



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 336 807**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05769801 .1**

96 Fecha de presentación : **03.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1751317**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2007**

54 Título: **Detección del tipo y subtipo del VIH.**

30 Prioridad: **04.06.2004 EP 04291402**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2010**

73 Titular/es: **BIO-RAD PASTEUR  
3, boulevard Raymond Poincaré  
92430 Marnes-la-Coquette, FR**

72 Inventor/es: **Biron, Marie-Philippe y  
Horvais, Alain**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 336 807 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

Detección del tipo y subtipo del VIH.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo del VIH y subtipos del VIH. Más precisamente, la invención se refiere a la detección de los tipos y subtipos del VIH, y especialmente a la detección múltiple de los tipos y subtipos del VIH.

10 **Antecedentes en la técnica**

El VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) es el virus responsable del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y pertenece a la familia de retrovirus humanos. Actualmente se considera que el SIDA es una de las mayores amenazas para la salud en los seres humanos. Un individuo infectado por VIH puede transmitir la enfermedad, aunque permanezca asintomático durante años.

Varios grupos de investigación identificaron en 1983-1984, de manera independiente, el supuesto agente etiológico responsable del SIDA (véase por ejemplo Barre-Sinoussi *et al.*, Science 220:868-871; Montagnier *et al.*, in Human T-Cell Leukaemia Viruses (Gallo, Essex & Gross, eds.); Vilmer *et al.*, The Lancet 1:753), y posteriormente se unificó la nomenclatura del VIH.

La familia del VIH comprende varios tipos y subtipos. Los virus VIH1 pueden clasificarse de acuerdo a subtipos. Los ejemplos de subtipos del VIH1 incluyen VIH1-M y VIH1-O. De manera similar, los virus del VIH2 incluyen diversos sub-tipos, por ejemplo VIH2-A y VIH2-B.

Para los ensayos de desarrollo de fármacos, profilaxis, así como para el tratamiento del SIDA, ha comenzado ahora a tener gran importancia el ser capaz de identificar y cuantificar de forma rápida y sencilla el grupo (o grupos), tipo (o tipos) y subtipo (o subtipos) de virus VIH presente en una muestra determinada.

En este documento, por grupo de VIH, se entiende cualquier grupo de VIH, independientemente de lo que se conoce o no en la fecha de prioridad. Se conocen en la técnica diversos grupos de VIH y se describen en la bibliografía y en las bases de datos correspondientes, por ejemplo en ncbi en Internet. Ejemplos de los mismos incluyen VIH1-M y VIH 1-O. Por subtipo de VIH, en este documento se entiende cualquier subtipo de VIH, independientemente de lo que se conoce o no en la fecha de prioridad. Se conocen en la técnica diversos subtipos de VIH y se describen en la bibliografía y bases de datos correspondientes, por ejemplo en ncbi en Internet.

Por aislado del VIH, se entiende en este documento cualquier aislado o cepa del VIH, independientemente de lo que se conoce o no en la fecha de prioridad. Se conocen diversos aislados del VIH en la técnica y se describen en la bibliografía y en la base de datos correspondiente, por ejemplo en ncbi en Internet. Algunos aislados se consideran como referencias. Ejemplos de los mismos incluyen K03455, L20587 y M30502.

Un posible enfoque podría depender del desarrollo de anticuerpos específicos. Sin embargo, en términos de sensibilidad y especificidad, un enfoque basado en PCR normalmente parece muy prometedor. Generalmente, esto también ofrece la posibilidad de trabajar sobre muestras pequeñas.

En la técnica se conocen métodos de amplificación, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y métodos basados en PCR, por ejemplo PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) y PCR (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis, Fritsch y Sambrook, CSHL Press; Molecular Biology of the Cell, Alberts *et al.*; PCR Primer: A Laboratory Manual, Dieffenbach y Dveksler, CSHL Press; The Polymerase Chain Reaction, Mullis, Ferre y Gibbs, Birkhauser Boston Press; Gene quantification, Ferre, Birkhauser Boston Press).

Generalmente estos métodos son herramientas muy eficaces para el análisis cualitativo y cuantitativo de muestras biológicas complejas.

Sin embargo, la eficacia de estas técnicas depende típicamente de manera crucial del diseño y de la elección de los cebadores.

Existe una técnica anterior que describe cebadores específicos del VIH1 (US 5 712 385; EP 1 043 407; WO 03/020878; EP 1 344 837). También existe una técnica anterior que describe cebadores específicos del VIH2 (US 5 962 665).

Dependiendo de las condiciones de trabajo, al menos alguno de estos cebadores de la técnica anterior puede mostrar una especificidad suficiente para VIH1 o VIH2, permitiendo de esta manera una detección específica del VIH1 y VIH2. Sin embargo, de acuerdo con el conocimiento de los solicitantes, ninguno de ellos permite:

- una detección específica cuantitativa en tiempo real de dichos subtipos o

- una detección múltiple de dichos subtipos que seguiría siendo específica o
- una detección múltiple de dichos subtipos que seguiría siendo cuantitativa, incluso cuando se implementa en tiempo real.

5

Sin embargo, dicha detección específica múltiple cuantitativa en tiempo real sería más fiable y daría más información sobre el estado de infección actual del paciente. Esto proporcionaría por tanto tener acceso a un diagnóstico más preciso, y como consecuencia, permitiría equilibrar con mayor precisión los efectos positivos frente a los negativos de un tratamiento determinado. Permitiría ajustar o elegir el tratamiento que debería ser más eficaz para el paciente particular que se diagnostica. Dicha detección específica múltiple cuantitativa en tiempo real tendría también la ventaja de ser más rápida y más fácil de ejecutar, especialmente a gran escala.

10

### Descripción de la invención

15

La presente invención proporciona un proceso para la detección del VIH.

La presente invención proporciona oligonucleótidos, que incluyen cebadores y sondas, y conjuntos de los mismos, que son adecuados para la detección del VIH.

20

En este sentido, la presente invención también se refiere al campo de la amplificación, PCR y a métodos basados en PCR, así como al diagnóstico.

25

Por PCR o reacción PCR, se entiende en este documento cualquier método basado en PCR. Esto incluye PCR convencional, PCR cualitativa, cuantitativa y semi-cuantitativa, PCR en tiempo real, PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR simple y múltiple y similares.

30

Por PCR en tiempo real, se entiende en este documento cualquier método basado en PCR que permite observar la fluorescencia emitida durante la reacción como un indicador de la producción del amplicón durante cada ciclo de PCR a diferencia de la detección de punto final por métodos PCR convencionales. Por PCR cuantitativa se entiende en este documento cualquier método basado en PCR que permite calcular la cantidad inicial de una determinada diana de PCR en una muestra determinada.

35

Por PCR múltiple, se entiende en este documento cualquier reacción de PCR que tiene por objeto la amplificación de más que una diana. Por ejemplo, la PCR múltiple incluye PCR doble (dos dianas), PCR triple (tres dianas) y PCR múltiples superiores. La PCR múltiple incluye reacciones de PCR con más de un par de cebadores, por ejemplo dos pares de cebadores. En este caso, podrían ser cuatro cebadores diferentes, pero también es posible que los dos pares de cebadores tengan un cebador en común, por ejemplo, el cebador directo y tener dos cebadores inversos distintos. La PCR múltiple también incluye reacciones PCR con un único par de cebadores, pero con más de una sonda.

40

Por oligonucleótido, se entiende en este documento cualquier polímero de nucleótidos corto, en el cual los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos; di desoxirribonucleótidos, nucleótidos degenerados y similares. Dichos oligonucleótidos, son preferiblemente monocatenarios. La longitud de dichos oligonucleótidos puede variar y habitualmente es menor de 150 nucleótidos (nt), preferiblemente en el intervalo de 10-100 nt, más preferiblemente 15-60 nt, incluso más preferiblemente 18-50 nt. Dichos oligonucleótidos pueden llevar modificaciones químicas, tales como etiquetado o marcaje, por ejemplo, radioactivo, fluorescente, biotinilado, o marcado con dig. De acuerdo con la invención un oligonucleótido puede ser directo (sentido) o inverso (antisentido). Además, debería destacarse que aunque puedan mencionarse funciones preferidas con respecto a algunos oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención, es obvio que un oligonucleótido determinado puede asumir varias funciones y puede usarse de diferentes maneras de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, un oligonucleótido puede usarse como un cebador, o como una sonda. También, cuando se describe que un oligonucleótido es útil como una sonda de dirección a amplicón, el especialista en la técnica entiende que la secuencia complementaria de este oligonucleótido también es útil como una sonda para dirigir el mismo amplicón. Además, también es obvio, que cualquier cebador adecuado para un ensayo múltiple, también puede, dentro del significado de la presente invención, usarse en un protocolo simple. Lo mismo se aplica a un cebador adecuado para un protocolo en tiempo real, que también puede usarse en el armazón de un ensayo de punto final dentro del significado de la presente invención.

55

Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención incluyen especialmente cebadores y sondas PCR. A menos que se indique otra cosa, las secuencias de ácidos nucleicos aparecen en la dirección 5' a 3'. Dichos oligonucleótidos pueden encontrarse de muchas formas, por ejemplo, en estado seco, en solución/suspensión con el disolvente y la concentración deseados. El especialista en la técnica sabría que disolventes, concentraciones, condiciones de almacenamiento son adecuados para los oligonucleótidos de la invención. En particular, el especialista en la técnica sabría como preparar dichos oligonucleótidos como soluciones madre. Los oligonucleótidos de acuerdo con la invención también pueden adoptar diversos grados de crudeza, según puedan considerar los especialistas en la técnica, por ejemplo por HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento).

65

Por conjunto de nucleótidos, se entiende en este documento cualquier combinación que comprende al menos un oligonucleótido, preferiblemente al menos dos, por ejemplo 2-10 oligonucleótidos. Dicho conjunto puede comprender

## ES 2 336 807 T3

por tanto un cebador PCR o un par de cebadores PCR, o una sonda, o una sonda y un par de cebadores. Dichos oligonucleótidos pueden mantenerse por separado o mezclarse parcial o totalmente.

5 Los especialistas en la técnica conocen el concepto de cebador o cebador de PCR. Este incluye, por ejemplo, cualquier oligonucleótido capaz de hibridarse con un molde diana en condiciones rigurosas adecuadas, y permitir la elongación de la cadena de la polimerasa. La longitud típica de dicho cebador es 15-30 nt, preferiblemente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nt.

10 Los especialistas en la técnica también conocen el concepto de sonda. Esta incluye, por ejemplo, cualquier nucleótido capaz de hibridarse a un molde diana en las condiciones de hibridación deseadas. La longitud típica de dicha sonda es de 20-55 nt, preferiblemente 15-60 nt, más preferiblemente 20-55 nt, más preferiblemente 30-50 nt, más preferiblemente 35-45 nt. Preferiblemente, dicha sonda se marca con fluorescencia. Sin embargo, los especialistas en la técnica tienen claro que en determinadas condiciones, se puede usar un cebador como una sonda y viceversa. Además, en este documento se destaca que los productos de acuerdo con la presente invención, especialmente, entre otros, 15 oligonucleótidos, no se limitan al uso previsto mencionado en este documento, sino que se interpretan en general, independientemente del destino indicado. Por ejemplo, una reivindicación para un producto (oligonucleótido) para un uso particular debería interpretarse como un producto (oligonucleótido) que significa que efectivamente es adecuado para el uso indicado. De esta manera, un oligonucleótido adecuado para usar como un cebador en un protocolo múltiple también se adapta claramente a un protocolo simple dentro del significado de la presente invención.

20 En la técnica se conocen diversos formatos (tipos) de sondas, que incluyen sondas Taqman<sup>TM</sup> (sondas de hidrólisis), molecular beacons<sup>TM</sup> (sondas beacon o sondas fluorescentes) y sondas Scorpion<sup>TM</sup>.

25 En una realización preferida, todas las sondas de acuerdo con la invención pueden sintetizarse y usarse en el formato molecular beacon.

La estructura de las sondas fluorescentes es la siguiente. Una secuencia corta de nucleótidos (denominada también brazo beacon) que no está asociada a la secuencia diana está unida covalentemente a ambos extremos de la sonda. Un brazo corto no asociado está unido por tanto al extremo 5' de la sonda, y está marcado con un resto fluorescente (es decir colorante fluorescente o marcador fluorescente). Otro brazo pero todavía no asociado está unido al extremo 3' de la sonda y está marcado con un resto de extinción de fluorescencia. Por tanto, las sondas fluorescentes tienen un fluoróforo y un extintor en los extremos opuestos. El brazo corto en 5' es totalmente complementario al de 3' de manera que pueden hibridar entre sí, y pueden por tanto adoptar una estructura en horquilla cuando no está hibridado con la diana en solución. En esta conformación de horquilla, el extintor y el colorante fluorescente están lo bastante próximos entre sí para permitir la extinción eficaz del fluoróforo. Sin embargo, cuando la sonda encuentra una molécula diana, la hibridación se favorece con respecto a la conformación de horquilla cuando se eligen adecuadamente valores de Tm del brazo beacon y Tm de la sonda (teóricamente; Tm de la sonda > Tm del brazo beacon > Tm del cebador, donde Tm es la temperatura de fusión de interés). El fluoróforo y el extintor se alejan uno del otro y el fluoróforo puede después emitir fluorescencia cuando se ilumina mediante excitación lumínica adecuada. Según avanza la PCR, el producto de 40 amplificación se acumula y la cantidad de fluorescencia en cualquier ciclo determinado depende de la cantidad del producto de amplificación presente en ese momento. (Véase, por ejemplo, Sanjay Tyagi and Fred Russell Kramer, Nature Biotechnology 1996, vol.14, pags. 303-308; Nature Biotechnology 1998, vol.16, pags. 49-53).

45 (Observación: También es posible unir el fluoróforo en el extremo 3', mientras que el extintor se fija al extremo 5'). Esquemáticamente, dicha sonda puede tener la siguiente fórmula (formato de sonda fluorescente):

5' Fluoróforo-(brazo1)-sonda-(brazo2)-Extintor 3'

5' Extintor-(brazo1)-sonda-(brazo2)-Fluoróforo 3'

50 en la que el brazo 1 y el brazo 2 puede ser cualquier secuencia corta de nucleótidos, por ejemplo en el intervalo de 3-10 nucleótidos, preferiblemente 5, 6, 7 nucleótidos, que permita la formación de la estructura en horquilla en condiciones rigurosas adecuadas, es decir, el brazo1 y el brazo2 son totalmente complementarios para hibridarse en las condiciones rigurosas deseadas (las condiciones rigurosas de la PCR convencional incluyen, por ejemplo, una temperatura de hibridación de 55 a 65°C y una concentración de Mg de 4 a 8 mM). Sin embargo, el brazo1 y el brazo2 no están asociados a la secuencia diana de la sonda, es decir la conformación en horquilla que resulta de la hibridación entre el brazo1 y el brazo2 es esencialmente la única estructura secundaria posible para la sonda cuando no se encuentra hibridada. El especialista en la técnica sabría como elegir dichos brazos para una sonda determinada.

60 Por ejemplo, los formatos posibles de sondas fluorescentes incluyen:

TGCGC-(secuencia de sonda)-GCGCA

65 GCGCA-(secuencia de sonda)-TGCGC

AGCGC-(secuencia de sonda)-GCGCT

## ES 2 336 807 T3

GCGCT-(secuencia de sonda)-AGCGC

CGCGA-(secuencia de sonda)-TCGCG

5 CGCGC-(secuencia de sonda)-GCGCG.

Por fluoróforo, se entiende en este documento cualquier marcador/colorante fluorescente conocido en la técnica. Los ejemplos de dichos marcadores fluorescentes adecuados incluyen colorantes Fam, Hex, Tet, Joe, Rox, Tamra, Max, Edans, Cy tales como Cy5, Fluoresceína, Coumarina, Eosina, Rodamina, Bodipy, Alexa, Azul Cascade, Amarillo Yakima, Amarillo Lucifer y Rojo Texas (todos son Marcas Registradas).

Por extintor, se entiende en este documento cualquier extintor conocido en la técnica. Los ejemplos de dichos extintores incluyen Dabcyl, Dark Quencher, Eclipse Dark Quencher, ElleQuencher, Tamra, BHQ y QSY (todos son Marcas Registradas).

El especialista en la técnica sabría que combinaciones de colorante/extintor son adecuadas cuando se diseña una sonda.

20 En una realización preferida de acuerdo con la invención, pueden seleccionarse propiedades espectrales de dichas sondas para no interferir una con respecto a la otra. En particular, cuando las sondas se usan en PCR múltiples, cada sonda única puede tener su propio fluoróforo siendo significativamente diferentes entre sí con respecto a las propiedades espectrales, es decir, los espectros de absorción/emisión son esencialmente no-solapantes. Esto permite de manera ventajosa la detección múltiple de baja interferencia para todas las sondas únicas, asegurando que las señales individuales no interfieran unas con otras en la detección. Los ejemplos de colorantes que pueden usarse juntos en PCR 25 múltiples incluyen Fam con Tamra, Fam con Tamra con Rojo Texas.

De acuerdo con la invención, todos los oligonucleótidos proporcionados pueden conservarse por separado, o mezclarse parcial o totalmente.

30 Dichos oligonucleótidos pueden proporcionarse en forma seca, o disueltos en un disolvente adecuado, a criterio del especialista en la técnica. Los disolventes adecuados incluyen TE, agua de calidad para PCR y similares.

Posteriormente, las secuencias se identifican mediante una SEC ID N°:

35 Las secuencias correspondientes se proporcionan en las tablas en las figuras adjuntas a ellas. En dichas tablas, se usa el código convencional para nucleótidos degenerados.

En particular: R es G o A; Y es C o T; W es A o T.

40 En las secuencias proporcionadas, donde diversas posiciones son degeneradas, los especialistas en la técnica tienen claro que cada posición degenerada se puede elegir de manera independiente una con respecto a la otra. Por ejemplo, RY puede ser GC, GT, AC, AT, combinaciones y mezclas de las mismas. Por tanto, la SEC ID N°: 52 puede ser una cualquiera de las SEC ID N°: 25 a 51 (véase tabla) o combinaciones o mezclas de las mismas, etc.

45 Además, en dichas tablas, d indica un oligonucleótido degenerado; e indica un oligonucleótido ampliado (es decir la versión alargada de otro oligonucleótido); y l indica un oligonucleótido en bucle.

50 Por oligonucleótido en bucle, en este documento se entiende cualquier oligonucleótido, cuyo extremo 5' se ha modificado añadiendo algunos nucleótidos (generalmente 3, 4, 5, 6 ó 7 nt) para ser complementario al extremo 3' de dicho cualquier nucleótido. Por tanto, dicho oligonucleótido en bucle tiene la característica ventajosa de poder adoptar una conformación en bucle en determinadas condiciones rigurosas. Esta propiedad es extremadamente ventajosa aumentando la especificidad y la sensibilidad en un protocolo de PCR, en particular en un protocolo múltiple, evitando interacciones entre cebadores, o entre cebadores sondas.

55 La presente invención proporciona un proceso para la detección del VIH como se define en las reivindicaciones. En un aspecto, la invención proporciona un proceso para la detección de al menos una diana del VIH, que comprende la etapa de producir al menos un amplión mediante al menos dos oligonucleótidos,

60 en el que dichos oligonucleótidos son adecuados para usar en la amplificación específica de al menos una secuencia molde de referencia seleccionada del grupo que consiste en:

65 - las posiciones 4281-4436 (SEC ID N°: 2) del aislado de referencia K03455 VIH1-M; y los fragmentos de la SEC ID N°: 2 seleccionados de las posiciones 4281-4429 (SEC ID N°: 306), 4283-4429 (SEC ID N°: 307), 4283-4431 (SEC ID N°: 308) de dicho aislado VIH1-M;

## ES 2 336 807 T3

- las posiciones 4336-4491 (SEC ID N°: 4) del aislado de referencia L20587 VIH1-O y los fragmentos de la SEC ID N°: 4 seleccionados de las posiciones 4336-4484 (SEC ID N°: 310), 4338-4484 (SEC ID N°:311) de dicho aislado VIH1-O;
- 5 - las posiciones 4889-5036 (SEC ID N°: 5) del aislado de referencia M30502 VIH2;
- las posiciones 4176-4436 (SEC ID N°: 1) del aislado de referencia K03455 VIH1-M y el fragmento de la SEC ID N°: 1 que es idéntico a las posiciones 4176-4429 (SEC ID N°: 305) de dicho aislado VIH1-M; y
- 10 - las posiciones 4231-4491 (SEC ID N°: 3) del aislado de referencia L20587 VIH1-O y el fragmento de la SEC ID N°:3 que es idéntico a las posiciones 4231-4484 (SEC ID N°: 309) de dicho aislado VIH1-O.

15 Por lo tanto, las secuencias molde de referencia corresponden a fragmentos aislados de un determinado aislado del VIH (es decir el fragmento que es idéntico a la secuencia que se amplía a partir de las posiciones indicadas). Los oligonucleótidos adecuados para usar en la amplificación específica de al menos dicha secuencia molde de referencia se seleccionan por lo tanto para conducir esta secuencia molde de referencia, a un emplazamiento tal que conduciría a la amplificación de esta secuencia molde de referencia en forma de fragmentos aislados.

20 En otro aspecto, se proporciona un proceso para la detección de al menos una diana del VIH, que comprende la etapa de producir al menos un amplicón mediante al menos dos oligonucleótidos,

25 en el que dichos oligonucleótidos son cebadores “compatibles para protocolos cuantitativos” y/o “compatibles para protocolos múltiples” que son adecuados para usar en la amplificación específica de al menos una secuencia molde de referencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 30 - las posiciones 4281 -4436 (SEC ID N°: 2) del aislado de referencia K03455 VIH1-M y los fragmentos de la SEC ID N°: 2 seleccionados de las posiciones 4281-4429, 4283-4429, 4283-4431 de dicho aislado VIH1-M (SEC ID N°: 306, 307 y 308);
- las posiciones 4336-4491 (SEC ID N°: 4) del aislado de referencia L20587 VIH1-O y los fragmentos de la SEC ID N°: 4 seleccionados de las posiciones 4336-4484, 4338-4484 de dicho aislado VIH1-O (SEC ID N°: 310 y 311);
- 35 - las posiciones 4889-5036 (SEC ID N°: 5) del aislado de referencia M30502 VIH2;
- las posiciones 4176-4436 (SEC ID N°: 1) del aislado de referencia K03455 VIH1-M y el fragmento de la SEC ID N°: 1 que es idéntico a las posiciones 4176-4429 (SEC ID N°: 305) de dicho aislado VIH1-M; y
- 40 - las posiciones 4231-4491 (SEC ID N°: 3) del aislado de referencia L20587 VIH1-O, y el fragmento de la SEC ID N°: 3 que es idéntico a las posiciones 4231-4484 (SEC ID N°: 309) de dicho aislado VIH1-O.

