



(10) **DE 689 29 467 T3** 2016.12.22

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 655 501 B2**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **689 29 467.0**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 10 0149.4**
(96) Europäischer Anmeldetag: **13.06.1989**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.05.1995**
(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **21.05.2003**
(97) Veröffentlichungstag
des geänderten Patents beim EPA: **27.07.2016**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.12.2016**

(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)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(66) Innere Priorität:
3820223 **14.06.1988**

(73) Patentinhaber:
QIAGEN GmbH, 40724 Hilden, DE;
Chemotherapeutisches Forschungsinstitut
Georg-Speyer-Haus, 60596 Frankfurt, DE

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, NL, SE, AT,
BE, CH, DE, ES, FR, GB, GR, IT, LI, NL, SE

(72) Erfinder:
Henco, Dr. Karsten, W-4069 Erkrath, DE;
Von Briesen, Hagen, W-6147 Kronberg, DE;
Immelmann, Dr. Andreas, W-4069 Erkrath, DE;
Kühnel, Dr. Herbert, W-6332 Egelsbach, DE;
Dietrich, Dr. Ursula, W-6576 Eschborn, DE;
Rübsamen-Waigmann, Prof. Dr. Helga, W-6581
Bad Soden/Taunus, DE; Adamski, Michalina, W-
6052 Frankfurt, DE

(54) Bezeichnung: **HIV-2 Varianten**

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft HIV D205, eine HIV-2-Virusvariante, die vom entsprechenden Virusisolat HIV D205 (ECACC V 87122304) kloniert werden kann.

[0002] "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" (H. Kühnel, H. v. Briesen, U. Dietrich, M. Adamski, D. Mix, L. Biesert, R. Kreuz, A. Immelmann, K. Henco, Ch. Meichsner, R. Andreesen, H. Gelderblom, und H. Rübsamen-Waigmann, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 4, 2383–2387.

[0003] In der Diagnostik müssen zwei Kriterien erfüllt werden, nämlich die Spezifität und die Empfindlichkeit für das nachzuweisende Antigen. Bei der AIDS-Diagnose kann der Bedarf an einer Spezifität sicherlich der Verwendung der Isolate HTLV-III_B und LAV-2 (M. Guyader et al., "Nature" 326, 1987, 662–669) entsprechen, um HIV-Infektionen von andere Infektionen abzugrenzen und somit eine grobe Zuordnung zu den Klassen der "HIV-2-verwandten Infektionen" oder der "HIV-1-verwandten Infektionen" vorzunehmen. Ein Problem besteht jedoch in der Empfindlichkeit der Diagnose. Im Bereich der sogenannten Serokonversion, d. h. dem anfänglichen Auftreten des Antikörpers in der infizierten Person, impliziert eine Verminderung der Empfindlichkeit eine Erhöhung der Zahl "falsch negativer" Testergebnisse. Folglich besteht ein Hauptziel in einer möglichst großen Verkürzung des Zeitraums zwischen einer Infektion und der Nachweisbarkeit dieser Infektion durch eine Verbesserung der Testempfindlichkeit.

[0004] Eine verminderte Überkreuz-Reaktivität manifestiert sich in der Praxis der häufig eingesetzten ELISA-Diagnostik zum Beispiel durch eine verminderte Empfindlichkeit. Somit bedeutet die Verwendung des beschriebenen HIV-1-Isolat etwa eine mittlere Verminderung der Testempfindlichkeit gegenüber HIV-2-Seren um den Faktor von 100 bis 1000, während das Isolat HTLV-III_B dazu führt, dass fast kein Nachweis mehr bewerkstelligt werden kann.

[0005] Ein verhängnisvolles Prinzip der durch HIV verursachten Krankheiten besteht in der Tatsache, dass es nicht nur einen Typ an Phänotypen und Genotypen jeweils des HIV-1- und des HIV-2-Virus gibt. Statt dessen ist eine große Gruppe verwandter Viren, möglicherweise sogar Populationen, zu postulieren, die keinesfalls strikt voneinander getrennt sind, sondern kontinuierlich ineinander eindringen und eine evolutionäre Entwicklung zu einer immer mehr ansteigenden Divergenz erfahren, während sie gleichzeitig durch Rekombinationsereignis-

se damit beginnen, Teile des Genoms untereinander auszutauschen. Somit bilden die existierenden HIV-Spezies ein breites, kontinuierliches Populationsniveau, in dem es keine eng abgegrenzten Unterpopulationen einer Virusvariante gibt. Statt dessen ist anzunehmen, dass ein Kontinuum existiert, das im Laufe der Zeit permanenten Schwankungen unterliegt.

