

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-537652

(P2017-537652A)

(43) 公表日 平成29年12月21日(2017.12.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4 B O 6 3
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 K	4 B O 6 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
C12N 1/20 (2006.01)	C12N 1/20 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-539532 (P2017-539532)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月20日 (2015.10.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月15日 (2017.5.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/056480
 (87) 国際公開番号 W02016/064887
 (87) 国際公開日 平成28年4月28日 (2016.4.28)
 (31) 優先権主張番号 62/066,244
 (32) 優先日 平成26年10月20日 (2014.10.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500169900
 ジェンブローブ・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国カリフォルニア州92121,
 サン・ディエゴ, ジェネティック・センター・ドライブ 10210
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 シェリーセリー, ジジュモン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92129,
 サンディエゴ, クーパー グリーンズ ウェイ 13369

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 赤血球溶解溶液

(57) 【要約】

本発明は、赤血球を溶解し、それによって、寄生生物から標的(例えば、RNA)を、分析に適した形態で放出するための溶解試薬を提供する。その試薬は、少なくとも塩化アンモニウムおよびアニオン性界面活性剤を含み、抗凝固薬を含み得る。その試薬は、赤血球を溶解し、その放出される標的を溶解物中での分解から保護するように働き、そしてその標的の分析のためのその後の工程(例えば、標的捕捉、増幅、検出、または配列決定)と適合性である。

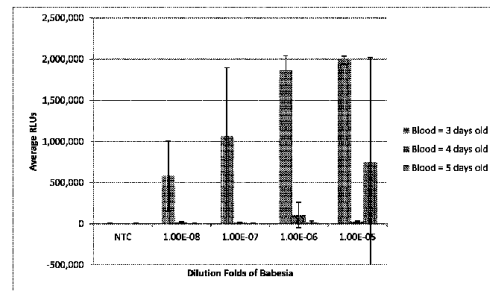


FIG. 1

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
塩化アンモニウム、ラウリル硫酸リチウム（LLS）、および抗凝固薬を含む試薬。
- 【請求項 2】
緩衝剤をさらに含む、請求項 1 に記載の試薬。
- 【請求項 3】
前記緩衝剤は、重炭酸ナトリウムである、請求項 2 に記載の試薬。
- 【請求項 4】
前記緩衝剤の pH は、7 ~ 8 である、請求項 2 または請求項 3 に記載の試薬。
- 【請求項 5】 10
前記抗凝固薬は、EDTA、ヘパリン、またはシトレートである、先行する請求項のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 6】
塩化アンモニウムの濃度は、100 ~ 500 mM である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 7】
塩化アンモニウムの濃度は、200 ~ 300 mM である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 8】 20
塩化アンモニウムの濃度は、250 mM である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 9】
LLS の濃度は、4 ~ 15 % (v/v) である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 10】
LLS の濃度は、5 ~ 8 % (v/v) である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 11】 30
LLS の濃度は、5 % (v/v) である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 12】
重炭酸ナトリウムの濃度は、5 ~ 30 mM である、請求項 3 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 13】
重炭酸ナトリウムの濃度は、10 ~ 20 mM である、請求項 3 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 14】
重炭酸ナトリウムの濃度は、14 mM である、請求項 3 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 15】 40
前記緩衝剤の pH は、7.2 ~ 7.6 である、請求項 3 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 16】
塩化アンモニウムの濃度は、250 mM であり、LLS の濃度は、5 % (v/v) であり、重炭酸ナトリウムの濃度は、14 mM であり、pH は、7.2 ~ 7.6 である、請求項 3 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 17】
前記試薬は、赤血球または赤血球に由来する生成物と混合される、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の試薬。
- 【請求項 18】 50

前記試薬は、全血と混合される、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の試薬。

【請求項 19】

前記試薬は、3 : 1 (v / v) の比で全血と混合される、請求項 18 に記載の試薬。

【請求項 20】

前記全血は、ヒト全血、非ヒト全血、またはこれらの混合物である、請求項 18 または請求項 19 に記載の試薬。

【請求項 21】

赤血球に由来する標的を分析する方法であって、該方法は、

(a) 赤血球と、塩化アンモニウムおよびアニオン性界面活性剤を含む試薬とを接触させる工程であって、該試薬は、該赤血球を溶解し、かつ該赤血球から放出された標的の分解を阻害するために有効である、工程；ならびに

(b) 該赤血球から放出された該標的を分析する工程、を包含する方法。

10

【請求項 22】

前記標的は、病原体由来の標的である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記標的は、RNA である、請求項 21 または請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記赤血球のうちの少なくとも 50% は、5 分またはそれ未満で溶解される、請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 25】

溶解された赤血球のパーセンテージは、溶解された白血球のパーセンテージより高い、請求項 21 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記試薬は、請求項 1 ~ 20 のいずれかに定義されるとおりである、請求項 21 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記標的を分析する工程は、前記放出された標的と、捕捉プローブおよび固定化プローブとを接触させる工程を包含し、該捕捉プローブは、該標的に相補的な第 1 のセグメントおよび該固定化プローブに相補的な第 2 のセグメントを有し、ここで該標的は、該捕捉プローブに結合し、そしてここで該結合された捕捉プローブは、該固定化プローブに結合する、請求項 21 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 28】

前記標的の転写媒介性増幅を行う工程および該得られた増幅生成物を検出プローブで検出する工程をさらに包含する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記試薬を、前記赤血球から放出された前記標的から分離するための遠心分離工程なしで行われる、請求項 21 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記標的は、Babesia 属の病原性生物に由来する 18S rRNA である、請求項 21 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 31】

前記病原性生物は、種 Babesia microti のものである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

検出限界は、全血 1 mL あたり Babesia microti 18S rRNA の少なくとも 2×10^3 コピーである、請求項 31 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

50

(背景)

血液中のRNAを検出するための市販のアッセイが存在するが、このようなアッセイにおいて検出されるRNAは、通常、細胞外形態で存在する（例えば、血液中のHIVまたはHCV粒子）。赤血球内からのRNAまたは他の標的分子の検出は、より困難だがやりがいがある。溶解によって放出される多くの非標的分子、特に、ヌクレアーゼまたはプロテアーゼは標的分子を分解し得るので、溶解に使用される試薬は、その後の加工処理を妨げ得る。

【0002】

RNAの本質的な不安定性および全血中のRNaseの存在は、RNAの単離を困難な仕事にする。高純度の無傷のRNAの使用は、感度の高い臨床診断アッセイを容易にする。既存のアプローチは、代表的には、いくつかの一連の工程を要する：細胞を破壊する工程、タンパク質を変性する工程、RNAの安定化およびRNaseからの保護のための別の工程、ならびに、その後、RNAを単離するための工程。

テトラデシルトリメチルアンモニウムオキサレート(TDTMAO)は、血液の輸送、貯蔵および加工処理のために一般に使用される（米国特許第6,602,718号および同第6,617,170号）。この四級アミンは、例えば、PAXgeneTM Blood RNA System(BD Biosciences)の中に含まれ、細胞に浸透し、細胞内標的RNAを安定化することによって働く。そのRNAは、次いで、後に、標準的技術を使用して、全血の成分から精製および分析され得る。細胞を溶解し、グアニジニウム塩を使用してRNaseを阻害するための方法もまた、公知である（Chomczynskiら(1987) Anal. Biochem. 162, 156-159）。

ヒトバベシア症は、赤血球のダニ媒介性赤血球内感染から生じる新興感染症である。Babesia microtiは、米国におけるバベシア症の最も一般的な原因であり、北東部の州および北中西部の州では、広く流行している。この種は、米国での輸血感染性バベシア症(TTB)の症例の大部分に関係付けられており、現在、FDAに最も多く報告されている輸血感染性疾患である。2005~2010年の間に、FDAに報告された輸血関連死のうちの3.6%は、TTBが原因であった。しかし、この因子が米国の血液供給に与えるリスクにも拘わらず、今日までにBabesiaの血液スクリーニングのためにFDAが認可した検査は存在しない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】米国特許第6,602,718号明細書

【特許文献2】米国特許第6,617,170号明細書

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Chomczynskiら(1987) Anal. Biochem. 162, 156-159

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

(特許請求される発明の要旨)

本発明は、塩化アンモニウム、ラウリル硫酸リチウム(LLS)、および抗凝固薬を含む試薬を提供する。一部の実施形態では、前記試薬は、緩衝剤をさらに含む。一部の実施形態では、前記緩衝剤は、重炭酸ナトリウムである。一部の実施形態では、前記緩衝剤のpHは、7~8または7.2~7.6である。一部の実施形態では、前記抗凝固薬は、EDTA、ヘパリン、またはシトレートである。