45 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para detección de al menos una diana del VIH, que comprende la amplificación de al menos una secuencia molde de referencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 50 - las posiciones 4281-4436 (SEC ID N°: 2) del aislado de referencia K03455 VIH1-M y los fragmentos de la SEC ID N°: 2 seleccionados de las posiciones 4281-4429, 4283-4429, 4283-4431 de dicho aislado VIH1-M;
- las posiciones 4336-4491 (SEC ID N°: 4) del aislado de referencia L20587 VIH1-O y los fragmentos de la SEC ID N°: 4 seleccionado de las posiciones 4336-4484, 4438-4484 de dicho aislado VIH1-O;
- 55 - las posiciones 4889-5036 (SEC ID N°: 5) del aislado de referencia M30502 VIH2;
- las posiciones 4176-4436 (SEC ID N°: 1) del aislado de referencia K03455 VIH1-M y el fragmento de la SEC ID N°: 1 que es idéntico a las posiciones 4176-4429 de dicho aislado VIH1-M; y
- 60 - las posiciones 4231-4491 (SEC ID N°: 3) del aislado de referencia L20587 VIH-O y el fragmento de la SEC ID N°: 3 que es idéntico a las posiciones 4231-4484 de dicho aislado de VIH1-O.

65 En una realización preferida, dicho proceso comprende la etapa de detectar dicho amplicón mediante al menos una sonda.

Los especialistas en la técnica conocen el término amplicón. Por amplicón, se entiende en este documento cualquier producto de amplificación.

## ES 2 336 807 T3

La amplificación se conoce en la técnica, y puede ser cualquier proceso que implique al menos una etapa de amplificación, en particular al menos una PCR o una etapa de amplificación basada en PCR.

5 Por oligonucleótido “compatible para protocolos múltiples” se entiende en este documento cualquier oligonucleótido que puede usarse satisfactoriamente en un protocolo (PCR) múltiple. En particular, los oligonucleótidos “compatibles para protocolos múltiples” permiten resultados específicos y sensibles en un protocolo múltiple.

10 Por oligonucleótido “compatible para protocolos cuantitativos”, se entiende en este documento cualquier oligonucleótido que puede usarse satisfactoriamente protocolo (PCR) cuantitativo. En particular, los oligonucleótidos “compatibles para protocolos cuantitativos” permiten resultados específicos, sensibles y cuantitativos.

En este documento, una secuencia complementaria a otra secuencia, se refiere a una secuencia que es complementaria a dicha otra secuencia a lo largo de la longitud completa de esa otra secuencia.

15 Aunque el proceso de acuerdo con la presente descripción puede realizarse ventajosamente en el armazón de un protocolo múltiple, evidentemente también puede realizarse como un protocolo simple, por ejemplo un protocolo de punto final o cualitativo simple.

20 Por secuencia molde de referencia, como se usa en este documento se entiende cualquier secuencia molde que puede usarse como una referencia para el alineamiento. Por ejemplo, algunos genomas se consideran como genomas de referencia. El alineamiento secuencial se conoce en la técnica. Ventajosamente de acuerdo con la invención, las SEC ID N°: 1 a 5 y los fragmentos de las mismas mencionados anteriormente son secuencias molde de referencia que comparten la característica técnica específica de ser referencias adecuadas para construir y producir cebadores que permiten una detección cuantitativa de al menos uno de los subtipos del VIH1-M, VIH1-O, VIH2-A y VIH2-B. 25 Dichas secuencias molde de referencia son referencias adecuadas para construir y producir cebadores que permiten:

- una detección cuantitativa en tiempo real de al menos uno de dichos subtipos del VIH,
- una detección múltiple de al menos uno de dichos subtipos del VIH,
- 30 - una detección múltiple cuantitativa en tiempo real de al menos uno de dichos subtipos del VIH.

35 Las secuencias molde de referencia de dicha invención comprenden notablemente las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en:

- las posiciones 4176-4436 (SEC ID N°: 1) del aislado de referencia K03455 VIH1-M y los fragmentos de la SEC ID N°: 1 seleccionados de las posiciones 4281-4436 (SEC ID N°: 2), 4281-4429, 4283-4429, 4283-4431 y 4176-4429 de dicho aislado de referencia K03455 VIH1-M;
- 40 - las posiciones 4231-4491 (SEC ID N°: 3) del aislado de referencia L20587 VIH1-O y los fragmentos de la SEC ID N°: 3 seleccionados de las posiciones 4336-4491 (SEC ID N°: 4), 4336-4484, 4338-4484 y 4231-4484 de dicho aislado de referencia L20587 VIH1-O;
- 45 - las posiciones 4889-5036 (SEC ID N°: 5) del aislado de referencia M30502 VIH2.

50 Por tanto, el proceso de acuerdo con la descripción permite ventajosamente la detección específica y sensible de los principales grupos y/o tipos y/o subtipos del VIH y posiblemente prácticamente cualquiera de los grupos y/o tipos y/o subtipos del VIH, mediante un protocolo de amplificación cuantitativo en tiempo real y/o múltiple. Los ejemplos de dichos grupos y/o tipos y/o subtipos incluidos mediante el proceso de acuerdo con la presente invención incluyen los subtipos A (A1 y A2), B, C, D, F (F1 y F2), G, H, J y K del VIH1-M, pero también las formas recombinantes AE, AG, AB, DF, BC, CD, BF y BG, y también U (muy divergente). Ejemplos adicionales de los mismos comprenden los subtipos A, B del VIH2.

55 La invención por tanto proporciona un proceso de detección del VIH por amplificación de ácidos nucleicos que:

- puede ser específica de grupo y/o tipo y/o subtipo,
- 60 - es cuantitativa y más particularmente permite una detección cuantitativa del VIH en tiempo real,
- puede implementarse en un protocolo múltiple permaneciendo específica e incluso puede implementarse en un protocolo de amplificación múltiple cuantitativa (posiblemente en tiempo real).

65 Por tanto, el proceso de acuerdo con la invención puede facilitar ventajosamente procedimientos de diagnóstico diferenciando los grupos VIH1-M y VIH1-O del grupo VIH2 e incluyendo un espectro muy amplio de tipos y/o subtipos del VIH usando un sólo procedimiento.

## ES 2 336 807 T3

En un aspecto de la invención, dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 2, del aislado de referencia K03455 VIH1-M o un fragmento de la SEC ID N°: 2 seleccionado de las posiciones 4281-4429, 4283-4429, 4283-4431.

5

En una realización, dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 2, del aislado de referencia K03455 VIH1-M de uno de dichos fragmentos de la SEC ID N°: 2, y dicho proceso se realiza con al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- 10
- SEC ID N°: 9, 12, 14, 15, 24, 52, 82, 91, 100, 109, 118, 127, 136, y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 91, 100, 109, 118; 127, 136 a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:

En una realización preferida dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

15

- SEC ID N°: 9, 12, 14, 15, 24, 52, 82.

En otra realización, dicho proceso se realiza con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

20

- SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136, y las secuencias complementarias de las mismas.

En una realización más preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

25

- SEC ID N°: 9, 12, 14, 15;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

30

- SEC ID N°: 24, 52, 82.

En una realización aún más preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

35

- SEC ID N°: 9, 12, 14, 15;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

40

- SEC ID N°: 24, 52, 82;

y, opcionalmente, con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

45

- SEC ID N°: 91, 100, 109, 110, 118, 127, 136, y las secuencias complementarias de las mismas.

Por tanto las posibles combinaciones de cebadores (pares de cebadores) son las siguientes:

50

SEC ID N°:	9	12	14	15
24	X	X	X	X
52	X	X	X	X
82	X	X	X	X

55

donde X indica que los cebadores pueden combinarse entre sí como un par y que cada par de cebadores puede además usarse en combinación con una cualquiera de las sondas seleccionadas del grupo que consiste en:

60

- SEC ID N°: 91, 100, 109, 110, 118, 127, 136, y las secuencias complementarias de las mismas.

65

En otro aspecto de la invención, dicha secuencia molde de referencia es SEC ID N°: 4, del aislado de referencia L20587 VIH-O o un fragmento de la SEC ID N°: 4 seleccionado de 4336-4484, 4338-4484.

## ES 2 336 807 T3

En una realización de la invención, dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 4, del aislado de referencia L20587 VIH1-O o uno de dichos fragmentos de la SEC ID N°: 4 y dicho proceso se realiza con al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- 5           - SEC ID N°: 148, 157, 167, 170, 179, 189, 190 a 194 y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 190 a 194 a lo largo de la longitud completa de esta SEC ID N°:

En una realización preferida, dicho proceso puede realizarse con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- 10           - SEC ID N°: 148, 157, 167, 170, 179, 189.

En otra realización, dicho proceso se realiza con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- 15           - SEC ID N°: 190 a 194 y las secuencias complementarias de las mismas.

En una realización más preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- 20           - SEC ID N°: 148, 157, 167;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- 25           - SEC ID N°: 170, 179, 189.

En una realización aún más preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- 30           - SEC ID N°: 148, 157, 167;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- 35           - SEC ID N°: 170, 179, 189;

y, opcionalmente, con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- 40           - SEC ID N°: 190 a 194, y las secuencias complementarias de las mismas.

Por tanto las posibles combinaciones de cebadores (pares de cebadores) son las siguientes:

45

SEC ID N°:	148	157	167
170	X	X	X
179	X	X	X
189	X	X	X

50

donde X indica que los cebadores pueden combinarse entre sí como un par y que cada par de cebadores puede además usarse en combinación con una cualquiera de las sondas seleccionadas del grupo que consiste en:

- 55           - SEC ID N°: 190, 191, 192, 193, 194, y las secuencias complementarias de las mismas.

En otro aspecto de la invención, dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 5, del aislado de referencia M30502 VIH2.

En una realización de la invención, dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 5, del aislado de referencia M30502 VIH2 y dicho proceso se realiza con al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- 65           - SEC ID N°: 221, 249, 276, 287, 296, 297 a 303, y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 297 a 303 a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:

## ES 2 336 807 T3

En una realización preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 221, 249, 276, 287, 296.

En otra realización, dicho proceso se realiza con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 297 a 303, y las secuencias complementarias de las mismas.

En una realización más preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 221, 249;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 276, 287, 296.

En una realización aún más preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 221, 249;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 276, 287, 296;

y, opcionalmente, con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 297 a 303 y las secuencias complementarias de las mismas.

Por tanto las posibles combinaciones de cebadores (pares de cebadores) son las siguientes:

SEC ID N°:	221	249
276	X	X
287	X	X
296	X	X

donde X indica que los cebadores pueden combinarse entre sí como un par y que cada par de cebadores puede además usarse en combinación con una cualquiera de las sondas seleccionadas del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, y las secuencias complementarias de las mismas.

En otro aspecto de la invención, dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 1, del aislado de referencia K03455 VIH1-M o el fragmento de la SEC ID N°: 1 que es idéntico a las posiciones 4176-4429 de dicho aislado de referencia K03455 VIH1-M.

En una realización de la invención, dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 1, del aislado de referencia K03455 VIH1-M o dicho fragmento de la misma y dicho proceso se realiza con al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 6, 24, 52, 82, 91, 100, 109, 118, 127, 136, y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136, a lo largo de la longitud completa de esta SEC ID N°:

## ES 2 336 807 T3

En una realización preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 6, 24, 52, 82.

En otra realización, dicho proceso se realiza con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136 y las secuencias complementarias de las mismas.

En una realización más preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado que es:

- SEC ID N°: 6;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 24, 52, 82.

En una realización aún más preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado que es:

- SEC ID N°: 6;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 24, 52, 82;

y opcionalmente, con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136 y las secuencias complementarias de las mismas.

Por tanto las posibles combinaciones de cebadores (pares de cebadores) son las siguientes:

SEC ID N°:	24	52	82
6	X	X	X

donde X indica que los cebadores pueden combinarse entre sí como un par y que cada par de cebadores puede además usarse en combinación con una cualquiera de las sondas seleccionadas del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136, y las secuencias complementarias de las mismas.

En otro aspecto de la invención, dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°:31, del aislado de referencia L20587 VIH1-O o el fragmento de la SEC ID N°: 3 que es idéntico a las posiciones 4231-4484 de dicho aislado de referencia L20587 VIH1-O.

En una realización de la invención, dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 3, del aislado de referencia L20587 VIH1-O o dicho fragmento de la misma y dicho proceso se realiza con al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 139, 170, 179, 189, 190 a 194, y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 190 a 194 a lo largo de la longitud completa de esta SEC ID N°:

En una realización preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 139, 170, 179, 189.

## ES 2 336 807 T3

En otra realización, dicho proceso se realiza con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 190 a 194 y las secuencias complementarias de las mismas.

5

En una realización más preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador que es:

- SEC ID N°: 139;

10 y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 170, 179, 189.

15 En una realización aún más preferida, dicho proceso se realiza con al menos un cebador que es:

- SEC ID N°: 139;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

20

- SEC ID N°: 170, 179, 189;

y, opcionalmente, con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

25

- SEC ID N°: 190 a 194, y las secuencias complementarias de las mismas.

Por tanto las posibles combinaciones de cebadores (pares de cebadores) son las siguientes:

30

SEC ID N°:	170	179	189
139	X	X	X

35

donde X indica que los cebadores pueden combinarse entre sí como un par y que cada par de cebadores puede además usarse en combinación con una cualquiera de las sondas seleccionadas del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 190, 191, 192, 193, 194, y las secuencias complementarias de las mismas.

40

En un aspecto de la invención, dicha etapa de producir al menos un amplicón comprende al menos una amplificación PCR cuantitativa y/o cualitativa, múltiple y/o simple.

45

En otro aspecto de la invención, dicha etapa de detección incluye preferiblemente detección en tiempo real y/o cuantitativa y/o de punto final.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un amplicón que puede obtenerse mediante el proceso descrito anteriormente, es decir realizando el proceso de la invención en una muestra que contiene el VIH.

50

En un aspecto adicional, se proporciona una composición de amplificación que comprende al menos un amplicón de acuerdo con la invención. Por composición de amplificación, se entiende en este documento cualquier composición que puede obtenerse por amplificación, especialmente por PCR.

55

La invención también se refiere a un polinucleótido adecuado para el uso como una secuencia molde de referencia en el diseño de cebadores que pueden usarse en protocolos múltiples para incluir al menos el VIH1-M, VIH1-O, VIH2-A y VIH2-B en un único proceso de amplificación al mismo tiempo que se ofrece una amplificación cuantitativa en tiempo real de la misma. Desde luego, los polinucleótidos de acuerdo con la presente invención también son adecuados para protocolos adicionales, que incluyen protocolos simples, protocolos múltiples, protocolos de punto final, protocolos cualitativos, protocolos cuantitativos, combinaciones de los mismos y similares.

60

Por polinucleótido, se entiende en este documento cualquier polímero de nucleótidos, en el que los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos; di desoxirribonucleótidos, nucleótidos degenerados y similares. Dichos nucleótidos son preferiblemente monocatenarios, pero también pueden ser bicatenarios. La longitud de dichos polinucleótidos puede variar y habitualmente es menor de 500 nucleótidos (nt), preferiblemente en el intervalo de 50-400 nt, más preferiblemente 100-300 nt, incluso más preferiblemente 150-250 nt.

65

## ES 2 336 807 T3

En una realización preferida, dicho polinucleótido molde de referencia es:

- las posiciones 4281-4436 (SEC ID N°: 2) del aislado de referencia K03455 VIH1-M (véase la Figura 7) o un fragmento de la SEC ID N°: 2 seleccionada de 4281-4429, 4283-4429, 4283-4431.

5

En otra realización, dicho polinucleótido molde de referencia es:

- las posiciones 4336-4491 (SEC ID N°: 4) del aislado de referencia L20587 VIH1-O (véase la Figura 7) o un fragmento de la SEC ID N°: 4 seleccionado de 4336-4484, 4338-4484.

10

En otra realización, dicho polinucleótido molde de referencia es:

- las posiciones 4889-5036 (SEC ID N°: 5) del aislado de referencia M30502 VIH2 (véase la Figura 7).

15

Incluso en otra realización, dicho polinucleótido molde de referencia es:

- las posiciones 4176-4436 (SEC ID N°: 1) del aislado de referencia K03455 VIH1-M (véase la Figura 7) o el fragmento de la SEC ID N°: 1 que es idéntico a las posiciones 4176-4429 de dicho aislado K03455 VIH1-M.

20

En una realización adicional, dicho polinucleótido molde de referencia es:

- las posiciones 4231-4491 (SEC ID N°: 3) del aislado de referencia L20587 VIH1-O (véase la Figura 7) o el fragmento de la SEC ID N°: 3 que es idéntico a las posiciones 4231-4484 de dicho aislado L20587 VIH1-O.

25

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un oligonucleótido adecuado para la detección de VIH: véanse las Figuras 7 a 21.

En una realización, la invención proporciona un oligonucleótido que se selecciona del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 6 a 304, y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 83-138, 190-194, 297-304 a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:

30

En una realización preferida la invención proporciona un oligonucleótido que se selecciona del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 6, 9, 12, 14, 15, 24, 52, 82, 91, 100, 109, 118, 127, 136, 139, 148, 157, 167, 170, 179, 189, 190 a 194, 221, 249, 276, 287, 296, 297 a 303, y

35

- las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136, 190, 191, 192, 193, 194, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:

40

En un aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido que es adecuado para la detección de VIH1-M y que se selecciona del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 6, 9, 12, 14, 15, 24, 52, 82, 91, 100, 109, 118, 127, 136 y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136 a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:

45

En otro aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido que es adecuado para la detección de VIH1-O y que se selecciona del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 139, 148, 157, 167, 170, 179, 189, 190 a 194, y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 190-194, a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:

50

Aun en otro aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido que es adecuado para la detección de VIH2-A y que se selecciona del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 221, 249, 276, 287, 296, 297 a 299, y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 297-299, a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:

55

## ES 2 336 807 T3

En otro aspecto más, la invención proporciona un oligonucleótido que es adecuado para la detección de VIH2-B y que se selecciona del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 221, 249, 276, 287, 296, 300 a 303, y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 300-303, a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:

Por favor obsérvese que secuencias tales como la SEC ID N°: 9 o la SEC ID N: 12 son secuencias degeneradas. La SEC ID N°: 9 con R=A es idéntica a la SEC ID N°: 8; la SEC ID N°: 12 con R=A es idéntica a la SEC ID N°: 11.

En otro aspecto, la invención proporciona lo siguientes oligonucleótidos que son adecuados para los usos indicados:

posible uso	SEC ID N°:
cebador directo VIH1-M	6-15
cebador inverso VIH1-M	16-82
sonda VIH1-M	83-138 (+secuencias complementarias de las mismas)
cebador directo VIH1-O	139-167
cebador inverso VIH1-O	168-189
sonda VIH1-O	190-194 (+secuencias complementarias de las mismas)
cebador directo VIH2	195-249
cebador inverso VIH2	250-296
sonda VIH2-A	297-299 (+secuencias complementarias de las mismas)
sonda VIH2-B	300-303 (+secuencias complementarias de las mismas)

En un aspecto adicional, la invención proporciona los siguientes oligonucleótidos, que son adecuados para los usos indicados:

posible uso	SEC ID N°:
cebador directo VIH1-M	6,9,12,14,15
cebador inverso VIH1-M	24, 52, 82
sonda VIH1-M	91, 100, 109, 118, 127, 136 (+secuencias complementarias de las mismas)
cebador directo VIH1-O	139, 148, 157, 167
cebador inverso VIH1-O	170, 179, 189
sonda VIH1-O	190 a 194 (+secuencias complementarias de las mismas)
cebador directo VIH2	221,249
cebador inverso VIH2	276, 287, 296
sonda VIH2-A	297 a 299 (+secuencias complementarias de las mismas)
sonda VIH2-B	300 a 303 (+secuencias complementarias de las mismas)

## ES 2 336 807 T3

En una realización preferida, se proporcionan los siguientes oligonucleótidos:

5	posible uso	SEC ID N°:
	cebador directo de bucle VIH1-M	14, 15
10	cebador inverso de bucle VIH1-M	82
15	sonda beacon VIH1-M	100, 109, 127, 136 (+secuencias complementarias de las mismas)
	cebador directo de bucle VIH1-O	167
20	cebador inverso de bucle VIH1-O	189
25	sonda beacon VIH1-O	191, 192, 194 (+secuencias complementarias de las mismas)
	cebador directo de bucle VIH2	249
	cebador inverso de bucle VIH2	287, 296
30	sonda beacon VIH2-A	298-299 (+secuencias complementarias de las mismas)
35	sonda beacon VIH2-B	301-303 (+secuencias complementarias de las mismas)

En una realización preferida, cualquier nucleótido de acuerdo con la invención puede marcarse con fluorescencia.

En otro aspecto, la invención proporciona un conjunto de oligonucleótidos adecuados para la detección de VIH.

En una realización, la invención proporciona un conjunto de oligonucleótidos adecuados para la detección de VIH1-M.

En una realización preferida, la invención proporciona un conjunto de nucleótidos adecuados para la detección de VIH1-M que comprende:

- al menos un oligonucleótido (cebador) seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 6, 9, 12, 14, 15; y/o
- al menos un oligonucleótido (cebador) seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 24, 52, 82; y/o
- al menos un oligonucleótido (sonda) seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136, y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136, a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:

Por tanto las posibles combinaciones de oligonucleótidos son las siguientes:

60	SEC ID N°:	6	9	12	14	15
	24	X	X	X	X	X
65	52	X	X	X	X	X
	82	X	X	X	X	X

## ES 2 336 807 T3

donde X indica que los oligonucleótidos pueden combinarse entre sí como un par (par de cebadores) y que cada par de cebadores puede usarse además en combinación con uno cualquiera de los oligonucleótidos (sondas) seleccionados del grupo que consiste en:

- 5 - SEC ID N°: 91, 100, 109, 110, 118, 127, 136, y las secuencias complementarias de las mismas.