[0006] Die klassifizierten Virusvarianten HIV-1 und HIV-2 sind Repräsentanten der diffus voneinander abgegrenzten Unterpopulationen mit einem relativ niedrigen Grad an Beziehungen, was sich durch eine nur teilweise Überkreuzreaktivität zeigt. Andererseits gibt es Varianten der HIV-1-Gruppe (H. Rübsamen-Waigmann et al., "AIDS-Forschung" 10, 1987, 572–575; H. Rübsamen-Waigmann et al., J. Med. Virol. 19, 1986, 335–344; H. v. Briesen et al., J. Med. Virol. 23, 1987, 51–66), die mit HIV-2 signifikant stärkere Überkreuzreaktionen eingehen als das zuerst charakterisierte HIV-1-Isolat selbst (B. Hahn et al., "Nature" 312, 1984, 166–169). Ein aus einem solchen Isolat bestehendes kommerzielles Produkt ermöglicht die Diagnose von deutlich mehr Seren als HIV-2-positiv als das beschriebene Standardisolat HTLV-III_B.

[0007] Ein ideales Diagnostikum oder Therapeutikum sollte wenigstens einen Repräsentanten aus den Populationen als biologisch signifikant voneinander unterschieden enthalten.

[0008] HIV-1-Viren in einer Mehrzahl hoch polymorpher genetischer Mutanten können verschiedene Krankheiten wie ARC, LAS, AIDS und Enzephalopathien (ARC: AIDS-bezogene Krankheitszustände, LAS: Lymphadenopathie-Syndrom, AIDS: erworbenes Immunschwäche-Syndrom) verursachen. Klonierte Virusvarianten unterscheiden sich durch die Sequenz und das Restriktionsmuster sogar dann, wenn sie gleichzeitig, am selben Ort und sogar vom selben Patienten isoliert wurden (H. Rübsamen et al., 1986). Es konnte gezeigt werden, dass Virusvarianten vom HIV-1-Typ sich in einigen Virusantigenen um bis zu etwa 15% unterscheiden. Bei HIV-2 sind sogar mehr als 40% der Aminosäuren mancher Antigene verschieden, wobei Substitutionen, Insertionen und Deletionen in Betracht gezogen worden sind (M. Guyader et al., 1987, A. B. Rabson und M. A. Martin, "Cell" 40, 1985, 477–480).

[0009] Die vorliegende Erfindung macht eine Variante des HIV-2-Virus verfügbar. Die Variante HIV-2 D205 wurde aus einem klinisch asymptomatischen Patienten isoliert. Das Virusisolat erwies sich als Diagnostikum in Bezug auf DNA/RNA sowie in Bezug auf die Virus-Antigene zur serologischen und direkten Identifizierung von Infektionen durch den Typ HIV-2 in der Pre-AIDS- und der AIDS-Stufe.

[0010] Das erfindungsgemäße Virusisolat umfasst Viren und Proviren, deren Merkmale mit denjeni-

gen der offenbaren Restriktionskarte und der Sequenz der klonierten Teilbereiche identisch sind (**Fig. 1–Fig. 4**). Darüber hinaus umfasst das Virusisolat Varianten, die sich von den oben beschriebenen Viren und Proviren dahingehend unterscheiden, dass ihre Nucleotidsequenzen sich von den oben beschriebenen Viren nur um bis zu 5% und vorzugsweise 2%, besonders bevorzugt um 1% unterscheiden.

[0011] Die erfindungsgemäße Virusvariante kann Lymphadenopathien (weiterhin als LAS/AIDS bezeichnet) verursachen.

