de presentación: **13.06.1989**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 655 501**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.1995**

⑤④ Título: **Variantes del virus HIV-2.**

③⑩ Prioridad: **14.06.1988 DE 38 20 223**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
16.11.2003

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
16.11.2003

⑦③ Titular/es: **Qiagen GmbH**
Max-Volmer-Strasse 4
40724 Hilden, DE
Chemotherapeutisches Forschungsinstitut
Georg-Speyer-Haus

⑦② Inventor/es: **Henco, Karsten;**
Von Briesen, Hagen;
Immelmann, Andreas;
Kühnel, Herbert;
Dietrich, Ursula;
Rübsamen-Waigmann, Helga y
Adamski, Michalina

⑦④ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCION

Variantes del virus HIV-2.

La presente invención se refiere al HIV D205 (HIV, abreviatura de la expresión inglesa para 'Virus de la Inmunodeficiencia Humana'), una variante del virus HIV-2 que se puede clonar a partir del correspondiente aislado del virus HIV D205 (ECACC V 87122304).

Se cita el trabajo titulado "Molecular cloning of two West African human immunodeficiency virus type 2 isolates which replicate well on macrophages: a Gambian isolate from a case of neurologic acquired immunodeficiency syndrome, and a highly divergent Ghanesian isolate" (Kühnel, H., v. Briesen, H., Dietrich, U., Adamski, M., Mix, D., Biesert, L. Kreutz, R., Immelmann, A., Henco, K., Meichsner, Ch., Andreesen, R., Gelderblom, H. & Rübsamen-Waigmann, H., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 4, 2383-2387.)

Al hacer un diagnóstico, se requieren dos criterios, principalmente especificidad y sensibilidad al antígeno que se ha de detectar. En el diagnóstico del SIDA el requerimiento de especificidad ciertamente se puede conseguir usando los aislados HTLV-III_B y LAV-2 (Guyader, M. et al., "Nature" 326, 1987, 662-669) para delimitar las infecciones por HIV de otras infecciones y, así, hacer una asignación aproximada a las clases "infecciones relacionadas con el HIV-2" o "infecciones relacionadas con el HIV-1". Sin embargo, la sensibilidad del diagnóstico constituye un problema. En el intervalo de la denominada seroconversión, es decir, la aparición de anticuerpos en la persona infectada, una reducción en la sensibilidad implica un aumento en el número de ensayos con resultados "falsamente negativos". De acuerdo con esto, un objetivo principal es acortar el período entre la infección y la detección de esta infección tanto como sea posible mejorando la sensibilidad del ensayo.

En la práctica del diagnóstico ELISA ampliamente usado, la menor reactividad cruzada, se manifiesta, por ejemplo, en una reducción de la sensibilidad. Así, el uso del aislado del HIV-1 descrito significa una reducción media de la sensibilidad del ensayo frente a los sueros HIV-2 de un factor de 100 a 1.000, mientras que el aislado de HTLV-III_B casi no permite que se realice ninguna detección más.

Un terrible principio de las enfermedades causadas por el HIV reside en el hecho de que no hay sólo un tipo de fenotipos y genotipos de cada uno de los virus HIV-1 y HIV-2. Lo que se ha de postular es que más que un grupo grande de virus relacionados, existen posibles poblaciones uniformes que no están estrictamente separadas de ninguna manera unas de otras pero que penetran continuamente unas en otras y experimentan un desarrollo evolutivo hasta una divergencia cada vez mayor, mientras que al mismo tiempo comienzan a intercambiar partes del genoma de unas a otras mediante sucesos de recombinación. Así, las especies de HIV existentes forman una amplia gama de población continua en la que no hay subpoblaciones estrechamente delimitadas de una variante de virus. Preferiblemente se supone

que existe un continuo que está sometido a permanentes fluctuaciones con el tiempo.

Las variantes del virus clasificadas HIV-1 y HIV-2 son representativas de las subpoblaciones difusamente delimitadas que tienen un grado relativamente bajo de relación, lo que se manifiesta en una reactividad cruzada sólo parcial. Por otra parte, hay variantes del grupo HIV-1 (Rübsamen-Waigmann, H. et al., "AIDS-Forschung" 10, 1987, 572-575; Rübsamen-Waigmann, H. et al., J. Med. Virol. 19, 1986, 335-344; v. Briesen, H. et al., J. Med. Virol. 23, 1987, 51-66), que reaccionan de manera cruzada más significativamente con HIV-2 que con el propio aislado HIV-1 que se caracterizó primeramente (Hahn, B. et al., "Nature" 312, 1984, 166-169). Un producto comercial que consiste en tal aislado diagnóstica de manera diferenciada más sueros como HIV-2 positivos que lo hace el aislado estándar descrito HTLV-III_B.

Un producto ideal de diagnóstico o terapéutico debe contener al menos un representante de las poblaciones que sean biológicamente distintas de manera significativa unas de otras.

Los virus HIV-1 en multitud de mutantes genéticos altamente polimorfos pueden causar distintas enfermedades tales como ARC, LAS, SIDA y encefalopatías (ARC: complejo relacionado con el SIDA, LAS: síndrome de linfadenopatía, SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Las variantes del virus clonadas se distinguen en secuencia y modelo de restricción, incluso si se han aislado al mismo tiempo, en el mismo lugar e incluso del mismo paciente (Rübsamen, H. et al., 1986). Se podría mostrar que las variantes del virus del tipo HIV-1 se distinguen hasta 15% en algunos antígenos del virus. Las del HIV-2 son diferentes hasta en más del 40% de los aminoácidos de algunos antígenos, habiéndose apreciado sustituciones, inserciones y deleciones (Guyader, M. et al., 1987; Rabson, A.B. y Martín, M.A. "Cell" 40, 1985, 447-480).

