

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 474**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2015 PCT/IB2015/001191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015 WO15181627**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2015 E 15766242 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3149203**

54 Título: **Método in vitro para la detección y la cuantificación del VIH-2**

30 Prioridad:

**27.05.2014 EP 14169958**

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

**30.12.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (16.7%)  
12, rue de l'Ecole de Médecine  
75006 Paris, FR;  
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT (16.7%);  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA  
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (16.7%);  
ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS  
(16.7%);  
UNIVERSITÉ DE ROUEN (16.7%) y  
CHU DE ROUEN (16.7%)**

72 Inventor/es:

**ROUZIUX, CHRISTINE;  
PLANTIER, JEAN-CHRISTOPHE;  
AVETTAND-FENOEL, VÉRONIQUE;  
DAMOND, FLORENCE;  
GUEUDIN, MARIE y  
DESCAMPS, DIANE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 800 474 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método *in vitro* para la detección y la cuantificación del VIH-2

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para la detección y la cuantificación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) 2.

**Antecedentes técnicos**

10 El VIH-2 se caracteriza por una transmisión menos eficaz a través de las vías sexual y vertical que el VIH-1, y por un curso clínico natural más lento. No obstante, la infección por VIH-2 finalmente conduce a SIDA. La infección por VIH-2 debe distinguirse de la infección por VIH-1, puesto que el VIH-2 es naturalmente resistente a inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos, a T20, y a algunos inhibidores de proteasa, y el seguimiento del paciente es distinto de el de una infección por VIH-1.

15 Comparado con el VIH-1, el VIH-2 se caracteriza por una menor replicación vírica. En la cohorte de ANRS francesa CO5 de pacientes infectados por VIH-2 (1009 pacientes en enero de 2014), 61% de los pacientes no tratados presentaban una carga vírica menor que 250 copias/ml (cp/ml). De modo similar, en un estudio británico, solo 8% de los pacientes con CD4 >500 células/mm<sup>3</sup> y 62% de los pacientes con CD4 <300 células/mm<sup>3</sup> presentaban una carga vírica detectable, lo cual implica que 38% de los pacientes presentaban una carga vírica indetectable en un ensayo con un límite de cuantificación de 100 copias/ml.

20 La gestión clínica de la infección por VIH-2 se ve dificultada por la falta de ensayos de carga vírica de ARN comerciales validados. Por tanto, se emplean en gran medida ensayos desarrollados por los propios laboratorios, tales como el ensayo descrito por Damond *et al.* (2005), J. Clin. Microbiol., 43:4234-4236, que se usa para cuantificar la carga vírica en la cohorte francesa CO5 de pacientes infectados por VIH-2.

25 Sin embargo, la colaboración internacional ACHIEV2E en la infección por VIH-2 demostró que los valores de ARN de VIH-2 en plasma varían considerablemente entre los laboratorios. Además, la alta diversidad genética del VIH-2, con 9 grupos nombrados de A a I, de los cuales solo los grupos A y B son epidémicos, también representa un obstáculo para la cuantificación precisa de la carga vírica: así, estudios previos han demostrado que los virus del grupo B son particularmente difíciles de cuantificar con los ensayos actuales. Además, los ensayos del VIH-2 actuales también presentan una baja sensibilidad y precisión.

Por tanto, un objeto de la invención es superar estas limitaciones.

**Sumario de la invención**

30 La presente invención surge de la identificación inesperada por parte de los presentes inventores de una combinación de dos secuencias diana específicas en el ARN del VIH-2, cuya amplificación de dúplex mediante una RT-PCR a tiempo real permite la detección eficaz de virus del grupo B y proporciona un límite de detección por debajo de 40 copias/ml, así como un límite de cuantificación por debajo de 100 copias/ml.

35 Por tanto, la presente invención se refiere a un método para detectar o cuantificar ácidos nucleicos del virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2) en una muestra biológica, que comprende:

a) realizar una reacción en cadena con polimerasa (PCR) a tiempo real o una reacción en cadena con polimerasa y transcriptasa inversa (RT-PCR) a tiempo real sobre los ácidos nucleicos de la muestra biológica con:

(i) al menos 4 cebadores que comprenden o que consisten, respectivamente, en:

- la secuencia SEQ ID NO:1 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:1, y
- 40 - la secuencia SEQ ID NO:2 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:2, y
- la secuencia SEQ ID NO:4 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:4, y
- la secuencia SEQ ID NO:5 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:5,

en el que los cebadores no comprenden más de 30 nucleótidos, y

(ii) al menos 2 sondas marcadas que comprenden o que consisten, respectivamente, en:

- 45 - la secuencia SEQ ID NO:3, una secuencia complementaria con SEQ ID NO:3, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:3 o con la complementaria de esta, y
- la secuencia SEQ ID NO:6, una secuencia complementaria con SEQ ID NO:6, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:6 o con la complementaria de esta,

en el que las sondas no comprenden más de 30 nucleótidos, y

b) determinar, a partir de ello, la presencia o la ausencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos de VIH-2 en la muestra biológica.

5 En una realización de la invención, el método definido anteriormente para detectar o cuantificar ácidos nucleicos del virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2) comprende además determinar o cuantificar los ácidos nucleicos de VIH-1 en una muestra biológica.

La presente invención también se refiere a un kit o una mezcla para detectar o cuantificar ácidos nucleicos de VIH-2, que comprende:

a) al menos 4 cebadores que comprenden o que consisten, respectivamente, en:

- 10 - la secuencia SEQ ID NO:1 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:1, y  
- la secuencia SEQ ID NO:2 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:2, y  
- la secuencia SEQ ID NO:4 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:4, y  
- la secuencia SEQ ID NO:5 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:5,

en los que los cebadores no comprenden más de 30 nucleótidos, y

15 b) al menos 2 sondas marcadas que comprenden o que consisten, respectivamente, en:

- la secuencia SEQ ID NO:3, una secuencia complementaria con SEQ ID NO:3, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:3 o con la complementaria de esta, y  
- la secuencia SEQ ID NO:6, una secuencia complementaria con SEQ ID NO:6, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:6 o con la complementaria de esta,

20 en los que las sondas no comprenden más de 30 nucleótidos, y

c) opcionalmente, reactivos adicionales para realizar una PCR o RT-PCR.

En una realización de la invención, el kit o la mezcla definidos anteriormente comprenden además cebadores y sondas marcadas para detectar o cuantificar ácidos nucleicos del virus de VIH-1.

25 En otra realización de la invención, el método definido anteriormente para detectar o cuantificar ácidos nucleicos del virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2) en una muestra biológica, el kit y la mezcla, comprenden además al menos un cebador que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO:7 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:7.

La presente invención también se refiere al uso del kit o la mezcla como se definieron anteriormente, para detectar o cuantificar ácidos nucleicos de VIH-2 de una muestra biológica.

30 La presente invención también se refiere a un método, en particular un método *in vitro* para diagnosticar una infección por VIH-2, o para determinar la carga vírica de VIH-2, en un individuo, que comprende las etapas de:

(a) realizar el método para detectar o cuantificar ácidos nucleicos del virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2) en una muestra biológica tomada del individuo según se definió anteriormente;

(b) determinar, a partir de ello, si el individuo está infectado por VIH-2 o la carga vírica de VIH-2 del individuo.

35 La presente invención también se refiere a un método, en particular un método *in vitro*, para determinar si es probable que un individuo se beneficie de un tratamiento con una terapia antirretrovírica ("antiretroviral therapy", ART) o del ajuste de una ART, que comprende realizar el método para diagnosticar una infección por VIH-2, o determinar la carga vírica de VIH-2, según se definió anteriormente.

40 La presente invención también se refiere a inhibidores de la transcriptasa inversa nucleotídicos ("nucleotide reverse transcriptase inhibitors", NRTI), inhibidores de proteasa (Pi) y/o inhibidores de integrasa para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección por VIH-2 en un individuo, en los que se determina la probabilidad de que el individuo se beneficie de un tratamiento con ART o de un ajuste de la ART realizando los métodos de la invención.