【0006】

一部の実施形態では、前記試薬中の塩化アンモニウムの濃度は、100~500mM、

10

20

30

40

50

200 ~ 300 mM または 250 mM である。一部の実施形態では、前記試薬中の L L S の濃度は、4 ~ 15 % (v / v)、5 ~ 8 % (v / v) または 5 % (v / v) である。一部の実施形態では、前記試薬中の重炭酸ナトリウムの濃度は、5 ~ 30 mM、10 ~ 20 mM または 14 mM である。一部の実施形態では、塩化アンモニウムの濃度は、250 mM であり、L L S の濃度は、5 % (v / v) であり、重炭酸ナトリウムの濃度は、14 mM であり、pH は、7.2 ~ 7.6 である。

【0007】

一部の実施形態では、前記試薬は、赤血球または赤血球に由来する生成物と混合される。一部の実施形態では、前記試薬は、全血と混合される。一部の実施形態では、前記試薬は、3 : 1 (v / v) の比で全血と混合される。一部の実施形態では、前記全血は、ヒト全血、非ヒト全血、またはこれらの混合物である。

10

【0008】

本発明はさらに、赤血球に由来する標的を分析する方法を提供し、該方法は、(a) 赤血球と、塩化アンモニウムおよびアニオン性界面活性剤を含む試薬とを接触させる工程であって、該試薬は、該赤血球を溶解し、かつ該赤血球から放出された標的の分解を阻害するために有効である、工程；ならびに (b) 該赤血球から放出された該標的を分析する工程を包含する。

【0009】

一部の方法では、前記標的は、病原体由来の標的である。一部の方法では、前記標的は、RNA である。

20

【0010】

一部の方法では、前記赤血球のうちの少なくとも 50 % は、5 分またはそれ未満で溶解される。一部の方法では、溶解された赤血球のパーセンテージは、溶解された白血球のパーセンテージより高い。

【0011】

一部の方法では、前記標的を分析する工程は、前記放出された標的と、捕捉プローブおよび固定化プローブとを接触させる工程を包含し、該捕捉プローブは、該標的に相補的な第 1 のセグメントおよび該固定化プローブに相補的な第 2 のセグメントを有し、ここで該標的は、該捕捉プローブに結合し、そしてここで該結合された捕捉プローブは、該固定化プローブに結合する。一部の方法は、前記標的の転写媒介性増幅を行う工程および該得られた増幅生成物を検出プローブで検出する工程をさらに包含する。

30

【0012】

一部の方法は、前記試薬を、前記赤血球から放出された前記標的から分離するための遠心分離工程なしで行われる。

【0013】

一部の方法では、前記標的は、B a b e s i a 属の病原性生物に由来する 18 S r R N A である。一部の方法では、前記病原性生物は、種 B a b e s i a m i c r o t i のものである。一部の方法では、検出限界は、全血 1 mL あたり B a b e s i a m i c r o t i 18 S r R N A の少なくとも 2×10^3 コピーの B a b e s i a である。

【図面の簡単な説明】

40

【0014】

【図 1】図 1 は、B a b e s i a 感染ハムスター血液を添加 (spike) したヒト全血中の B a b e s i a 18 S r R N A の検出を示す。サンプルを、250 mM の濃度の緩衝塩化アンモニウム (A C L) の溶解試薬で溶解した。B a b e s i a 18 S r R N A を、P r o c l e i x 標的捕捉試薬 (T C R) および転写媒介性増幅 (T M A) を使用して検出した。

【0015】

【図 2 a】図 2 a、2 b および 2 c は、種々の溶解試薬の分析、およびそれら試薬が分析のために T C R に加えられたときの、細胞沈殿も、細胞集塊化も、細胞デブリも、磁性ビーズ喪失も引き起こすことなく、全血サンプルを溶解するその能力を示す。

50

【図2b】図2a、2bおよび2cは、種々の溶解試薬の分析、およびそれら試薬が分析のためにTCRに加えられたときの、細胞沈殿も、細胞集塊化も、細胞デブリも、磁性ビーズ喪失も引き起こすことなく、全血サンプルを溶解するその能力を示す。

【図2c】図2a、2bおよび2cは、種々の溶解試薬の分析、およびそれら試薬が分析のためにTCRに加えられたときの、細胞沈殿も、細胞集塊化も、細胞デブリも、磁性ビーズ喪失も引き起こすことなく、全血サンプルを溶解するその能力を示す。

【0016】

【図3】図3は、種々の溶解試薬の組成、およびBabesia 18S rRNAの検出のために全血サンプルを溶解するためのそれら試薬の潜在的な使用を示す。

【0017】

【図4】図4は、Babesia 18S rRNAを検出する前に全血サンプルを溶解するにあたって使用するためのPTM2.4(250mM ACL、14mM 重炭酸ナトリウム、5% ラウリル硫酸リチウム(LLS))とIC緩衝剤(10% LLS)との間の比較を示す。

【0018】

【図5】図5は、全血サンプル中のBabesia 18S rRNAの検出のための緩衝化ACL溶液におけるLLSの効果を示す。

【0019】

【図6A】図6Aは、Babesia感染ハムスター血液の連続希釈物を添加したヒト全血サンプル中でBabesia 18S rRNAを検出するためのアッセイ感度を示す。サンプルを、検出する前に、緩衝化ACLおよび5% LLSという溶解試薬で溶解した。任意(arbitrary)カットオフ=50,000 RLU;任意の活性>50,000 RLUを、100%反応性とみなす。

【0020】

【図6B】図6Bは、ヒト全血へと添加したBabesia 18S rRNAインビトロ転写物を検出するためのアッセイの感度を示す。添加したサンプルを、検出する前に、緩衝化ACLおよび5% LLSの溶解試薬で溶解した。任意カットオフ=50,000 RLU;任意の活性>50,000 RLUを、100%反応性とみなす。

【0021】

【図7】図7は、Babesia 18S rRNAの検出のためにヒト全血に対する溶解試薬の2つの比の間の比較を示す。緩衝化ACLおよび5% LLSという溶解試薬を、細胞溶解のために使用した。実験において評価したヒト全血対溶解試薬の比は、1:2および1:3(血液:試薬)であった。任意カットオフ=50,000 RLU;任意の活性>50,000 RLUを、100%反応性とみなす。

【0022】

【図8】図8は、6名の異なるドナーから得られたヒト全血サンプル中でBabesia 18S rRNAを検出するためのアッセイの再現性を示す。任意カットオフ=50,000 RLU;任意の活性>50,000 RLUを、100%反応性とみなす。

【0023】

【図9】図9は、ヒト全血中のBabesia寄生生物の安定性を示す。Babesia感染ハムスター血液の連続希釈物を、ヒト全血へと添加した。一方の群を、分析する前に25で5日間貯蔵した。別の群を、寄生生物感染血液を加えた直後に分析した。その感染全血サンプルを、Babesia 18S rRNAを検出する前に、緩衝化ACLおよび5% LLSの溶解試薬で溶解した。任意カットオフ=50,000 RLU;任意の活性>50,000 RLUを、100%反応性とみなす。

【0024】

【図10】図10は、赤血球から放出されたBabesia 18S rRNAの安定性を示す。Babesia感染ハムスター血液の連続希釈物を、ヒト全血へと添加した。サンプルを、緩衝化ACLおよび5% LLSという溶解試薬で溶解した。溶解の後、サンプルを、Babesia 18S rRNAを分析する前に、0日間、1日間、3日間、

10

20

30

40

50

または4日間、4 で貯蔵した。任意カットオフ = 50, 000 RLU ; 任意の活性 > 50, 000 RLUを、100%反応性とみなす。

【発明を実施するための形態】

【0025】

(配列の簡単な説明)

配列番号1は、非T7プライマーの核酸配列を示す。

【0026】

配列番号2は、T7プライマーの核酸配列を示す。

【0027】

配列番号3は、アクリジニウムエステル(AE)プローブの核酸配列を示す。

10

【0028】

配列番号4は、標的捕捉オリゴヌクレオチド(TCO)プローブの核酸配列を示す。

【0029】

配列番号5は、Babesia 18S rRNAのインビトロ転写物コピーの核酸配列を示す。

【0030】

(定義)

病原体とは、ヒトおよび他の動物における疾患の原因となる、ウイルス、細菌、原生動物、真菌、および他の微生物を包含する。

【0031】

20

標的は、単一のタイプの分子(例えば、Babesiaのタンパク質または18S rRNA)、または分子のークラス(例えば、Babesiaに由来する任意のタンパク質もしくはRNA、または赤血球に由来する任意のタンパク質もしくはRNA)であり得る。複数の別個の標的(例えば、RNA標的およびタンパク質標的、または2種の別個のRNA標的(例えば、2種の異なるmRNA標的、もしくはmRNA標的およびrRNA標的))もまた、分析され得る。標的は、赤血球の内因性成分、および感染赤血球の病原性感染の結果として生じ、感染している病原体によって代表的にコードされる成分(すなわち、「病原性」または「病原体由来」標的)を包含する。