La presente invención proporciona una variante del virus HIV-2. La variante HIV-2 D205 se aisló de un paciente clínicamente asintomático. Se comprobó que el aislado del virus era un agente de diagnóstico, en relación con DNA/RNA así como en relación con los antígenos del virus, para infecciones por el tipo HIV-2 que se identifican serológica y directamente en las etapas de pre-SIDA y SIDA.

El aislado del virus según la invención comprende virus y provirus, cuyas características son idénticas a las del mapa de restricción descrito y la secuencia de las regiones clonadas parciales (Figuras 1-4). Además, el aislado del virus comprende variantes que se distinguen de los virus y provirus descritos anteriormente en que sus secuencias de nucleótidos son diferentes de las de los virus descritos anteriormente sólo hasta 5%, y preferiblemente en 2%, particularmente preferido en 1%.

La variante del virus según la invención puede causar linfadenopatías (que más adelante se denominan LAS/SIDA). Según la invención se reivindican también productos de expresión de dicha variante del virus y más particularmente antígenos, preferiblemente en forma acumulada o pura y procedimientos para producir dichos pro-

ductos de expresión. Los productos de expresión están destinados a incluir todos los polipéptidos en forma glicosilada y/o meristilada que han sido codificados en la cadena positiva o negativa del RNA o DNA clonado.

Una realización adicional preferida consiste en secuencias de DNA clonado capaces de hibridarse con RNA y DNA genómico de la variante del virus. Según la invención se reivindican sondas génicas estables que contienen tales secuencias de DNA que son adecuadas para la detección de la hibridación de estas y otras variantes de HIV o virus relacionados o provirus de DNA en muestras que se han de examinar, más particularmente muestras biológicas o semisintéticas.

Una realización adicional preferida de la invención está comprendida por la variante del virus de RNA/DNA o de sus fragmentos respectivos que se hibridarán con las variantes del virus según la invención en condiciones estrictas, más particularmente DNAC, DNA genómico, DNA recombinante, DNA sintético o sus fragmentos. Se entiende que se incluyen variantes o fragmentos que muestran delecciones e inserciones comparados con la variante del virus según la invención.

Por condiciones estrictas de hibridación y lavado se pretende que se entiendan las condiciones que aseguran mediante experimentación o cálculo si el punto de fusión de los complejos de ácidos nucleicos 100% homólogos en condiciones de hibridación y lavado están no más de 5°C por debajo de las condiciones del tampón empleado.

Según la invención también se reivindican sondas génicas sintéticas clonadas que se pueden derivar de las variantes de virus descritas anteriormente y se pueden aumentar en sistemas vectores en eucariotas o procariotas. Los fragmentos de DNA clonados descritos son adecuados para la hibridación con ácidos nucleicos complementarios (DNA/RNA) para la detección/diagnóstico de las variantes del virus. Los ensayos de diagnóstico según la invención se llevan a cabo usando sondas de DNA o RNA. Las sondas son radioactivas o se han marcado con grupos o enzimas fluorescentes bio- o quimioluminiscentes o son detectables de manera específica con enzimas por medio de sistemas de reacción acoplados. Las hibridaciones se pueden efectuar en fase homogénea en disolución o en fase heterogénea con ácidos nucleicos inmovilizados en un sólido; aunque el sólido puede ser una membrana, partícula, célula o tejido, la hibridación también se puede efectuar *in situ*.

A partir del aislado del virus reivindicado según la invención, las secuencias de DNA correspondientes (Figura 1) se pueden clonar en bacterias *E. coli* estableciendo un banco genómico de genes lambda, a partir del DNA de los linfocitos infectados con el aislado del virus. Los clones deseados se obtienen llevando a cabo un escrutinio en placa con secuencias STLV-III de la gama gag-pol. De una manera más específica, se puede usar como sonda un DNA derivado de la secuencia HIV-2 ROD publicada (Guyader, M. et al., "Nature" 326, 1987, 662-669), o una sonda de DNA derivada de las secuencias parciales del aislado HIV-2 D205 según la invención.

El método de diagnóstico basado en el uso de los virus reivindicado según la invención com-

prende las siguientes etapas: Extracción de RNA o DNA de muestras biológicas, posiblemente procesado enzimático mediante enzimas de restricción, separación por electroforesis en gel y/o métodos de transferencia para portadores enlazados a ácidos nucleicos, y posteriormente hibridación con partes de los fragmentos clonados de los virus reivindicados. Las hibridaciones también se pueden llevar a cabo directamente en células o tejidos tratados químicamente. A ese respecto el origen de los tejidos o líquidos es insignificante.

De manera específica, un procedimiento para la detección *in vitro* de anticuerpos frente a productos de expresión de los virus de la presente invención se caracteriza porque los productos de expresión de los virus o partes de estos productos se detectan mediante métodos inmunológicos. El procedimiento se caracteriza porque los productos de expresión son proteínas, péptidos o partes de ellos que han sido codificados dentro del significado de un marco de lectura abierto del DNA de las secuencias parciales províricas como se caracteriza en la reivindicación 1 y se preparan mediante procedimientos sintéticos o biosintéticos.

Además, el procedimiento se caracteriza porque previamente una cantidad definida o una combinación de productos de expresión o partes de ellos se fijan en placas de microtitulación, posteriormente se ponen en contacto muestras biológicas, diluidas o sin diluir con las placas de microtitulación revestidas y después de la incubación y las etapas secuenciales de lavado se pueden identificar mediante un reactivo detector o de anticuerpos anti-HIV marcados.