45 La presente invención también se refiere a una sonda, en particular a una sonda marcada, que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO:3, o una secuencia complementaria con SEQ ID NO:3. La presente invención también se refiere a un kit o una mezcla según se describe en las reivindicaciones adjuntas. La presente solicitud también se refiere a un kit o una mezcla para detectar o cuantificar ácidos nucleicos de VIH-2, que comprende:

a) al menos 2 cebadores que comprenden o que consisten, respectivamente, en:

- la secuencia SEQ ID NO:1 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:1, y
- la secuencia SEQ ID NO:2 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:2, y

b) al menos una sonda marcada que comprende o que consiste en:

- 5 - la secuencia SEQ ID NO:3, una secuencia complementaria con SEQ ID NO:3, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:3 o con la complementaria de esta, y

c) opcionalmente, reactivos adicionales para realizar una PCR o RT-PCR.

La presente invención también se refiere al uso de la sonda, kit o mezcla definidos anteriormente, según se define en las reivindicaciones adjuntas, para detectar o cuantificar ácidos nucleicos de VIH-2 de una muestra biológica.

## 10 Descripción detallada de la invención

### *Ácidos nucleicos de VIH-2*

El virus de la inmunodeficiencia humana 2 (VIH-2), cuya infección puede conducir al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), es muy conocido por los expertos en la técnica. El VIH-2 es un miembro del género *Lentivirus*, parte de la familia *Retroviridae*. Su ciclo de replicación implica la entrada de ARN monocatenario del VIH-2 en una célula, su transcripción inversa para producir un ADN monocatenario y después un ADN bicatenario que se integra en el genoma de la célula hospedante. Por consiguiente, tal como se pretende en la presente, los ácidos nucleicos de VIH-2 se refieren a ácidos nucleicos de cualquier tipo que portan el genoma del VIH-2 en su totalidad o en parte. Por tanto, los ácidos nucleicos de VIH-2 que van a ser detectados o cuantificados según la invención pueden ser ARN, en particular ARN monocatenario, o ADN, en particular ADN monocatenario o bicatenario.

20 Preferiblemente, el método, el kit o la mezcla definidos anteriormente, o el uso para detectar o cuantificar ácidos nucleicos del virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2), son para detectar o cuantificar ARN de VIH-2.

### *PCR o RT-PCR a tiempo real*

La reacción en cadena con polimerasa ("Polymerase Chain Reaction", PCR) y la reacción en cadena con polimerasa y transcriptasa inversa ("Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction", RT-PCR) a tiempo real son muy conocidas por los expertos en la técnica, y también se conocen como PCR cuantitativa ("quantitative PCR", qPCR) y RT-PCR cuantitativa ("quantitative RT-PCR", RT-qPCR).

Según la invención, se realizará una PCR a tiempo real para detectar o cuantificar ADN de VIH-2, mientras que se realizará una RT-PCR para detectar o cuantificar ARN de VIH-2.

Los expertos en la técnica pueden determinar con facilidad, a partir de una PCR o RT-PCR a tiempo real, si están presentes ácidos nucleicos de VIH-2, es decir, los pueden detectar y/o pueden cuantificar los ácidos nucleicos de VIH-2. Generalmente, en una PCR o RT-PCR a tiempo real se mide una señal, en general una señal fluorescente, cuya intensidad es la consecuencia de la acumulación del ADN amplificado, medido por el termociclador que hace funcionar la PCR o RT-PCR. Si durante el transcurso de la PCR o RT-PCR, la intensidad de la señal medida, en particular la señal fluorescente, es mayor que una señal umbral, en general la intensidad de la señal de fondo, se deduce que se ha producido una amplificación, es decir, que están presentes ácidos nucleicos de VIH-2 en la muestra biológica. A la inversa, si no se mide una intensidad de señal mayor que la intensidad de la señal de fondo en el transcurso de la PCR o RT-PCR, se deduce que no están presentes ácidos nucleicos o que está presente una cantidad de ácido nucleico por debajo del nivel de detección en la muestra biológica. Además, el ciclo de la PCR o RT-PCR en que se mide la señal mayor que la intensidad de la señal de fondo se denomina ciclo umbral ("threshold cycle", CT). Los expertos en la técnica saben que los valores del CT son proporcionales al  $\log_{10}$  de las cantidades iniciales de ácidos nucleicos en la muestra biológica. Por consiguiente, la cantidad de ácidos nucleicos presente, es decir, la carga de ácidos nucleicos de la muestra biológica, puede determinarse con facilidad, si es necesario remitiéndose a una curva patrón.

Pueden usarse numerosas técnicas de PCR y RT-PCR a tiempo real, según la presente invención, que en general se diferencian en el sistema de generación de la señal y las sondas marcadas usadas, tales como los denominados ensayos Taqman o de balizas moleculares. Sin embargo, se prefiere que la PCR o RT-PCR a tiempo real según la invención sea de tipo Taqman. La PCR o RT-PCR a tiempo real de tipo Taqman son muy conocidas por los expertos en la técnica, y fueron descritas originariamente en 1991 por Holland *et al.* (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7276-7280.

50 Brevemente, las sondas TaqMan consisten en un fluoróforo unido covalentemente al extremo 5' de una sonda oligonucleotídica y un extintor en el extremo 3'. La sonda es de tal modo que la molécula extintora extingue la fluorescencia emitida por el fluoróforo cuando es excitado por una fuente de luz del termociclador a través de FRET ("Fluorescence Resonance Energy Transfer", transferencia de energía de resonancia de fluorescencia). Por tanto,

siempre que el fluoróforo y el extintor estén próximos, es decir, estén unidos a la sonda, la extinción inhibe cualquier señal de fluorescencia. Además, las sondas TaqMan se diseñan para que se asocien con una diana dentro de la región del ADN amplificado. Puesto que la polimerasa termoestable usada para realizar una PCR o RT-PCR extiende el cebador y sintetiza la hebra naciente, su actividad 5' a 3' exonucleasa degrada la sonda que se ha asociado al molde. La degradación de la sonda libera el fluoróforo y rompe la proximidad con el extintor, aliviando de esto modo el efecto extintor y permitiendo la fluorescencia del fluoróforo. Por tanto, la fluorescencia detectada en el termociclador de la PCR cuantitativa es directamente proporcional al fluoróforo liberado y la cantidad de molde de ADN presente en la PCR.

Preferiblemente, la PCR o RT-PCR a tiempo real según la invención comprende las siguientes condiciones de termociclación:

- opcionalmente, 10 min a 50 °C para la transcripción inversa, seguidos de
- 5 min a 95 °C, seguidos de
- 50 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min.

De modo ventajoso, las condiciones de termociclación definidas anteriormente son similares a las usadas por el ensayo de RT-PCR a tiempo real para ARN de VIH-1 genérico descrito por Rouet *et al.* (2005), J. Clin. Microbiol., 43:2709-2717, y comercializado por Biocentric, que se emplea con éxito en la actualidad en muchos países con recursos limitados. Por consiguiente, el método para detectar o cuantificar ácidos nucleicos del virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2) en una muestra biológica según la invención puede usarse en el mismo termociclador, con el mismo programa informático e incluso, si es necesario, en la misma placa de amplificación que las muestras biológicas previstas para la detección o la cuantificación de ácidos nucleicos de VIH-1.

#### *Cebadores y sondas*

Tal como se pretende en la presente, un cebador es un oligonucleótido, preferiblemente, un oligonucleótido de ADN, útil para cebar la replicación por una ADN polimerasa, en particular una ADN polimerasa termoestable, o la transcripción inversa por una transcriptasa inversa. Preferiblemente, los cebadores según la invención comprenden no más de 50 nucleótidos, más preferiblemente no más de 40 nucleótidos, y lo más preferiblemente no más de 30 nucleótidos.