【0032】

溶解試薬は、全血または赤血球生成物(例えば、ペレット化赤血球)中の赤血球の溶解を誘導するために有効な、(しばしば溶液の形態で提供される)試薬である。

30

【0033】

赤血球を、血液の他の細胞成分よりも優先的に溶解することは、溶解した赤血球のパーセンテージが、分析されるサンプル中に存在する他の細胞成分(他の細胞タイプは、凝集物中で評価される)のパーセンテージより高いことを意味する。

【0034】

アニオン性界面活性剤(anionic detergent)は、負に荷電した、アニオン性のヘッド基および長い炭化水素テールを有し、しばしばアルカリ金属またはアンモニウムイオンとの塩として提供される化合物である。

【0035】

40

抗凝固薬は、全血の凝固を阻害する。抗凝固薬としては、ヘパリンおよびカルシウムキレート化剤が挙げられる。ヘパリンは、トロンビンおよび血液凝固に關与する他のプロテアーゼの活性を阻害するアンチトロンビンIIIを活性化する。カルシウムキレート化剤(例えば、EDTAおよびシトレート)は、血液凝固に必要とされるカルシウムイオンを結合する。

【0036】

緩衝剤(buffer)とは、溶液のpHを維持するために使用される弱酸または弱塩基をいう。

【0037】

核酸とは、一緒に結合されてポリマーを形成する窒素性複素環式塩基もしくは塩基アナ

50

ログを有する、ヌクレオチドまたはアナログを含むマルチマー化合物（従来のRNA、DNA、混合RNA-DNA、およびこれらのアナログが挙げられる）をいう。

【0038】

この窒素性複素環式塩基は、核酸塩基 (nucleobase) といわれ得る。核酸塩基は、以下であり得る：従来のDNA塩基またはRNA塩基 (A、G、C、T、U)、塩基アナログ (例えば、イノシン、5-ニトロインダゾール-L-ヌクレオチド、および他 (The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adamsら, ed., 11. sup. th ed., 1992; van Aerschotら, 1995, Nucl. Acids Res. 23(21): 4363-70))、イミダゾール-4-カルボキサミド (Nairら, 2001, Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids, 20(4-7): 735-8)、ピリミジンもしくはプリン誘導体 (例えば、修飾ピリミジン塩基 6H, 8H-3, 4-ジヒドロピリミド [4, 5-c] [1, 2] オキサジン-7-オン (ときおり、AまたはGを結合する「P」塩基と表される) および修飾プリン塩基 N6-メトキシ-2, 6-ジアミノプリン (ときおりCまたはTを結合する「K」塩基と表される))、ヒポキサンチン (Hillら, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(8): 4258-63, Lin and Brown, 1992, Nucl. Acids Res. 20(19): 5149-52)、2-アミノ-7-デアザ-アデニン (これはCおよびTと対合する; Okamotoら, 2002, Bioorg. Med. Chem. Lett. 12(1): 97-9)、N-4-メチルデオキシグアノシン (N-4-methyl deoxy guanosine)、4-エチル-2'-デオキシシチジン (Nguyenら, 1998, Nucl. Acids Res. 26(18): 4249-58)、4, 6-ジフルオロベンゾイミダゾールおよび2, 4-ジフルオロベンゼンヌクレオチドアナログ (Kiopffer & Engels, 2005, Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids, 24(5-7) 651-4)、ピレン官能化LNAヌクレオチドアナログ (Babu & Wengel, 2001, Chem. Commun. (Camb.) 20: 2114-5; Hrdlickaら, 2005, J. Am. Chem. Soc. 127(38): 13293-9)、デアザ修飾またはアザ修飾されたプリンおよびピリミジン、5位または6位で置換基を有するピリミジン、および2位、6位または8位で置換基を有するプリン、2-アミノアデニン (nA)、2-チオウラシル (sU)、2-アミノ-6-メチルアミノプリン、O-6-メチルグアニン、4-チオ-ピリミジン、4-アミノ-ピリミジン、4-ジメチルヒドラジン-ピリミジン、ならびにO-4-アルキル-ピリミジン (米国特許第5, 378, 825号; PCT番号WO 93/13121; Gamperら, 2004, Biochem. 43(31): 10224-36)、ならびに水素結合なしの二重鎖DNAを形成する疎水性核酸塩基 (Bergerら, 2000, Nucl. Acids Res. 28(15): 2911-4)。多くの誘導体化および修飾された核酸塩基またはアナログは、市販されている (例えば、Glen Research, Sterling, Va.)。

【0039】

糖に付着した核酸塩基ユニットは、核酸塩基ユニット、またはモノマーといわれ得る。核酸の糖部分は、リボース、デオキシリボース、または類似化合物 (例えば、2'-メトキシまたは2'-ハライド置換を有する) であり得る。ヌクレオチドおよびヌクレオチドは、核酸塩基ユニットの例である。

【0040】

この核酸塩基ユニットは、種々の結合またはコンホメーション (ホスホジエステル、ホスホオチオエートまたはメチルホスホネート結合、ペプチド-核酸結合 (PNA; Nielsenら, 1994, Bioconj. Chem. 5(1): 3-7; PCT番号WO 95/32305)、および二環式フラノースユニットを有するヌクレ

10

20

30

40

50

オチドモノマーがRNA摸倣糖コンホメーションの中にロックされているロックされた核酸 (locked nucleic acid) (LNA) コンホメーション (Vesterå, 2004, Biochemistry 43 (42): 13233-41; Hakansson & Wengel, 2001, Bioorg. Med. Chem. Lett. 11 (7): 935-8)、または核酸鎖の中のこのような結合の組み合わせが挙げられる) によって連結され得る。核酸は、1個もしくはこれより多くの「脱塩基」残基を含み得る。すなわち、その骨格は、1個もしくはこれより多くの位置に窒素性塩基を含まない (米国特許第5,585,481号)。

【0041】

核酸は、従来のRNAまたはDNAの糖、塩基および結合のみを含んでいてもよいし、従来の成分および置換の両方を含んでいてもよい (例えば、2'-O-メチル結合を有する従来のRNA塩基、または従来の塩基およびアナログの混合物)。PNA、2'-メトキシもしくは2'-フルオロ置換されたRNA、または全体的な電荷、電荷密度、もしくはハイブリダイゼーション複合体の立体的な会合に影響を及ぼす構造 (荷電した結合を含むオリゴマー (例えば、ホスホロチオエート) または中性基 (例えば、メチルホスホネート) が挙げられる) を含めることは、核酸によって形成される二重鎖の安定性に影響を及ぼし得る。

【0042】

オリゴマーは、全体的な長さおよび他の特性において実質的に同じであるが、そのオリゴマーのうち少なくとも一部が、特定の長さに対して異なる塩基のランダム組み込みによって合成されているオリゴマーの集団 (例えば、DNAオリゴマー中の全4種の標準的塩基 (A、T、G、およびC) のランダムアソートメント、またはより大きなオリゴマーの規定された部分におけるいくつかの塩基 (UまたはTおよびG) のランダムアソートメント) をいう「ランダムポリマー」配列を含み得る。その得られるオリゴマーは、実際には、メンバーの有限の数が、そのランダム部分を構成する塩基の長さおよび数によって決定されるオリゴマーの集団である (例えば、2種の異なる塩基を使用することによって合成された6ntランダム配列を含むオリゴマーの集団においては 2^6 種のオリゴマー)。

【0043】

核酸の相補性は、核酸の一方の鎖のヌクレオチド配列が、その核酸塩基の基の配向に起因して、対向する核酸鎖上の別の配列に水素結合することを意味する。相補的な塩基は、代表的には、DNAでは、AとTおよびCとGであり、RNAでは、CとG、およびUとAである。相補性は、完全 (すなわち、正確) または実質的 / 十分であり得る。2つの核酸の間の完全な相補性は、その2つの核酸が、二重鎖の中のあらゆる塩基が、ワトソン-クリック対合によって相補的塩基に結合される二重鎖を形成し得ることを意味する。「実質的」または「十分」な相補性は、一方の鎖の配列が対向する鎖の配列に完璧におよび / または完全に相補的であるわけではないが、この2つの鎖上の塩基間でこの十分な結合が起こって、ハイブリダイゼーション条件のセット (例えば、塩濃度および温度) において安定なハイブリッド複合体を形成することを意味する。このような条件は、配列および標準的な数学的計算を使用して、ハイブリダイズされる鎖の T_m を推定することによってか、または慣用的方法を使用することによる T_m の経験的決定によって、推定され得る。 T_m とは、2つの核酸鎖の間で形成されるハイブリダイゼーション複合体の集団が50%変性される温度をいう。 T_m 未満の温度では、ハイブリダイゼーション複合体の形成が有利であるのに対して、 T_m より高い温度では、このハイブリダイゼーション複合体における鎖の融解または分離が有利である。 T_m は、例えば、 $T_m = 81.5 + 0.41 (\% G + C)$ を使用することによって、水性1M NaCl溶液中で既知のG+C含有量を有する核酸に関して概算され得るが、他の公知の T_m 計算法は、核酸の構造特性を考慮に入れる。