En un aspecto adicional, se proporciona un conjunto de oligonucleótidos adecuado para la detección de VIH1-O.

10 En una realización preferida, se proporciona un conjunto de nucleótidos adecuados para la detección de VIH1-O, que comprende:

- al menos un oligonucleótido (cebador) seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 139, 148, 157, 167; y/o
- 15 - al menos un oligonucleótido (cebador) seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 170, 179, 189; y/o
- al menos un oligonucleótido (sonda) seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 190 a 194, y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 190-194, a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:
- 20

Por tanto las posibles combinaciones de oligonucleótidos son las siguientes:

25

SEC ID N°:	170	179	189
139	X	X	X
148	X	X	X
157	X	X	X
167	X	X	X

30

35 donde X indica que los oligonucleótidos pueden combinarse entre sí como un par (par de cebadores) y que cada par de cebadores puede usarse además en combinación con uno cualquiera de los oligonucleótidos (sondas) seleccionados del grupo que consiste en:

- 40 - SEC ID N°: 190, 191, 192, 193, 194, y las secuencias complementarias de las mismas.

En un aspecto adicional, se proporciona un conjunto de oligonucleótidos adecuados para la detección de VIH2-A.

45 En una realización preferida, se proporciona un conjunto de oligonucleótidos adecuados para la detección de VIH2-A, que comprende:

- al menos un oligonucleótido (cebador) seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 221, 249; y/o
- 50 - al menos un oligonucleótido (cebador) seleccionado del grupo que consiste las SEC ID N°: 276, 287, 296; y/o
- al menos un oligonucleótido (sonda) seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 297 a 299 y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 297-299 a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:
- 55

Por tanto las posibles combinaciones de oligonucleótidos son las siguientes:

60

SEC ID N°:	221	249
276	X	X
287	X	X
296	X	X

65

## ES 2 336 807 T3

donde X indica que los oligonucleótidos pueden combinarse entre sí como un par (par de cebadores) y que cada par de cebadores puede usarse además en combinación con uno cualquiera de los oligonucleótidos (sondas) seleccionados del grupo que consiste en:

- 5           - SEC ID N°: 297, 298, 299 y las secuencias complementarias de las mismas.

En un aspecto adicional, se proporciona un conjunto de oligonucleótidos adecuados para la detección de VIH2-B.

10           En una realización preferida, se proporciona un conjunto de oligonucleótidos adecuados para la detección de VIH2-B, que comprende:

- 15           - al menos un oligonucleótido (cebador) seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 221, 249; y/o
- al menos un oligonucleótido (cebador) seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 276, 287, 296; y/o
- 20           - al menos un oligonucleótido (sonda) seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 300 a 303, y las secuencias que son complementarias a una de las SEC ID N°: 300-303, a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°:

25           Por tanto las posibles combinaciones de oligonucleótidos son las siguientes:

30

SEC ID N°:	221	249
276	X	X
287	X	X
296	X	X

35

donde X indica que los oligonucleótidos pueden combinarse entre sí como un par (par de cebadores) y que cada par de cebadores puede usarse además en combinación con uno cualquiera de los oligonucleótidos (sondas) seleccionados del grupo que consiste en:

- 40           - SEC ID N°: 300, 301, 302, 303, y las secuencias complementarias de las mismas.

45           En un aspecto adicional, se proporciona un conjunto de oligonucleótidos adecuados para la detección múltiple del VIH.

En una realización preferida, se proporciona un conjunto de oligonucleótidos adecuados para la detección del VIH, preferiblemente detección múltiple, que comprende:

- 50           - al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136, y las secuencias complementarias de las mismas; y/o
- 55           - al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 190 a 194, y las secuencias complementarias de las mismas; y/o
- al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 297 a 299, y las secuencias complementarias de las mismas; y/o
- 60           - al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID N°: 300 a 303, y las secuencias complementarias de las mismas; y/o
- combinaciones de las mismas.

65           Dicho conjunto de oligonucleótidos de acuerdo con la invención puede por tanto comprender cualquier combinación de los mismos de 2, 3, 4, 5 y más de dichos oligonucleótidos.

## ES 2 336 807 T3

En una realización preferida, dicho conjunto de oligonucleótidos puede ser una combinación de sondas, por ejemplo una combinación de una sonda VIH1-M y una sonda VIH1-O:

SEC ID N°:	91	100	109	118	127	136
190	X	X	X	X	X	X
191	X	X	X	X	X	X
192	X	X	X	X	X	X
193	X	X	X	X	X	X
194	X	X	X	X	X	X
(X= posible combinación, opcionalmente con cualquier sonda (o sondas) adicional, por ejemplo sondas VIH2-A o VIH2-B)						

En otra realización, dicho conjunto de oligonucleótidos puede ser una combinación de sondas, por ejemplo una combinación de una sonda VIH2-A y una sonda VIH2-B:

SEC ID N°:	297	298	299
300	X	X	X
301	X	X	X
302	X	X	X
303	X	X	X
(X= posible combinación, opcionalmente con cualquier sonda (o sondas) adicional, por ejemplo sondas VIH1-M o VIH1-O)			

Otras posibilidades incluyen:

SEC ID N°:	91	100	109	118	127	136
297	X	X	X	X	X	X
298	X	X	X	X	X	X
299	X	X	X	X	X	X
300	X	X	X	X	X	X
301	X	X	X	X	X	X
302	X	X	X	X	X	X
303	X	X	X	X	X	X
(X= posible combinación, opcionalmente con cualquier sonda (o sondas) adicional, por ejemplo para VIH1-O)						

y

## ES 2 336 807 T3

SEC ID N°:	190	191	192	193	194
297	X	X	X	X	X
298	X	X	X	X	X
299	X	X	X	X	X
300	X	X	X	X	X
301	X	X	X	X	X
302	X	X	X	X	X
303	X	X	X	X	X
(X= posible combinación, opcionalmente con cualquier sonda (o sondas) adicional, por ejemplo para VIH1-M)					

En una realización preferida, en cualquier conjunto de nucleótidos de acuerdo con la invención, al menos uno de dicho oligonucleótidos está marcado con fluorescencia.

Se proporciona adicionalmente un amplicon que puede obtenerse mediante al menos un oligonucleótido de acuerdo con la invención y/o al menos conjunto de nucleótidos de acuerdo con la invención.

Se proporciona más particularmente un amplicon que puede obtenerse por amplificación de una muestra que contiene el VIH con un par de cebadores seleccionados de:

- un cebador de las SEC ID N°: 9, 12, 14 ó 15, y un cebador de las SEC ID N°: 24, 52 ó 82; o
- un cebador de las SEC ID N°: 148, 157 ó 167, y un cebador de las SEC ID N°: 170, 179 ó 189; o
- un cebador de las SEC ID N°: 221 ó 249, y un cebador de las SEC ID N°: 276, 287 ó 296; o
- un cebador de las SEC ID N°: 6, y un cebador de las SEC ID N°: 24, 52 ó 82; o
- un cebador de las SEC ID N°: 139, y un cebador de las SEC ID N°: 170, 179 ó 189.

También se proporciona un amplicon que tiene un longitud de nucleótidos idéntica a la longitud de nucleótidos de una de las secuencias moldes de referencia de la invención (es decir las SEC ID N°: 2, 4, 5, 1 ó 3 y los fragmentos de las mismas mencionados anteriormente) y que comprende una secuencia que tiene un porcentaje de identidad de nucleótidos de al menos el 90%, preferiblemente al menos el 91%, más preferiblemente al menos el 92%, más preferiblemente al menos el 93%, más preferiblemente al menos el 94%, más preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 96%, más preferiblemente al menos el 97%, más preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente al menos el 99%, más preferiblemente del 100%, con una secuencia sonda, a lo largo de la longitud completa de esta secuencia sonda, en la que esta secuencia sonda es una de las siguientes: SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136, 190, 191, 192, 193, 194, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, y las secuencias que son complementarias a estas SEC ID N°: a lo largo de la longitud completa de estas SEC ID N°.

En la presente invención también se incluye una composición de amplificación que comprende un amplicón de este tipo.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un kit. En una realización preferida, dicho kit comprende al menos un oligonucleótido (cebador o sonda) de acuerdo con la invención, como se describe anteriormente.

En otra realización, dicho kit comprende al menos un par de cebadores de acuerdo con la invención, como se describe anteriormente.

En otra realización más, dicho kit comprende al menos un conjunto de oligonucleótidos de acuerdo con la descripción, por ejemplo al menos una pluralidad de sondas de acuerdo con la invención, como se describe anteriormente.

En el kit de acuerdo con la descripción, los oligonucleótidos (cebadores, sondas) pueden guardarse por separado o mezclados parcial o totalmente.

## ES 2 336 807 T3

Dicho oligonucleótidos pueden proporcionarse en forma seca o disueltos en un disolvente adecuado, según criterio del especialista en la técnica.

Los disolventes adecuados incluyen TE, agua de calidad para PCR y similares.

En una realización preferida, el kit de acuerdo con la descripción también puede contener otros reactivos adecuados para una etapa de PCR, posiblemente incluyendo reactivos adecuados para una etapa RT-PCR.

Los especialistas en la técnica conocen dichos reactivos e incluyen agua, de tipo agua sin nucleasa, agua sin RNasa, agua sin ADNasa, agua de calidad para PCR; sales; del tipo magnesio, potasio; tampones tales como Tris; enzimas, incluyendo polimerasas, tales como Taq, Vent, Pfu (todas son Marcas Registradas), polimerasa que puede activarse, transcriptasa inversa y similares; nucleótidos de tipo desoxinucleótidos, didesoxinucleótidos, dNTP, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, dUTP; otros reactivos de tipo DTT y/o inhibidores de RNasa y polinucleótidos de tipo poliT, polidT, y otros oligonucleótidos, por ejemplo cebadores.

En otra realización preferida, el kit de acuerdo con la descripción comprende controles de PCR. Dichos controles se conocen en la técnica e incluyen controles cualitativos, controles positivos, controles negativos, controles internos, controles cuantitativos, controles internos cuantitativos, así como intervalos de graduación. Los controles internos para dicha etapa de PCR pueden ser un molde que no está asociado al molde diana en la etapa de PCR. Dichos controles también pueden comprender cebadores de control y/o sondas de control. Por ejemplo, en el caso de detección del VIH, es posible usar como un control interno, un polinucleótido elegido dentro de un gen cuya presencia se excluye en una muestra originada a partir de un cuerpo humano, (por ejemplo, a partir de un gen vegetal) y cuyo tamaño y contenido en GC es equivalente a los de la secuencia diana.

En una realización preferida, el kit de acuerdo con la descripción contiene medios para extraer y/o purificar ácidos nucleicos de una muestra biológica, por ejemplo de sangre, suero, plasma. Los especialistas en la técnica conocen bien dicho medios. En una realización preferida, el kit de acuerdo con la invención contiene instrucciones para su uso. Ventajosamente dichas instrucciones pueden estar en un prospecto, una tarjeta o similar. Dichas instrucciones también pueden presentarse de dos formas: una detallada, que recoge información exhaustiva sobre el kit y su uso, posiblemente incluyendo también datos bibliográficos; y en forma de guía rápida o una memoria, por ejemplo en forma de una tarjeta, que recoge la información básica necesaria para su uso.

En una realización preferida, dicho kit es un kit para realizar diagnósticos, especialmente un kit para diagnósticos *in vitro*, es decir un kit para diagnósticos del VIH.

La presente descripción también se relaciona con el campo de la diagnosis.

Los oligonucleótidos de acuerdo con la presente descripción, y según se describe anteriormente, pueden usarse para realizar diagnósticos *in vitro* de los tipos y subtipos del VIH. En particular, los cebadores y las sondas de acuerdo con la invención pueden usarse para cuantificar *in vitro* los ácidos nucleicos del VIH y los sub-tipos y tipos presentes en una muestra *in vitro*, por ejemplo, en sangre, plasma y/o suero de un paciente o en un sobrenadante de cultivo celular.

Es también un objeto de la presente descripción proporcionar un método para detectar la presencia de ácido nucleico del VIH en una muestra.

En una realización, dicho método comprende la etapa de proporcionar al menos una muestra que se sospecha que comprende al menos un molde diana de al menos un tipo y/o subtipo y/o aislado del VIH.

Por ácido nucleico, en este documento se entiende que es cualquier ácido nucleico: este puede ser sintético o no, recombinante o de origen natural, lineal o circular. Esto incluye ADN y ARN. El ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario o incluso tricatenario. Puede proceder de diversas fuentes biológicas, tales como microorganismos (bacterias, levaduras, y similares) u organismos superiores, como células de mamíferos. Dicho ácido nucleico también puede ser de naturaleza viral, por ejemplo de naturaleza retroviral, como los VIH. El ácido nucleico también puede comprender ADN total, ARN total, ADN genómico, ADN mitocondrial, ADN plasmídico, ADN BAC (cromosoma artificial bacteriano) y mezclas de los mismos. Además, el ácido nucleico puede adoptar diversos estados de pureza.

Por muestra, en este documento se entiende que es cualquier tipo de muestra, de origen natural o no. Preferiblemente, dicha muestra es de origen biológico. Dicha muestra puede proceder también de un sobrenadante de cultivo celular. En una realización preferida, dicha muestra deriva de sangre. Más preferiblemente, dicha muestra que contiene ácido nucleico deriva de suero y/o plasma. También puede que dicha muestra proceda de una etapa preliminar. Por ejemplo, dicha muestra puede que se obtenga mediante un procedimiento de purificación y/o extracción, por ejemplo de una muestra de sangre. En particular, dicha muestra puede ser el resultado de un proceso de separación y/o purificación y/o extracción realizado en una muestra biológica. Dicha muestra también puede ser una muestra de control. Las muestras de control incluyen muestras como control cualitativo, control positivo, control negativo, control cuantitativo y control de graduación. Dicho control puede ser interno así como externo. Cualquier muestra de acuerdo con la presente invención puede presentarse varias veces. Por ejemplo, dicha muestra puede proporcionarse duplicada, triplicada, cuadruplicada...multiplicada, lo que resulta ventajoso en el caso de experimentos cuantitativos.

## ES 2 336 807 T3

El especialista en la técnica está familiarizado con el concepto del molde diana. Dicho molde diana puede ser cualquier ácido nucleico, cuya presencia se ensaya en dicho método. Dicho molde diana es posiblemente, pero no necesariamente, el ácido nucleico a amplificar en dicho método (amplicon PCR).

5 Dicho método puede comprender la etapa de proporcionar al menos una muestra que contiene ácido nucleico que se sospecha que comprende al menos un molde diana de al menos un tipo y/o subtipo del VIH.

En un aspecto de la invención, dicho método comprende la etapa de proporcionar al menos un nucleótido de acuerdo con la invención (por ejemplo cebador y/o sonda PCR) y/o al menos un conjunto de nucleótidos (por ejemplo 10 un par de cebadores) de acuerdo con la invención.

En una realización, dicho método comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra que contiene ácido nucleico con al menos un oligonucleótido de acuerdo con la invención y/o al menos un conjunto de nucleótidos de acuerdo con la invención, en condiciones que permiten la hibridación de dicho cebador y/o dicho par de cebadores y/o 15 dicha sonda en dicho molde. En otro aspecto, dicho método comprende la etapa de observar o detectar la presencia de un producto hibridado, revelando por lo tanto la presencia inicial de un ácido nucleico del VIH en dicha muestra.

Un objeto adicional de la descripción es proporcionar un método para la detección específica cuantitativa de los tipos y subtipos del VIH en una muestra, preferiblemente por análisis PCR múltiple cuantitativo en tiempo real. 20

En una realización, dicho método comprende la etapa de proporcionar al menos una muestra que se sospecha que comprende al menos un molde diana de al menos un tipo y/o subtipo del VIH.

En otra realización preferida, dicho método comprende la etapa de proporcionar al menos un oligonucleótido de acuerdo con la invención (por ejemplo cebador y/o sonda PCR) y/o al menos un conjunto de nucleótidos de acuerdo con la invención (por ejemplo par de cebadores). 25

En una realización preferida, dicha sonda es adecuada para la detección de un supuesto amplicon del VIH que puede obtenerse con dicho par de cebadores. 30

En una realización preferida de acuerdo con la invención, las propiedades espectrales de dichas sondas pueden elegirse de manera que no interfieran entre ellas. En particular, cuando las sondas se usan en protocolos múltiples, cada sonda única puede tener su propio fluoróforo con propiedades espectrales significativamente diferentes entre sí, es decir, el espectro de absorción/emisión es esencialmente no-solapante. De manera ventajosa, esto permite la 35 detección múltiple con baja interferencia para todas las sondas únicas, asegurando que en la detección las señales individuales no interfieren entre ellas. Los ejemplos de colorantes que pueden usarse juntos en protocolos múltiples incluyen Fam con Tamra, Fam con Tamra y Rojo Texas.

En otra realización preferida, dicho método comprende la etapa de poner en contacto dicha muestra, en presencia de dicho oligonucleótido (u oligonucleótidos) y/o cebador (o cebadores) y/o par (o pares) de cebadores y/o sonda (o sondas) y/o conjunto (o conjuntos) de oligonucleótidos y posiblemente en presencia de reactivos adecuados, en las condiciones adecuadas para realizar la amplificación PCR de dicho molde diana con dicho par (o pares) de cebadores y/o conjunto (o conjuntos). 40

Dicha amplificación PCR puede ser cualquier reacción PCR, incluyendo RT-PCR. 45

Dichos reactivos adecuados se conocen en la técnica, y ejemplos de los mismos incluyen agua, como agua sin nucleasa, agua sin RNasa, agua sin ADNasa, agua de calidad para PCR; sales, como magnesio, potasio; tampones tales como Tris; enzimas, que incluyen polimerasas, tales como Taq, Vent, Pfu (todas ellas Marcas Registradas), polimerasa que puede activarse, transcriptasa inversa, y similares; nucleótidos como desoxinucleótidos, dideoxinucleótidos, dNTP, dATP, dTTP, dUTP, dCTP, dGTP; otros reactivos, como DTT y/o inhibidores de RNasa; y polinucleótidos como poliT, polidT. Ventajosamente de acuerdo con la invención, al menos parte de estos reactivos pueden usarse como una pre-mezcla. Los especialistas en la técnica conocen que cantidades de estos reactivos deben usarse. 50

En una realización preferida, los cebadores de acuerdo con la descripción se usan en un intervalo de concentración final de 100-2000 nM. Típicamente, dichos cebadores pueden usarse a un intervalo de concentración final de 200-1500 nM, preferiblemente 250-1000 nM, más preferiblemente 500-1000 nM, incluso más preferiblemente 600-1000 nM. 55

La concentración de la sonda en una reacción PCR puede optimizarse, típicamente variando la concentración final de 50 nM a 1000 nM. En una realización preferida, las sondas de acuerdo con la invención se usan a un intervalo de concentración final de 50-1000 nM, preferiblemente 100-800 nM, más preferiblemente 100-600 nM, incluso más preferiblemente 200-600 nM. 60

Los especialistas en la técnica conocen bien dichas condiciones. Estas incluyen condiciones de temperatura, en particular condiciones de ciclo térmico, por ejemplo, temperatura, duración, número, tasa de calentamiento de los ciclos. En una realización preferida, dichas condiciones de temperatura incluyen condiciones adecuadas para una RT-PCR. En otra realización preferida, dichas condiciones incluyen condiciones adecuadas para una QPCR (PCR cuantitativa). En otra realización preferida, dichas condiciones incluyen condiciones adecuadas para una RT-PCR cuantitativa. 65

## ES 2 336 807 T3

En otra realización, dicho método comprende la etapa de llevar dicha muestra, en presencia de dicha sonda (o sondas) a condiciones adecuadas para realizar la hibridación de dicha sonda con dicho supuesto amplicon.

5 Aun en otra realización preferida, dicho método comprende la etapa de detectar al menos una vez, preferiblemente el tiempo real, posibles productos de amplificación, es decir, si dicha sonda (o sondas) encuentra (o encuentran) a dicho amplicon para hibridarse con él, preferiblemente para cada muestra. Esto permite ventajosamente evaluar la presencia de dicho tipo y/o subtipo de VIH. Esto puede conseguirse ventajosamente por mediciones de intensidad de fluorescencia. En la técnica se conocen los procedimientos de medición de fluorescencia. En resumen, la muestra se ilumina a aproximadamente la longitud de onda de excitación del fluoróforo y se mide la intensidad de la emisión.

10 En otra realización, dicho método comprende la etapa de medir al menos una vez, preferiblemente en tiempo real, la cantidad de dicha sonda hibridada con dicho amplicon. Esto puede conseguirse de manera ventajosa por mediciones de intensidad de fluorescencia. En la técnica se conocen los procedimientos de medición de fluorescencia. En resumen, la muestra se ilumina a aproximadamente la longitud de onda de excitación del fluoróforo y se mide la intensidad de la emisión.

15 En otra realización preferida, dicho método comprende la etapa de calcular al menos una vez el número de copias del molde de diana inicialmente presentes en dicha muestra. El especialista en la técnica sabría como realizar dicha etapa. Por ejemplo, esto puede realizarse ventajosamente usando controles de calibrado convencionales y/o internos. Preferiblemente, esta etapa incluye la determinación del llamado ciclo de umbral (CT), para cada muestra, que se correlaciona con el número de copias del molde de diana inicialmente presentes en dicha muestra.

20 En una realización preferida, al menos una etapa, preferiblemente varias etapas, mas preferiblemente la mayoría de las etapas de dicho método puede realizarse en una placa de PCR. En la técnica se conocen dichas placas de PCR adecuadas. Estas incluyen placas de 24 pocillos, placas de 48 pocillos, placas de 96 pocillos y placas de 284 pocillos. De manera ventajosa esto asegura que en dichas etapas las muestras puedan procesarse en paralelo. Además, esto permite la selección de alto rendimiento, lo cual ventajosamente ahorra tiempo.

25 En otra realización preferida, al menos una etapa, preferiblemente varias etapas, mas preferiblemente la mayoría de las etapas de dicho método puede realizarse en un termociclador. Dicho termociclador puede equiparse para realizar mediciones de intensidad de fluorescencia en tiempo real, en cuyo caso dichas placas ventajosamente pueden ser de calidad óptica.