[0012] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform besteht aus klonierten DNA-Sequenzen, die dazu fähig sind, mit genomischer RNA und DNA der Virusvariante zu hybridisieren. Erfindungsgemäß beansprucht sind stabile Gensonden, die DNA-Sequenzen enthalten, die zum Nachweis der Hybridisierung dieser und anderer HIV-Varianten oder verwandter Viren oder DNA-Proviren in zu untersuchenden Proben, insbesondere biologischen oder halbsynthetischen Proben, fähig sind.

[0013] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung besteht aus einer Virusvariante der RNA/DNA, die oder deren jeweilige Fragmente, insbesondere c-DNA, genomische DNA, rekombinante DNA, synthetische DNA oder Fragmente davon unter stringenten Bedingungen an erfindungsgemäßen Virusvarianten hybridisieren. Es gilt als vereinbart, dass diese Varianten oder Fragmente einschließen, die im Vergleich zur erfindungsgemäßen Virusvariante Deletionen und Insertionen aufweisen.

[0014] Als stringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen sind diejenigen Bedingungen zu verstehen, aus denen experimentell oder durch Berechnungen abgeleitet werden kann, dass der Schmelzpunkt der zu 100% homologen Nucleinsäurekomplexe unter den Hybridisierungs- und Waschbedingungen unter den eingesetzten Pufferbedingungen um nicht mehr als 5°C abnimmt.

[0015] Die beschriebenen klonierten DNA-Fragmente sind zur Hybridisierung mit komplementären Nucleinsäuren (DNA/RNA) zum Zweck des diagnostischen Nachweises der Virusvarianten geeignet. Die erfindungsgemäßen Diagnostestsets werden mittels DNA- oder RNA-Sonden durchgeführt. Die Sonden sind radioaktiv oder sind mit fluoreszenten bio- oder chemilumineszenten Gruppen oder Enzymen markiert oder sind mit Enzymen über gekoppelte Reaktionssysteme spezifisch nachweisbar. Die Hybridisierungen können in einer homogenen Phase einer Lösung oder in einer heterogenen Phase mit an Feststoff immobilisierten Nucleinsäuren erfolgen, während es sich beim Feststoff um eine Membran, ein Teilchen, eine Zelle oder ein Gewebe handeln kann, so dass die Hybridisierung auch in situ erfolgen kann.

[0016] Die entsprechenden DNA-Sequenzen (**Fig. 1**) aus den erfindungsgemäß beanspruchten Virusisolaten können in *E. coli*-Bakterien kloniert werden, indem eine genomische Lambda-Genbank eingerichtet wird, wobei von der DNA der mit dem Virusisolat infizierten Lymphozyten ausgegangen wird. Die gewünschten Klone werden erhalten, indem ein Plaque-Screening mit STLV-III-Sequenzen des Gag-Pol-Bereichs durchgeführt wird. Noch spezifischer kann eine DNA, die von der veröffentlichten Sequenz HIV-2 ROD (M. Guyader et al., "Nature" 326, 1987, 6623–669) stammt, oder eine DNA-Sonde, die von den Teilsequenzen des erfindungsgemäßen Isolats HIV-2 D205 stammt, als Sonde verwendet werden.

[0017] Das Diagnoseverfahren, das auf der Verwendung der erfindungsgemäß beanspruchten Viren basiert, umfasst die folgenden Schritte: Extraktion der RNA oder DNA aus biologischen Proben, gegebenenfalls die enzymatische Verarbeitung durch Restriktionsenzyme, die Trennung durch Gelelektrophorese und/oder Direkt-Blotting-Verfahren für Nucleinsäure bindende Träger, und die anschließende Hybridisierung mit Teilen der klonierten Fragmente der beanspruchten Viren. Hybridisierungen können auch direkt in chemisch behandelten Zellen oder Geweben erfolgen. Dabei ist der Ursprung der Gewebe oder Flüssigkeiten unerheblich.

[0018] Insbesondere ist ein Verfahren zum in-vitro-Nachweis von Antikörpern gegen Expressionsprodukte der Viren der vorliegenden Erfindung dadurch gekennzeichnet, dass die Expressionsprodukte der Viren oder Teile davon durch immunologische Methoden nachgewiesen werden. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Expressionsprodukten um Proteine, Peptide oder Teile davon handelt, die innerhalb der Bedeutung eines offenen Leserasters auf der DNA der proviralen Teilsequenzen nach Anspruch 1 kodiert worden sind und durch synthetische oder biosynthetische Verfahren hergestellt werden.