Alternativamente, se usan tiras de filtro y tiras de plástico o varillas en vez de placas de microtitulación, cuando los productos de expresión de los virus se han fijado en respectivas posiciones específicas por aplicación aislada de los distintos antígenos.

Los productos de expresión también se pueden separar mediante electroforesis en gel y después trasladar mediante transferencia tras la incubación con anticuerpos anti-HIV y efectuar su detección. La detección se efectúa en vehículos en fase sólida a los que se han enlazado los determinantes antigénicos, consistiendo el vehículo en fase sólida en forma de partículas.

Los productos de expresión pueden ser antígenos de virus derivados de células infectadas *in vitro*, estando dichos antígenos en contacto con materiales de ensayo biológicos como antígenos enlazados a células fijadas y la posterior unión al anticuerpo se puede determinar con reactivos de detección inmunológica mediante un aparato, por ejemplo con un citofluorímetro, o visualmente.

Los antígenos se pueden determinar mediante un ensayo ELISA competitivo. Los ácidos nucleicos relacionados con el HIV (DNA y RNA) se pueden detectar en muestras biológicas, células y en forma aislada usando los ácidos nucleicos según la presente invención.

Los productos de expresión se pueden complementar con materiales que están relacionados con otras variantes del HIV, que, sin embargo, se distinguen de los materiales de los aislados de la presente invención en sus propiedades biológicas.

Los segmentos de DNA descritos también se pueden emplear para expresar antígenos codificados con fines terapéuticos y de diagnóstico. En ese respecto los segmentos de DNA bajo el control intencionado de secuencias de regulación se introducen en células diana procariotas o eucariotas, tejidos u organismos multicelulares para estimularles a producir los correspondientes antígenos codificados, partes o combinaciones de los mismos con antígenos extraños. Los antígenos se pueden detectar mediante la reacción con anticuerpos anti-HIV-2, más particularmente a partir de los sueros de los respectivos pacientes. Los antígenos que tienen marcos de lectura abiertos más largos (>50 aminoácidos) se doblan sobre sí mismas así como los que están sometidos a procesos de corte y empalme a nivel de RNA y así sólo se componen para formar los marcos de lectura abiertos más largos.

Según la invención se reivindican adicionalmente los polipéptidos que se originan a partir de la variante del virus clonada según la invención para detectar tales antígenos, en el material que se está investigando, que contienen determinantes antígenicos similares y por tanto reaccionan de forma cruzada inmunológicamente. Esto es particularmente adecuado para el diagnóstico en el SIDA y pre-SIDA de portadores del virus o portadores del virus asintomáticos o productos del virus, respectivamente, que se obtienen de la sangre. También es posible la detección serológica de los anticuerpos dirigidos contra estos polipéptidos antígenicos como productos de expresión del virus reivindicados según la invención empleando sistemas convencionales tales como ELISA. Los polipéptidos inmunogénicos se pueden usar como polipéptidos protectores que vacunas para proteger contra infecciones por SIDA.

Los aislados del virus según la invención y los productos derivados de ellos se pueden combinar con otros aislados de la población parcial HIV-2 en sistemas de ensayo, esto es, con los que son tan remotamente posibles en el nivel de población descrito como por ejemplo, el aislado HIV-2 ROD (Guyader, M. et al., 1987). Así, es posible detectar en un ensayo de forma sensible poblaciones remotamente relacionadas.

La variante del virus según la invención es muy diferente del espectro de variantes del HIV-1 y tiene una relación molecular más estrecha con los virus HIV-2 descritos por Guyader, aunque se distinguen de ellos de manera significativa (Figura 1). También las propiedades biológicas se distinguen claramente de las del aislado de HIV-2 descrito. Así, para la replicación efectiva *in vitro*, la variante según la invención, prefiere células que son derivadas de líneas mieloides. Por el contrario, el virus se reproduce mal en líneas linfocíticas.

Se ha depositado según el Tratado de Budapest una muestra del virus reivindicado según la invención en forma de aislado en *European Collection of Animal Cell Cultures* con la designación HIV D205 (V 87122304).

La Figura 1 muestra los mapas de restricción del aislado del virus según la invención comparados con secuencias de HIV conocidas.

La Figura 2 muestra las secuencias parciales de nucleótidos de HIV-D205 (que corresponden al

clon HIV-2 A7.1 de la Figura 1)

La Figura 3 muestra la homología de secuencia del HIV-2 D205,7 comparada con el grupo HIV/SIV (a nivel de genes nt/aa).

La Figura 4 muestra una comparación de las secuencias de nucleótidos del HIV-2 D205 con cadenas de HIV y SIV (en % de homología).

Los resultados experimentales y las características de HIV-D205 se describen en Kühnel, H. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 4, 2383-2387.

La secuencia de HIV-D205 muestra muchos de los denominados "marcos de lectura abiertos". La mayoría de estos marcos de lectura se pueden relacionar con proteínas/antígenos expresados *in vivo* por comparación de homologías con virus HIV previamente descritos, por comparación de transferencias Western realizadas con antígenos de HIV-D205 derivados de células HUT78 ó U937 infectadas y por sondeo con sueros de los correspondientes pacientes y sueros de referencia.

Otros marcos de lectura abiertos no se identifican a nivel de sus antígenos expresados definidos por función o manchado del anticuerpo en una transferencia Western. Sin embargo, se pueden expresar en otras circunstancias *in vivo*. Otros marcos de lectura, incluso los cortos, se pueden expresar también de forma difícil de predecir basándose sólo en los datos de secuenciación de ácidos nucleicos debido a procesos de corte y empalme.