30 Esta solicitud también se refiere a la amplificación de ácidos nucleicos del VIH con al menos un oligonucleótido y/o cebador PCR y/o al menos un par de cebadores PCR y/o al menos una sonda y/o al menos un conjunto de nucleótidos de acuerdo con la invención.

35 El especialista en la técnica puede apreciar que la presente invención puede incorporar cualquier cantidad de características preferidas descritas anteriormente.

40 Otras realizaciones de la presente invención no se presentan en este documento, lo cual resulta obvio para los especialistas en la técnica y por tanto están dentro del alcance y el espíritu de la presente invención. En particular, a pesar de ser adecuados para la detección mediante protocolos múltiples y/o en tiempo real, los métodos, procedimientos, polinucleótidos, oligonucleótidos, conjuntos de polinucleótidos, amplicones y kits de la presente invención obviamente también son adecuados para protocolos simples, protocolos cualitativos, protocolos cuantitativos, protocolos de detección de punto final y combinaciones de los mismos.

45 Las ventajas de los productos, procesos y métodos de acuerdo con la invención se pondrán de manifiesto a partir de los siguientes ejemplos, proporcionados a continuación de forma meramente ilustrativa, y que no son limitativos.

50 Las Figuras 1A, 1B, 2A, 2B y 3 ilustran la detección del VIH2-A y VIH2-B de acuerdo con la presente invención (véase el ejemplo 1 a continuación).

55 Las Figuras 4A y 4B ilustran la detección del VIH1-M y VIH1-O de acuerdo con la presente invención (véase el ejemplo 2 a continuación).

Las Figuras 5A y 5B ilustran la detección múltiple del VIH1/VIH2 de acuerdo con la presente invención (véase el ejemplo 4 a continuación).

60 Las Figuras 6A, 6B y 6C ilustran un ensayo de control interno (CI) para el VIH-2 de acuerdo con la presente invención (véase el ejemplo 5 a continuación).

65 Las Figuras 7 a 21 ilustran secuencias de acuerdo con la presente invención.

**Ejemplos**

Ejemplo 1

5 *Detección del VIH2 (subtipos A y B) (Figuras 1A, 1B, 2A, 2B y 3)*

Este ejemplo ilustra que los cebadores y sondas del VIH2 de la invención permiten la detección específica en tiempo real por RT-PCR de los subtipos A y B del VIH2.

10 Este ejemplo implica el uso de un par de cebadores del VIH2, y dos sondas del VIH2 diferentes. Una sonda es una sonda del VIH2-A (sonda de subtipo A), y la otra es una sonda del VIH2-B (sonda del subtipo B). Estos cebadores y sondas dirigen una secuencia de 147 pb en aislados del VIH2.

15 Estos tienen las siguientes secuencias:

Cebador directo del VIH2 (H2A3f, SEC ID N°: 195):

20 AGGAAGRCARACAGCACTCTTC con R=A/G (T<sub>m</sub> = 66°C)

Cebador inverso del VIH2 (H2A3r, SEC ID N°: 250):

25 GGTACTCCRAAGGGGTTTGTCTAT con R=A/G (T<sub>m</sub> = 65°C)

Como ya se ha mencionado, R corresponde a una A o G, de manera que hay 4 formas para el cebador directo (AA, AG, GA y GG) y 2 formas para el cebador inverso (AG o GA).

30 Sonda del VIH2-A (sonda del VIH2-A, SEC ID N°: 297):

GGCCAATAACACACTTGACACACA

35 Sonda del VIH2-B (sonda del VIH2-B, SEC ID N°: 300):

GCCTATCACACACCTGCACACA.

40 En este ejemplo cada una de estas sondas se usa como una sonda fluorescente. Los brazos beacon no asociados a la diana que se han añadido a cada extremo de cada sonda se muestran subrayados (FAM = fluoróforo; DQ = Extintor Dark).

45 Sonda del VIH2-A en formato de sonda fluorescente (sonda beacon del VIH2-A, SH2A9a, SEC ID N°: 298):

FAM-AGCGCGGCCAATAACACACTTGACACACAGCGCT-DQ

50 Sonda del VIH2-B en formato de sonda fluorescente (sonda beacon del VIH2-B, SH2A1b, SEC ID N°: 301):

FAM-AGCGCGCCTATCACACACCTGCACACAGCGCT-DQ

55 Se realizaron tres series de experimentos de amplificación cuantitativa en tiempo real en un panel de muestras de plasma positivas para VIH2 (muestras positivas VIH2-A negativas VIH2-B y muestras positivas VIH2-B negativas VIH2-A):

60 a) par de cebadores del VIH2 + sonda beacon del VIH2-A (H2A3f, H2A3r, SH2A9a, SEC ID N°: 195, 250, 298),

b) par de cebadores del VIH2 + sonda beacon del VIH2-B (H2A3f, H2A3r, SH2A1b, SEC ID N°: 195, 250, 301),

65 c) par de cebadores del VIH2 + sonda beacon del VIH2-A + sonda beacon del VIH2-B (H2A3f, H2A3r, SH2A9a, SH2A1b, SEC ID N°: 195, 250, 298, 301).

## ES 2 336 807 T3

Los detalles del procedimiento son los siguientes:

- 5 - Panel de muestras positivas VIH2: se obtuvieron muestras de plasma positivas VIH2-A negativas VIH2-B (muestras del subtipo A) y muestras de plasma positivas VIH2-B negativas VIH2-A (muestras del subtipo B) de pacientes infectados (Centro Hospitalario Bichat, Laboratorio de Virología de Asistencia Pública - Hospital de París, Francia);
- Controles negativos: plasma negativo VIH2;
- 10 - Extracción de ácido nucleico: ARN Viral Kit Qiagen QiaAmp (referencia 52904) usado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (volumen de muestra por extracción = 140 microlitros);
- Par de cebadores: 1 microM por cada reacción (SEC ID N°: 11, 12);
- 15 - Sondas: sondas beacon con FAM-DQ como se ha descrito anteriormente (SEC ID N°: 298; 301); cada una a 0,2 microM por reacción;
- Reactivos para RT-PCR: agua sin ARNasa y kit de RT-PCR Qiagen QuantiTect Probe (referencia Qiagen: 204443) usado de acuerdo con las instrucciones del fabricante,  $[MgCl_2] = 4 \text{ mM}$ ;
- 20 - Aparato: Ciclador IQ de Bio-Rad;
- Ciclado térmico:
  - 25 30' a 42°C (etapa de RT),
  - 15' a 95°C (etapa de activación de la polimerasa),
  - (30" a 94°C - 30" a 55°C - 30" a 72°C) x 50,
  - 30 +4°C.

35 Se sometió el panel de muestras del subtipo A y muestras del subtipo B a extracción de ácido nucleico y amplificación por RT-PCR usando el par de cebadores VIH2 junto con únicamente una de las sondas (experimentos a) y b)) o ambas sondas (experimento c)).

40 Interpretación de los resultados: para cada ensayo, se determina un ciclo de umbral (Ct) que es el nivel de fluorescencia que se considera que está significativamente por encima del nivel de fondo de fluorescencia medida en los primeros ciclos de amplificación. El valor Ct es inversamente proporcional a la concentración de la diana: a menor Ct, mayor concentración de la diana.

45 En las siguientes tablas, CT = Ciclo de Umbral; UFR máx = Unidades de Fluorescencia Relativa Máxima observadas al final del proceso de la PCR; CTL - = control negativo; N/A = muestras cuyo nivel de fluorescencia está por debajo del nivel de fondo.

TABLA 1

50 *Resultados obtenidos con el par de cebadores del VIH2 + sonda fluorescente VIH2-A en el experimento a)*  
(H2A3f, H2A3r, SH2A9a, SEC ID N°: 195, 250, 298)

55 Dilución de Muestras del Sub-tipo A	A1 1/10	CT	20,2
		UFR máx	916
	GS 1/800	CT	22
		UFR máx	1078
60 Dilución de Muestras del Sub-tipo A	A3 1/10	CT	21,2
		UFR máx	1382
	A4 1/10	CT	22,4
		UFR máx	1221
65 Dilución de Muestras del	B1 1/10	CT	42,9
		UFR máx	67

ES 2 336 807 T3

Sub-tipo B	B21/10	CT	30,9
		UFR máx	265
	B31/10	CT	N/A
		UFR máx	50
	B41/10	CT	37,8
		UFR máx	52
Control negativo	CTL -	CT	N/A
		UFR máx	N/A

Las figuras 1A y 1B ilustran estos resultados.

Ventajosamente de acuerdo con la invención, la sonda del VIH2-A (SH2A9a, SEC ID N°: 298) permite la detección dirigida de muestras positivas del subtipo A en combinación con los cebadores del VIH2 de acuerdo con la invención (H2A3f, H2A3r, SEC ID N°: 195, 250), sin detección cruzada de muestras positivas del subtipo B (véase la Tabla 1 y las Figuras 1A y 1B).

TABLA 2

*Resultados obtenidos con el par de cebadores del VIH2 + sonda del VIH2-B en el experimento b) (H2A3f, H2A3r, SH2A1b, SEC ID N°: 195, 250, 301)*

Dilución de Muestras del Sub-tipo A	A1 1/10	CT	35,1	39,5
		UFR máx	84	53
	GS 1/800	CT	36,8	40,5
		UFR máx	81	57
	A3 1/10	CT	26,9	26,7
		UFR máx	159	137
	A4 1/10	CT	44	N/A
		UFR máx	55	-
Muestras del Subtipo B	B1 1/10	CT	21,4	21,5
		UFRmáx	1018	996,
	B21/10	CT	29,6	29,9
		UFR máx	286	292
	B3 1/10	CT	26,3	27,2
		UFR máx	768	690
	B4 1/10	CT	27	27,1
		UFR máx	832	779
Control negativo	CTL -	CT	N/A	N/A
		UFR máx	N/A	N/A

Las Figuras 2A y 2B ilustran estos resultados.

## ES 2 336 807 T3

Ventajosamente de acuerdo con la invención, la sonda del VIH2-B (SH2A1b, SEC ID N°: 301) permite la detección dirigida de muestras positivas del subtipo B en combinación con los cebadores del VIH2 (H2A3r, H2A3f, SEC ID N°: 195, 250) de la invención, sin detección cruzada de muestras positivas del subtipo A (véase la Tabla 2 y las Figuras 2A y 2B).

TABLA 3

*Resultados obtenidos con el par de cebadores del VIH2 + sonda del VIH2-A + sonda del VIH-2B en el experimento c) (H2A3f, H2A3r, SH2A9a, SH2A1b, SEC D N°: 195, 250, 298, 301)*

Dilución de Muestras del Sub-tipo A	A1 1/10	CT	20,3	20,6
		UFR máx	1673	1550
	GS 1/800	CT	23,7	23,9
		UFR máx	1709	1580
	A3 1/10	CT	21,4	21,5
		UFR máx	2439	2201
	A4 1/10	CT	22,6	22,8
		UFR máx	1974	1911
Muestras del Subtipo B	B1 1/10	CT	23,3	23,6
		UFR máx	1197	1122
	B2 1/10	CT	30,2	30,5
		UFR máx	635	672
	B3 1/10	CT	28,6	28,7
		UFR máx	814	834
	B4 1/10	CT	28,7	28,8
		UFR máx	837	841
Control negativo	CTL -	CT	N/A	N/A
		UFR máx	N/A	N/A

En la Figura 3 se ilustran estos resultados.

Como una característica destacable de la invención, la sonda del VIH2-A (SH2A9a, SEC ID N°: 298) y la sonda del VIH2-B (SH2A1b, SEC ID N°: 301) pueden usarse simultáneamente (véase la Tabla 3 y la Figura 3) y permiten la detección de ambos subtipos en un procedimiento múltiple (en este caso doble) de una tapa.

Como una característica sorprendente, se observó un efecto sinérgico para el uso simultáneo de ambas sondas A y B (sonda del sub-tipo A y sonda del sub-tipo B) (protocolo doble), en comparación con el uso de una sonda en solitario (sonda del sub-tipo A o sonda del sub-tipo B). La señal de detección obtenida con una sola sonda es ligeramente más precisa que la obtenida con ambas sondas respectivamente, como puede juzgarse a partir de la comparación de los resultados obtenidos en el experimento a) con los obtenidos en el experimento c) en las muestras del sub-tipo A y a partir de la comparación de los resultados obtenidos en el experimento b) con los obtenidos en las muestras del sub-tipo B en el experimento c).

Como un efecto sinérgico, sorprendente e inesperado, los conjuntos de oligonucleótidos (cebadores y sondas) de acuerdo con la invención prueban de esta manera una especificidad aumentada cuando las sondas se usan de manera simultánea (protocolo doble, múltiple).

### Ejemplo 2

*Cebadores y sondas del VIH1-M/VIH1-O (Figuras 4A y 4B)*

En un proceso, se sometieron paneles de referencia representativos de muestras de suero positivas VIH1-M negativas VIH1-O (muestras de panel VIH1-M) y paneles de referencia representativos de muestras de suero positivas

## ES 2 336 807 T3

VIH1-O negativas VIH1-M (muestras de panel VIH1-O) a amplificación RT-PCR cuantitativa en tiempo real con los cebadores VIH1-M (H1B4f, H1B10r, SEC ID N°: 7, 16) y una sonda VIH1-M (SH1BM5, SEC ID N°: 119) de la invención.

5 En otro proceso, los mismos paneles se sometieron a amplificación RT-PCR cuantitativa en tiempo real con los cebadores VIH1-O (H1B5f, H1B13r, SEC ID N°: 140, 168) y una sonda VIH1-O (SH1BO2 SEC ID N°: 191 o SH1B010 SEC ID N°:194) de la invención.

10 Los cebadores y las sondas del VIH1 tienen las siguientes secuencias:

Cebadores VIH1-M:

Directo: TTGGAGAGCAATGGCTAGTGA (H1B4f, SEC ID N°: 7)

15 Inverso: TGTGTGCAATCTAGTTGCCATA (H1B10r, SEC ID N°: 16)

Sonda VIH1-M:

20 ATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTC (SEC ID N°: 110)

Cebadores VIH1-O:

25 Directo: TTGGAGAGCACTAGCTAGTGA (H1B5f, SEC ID N°: 140)

Inverso: TGTGTGCAATCTATTTGCCATA (H1B13r, SEC ID N°: 168)

30 Sonda VIH1-O:

GAAATCATTGCTAGTTGTCCTAAATGTCATAT (SEC ID N°: 190)

35 De acuerdo con la invención, cada sonda se produce en este caso como una sonda fluorescente, con "TGCGC" como brazo no asociado a la diana en 5' y con "GCGCA" como brazo no asociado a la diana en 3' (ambos brazos subrayados). El brazo 5' se marcó con un fluoróforo FAM y el brazo 3' con un Extintor Dark (DQ).

40 Las secuencias de las sondas son las siguientes:

Sonda VIH1-M en un formato de sonda fluorescente:

FAM-TGCGCATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA-DQ (SH1BM5, SEC ID N°: 119)

45

Sonda VIH1-O en un formato de sonda fluorescente:

FAM-TGCGCGAAATCATTGCTAGTTGTCCTAAATGTCATATGCGCA-DQ (SH1BO2, SEC ID N°: 191)

50

A continuación se indican los detalles del procedimiento RT-PCR:

55 - Paneles: La referencia del Panel de Realización BBI PRD301 (cultivos del VIH1-O diluidos en plasma humano a aproximadamente  $10^5$  copias por ml; los números de las muestras tienen el formato 301-xx, donde xx es el número de muestra) se usa como panel representativo del VIH1-O;

- La referencia del Panel de Realización BBI PRD201 (cultivos del VIH1-M diluidos en plasma humano a aproximadamente  $10^5$  copias por ml; los números de las muestras tienen el formato 201-yy, donde yy es el número de muestra) se usa como panel representativo del VIH1-M;

60

- Controles negativos: plasma negativo para VIH1;

- Extracción: ARN viral Kit Qiagen QiaAmp Viral ARN (referencia 52904) usado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (volumen de muestra por extracción: 140 microlitros);

65

- Pares de cebadores: par de cebadores del VIH1-O (H1B5f, H1B13r, SEC ID N°: 140, 168) y par de cebadores del VIH1-M (H1B4f, H1B10r, SEC ID N°: 7, 16) cada par de cebadores se ha usado a  $0,6 \mu\text{M}$  por reacción;

## ES 2 336 807 T3

- Sondas: sondas con FAM-DQ (SH1BM5, SH1BO2, SEC ID N°: 119, 191) cada una a 0,6  $\mu$ M por reacción;
- Reactivos RT-PCR: agua sin ARNasa y kit de RT-PCT Qiagen QuantiTect Probe (referencia Qiagen: 204443), usado de acuerdo con las instrucciones del fabricante,  $[MgCl_2] = 4$  mM;
- Aparato: Ciclador IQ de Bio-Rad;
- Ciclado Térmico:
  - 30' a 42°C,
  - 15' a 95°C,
  - (15'' a 94°C - 30'' a 55°C - 30'' a 72°C) x 50,
  - +4°C.

Se siguió el mismo procedimiento RT-PCR para ambos tipos de experimentos de amplificación.

Interpretación de los resultados: para cada ensayo, se determina un ciclo de umbral (Ct) que es el nivel de fluorescencia que se considera que está significativamente por encima del nivel de fondo o de fluorescencia medida en los ciclos iniciales de amplificación. El valor Ct es inversamente proporcional a la concentración de diana: a menor Ct, mayor concentración de diana.

En las siguientes tablas:

CT = Ciclo de Umbral;

UFR máx = Unidades de Fluorescencia Relativa Máxima observadas al final del proceso de la PCR;

CTL - = control negativo;

N/A = muestras cuyo nivel de fluorescencia está por debajo del nivel de fondo;

Med: media.

TABLA 4

A continuación se proporcionan los resultados experimentales ilustrativos:

Muestra	Grupo/ Subtipo	Cebadores y sonda VIH1-M			Cebadores y sonda VIH1-O		
		CT		Med.	CT		Med.
201-1	A	37,6	38,3	38,0	44,3	N/A	
201-2	B	29,0	29,3	29,2	N/A	N/A	
201-3	C	37,5	38,8	38,2	N/A	N/A	
201-4	D	34,1	34,1	34,1	N/A	N/A	
201-5	E	32,1	35,2	33,7	N/A	N/A	
201-6	F	28,1	31,0	29,6	N/A	N/A	
201-7	G	31,9	32,0	32,0	N/A	N/A	
201-8	H	35,2	35,2	35,2	N/A	N/A	
201-9	CTL -	N/A	N/A		N/A	N/A	

## ES 2 336 807 T3

Muestra	Grupo/ Subtipo	Cebadores y sonda VIH1-M			Cebadores y sonda VIH1-O		
		CT		Med.	CT		Med.
301-1	O	N/A	N/A		32,4	31,8	32,1
301-2	O	41,1	N/A		33,0	32,8	32,9
301-3	O	N/A	N/A		30,9	31,0	31,0
301-4	O	N/A	47,5		N/A	35,7	35,7
Control		N/A			N/A		
(agua)		N/A			N/A		
		N/A			N/A		

Las Figuras 4A y 4B ilustran los resultados.

En la Figura 4A, se muestran los resultados obtenidos con los cebadores del VIH1-M (H1B4f, H1B10r, SEC ID N°: 7, 16) y las sondas del VIH1-M (SH1BM5, SEC ID N°: 119) de la invención en el panel VIH1-M (BBI PRD201), en el panel VIH1-O (BBI PRD301) y en los controles.

En la Figura 4B, se muestran los resultados obtenidos con los cebadores del VIH1-O (H1B5f, H1B13r, SEC ID N°: 140,168) y las sondas del VIH1-O (SH1BO2, SEC ID N°: 191) de la invención en el panel VIH1-O, en el panel VIH1-M y en los controles.

En ambos casos, no se detectó amplificación RT-PCR cuantitativa en tiempo real cuando los cebadores y las sondas del VIH1-M de la invención se usan en muestras con VIH1-O y a la inversa.

Ventajosamente de acuerdo con la invención, no se produce hibridación cruzada entre el amplicón del VIH1-M y las sondas del VIH1-O, ni entre el amplicón del VIH1-O y las sondas del VIH1-M. Los cebadores y las sondas del VIH1-M y VIH1-O de acuerdo con la invención demuestran por tanto que permiten una detección muy específica en condiciones de RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

### Ejemplo 3

#### *Cuantificación del VIH1-M y del VIH1-O*

Este ejemplo ilustra que los cebadores y las sondas de la invención permiten la cuantificación de la carga viral del VIH mediante RT-PCR.

Los cebadores y las sondas tienen las siguientes secuencias:

Cebadores VIH1-M:

Directo: TTGGAGAGCAATGGCTAGTGA (H1B4f, SEC ID N°: 7)

Inverso: TGTGTGCAATCTAGTTGCCATA (H1B10r, SEC ID N°: 16)

Sonda VIH1-M:

ATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTC (SEC ID N°: 110)

## ES 2 336 807 T3

Cebadores VIH1-O:

Directo: TTGGAGAGCACTAGCTAGTGA (H1B5f, SEC ID N°: 140)

5 Inverso: TGTGTGCAATCTATTTGCCATA (H1B13r, SEC ID N°: 168)

Sonda VIH1-O:

10 GAAATCATTGCTAGTTGTCCTAAATGTCATAT (SEC ID N°: 190)

15 De acuerdo con la invención, en este caso cada sonda se produce como una sonda fluorescente (molecular beacon), con "TGCGC" como brazo no asociado a la diana en 5' y con "GCGCA" como brazo no asociado a la diana en 3' (ambos brazos se subrayan). El brazo 5' se marca con un fluoróforo FAM y el brazo 3' con un Extintor Dark (QD).