【0044】

「分離する」または「単離する」または「精製する」とは、1種またはこれより多くの成分を、複雑な混合物 (例えば、サンプル) から取り出すことをいう。好ましくは、分離

10

20

30

40

50

する工程、単離する工程または精製する工程は、他のサンプル成分から、標的核酸のうち少なくとも70%、好ましくは、少なくとも90%、およびより好ましくは、少なくとも95% w/wを取り出す。分離する工程、単離する工程または精製する工程は、必要に応じて、非標的サンプル成分を除去するために、さらなる洗浄工程を含み得る。

【0045】

捕捉ハイブリッドの「放出」とは、捕捉ハイブリッドの1種またはこれより多くの成分を互いから分離すること、例えば、標的核酸を捕捉プローブから、および/または捕捉プローブを固定化プローブから分離することをいう。標的核酸鎖の放出は、標的を、捕捉ハイブリッドの他の成分から分離し、この標的を、検出プローブへの結合に利用可能にする。この捕捉ハイブリッドの他の成分は、標的検出に影響を及ぼすことなく、例えば、捕捉プローブ鎖を捕捉支持体上の固定化プローブに結合したままにし得る。

10

【0046】

「標識」とは、例えば、検出可能なシグナルを生成する反応を触媒することによって、検出可能な応答またはシグナルを、直接的にまたは間接的に、検出可能であるかまたは生成する分子部分をいう。標識としては、発光部分（例えば、蛍光、生物発光、または化学発光化合物）、放射性同位体、特異的結合対（例えば、ビオチンおよびアビジン）のメンバー、酵素もしくは酵素基質、反応性の基、または発色団（例えば、検出可能な色を生じる色素または粒子）が挙げられる。

【0047】

捕捉プローブは、配列の標的相補性領域を含む第1のセグメント、およびこの捕捉プローブ（またはこの捕捉プローブを含むハイブリダイゼーション複合体）を固定化プローブに付着させるための第2のセグメントを含む。この第1のセグメントは、第1のセグメントおよび標的核酸がハイブリダイズして、ハイブリダイズする条件（例えば、実施例に記載されるもの）下で安定な（すなわち、検出可能な融解点を有する）二重鎖を形成し得るように、特定の標的核酸配列に実質的に相補性であるように構成され得る。あるいは、この第1のセグメントは、ハイブリダイズする条件下で、サンプル中の核酸配列に非特異的に結合するように構成され得る（WO 2008/016988を参照のこと）。この第2のセグメントは、固定化プローブの配列に相補的である配列の領域を含む。好ましくは、キメラ捕捉プローブは、核酸ホモポリマー（例えば、ポリ-Aまたはポリ-T）であって、捕捉プローブの標的相補性領域に共有結合されかつ先に記載される（Weisbur

20

30

40

【0048】

固定化プローブは、支持体に直接的にまたは間接的に結合される核酸を含む。この核酸は、上記捕捉プローブ中の核酸に相補的であるが、上記捕捉プローブにおける長さと同じ長さ（核酸塩基ユニットの数）であってもよいし、そうでなくてもよい。この固定化プローブ中の核酸は、好ましくは、少なくとも6個連続した核酸塩基のユニットを含み、例えば、10~45個または10~40個または10~30個または10~25個または15~25個（両端を含む）のL-核酸塩基ユニットを含み得る。上記核酸は、好ましくはホモポリマーであり、より好ましくは、アデニンまたはチミンのホモポリマーである。固定化プローブの好ましい形態は、アデニン残基のホモポリマーを有する第2のセグメントを含む捕捉プローブと組み合わせて使用するための、14個のチミン残基のホモポリマーで

50

あるか、または14個のチミン残基のホモポリマーを含む。固定化プローブの核酸部分は、代表的には、1本鎖形態で提供されるか、またはそうでなければ、使用前もしくは使用中に、1本鎖形態へと変性される。

【0049】

種々の材料のうちのいずれも、固定化プローブのための支持体（例えば、ニトロセルロース、ナイロン、ガラス、ポリアクリレート、混合ポリマー、ポリスチレン、シランポリプロピレン、および磁気で引きつけられ得る物質から作製されるマトリクスまたは粒子）として使用され得る。単分散性磁性スフェアは好ましい支持体である。なぜならそれらは、サイズが比較的均質であり、好ましくは自動化システムにおいて反応容器へと磁力を印加することによって、溶液から容易に回収されるからである。固定化プローブは、その捕捉支持体へと、例えば、種々の共有結合、キレート化、もしくはイオン性相互作用のうちのいずれかを使用することによって直接結合されてもよいし、上記支持体に結合された1もしくはこれより多くのリンカーを介して間接的に結合されてもよい。このリンカーは、捕捉プローブにハイブリダイズすることは意図しないが、固定化プローブの核酸とその支持体との間のスペーサーとして作用することが意図される、1個もしくはこれより多くのヌクレオチドを含み得る。

10

【0050】

「検出プローブ」は、標的配列に特異的に結合しかつこの結合が、この標的配列の存在を示す検出可能なシグナルを直接的にまたは間接的に生じる、核酸または他の分子である。検出プローブは、検出可能なシグナルを生成するために標識される必要はない（例えば、プローブがその標的配列に結合することから生じる電気インパルスが、検出可能なシグナルであり得る）。「標識されたプローブ」は、標識を含むか、または直接的にまたは間接的に標識に結合されているプローブである（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Chapt. 10; 米国特許第6,361,945号、Beckerら; 米国特許第5,658,737号、Nelsonら; 米国特許第5,656,207号、Woodheadら; 米国特許第5,547,842号、Hoganら; 米国特許第5,283,174号、Arnoldら; 米国特許第4,581,333号、Kourilskyら; 米国特許第5,731,148号、Beckerら）。例えば、検出プローブは、非ヌクレオチドリンカーおよびこのリンカーに付着された化学発光標識を含み得る（米国特許第5,185,439号、同第5,585,481号および同第5,639,604号、Arnoldら）。検出プローブの例は、均質系の反応（例えば、結合しているかまたは結合していないプローブ上の標識の差次的加水分解を使用するもの）において検出される付着された標識を有する約5~50ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドを含む。

20

30

【0051】

検出プローブは、アッセイの形式に依存して、標的配列と同じセンスまたは対向センス配列であるヌクレオチド配列を有し得る。検出プローブは、捕捉プローブと、標的配列の同じまたは異なるセグメントにハイブリダイズし得る。いくつかの検出プローブは、付着された化学発光マーカ、例えば、アクリジニウムエステル(AE)化合物を有する（米国特許第5,185,439号、同第5,639,604号、同第5,585,481号、および同第5,656,744号）。いくつかの検出プローブにおいて、アクリジニウムエステル標識は、ヌクレオチド塩基のアミンをAEの両側に拘束しかつインターカレーションのための部位を提供する非ヌクレオチドリンカーを使用することによって、AおよびTの塩基対の領域の近くにあるプローブの中心領域に付着される（米国特許第5,585,481号および同第5,656,744号、Arnoldら）。あるいは、AE標識は、検出プローブの3'末端または5'末端に付着され得、この検出プローブは、標的核酸上の検出プローブに隣接してハイブリダイズして、標的核酸によって与えられる近くのアミンの効果制限する第2のオリゴマーとともに使用される。いくつかの検出プローブにおいて、関連する非標的ポリヌクレオチド配列とのミスマッチの部位にまたはこの部位

40

50

の近くにある A E 標識は、僅か 1 個のヌクレオチドが異なり得る関連する配列と標的配列との間の区別を可能にする。なぜならこのミスマッチ部位の周辺の二重鎖の領域は、その関連する非標的配列にハイブリダイズしたプローブ上の A E を、加水分解 (hydrolysis degradation) に感受性にするために十分に不安定化されるからである。HIV-1 および HCV は、Gen-Probe による市販の PROCLIX (登録商標) ULTRIO HIV-1/HCV/HBV Assay の改変形態を使用して検出され得る。この改変は、捕捉プローブおよび固定化プローブにおける D-ポリ A および D-ポリ T の配列を、それぞれ、L-ポリ A および L-ポリ T で置き換えることを要する。

【0052】

「ハイブリダイゼーション条件」とは、1本の核酸鎖が相補的な鎖の相互作用および水素結合によって第2の核酸鎖に結合して、ハイブリダイゼーション複合体を生成する累積的環境をいう。このような条件は、核酸を含む水性または有機性の溶液の化学的成分およびそれらの濃度(例えば、塩、キレート化剤、ホルムアミド)、ならびにこの混合物の温度を含む。他の要因(例えば、インキュベーション時間の長さまたは反応チャンバの寸法)は、その環境に寄与し得る(例えば、Sambrookら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. sup. nd ed., pp. 1.90-1.91, 9.47-9.51, 11.47-11.57 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989))。