[0019] Das Verfahren ist weiter dadurch gekennzeichnet, dass zuvor eine definierte Menge oder eine Kombination von Expressionsprodukten oder Teilen davon auf Mikrotiterplatten fixiert wird, wonach anschließend biologische Proben, verdünnt oder unverdünnt, mit den beschichteten Mikrotiterplatten in Kontakt gebracht werden und nach einer Inkubation und anschließenden Waschschrritten mittels eines Nachweisreagenzes oder markierten Anti-HIV-Antikörpern identifiziert werden können.

[0020] Alternativ werden Filterstreifen und Kunststoffstreifen oder -stäbe statt Mikrotiterplatten verwendet, wobei die Expressionsprodukte der Viren durch die isolierte Auftragung der verschiedenen Antigene an jeweils spezifischen Positionen fixiert worden sind.

[0021] Für diagnostische und therapeutische Aufgaben können die beschriebenen DNA-Segmente auch zur Expressierung kodierter Antigene verwendet werden. Dabei werden die DNA-Segmente unter der gezielten Steuerung von Regulationssequenzen in pro- oder eukaryontische Zielzellen, -gewebe oder aus mehreren Zellen bestehende Zielorganismen eingeführt, um diese zur Produktion der entsprechend kodierten Antigene, Teilen davon oder Kombinationen davon mit fremden Antigenen zu stimulieren. Antigene können über die Reaktion mit Anti-HIV-2-Antikörpern, insbesondere aus den Seren der betreffenden Patienten, nachgewiesen werden. Antigene mit längeren offenen Leserastern (> 50 Aminosäuren) eignen sich dafür genauso wie diejenigen, die auf RNA-Ebene Spleißvorgängen unterworfen sind und somit so zusammengesetzt sind, dass sie die längeren offenen Leseraster bilden.

[0022] Polypeptide, die von der erfindungsgemäßen klonierten Virusvariante stammen, können verwendet werden, um solche Antigene in einem zu untersuchenden Material nachzuweisen, das ähnliche Antigen-Determinanten enthält und deswegen eine immunologische Überkreuzreaktion eingeht. Dies ist zur Diagnose von AIDS und Pre-AIDS von Virentägern oder asymptomatischen Virentägern bzw. von Blut stammenden Virusprodukten besonders geeignet. Auch der serologische Nachweis der Antikörper, die gegen diese antigenen Polypeptide als Expressionsprodukte des erfindungsgemäß beanspruchten Virus gerichtet sind, werden durch die Verwendung herkömmlicher Systeme wie ELISA möglich. Die immunogenen Polypeptide können als schützende Polypeptide als Vakzine verwendet werden, um einen Schutz gegen AIDS-Infektionen zu bewirken.

[0023] Die erfindungsgemäßen Virusisolate und die davon stammenden Produkte können mit anderen Isolaten der Teilpopulation HIV-2 in Testsystemen kombiniert werden, d. h. mit denjenigen, die sich so weit wie möglich im beschriebenen Populationsniveau entfernt befinden, wie zum Beispiel das Isolat HIV-2 ROD (M. Guyader et al., 1987). Dadurch wird es möglich, auch Populationen entfernter Verwandtschaft in einem Test empfindlich nachzuweisen.

[0024] Die erfindungsgemäße Virusvariante ist vom Spektrum der HIV-1-Varianten hochgradig verschieden und weist eine engere molekulare Verwandtschaft zu dem von Guyader beschriebenen HIV-2-Virus auf, obwohl sie sich davon beträchtlich unterscheidet (**Fig. 1**). Auch die biologischen Eigenschaften unterscheiden sich deutlich vom beschriebenen HIV-2-Isolat. Somit bevorzugt die erfindungsgemäße Variante für eine wirksame in-vitro-Replikation Zellen, die von myeloischen Linien stammen. Im Gegensatz dazu reproduziert das Virus sich in Lymphozyten Linien schlecht.