Las secuencias de las sondas son por tanto las siguientes: (los brazos de las sondas se muestran subrayados):

20 Sonda del VIH1-M en un formato de sonda fluorescente:

FAM-TGCGCATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA-DQ (SH1BM5, SEC ID N°: 119)

25 Sonda del VIH1-O en un formato de sonda fluorescente:

FAM-TGCGCGAAATCATTGCTAGTTGTCCTAAATGTCATATGCGCA-DQ (SH1BO2, SEC ID N°: 191)

30 Los detalles del procedimiento RT-PCR se indican a continuación:

- Paneles:

35 - La referencia del Panel de Realización BBI PRD301 (cultivos del VIH1-O diluidos en plasma humano a aproximadamente  $10^5$  copias por ml; los números de las muestras tienen el formato 301-xx, donde xx es el número de muestra) se usa como panel representativo del VIH1-O;

40 - La referencia del Panel de Realización BBI PRD201 (cultivos del VIH1-M diluidos en plasma humano a aproximadamente  $10^5$  copias por ml; los números de las muestras tienen el formato 201-yy, donde yy es el número de muestra) se usa como panel representativo del VIH1-M;

- La serie de panel 500 Accurum 315 (sub-tipo B) se usa como un panel de referencia para producir la curva patrón de referencia, construida por la representación del logaritmo de concentraciones diana conocidas frente al valor Ct correspondiente. La concentración de una muestra desconocida se define por tanto cartografiando el valor Ct correspondiente con respecto a la curva convencional;

45 - Controles negativos: plasma negativo para VIH1;

- Extracción: ARN Viral Kit Qiagen QiaAmp (referencia 52904) usado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (volumen de la muestra para la extracción: 140 microlitros);

50 - Par de cebadores: par de cebadores VIH1-O (SEC ID N°: 7, 8) y par de cebadores VIH1-M (SEC ID N°: 1, 2) cada uno usado a 0,6 microM por reacción;

- Sondas: sondas con FAM-DQ (SEC ID N°: 4, 10), 0,2 microM cada una por reacción;

55 - Reactivos para RT-PCR: agua sin ARNasa y kit para RT-PCR Qiagen QuantiTect Probe (referencia Qiagen: 204443), de acuerdo con las instrucciones del fabricante,  $[MgCl_2] = 4 \text{ mM}$ ;

- Aparato: Ciclador IQ de Bio-Rad;

60 - Ciclado Térmico:

30' a 42°C (etapa de la RT),

15' a 95°C (etapa de activación de la polimerasa),

65 (15" a 94°C - 30" a 55°C - 30" a 72°C) x 50,

+4°C.

## ES 2 336 807 T3

Se realizaron dos series de experimentos de amplificación con los cebadores y sondas de la invención:

- a) RT-PCR con un solo par de cebadores y sondas (par de cebadores del VIH1-M (H1B4f, H1B10r, SEC ID N°: 7, 16) y sonda del VIH1-M (SH1BM5, SEC ID N°: 119);
- b) RT-PCR con ambos pares de cebadores y ambas sondas (par de cebadores del VIH1-M (H1B4f, H1B10r, SEC ID N°: 7, 16) + par de cebadores del VIH1-O (H1B5f, H1B13r, SEC ID N°: 140,168) y sonda del VIH1-M (SH1BM5, SEC ID N°: 119) + sonda del VIH1-O (SH1BO2, SEC ID N°: 191)).

Los resultados del valor Ct de cada ensayo se usaron para la cuantificación de paneles PRD201 y PRD301 cartografiando el valor Ct correspondiente con respecto a la curva convencional. Los valores de cuantificación que corresponden al número de copias de ARN/ml en cada muestra pura se compararon con kits disponibles en el mercado usados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante: kit Amplicor VIH1 Monitor Versión 1.5 de Roche (ref. 87674), kit Quantiplex ARN VIH1 3.0 ADNb de Bayer (ref. 6147) y kit Nuclisens VIH-1 QT de Organon Teknika (ref. 84152).

Los resultados representativos se muestran en las Tablas 5 y 6:

TABLA 5 (experimento a)

*Resultados obtenidos con un solo par de cebadores (par de cebadores VIH1-M, H1B4f, H1B10r, SEC ID N°: 7, 16) y una sola sonda (sonda beacon VIH1-M, SEC ID N°: 119) en el panel de muestra del VIH1-M*

		Resultados de copias por ml				
		Amplicor de Roche	Quantiplex de Bayer	Nuclisens de Organon	Invención	
Muestra	Genotipo				CT	Media.
201-1	A	4,00E+03	3,00E+03	2,00E+03	37,8	2,80E+03
201-2	B	2,00E+05	8,00E+04	2,00E+05	29,2	4,30E+04
201-3	C	2,00E+03	5,00E+03	1,00E+04	36,8	3,90E+03
201-4	D	2,00E+05	1,00E+05	3,00E+05	30,9	2,50E+04
201-5	E	2,00E+05	9,00E+04	6,00E+04	33,9	9,80E+03
201-6	F	5,00E+05	9,00E+04	2,00E+05	28,7	5,00E+04
201-7	G	5,00E+05	8,00E+04	1,00E+05	32,3	1,60E+04
201-8	H	2,00E+05	3,00E+04	9,00E+04	34,7	7,60E+03
201-9	Diluyente	ND	ND	ND	N/A	

A partir de estos resultados es evidente que los cebadores y las sondas del VIH1-M de la invención permiten una detección cuantitativa precisa en tiempo real de todos los genotipos del VIH1-M y una buena correlación con los kits disponibles en el mercado.

## ES 2 336 807 T3

TABLA 6 (experimento b)

*Resultados obtenidos con los cebadores del VIH1-M y VIH1-O (H1B4f, H1B10r, H1B5f, H1B13r, SEC ID N°: 7, 16, 140, 168) y las sondas del VIH1-M y VIH1-O (SEC ID N°: 119, 191) en el panel de muestra VIH1-O*

Muestra	Genotipo	Resultados de copias por ml				
		Amplicor de Roche	Quantiplex de Bayer	Nuclisens de Organon	Invención	
					CT	Media.
301-1	O	ND	3,00E+02	<LDL	32,1	1,60E+04
301-2	O	ND	2,00E+03	<LDL	32,9	1,00E+04
301-3	O	ND	8,00E+02	<LDL	31	1,40E+04
301-4	O	ND	3,00E+02	<LDL	35,7	2,00E+03
301-5	Diluyente	ND	ND	ND	N/A	

De la Tabla 6 puede observarse que el nivel de cuantificación más elevado en el panel VIH1-0 se obtiene con ambos cebadores y sondas VIH-1 y VIH1-O de la invención (<LDL = menor que el límite de detección más bajo).

### Ejemplo 4

#### *Ensayo Múltiple de VIH1/VIH2 (Figuras 5A y 5B)*

Este ejemplo ilustra que los cebadores y las sondas de VIH1 y VIH2 de la invención pueden usarse en un ensayo múltiple para la señal de VIH1 o VIH2. También demuestra la posibilidad de seguir la fluorescencia de dos dianas en el mismo tubo mediante el uso de fluoróforos diferentes (FAM y ROX).

Los cebadores y las sondas tienen las siguientes secuencias:

Cebadores VIH1-M:

Directo: TTGGAGAGCAATGGCTAGTGA (H1B4f, SEC ID N°: 7)

Inverso: TGTGTGCAATCTAGTTGCCATA (H1B10r, SEC ID N°: 16)

Sonda VIH1-M:

ATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTC (SEC ID N°: 110)

Cebador directo VIH2 (H2A3f, SEC ID N°: 195):

AGGAAGRCARACAGCACTCTTC con R=A/G (Tm = 66°C)

Cebador inverso VIH2 (H2A3r, SEC ID N°: 250):

GGTACTCCRAAGGGGTTTGTCTAT con R=A/G (Tm = 65°)

Sonda VIH2-A (sonda VIH2-A, SEC ID N°: 297):

GGCCAATAACACACTTGACACACA

De acuerdo con la invención, en este caso cada sonda se produce como una sonda fluorescente con "CGCGC" como brazo no asociado a la diana en 5' y con "GCGCG" como brazo no asociado a la diana en 3' (ambos brazos se subrayan). El brazo 5' está marcado con un fluoróforo FAM o ROX, y el brazo 3' con un resto Dabcyl.

## ES 2 336 807 T3

Por tanto, las secuencias sonda son las siguientes (los brazos beacon se muestran subrayados):

Sonda VIH1-M en un formato de sonda fluorescente:

5 FAM-CGCGCATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG-Dabcyl (SH1BM10, SEC ID N°: 128)

Sonda VIH2-A en un formato de sonda fluorescente:

10 ROX-CGCGCGGCCAATAACACACTTGCACACAGCGCG-Dabcyl (sonda beacon VIH2-A, SH2A14a, SEC ID N°: 299)

A continuación se indican los detalles del procedimiento RT-PCR

- 15
- Muestra positiva del VIH2-A: obtenida del paciente infectado (Centro Hospitalario Bichat, Laboratorio de Virología, Asistencia Pública - Hospital de París, Francia);
  - Serie panel 500 BBI Accurun 315 (sub-tipo B);
  - 20 - Controles negativos: muestra negativa VIH1 y VIH2;
  - Extracción: ARN Viral kit Qiagen QiaAmp (referencia 52904) usado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (volumen de la muestra por extracción = 140 microlitros);
  - 25 - Pares de cebadores: se han usado el par de cebadores de VIH1-M (SEC ID N°: 7, 16) y el par de cebadores de VIH2 (SEC ID N°: 195, 250) respectivamente a 0,5 microM cada uno por reacción para el VIH1-M y 0,3 microM cada uno por reacción para el VIH2;
  - 30 - Sondas: sonda VIH1-M FAM-Dabcyl (SEC ID N°: 128) y sonda VIH2-A ROX Dabcyl (SEC ID N°: 296), 0,4 microM cada una por reacción;
  - Reactivos para la RT-PCR: agua sin ARNasa y kit para RT-PCR Qiagen QuantiTect Probe (referencia Qiagen: 204443) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, [MgCl<sub>2</sub>] = 4 mM;
  - 35 - Aparato: Ciclador IQ de Bio-Rad;
  - Ciclado térmico:
  - 40 30' a 42°C (etapa de la RT),
  - 15' a 95°C (etapa de activación de la polimerasa),
  - (30" a 94°C - 30" a 55°C - 30" a 72°C) x 50,
  - 45 +4°C.

Se realizaron dos series de experimentos de amplificación con los cebadores y las sondas de la invención:

- 50
- a) RT-PCR con un único par de cebadores y sonda VIH1-M (H1B4f, H1B10r, SH1BM10, SEC ID N°: 7, 16, 119), un único par de cebadores y sonda VIH2 (H2A3f, H2A3r, SH2A14a, SEC ID N°: 195, 250, 299) con un intervalo de concentraciones de la diana de VIH1-M.
  - 55 b) RT-PCR con único par de cebadores y sonda VIH1-M (H1B4f, H1B10r, SH1BM10, SEC ID N°: 7, 16, 119), un único par de cebadores y sonda VIH2 (H2A3f, H2A3r, SH2A14a, SEC ID N°: 195, 250, 299) con un intervalo de diluciones de la diana de VIH2.

60 Interpretación de los resultados: para cada ensayo, se determina un ciclo de umbral (Ct) que es el nivel de fluorescencia que se considera que está significativamente por encima del nivel de fondo de fluorescencia medido en los ciclos iniciales de la amplificación. El valor Ct es inversamente proporcional a la concentración de diana: a menor Ct, mayor concentración de diana.

65 En las siguientes tablas, CT = Ciclo de Umbral; UFR máx = Unidades de Fluorescencia Relativa máxima observadas al final del proceso de la PCR; CTL - = control negativo; N/A = muestra cuyo nivel de fluorescencia está por debajo del nivel de fondo; Med.= media; cop = copias.

## ES 2 336 807 T3

En la Tabla 7 se muestran los resultados Ct ilustrativos:

VIH1-M				VIH2-A			
Número cop/PCR	CT	CT	Med.	Dilución	CT	CT	Med.
10000	28,2	28,2	28,2	1/300	28,0	27,7	27,9
1000	31,6	31,3	31,5	1/3000	31,9	32,4	32,2
100	35,7	35,7	35,7	1/30000	36,6	36,7	36,7
10	39,4	N/A	39,4	1/300000	40,7	N/A	40,7
CTL-(agua)	N/A	N/A		CTL-(agua)	N/A	N/A	

A partir de estos resultados es evidente que los cebadores y sondas VIH1 y VIH2 de la invención pueden usarse en un ensayo múltiple para la detección de la diana de VIH1-M o VIH2.

Los resultados se ilustran en las Figuras 5A y 5B (para cada dilución, hay 2 curvas ya que los experimentos, en este caso, se han realizado por duplicado).

### Ejemplo 5

#### *Ensayo Múltiple de CI/VIH2 (Figuras 6A y 6B)*

Este ejemplo ilustra que la diana VIH2 y el control interno (CI) pueden co-amplificarse usando los cebadores y las sondas del VIH2 de la invención y seleccionarse los cebadores y sonda CI sin ninguna perturbación de la señal del VIH2. Esto también demuestra la posibilidad de seguir la fluorescencia de dos dianas en el mismo tubo mediante el uso de dos fluoróforos diferentes (ROX y TAMRA).

Este ejemplo implica el uso de un par de cebadores VIH2 y una sonda VIH2. Estos cebadores y sondas dirigen una secuencia de 147 pb en aislados VIH2. Tienen las siguientes secuencias:

Cebador directo VIH2 (H2A3f, SEC ID N°: 195):

AGGAAGRCARACAGCACTCTTC con R=A/G (Tm = 66°C)

Cebador inverso VIH2 (H2A3r, SEC ID N°: 250):

GGTACTCCRAAGGGGTTTGTCTAT con R=A/G (Tm = 65°)

Sonda VIH2-A (sonda VIH2-A, SEC ID N°: 297):

GGCCAATAACACACTTGCACACA

Este ejemplo también implica el uso de un par de cebadores de CI y una sonda de CI, seleccionados para conseguir el mismo tamaño de fragmento amplificado y % de GC% que la diana VIH.

En este ejemplo, cada una de estas sondas se usa como una sonda fluorescente. Los brazos beacon no asociados a la diana que se han añadido a cada extremo de la sonda VIH2 se muestran subrayados (ROX = fluoróforo; Dabcyl = extintor).

Sonda VIH2-A en formato de sonda fluorescente (sonda beacon VIH2-A, SH2A14a, SEC ID N°: 299):

ROX-CGCGCGGCCAATAACACACTTGCACACAGCGCG-Dabcyl

Para la sonda de CI, se ha elegido TAMRA como fluoróforo y Dabcyl como extintor.

## ES 2 336 807 T3

Se realizaron dos series de experimentos de amplificación cuantitativa en tiempo real:

- 5
- a) Par de cebadores VIH2 + sonda beacon VIH2-A (H2A3f, H2A3r, SH2A9a, SEC ID N°: 195, 250, 299) + par de cebadores de CI + sonda beacon de CI con adición de diana VIH2 en solitario;
- b) Par de cebadores VIH2 + sonda beacon VIH2-A (H2A3f, H2A3r, SH2A9a, SEC ID N°: 195, 250, 299) + par de cebadores de CI + sonda beacon de CI con adición de diana VIH2 y CI.

10 Los detalles del procedimiento son los siguientes:

- Muestra positiva VIH2-A: obtenida del paciente infectado (Centro Hospitalario Bichat, Laboratorio de Virología, Asistencia Publica - Hospital de París, Francia);
- 15 - Dilución del CI: El CI se diluye para obtener  $10^6$  cop/PCR;
- Controles negativos: plasma negativo VIH2;
- Extracción de ácido nucleico: ARN Viral kit Qiagen QiaAmp (referencia 52904) usado de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (volumen de muestra por extracción = 140 microlitros);
- 20 - Par de cebadores: 0,3 microM cada uno por reacción (SEC ID N°: 11, 12 y cebadores de CI);
- Sondas: sonda beacon VIH2-A ROX Dabcy1 como se ha descrito anteriormente (SEC ID N°: 229) y sonda beacon de CI Tamra-Dabcy1, 0,4 microM por cada reacción;
- 25 - Reactivos para la RT-PCR: agua sin ARNasa y kit para RT-PCR Qiagen QuantiTect Probe (referencia Qiagen: 204443) usado de acuerdo con las instrucciones del fabricante,  $[MgCl_2] = 4$  mM;
- 30 - Aparato: Ciclador IQ de Bio-Rad;
- Ciclado térmico:
  - 30' a 42°C (etapa de la RT),
  - 35 15' a 95°C (etapa de activación de la polimerasa),
  - (30" a 94°C - 30" a 55°C - 30" a 72°C) x 50,
  - 40 +4°C.

Se sometió una muestra positiva VIH2-A a extracción de ácido nucleico y después a dilución a 1/300, 1/3000 y 1/30000 en agua para amplificación RT-PCR como se describe en los experimentos a) y b).

45 La dilución del CI se sometió a amplificación RT-PCR (aproximadamente  $10^6$  cop./PCR) como se describe en el experimento b). (cop = copias).

50 Interpretación de los resultados: para cada ensayo se determinó un ciclo de umbral (Ct) que es el nivel de fluorescencia que se considera que está significativamente por encima del nivel de fondo de la fluorescencia medida en los ciclos iniciales de la amplificación. El valor Ct es inversamente proporcional a la concentración de diana: a menor Ct, mayor concentración de diana.

55 En las siguientes tablas, CT = Ciclo de Umbral; UFR máx = Unidades de Fluorescencia Relativas máxima observadas al final del proceso de la PCR; CTL - = control negativo; N/A = muestra cuyo nivel de fluorescencia está por debajo del nivel de fondo.

60

65

## ES 2 336 807 T3

TABLA 8

*Valores CT obtenidos con el par de cebadores VIH2 + sonda beacon VIH2-A + par de cebadores de CI + sonda beacon de CI en experimentos a) y b) (H2A3f, H2A3r, SH2A14a, SEC ID N°: 195, 250, 299 para VIH2) cuando se lee la fluorescencia de ROX (señal VIH2)*

Condiciones del ensayo	VIH2-A 1/300				VIH2-A 1/3000				VIH2-A 1/30000			
	CT	CT	CT	Med	CT	CT	CT	Med	CT	CT	CT	Med
Exp. a): diana VIH2	25,3	25,4	25,7	25,5	28,8	28,2	28,8	28,6	32,3	33,0	32,7	32,7
Exp. b): diana VIH2 + CI	25,4	25,3	25,4	25,4	29,0	20,3	28,7	29,0	33,0	34,1	34,8	34,0

A partir de esta tabla puede observarse que los valores Ct de VIH2 no cambian con la adición del CI, independiente de la dilución de la muestra extraída del VIH2-A ensayada (1/300, 1/3000, 1/30000).

TABLA 9

*Valores CT obtenidos con el par de cebadores + sonda beacon VIH2- A + par de cebadores de CI + sonda beacon de CI en el experimento b) (H2A3f, H2A3r, SH2A14a, SEC ID N°: 195, 250, 299 para VIH2) cuando se lee la fluorescencia de TAMRA (señal de CI)*

Condiciones del ensayo	CI											
	VIH2-A 1/300				VIH2-A 1/3000				VIH2-A 1/30000			
	CT	CT	CT	Med	CT	CT	CT	Med	CT	CT	CT	Med
Exp. b): CI + diana VIH2	28,5	28,7	28,7	28,6	27,2	27,7	28,0	27,6	27,7	27,7	27,7	27,7

A partir de esta tabla puede observarse que los valores Ct para el CI son muy reproducibles independientemente de la dilución de la muestra extraída VIH2-A añadida.

Estos resultados se ilustran en las Figuras 6A, 6B y 6C (para cada dilución de VIH2-A, hay 3 curvas ya que los experimentos, en este caso, se realizaron por triplicado en las Figuras 6A y 6B; hay 6 curvas para el control negativo y hay 9 curvas para el CI, todas con la misma concentración en la Figura 6C).

# ES 2 336 807 T3

## REIVINDICACIONES

1. Proceso para la detección de al menos una diana del VIH,

que comprende la etapa de producir al menos un amplicón por medio de al menos dos oligonucleótidos,

en el que dichos oligonucleótidos son cebadores que son adecuados para usar en la amplificación específica de al menos una secuencia molde de referencia seleccionada del grupo que consiste en:

- las posiciones 4281-4436 (SEC ID N°: 2) del aislado de referencia K03455 VIH1-M; y los fragmentos de la SEC ID N°: 2 seleccionados de las posiciones 4281-4429 (SEC ID N°: 306), 4283-4429 (SEC ID N°: 307), 4283-4431 (SEC ID N°: 308) de dicho aislado VIH1-M;

- las posiciones 4336-4491 (SEC ID N°: 4) del aislado de referencia L20587 VIH1-O, y los fragmentos de la SEC ID N°: 4 seleccionados de las posiciones 4336-4484 (SEC ID N°: 310), 4338-4484 (SEC ID N°: 311) de dicho aislado VIH1-O;

- las posiciones 4889-5036 (SEC ID N°: 5) de aislado de referencia M30502 VIH2;

- las posiciones 4176-4436 (SEC ID N°: 1) de aislado de referencia K03455 VIH1-M y el fragmento de la SEC ID N°: 1 que es idéntico a las posiciones 4176-4429 (SEC ID N°: 305) de dicho aislado VIH1-M; y

- las posiciones 4231-4491 (SEC ID N°: 3) del aislado de referencia L20587 VIH1-y el fragmento de la SEC ID N°: 3 que es idéntico a las posiciones 4231-4484 (SEC ID N°: 309) de dicho aislado VIH1-O;

compartiendo dichas secuencias molde de referencia la característica técnica específica de ser referencias adecuadas para construir y producir cebadores que permiten una detección múltiple cuantitativa en tiempo real de al menos uno de los subtipos del VIH1-M, VIH2-O, VIH2-A y VIH2-B;

en el que dichos cebadores son adecuados para hibridarse con dicho aislado de referencia del VIH en dichas posiciones que conducen en una secuencia aislada de referencia del VIH que consiste en dicha secuencia molde de referencia;

y opcionalmente, comprende la etapa de detectar dicho amplicón por medio de al menos una sonda.

2. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 2 o uno de dichos fragmentos de la misma y donde dicho proceso se realiza con al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 9, 12, 14, 15, 24, 52, 82, 91, 100, 109, 127, 136.

3. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 2, en el que dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 9, 12, 14, 15, 24, 52, 82.

4. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 2-3, en el que dicho proceso se realiza con al menos una sonda seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 91, 100, 109, 127, 136.

5. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 2-4, en el que dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 9, 12, 14, 15;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 24, 52, 82;

y, opcionalmente, con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136.

6. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 4, o uno de dichos fragmentos de la misma y en el que dicho proceso se realiza con al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 148, 157, 167, 170, 179, 189, 190 a 194.