【0053】

1つのまたは複数の標的核酸への標的捕捉オリゴマーの特異的結合は、安定な二重鎖を形成する、標的捕捉オリゴマーの第1のセグメント中の1つの規定された配列と標的核酸上の正確にもしくは実質的に相補性のセグメントとの間の結合を意味する。このような結合は、その単一の規定された標的捕捉オリゴマー配列に正確にもしくは実質的に相補的なセグメントを欠いている、そのサンプル中の他の核酸への結合よりも検出可能に強い(より高いシグナルまたは融解温度)。標的核酸への標的捕捉オリゴマーの非特異的結合は、その標的捕捉オリゴマーが、単一の規定された標的捕捉オリゴマー配列に対して正確なもしくは実質的な相補性を有するセグメントを共有しない標的配列の集団に結合し得ることを意味する。例えば、その捕捉プローブの第1のセグメントにおけるランダム化配列を使用することによって、このようなことが達成され得る。

【0054】

核酸の間の結合を欠いていることは、実質的な相補性を欠いているが問題の核酸と同じ長さの核酸のランダムに選択された対の間で起こる非特異的結合から区別不能な結合によって明らかになり得る。

【0055】

捕捉ハイブリッドの「放出」とは、捕捉ハイブリッドの1またはこれより多くの成分を互いから分離すること(例えば、標的核酸を捕捉プローブから、および/または標的捕捉オリゴマーを固定化プローブから分離すること)をいう。その標的核酸鎖の放出は、標的を、捕捉ハイブリッドの他の成分から分離し、その標的を検出プローブへの結合のために利用可能にする。この捕捉ハイブリッドの他の成分は、標的検出に影響を及ぼすことなく、例えば、標的捕捉オリゴマー鎖を、捕捉支持体上の固定化プローブに結合したままにし得る。

【0056】

「感度」とは、それ自体として正確に特定された真の陽性の割合である(例えば、感染を有すると正確に特定された感染患者のパーセンテージ)。特異度とは、正確に特定された真の陰性の割合を測定する(例えば、感染を有しないと正確に特定された非感染患者のパーセンテージ)。

【0057】

値の範囲への言及はまた、範囲内の整数およびその範囲の中の整数によって規定される

10

20

30

40

50

部分範囲を含む。任意の数値または数値範囲への言及は、他の代表的な使用条件を評価する測定時において本質的であるように、任意のこのようなバリエーションを包含すると理解されるものとする。

【0058】

(詳細な説明)

(I. 一般)

本発明は、赤血球を溶解することによってRNAまたは他の標的を分析に適切な形態で放出するための溶解試薬を提供する。この溶解試薬は、少なくとも塩化アンモニウムおよびアニオン性界面活性剤を含み、そして抗凝固薬を含み得る。上記試薬は、赤血球を溶解し、放出された標的を溶解物中での分解から保護するように働き、その標的の分析のためのその後の工程（例えば、標的捕捉、増幅、検出、および/または配列決定）と適合性である。好ましくは、上記溶解試薬は、サンプル（例えば、全血）中の赤血球を、存在する白血球または他の細胞と比較して優先的に溶解して、他の細胞タイプの溶解物に由来する汚染を低減しかつ均質なサンプルを生成する。上記溶解試薬は、赤血球に感染する病原体由来のRNA（*Babesia* および *Plasmodium* species のような寄生生物が挙げられる）の分析に特に適している。

10

【0059】

本発明は、病原体由来RNAを赤血球から調製および分析するための種々の公知の溶解因子にともなう欠陥を特定することから一部生じる。公知の溶解因子は、溶解したサンプルを捕捉試薬に添加した場合に、細胞集塊化、沈殿物の出現、および磁性ビーズの喪失を引き起こして、病原体由来RNAを分析するための試薬および方法と不適合であることが見出された。それとは対照的に、本発明の溶解試薬は、これら方法と適合性であり、全血サンプル中の赤血球の優先的溶解、ならびに標的捕捉および転写媒介性増幅後のその放出される病原体由来RNAの感度の高い検出を可能にした。本発明の溶解試薬はまた、溶解後のヌクレアーゼおよびプロテアーゼによる病原体由来RNAの分解を阻害し、サンプル間での再現性を示した。

20

【0060】

(II. 溶解試薬)

本発明の溶解試薬は、少なくとも塩化アンモニウムおよびアニオン性界面活性剤、ならびに好ましくは、抗凝固薬を含む。塩化アンモニウム（ACL）は、溶解因子として作用する。全血において、塩化アンモニウムは、赤血球を、白血球よりも優先的に溶解し、従って、サンプルの汚染および検出アッセイの工程の妨害を低減する。塩化アンモニウムに関する例示的濃度範囲としては、100～1000mM、100～800mM、100～500mM、150～300mM、200～300mM、240～260mM、または250mMが挙げられる。

30

【0061】

上記アニオン性界面活性剤は、溶解因子および赤血球の溶解後の標的分解のインヒビターの両方として作用し得る。上記アニオン性界面活性剤は、核酸の分解を阻害するために特に有用である。例示的アニオン性界面活性剤としては、ラウリル硫酸リチウム（LLS）またはドデシル硫酸ナトリウム（SDS）が挙げられる。LLSが好ましい。例示によれば、LLSに関する14.7mM～55mMの濃度範囲は、ストックLLS溶液の4～15%（v/v）、5～8%（v/v）、または約5%（v/v）である。

40

【0062】

上記抗凝固薬は、存在する場合には、サンプル（例えば、全血または赤血球）の凝固を阻害するために十分な濃度で使用される。凝固を阻害することによって、この抗凝固薬は、赤血球を単離する方法の間にサンプルを遠心分離する必要性を排除する。例示的な抗凝固薬としては、EDTA、ヘパリン、またはシトレートが挙げられる。EDTAが好ましい。EDTAの例示的な濃度としては、0.01～10mM、0.05～1.0mM、0.05～0.50mM、0.075～0.125mM、または0.1mMが挙げられる。

【0063】

50

溶解試薬はまた、緩衝剤を含み得る。重炭酸ナトリウムは、適切な緩衝剤の一例である。他の適切な緩衝剤は、ACES、PIPES、MPSO、イミダゾール、Tris、BES、MOPS、HEPES、TES、MOBS、DIPSO、TAPSO、トリエタノールアミン、ピロホスフェート、HEPPSO、およびPOPSOである。重炭酸ナトリウムまたは他の緩衝剤は、例えば、5～30mM、10～20mM、12～16mMまたは14mMの濃度において、上記試薬の中に存在し得る。上記試薬において使用される緩衝剤のpHは、例えば、7～8、または7.2～7.6であり得る。

【0064】

好ましい溶解試薬は、粉末形態で、または溶媒（例えば、水）中に、上記で示される濃度のうちのいずれかで、塩化アンモニウム、LLS、EDTAおよび重炭酸ナトリウムを含む。好ましくは、塩化アンモニウムは、100～500mMまたは250mMの濃度であり、LLSは、4～15%または5%（v/v）の濃度であり、EDTAは、0.01～10mMまたは0.1mMの濃度であり、重炭酸ナトリウムは、12～16mMまたは14mMの濃度であり、pHは、7.2～7.6である。必要に応じて、この溶解試薬は、塩化アンモニウム、LLS、EDTA、重炭酸ナトリウムおよび水から本質的になる。

10

【0065】

上記溶解試薬は、赤血球から単離されるべき標的（以下で記載される標的のうちのいずれかを含む）に対するアッセイを行うためのプローブおよび/またはプライマーもまた含むキットとして提供され得る。このようなキットは、上記溶解試薬を使用するための、および/または赤血球から単離された標的に対してアッセイを行うための指示を含み得る。

20

【0066】

（III. 溶解試薬の使用）

赤血球は、任意の利用可能な供給源（例えば、全血または赤血球を含むその任意の画分（例えば、ペレット化赤血球））から得られ得る。全血は、ヒト全血、非ヒト全血、またはこれらの組み合わせであり得る。

【0067】

溶解試薬は、細胞溶解を誘導し、細胞からの、望ましい標的の分子の放出を引き起こすために十分な時間にわたって、赤血球と混合され得る。溶解試薬と混合して赤血球を維持するための例示的時間としては、1～30分間、2～15分間、3～10分間、4～6分間、または5分間が挙げられる。好ましくは、その時間は、30分間以下、15分間以下、10分間以下または5分間以下である。好ましくは、上記混合物は、溶解後に目に見える粒子を欠いている。

30

【0068】

溶解試薬を赤血球とともにインキュベートする温度は、変動し得る。その温度は、好ましくは、サンプル中の白血球または他の細胞と比べた赤血球の溶解および優先度の程度および速度を最大限にしかつ標的の分解を最小限にするかまたはその後の加工処理の阻害を防止するように、選択される。例示的な温度範囲としては、0～50、5～45、10～40、15～37、20～30、22～27、または25が挙げられる。周囲温度は適切である。赤血球の溶解は、本明細書で記載される方法によって検出可能であるに十分な量の標的分子を放出するべきである。好ましくは、溶解は、溶解されるサンプル中の赤血球のうちの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、または100%の溶解を生じる。