Los determinantes antígenicos de proteínas expresadas que son importantes para la función biológica, para antígenos diana en el diagnóstico o para inmunización se extienden por toda la secuencia de la proteína lineal expresada. Partes de estas secuencias pueden tener más propiedades antígenicas generales que otras como se puede mostrar mediante la escrutinio/cartografía de péptidos para sitios antígenicos. Estos sitios se pueden expresar como epitopos únicos o como polipéptidos continuos o en una versión de antígenos cortados y empalmados *in vitro* o sintéticamente. La antigenicidad de los productos expresados se puede demostrar mediante la fijación de los antígenos y la transferencia en el análisis de transferencia Western. Se pueden preparar construcciones para la expresión del antígeno en *E. coli* usando técnicas convencionales empleando genes sintéticos, fragmentos de restricción de segmentos de genoma viral clonados, productos de recorte de ellos usando exonucleasa o DNasa I o empleando cebadores sintéticos específicos de una secuencia que definen los deseados extremos 5' y 3' del fragmento que se ha de expresar junto con sitios de restricción apropiados. Estos sitios de restricción se pueden usar fácilmente para ligación en un panel de vectores de expresión de distintos organismos como los derivados de PLc24 (Remault et al. 1981 Gene 15, 81-83) con sitios de clonación múltiple (pEX).

Se mostró que los antígenos expresados reaccionaban específicamente con los sueros de los pacientes. El p27(24) de gag de HIV-D205 reaccionaba de forma muy sensible tanto con los sueros típicos HIV-1 como con los sueros típicos HIV-2 (véase Kühnel et al.)

REIVINDICACIONES

1. Un aislado del virus HIV-2 D205 (ECACC V 87122304), que tiene preferencia por células que se derivan de células mieloides para la replicación *in vitro*.

2. DNA de las secuencias parciales províricas del aislado del virus de la reivindicación 1, según las características de los sitios de restricción de endonucleasa de la figura 1.

3. DNAC que se diferencia de la secuencia de nucleótidos de los aislados de virus según la reivindicación 1, en hasta 5 %.

4. RNA vírico que se diferencia de la secuencia de nucleótidos de los aislados del virus según la reivindicación 1, en hasta 5 %.

5. DNA recombinante que contiene DNA como se define en las reivindicaciones 2 y 3.

6. DNA o RNA según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en los que el DNA o RNA está presente como híbrido con cadenas complementarias de DNA o RNA marcadas.

7. DNA según una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3, 5 y/o 6, **caracterizado** porque es complementario del DNA viral.

8. Productos de expresión del aislado del virus según la reivindicación 1.

9. Productos de expresión según la reivindicación 8, **caracterizados** porque las proteínas o los péptidos han sido codificados mediante un marco de lectura abierto en el DNA según la reivindicación 2.

10. Un procedimiento para la detección *in vitro* de anticuerpos contra los productos de expresión de los virus según la reivindicación 8, **caracterizado** porque los productos de expresión de los virus se detectan mediante métodos inmunológicos.

11. El procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque los productos de expresión son proteínas o péptidos que son codificados por un marco de lectura abierto del DNA según la reivindicación 2 y se preparan mediante métodos sintéticos o biosintéticos.

12. El procedimiento según las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizado** porque previamente una cantidad definida de una combinación de productos de expresión se fija en placas de microtitulación, tras lo cual posteriormente muestras biológicas, diluidas o sin diluir, se ponen en contacto con las placas de microtitulación revestidas y después de la incubación y etapas secuenciales de lavado se pueden identificar mediante un reactivo de detección o anticuerpos anti-HIV marcados.

13. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, **caracterizado** porque se usan tiras de filtro y tiras de plástico o varillas en vez de placas de microtitulación, cuando los productos de expresión de los virus se han fijado en posiciones respectivas específicas por aplicación aislada de los distintos antígenos.

14. El procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado** porque los productos de expresión se separan por electroforesis en gel y después se trasladan por transferencia después de lo cual se efectúa la incubación con anticuerpos anti-HIV y su detección.

15. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, **caracterizado** porque la detección se efectúa en portadores en fase sólida a los que se han unido los determinantes antígenicos, consistiendo el portador en fase sólida en partículas.

16. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, **caracterizado** porque los productos de expresión son antígenos del virus derivados de células infectadas *in vitro*, estando dichos antígenos en contacto con materiales de ensayo biológicos como antígenos unidos a células fijadas y porque la posterior unión al anticuerpo se puede determinar con reactivos de detección inmunológicos mediante un aparato, por ejemplo con un citofluorímetro o visualmente.

17. El procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado** porque los antígenos se determinan por ensayo ELISA competitivo.

18. Un procedimiento para detectar ácidos nucleicos relacionados con HIV (DNA y RNA) en muestras biológicas, células y en forma aislada usando los ácidos nucleicos según las reivindicaciones 2 a 7.

19. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 18, **caracterizado** porque los productos de expresión se suplementan con materiales que están relacionados con otras variantes del HIV, que, sin embargo, se distinguen en sus propiedades biológicas de los productos de expresión del aislado según la reivindicación 1.

20. Composición inmunogénica, que contiene productos de expresión de la reivindicación 8.

21. Composición inmunogénica según la reivindicación 20, **caracterizada** porque un antígeno es el antígeno de membrana total.

22. Anticuerpos, y más específicamente anticuerpos monoclonales, dirigidos específicamente contra productos de expresión del aislado del virus según la reivindicación 1.