[0025] Eine Probe des erfindungsgemäß beanspruchten Virus ist in Form seines Isolats am European Collection of Animal Cell Cultures unter der Bezeichnung HIV D205 (V 87122304) gemäß dem Budapest-Vertrag hinterlegt worden.

[0026] **Fig. 1** zeigt die Restriktionskarten des erfindungsgemäßen Virusisolats im Vergleich zu bekannten HIV-Sequenzen.

[0027] **Fig. 2** zeigt die partiellen Nucleotidsequenzen von HIV-D205 (entsprechend dem Klon HIV-2 A7.1 von **Fig. 2**).

[0028] **Fig. 3** zeigt die Sequenzhomologie von HIV-2 D205, 7 im Vergleich zur HIV/SIV-Gruppe (Genniveau; nt/aa).

[0029] **Fig. 4** zeigt einen Vergleich der Nucleotidsequenz zwischen HIV-2 D205 und HIV- und SIV-Stämmen (in % der Homologie).

[0030] Experimentelle Ergebnisse und Merkmale von HIV-D205 sind in H. Kühnel et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 4, 2383–2387, beschrieben.

[0031] Die Sequenz von HIV-D205 zeigt viele sogenannte "offene Leseraster". Die meisten dieser Leseraster können durch einen Vergleich von Homologien mit zuvor beschriebenen HIV-Viren mittels eines Vergleichs von Western-Blots, die mit HIV-D2-5-Antigenen durchgeführt wurden, die von infizierten HUT 78- oder U937-Zellen stammen, und durch Untersuchungen mit Seren von den entsprechenden Patienten und Bezugsseren mit in vivo exprimierten Proteinen/Antigenen in Beziehung gesetzt werden.

[0032] Andere offene Leseraster werden nicht auf dem Niveau ihrer exprimierten Antigene, die durch die Funktion oder die auf Western-Blots erfolgenden Färbung von Antikörpern definiert sind, identifiziert. Sie können unter bestimmten Umständen jedoch in vivo exprimiert werden. Andere Leseraster, sogar kurze, können gut auf eine Weise exprimiert werden, die auf Grund von Spleißvorgängen allein auf der Grundlage der Nucleinsäure-Sequenzdaten schwierig vorhersagbar ist.

[0033] Antigen-Determinanten auf exprimierten Proteinen, die für die biologische Funktion, für Zielantigene in der Diagnostik oder für die Immunisierung wichtig sind, sind über die gesamte exprimierte lineare Proteinstruktur verteilt. Teile dieser Sequenzen können allgemeinere antigenen Eigenschaften als andere haben, wie durch ein Peptid-Screening/eine Peptid-Kartierung für antigenen Stellen gezeigt werden kann. Diese Stellen können als einzelne Epitope oder kontinuierliches Polypeptid oder in einer Version von in vitro oder synthetisch gespleißten Antigenen exprimiert werden. Die Antigenität der exprimierten Produkte

kann durch eine Fixierung und ein Blotting des Antigens im Western-Blot-Assay gezeigt werden. Konstruktionen zur Antigen-Expression in *E. coli* können erfolgen, indem herkömmliche Techniken unter Verwendung von synthetischen Genen, Restriktionsfragmenten von klonierten viralen Genomsegmenten, unter Verwendung von mit Exonuclease oder DNase I getrimmten Produkte davon oder unter Verwendung von sequenzspezifischen synthetischen Primern, die das gewünschte 5'- und 3'-Ende des zu exprimierenden Fragments zusammen mit geeigneten Restriktionsorten definieren, verwendet werden. Diese Restriktionsorte können leicht zur Ligation in ein Feld von mehrfach klonierende Orte (pEX) aufweisenden Expressionsvektoren verschiedener Organismen wie denjenigen, die von PLc24 (Remault et al., 1981 *Gene* 15, 81–83) stammen, verwendet werden.

[0034] Es wurde gezeigt, dass die exprimierten Antigene mit Seren von Patienten spezifisch reagieren. Das p27(24) des gag von HIV-D205 reagiert sehr empfindlich mit sowohl typischen HIV-1-Seren als auch mit typischen HIV-2-Seren (siehe Kühnel et al.).