Tal como se pretende en la presente, una sonda es un oligonucleótido, preferiblemente, un oligonucleótido de ADN, que puede asociarse con moléculas de ADN amplificadas como resultado de la PCR o la RT-PCR según la invención. Preferiblemente, las sondas según la invención comprenden no más de 50 nucleótidos, más preferiblemente no más de 40 nucleótidos, y lo más preferiblemente no más de 30 nucleótidos. La sonda marcada es de tal forma que se emite una señal detectable, preferiblemente fluorescencia, y esta aumenta en intensidad como consecuencia de la acumulación de moléculas de ADN amplificadas. Más preferiblemente, las sondas según la invención están marcadas, en particular marcadas covalentemente, con un fluoróforo y con un extintor, y la pareja de fluoróforo-extintor es de tal forma que el extintor extingue la emisión de fluorescencia por el fluoróforo. En este marco, se prefiere que el fluoróforo esté unido al extremo 5' de la sonda o cerca de este, y que el extintor esté unido al extremo 3' de la sonda o cerca de este. Los expertos en la técnica pueden diseñar numerosas parejas de fluoróforo-extintor adecuadas según la invención. Como ejemplo, las parejas de fluoróforo-extintor de 6-carboxifluoresceína (FAM)-carboxitetrametilrodamina (TAMRA) y 6-carboxifluoresceína (FAM)-Black Hole Quencher-1 (BHQ1, "extintor de agujero negro-1") son adecuadas para las sondas marcadas según la invención. Una pareja de fluoróforo-extintor particularmente preferida según la invención es 6-carboxifluoresceína (FAM)-Black Hole Quencher-1 (BHQ1). Además, también se prefiere que las 2 sondas marcadas según la invención sean marcadas por la misma pareja de fluoróforo-extintor. Así, se prefiere en particular que las 2 sondas marcadas estén marcadas con 6-carboxifluoresceína (FAM) en su extremo 5', y con Black Hole Quencher-1 (BHQ1) en su extremo 3'.

Tal como se pretende en la presente, cuando se dice que un cebador o una sonda según la invención "comprende" una secuencia concreta, el cebador o la sonda también puede comprender secuencias adicionales que se extienden desde el extremo 5' y/o el extremo 3' de la secuencia concreta. Por contraste, cuando un cebador o una sonda según la invención "consiste en" una secuencia concreta, el cebador o la sonda no comprende secuencias suplementarias además de la secuencia concreta.

Preferiblemente, dichos al menos 4 cebadores según la invención consisten, respectivamente, en las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, y las 2 sondas marcadas según la invención consisten, respectivamente, en las secuencias SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:6.

Tal como se pretende en la presente, una "secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:X", en particular se diferencia de SEQ ID NO:X por la inserción, la supresión o la sustitución de al menos un nucleótido. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se define en la presente como el número de posiciones en que las bases son idénticas cuando las dos secuencias se alinean óptimamente, dividido entre el número total de bases de la secuencia más larga de las dos. Se dice que dos secuencias están óptimamente alineadas cuando el porcentaje de identidad es máximo. Además, tal como será evidente para los expertos en la

técnica, puede ser necesario añadir huecos para obtener un alineamiento óptimo entre las dos secuencias.

Preferiblemente, una secuencia según la invención que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 tiene, respectivamente, al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad con SEQ ID NO:1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7.

- 5 Los cebadores según la invención que comprenden las secuencias SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 o secuencias que tienen al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, y la sonda que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO:3, una secuencia complementaria con SEQ ID NO:3, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:3 o con la complementaria de esta, son útiles para detectar una porción de la región LTR del genoma de VIH-2.
- 10 Los cebadores según la invención que comprenden las secuencias SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5 o secuencias que tienen al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, y la sonda que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO:6, una secuencia complementaria con SEQ ID NO:6, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:6 o con la complementaria de esta, son útiles para detectar una porción de la región Gag del genoma de VIH-2.
- 15 El cebador según la invención que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO:7 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:7 es útil para mejorar la detección y la cuantificación de ácidos nucleicos de VIH-2 de subtipo B.

20 Tal como será evidente para los expertos en la técnica y como ejemplo, la secuencia complementaria con una secuencia 5' TAGGTTACGGCCCGGCGAAAGA 3' (SEQ ID NO:6) es 5' TCTTTCCGCCGGCCGTAACCTA 3' (SEQ ID NO:9).

Además, como también será evidente para los expertos en la técnica, SEQ ID NO:3 (CTTGCCGGYRCTGGGCAGA) es una secuencia degenerada, tal como se denomina, en la que Y representa C y T, y R representa A y G.

- 25 De forma ventajoso, el uso de cebadores y sondas según la invención en una PCR y RT-PCR a tiempo real (i) proporciona la detección y la cuantificación específicas de ácido nucleicos de VIH-2 frente a ácidos nucleicos de VIH-1, (ii) disminuye el límite de detección y cuantificación de los ensayos de la técnica anterior, y (iii) proporciona una detección y una cuantificación mejoradas de ácidos nucleicos de VIH-2 de subtipo B.

#### *Muestra biológica*

- 30 Tal como se pretende en la presente, una "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra tomada de un individuo humano susceptible de contener ácidos nucleicos de VIH-2, tal como una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra seminal. Tal como será evidente para los expertos en la técnica, la muestra biológica puede haber sido tratada después de que se tomase del individuo y antes de ser sometida a una PCR o RT-PCR a tiempo real según la invención. Estos tratamientos incluyen, de forma notable, centrifugación, tratamiento con un anticoagulante, tal como EDTA, o concentración, purificación o extracción de ácidos nucleicos. Así, como ejemplo,
- 35 una muestra biológica según la invención puede ser una disolución de ácidos nucleicos extraída de una muestra, tal como una muestra plasma, tomada de un individuo humano.

#### Kit y mezcla

Tal como se pretende en la presente en un "kit" según la invención, uno o más de los componentes del kit pueden estar envasados o compartimentalizados por separado del resto de los componentes.

- 40 Tal como se pretende en la presente en una "mix" según la invención, todos los componentes de la mezcla están en un único compartimento. Preferiblemente, la mezcla según la invención es una mezcla de PCR o una mezcla de RT-PCR.

- 45 Los expertos en la técnica pueden diseñar con facilidad otros reactivos además de los cebadores y las sondas según la invención, y estos incluyen, de modo notable, una ADN polimerasa termoestable, una transcriptasa inversa, dNTP, sales, en particular sales  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , y tampones.

La presente invención se describirá más a fondo mediante las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

#### **Descripción de las figuras**

##### Figura 1

- 50 La figura 1 representa la curva patrón del ensayo de carga vírica a tiempo real de ARN de VIH-2 según la invención. El ciclo umbral (CT) (eje vertical) es el número de ciclos en los cuales la fluorescencia sobrepasa un límite fijado (tiempo hasta la positividad), y el  $\log_{10}$  de los equivalentes de copias de VIH-2 de entrada/ml (eje horizontal) representa la estandarización de la carga vírica presente en la muestra sometida a una RT-PCR a tiempo real. Se

indican los valores de la mediana y los intervalos de los intercuartiles 25% y 75% (cajas del diagrama) del CT. Las líneas verticales muestran las amplitudes del CT.

Figura 2

5 La figura 2 es un diagrama de dispersión de la carga de ARN de VIH-2 (expresada como  $\log_{10}$  de copias/ml) según se determina mediante el ensayo según la invención (eje vertical) frente a la determinación mediante un ensayo de la técnica anterior (eje horizontal), según el grupo genético (A, B, H o no genotipificable (NA)) de las 78 muestras detectable (de 0 a <40 cp/ml) o cuantificables ( $r^2 = 0,8812$ ). Se atribuye un valor arbitrario de 10 cp/ml a las muestras indetectables en el ensayo actual, y de 20 cp/ml a las detectables en el nuevo ensayo (de 0 a <40 cp/ml).

Figuras 3 y 4

10 Las figuras 3 y 4 representan curvas de Bland y Altman para medir el grado de concordancia en  $\log_{10}$  cp/ml entre el ensayo según la invención y el ensayo de la técnica anterior; para las muestras del grupo A (N = 32) (figura 3) y grupo B (N = 39) (figura 4) detectables (de 0 a 40 cp/ml) y cuantificables (>40 cp/ml) con el ensayo según la invención. Se atribuye un valor arbitrario de 10 cp/ml a las muestras indetectables con el ensayo de la técnica anterior, y de 20 cp/ml para las muestras detectables con el ensayo según la invención (entre 0 y 40 cp/ml).

### 15 Ejemplo

#### Materiales y métodos

#### Ensayo de ARN de VIH-2 según la invención

El ensayo se basa en una estrategia de PCR Taqman de dúplex de una etapa que se dirige a una región consenso conservada en la repetición terminal larga ("long terminal repeat", *LTR*) y la región *Gag*.

