

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



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

51 Int. Cl.:

C12N 15/49 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 14/155 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.1989 E 95100149 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **27.07.2016 EP 0655501**

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

30 Prioridad:

14.06.1988 DE 3820223

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

26.10.2016

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (50.0%)
Max-Volmer-Strasse 4
40724 Hilden, DE y
CHEMOTHERAPEUTISCHES
FORSCHUNGSINSTITUT GEORG-SPEYER-HAUS
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**HENCO, DR. KARSTEN;
VON BRIESEN, HAGEN;
IMMELMANN, DR. ANDREAS;
KÜHNEL, DR. HERBERT;
DIETRICH, DR. URSULA;
RÜBSAMEN-WAIGMANN, PROF. DR. HELGA y
ADAMSKI, MICHALINA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 194 029 T5

DESCRIPCIÓN

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 delecciones (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).

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.

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 comprende 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 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.

Los polipéptidos que se originan a partir de la variante del virus clonada según la invención pueden ser usados para detectar tales antígenos, en el material que se está investigando, que contienen determinantes antigénicos 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 antigénicos 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 como 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 antigénicos 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 antigénicas generales que otras como se puede mostrar mediante la escrutinio/cartografía de péptidos para sitios antigénicos. 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*.
- 5 2. RNA vírico que se diferencia de la secuencia de nucleótidos de los aislados del virus según la reivindicación 1, en hasta 5 %.
3. RNA según la reivindicación 2, en donde el RNA está presente como híbrido con cadenas complementarias de RNA marcadas.
4. Un procedimiento para la detección de ácidos nucleicos relacionados con HIV (DNA y RNA) en muestras biológicas, células y en forma aislada usando los ácidos nucleicos según las reivindicaciones 2 o 3.
- 10 5. Células aisladas que se han transformado con ácidos nucleicos según una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3.
6. Células aisladas que se han infectado con el aislado del virus según la reivindicación 1.