Patentansprüche

1. Virusisolat HIV-2 D205 (ECACC V 87122304), das zur in-vitro-Replikation von Knochenmarkzellen stammende Zellen bevorzugt.
2. Virus-RNA, die sich um bis zu 5% von der Nucleotidsequenz der Virusisolate gemäß Anspruch 1 unterscheidet.
3. RNA nach Anspruch 2, wobei die RNA als Hybrid mit komplementär markierten RNA-Strängen vorliegt.
4. Verfahren zum Nachweis von HIV-verwandten Nucleinsäuren (DNA und RNA) in biologischen Proben, Zellen und in isolierter Form durch Verwendung der Nucleinsäuren nach den Ansprüchen 2 oder 3.
5. Isolierte Zellen, die mit Nucleinsäuren nach einem der Ansprüche 2 oder 3 transformiert worden sind.
6. Isolierte Zellen, die mit dem Virusisolat nach Anspruch 1 infiziert worden sind.

Es folgen 10 Seiten Zeichnungen

Fig. 2

Partielle Nucleotidsequenzen von HIV-D205
(entsprechend dem Klon HIV-2 A7.1 von Fig. 2);

HIV-D205; entsprechend Pos. 8942-9255 in HIV-2_{RCD}; Homologie
71,6 %

```

      10          20          30          40          50          60
TGGAAGGGAT GTATTATAGT GAGAGAAGAC ACAGAATATT AGACACATAT TTTGAGAATG

      70          80          90          100         110         120
AAGAAGGCAT TGTGTCTGGC TGGCAAACCT 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; entsprechend Pos. 718-2510 in HIV-2_{RCD}; Homologie 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 CCTTAAATGC 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 ATGCAAATTA

      430         440         450         460         470         480
TTAGAGAAAT AATCAATGAG GAAGCAGCAG ACTGGGACCA GCAACACCCG TCACCAGGCC

```

Fig. 2

```

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

550      560      570      580      590      600
CAGTAGAGGA ACAGATACAG TGGATGTACA GGGCCCAAAA 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 AGGCCCAAGG CAGAAGGCAA

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

970      980      990      1000      1010      1020
TTCAACAAAA AGCAGGGAAG AGAGGGACAG TGACATGCTG GAACTGTGGC 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 GGGGAGACAA CAGAGAGAGA

1330      1340      1350      1360      1370      1380
GCCGAGAGAG ACCCTACAAG GAGGTGACAG AGGATTTGCT GCACCTCAAT TCTCTCTTTG

1390      1400      1410      1420      1430      1440
GAGAAAGACCA 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 CAAAGAATAC AAAGATGTAG AAATAGAAAT

1570      1580      1590      1600      1610      1620
AGTGGGAAA AGAGTAAAGG CAACTATAAT GACAGGAGAT ACCCCAATAA ACATTTTGG

```


Fig. 2

```

1630      1640      1650      1660      1670      1680
CAGAAATATT TAAATACCT TGGGCATGAC TTAAATTTT CCAGTGGCAA AGGTAGAACC

1690      1700      1710      1720      1730      1740
AGTAAAAGTT GAGTTAAAAC CTGGAAAAGA TGGGCCAAAAG ATCAGACAAT GGCCTCTATC

1750      1760      1770      1780      1790
CAGGGAAAAG ATACTAGCCC TCAAAGAAT CTGTGAAAAA ATGGAAAAGG

```

HIV-D205; entsprechend Pos. 2877-7293 in HIV-2 ROD; Homologie
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
CGTTCAAATG 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 ATGCAAATA ATTAGGGGAA

370     380     390     400     410     420
AGATGACCCT AACAGAAGAA GTACAGTGGG 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 CAGGGAAATA