20 Los cebadores directo e inverso para la región *LTR* son 5'-TCTTTAAGCAAGCAAGCGTGG-3' (SEQ ID NO:1) y 5'-AGCAGGTAGAGCCTGGGTGTT-3' (SEQ ID NO:2), respectivamente (Rouet *et al.* (2004), J. Clin. Microbiol., 42:4147-53), con una sonda interna (5' FAM-CTTGGCCGGYRCTGGGCAGA-BHQ1 3', SEQ ID NO:3) modificada para optimizar la eficacia para el VIH-2 del grupo B.

25 Los cebadores directo e inverso para la región *Gag* son F3 5'-GCGCGAGAAACTCCGTCTTG-3' (SEQ ID NO:4) y R1 5'-TTCGCTGCCACACAATATGTT-3' (SEQ ID NO:5), respectivamente (Damond *et al.* (2005), J. Clin. Microbiol., 43:4234-6), y la sonda *gag* de Taqman de VIH-2 interna es S65GAG2 5' FAM-TAGGTTACGGCCCGCGGAAAGA-BHQ1 3' (Eurogentec, Seraing, Bélgica) (Damond *et al.* (2005), J. Clin. Microbiol., 43:4234-4236).

Tabla 1: Cebadores y sondas usados para el análisis de RT-PCR

Cebadores y sondas	<i>LTR</i>	<i>Gag</i>
<b>Cebador directo</b>	5'-TCTTTAAGCAAGCAAGCGTGG-3' (SEQ ID NO: 1)	5'-GCGCGAGAAACTCCGTCTTG-3' (SEQ ID NO: 4)
<b>Cebador inverso</b>	5'-AGCAGGTAGAGCCTGGGTGTT-3' (SEQ ID NO: 2)	5'-TTCGCTGCCACACAATATGTT-3' (SEQ ID NO: 5)
<b>Sonda</b>	5'-CTTGGCCGGYRCTGGGCAGA-3' (SEQ ID NO: 3)	5'-TAGGTTACGGCCCGCGGAAAGA-3' (SEQ ID NO: 6)

30 Se extrajo ARN de 200  $\mu$ l de plasma usando el minikit de ARN vírico QIAamp kit (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) como el ensayo de carga vírica del VIH-1 genérico de Biocentric, en los laboratorios A y B (Hospital Necker, París, y Charles Nicolle Hospital, Ruan) o de 1 ml con el kit MagnaPure de volumen grande de AN totales (Roche Automated System, Meylan, Francia) en el laboratorio C (Hospital Bichat Claude Bernard, París).

35 La mezcla de reacción consiste en un volumen de 20  $\mu$ l que contiene el extracto de ARN (10  $\mu$ l), cebadores (500 nM de cada uno), sondas (250 nM de cada una), y 1X tampón de PCR (4X mezcla One-step, Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia).

40 Las condiciones de termociclación fueron las usadas para el ensayo del VIH-1 de Biocentric: 10 min a 50 °C y 5 min a 95 °C, seguido de 50 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. La amplificación y la adquisición de los datos se realizaron con el sistema de PCR a tiempo real TaqMan ABI (Applied Biosystems, Courtaboeuf, Francia). El  $\log_{10}$  del número de dianas inicialmente presentes es proporcional al ciclo umbral (CT) y se determina a partir de la curva patrón.

Se usó un panel de cuantificación del ARN de VIH-2 del grupo A BIOQ (P0182; Rijswijk, Países Bajos) como el patrón externo. El patrón, evaluado a  $2,93 \times 10^6$  cp/ml, primero se diluyó en medio de cultivo RPMI hasta una

concentración teórica de 1 000 000 cp/ml (2 400 000 IU/ml), seguido de una dilución en serie en 10 veces hasta unas concentraciones que varían de 1 000 000 (5 log<sub>10</sub>) a 100 cp/ml (2 log<sub>10</sub>), y una dilución final hasta 40 cp/ml (1,6 log<sub>10</sub>).

Determinación de la actuación analítica del ensayo según la invención

- 5 Se determinó la especificidad ensayando muestras de plasma procedentes de 49 sujetos VIH-negativos y 30 pacientes positivos al VIH-1 del grupo M con unas cargas víricas que varían de >20 a <10 000 000 cp/ml. También se ensayaron nueve sobrenadantes de cocultivos del VIH-1 del grupo O.

Se evaluó la linealidad usando el patrón externo BIOQ diluido en RPMI hasta 1 000 000, 100 000, 10 000, 1000, 100 y 40 cp/ml (cada uno ensayado en 10 pruebas en el laboratorio A).

- 10 Se determinó la sensibilidad analítica mediante una dilución en RPMI del patrón externo BIOQ hasta 100, 50, 40, 20 y 10 cp/ml (10 duplicados cada uno).

Para determinar la reproducibilidad dentro de cada prueba, el patrón externo BIOQ se ensayó a unas concentraciones de 10 000 y 100 cp/ml en cada uno de los tres laboratorios (10 duplicados para cada dilución).

- 15 Para determinar la reproducibilidad entre pruebas, se preparó un control positivo a VIH-2 mediante una dilución en serie en plasma humano con EDTA negativo a VIH del sobrenadante de un cocultivo de un aislado de VIH-2 del grupo A (n.º de registro de Genbank AY688870, SEQ ID NO:8). Esta disolución se diluyó para obtener partes alícuotas con unas concentraciones teóricas que varían de 10 000 a 100 000 cp/ml en el ensayo actual. Estas partes alícuotas se ensayaron una vez en 7 pruebas distintas con el sistema de extracción automático Magna Pure (laboratorio C) y, respectivamente, en 18 y 7 pruebas distintas con una extracción manual de Qiagen en el laboratorio A y el laboratorio B.
- 20

Análisis estadístico

- 25 Se usó el programa informático MedCalc (Ostende, Bélgica) para el análisis de los datos. Se usaron curvas de Bland y Altman para representar el grado de concordancia entre las dos técnicas (Bland y Altman (1986), Lancet, 1:307-310). El eje de abscisas indica los valores promedio para cada muestra obtenida con las dos técnicas, y el eje de ordenadas indica la diferencia entre los valores obtenidos con las dos técnicas.

La no concordancia entre las dos técnicas se define como una diferencia mayor que 0,5 log<sub>10</sub> para una muestra concreta.

Muestras clínicas

- 30 Se seleccionaron 100 muestras de plasma procedente de pacientes infectados por VIH-2 (n = 100) incluidos en la cohorte de VIH-2 nacional francesa (ANRS CO05) según el genotipo vírico y la concentración de ARN de VIH-2, según se determina con la técnica descrita en Damond *et al.* (2005), J. Clin. Microbiol., 43:4234-4236. Se determinó el grupo de VIH-2 para 89 muestras, tal como se ha descrito previamente (Damond *et al.* (2004), AIDS Res. Hum. Retroviruses, 20:666-672; y Plantier *et al.* (2004), J. Clin. Microbiol., 42:5866-5870): 38 muestras fueron del grupo A, 50 del grupo B, y una del grupo H. No pudo realizarse la genotipificación de las 11 muestras restantes, debido a la ausencia de ARN detectable y a la falta de células mononucleares o de sangre completa para un ensayo de ADN vírico.
- 35

- 40 Las muestras seleccionadas tenían las siguientes características: <100 (2 log<sub>10</sub>) cp/ml (n = 39, 9 del grupo A y 19 del grupo B, 11 no genotipificables), 100 (2 log<sub>10</sub>) - 1000 (3 log<sub>10</sub>) cp/ml (n = 16, 5 de A y 11 de B), 1000 (3 log<sub>10</sub>) - 10 000 (4 log<sub>10</sub>) (n = 22, 12 de A y 10 de B), 10 000 (4 log<sub>10</sub>) - 100 000 (5 log<sub>10</sub>) (n = 19, 11 de A, 7 de B y 1 de H) y >100 000 (5 log<sub>10</sub>) (n = 4, 1 de A y 3 de B).

**Resultados**

Actuaciones analíticas del ensayo según la invención

- 45 Tal como se esperaba, dada la amplia divergencia genómica entre el VIH-1 y el VIH-2, los cebadores de VIH-2 no se hibridaron con los genes de VIH-1: todas las muestras de plasma positivo a VIH-1 y todas las muestras negativas a VIH fueron negativas en el nuevo ensayo, proporcionando una especificidad del 100%.