## ES 2 336 807 T3

7. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 6, en el que dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 148,157, 167, 170, 179, 189.

8. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 6-7, en el que dicho proceso se realiza con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 190 a 194.

9. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 6-8, en el que dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 148, 157, 167;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 170, 179, 189;

y, opcionalmente, con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 190 a 194.

10. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 5 y en el que dicho proceso se realiza con al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 221, 249, 276, 287, 296, 297 a 303.

11. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 10, en el que dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 221; 249, 276, 287, 296.

12. Proceso de acuerdo una cualquiera de las Reivindicaciones 10-11, en el que dicho proceso se realiza con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 297 a 303.

13. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 10-12, en el que dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 221, 249;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 276, 287, 296;

y, opcionalmente, con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 297 a 303.

14. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 1 o dicho fragmento de la misma y en el que dicho proceso se realiza con al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 6, 24, 52, 82, 91, 100, 109, 127, 136.

15. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 14, en el que dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 6, 24, 52, 82.

16. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 14-15, en el que dicho proceso se realiza con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 91, 100, 109, 127, 136.

## ES 2 336 807 T3

17. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 14-16, en el que dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado que es:

- SEC ID N°: 6;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 24, 52, 82;

y, opcionalmente, con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136.

18. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que dicha secuencia molde de referencia es la SEC ID N°: 3, o dicho fragmento de la misma, y en el que dicho proceso se realiza con al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 139, 170, 179, 189, 190 a 194.

19. Proceso de acuerdo con la Reivindicación 18, en el que dicho proceso se realiza con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 139, 170, 179, 189.

20. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 18-19, en el que dicho proceso se realiza con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 190 a 194.

21. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 18-20, en el que dicho proceso se realiza con al menos un cebador que es:

- SEC ID N°: 139;

y con al menos un cebador seleccionado del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 170, 179, 189;

y, opcionalmente, con al menos una sonda seleccionada del grupo que consiste en:

- SEC ID N°: 190 a 194.

22. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-21, el que dicha etapa de producir al menos un amplicón comprende al menos una amplificación PCR simple y/o múltiple cualitativa y/o cuantitativa.

23. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-22, en el que dichos oligonucleótidos son cebadores en bucle.

24. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-23, en el que dichos oligonucleótidos son cebadores en bucle, que comprenden un extremo terminal 5' de 3 a 7 nucleótidos que es complementario a su extremo 3'.

25. Amplicón que puede obtenerse implementando el proceso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-24 en una muestra que contiene el VIH.

26. Composición de amplificación que comprende al menos un amplicón de acuerdo con la Reivindicación 25.

27. Polinucleótido adecuado para usar como una secuencia molde de referencia en el diseño de cebadores que pueden usarse en protocolos múltiples para incluir al menos VIH1-M, VIH1-O, VIH2-A y VIH2-B en un solo proceso de amplificación ofreciendo al mismo tiempo una amplificación cuantitativa en tiempo real de la misma, seleccionándose dicho polinucleótido molde de referencia del grupo que consiste en:

- las posiciones 4281-4436 (SEC ID N°: 2) del aislado de referencia K03455 VIH1-M; y los fragmentos de la SEC ID N°: 2 seleccionados de las posiciones 4281-4429 (SEC ID N°: 306), 4283-4429 (SEC ID N°: 307), 4283- 4431 (SEC ID N°: 308) de dicho aislado VIH1-M;

## ES 2 336 807 T3

- las posiciones 4336-4491 (SEC ID N°: 4) del aislado de referencia L20587 VIH1-O, y los fragmentos de la SEC ID N°: 4 seleccionados de las posiciones 4336-4484 (SEC ID N°: 310), 4338-4484 (SEC ID N°: 311) de dicho aislado VIH1-O;

5 - las posiciones 4889-5036 (SEC ID N°: 5) de aislado de referencia M30502 VIH2;

- las posiciones 4176-4436 (SEC ID N°: 1) de aislado de referencia K03455 VIH1-M y el fragmento de la SEC ID N°: 1 que es idéntico a las posiciones 4176-4429 (SEC ID N°: 305) de dicho aislado VIH1-M; y

10 - las posiciones 4231-4491 (SEC ID N°: 3) del aislado de referencia L20587 VIH1-y el fragmento de la SEC ID N°: 3 que es idéntico a las posiciones 4231-4484 (SEC ID N°: 309) de dicho aislado VIH1-O.

28. Oligonucleótido adecuado para detección del VIH, seleccionado del grupo que consiste en:

15 - SEC ID N°: 6, 8, 11, 14, 15, 24, 52, 82, 91, 100, 109, 127, 136, 139, 148, 157, 167, 170, 179, 189, 190 a 194, 221, 249, 276, 287, 296, 297 a 303.

29. Oligonucleótido de acuerdo con la Reivindicación 28, seleccionado del grupo que consiste en:

20 - SEC ID N°: 6, 8, 11, 14, 15, 24, 52, 82, 91, 100, 109, 127, 136; en el que dicho oligonucleótido es adecuado para la detección del VIH1-M.

30. Oligonucleótido de acuerdo con la Reivindicación 28, seleccionado del grupo que consiste en:

25 - SEC ID N°: 139, 148, 157, 167, 170, 179, 189, 190 a 194; el que dicho oligonucleótido es adecuado para detección del VIH1-O.

31. Oligonucleótido de acuerdo con la Reivindicación 28, seleccionado del grupo que consiste en:

30 - SEC ID N°: 221, 249, 276, 287, 296, 297 a 299;

en el que dicho oligonucleótido es adecuado para detección del VIH2-A.

32. Oligonucleótido de acuerdo con la Reivindicación 28, seleccionado del grupo que consiste en:

35 - SEC ID N°: 221, 249, 276, 287, 296, 300 a 303;

en el que dicho oligonucleótido es adecuado para la detección del VIH2-B.

40 33. Oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 28-32, en el que dicho oligonucleótido está marcado con fluorescencia.

45 34. Conjunto de oligonucleótidos adecuado para la detección del VIH, que comprende al menos dos oligonucleótidos seleccionados de dos grupos diferentes entre los siguientes grupos:

- el grupo que consiste en: SEC ID N°: 6, 9, 12, 14, 15;

50 - el grupo que consiste en: SEC ID N°: 24, 52, 82;

- el grupo que consiste en: SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136;

en el que dicho conjunto de oligonucleótidos es adecuado para detección del VIH1-M.

55

35. Conjunto de oligonucleótidos adecuado para la detección del VIH, que comprende:

- al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 139, 148, 157,167; y/o

60

- al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 170, 179, 189; y/o

- al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 190 a 194;

65 en el que dicho conjunto de oligonucleótidos es adecuado para detección del VIH1-O.

## ES 2 336 807 T3

36. Conjunto de oligonucleótidos adecuado para la detección del VIH, que comprende:

- al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 221, 249; y/o
  - al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 276, 287, 296; y/o
  - al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 297 a 299;
- en el que dicho conjunto de oligonucleótidos es adecuado para detección del VIH2-A.

37. Conjunto de oligonucleótidos adecuado para la detección del VIH, que comprende:

- al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 221, 249; y/o
  - al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 276, 287, 296; y/o
  - al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 300 a 303;
- en el que dicho conjunto de oligonucleótidos es adecuado para detección del VIH2-B.

38. Conjunto de oligonucleótidos adecuado para la detección del VIH, que comprende:

- al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136; y/o
  - al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 190 a 194; y/o
  - al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 297 a 299; y/o
  - al menos un oligonucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEC ID N°: 300 a 303;
- en el que dicho conjunto de oligonucleótidos es adecuado para detección múltiple del VIH.

39. Conjunto de oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 34-38, en el que al menos uno de dichos oligonucleótidos está marcado con fluorescencia.

40. Amplicón que puede obtenerse por amplificación de una muestra que contiene el VIH con un par de cebadores seleccionados de:

- un cebador de las SEC ID N°: 9, 12, 14 ó 15 y un cebador de las SEC ID N°: 24, 52 ó 82; o
- un cebador de las SEC ID N°: 148, 157 ó 167 y un cebador de las SEC ID N°: 170, 179 ó 189; o
- un cebador de las SEC ID N°: 221 ó 249 y un cebador de las SEC ID N°: 276, 287 ó 296; o
- un cebador de las SEC ID N°: 6 y un cebador de las SEC ID N°: 24, 52 ó 82; o
- un cebador de las SEC ID N°: 139 y un cebador de las SEC ID N°: 170, 179 ó 189.

41. Amplicón que tiene una longitud de nucleótidos idéntica a la longitud de nucleótidos de un polinucleótido de la reivindicación 27 y que comprende una secuencia que tiene un porcentaje de identidad de nucleótidos de al menos el 90% con una secuencia de sonda, a lo largo de la longitud completa de esta secuencia de sonda, en el que dicha secuencia sonda es una de las siguientes: SEC ID N°: 91, 100, 109, 118, 127, 136, 190, 191, 192, 193, 194, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, o una secuencia que es complementaria a una de estas secuencias de sondas SEC ID N°: a lo largo de la longitud completa de esta secuencia SEC ID N°: de sonda.

42. Composición de amplificación que comprende un amplicón de acuerdo con la Reivindicación 40 ó 41.

43. Kit para el diagnóstico del VIH, que comprende:

- a) al menos un oligonucleótido de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 28-33; y/o

## ES 2 336 807 T3

- b) al menos un conjunto de oligonucleótidos de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 34-39; y
- c) opcionalmente, instrucciones para su uso.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

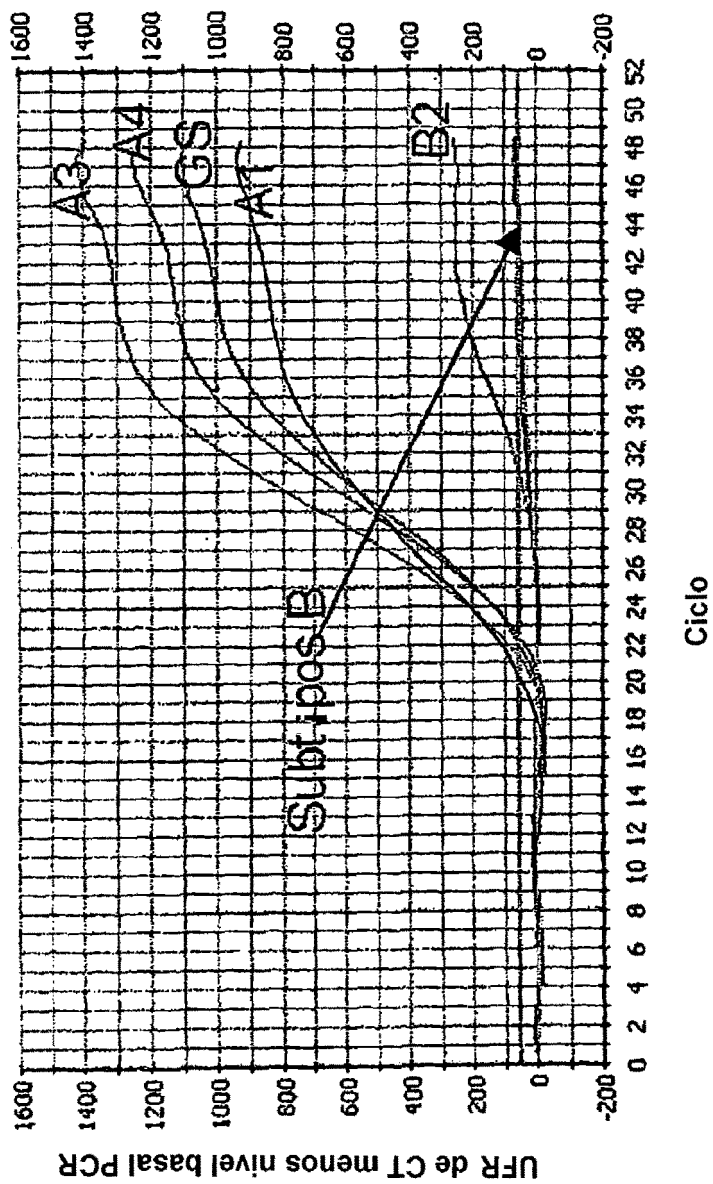
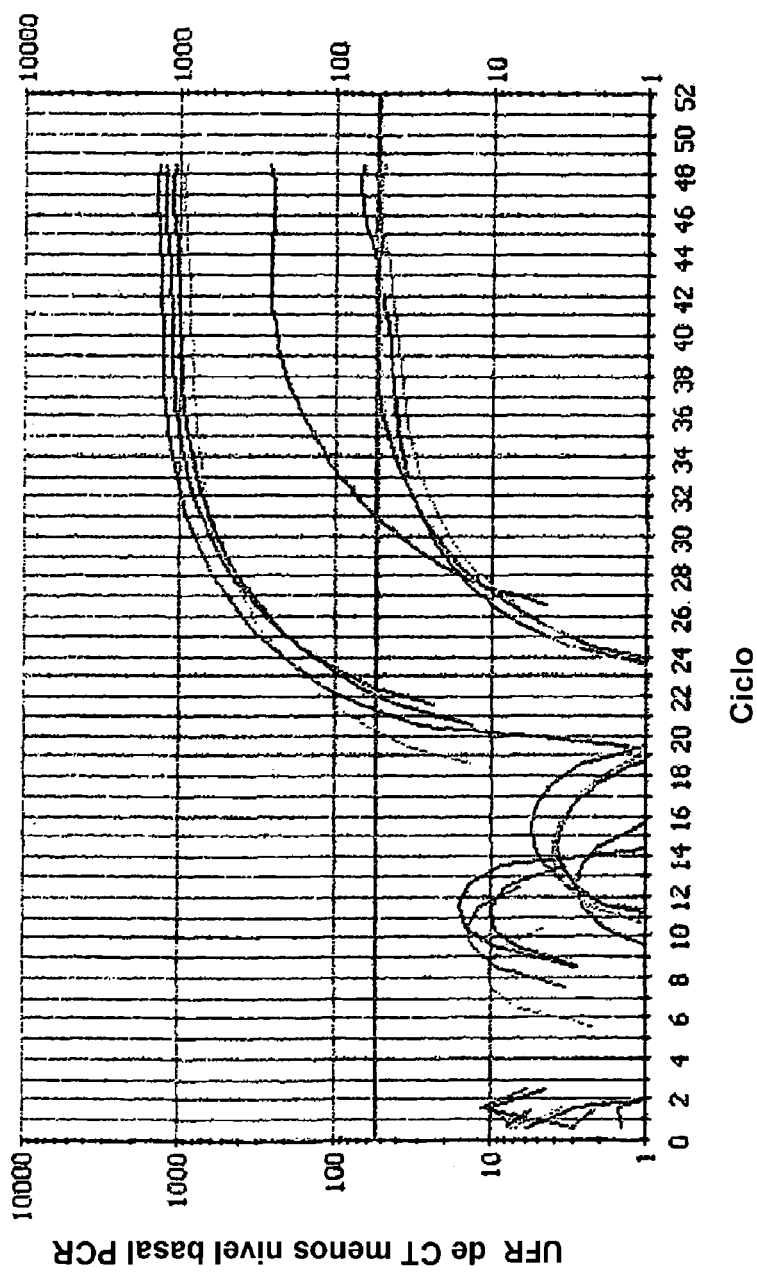