40

【0069】

全血が溶解試薬と合わされる比は、細胞溶解の程度および速度、ならびに溶解した細胞からの放出後の分解からの標的分子の保護に影響を及ぼし得る。全血が上記溶解試薬と混合される例示的な比としては、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10、または1:1～1:10（v/v；全血：試薬）の間の比の範囲の中の比が挙げられる。好ましい比は、約1:3（v/v）の比で全血が溶解試薬と混合される。上記サンプルが全血から単離された赤血球（例えば、ペレット化赤血球）を含む場合、この赤血球は、1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:10の、または1:1～1:10（v/v

50

; 赤血球：試薬)の間の比の範囲にある例示的な比で、上記溶解試薬と混合され得る。

【0070】

(IV. 標的)

本発明の溶解試薬によって赤血球から放出される標的としては、内因性もしくは病原性の核酸(例えば、DNAもしくはRNA)、粒子全体、病原性のウイルスもしくは生物に由来するタンパク質、ならびに/または抗体、脂質および炭水化物が挙げられ得る。病原体由来RNA標的が好ましい。種々のタイプのRNAが検出され得る。このRNAは、リボソームRNA(rRNA)、メッセンジャーRNA(mRNA)、または異種の核RNA(hnRNA)であり得る。病原体の好ましい標的は、リボソームRNA、特に、18S rRNA、5S rRNA、5.8S rRNA、または28S rRNAである。

10

【0071】

例示的な病原性生物としては、Babesia属、Plasmodium属、Trypanosoma属、Leishmania属、Anaplasma属、またはToxoplasma属の寄生生物が挙げられる。ヒトにおいて疾患を引き起こすBabesia属の生物は、Babesia microti、Babesia divergens、またはBabesia duncaniであり得る。Plasmodium属の生物は、Plasmodium falciparum、Plasmodium malariae、Plasmodium ovale、Plasmodium vivax、またはPlasmodium knowlesiであり得る。

【0072】

20

(V. アッセイ)

赤血球の溶解から放出される標的分子は、分析に供される。標的分子は、分析の前に、溶解試薬から(遠心分離または他の方法によって)分離されてもよいし、分離されなくてもよい。分離工程の省略は、そのアッセイを行うにあたって、効率的な作業フローを容易にし得る。アッセイのタイプは、標的に依存する。

【0073】

(A. 核酸)

核酸標的の分析はしばしば、捕捉、増幅および検出の工程を伴う。あるいは、増幅法および検出法は、事前の標的捕捉なしで行われ得る。好ましくは、増幅、ならびに検出および標的捕捉(行われる場合)は、標的分子を溶解試薬から分離することなく起こる。従って、プロセス全体は、1つの容器中で行われ得る。

30

【0074】

(1. 標的捕捉アッセイ)

例示的な標的捕捉アッセイは、以下のとおりに1またはこれより多くの捕捉プローブ、固定化プローブ、サンプル、および適切な媒体を使用して行われて、標的核酸への標的捕捉オリゴマーの、および固定化プローブへの標的捕捉オリゴマーのハイブリダイゼーションを可能にし得る。標的サンプルは、上記アッセイを行う前に(例えば、65 から95 へと)加熱されて、2本鎖形態にあるあらゆる核酸を変性し得る。その成分は、任意の順序で混合され得る。例えば、上記標的捕捉オリゴマーは、上記サンプルに加えられ得、上記固定化プローブを加える前に上記サンプル中の標的核酸とハイブリダイズされ得る。しかし、自動化アッセイに関しては、上記標的捕捉オリゴマーおよび固定化プローブを、同時または実質的に同時に供給することによって、加える工程の回数を最小限にすることが好ましい。この場合には、ハイブリダイゼーションの順序は標的捕捉オリゴマーと標的核酸との間で二重鎖を形成し得るが、捕捉プローブの第1のステムセグメントと第2のステムセグメントとの間で、および標的捕捉オリゴマーと固定化プローブとの間で形成する二重鎖の融解温度を超える条件下で第1のハイブリダイゼーションを行い、次いで、低減したストリンジェンシー、好ましくは、第1のステムセグメントと第2のステムセグメントとの間で、および標的捕捉オリゴマーと固定化プローブとの間で形成される二重鎖の融解温度未満の条件下で第2のハイブリダイゼーションを行うことによって、制御され得る。ストリンジェンシーは、アッセイミックスの温度を低下させることによって低減され得

40

50

る。より高温では、標的結合部位は、標的核酸と二重鎖を形成する。より低い温度では、標的核酸に結合しなかった捕捉プローブの第1のおよび第2のステムセグメントが、互いと二重鎖を形成し、そして標的核酸に結合した捕捉プローブの第1のステムセグメントは、固定化プローブと二重鎖を形成する。例えば、より高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは、60℃でまたは60℃付近で行われ得、より低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは、室温または25℃へと冷却させることによって行われ得る。ストリンジェンシーはまた、塩濃度を低下させるか、またはカオトロピック溶媒を加えるかもしくはその濃度を増大させることによって、低減され得る。いくつかの方法では、全ての工程（2本鎖標的を変性させる、より高温での最初の变性工程を除くことはあり得る）が、等温で行われ得る。

10

【0075】

標的核酸：捕捉プローブの形成後に、固定化プローブハイブリッド（捕捉ハイブリッド複合体）は、他のサンプル成分から、種々の公知の方法のうちのいずれか（例えば、遠心分離、濾過、または磁性捕捉支持体の磁気誘引）を使用して、捕捉支持体を物理的に分離することによって、分離される。上記分離は、好ましくは、空の標的捕捉オリゴマーが变性する機会をもたず、従って、捕捉プローブに結合するように、標的捕捉オリゴマーによって形成されるステム-ループ構造の融解温度未満の温度で行われる。いくつかの方法では、上記分離は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーおよびマッチした標的核酸とマッチしていない標的核酸とを区別する必要な能力を維持するために、このステム-ループ構造の融解温度より低い、この融解温度の10℃以内の温度で（例えば、60℃で）行われる。

20

【0076】

捕捉ハイブリッドの任意の部分に非特異的に接着する他のサンプル成分から標的核酸を単離することをさらに容易にするために、上記捕捉ハイブリッドは、他のサンプル成分を希釈および除去するために、1回もしくはこれより多く洗浄され得る。洗浄は、適切な水溶液（例えば、TrisおよびEDTAを含む溶液。例えば、米国特許第6,110,678号を参照のこと）および適切な条件（例えば、上記成分の T_m より高い温度）において、捕捉ハイブリッドをその個々の成分へと解離し、次いで、その条件を再調節して、捕捉ハイブリッドの再形成を可能にすることによって達成され得る。しかし、取り扱いやすくし、工程を最小限にするために、洗浄は、好ましくは、上記捕捉支持体に付着した無傷の捕捉ハイブリッドを、この捕捉ハイブリッドを維持する条件を使用することによって溶液中ですすぐ。好ましくは、行われる場合、洗浄での標的核酸の捕捉は、上記標的核酸のうち少なくとも70%、好ましくは、少なくとも90%、およびより好ましくは、約95%を、他のサンプル成分から単離する。単離された核酸は、核酸増幅のような多くの下流プロセスのために使用され得る。

30

【0077】

標的捕捉アッセイはまた、リアルタイムの二相性標的捕捉および増幅法の一部として行われ得る。このような方法において、500 μ Lのサンプルおよび400 μ Lの標的捕捉試薬（TCR）が、反応チューブに加えられる。このTCRは、磁性粒子、上記サンプル中に存在する生物を溶解するための成分、捕捉オリゴ、T7開始プロモーター、および内部較正因子を含む。反応チューブ中の流体は、特定の時間にわたって特定の速度で混合され、上記混合物が均質であることを担保する。次いで、反応チューブは、反応チューブ中の流体を予備加熱するために、43.7℃のトランジションインキュベーター（transition incubator）へと移される。反応チューブは、次いで、64℃に設定したアニールインキュベーターへと移される。64℃でのインキュベーションの間に、溶解試薬によって事前に破壊されなかった、上記サンプル中に存在する任意の生物が破壊され、標的の放出を引き起こす。次いで、反応チューブは、クールダウンプロセスを開始するために移行インキュベーターへと移され、冷却機勾配（17℃～19℃）の中でさらに冷却され、T7開始プロモーターの結合、ならびに捕捉オリゴを介する磁性粒子への標的および内部較正因子の両方の捕捉をもたらす。上記反応チューブは、磁気パーキン

40

50

グステーション (magnetic parking station) に移され、このステーションでは、上記チューブは、洗浄ステーションに入る前に、磁性粒子をチューブの側面に引きつける磁石に供される。洗浄ステーションでは、潜在的な妨害物質を、磁性粒子を洗浄することによって上記反応物から除去する。