La curva patrón muestra una fuerte relación lineal entre los valores de CT y el log<sub>10</sub> de ARN de VIH-2 cp/ml (figura 1). La mediana del coeficiente de correlación fue de 0,9947 (intervalo, de 0,9831 a 0,9997), y la pendiente de la mediana fue de -3,37 (intervalo, de -3,16 a -3,62).

- 50 La sensibilidad analítica del ensayo fue del 100% a 40 cp/ml (1,6 log<sub>10</sub> cp/ml) y 90% a 20 cp/ml (1,3 log<sub>10</sub>cp/ml) después de una extracción automática con Magna Pure de Roche de 1 ml, y del 100% a 50 cp/ml (1,7 log<sub>10</sub> cp/ml) después de la extracción manual de 200 µl. La optimización de la sensibilidad del ensayo después de la extracción manual se evaluó usando 1 ml de plasma: la muestra se centrifugó a 17 000 rpm y el sedimento se resuspendió en



200 µl de medio RPMI antes de la extracción manual, con elución en 60 µl. Esto produjo una sensibilidad del 90% a 10 cp/ml (1 log<sub>10</sub> cp/ml).

5 Se evaluó la reproducibilidad dentro de cada prueba en tres laboratorios usando el patrón externo BIOQ con unas concentraciones víricas teóricas de 10 000 y 100 cp/ml (4 y 2 log<sub>10</sub> cp/ml): para el valor de 4 log<sub>10</sub> cp/ml, se obtuvo un promedio de 3,91 log<sub>10</sub> cp/ml en el laboratorio C, de 4,1 log<sub>10</sub> cp/ml en el laboratorio A, y de 4,2 log<sub>10</sub> cp/ml en el laboratorio B, con unos coeficientes de variación dentro de cada prueba del 1,61%, 0,54% y 1,10%, respectivamente. A la concentración de 2 log<sub>10</sub> cp/ml, los inventores obtuvieron unos valores promedio de 2,03 log<sub>10</sub> cp/ml en el laboratorio B, de 2,07 log<sub>10</sub> cp/ml en el laboratorio A, y de 2,17 log<sub>10</sub> cp/ml en el laboratorio C, con unos coeficientes de variación dentro de cada prueba del 10,72%, 14,32% y 7,24%, respectivamente.

10 En los ensayos entre pruebas, se evaluó el control positivo con una concentración teórica de entre 10 000 (4 log<sub>10</sub>) y 100 000 cp/ml (5 log<sub>10</sub>) a 4,61 log<sub>10</sub> cp/ml en el laboratorio C, de 4,70 log<sub>10</sub> cp/ml en el laboratorio A, y de 4,88 log<sub>10</sub> cp/ml en el laboratorio B, con unos coeficientes de variación del 2,28%, 6,43% y 3,03%, respectivamente.

#### Actuaciones clínicas

15 Se evaluaron las actuaciones clínicas del nuevo ensayo en el laboratorio C. Se extrajeron muestras clínicas de 1 ml con el método de MagnaPure automático y después se ensayaron en paralelo con el dispositivo de ABI para el ensayo según la invención, y el dispositivo Light Cycler 1.5 para el ensayo de la técnica anterior, según se describe en Damond *et al.* (2005), *J. Clin. Microbiol.*, 43:4234-4236. Los resultados obtenidos con el ensayo según la invención se categorizaron en cuatro grupos (tabla 2): indetectable (<40 cp/ml), detectable pero no cuantificable (de 0 a <40 cp/ml), cuantificable entre 40 y 100 cp/ml, y por encima de límite inferior de cuantificación del ensayo actual (100 cp/ml).

20 De las 39 muestras por debajo del límite de cuantificación de 100 cp/ml en el ensayo actual, 22 muestras (56%) también fueron indetectables con el ensayo según la invención (tabla 2), mientras que se detectaron 10 muestras (26%; 3 de A, 3 de B y 4 no genotipificables) a unos valores entre 0 y 40 cp/ml (intervalo: de 1 a 36 cp/ml). Tres muestras (7,7%; 1 de B, 2 no genotipificables) fueron cuantificadas entre 40 y 100 cp/ml (intervalo: de 56 a 79 cp/ml), y cuatro muestras (10%; todas de B) fueron cuantificadas por encima de 100 cp/ml (intervalo: de 102 a 970 cp/ml); estas últimas se corresponden con muestras de falsos negativos verdaderos, tomando en cuenta el valor de corte de 100 cp/ml del ensayo actual.

Estos resultados demuestran que el ensayo mejora la detección o la cuantificación de 17/39 muestras (43,6%), incluyendo ocho muestras del grupo B (tabla 1).

30 Todas las 61 muestras de plasma con unos valores por encima de 100 cp/ml en el ensayo de la técnica anterior fueron detectables con el ensayo según la invención. Una muestra a 209 cp/ml (2,32 log<sub>10</sub> cp/ml) en el ensayo actual produjo un valor de 46 cp/ml (1,69 log<sub>10</sub> cp/ml) en el ensayo según la invención (tabla 1).

35 Se construyó un diagrama de dispersión para las 78 muestras que fueron detectables o cuantificables con el ensayo según la invención y cuantificables con el ensayo de la técnica anterior (figura 2). Este mostró una dispersión más amplia de valores para las muestras del grupo B cuantificables que para las muestras del grupo A cuantificables, así como una mejor detección o cuantificación de las muestras del grupo B y no genotipificables. Esto fue confirmado por las ecuaciones de dispersión específicas para las muestras del grupo A ( $n = 32$ ;  $y = 0,8921x + 0,2545$ ,  $r^2 = 0,9569$ ) y las muestras del B ( $n = 39$ ;  $y = 0,7136x + 1,0484$ ,  $r^2 = 0,8067$ ), y también por representaciones de Bland-Altman (figura 3). Se obtuvo una cuantificación homogénea ( $\pm 1,96$  DE, intervalo de -0,35 a 0,6) y valores similares (diferencia de mediana de -0,13) con el ensayo según la invención y el ensayo de la técnica anterior para muestras del grupo A. La diferencia de mediana entre los dos ensayos para las muestras del grupo B fue de +0,18, pero con mayor heterogeneidad ( $\pm 1,96$  DE, intervalo de -1,33 a 0,98).

La única muestra de VIH-2 del grupo H produjo unos resultados muy similares con los dos ensayos (4,33 log<sub>10</sub> y 4,34 log<sub>10</sub>).

#### 45 Conclusión

La infección por VIH-2 se diferencia mucho de la infección por VIH-1, de modo notable por su curso natural más lento, su diferente gestión terapéutica y su diversidad genética. Por tanto, son necesarios métodos moleculares específicos para el diagnóstico y el control de los pacientes. Los ensayos actuales, que consisten principalmente en métodos desarrollados en propios los laboratorios o derivados no validados de kits del mercado, presentan importantes limitaciones en términos a su sensibilidad, precisión y cobertura de la diversidad genética del VIH-2.

55 El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un ensayo cuantitativo que tome en cuenta la baja carga vírica observada en la mayoría de los pacientes infectados por VIH-2 y la amplia diversidad genética del VIH-2, en especial del grupo B. Además, puesto que la mayoría de los casos de infección por VIH-2 se producen en África occidental, este ensayo debe ser asequible y fácil de aplicar en países en desarrollo, tal como se ha logrado previamente con el ensayo de carga vírica del VIH-1 genérico comercializado por Biocentric.

Los inventores han mejorado el ensayo que se usa en la actualidad para controlar la cohorte de VIH-2 francesa, que se basa en la amplificación de la región Gag de VIH-2 y que tiene un menor límite de cuantificación de 100 cp/ml (Damond *et al.* (2005), J. Clin. Microbiol., 43:4234-4236). Los inventores también usaron las mismas condiciones de funcionamiento que las del kit de ensayo del VIH-1 de Biocentric, para facilitar su uso solo para el VIH-2 o conjuntamente para VIH-1 y VIH-2.