Figura 1A



**Figura 1B**

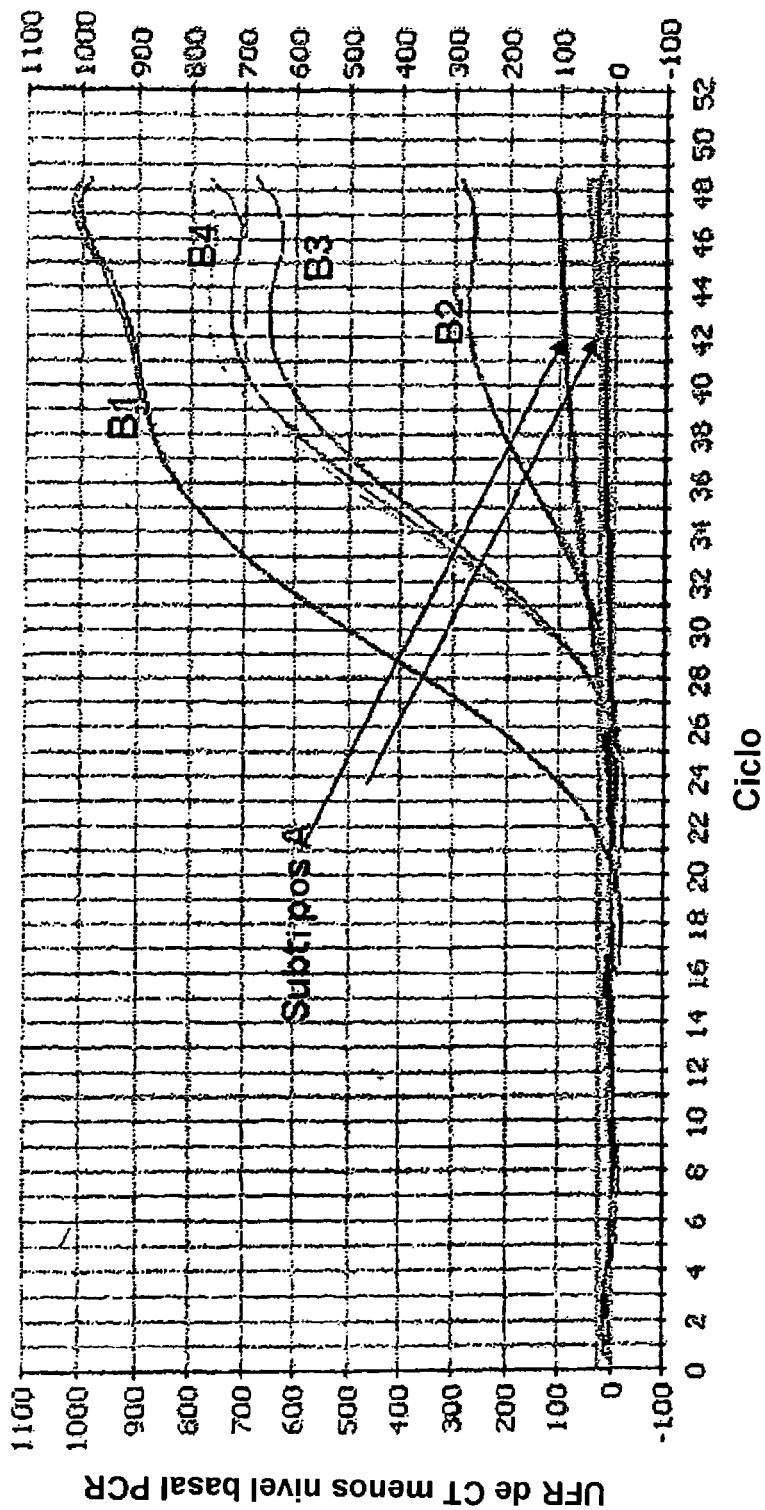


Figura 2A

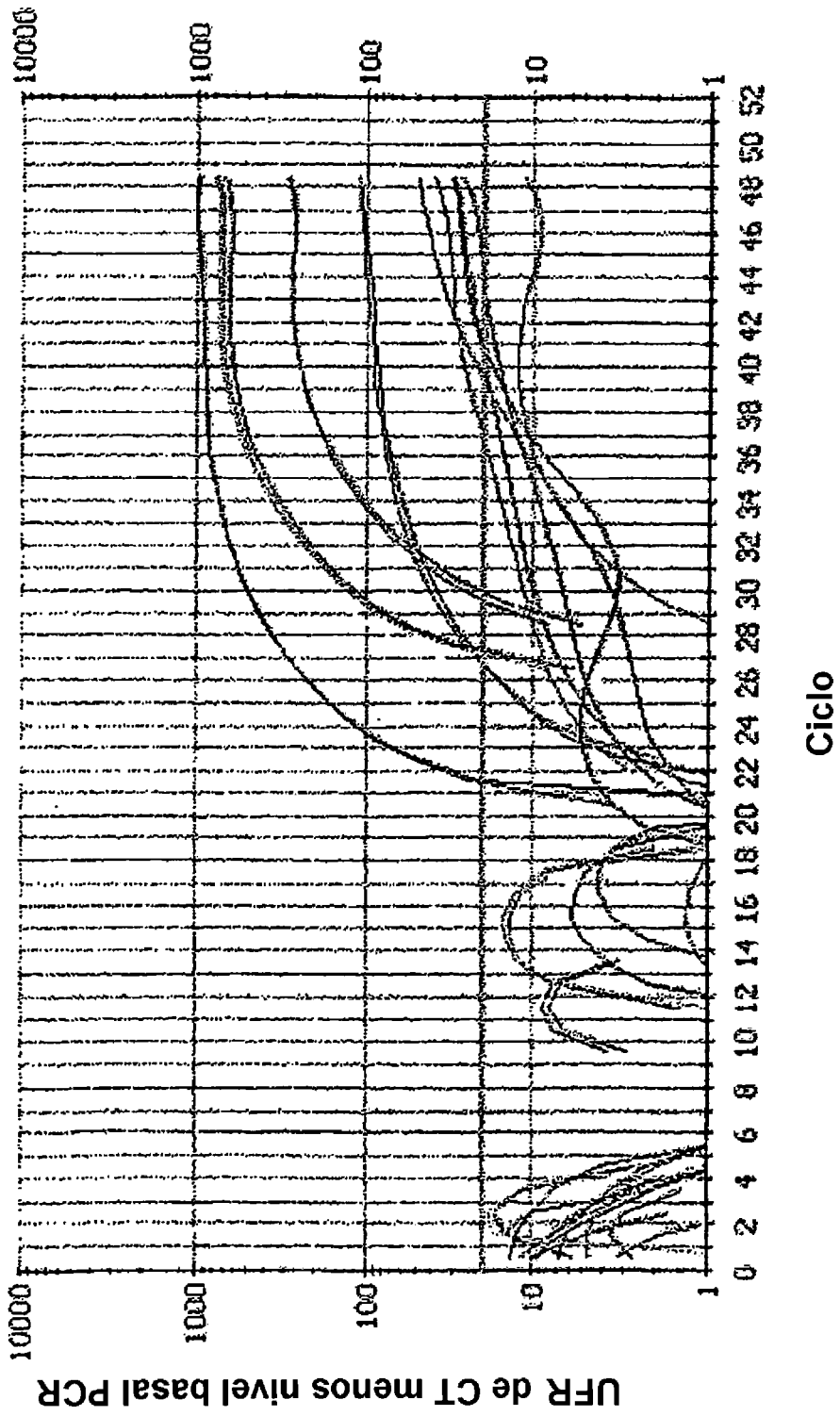


Figura 2B

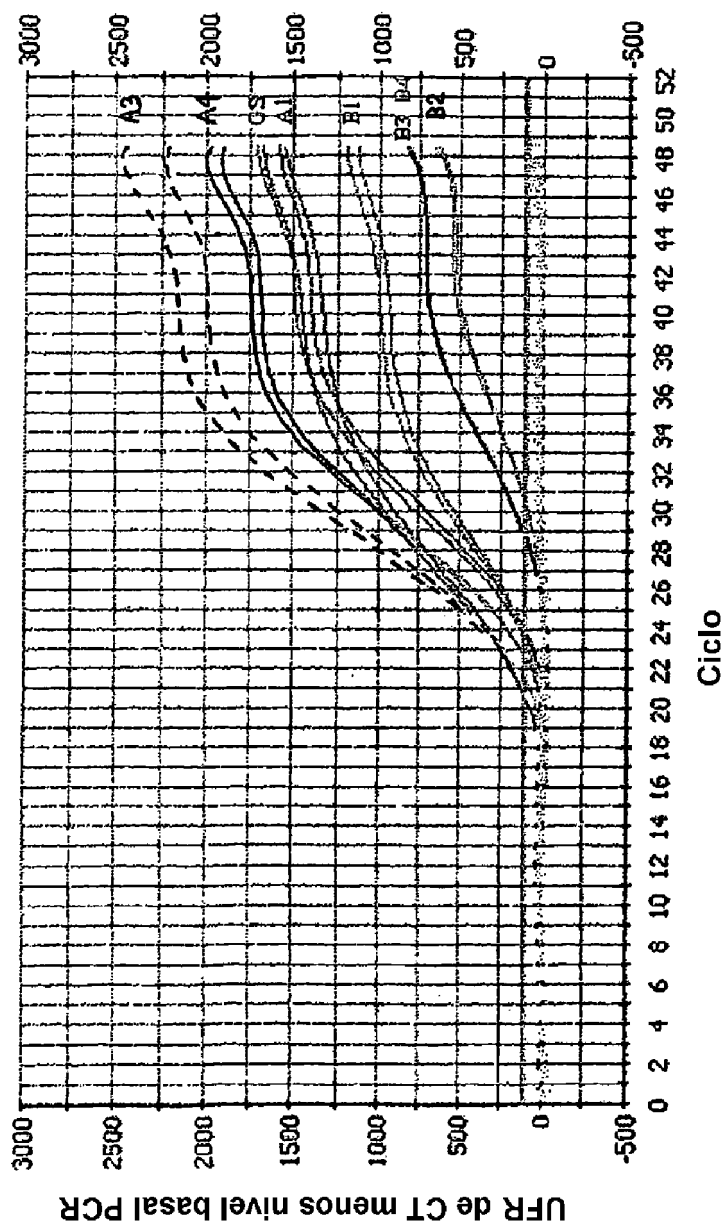


Figura 3

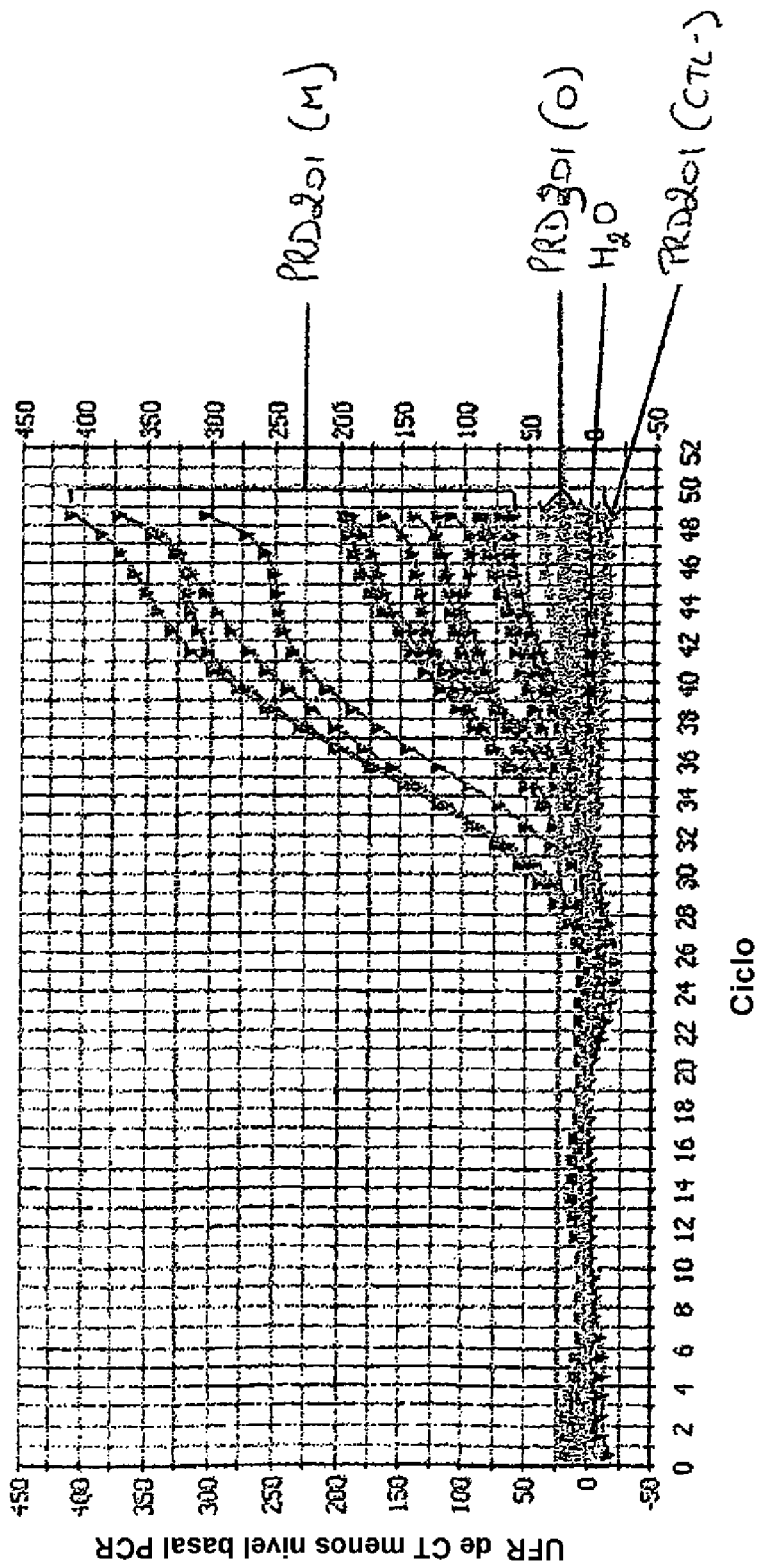
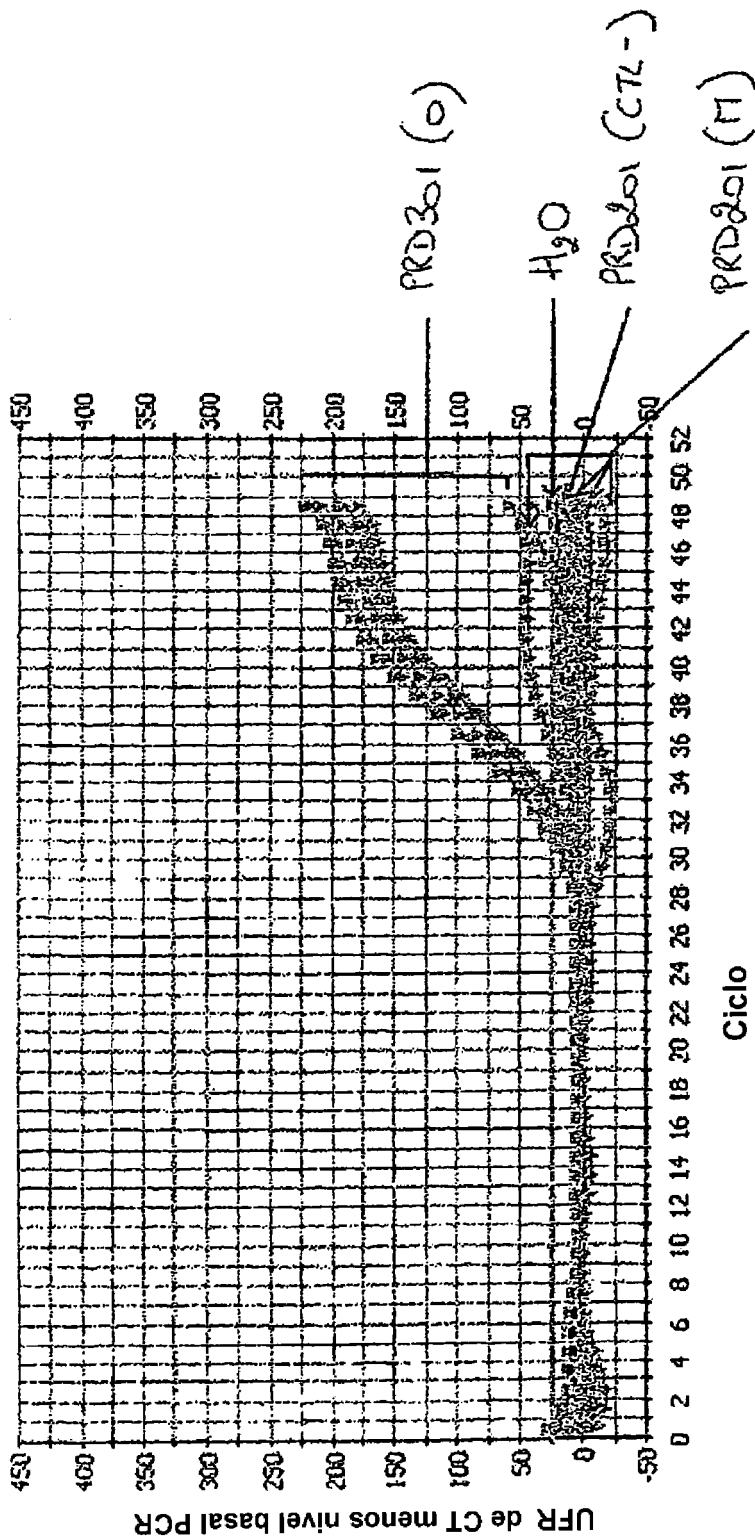


Figura 4A



**Figura 4B**

FIGURA 5A. Diana VIH1 - M con 10000 cop, 1000, 100 y 10 cop/PCR y controles negativos

DETECCIÓN CON FAM

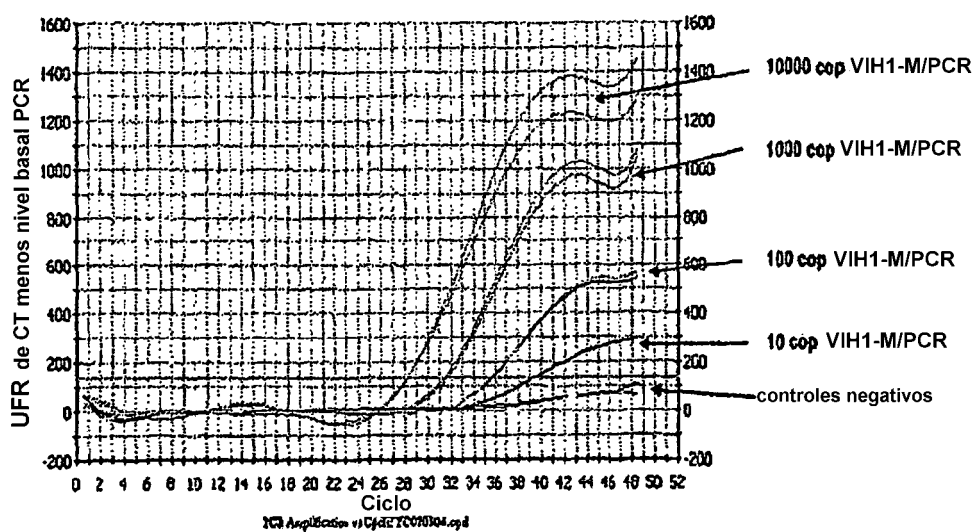


FIGURA 5B. Diana VIH2 - A - dil 1/300, 1/3000, 1/30000 y controles negativos

DETECCIÓN CON ROX

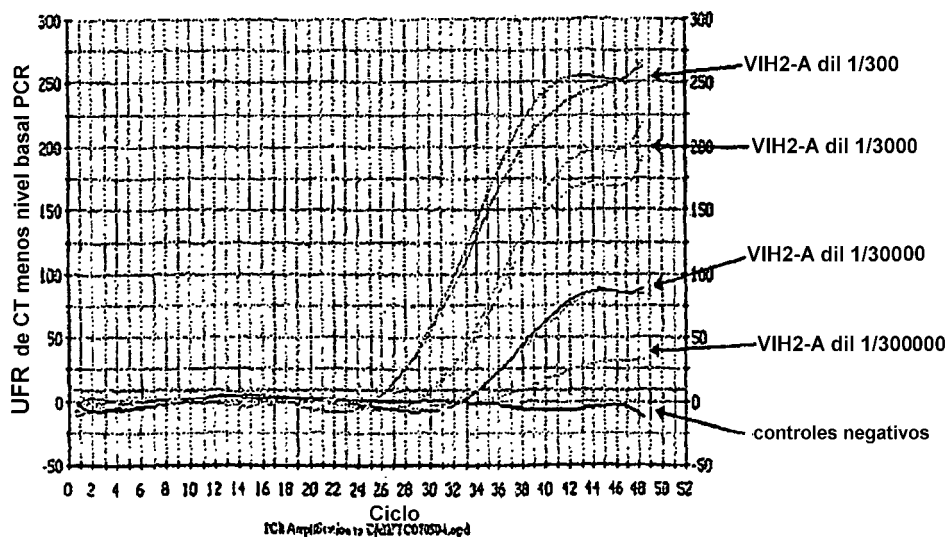


FIGURA 6A: Experimento a) con diana VIH2 dil 1/300, 1/3000, 1/30000

DETECCIÓN CON ROX

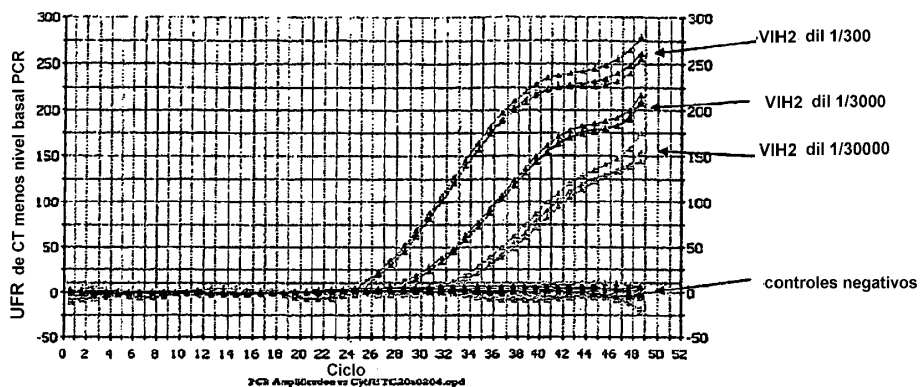


FIGURA 6B. Experimento b) con diana VIH2 dil 1/300, 1/3000, 1/30000 + CI 10<sup>6</sup> cop/PCR

DETECCIÓN CON ROX

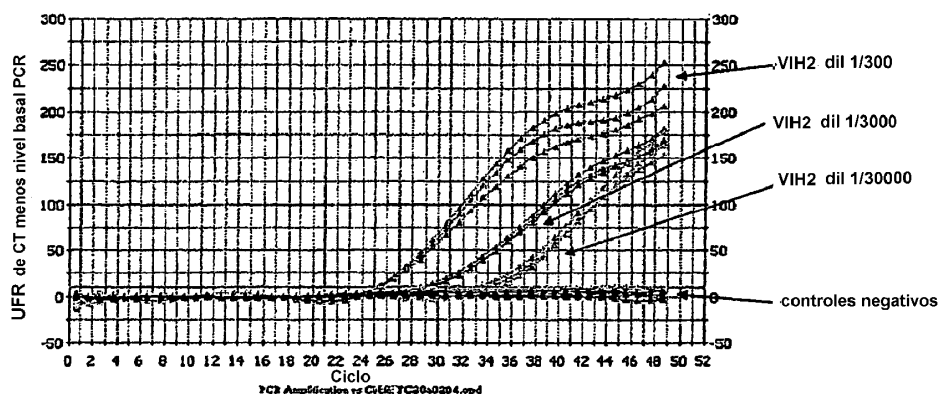
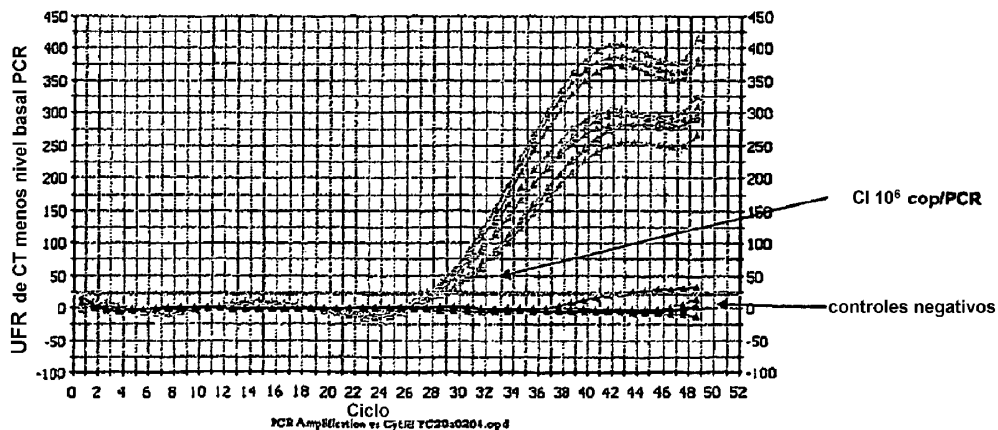


FIGURA 6C. Experimento b) con CI 10<sup>6</sup> cop/PCR + diana VIH2 dil 1/300, 1/3000, 1/30000

DETECCIÓN CON TAMRA



SEC ID N°	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Función preferida	Comentario	Posiciones
1		ggagg aatgaaacaa gtagataaat tagtcagtcg tggaaicagg aaagtaactat tttagatgg aatagataag gcccaagatg aacatgagaa atatacacagt aattggagag caatggctag tgaatttaac ctagccaccig tagtagcaaa agaaatagta gccagctgig ataaatgtca gctaaaagga gaagccatgc atggacaagt agactgtagt ccaggaatat ggcaactaga ttgtacacat ttgaa	Amplicón VIH1-M		4176 - 4436
2		aattggagag caatggctag tgaatttaac ctagccaccig tagtagcaaa agaaatagta gccagctgig ataaaatgca gctaaaagga gaagccatgc alggacaagt agactgtagt ccaggaatat ggcaactaga ttgtacacat ttgaa	Amplicón VIH1-M		4281 - 4436
3		ggaggaaatg aaaaaataga taaattagta agcaaggata ttagaagagt ccigtcccta gaaggaaatag accaggcaca agaagatcat gaaaaatctc atagtaaitg gaagccacta gctagtgaat ttggactacc accagtggig gccaaaggaaa tcatgtctag ctgtcctaaa tgtcalataa aeggggaagc aattcatggt caggtagact gcaqtcaga agtatggcaa atagatgca cactatgga a	Amplicón VIH1-O		4231 - 4491
4		aattg gaaagcacia gctagtgaat ttggactacc accagtggig gccaaaggaaa tcattgctag ctgtcctaaa tgcataata aaggggaagc aattcatggt caggtagact gcagtcaga atgtatggcaa atagatgca cactatgga a	Amplicón VIH1-O		4336 - 4491
5		a ggaaggcaga cagcactct cctaltaaaa ciggccagta ggtggccaat aacgcactig cacacagaca agggcccaa ctcactfca caggaaatga agatggggc atgggggga ggtatagaac aatccttgg agtacc ggagg aatgaaacaa gtagataaat tagtcagtcg tggaaicagg aaagtaactat tttagatgg aatagataag gcccaagatg aacatgagaa atatacacagt aattggagag caatggctag tgaatttaac ctagccaccig tagtagcaaa agaaatagta gccagctgig ataaatgtca gctaaaagga gaagccatgc alggacaagt agactgtagt ccaggaatat ggcaactaga ttgtacaca	Amplicón VIH2		4889 - 5036
305			Amplicón VIH1-M		4176-4429

FIGURA 7

306	aatggagag caatggctag tgaatttaac ctgccacctg tagtagcaaa agaaaatagta gccagctgtg ataaatgca gctaaaagga gaagccaatgc alggacaagt agacigtagt ccaggaatat ggcaactaga ttgtacaca	Amplificón VIH1-M	4281-4429
307	tggagag caatggctag tgaatttaac ctgccacctg tagtagcaaa agaaaatagta gccagctgtg ataaatgca gctaaaagga gaagccaatgc alggacaagt agacigtagt ccaggaatat ggcaactaga ttgtacaca	Amplificón VIH1-M	4283-4429
308	tggagag caatggctag tgaatttaac ctgccacctg tagtagcaaa agaaaatagta gccagctgtg ataaatgca gctaaaagga gaagccaatgc alggacaagt agacigtagt ccaggaatat ggcaactaga ttgtacaca t	Amplificón VIH1-M	4283-4431
309	ggaggaaatg aaaaaataga taatagta agcaaggata ttagaagagt ccgttccia gaaggaatag accaggaca agagatcat gaaaatattc atagtaatg gaaagcacta gctagtaat tggactacc accagtggtg gccaggaaa tcaatgctag ctgtctaaa tgcataataa aaggggaagc aatitcaatggt caggtagact gcagtcacaga agtatggcaa atagattgca caca	Amplificón VIH1-O	4231-4484 4336-4484
310	aatfg gaaagcacta gctagtaat tggactacc accagtggtg gccaaaggaaa tcaatgctag ctgtctaaa tgcataataa aaggggaagc aatitcaatggt caggtagact gcagtcacaga agtatggcaa atagattgca caca	Amplificón VIH1-O	
311	tfg gaaagcacta gctagtaat tggactacc accagtggtg gccaaaggaaa tcaatgctag ctgtctaaa tgcataataa aaggggaagc aatitcaatggt caggtagact gcagtcacaga agtatggcaa atagattgca caca	Amplificón VIH1-O	4338-4484