【0078】

(2. 増幅)

核酸標的は、転写媒介性増幅 (TMA)、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、核酸配列ベースの増幅、リガーゼ連鎖反応または他の増幅法のような方法を使用して増幅され得る。増幅された標的RNA生成物の検出は、増幅の間に (リアルタイムで) または増幅後に (エンドポイントで) 行われ得る。

【0079】

(i. 転写媒介性増幅)

TMAは、以前に記載されている (例えば、米国特許第5,399,491号、同第5,554,516号、同第5,824,518号、および同第7,833,716号;そしてまた、例えば、F. Gonzales and S. McDonough. Applications of Transcription-Mediated Amplification to Quantification of Gene Sequences. Gene Amplification. 1998 Ed. Francois Ferre, Birkhauser, Boston. PP. 189-204)。TMAでは、増幅されるべき配列を含む標的核酸は、1本鎖核酸 (例えば、ssRNAまたはssDNA) として提供される。2本鎖核酸 (例えば、dsDNA) を1本鎖核酸へと変換する任意の従来の方法が、使用され得る。プロモータープライマーは、上記標的核酸へとその標的配列において特異的に結合し、逆転写酵素 (RT) は、テンプレートとして上記標的鎖を使用して上記プロモータープライマーの3'末端を伸長して、cDNAコピーを作りだし、RNA:cDNA二重鎖を生じる。RNase活性 (例えば、RT酵素のRNase H) は、RNA:cDNA二重鎖のRNAを消化し、第2のプライマーが、上記プロモーター-プライマー末端から下流にある、このcDNA中のその標的配列に特異的に結合する。次いで、RTは、テンプレートとしてそのcDNAを使用して第2のプライマーの3'末端を伸長して、機能的プロモーター配列を含むdsDNAを作り出すことによって、新たなDNA鎖を合成する。機能的プロモーターに対して特異的なRNAポリメラーゼは、転写を開始して、最初の標的鎖に相補的な約100~1000個のRNA転写物 (増幅されたコピーまたはアンプリコン) を生成する。この第2のプライマーは、各アンプリコン中のその標的配列に特異的に結合し、RTは、このアンプリコンRNAテンプレートからcDNAを作り出して、RNA:cDNA二重鎖を生成する。RNaseは、上記アンプリコンRNAを、RNA:cDNA二重鎖から消化し、このプロモータープライマーの標的的特異的配列は、その新たに合成されたDNA中のその相補的配列に結合し、RTは、上記プロモータープライマーの3'末端および上記cDNAの3'末端を伸長して、RNAポリメラーゼが結合し、その標的鎖に相補的なさらなるアンプリコンを転写する機能的プロモーターを含むdsDNAを作り出す。反応の間にこれら工程を反復して使用する自動触媒サイクルは、その最初の標的配列の約10億倍の増幅を生じる。必要に応じて、アンプリコンは、上記アンプリコン中に含まれる配列に特異的に結合するプローブを使用することによって増幅の間 (リアルタイム検出) に、または反応のエンドポイント (エンドポイント検出) で、検出され得る。その結合したプローブから生じるシグナルの検出は、上記サンプル中の標的核酸の存在を示す。

【0080】

TMAはまた、リアルタイムの二相性標的捕捉および増幅法の一部として行われ得る。このような方法において、TMAは、増幅試薬 (50 μL / 試験) を、捕捉された標的分子を含む反応チューブに加え、そして増幅ロードステーションにおいて混合することによって、行われ得る。この増幅試薬は、核酸を作るために必要なオリゴおよび成分を含む。この反応チューブは、反応チューブ中の液体の温度を上昇させるために43.7の移行

10

20

30

40

50

インキュベーターに移され、次いで、それは、増幅ロードステーションへと戻されて、このステーションにおいて酵素（25 μL / 試験）が加えられる。反応チューブは、42.7 に設定した増幅インキュベーターへと移され、インキュベーターの中に5分間留まり、その間に、第1回の増幅が開始される。反応チューブは、増幅ロードステーションへと戻され、このステーションにおいて、プロモーター試薬（25 μL / 試験）が加えられる。反応チューブは、標的増幅のさらなる回のために、増幅インキュベーターへと戻される。このプロモーター試薬は、オリゴおよびトーチ（torch）を含む。このトーチは、上記標的または内部較正因子に相補的であり、結合した場合には、蛍光を発生し、リアルタイムでシグナルを生成する。上記標的および内部較正因子に関するシグナルは、好ましくは、異なる波長を有し、区別され得る。

10

【0081】

（ii. ポリメラーゼ連鎖反応）

あるいは、PCR増幅（例えば、逆転写酵素またはリアルタイムPCR）が、増幅のために使用され得る。PCRは、標的核酸を捕捉複合体から事前に放出してまたは放出せずに、行われ得る。このPCR反応は、捕捉工程と同じ容器（例えば、微量遠心チューブ）の中で行われ得る。このPCR反応は、解離のための約95（例えば、90～99）という高温から、アニーリングのための約60という低温（例えば、40～75、または50～70 または55～64）の間でのサーモサイクリングを含む。代表的には、完全サーモサイクルの数は、少なくとも10、20、30または40である。PCR増幅は、1またはこれより多くのプライマー対を使用して行われる。PCR増幅に使用されるプライマー対は、配列決定されることが望まれる領域に隣接する標的核酸の対抗する鎖に相補的な2つのプライマーを含む。ウイルスゲノムの大部分（例えば、50、75または99%より多く）を配列決定するために、プライマーは、好ましくは、ウイルスゲノムの末端の近くに位置する。関連分子（例えば、患者サンプル中に存在する同じウイルスの変異形態）の増幅のために、プライマーは、好ましくは、その集団の大部分のメンバーに存在する可能性が高い標的核酸の保存された領域に相補的である。PCR増幅は、以下に記載される：PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (H. A. Erlich 編, Freeman Press, NY, NY, 1992); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innisら編, Academic Press, San Diego, CA, 1990); Mattilaら, Nucleic Acids Res. 19, 4967 (1991); Eckertら, PCR Methods and Applications 1, 17 (1991); PCR (McPhersonら編, IRL Press, Oxford); および米国特許第4,683,202号。

20

30

【0082】

（3. 検出）

核酸標的の検出は、捕捉後にかつ任意の公知の方法を使用することによって、増幅の間（リアルタイム）または増幅後（エンドポイント）のいずれかで行われ得る。RNAの増幅生成物はしばしば、RT-PCRから生じるDNA、またはTMAから生じるRNAコピーの形態にある。増幅された核酸は、液相中で検出され得るか、またはそれらをマトリクス中でまたはマトリクス上で濃縮し、上記核酸と関連した標識（例えば、臭化エチジウムのようなインターカレーティング剤）を検出することによって検出され得る。いくつかの検出法は、増幅された生成物中の配列に相補的なプローブを使用してプローブ：生成物複合体の存在を検出するか、またはプローブの複合体を使用して、増幅された生成物から検出されるシグナルを増幅する（例えば、米国特許第5,424,413号、同第5,451,503号および同第5,849,481号）。他の検出法は、シグナル生成が標的配列の存在に結び付いているプローブを使用する。なぜならシグナルの変化は、分子ビーコン、分子トーチ、またはハイブリダイゼーションスイッチプローブ（例えば、米国特許

40

50

第5, 118, 801号、同第5, 210, 015号、同第5, 312, 728号、同第5, 538, 848号、同第5, 541, 308号、同第5, 656, 207号、同第5, 658, 737号、同第5, 925, 517号、同第6, 150, 097号、同第6, 361, 945号、同第6, 534, 274号、同第6, 835, 542号、および同第6, 849, 412号；ならびに米国公開番号2006/0194240 A1)におけるように、上記標識されたプローブが増幅された生成物に結合する場合にのみ生じるからである。このようなプローブは、代表的には、このプローブの一方の末端に付着された標識(例えば、発蛍光団)、およびこのプローブが、増幅された生成物にハイブリダイズされていないことを示すあるコンホメーションにある(「閉じている」)ときの標識からのシグナル生成を阻害するが、プローブがそのコンホメーションを(「開いている」へと)変化させる増幅された生成物にハイブリダイズしているときに検出可能なシグナルが生成されるようにこのプローブの別の位置に付着される相互作用化合物(例えば、クエンチャー)を使用する。この増幅された生成物と特異的に会合する直接的にまたは間接的に標識されたプローブからのシグナルの検出は、増幅された標的核酸の存在を示す。

10

20

30

40

50

【0083】

(4. 配列決定)