El nuevo ensayo muestra una buena linealidad (de 40 a 1 000 000 cp/ml) y reproducibilidad dentro de cada prueba (<15%). Su reproducibilidad entre laboratorios se validó mediante la evaluación en tres sitios diferentes. Se validaron los métodos de extracción manual y automática para lograr la compatibilidad con las prácticas locales en los países con recursos limitados.

Con relación al ensayo de la técnica anterior de Damond *et al.* (2005), J. Clin. Microbiol., 43:4234-4236, el ensayo según la invención tiene un límite de cuantificación analítico significativamente mejor, alcanzando 50 cp/ml con la extracción manual de 200 µl de plasma y 40 cp/ml con la extracción automática de 1 ml. Suponiendo un tasa de probit de 90%, el límite de detección con 1 ml de plasma sería de 10 cp/ml y 20 cp/ml, respectivamente. Esta excelente sensibilidad analítica equivale a la de los métodos desarrollados dentro de los propios laboratorios recientemente publicados (5, 11, 29), y es compatible con el control virológico de la infección por VIH-2, puesto que más del 60% de los pacientes no tratados tienen una carga vírica menor que 250 cp/ml. El nuevo ensayo ha sido capaz de detectar y/o cuantificar más de una tercera parte de las muestras que eran indetectables con el ensayo actual, que tiene un límite de cuantificación de 100 cp/ml. Esta excelente sensibilidad debería ser útil para estudios patofisiológicos y para el control del tratamiento.

La cuestión más difícil a la que se enfrenta el desarrollo de ensayos de carga vírica del VIH-2 es la diversidad genética de este virus (en especial el grupo B), y algunos variantes están siendo infracuantificados o están escapando a la detección con los ensayos actuales. Tres equipos han indicado recientemente haber obtenido una mayor sensibilidad para el VIH-2, pero principalmente usaron sobrenadantes (Delarue *et al.* (2013), J. Clin. Virol., 58:461-467) o un número limitado de muestras (Chang *et al.* (2012), J. Clin. Virol., 55:128-133; Styer *et al.* (2013), J. Clin. Virol., 58, supl. 1:e127-33) o han validado la detección, pero no la cuantificación (Styer *et al.* (2013), J. Clin. Virol., 58, supl. 1:e127-33), y dejan sin resolver cuestiones acerca de sus actuación clínica, en especial para los virus del grupo B.

Los inventores evaluaron el ensayo según la invención en 100 muestras clínicas, 39% de las cuales eran indetectables con el ensayo de la técnica anterior comparativo descrito en Damond *et al.* (2005), J. Clin. Microbiol., 43:4234-4236, representativas de la epidemiología molecular de los grupos A y B, más la única muestra divergente del grupo H. La mitad de las muestras corresponden al grupo B, y más de una tercera parte de ellas (n = 19) eran indetectables con el ensayo de la técnica anterior comparativo. Los inventores han desarrollado un método de dúplex capaz de amplificar simultáneamente las regiones *LTR* y *Gag*, que ha producido, de modo inesperado, una mejora sinérgica de la detección de los virus del grupo B reduciendo el riesgo de incongruencias. Los métodos de ensayo del VIH-2 nuevo y actual produjeron resultados similares para la única muestra del grupo H y para las muestras del grupo A (aunque 3 muestras adicionales del grupo A fueron detectables con el nuevo ensayo), mientras que el nuevo ensayo desarrollado por Delarue *et al.* produjo unos valores casi 0,5 log<sub>10</sub> más bajos que su ensayo de referencia (Delarue *et al.* (2013), J. Clin. Virol., 58:461-467). Ocho muestras del grupo B adicionales (42%) fueron detectadas o cuantificadas con el nuevo ensayo de los inventores, y cuatro muestras presentaron unos valores de 102 a 970 cp/ml. Esta mejora inesperada es debida a la adición de cebadores en la región *LTR* y a cambios en la sonda de *LTR*. Sin embargo, la dispersión más amplia de valores y el mayor número de muestras del grupo B que del grupo A, con unas diferencias mayores que 0,5 log<sub>10</sub> con relación al ensayo actual, ilustran la mayor dificultad de cuantificación del grupo B. Además, seis muestras no genotipificables fueron detectadas o cuantificadas mejor con el nuevo ensayo de los inventores.

De manera ventajosa, el ensayo según la invención puede usarse en las mismas condiciones de ejecución que el ensayo de ARN de VIH-1 genérico que se emplea en la actualidad con éxito en muchos países con recursos limitados (Rouet *et al.* (2005), J. Clin. Microbiol. 43:2709-2717), lo cual significa que puede usarse en la misma máquina, con el mismo programa informático e incluso, si es necesario, en la misma placa de amplificación que las muestras de VIH-1. Esto reduce los costes analíticos aumentando el número de muestras por prueba

El ensayo según la invención tiene unas actuaciones analíticas al menos iguales a las de otros ensayos recientemente desarrollados (Chang *et al.* (2012), J. Clin. Virol., 55:128-133; Delarue *et al.* (2013), J. Clin. Virol., 58:461-467; y Styer *et al.* (2013) J. Clin. Virol., 58, supl. 1:e127-33), puesto que las actuaciones de estos ensayos no han sido evaluadas tan a fondo como el ensayo según la invención. Así, el ensayo descrito por Chang *et al.*, adaptado a partir de la plataforma Abbott (Abbott Molecular, Chicago, IL), ha sido evaluado solo en unas pocas muestras del grupo B y no ha sido comparado con otras técnicas. Styer *et al.*, en fechas recientes, compararon su método con esta técnica "Abbott" y observaron una diferencia de -0,35 log<sub>10</sub> UI/ml, pero usaron un panel limitado de muestras no caracterizadas, excluyendo cualquier tipo de evaluación en términos de la diversidad genética. Por último, Styer *et al.* y Delarue *et al.* usan un método de dos etapas, mientras que el ensayo según la invención se realiza en una sola etapa.

En conclusión, los inventores han desarrollado y estandarizado un ensayo con mejor sensibilidad analítica que la

técnica que se emplea en la actualidad usada para controlar a pacientes infectados por VIH-2 en Francia. El ensayo según la invención también tiene una mejor sensibilidad clínica y se ha validado con un panel de muestras amplio y bien caracterizado, en contraste con los ensayos recientemente publicados. La actuación analítica de este nuevo ensayo, que es fácil de llevar de cabo, hace que sea adecuado para usar en países con recursos limitados, en los que circulan múltiples variantes del VIH-2. Además, el ensayo según la invención puede usarse en las mismas plataformas analíticas y en las mismas pruebas que los ensayos para el VIH-1, con lo cual mejora su rentabilidad para controlar pacientes infectados por VIH-1 y/o VIH-2. Esta posibilidad de análisis simultáneo facilitará el diagnóstico molecular de la transmisión de la madre al feto del VIH-1 y/o VIH-2, y también el diagnóstico y el seguimiento de la infección por VIH-1/VIH-2 dual en la misma muestra. Por último, el uso de este ensayo para el control virológico proporcionará nuevos descubrimientos acerca de la historia natural de la infección por VIH-2 en diferentes estadios clínicos.

**Listado de secuencias**

<110> UNIVERSITE PARIS DESCARTES

<120> método *in vitro* para la detección y la cuantificación del VIH-2

15 <130> B000011WO

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 1

25 tctttaagca agcaagcgtg g 21

<210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Cebador de PCR

<400> 2

agcaggtaga gcctgggtgt t 21

<210> 3

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda

<400> 3

40 cttggccggy rctgggcaga 20

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

45 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 4

gcgagagaaa ctccgtcttg 20

50 <210> 5

ES 2 800 474 T3

<211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 5  
 ttcgctgcc acacaatag tt 22

10 <210> 6  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sonda

15 <400> 6  
 taggttacgg cccggcggaa aga 23

<210> 7  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador de PCR

<400> 7  
 tccaacaggc tctctgctaa tcc 23

25 <210> 8  
 <211> 297  
 <212> ADN  
 <213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 2

<400> 8  
 cctcaattct ctctttggag gagaccagta gtcwcagcac acattgaggg ccagccagta 60  
 gaagttttac tagatacagg ggccgacgac tcaatagtag caggggtaga gttaggaagc 120  
 aattatagtc caaaaatagt agggggaata gggggattca taaataccaa agaatataag 180  
 gatgtagaga taaaagtact aaataaaaca gtaagggcca ctataatgac aggtgaaacc 240  
 ccaatcaaca tttttggcag aacattttg acagcattag gcatgtcatt aaatcta 297