23. Células aisladas que se han transformado con ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.

24. Células aisladas que se han infectado con el aislado del virus según la reivindicación 1.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

ES 2 194 029 T3

Fig. 2

Hoja 1

Secuencias parciales de nucleótidos del HIV-D205
(correspondientes al clon HIV-2 A7.1 de la Fig. 1)

HIV-D205; correspondiente a la posición 8942-9255 en HIV-2_{ROD}; homología 71,6%

```

      10           20           30           40           50           60
TGG AAGGGAT GTATTATAGT GAGAGAGAC ACAGATATT AGACACATAT TTTGAGAATG
      70           80           90          100          110          120
AAGAAGGCAT TGTGTCTGGC TGGCAAAACT ATACTCATGG GCCAGGGATA AGGCATCCCA
      130          140          150          160          170          180
AATACTTTGG TTGGCTGTGG AAGCTGGTAC CAGTAGAGGT GCCAGCAGCG ACCCGAGAGG
      190          200          210          220          230          240
AGGAGGAAC CCATTGCCTA ATGCACCCCG CACAGATCTC CTCATGGGAT GACATCCATG
      250          260          270          280          290          300
GGGAGACTCT TATCTGGCAG TTTGATTCCC TCCTGGCATA TGATTATGTG GCTTTCAATA
      310
GGTTTCCAGA AGAGTTT
    
```

HIV-D205; correspondiente a la posición 718-2510 en HIV-2_{ROD}; homología 78,6%

```

      10           20           30           40           50           60
AAAAAATTCT TAAAGTCTTA GCTCCATTAG TACCACACAGG GTCAGAAAAT TTA AAAAGCC
      70           80           90          100          110          120
TTTTTAATAT CCTCTGGGTC ATTTTTTGCC TGCACCCAGA AGAGAAAAGTG AAAGATACAG
      130          140          150          160          170          180
AGGAAGCAA AAAGATAGCA CAGAGACATC TAGCCGCGGA CACAGAAAAA ATGCCAGCTA
      190          200          210          220          230          240
CAATAAACC AACAGCACCA CCTAGCGGCG GAAATTATCC AGTGCAGCAA CTGGCTGGCA
      250          260          270          280          290          300
ACTACGTCCT CCTGCGGCTA AGCCCCGAA CCTTAATGC TTGGGTAAAG TTAGTAGAAG
      310          320          330          340          350          360
AAAGAAGTT CGGGGCAGAA CTAGTACCAG GATTCAGGC ACTATCAGAA GGATGCACCC
      370          380          390          400          410          420
CTTATGATAT AAATCAGATG CTAAATTGTG TAGGAGAACA TCAGGCAGCC ATGCAAATTA
      430          440          450          460          470          480
TTAGAGAAAT AATCAATGAG GAAGCACCAC ACTGGACCA GCAACACCCG TCACCAGGCC
    
```

Fig. 2

Hoja 2

```

490      500      510      520      530      540
CAATGCCGGC AGGACAACCTT AGGGACCCAA GAGGGTCAGA TATAGCAGGA ACCACCAGCA

550      560      570      580      590      600
CAGTAGAGGA ACAGATACAG TGGATGTACA GGGCCCAAAA TCCTGTCCCA GTGGSAACA

610      620      630      640      650      660
TTTATAGAAG ATGGATTCAA TTAGGATTGC AGAAATGTGT CCGAATGTAC AATCCTACCA

670      680      690      700      710      720
ACATATTAGA CATAAAGCAG GGACCAAGG AGCCCTTCCA AAGCTATGTA GATAGATTCT

730      740      750      760      770      780
ACAAAAGCTT ACGGGCAGAA CAAACAGACC CAGCAGTGAA AAATTGGATG ACACAAACAC

790      800      810      820      830      840
TGCTGATTCA GAATGCTAAC CCAGATTGCA ACTTAGTGCT TAAGGGCTTG GGAATGAATC

850      860      870      880      890      900
CCACCTTAGA GGAATGCTA ACGCCCTGCC AAGGGATAGG AGGCCCAGGG CAGAAGGCAA

910      920      930      940      950      960
GGCTAATGGC CGAAGCCTTA AAAGAGGCCC TAACACCTGC ACCCATACCG TTTGCTGCCG

970      980      990      1000     1010     1020
TTCAACAAA AGCAGGGGAG AGAGGGACAG TGACATGCTC GAAGTGTGGC AAACAGGGAC

1030     1040     1050     1060     1070     1080
ACACAGCCAG GCAATGCAGG GCCCCTAGAA CACAGGGATG CTGGAAATGT GGA AAAACAG

1090     1100     1110     1120     1130     1140
GACACATCAT GTCAPPAATGC CCAGAAAGAC AGCCGGGTTT TTTAGGGTFA GGACCCCTGGG

1150     1160     1170     1180     1190     1200
GAAAGAAGCC TCGCAACTTC CCCATGACCC AAGTGCCTCA GGGAGTGACA CCATCTGCAC

1210     1220     1230     1240     1250     1260
CCCCGATGAA CCCAGCAGAG GGCATGACAC CTCGGGGGGC GACACCATCT GCGCCCCCTG

1270     1280     1290     1300     1310     1320
CAGATCCAGC AGTGGAGATG CTGAAAAGTT ACATGCAGAT GGGGAGACAA CAGAGAGAGA

1330     1340     1350     1360     1370     1380
CCCGAGAGAG ACCCTACAAG GAGGTGACAG AGGATTGCT GCACCTCAAT TCTCTTTIG

1390     1400     1410     1420     1430     1440
GAGAAGACCA GTAGTCAAAG CATGTATCGA GGGTCAGTCA GTAGAAGTAT TACTAGACAC

1450     1460     1470     1480     1490     1500
AGGAGTTGAC GACTCAATAG TAGCAGGGAT AGAATTAGGT AGCAATTACA CCCCAAAAAT

1510     1520     1530     1540     1550     1560
AGTAGGAGGG ATAGGAGGGT TCATAAATAC CAAAGAATAC AAAGATGTAG AATAGAAAT

1570     1580     1590     1600     1610     1620
AGTGGGAAA AGAGTAAGGG CAACTATAAT GACAGGAGAT ACCCCAATAA ACATTTTGG
    
```