Fig. 1

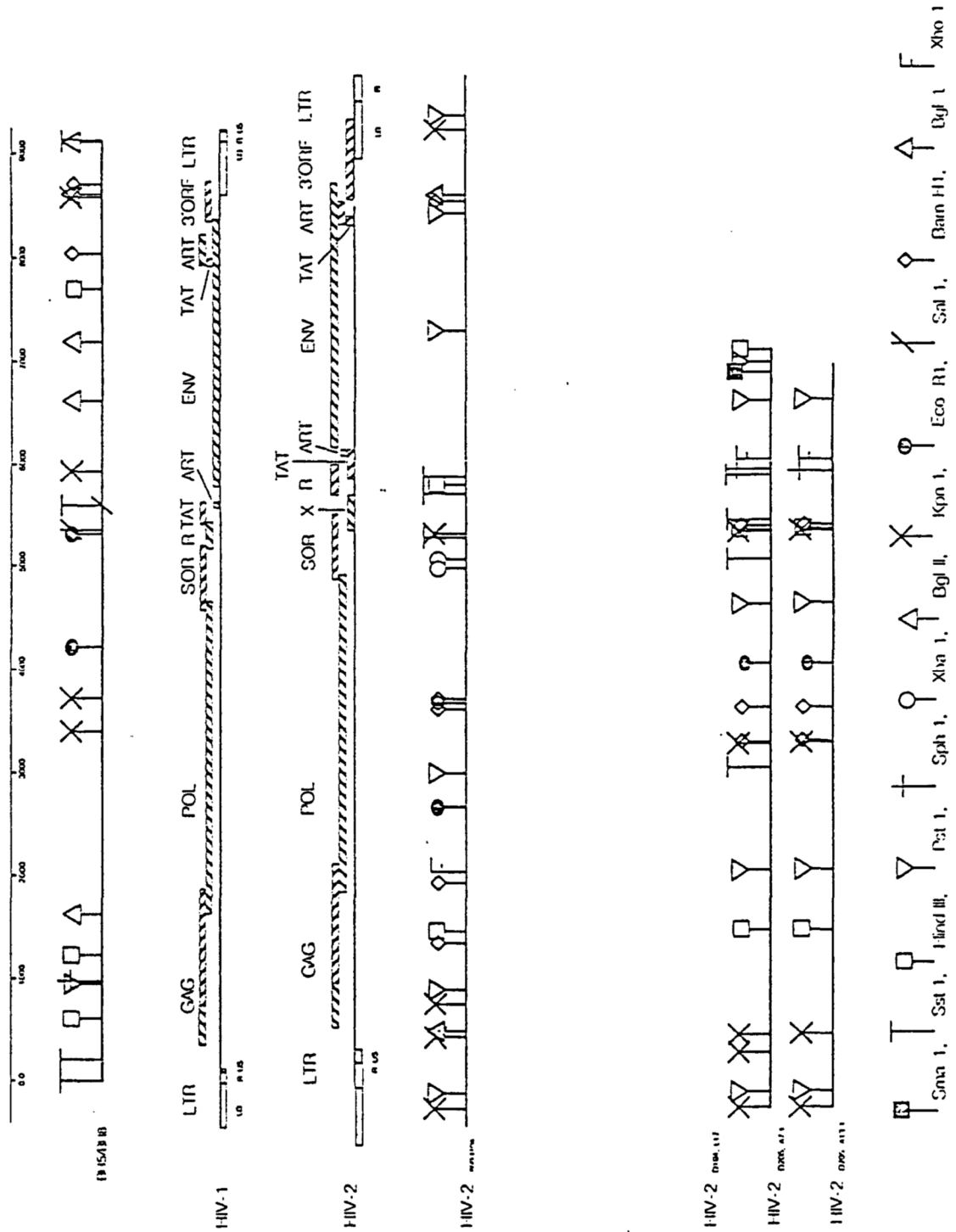


Fig. 2

Hoja 1

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

HIV-D205, correspondiente a la posición 8492-9255 en HIV-2_{ROD}; homología 71.6%

```

      10      20      30      40      50      60
TGGAAGGGAT GTATTATAGT GAGAGAAGAC ACAGAAATATT 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
AGGAGGAAAC CCATTGCCTA ATGCACCCGG 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 TACCAACAGG GTCAGAAAAT TTAAAAAGCC

      70      80      90     100     110     120
TTTTTAATAT CGTCTGCGTC ATTTTTTTGCC TGCACGCAGA AGAGAAAGTG AAAGATACAG

     130     140     150     160     170     180
AGGAAGCAAA AAAGATAGCA CAGAGACATC TAGCGGCGGA CACAGAAAAA ATGCCAGCTA

     190     200     210     220     230     240
CAAATAAACC AACAGCACCA CCTAGCGGCG GAAATTATCC AGTGCAGCAA CTGGCTGGCA

     250     260     270     280     290     300
ACTACGTCCA CCTGCCGCTA AGCCCCCGAA CCTTAATATGC TTGGGTAAAG TTAGTAGAAG

     310     320     330     340     350     360
AAAAGAAGTT CGGGGCAGAA GTAGTACCAG GATTTCAGGC ACTATCAGAA GGATGCACCC

     370     380     390     400     410     420
CTTATGATAT AAATCAGATG CTAAATTGTG TAGGAGAACA TCAGGCAGCC ATGCAAAATTA

     430     440     450     460     470     480
TTAGAGAAAT AATCAATGAG GAAGCAGCAG ACTGGGACCA 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	GGGCCCCAAA	TCCTGTCCCA	GTGGGAAACA
610	620	630	640	650	660
TTTATAGAAG	ATGGATTCAA	TTAGGATTGC	AGAAATGTGT	CCGAATGTAC	AATCCTACCA
670	680	690	700	710	720
ACATATTAGA	CATAAAGCAG	GGACCAAAGG	AGCCCTTCCA	AAGCTATGTA	GATAGATTCT
730	740	750	760	770	780
ACAAAAGCTT	ACGGGCAGAA	CAAACAGACC	CAGCAGTGAA	AAATTGGATG	ACACAAACAC
790	800	810	820	830	840
TGCTGATTCA	GAATGCTAAC	CCAGATTGCA	AGTTAGTGCT	TAAGGGCTTG	GGAATGAATC
850	860	870	880	890	900
CCACCTTAGA	GGAAATGCTA	ACGGCCTGCC	AAGGGATAGG	AGGCCCAGGG	CAGAAGGCAA
910	920	930	940	950	960
GGCTAATGGC	CGAAGCCTTA	AAAGAGGCC	TAACACCTGC	ACCCATACCG	TTTGCTGCCG
970	980	990	1000	1010	1020
TTCAACAAAA	AGCAGGGAAG	AGAGGGACAG	TGACATGCTG	GAAGTGTGGC	AAACAGGGAC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
ACACAGCCAG	GCAATGCAGG	GCCCCTAGAA	GACAGGGATG	CTGGAAATGT	GGAAAAACAG
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GACACATCAT	GTCAAAATGC	CCAGAAAGAC	AGGCGGGTTT	TTTAGGGTTA	GGACCCTGGG
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	GGGAGACAA	CAGAGAGAGA
1330	1340	1350	1360	1370	1380
GCCGAGAGAG	ACCCTACAAG	GAGGTGACAG	AGGATTGCT	GCACCTCAAT	TCTCTCTTG
1390	1400	1410	1420	1430	1440
GAGAAGACCA	GTAGTCAAAG	CATGTATCGA	GGGTCAGTCA	GTAGAAGTAT	TACTAGACAC
1450	1460	1470	1480	1490	1500
AGGAGTTGAC	GACTCAATAG	TAGCAGGGAT	AGAATTAGGT	AGCAATTACA	CCCCAAAAT
1510	1520	1530	1540	1550	1560
AGTAGGAGGG	ATAGGAGGGT	TCATAAATAC	CAAGAATAC	AAAGATGTAG	AAATAGAAAT
1570	1580	1590	1600	1610	1620
AGTGGGAAAA	AGAGTAAGGG	CAACTATAAT	GACAGGAGAT	ACCCCAATAA	ACATTTTTTG

Fig. 2

Hoja 3