FIGURA 7 (fin)

SEC ID N°	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Función preferida	Comentario	Posiciones
6	H1B1f	GGAGGAAATGAACAAGTAGATAAA	Cebador directo VIH1 - M		4176 - 4199
7	H1B4f	TTGGAGAGCAATGGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - M		4283 - 4303
8	H1B25f	TTGGAGAGCAATGGCTAATGA	Cebador directo VIH1 - M		4283 - 4303
9		TTGGAGAGCAATGGCTARTGA	Cebador directo VIH1 - M	d	4283 - 4303
10	H1B11f	AATTGGAGAGCAATGGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - M	e	4281 - 4303
11	H1B13f	AATTGGAGAGCAATGGCTAA TGA	Cebador directo VIH1 - M	e	4281 - 4303
12		AATTGGAGAGCAATGGCTARTGA	Cebador directo VIH1 - M	d	4281 - 4303
13	H1B14f	AATTGGAGAGCAATGGCTAITGA	Cebador directo VIH1 - M	e, i	4281 - 4303
14	H1B12f	TCACTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - M	e, l	4281 - 4303
15		TCATTAAATTGGAGAGCAATGGCTAA TGA	Cebador directo VIH1 - M	e, l	4281 - 4303

FIGURA 8

SEC ID N°	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Función preferida	Comentario	Posiciones
16	H1B10r	TGTGTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M		4429 - 4408
17	H1B32r	TGTGTACAAATCTAA TTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M		4429 - 4408
18	H1B33r	TGTGTACAAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M		4429 - 4408
19		TGTGTGCAATCTAA TTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M		4429 - 4408
20		TGTGTIRCAAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d	4429 - 4408
21		TGTGTGCAATCTARTTGGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d	4429 - 4408
22		TGTGTIRCAAATCTAA TTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d	4429 - 4408
23		TGTGTACAAATCTARTTGGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d	4429 - 4408
24		TGTGTIRCAAATCTARTTGGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d	4429 - 4408
25	H1B16r	AATGTGTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e	4431 - 4408
26	H1B19r	TTCTAAAATGTGTACAAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e	4436 - 4408
27	H1B20r	TTCTAAAATGTGTACAAATCTAA TTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e	4436 - 4408
28		TTCTAAAATGTGTGCAATCTAA TTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e	4436 - 4408
29		TTCTAAAATGTGTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e	4436 - 4408
30		TTCTAAAATGTGTIRCAAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
31		TTCTAAAATGTGTGCAATCTARTTGGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
32		TTCTAAAATGTGTIRCAAATCTAA TTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
33		TTCTAAAATGTGTACAAATCTARTTGGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
34		TTCTAAAATGTGTIRCAAATCTARTTGGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
35		TTCTAGATGTGTACAAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e	4436 - 4408
36		TTCTAGATGTGTACAAATCTAA TTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e	4436 - 4408
37		TTCTAGATGTGTGCAATCTAA TTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e	4436 - 4408
38	H1B22r	TTCTAGATGTGTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e	4436 - 4408
39		TTCTAGATGTGTIRCAAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
40		TTCTAGATGTGTGCAATCTARTTGGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
41		TTCTAGATGTGTIRCAAATCTAA TTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
42		TTCTAGATGTGTACAAATCTARTTGGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
43		TTCTAGATGTGTIRCAAATCTARTTGGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408

FIGURA 9

44			TTCTARATGTTGACAAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
45			TTCTARATGTTGACAAATCTAAITGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
46			TTCTARATGTTGCAATCTAAITGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
47			TTCTARATGTTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
48			TTCTARATGTTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
49			TTCTARATGTTGCAATCTARTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
50			TTCTARATGTTGCAATCTARTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
51			TTCTARATGTTGCAATCTARTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
52			TTCTARATGTTGCAATCTARTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e	4436 - 4408
53	534		TGTGTCAATCTAITGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	i	4429 - 4408
54	535		AATGTGTCAATCTAITGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e, i	4431 - 4408
55	H1B23r		TTCTAATGTTGCAATCTAITGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e, i	4436 - 4408
56	H1B21r		TATGGCTTCTAAATGTTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e, i	4436 - 4408
57			TATGGCTTCTAAATGTTGCAATCTAAITGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e, i	4436 - 4408
58			TATGGCTTCTAAATGTTGCAATCTARTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, i	4436 - 4408
59			TATGGCTTCTAAATGTTGCAATCTAAITGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e, i	4436 - 4408
60			TATGGCTTCTAAATGTTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e, i	4436 - 4408
61			TATGGCTTCTAAATGTTGCAATCTARTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, i	4436 - 4408
62			TATGGCTTCTAAATGTTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, i	4436 - 4408
63			TATGGCTTCTAAATGTTGCAATCTARTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, i	4436 - 4408
64			TATGGCTTCTAAATGTTGCAATCTAAITGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, i	4436 - 4408
65			TATGGCTTCTAGATGTTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e, i	4436 - 4408
66			TATGGCTTCTAGATGTTGCAATCTAAITGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e, i	4436 - 4408
67			TATGGCTTCTAGATGTTGCAATCTARTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, i	4436 - 4408
68			TATGGCTTCTAGATGTTGCAATCTAAITGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e, i	4436 - 4408
69			TATGGCTTCTAGATGTTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	e, i	4436 - 4408
70			TATGGCTTCTAGATGTTGCAATCTARTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, i	4436 - 4408
71			TATGGCTTCTAGATGTTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, i	4436 - 4408
72			TATGGCTTCTAGATGTTGCAATCTARTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, i	4436 - 4408
73			TATGGCTTCTAGATGTTGCAATCTAAITGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, i	4436 - 4408
74			TATGGCTTCTARATGTTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, i	4436 - 4408

FIGURA 10

75	TATGGCTTCTARATGTGTACAATCTAATTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, l	4436 - 4408
76	TATGGCTTCTARATGTGTACAATCTARTTGGCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, l	4436 - 4408
77	TATGGCTTCTARATGTGTGCAATCTAATTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, l	4436 - 4408
78	TATGGCTTCTARATGTGTGCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, l	4436 - 4408
79	TATGGCTTCTARATGTGTGCAATCTARTTGGCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, l	4436 - 4408
80	TATGGCTTCTARATGTGTRCAATCTAGTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, l	4436 - 4408
81	TATGGCTTCTARATGTGTRCAATCTAATTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, l	4436 - 4408
82	TATGGCTTCTARATGTGTRCAATCTARTTGGCATA	Cebador inverso VIH1 - M	d, e, l	4436 - 4408

FIGURA 11

SEC ID N°	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Función preferida	Comentari o	Posiciones
83		AAAGAAA TAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	e	4329 - 4359
84		AAAGAAA TAGTGCCAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	e	4329 - 4359
85		AAAGAAA TAGTGGCTAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	e	4329 - 4359
86		AAAGAAA TAGTAGCTAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	e	4329 - 4359
87	*	AAAGAAA TAGTGCYAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	e	4329 - 4359
88		AAAGAAA TAGTGCCAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	d, e	4329 - 4359
89		AAAGAAA TAGTRGCTAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	d, e	4329 - 4359
90		AAAGAAA TAGTGCCYAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	d, e	4329 - 4359
91		AAAGAAA TAGTRGCYAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	d, e	4329 - 4359
92	SH1BM4	TGCGCAAA GAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	e, b	4329 - 4359
93		TGCGCAAA GAAATAGTGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	e, b	4329 - 4359
94		TGCGCAAA GAAATAGTGGCTAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	e, b	4329 - 4359
95		TGCGCAAA GAAATAGTAGCTAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	e, b	4329 - 4359
96		TGCGCAAA GAAATAGTGCYAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	d, e, b	4329 - 4359
97		TGCGCAAA GAAATAGTRGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	d, e, b	4329 - 4359
98		TGCGCAAA GAAATAGTRGCTAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	d, e, b	4329 - 4359
99		TGCGCAAA GAAATAGTGCYAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	d, e, b	4329 - 4359
100		TGCGCAAA GAAATAGTRGCYAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	e, b	4329 - 4359
101	SH1BM12	CGCGCAAA GAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	e, b	4329 - 4359
102		CGCGCAAA GAAATAGTGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	e, b	4329 - 4359
103		CGCGCAAA GAAATAGTGGCTAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	e, b	4329 - 4359
104		CGCGCAAA GAAATAGTAGCTAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	e, b	4329 - 4359
105		CGCGCAAA GAAATAGTRGCCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	d, e, b	4329 - 4359
106		CGCGCAAA GAAATAGTRGCTAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	d, e, b	4329 - 4359
107		CGCGCAAA GAAATAGTGCYAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	d, e, b	4329 - 4359
108		CGCGCAAA GAAATAGTRGCYAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	d, e, b	4329 - 4359
109		CGCGCAAA GAAATAGTRGCYAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	d, e, b	4329 - 4359

FIGURA 12

110		ATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
111		ATAGTAGCTAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	4336 - 4359
112		ATAGTGCCAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
113		ATAGTGCTAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
114		ATAGTAGCYAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
115		ATAGTRGCCAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	4336 - 4359
116		ATAGTRGCTAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
117		ATAGTGGCYAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
118		ATAGTRGCTAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
119	SH1BM5	TGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
120		TGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
121		TGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
122		TGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
123		TGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
124		TGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
125		TGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
126		TGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
127		TGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCA	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
128	SH1BM10	CGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
129	SH1BM13	CGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
130	SH1BM14	CGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
131		CGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
132		CGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
133		CGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
134		CGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
135		CGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
136		CGCGCATAGTGCAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
137		ATAGTIGCIAAGCTGTGATAAATGTC	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359
138	SH1BM15	CGCGCATAGTIGCIAAGCTGTGATAAATGTCGCGCG	Sonda VIH1 - M	4335 - 4359

FIGURA 13

SEC ID N°	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Función preferida	Comentario	Posiciones
139	H1 B3f	GGAGGAAATGAAAAATAGATAAA	Cebador directo VIH1 - O		4231 - 4254
140	H1B5f	TTGGAGAG C ACTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O		4338 - 4358
141		TTGGAGAGCATTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O		4338 - 4358
142		TTGAAAAGCAGCTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O		4338 - 4358
143		TTGAAAAGCATTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O		4338 - 4358
144		TTGGAGAGCAYTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d	4338 - 4358
145		TTGGARAGCAGCTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d	4338 - 4358
146		TTGAAAAGCAYTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d	4338 - 4358
147		TTGGARAGCATTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d	4338 - 4358
148		TTGGARAGCAYTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d	4338 - 4358
149	H1B15f	AATTGGAGAGCATTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	e	4336 - 4358
150	H1B16f	AATTGGAAAAGCAGCTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	e	4336 - 4358
151	H1B17f	AATTGGAAAAGCATTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	e	4336 - 4358
152		AATTGGAGAGCAGCTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	e	4336 - 4358
153		AATTGGARAGCAGCTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d, e	4336 - 4358
154		AATTGAAAAGCAYTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d, e	4336 - 4358
155		AATTGGARAGCATTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d, e	4336 - 4358
156		AATTGGARAGCAYTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d, e	4336 - 4358
157		AATTGGARAGCAYTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d, e	4336 - 4358
158	H1B18f	AATTGGAIAGCAITAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	e, i	4336 - 4358
159		TCACTAA TTGGAGAGCATTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	e, i	4336 - 4358
160		TCACTAA TTGAAAAGCAGCTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	e, i	4336 - 4358
161		TCACTAA TTGAAAAGCATTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	e, i	4336 - 4358
162		TCACTAA TTGGAGAGCAGCTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	e, i	4336 - 4358
163		TCACTAA TTGGARAGCAGCTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d, e, i	4336 - 4358
164		TCACTAA TTGAAAAGCAYTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d, e, i	4336 - 4358
165		TCACTAA TTGGARAGCATTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d, e, i	4336 - 4358
166		TCACTAA TTGGARAGCAYTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d, e, i	4336 - 4358
167		TCACTAA TTGGARAGCAYTAGCTAGTGA	Cebador directo VIH1 - O	d, e, i	4336 - 4358

FIGURA 14

SEC ID N°	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Función preferida	Comentario	Posiciones
168	H1B13r	TGTGTGCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O		4484 - 4463
169		TGTGTACAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O		4484 - 4463
170		TGTGTRCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O		4484 - 4463
171	H1B24r	TTCTAAATGTGTACAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	e	4491 - 4463
172	H1B25r	TTCTAGATGTGTGCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	e	4491 - 4463
173		TTCTAAATGTGTGCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	e	4491 - 4463
174		TTCTAGATGTGTACAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	e	4491 - 4463
175		TTCTARATGTGTACAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	d, e	4491 - 4463
176		TTCTARATGTGTGCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	d, e	4491 - 4463
177		TTCTAAATGTGTGTRCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	d, e	4491 - 4463
178		TTCTAGATGTGTGTRCMTCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	d, e	4491 - 4463
179		TTCTARATGTGTGTRCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	e	4491 - 4463
180	H1B26r	TTCTAATGTGTGCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	e, i	4491 - 4463
181		TATGGCTTCTAAATGTGTACAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	e, i	4491 - 4463
182		TATGGCTTCTAGATGTGTGCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	e, i	4491 - 4463
183		TATGGCTTCTAAATGTGTGCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	e, i	4491 - 4463
184		TATGGCTTCTAGATGTGTACAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	e, i	4491 - 4463
185		TATGGCTTCTARATGTGTACAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	d, e, i	4491 - 4463
186		TATGGCTTCTARATGTGTGCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	d, e, i	4491 - 4463
187		TATGGCTTCTAAATGTGTGTRCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	d, e, i	4491 - 4463
188		TATGGCTTCTAGATGTGTGTRCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	d, e, i	4491 - 4463
189		TATGGCTTCTARATGTGTGTRCAATCTATTTGCCATA	Cebador inverso VIH1 - O	d, e, i	4491 - 4463

FIGURA 15

SEC ID N°	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Función preferida	Comentario	Posiciones
190		GAAATCATTGCTAGTTGTCCTAAATGTCATAT	Sonda VIH1 - O		4387 - 4417
191	SH1B02	TGCGCGAAATCATTGCTAGTTGTCCTAAATGTCATATGCGCA	Sonda VIH1 - O	b	4387 - 4417
192	SH1B07	CGCGCGAAATCATTGCTAGTTGTCCTAAATGTCATATGCGCG	Sonda VIH1 - O	b	4387 - 4417
193		AGTCTACCTGACCATGAAATGCTTCCCCCTTTTA	Sonda VIH1 - O		4449 - 4417
194	SH1B010	CGCGCAAGTCTACCTGACCATGAAATGCTTCCCCCTTTTATGCGCG	Sonda VIH1 - O	b	4449 - 4417

FIGURA 16

SEC ID N°	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Función preferida	Comentario	Posiciones
195	H2A3f	AGGAAGRCARACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
196	H2A9f	AGGAAGGCAAAACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2	c	4889 - 4913
197		AGGAAGACARACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
198		AGGAAGGCARACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
199		AGGAAGACAAACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
200		AGGAAGGCAGACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
201		AGGAAGACAGACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
202		AGGAAGRCAAACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
203		AGGAAGRCAGACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
204	H2A10f	AGGAAGACAGACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2	c	4889 - 4913
205		AGGAAGRCARACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
206		AGGAAGACAAACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
207		AGGAAGGCAGACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
208		AGGAAGGCAAAACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
209		AGGAAGRCAGACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
210		AGGAAGRCAAACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
211		AGGAAGACARACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
212		AGGAAGGCARACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
213		AGGAAGACAAACAGCWCTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
214		AGGAAGGCAGACAGCWCTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
215		AGGAAGACAGACAGCWCTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
215		AGGAAGGCAAAACAGCWCTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
217		AGGAAGRCAGACAGCWCTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
218		AGGAAGRCAAACAGCWCTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
219		AGGAAGACARACAGCWCTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
220		AGGAAGGCARACAGCWCTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
221		AGGAAGRCARACAGCWCTCTTC	Cebador directo VIH2	d	4889 - 4913
222	539	CAGGAAGICAACAGCICTCTTCCT	Cebador directo VIH2	e, i	4888 - 4915

FIGURA 17

223	H2A7f	GAAGAGAGGAAGRCARACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
224		GAAGAGAGGMGACAAACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
225		GAAGAGAGGAAGGCAGACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
226		GAAGAGAGGAAGGCACAAACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
227		GAAGAGAGGAAGACAGACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
228		GAAGAGAGGAAGACARACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
229		GAAGAGAGGAAGGCARACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
230		GAAGAGAGGAAGRCACAAACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
231		GAAGAGAGGAAGRCAGACAGCACTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
232		GAAGAGAGGAAGRCARACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
233		GAAGAGAGGAAGACAAACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
234		GAAGAGAGGAAGGCAGACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
235		GAAGAGAGGAAGGCACAAACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
236		GAAGAGAGGAAGACAGACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2		4889 - 4913
237		GAAGAGAGGAAGACARACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
238		GAAGAGAGGAAGRCARACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
239		GAAGAGAGGAAGRCACAAACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
240		GAAGAGAGGAAGRCAGACAGCTCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
241		GAAGAGAGGAAGACAAACAGCWCCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
242		GAAGAGAGGAAGGCAGACAGCWCCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
243		GAAGAGAGGAAGGCACAAACAGCWCCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
244		GAAGAGAGGAAGACAGACAGCWCCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
245		GAAGAGAGGAAGACARACAGCWCCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
246		GAAGAGAGGAAGGCARACAGCWCCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
247		GAAGAGAGGAAGRCACAAACAGCWCCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
248		GAAGAGAGGAAGRCAGACAGCWCCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913
249		GAAGAGAGGAAGRCARACAGCWCCTCTTC	Cebador directo VIH2	d, l	4889 - 4913

FIGURA 18

SEC ID N°	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Función preferida	Comentario	Posiciones
250	H2A3r	GGTACTCCRAAGGTTTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
251		GGTACTCCRAAGGATTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
252		GGTACTCCRAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
253		GGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
254		GGTACTCCRAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
255		GGTACTCCRAAGGTTTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
256		GGTACTCCRAAGGATTGYTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
257		GGTACTCCRAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
258	H2A8r	GGTACTCCAAAGGATTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	c	5036 - 5014
259		GGTACTCCAAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
260		GGTACTCCAAAGGTTTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
261		GGTACTCCAAAGGTTGYTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
262		GGTACTCCAAAGGATTGYTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
263		GGTACTCCAAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
264		GGTACTCCAAAGGTTTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
265		GGTACTCCAAAGGATTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
266		GGTACTCCAAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
267	H2A9r	GGTACTCCGAAGGTTTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	c	5036 - 5014
268		GGTACTCCGAAGGATTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
269		GGTACTCCGAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
270		GGTACTCCGAAGGATTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
271		GGTACTCCGAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
272		GGTACTCCGAAGGTTTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
273		GGTACTCCGAAGGTTGYTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
274		GGTACTCCGAAGGATTGYTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
275		GGTACTCCGAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
276		GGTACTCCRAAGGTTGYTCTAT	Cebador inverso VIH2	d	5036 - 5014
277	H2A10r	GGTACTCCIAAGGTTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	i	5036 - 5014

FIGURA 19

278	n° 538	GGTACTCCJAAGGIITGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	i	5036 - 5014
279	H2A7r	ATAGAACGGTACTCCRAAGGTTTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	d, l	5036 - 5014
280		ATAGAACGGTACTCCGAAGGTTTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
281		ATAGAACGGTACTCCRAAGGATTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	d, l	5036 - 5014
282		ATAGAACGGTACTCCAAAAGGWTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	d, l	5036 - 5014
283		ATAGAACGGTACTCCAAAAGGTTTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
284		ATAGAACGGTACTCCAAAAGGATTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
285		ATAGAACGGTACTCCGAAGGATTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
286		ATAGAACGGTACTCCGAAGGWTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	d, l	5036 - 5014
287		ATAGAACGGTACTCCRAAGGWTGTTCTAT	Cebador inverso VIH2	d, l	5036 - 5014
288		ATAGAGCGGTACTCCRAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d, l	5036 - 5014
289		ATAGAGCGGTACTCCRAAGGATTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d, l	5036 - 5014
290		ATAGAGCGGTACTCCAAAAGGATTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
291		ATAGAGCGGTACTCCAAAAGGWTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d, l	5036 - 5014
292		ATAGAGCGGTACTCCAAAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
293		ATAGAGCGGTACTCCGAAGGTTTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
294		ATAGAGCGGTACTCCGAAGGATTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2		5036 - 5014
295		ATAGAGCGGTACTCCGAAGGWTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d, l	5036 - 5014
296		ATAGAGCGGTACTCCRAAGGWTGCTCTAT	Cebador inverso VIH2	d, l	5036 - 5014

FIGURA 20

SEC ID N°	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Función preferida	Comentario	Posiciones
297		GGCCAATAACACACTTGCACACA	Sonda VIH2 - A		4932 - 4956
293	SH2A9a	AGCGCGCCAATAACACACTTGCACACAGCGCT	Sonda VIH2 - A	b	4932 - 4956
299	SH2A14a	CGCGGGCCAATAACACACTTGCACACAGCGCG	Sonda VIH2 - A	b	4932 - 4956
300		GCCTATCACACACCTGCACACA	Sonda VIH2 - B		4933 - 4956
301	SH2A1b	AGCGGCGCTATCACACACCTGCACACAGCGCT	Sonda VIH2 - B	b	4933 - 4956
302	SH2A2b	CGCGGCGCTATCACACACCTGCACACAGCGCG	Sonda VIH2 - B	b	4933 - 4956
303	SH2A3b	CCGCGGCGCTATCACACACCTGCACACAGCGGG	Sonda VIH2 - B	b	4933 - 4956
304	SH2AB	CGCGGGCCCIATACACACITGCACACAGCGCG	sonda VIH2	i	4932 - 4956

FIGURA 21