ES 2 194 029 T3

Fig. 2

Hoja 3

```

1530      1640      1650      1660      1670      1680
CAGAAATATT TAAATACCT TGGGCATGAC TTTAAATTTT CCAGTGGCAA AGGTAGAACC

1690      1700      1710      1720      1730      1740
AGTAAAAGTT GAGTTAAAAC CTGGAAAAGA TGGGCCAARG ATCAGACAAT GGCCCTCATT

1750      1760      1770      1780      1790
CAGGAAAAG ATACTAGCCC TCAAAGAAAT CTGTGAAAA ATGGAAAAGG
    
```

HIV-D205, correspondiente a la posición 2877-7293 en HIV-2_{ROD}; homología 75,1%

```

10      20      30      40      50      60
AGGTATTAGA TCCTTTTAGA AAGGCCAACA GCGATGICAT TATAATTCAG TACATGGATG

70      80      90      100     110     120
ACATCCTTAT AGCAAGTGAC AGAAGTGATC TCGAGCACGA CAGGGTAGTG TCCCAACTAA

130     140     150     160     170     180
AAGAGTTATT AAATGACATG GGATTCTCTA CCCCAGAGA AAGTTCCAA AAGACCCTC

190     200     210     220     230     240
CGTTCAAATG GATGGGTTAT GAGCTCTGGC CAAAAAGTG GAACCTGCAA AAATATACAC

250     260     270     280     290     300
TGCCAGAAAA AGAAGTETGG ACAGTGAATG CAATTCAAAA ACTGCTAGGA GTATTAAACT

310     320     330     340     350     360
GGGCAGCTCA ACTCTTTCCT GGAATTAAGA CAGGACACAT ATGCAAACTA ATTAGGGGAA

370     380     390     400     410     420
AGATGACCCT AACAGAAGAA GTACAGTGGC CAGAACTAGC AGAAGCAGAG CTACAGGAGA

430     440     450     460     470     480
ATAAAATCAT CTTAGAACAG GAACAAGAGG GATCCTACTA CAGGGAAGG GTACCCCTAG

490     500     510     520     530     540
AAGCAACAGT ACAGAAAAAC CTAGCAAAAC AGTGGACATA CAAAATTCAT CAGGGALATA

550     560     570     580     590     600
AACTCCTAAA AGTAGGAAAA TATGCAAAAG TIAAAAACAC GCACACCAAC GGGGTAAAGC

610     620     630     640     650     660
TACTGGCACA TGTAGTTCAG AAAATAGGCA AAGAAGCCCT AGTCATCTGG GGAGAGATAC

670     680     690     700     710     720
CAGTGTTCCT TCTGCCAGTA GAAAGAGAGA CATGGGACCA GTGGETGGACA GATTACTGCC

730     740     750     760     770     780
AAGTAACCTG GATCCCAGAG TGGGACTTTG TCTCGACCCC ACCATTAATA AGACTAGCCT

790     800     810     820     830     840
ACAACCTAGT CAAAGACCCC CTAGAAGGGA GAGAACCTA CTACACAGAT GGGTCCTGCA
    
```

ES 2 194 029 T3

Fig. 2

Hoja 4

```

      850      860      870      880      890      900
ATAGAACCTC AAAGGAAGSA AAAGCAGGAT ATGTCACTGA CAGGGGAAAA GATAAGGTTA

      910      920      930      940      950      960
AAGTGTTAGA ACAGACAACA AACCAACAAG CAGAACTTGA AGCATTGGCA TTAGCATTAA

      970      980      990     1000     1010     1020
CAGACTCAGA ACCACAAGTT AACATCATAG TAGATTCACA ATATGTCATG GGAATAATAG

     1030     1040     1050     1060     1070     1080
CTGCACAGCC AACACAAACA GAATCACCAA TAGTAGCAA AATAATGAA GAAATGATCA

     1090     1100     1110     1120     1130     1140
AAAAGAGGC AGTATATGTA GGATGGGTAC CAGCTCACAA GGGACTGGGT GGTAATCAGG

     1150     1160     1170     1180     1190     1200
AAGTAGACCA CCTAGTAAGT CAAGGAATCA GACAGSTCTT GTTCCTAGAA AAAATAGAAC

     1210     1220     1230     1240     1250     1260
CAGCCAGGA AGAGCATGAA AAATATCATG GCAATGTAAG AGAACTGGTC CATAAATTCG

     1270     1280     1290     1300     1310     1320
GAATCCACA ATTAGTGGCA AACAGATAG TAAATTCCTG TGATAAATGC CAACAAAAAG

     1330     1340     1350     1360     1370     1380
GGGAAGCTAT TCATGGACAG GTAAATGCAG ACCTAGGGAC ATGGCAGATG GACTGTACAC

     1390     1400     1410     1420     1430     1440
ATTTAGAAGG AAAAATTATA ATAGTGGCAG TCCATGTAGC CAGTGGGTTT ATAGAAGCAG

     1450     1460     1470     1480     1490     1500
AGGTATATACC CCAAGAGACA GGAAGACAAA CAGCTCTCTT CCTACTAAAG TTGGCCAGCA

     1510     1520     1530     1540     1550     1560
GATGGCCTAT CACACACCTA CACACAGACA ACGSTGCCAA CTTACCTCA CCAAGTGTAA

     1570     1580     1590     1600     1610     1620
AGATGGTAGC CTGGTGGGTA GGAATAGAAC AAACCTTTGG AGTACCCTAT AACCCACAAA

     1630     1640     1650     1660     1670     1680
GTCAAGGAGT AGTGGAAAGCA ATGAACCATC ACCTGAAAA TCAAATAGAC AGACTCAGAG

     1690     1700     1710     1720     1730     1740
ACCAAGCAGT ATCAATAGAG ACAGTTGTAC TAAITGGCAAC TCACTGCATG AATTTTAAAA

     1750     1760     1770     1780     1790     1800
GAAGGGGAGG AATAGGGGAT ATGACCCCTG CAGAAAGACT AGTTAACATG ATAACCACAG

     1810     1820     1830     1840     1850     1860
AGCAAGAAAT ACAGTTCTTC CAAGCAAAAA ATTTAAATTT TCAAAATTTT CAGGTCTATT

     1870     1880     1890     1900     1910     1920
ACAGAGAAGG CAGAGATCAA CTCTGGAAGG GACCTGGTGA ACTATTGTGG AAAGGGGAGG

     1930     1940     1950     1960     1970     1980
GAGCAGTCAT CATAAAGGTA GGGACAGAAA TCAAGTAGT ACCCAGGAGA AAAGCAAAA
    
```