```

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
CAGAAATATT TTAAATACCT TGGGCATGAC TTAAATTTTC CCAGTGGCAA AGGTAGAACC

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
AGTAAAAGTT GAGTTAAAAC CTGGAAGAAG TGGGCCAAG ATCAGACAAT GGCCTCTATC

      1750      1760      1770      1780      1790
CAGGGAAAAG 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 GCGATGTCAT TATAATTCAG TACATGGATG

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

      130     140     150     160     170     180
AAGAGTTATT AAATGACATG GGATTCTCTA CCCCAGAAGA AAAGTTCCAA AAAGACCCTC

      190     200     210     220     230     240
CGTTCAAAATG GATGGGTTAT GAGCTCTGGC CAAAAAAGTG GAAACTGCAA AAAATACAAC

      250     260     270     280     290     300
TGCCAGAAAA AGAAGTTTGG ACAGTGAATG CAATTCAAAA ACTGGTAGGA GTATTAAACT

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

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

      430     440     450     460     470     480
ATAAAATCAT CTTAGAACAG GAACAAGAAG GATCCTACTA CAAGGAAAGG GTACCGCTAG

      490     500     510     520     530     540
AAGCAACAGT ACAGAAAAAC CTAGCAAATC AGTGGACATA CAAAATTCAT CAGGGAATA

      550     560     570     580     590     600
AAGTCCTAAA AGTAGGAAAA TATGCAAAGG TAAAAACAC GCACACCAAC GGGGTAAGAC

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

      670     680     690     700     710     720
CAGTGTTCCT TCTGCCAGTA GAAAGAGAGA CATGGGACCA GTGGTGGACA GATTACTGGC

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

      790     800     810     820     830     840
ACAACCTAGT CAAAGACCCC CTAGAAGGGA GAGAAACCTA CTACACAGAT GGGTCCTGCA

```

Fig. 2

Hoja 4

850	860	870	880	890	900
ATAGAACCTC	AAAGGAAGGA	AAAGCAGGAT	ATGTCACTGA	CAGGGGAAAA	GATAAGGTTA
910	920	930	940	950	960
AAGTGTTAGA	ACAGACAACA	AACCAACAAG	CAGAACTTGA	AGCATTGCGA	TTAGCATTAA
970	980	990	1000	1010	1020
CAGACTCAGA	ACCACAAGTT	AACATCATAG	TAGATTCACA	ATATGTCATG	GGAAATAATAG
1030	1040	1050	1060	1070	1080
CTGCACAGCC	AACAGAAACA	GAATCACCAA	TAGTAGCAAA	AATAATTGAA	GAAATGATCA
1090	1100	1110	1120	1130	1140
AAAAAGAGGC	AGTATATGTA	GGATGGGTAC	CAGCTCACAA	GGGACTGGGT	GGTAATCAGG
1150	1160	1170	1180	1190	1200
AAGTAGACCA	CCTAGTAAGT	CAAGGAATCA	GACAGGTCTT	GTTCCCTAGAA	AAAATAGAAC
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CAGCCCAGGA	AGAGCATGAA	AAATATCATG	GCAATGTAAA	AGAACTGGTC	CATAAATTCG
1270	1280	1290	1300	1310	1320
GAATTCCACA	ATTAGTGGCA	AAACAGATAG	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
AGGTAATACC	CCAAGAGACA	GGAAGACAGA	CAGCTCTCTT	CCTACTAAAG	TTGGCCAGCA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GATGGCCTAT	CACACACCTA	CACACAGACA	ACGGTGCCAA	CTTCACCTCA	CCAAGTGTA
1570	1580	1590	1600	1610	1620
AGATGGTAGC	CTGGTGGGTA	GGAATAGAAC	AAACTTTTGG	AGTACCCTAT	AACCCACAAA
1630	1640	1650	1660	1670	1680
GTCAAGGAGT	AGTGGAAGCA	ATGAACCATC	ACCTGAAAAA	TCAAATAGAC	AGACTCAGAG
1690	1700	1710	1720	1730	1740
ACCAAGCAGT	ATCAATAGAG	ACAGTTGTAC	TAAATGGCAAC	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	AAAGGGGAAG
1930	1940	1950	1960	1970	1980
GAGCAGTCAT	CATAAAGGTA	GGGACAGAAA	TCAAAGTAGT	ACCCAGGAGA	AAAGCAAAAA

Fig. 2

Hoja 5

1990	2000	2010	2020	2030	2040
TTATAAGGCA	CTATGGAGGA	GGAAAAGGAT	TGGATTGTAG	TGCCGACATG	GAGGATACCA