550     560     570     580     590     600
AAGTCCTAAA AGTAGGAAA TATGCAARGG TAAAAACAC GCACACCAAC GGGGTAAGAC

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

670     680     690     700     710     720
CAGTGTTCCA 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

```

      850      860      870      880      890      900
ATAGAACCTC AAAGGAAGGA AAAGCAGGAT ATGTCACTGA CAGGGGAAA GATAAGGTTA

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

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

     1030     1040     1050     1060     1070     1080
CTGCACAGCC AACAGAAACA GAATCACCAA TAGTAGCAA AATAATTGAA GAAATGATCA

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

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

     1210     1220     1230     1240     1250     1260
CAGCCCAGGA AGAGCATGAA AAATATCATG GCATGTGAAA AGAACTGGTC CATAAATTCG

     1270     1280     1290     1300     1310     1320
GAATTCACAA ATTAGTGGCA AAACAGATAG TAAATTCCTG TGATAAATGC CAACAAAAG

     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 CTTACCTCA CCAAGTGTAA

-----1570----- 1580     1590     1600----- 1610----- 1620
AGATGGTAGC CTGGTGGGTA GGAATAGAAC AAACTTTGG AGTACCCTAT AACCCACAAA

     1630     1640     1650     1660     1670     1680
GTCAAGGAGT AGTGGAAGCA ATGAACCATC ACCTGAAATA TCAAATAGAC AGACTCAGAG

     1690     1700     1710     1720     1730     1740
ACCAAGCAGT ATCAATAGAG ACAGTTGTAC TAAATGGCAAC TCACTGCATG AATTTTAAA

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

     1810     1820     1830     1840     1850     1860
AGCAAGAAAT ACAGTTCTTC CAAGCAAAA ATTTAAAATT TCAAAATTC CAGGTCTATT

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

     1930     1940     1950     1960     1970     1980
GAGCAGTCAT CATAAAGGTA GGGACAGAAA TCAAAGTAGT ACCCAGGAGA AAAGCAAAA

```

Fig. 2

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	GAGGAACFTT
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	GCATTCGCTT	GGCTAGAAAG	AACAATAACA	GAGCTCAACA	GGGTAGCGGT
2590	2600	2610	2620	2630	2640
CAACCATTTG	CCCCGAGAAC	TTATTTTCCA	GGTCTGGCAG	AGGTCTTGGG	CATACTGGCG
2650	2660	2670	2680	2690	2700
TGAGGAACAG	GGCATGTCAA	TTAGCTATAC	CAATATAGA	TACTTGTTC	TAATGCAGAA
2710	2720	2730	2740	2750	2760
AGCAATGTTT	GTGCACTATA	CAAAGGGCTG	TAGGTGCCTG	CAGGAGGGCC	ATGGGCCAGG
2770	2780	2790	2800	2810	2820
GGGATNGAGA	TCAGGACCTC	CTCCTCCTCC	TCCCCCAGGC	CTGGCCTAAT	GGCAGAAGCA
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	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

Fig. 2

```

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

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

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

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

3370      3380      3390      3400      3410      3420
ATACCCGCAT GGAGGAACGC AACAGTTCCC CTCATTTGTG CAACCACAAA CAGAGACACC

3430      3440      3450      3460      3470      3480
TGGGGAAGTG 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 AAACCGAAC 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 AGCTAAAACA ATATAAAGAC ACCTGGTACT CAGAAGATTT 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 CTGCAGTAAAG

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 CPATAAGAAC CGTGTCAGGA CTACTTTTCC ATTCACAGCC TATCAATAAG

```

Fig. 2

```
      4270      4280      4290      4300      4310      4320
AGACCCAGAC AAGCTTGGTG CTGGTTTAAAG GGAAACTGGA CAGAAAGCCAT AAAGGAGGTG

      4330      4340      4350      4360      4370      4380
AAAGGACCA TCATAAAACA TCCCAGGTAT AAAGGAGGTG CAAAAAATAT CACAAAGCGTA

      4390      4400      4410
AAGTTAGTAT CAGAACATGG AAAAGGTTCA GATC
```

Fig. 3

Sequenzhomologie von HIV-2_{D205,7} im Vergleich zur HIV/SIV-Gruppe (Genniveau; nt/aa)

HIV-2_{D205,7}

Gen	Position	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
talax1	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

Vergleich der Nucleotidsequenz von HIV-2_{D205,7} mit HIV- und SIV-Stämmen (in % der Homologie)

HIV-2D205 Position	HIV-2ROD	HIV-2NIHZ	HIV-2D194	SIVMAC	SIVAGM	HIV-1BRU
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	50.9
2877-7293	75.1	74.8	75.4	74.0	58.0	54.6
Summe	75.9	75.9	75.9	75.0	58.9	56.4