30 <210> 9  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Sonda

<400> 9  
 tcttccgcc gggccgtaac cta 23

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un método para detectar o cuantificar ácidos nucleicos del virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2) en una muestra biológica, que comprende:
- 5 a) realizar una reacción en cadena con polimerasa (PCR) a tiempo real o una reacción en cadena con polimerasa y transcriptasa inversa (RT-PCR) a tiempo real sobre los ácidos nucleicos de la muestra biológica con:
- (i) al menos 4 cebadores que comprenden o que consisten, respectivamente, en:
- la secuencia SEQ ID NO:1 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:1, y
  - la secuencia SEQ ID NO:2 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:2, y
  - la secuencia SEQ ID NO:4 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:4, y
  - 10 - la secuencia SEQ ID NO:5 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:5,
- en el que los cebadores no comprenden más de 30 nucleótidos, y
- (ii) al menos 2 sondas marcadas que comprenden o que consisten, respectivamente, en:
- la secuencia SEQ ID NO:3, una secuencia complementaria con SEQ ID NO:3, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:3 o con la complementaria de esta, y
  - 15 - la secuencia SEQ ID NO:6, una secuencia complementaria con SEQ ID NO:6, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:6 o con la complementaria de esta,
- en el que las sondas no comprenden más de 30 nucleótidos, y
- b) determinar, a partir de ello, la presencia o la ausencia y/o la cantidad de ácidos nucleicos de VIH-2 en la muestra biológica.
- 20 2.- El método según la reivindicación 1, para detectar o cuantificar ARN de VIH-2.
- 3.- El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dichos al menos 4 cebadores consisten, respectivamente, en las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, y las 2 sondas marcadas consisten, respectivamente, en las secuencias SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:6.
- 25 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las sondas marcadas están marcadas con 6-carboxifluoresceína (FAM) en su extremo 5', y con Black Hole Quencher-1 (BHQ1) en su extremo 3'.
- 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la PCR o RT-PCR comprende las siguientes condiciones de termociclación:
- opcionalmente, 10 min a 50 °C para la transcripción inversa, seguidos de
  - 5 min a 95 °C, seguidos de
  - 30 - 50 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min.
- 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además determinar o cuantificar ácidos nucleicos de VIH-1 en una muestra biológica.
- 7.- Un kit o una mezcla para detectar o cuantificar ácidos nucleicos de VIH-2, que comprende:
- a) al menos 4 cebadores que comprenden o que consisten, respectivamente, en:
- 35 - la secuencia SEQ ID NO:1 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:1, y
  - la secuencia SEQ ID NO:2 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:2, y
  - la secuencia SEQ ID NO:4 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:4, y
  - la secuencia SEQ ID NO:5 o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:5,
- en los que los cebadores no comprenden más de 30 nucleótidos, y
- 40 b) al menos 2 sondas marcadas que comprenden o que consisten, respectivamente, en:
- la secuencia SEQ ID NO:3, una secuencia complementaria con SEQ ID NO:3, o una secuencia que tiene al menos

90% de identidad con SEQ ID NO:3 o con la complementaria de esta, y

- la secuencia SEQ ID NO:6, una secuencia complementaria con SEQ ID NO:6, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO:6 o con la complementaria de esta,

en los que las sondas no comprenden más de 30 nucleótidos, y

5 c) opcionalmente, reactivos adicionales para realizar una PCR o RT-PCR.

8.- El kit o la mezcla según la reivindicación 7, en los que dichos al menos 4 cebadores consisten, respectivamente, en las secuencias SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, y las 2 sondas marcadas consisten, respectivamente, en las secuencias SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:6.

10 9.- El kit o la mezcla según la reivindicación 7 u 8, en el que las sondas marcadas estén marcadas con 6-carboxifluoresceína (FAM) en su extremo 5', y con Black Hole Quencher-1 (BHQ1) en su extremo 3'.

10.- El kit o la mezcla según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprenden además cebadores y sondas marcadas para detectar o cuantificar ácidos nucleicos del virus de VIH-1.

11.- El uso del kit o la mezcla según se define en las reivindicaciones 7 a 10, para detectar o cuantificar ácidos nucleicos de VIH-2 de una muestra biológica.

15 12.- Un método *in vitro* para diagnosticar una infección por VIH-2, o para determinar la carga vírica de VIH-2, en un individuo, que comprende las etapas de:

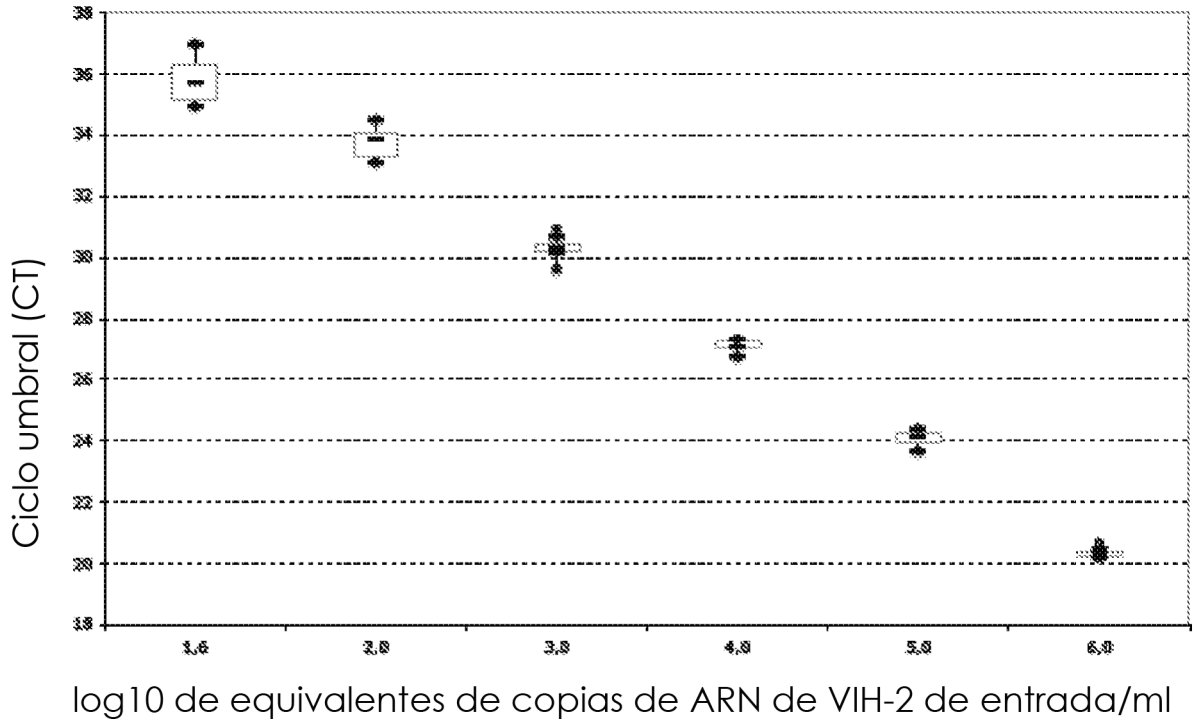
(a) realizar el método para detectar o cuantificar ácidos nucleicos del virus de la inmunodeficiencia humana-2 (VIH-2) en una muestra biológica tomada del individuo como se define en las reivindicaciones 1 a 6;

(b) determinar, a partir de ello, si el individuo está infectado por VIH-2 o la carga vírica de VIH-2 del individuo.