2050	2060	2070	2080	2090	2100
GGCAGGCTAG	AGAGATGGCA	CAGTCTGATT	AAGTATCTTA	AGTATAGAAC	AGGAGAGTTG
2110	2120	2130	2140	2150	2160
CAACAGGTCT	CTTATGTCCC	TCACCACAAG	GTAGGATGGG	CTTGGTGGAC	TTGCAGTAGA
2170	2180	2190	2200	2210	2220
ATAATATTTT	CCCTAAACAA	AGGAGCATGG	CTAGAAGTCC	AAGGATATTG	GAACCTAACC
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	ATGAAGTAAG	GAGAGCCATC	AGGGGAGAAA	AGATATTGTC	CTACTGCAAC
2410	2420	2430	2440	2450	2460
TATCCATCAG	CTCACGAAGG	GCAGGTACCA	AGCTTACAGT	TTCTAGCCCT	AAGGGTCGTA
2470	2480	2490	2500	2510	2520
CAGGAAGGAA	AAAATGGATC	CCAGGGAGAG	AGTGCCACCA	GGAAACAGCG	ACGAAGAAAC
2530	2540	2550	2560	2570	2580
AGTAGGAGAA	GCATTGCTTT	GGCTAGAAAG	AACAATAACA	GAGCTCAACA	GGGTAGCGGT
2590	2600	2610	2620	2630	2640
CAACCATTGT	CCCCGAGAAC	TTATTTTCCA	GGTCTGGCAG	AGGTCTTGGG	CATACTGGCG
2650	2660	2670	2680	2690	2700
TGAGGAACAG	GGCATGTCAA	TTAGCTATAC	CAATATATAG	TACTTGTTGC	TAATGCAGAA
2710	2720	2730	2740	2750	2760
AGCAATGTTT	GTGCACTATA	CAAAGGGCTG	TAGGTGCCTG	CAGGAGGGCC	ATGGGCCAGG
2770	2780	2790	2800	2810	2820
GGGATNGAGA	TCAGGACCTC	CTCCTCCTCC	TCCCCCAGGC	CTGGCCTAAT	GGCAGAAAGCA
2830	2840	2850	2860	2870	2880
GCCCCAGAGA	TCCCTCCAGA	GAACGAGAAC	CCACAAAGAG	AACCGTGGGA	AGAGTGGATA
2890	2900	2910	2920	2930	2940
GGGGAGATCC	TGGAGGAAAT	AAAGCAAGAA	GCCTTAAAGC	ATTTTGATCC	TCGCTTGCTA
2950	2960	2970	2980	2990	3000
ACTGCGCTTG	GTAACCTTAT	CTACAGTAGG	CATGGAGATA	CCCTTGACAGG	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

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	GCAAAAAGAG	CTAAGACTAC
3250	3260	3270	3280	3290	3300
TGCACCTTCT	GCACCAGACA	AGTGAGTATG	GCATATTTTA	GCAGCCGCCT	GCCTATTGCG
3310	3320	3330	3340	3350	3360
CTCCTGCTTA	TAGGTATCAG	TGGGTTTGTA	TGTAACAAT	ATGTTACTGT	CTTCTATGGC
3370	3380	3390	3400	3410	3420
ATACCCGCAT	GGAGGAACGC	AACAGTTCCC	CTCATTTGTG	CAA'CCACAAA	CAGAGACACC
3430	3440	3450	3460	3470	3480
TGGGGAACCTG	TACAGTGTCT	CCCAGACAAT	GGTGACTACA	CTGAGATCAG	GCTAAACATA
3490	3500	3510	3520	3530	3540
ACAGAGGCTT	TTGATGCATG	GGATAATACA	GTGACACAAC	AGGCAGTAGA	TGATGTGTGG
3550	3560	3570	3580	3590	3600
AGACTCTTTG	AAACCTCCAT	AAAACCATGT	GTCAAACATA	CCCCACTGTG	TGTGGCAATG
3610	3620	3630	3640	3650	3660
AACTGTAGTA	AAACCGAAAC	AAACCCAGGG	AATGCCAGTA	GTACTACCAC	CACTAAGCCT
3670	3680	3690	3700	3710	3720
ACTACCACCT	CTCGTGGGCT	GAAAACGATT	AACGAAACAG	ACCCATGCAT	AAAAAATGAC
3730	3740	3750	3760	3770	3780
AGCTGCACAG	GACTAGGAGA	AGAGGAAATA	ATGCAATGTA	ATTTTAGTAT	GACGGGACTA
3790	3800	3810	3820	3830	3840
AGAAGAGATG	AGCTAAACA	ATATAAAGAC	ACCTGGTACT	CAGAAGATT	AGAGTGTAAT
3850	3860	3870	3880	3890	3900
AATACCAGGA	AGTAATACCA	GCAGTGCTAT	ATAAGAACCT	GCAACACAAC	AATTATCCAA
3910	3920	3930	3940	3950	3960
GAGTCATGTG	ACAAACATTA	TTGGGACAGC	TTAAGGTTTA	GGTATTGTGC	TCCCCCGGGG
3970	3980	3990	4000	4010	4020
TTTTTTCTAC	TAAGATGTAA	TGATACCAAC	TATTCAGGCT	TCATGCCCAA	CTGCAGTAAG
4030	4040	4050	4060	4070	4080
GTAGTAGCGT	CCTCCTGCAC	AAGAATGATG	GAAACACAGT	CCTCTACATG	GTTTGGCTTC
4090	4100	4110	4120	4130	4140
AATGGTACAA	GGGCAGAGAA	CAGGACATAT	ATATATTGGC	ATGAAAAAGA	CAATAGGACC
4150	4160	4170	4180	4190	4200
ATCATAAGCT	TAAATACATA	CTATAATTTG	TCAATACACT	GTAAGAGGCC	AGGAAACAAG
4210	4220	4230	4240	4250	4260
ACGGTTGTAC	CAATAAGAAC	CGTGTCAGGA	CTACTTTTCC	ATTACAGGCC	TATCAATAAG

Fig. 2

Hoja 7