ES 2 194 029 T3

Fig. 2

Hoja 5

1990	2000	2010	2020	2030	2040
TTATAAGGCA	CTATGGAGGA	GGAAAAGGAT	TGGATTGTAG	TGCCGACATG	GAGGATACCA
2050	2060	2070	2080	2090	2100
GGCAGGCTAG	AGAGATGGCA	CAGTGTGATT	AAGTATCTTA	AGTATAGAAC	AGGAGAGTTG
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CAACAGGTCT	CTTATGTCCC	TCACCACAAG	GTAGGATGGG	CTTGGTGGAC	TTGCAGTAGA
2170	2180	2190	2200	2210	2220
ATAATATTTT	CCCTAAACAA	AGGAGCATGG	CTAGAACTCC	AAGGATATTG	GAACCTAAC
2230	2240	2250	2260	2270	2280
CCAGAAAGGG	GATTCTTGAG	CTCCTATGCT	GTAAGACTAA	CATGGTATGA	GAGGAACTTT
2290	2300	2310	2320	2330	2340
TATACAGATG	TAACACCTGA	TGTGGCAGAC	CAGCTACTGC	ATGGGTCTTA	TTTCTCTTGC
2350	2360	2370	2380	2390	2400
TTTTCAGCCA	ATGAAGTAG	GAGAGCCATC	AGGGGAGAAA	AGATATGTTC	CTACTGCAAC
2410	2420	2430	2440	2450	2460
TATCCATCAG	CTCACGAAGG	GCAGGTACCA	AGCTTACAGT	TTCTAGCCCT	AAGGGTCTGA
2470	2480	2490	2500	2510	2520
CAGGAAGGAA	AAAATGGATC	CCAGGGAGAG	AGTCCACCCA	GGAAACAGCG	ACGAAGAAM
2530	2540	2550	2560	2570	2580
AGTAGGAGAA	GCATTGCTT	GGCTAGAAAG	AACATAACA	GAGCTCAACA	GGGTAGCGGT
2590	2600	2610	2620	2630	2640
CAACCATTGG	CCCCGAGAAC	TTATTTTCCA	GGTGTGGCAG	AGGTCTTGGG	CATACTGGCG
2650	2660	2670	2680	2690	2700
TGAGGAACAG	GGCATGTCAA	TTAGCTATAC	CATAATAGA	TACTTGTTCG	TAATGCAGAA
2710	2720	2730	2740	2750	2760
AGCAATGTTT	GTGCACTATA	CAAAGGGCTC	TAGGTGCCTC	CAGGAGGGCC	ATGGGCCAGG
2770	2780	2790	2800	2810	2820
GGGATNGAGA	TCAGGACCTC	CTCCTCCTCC	TCCCCCAGGC	CTGGCCATAAT	GGCAGAAGCA
2830	2840	2850	2860	2870	2880
GCCCCAGAGA	TCCCTCCAGA	GACCGAGAAC	CCACAAAGAG	AACCGTGGGA	AGAGTGGATA
2890	2900	2910	2920	2930	2940
GGGGAGATCC	TGGAGGAAAT	AAAGCAAGAA	GCCTTAAAGC	ATTTTGATCC	TGGCTTGCTA
2950	2960	2970	2980	2990	3000
ACTGCGCTTG	GTAACTTTAT	CTACAGTAGG	CATGGAGATA	CCCTTGCAGG	AGCAGGAGAG
3010	3020	3030	3040	3050	3060
CTCATTAATA	TCCTCCAACG	AGCNCTCTTC	CTCCACTTCA	GAGCCGGTTG	TCAACACTCA
3070	3080	3090	3100	3110	3120
AGGATTGGAC	AATCAGGGGG	AGGAAATCCT	CTCTCAACTA	TACCGCCCCC	TTAAGGCATG