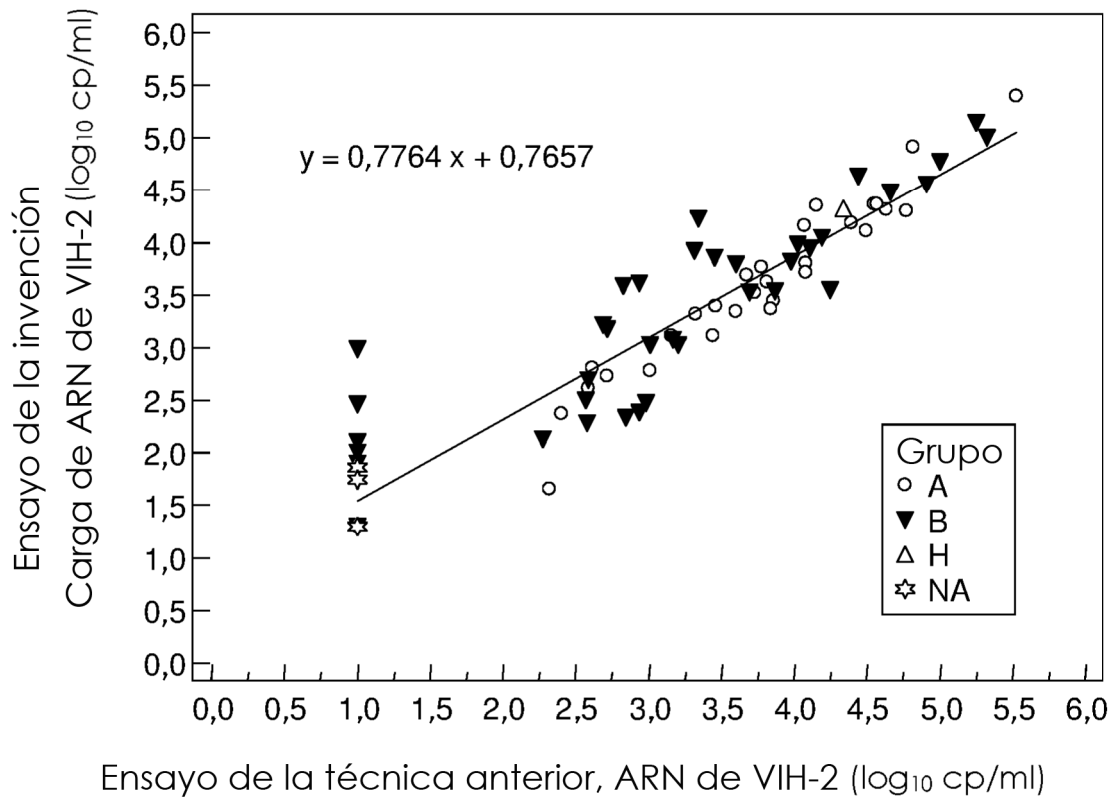
20 13.- Un método *in vitro* para determinar si es probable que un individuo se beneficie de un tratamiento con una terapia antirretrovírica (ART) o del ajuste de una ART, que comprende realizar el método para diagnosticar una infección por VIH-2, o determinar la carga vírica de VIH-2, según la reivindicación 12.

25 14.- Inhibidores de la transcriptasa inversa nucleotídicos (NRTI), inhibidores de proteasa (Pi) y/o inhibidores de integrasa para su uso en la prevención o el tratamiento de una infección por VIH-2 en un individuo, en los que se determina la probabilidad de que el individuo se beneficie de un tratamiento con ART o de un ajuste de la ART realizando el método según la reivindicación 13.

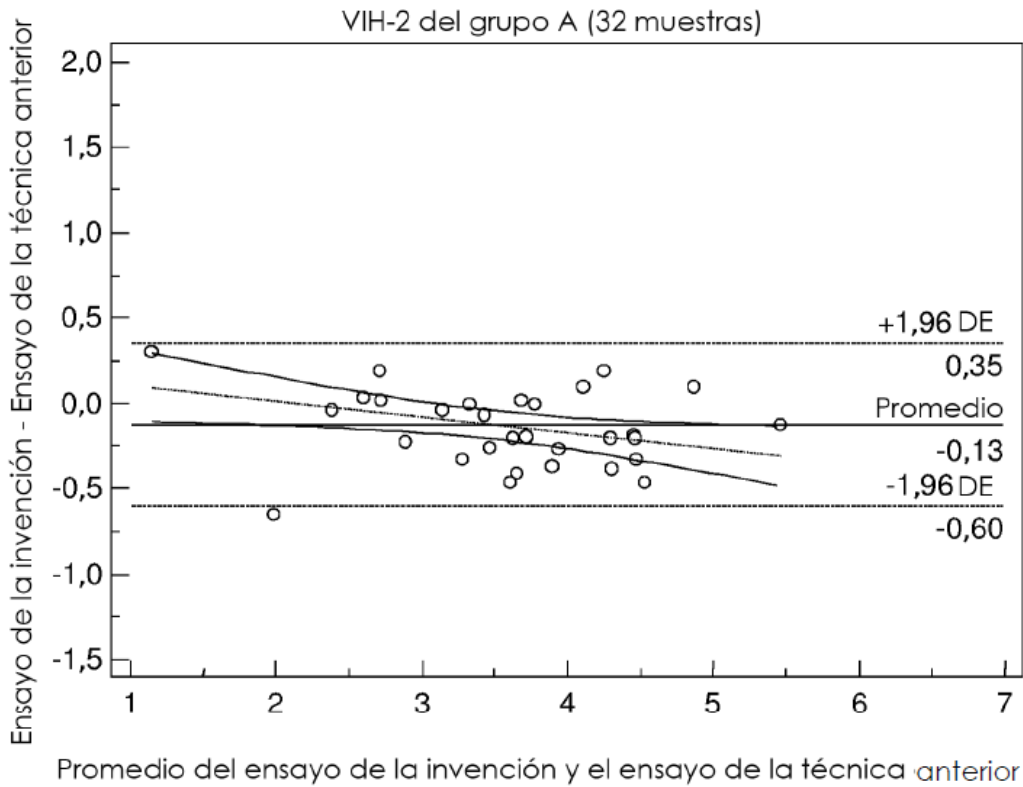
15.- Una sonda que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO:3, o una secuencia complementaria con SEQ ID NO:3.



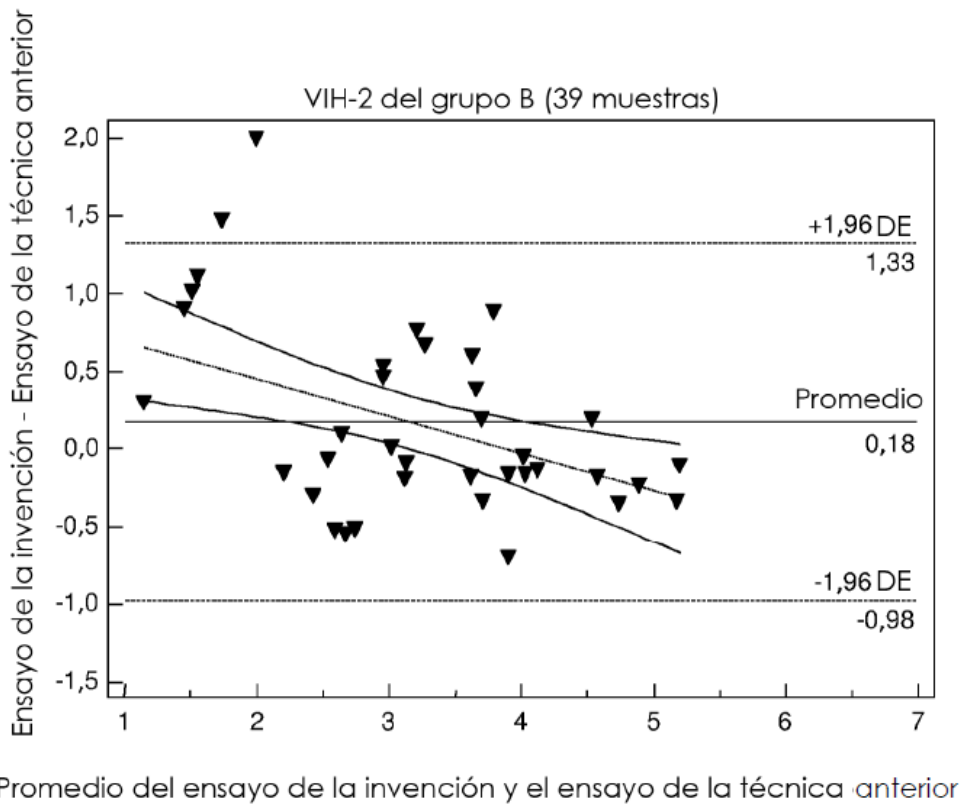
**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**



**Figura 4**