```

      4270      4280      4290      4300      4310      4320
AGACCCAGAC AAGCTTGGTG CTGGTTTAAG GGAAACTGGA CAGAAGCCAT AAAGGAGGTG

      4330      4340      4350      4360      4370      4380
AAAAGGACCA TCATAAAACA TCCCAGGTAT AAAGGAGGTG CAAAAAATAT CACAAGCGTA

      4390      4400      4410
AAGTTAGTAT CAGAACATGG AAAAGGTTCA GATC

```

Fig 3.

Homología de la secuencia del HIV-2D_{205,7} comparada con el grupo HIV/SIV (a nivel de genes; nt/aa)

HIV-2D _{205,7}								
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	2084-2381	84.0 / 81.0	83.0 / 84.8	84.8 / 86.8	76.3 / 83.8	57.8 / 47.1	60.4 / 48.5	
vif	4869-5516	72.0 / 68.5	70.9 / 67.9	72.4 / 66.5	71.8 / 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	78.8 / 69.8	77.7 / 69.8	74.2 / 59.4	78.3 / 76.4		51.9 / 47.3	
latex1	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	
revex1	6071-6140	67.1 / 61.9	68.6 / 60.9	67.1 / 52.2	70.3 / 60.9	45.5 / 28.6	38.2 / 40.4	
nef	8557-9255	72.1 / 69.5						
env	6147-7293	70.0 / 67.0						

Fig 4.

Homología de la secuencia del HIV-2D2₀₅ con las cepas de HIV y SIV (en % de homología)

HIV-2 _{D205}						
posición	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
1859-2510	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