ES 2 194 029 T3

Fig. 2

Hoja 6

```

3130      3140      3150      3160      3170      3180
CGATAATACA TGCTACTGTA AGAAATGCTG CTACCATTGC CAGCTTTGTT TTCTTAAAAA

3190      3200      3210      3220      3230      3240
GGGTCTTGGG ATATGTTATG ACCGCTCGAG AAGGAGATCT GCRAAAAGAG CTAAGACTAC

3250      3260      3270      3280      3290      3300
TGCACCTTCT GCACCAGACA AGTGAGTATG GCATATTTTA GCAGCCGCCT GCCTATTGCG

3310      3320      3330      3340      3350      3360
CTCCTGCCTA TAGGTATCAG TGGGTTTGTA TGTAAACAAT ATGTTACTGT CTTCTATGGC

3370      3380      3390      3400      3410      3420
ATACCCGCAT GGAGGAACGC AACAGTTCCC CTCATTGTG CAACCCACAA CAGAGACACC

3430      3440      3450      3460      3470      3480
TGGGGAACATG TACAGTGTCT CCCAGACAAT GGTGACTACA CTGACATCAG GCTAAACATA

3490      3500      3510      3520      3530      3540
ACAGAGGCTT TTGATGCATG GGATAATACA CTCACACAAC AGGCAGTAGA TGATGTGTGG

3550      3560      3570      3580      3590      3600
AGACTCTTTS AAACCTCCAT AAAACCATGT CTCAACTAA CCCCCTGTG TGTGGCAATG

3610      3620      3630      3640      3650      3660
AACTGTACTA AAACCGAAC AAACCCAGGG AATGCCAGTA GTACTACCAC CACTARGCCT

3670      3680      3690      3700      3710      3720
ACTACCACCT CTCGTGGGCT GAAAACGATT AACGAAACAG ACCCATGCAT AAAAATGAC

3730      3740      3750      3760      3770      3780
AGCTGCACAG GACTAGGAGA AGAGGAATA ATGCCATGTA ATTTTAGTAT GACGGGACTA

3790      3800      3810      3820      3830      3840
AGAAGAGATG AGCTAAAACA ATATAAGAC ACCTGCTACT CAGAAGATT AGAGTSTAAT

3850      3860      3870      3880      3890      3900
AATACCAGGA AGTAAATACCA GCAGTGTAT ATAAGAACCT GCAACACAAC AATTATCCAA

3910      3920      3930      3940      3950      3960
GAGTCATGTG ACAAACATA TTGGGACAGC TTAAAGTTTA GGTATTTGTC TCCCCCGGG

3970      3980      3990      4000      4010      4020
TTTTTCTAC TAAGATGTA TGATACCAC TATTCAGGCT TCATGCCCAA CTGCAGTAAG

4030      4040      4050      4060      4070      4080
GTAGTAGCGT CCTCCTCCAC AAGATGATG GAAACACAGT CCTCTACATG GTTTGGCTTC

4090      4100      4110      4120      4130      4140
AATGGTACAA GGGCAGAGAA CAGGACATAT ATATAATGGC ATGAABABA CAATAGGACC

4150      4160      4170      4180      4190      4200
ATCATAAGCT TAAATACATA CTATAATTG TCAATACACT GTAAGAGGCC AGGAACAAAG

4210      4220      4230      4240      4250      4260
ACGGTTGTAC CAATAAGAAC CGTGTGAGGA CTACTTTCC ATTCACAGCC TATCAATAAG

```

ES 2 194 029 T3

Fig. 2

Hoja 7

```
      4270      4280      4290      4300      4310      4320
AGACCCAGAC AAGCTTGGTG CTGGTTAAG GGAAACTGGA CAGAAGCCAT AAGGAGGTC

      4330      4340      4350      4360      4370      4380
AAAAGGACCA TCATAAACA TCCCAGGTAT AAGGAGGTC CAAAAATAT CACAGCGTA

      4390      4400      4410
AAGTTAGTAT CAGAACATGG AAAAGGTCA GATC
```

Fig. 3

Homología de la secuencia del HIV-2D205,7 comparada con el grupo HIV/SIV (a nivel de genes; nt/aa)

HIV-2D205,7									
Gen	Posición	HIV-2 _{ROD}	HIV-2 _{NIHZ}	HIV-2 _{D194}	SIV _{MAC}	SIV _{AGM}	HIV-1 _{BRU}		
gag	720-1826	80.5 / 85.6							
gag	1860-2114	83.1 / 77.6							
pol	1859-2510	80.2 / 72.5							
pol	2877-4948	78.3 / 83.5							
protease	2084-2301	84.0 / 81.0	83.0 / 84.8	84.0 / 86.0	76.3 / 83.8	57.8 / 47.1	60.4 / 48.5		
vil	4860-5516	72.0 / 68.5	70.9 / 67.9	72.4 / 66.5	71.9 / 60.6	53.8 / 34.7	47.9 / 33.0		
vpx	5344-5682	76.1 / 74.1	73.5 / 68.1	74.6 / 77.9	75.2 / 77.0	50.8 / 34.7			
vpr	5682-5999	78.0 / 69.0	77.7 / 69.8	74.2 / 59.4	78.9 / 76.4		51.9 / 47.3		
tax1	5845-6140	78.4 / 66.3	79.1 / 68.4	74.7 / 63.3	81.1 / 66.3	33.1 / 38.1	33.6 / 34.0		
rev1	6071-6140	67.1 / 61.9	68.6 / 60.9	67.1 / 52.2	70.9 / 60.9	45.5 / 28.6	38.2 / 40.4		
nel	8557-9255	72.1 / 69.5							
env	6147-7293	70.0 / 67.0							

Fig. 4

Comparación de la secuencia de nucleótidos del HIV-2_{D205} con las cepas de HIV y SIV (en % de homología)

HIV-2 _{D205}	HIV-2 _{ROD}	HIV-2 _{NIHZ}	HIV-2 _{D194}	SIV _{MAC}	SIV _{AGM}	HIV-1 _{BRU}
8942-9255	71.6	77.0	68.8	66.4	56.3	54.7
718-1825	80.5	80.8	80.3	79.1	65.1	63.8
1059-2510	80.2	74.6	75.0	78.8	55.6	56.9
2877-7293	75.1	74.8	75.4	74.0	58.0	54.6
Total	75.9	75.9	75.9	75.0	58.9	56.4