増幅後に、標的核酸は、定性的もしくは定量的な検出をされるとともに、または定性的もしくは定量的な検出をされる代わりに、配列決定され得る。精製は、望ましい場合、シリカカラム(例えば、Qiagen重力流カラム)上で行われ得る。この標的核酸は、カラムに結合し、ここでこの標的核酸は、洗浄され得、次いで溶離され得る。あるいは、精製は、核酸プローブベースの精製システム(例えば、米国特許第6, 110, 678号もしくは同第8, 034, 554号、US 2013/0209992もしくはUS 2009/0286249、またはWO 2012/037531もしくはWO 2013/116774)を使用して行われ得る。その増幅された標的DNAはまた、アダプターの付着によって、いくつかの配列決定形式に適合させられ得る。その増幅されたDNAは、ヌクレオチド(通常は、ホモポリマー)のクレノウ媒介性付加によってテール付加され得、続いて、その付加されたテールに相補的なオリゴヌクレオチドにアニールされ得、ライゲーションされ得る。使用される配列決定プラットフォームに依存して、特別なアダプターが、配列決定前にテンプレートにライゲーションされる。例えば、SMRTベルアダプターは、Pacific Biosciences' PacBio RS配列決定機での配列決定のために、サンプルテンプレートにライゲーションされる(例えば、Traversら Nucl. Acids Res. (2010) 38(15): e159を参照のこと)。

【0084】

その増幅された標的核酸は、種々の技術による配列分析に適している。標的核酸の捕捉は、いわゆる次世代および第三世代の配列決定法のいくつかの異なる形式につながられ得る。このような方法は、数百万もの標的テンプレートを並行して配列決定し得る。このような方法は、標的核酸が改変体の異種混合物である場合に、特に有用である。その多くの利点の中でも、改変体を並行して配列決定することで、このサンプル内に比較的小さな割合で薬物変異が存在しても、サンプル中の薬物耐性変異のプロフィールが提供される。

【0085】

いくつかの次世代配列決定法は、エマルジョンPCRによって増幅する(amplify)。標的捕捉オリゴマーを介してビーズに固定化された標的核酸は、エマルジョンPCRに適切な出発物質を提供する。そのビーズは、単一のビーズを含む個々のマイクロリアクターを作るために、PCR試薬およびエマルジョンオイルと混合される(Marguliesら, Nature 437, 376-80 (2005))。次いで、このエマルジョンは破壊され、増幅されたDNAを有するその個々のビーズが配列決定される。この配列決定は、例えば、Roche 454 GS FLX配列決定機(454 Life Sciences, Branford, CT 06405)を使用して行われるパイロシーケンシングであり得る。あるいは、配列決定は、例えば、ABI SOLi

D Sequencing System (Life Technologies, Carlsbad, CA 92008) を使用して行われるライゲーション/検出であり得る。別のバリエーションにおいて、標的核酸は、標的捕捉オリゴマーを有するビーズから溶離され、アレイ上の異なる位置に固定化される(例えば、HiScanSQ (Illumina, San Diego, CA 92121))。その標的核酸は、ブリッジ増幅によって増幅され、アレイ形式で、標識されたヌクレオチドのテンプレート指向性組み込みによって配列決定される(Illumina)。別のアプローチでは、標的核酸は、標的捕捉オリゴマーから溶離され、単一の分子が、リアルタイムで、ポリメラーゼによるヌクレオチドの組み込みを検出することによって分析される(単一分子リアルタイム配列決定またはSMRT配列決定)。このヌクレオチドは、組み込まれた場合にシグナルを放出する標識されたヌクレオチドであり得る(例えば、Pacific Biosciences, Eidら, *Sciences* 323 pp. 133-138 (2009))か、または標識されていないヌクレオチドであり得る(この場合、上記システムは、組み込みの際の化学変化を測定する(例えば、Ion Torrent Personal Genome Machine (Life Technologies))。【0086】

捕捉された標的核酸が、任意の技術によって配列決定され得るが、第三世代、次世代または大規模並列処理法(massively parallel method)は、Sanger and Maxam Gilbert配列決定を上回るかなりの利点を提供する。いくつかのグループは、超ハイスループットDNA配列決定手順を記載している(例えば、Cheeseman、米国特許第5,302,509号、Metzkerら, *Nucleic Acids Res.* 22: 4259 (1994)を参照のこと)。4種の天然のヌクレオチド(アデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)、またはチミン(T)という塩基を含む)および合成によってDNAを配列決定するためのいくつかの他の酵素を使用するパイロシーケンシングアプローチは、今や変異検出のために広く使用されている(Ronaghi, *Science* 281, 363 (1998); Binladinら, *PLoS ONE*, issue 2, e197 (February 2007); Rehmanら, *American Journal of Human Genetics*, 86, 378 (March 2010); Lindら, *Next Generation Sequencing: The solution for high-resolution, unambiguous human leukocyte antigen typing*, *Hum. Immunol.* (2010), doi 10.1016/j.humimm.2010.06.016 (印刷中); Shaferら, *J Infect Dis.* 1;199(5):610 (2009)。このアプローチにおいて、検出は、DNAポリメラーゼ反応の間に放出されるピロホスフェート(Pi)、スルフリラーゼによるピロホスフェートのアデノシン三リン酸(ATP)への定量的変換、およびその後のホタルルシフェラーゼによる可視光の生成に基づく。より近年の研究は、デオキシヌクレオシド三リン酸(dNTPs)の3'-OH基にキャップをするために蛍光色素に連結される光切断可能な化学部分に大部分は焦点を当てた合成法によってDNA配列決定を行う(Welchら *Nucleosides and Nucleotides* 18, 197 (1999) & *European Journal*, 5:951-960 (1999); Xuら、米国特許第7,777,013号; Williamsら、米国特許第7,645,596号; Kao et al, 米国特許第6,399,335号; Nelsonら, 米国特許第7,052,839号および同第7,033,762号; Kumarら, 米国特許第7,041,812号; Sood et al, 米国特許出願番号2004-0152119; Eidら, *Science* 323, 133 (2009))。合成による配列決定方法論(sequencing-by-synthesis methodology)では、DNA配列は、各デオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)を別個にかつ逐次的に用いてDNA/ポリメラーゼ複

10

20

30

40

50

合体を試験する際のピロホスフェート放出を測定することによって導き出されている。Ronaghiら, *Science* 281: 363-365 (1998); Hyman, *Anal. Biochem.* 174, 423 (1988); Harris、米国特許第7,767,400号を参照のこと。

【0087】

(B. 他の標的)

抗体、タンパク質、粒子および他の標的は、免疫沈降、ウェスタンブロッティング、ELISA、ラジオイムノアッセイ、競合アッセイおよび免疫測定アッセイ (immuno-metric assay) のような形式によって検出され得る。Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988); 米国特許第3,791,932号; 同第3,839,153号; 同第3,850,752号; 同第3,879,262号; 同第4,034,074号; 同第3,791,932号; 同第3,817,837号; 同第3,839,153号; 同第3,850,752号; 同第3,850,578号; 同第3,853,987号; 同第3,867,517号; 同第3,879,262号; 同第3,901,654号; 同第3,935,074号; 同第3,984,533号; 同第3,996,345号; 同第4,034,074号; および同第4,098,876号を参照のこと。サンドイッチアッセイは、好ましい形式である (米国特許第4,376,110号、同第4,486,530号、同第5,914,241号、および同第5,965,375号を参照のこと)。

10

【0088】

競合アッセイがまた使用され得る。いくつかの方法では、サンプル中の標的抗原は、外因的に供給された、標識された標的抗原と抗体検出試薬への結合に関して競合する。その抗体に結合される標識された標的抗原の量は、サンプル中の標的抗原の量に逆比例する。その抗体は、検出する前に、サンプルからの結合した複合体の分離を容易にするために固定化され得る。

20

【0089】

接線流デバイスはまた、標的を検出するために使用され得る。流体は、標的が存在し得るサンプルで処理された試験ストリップに適用される。標識された結合分子は、このストリップを通り、標的を有するサンプルを含む特定のゾーンに入るにつれて捕捉され得る。

【0090】

(VI. 感度)

本発明の方法は、赤血球に由来する標的の高感度の検出を提供し得る。病原体由来RNA標的に関しては、感度は、ある体積の全血に存在する病原体RNAコピーの最小数として表され得る。全血の体積は、溶解試薬と直接接触され得るものであるか、または血液画分 (例えば、ペレット化赤血球) を調製するために使用され得るものであり、この血液画分は、翻って、この溶解試薬と接触させられる。好ましくは、上記方法は、全血中の病原性RNAの存在を、1寄生生物に等しい 2×10^3 コピーのRNA / 1 mL 全血もしくはこれより良好、 2×10^3 コピー / 5 mL 全血もしくはこれより良好、 2×10^3 コピー / 10 mL 全血もしくはこれより良好、 2×10^3 コピー / 50 mL 全血もしくはこれより良好、または 2×10^3 コピー / 100 mL 全血もしくはこれより良好な感度で検出する。いくつかの方法では、溶解したサンプル中の病原体RNAの範囲は、 $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^7$ コピー / 1 mL サンプルの間で変動する。

30

40

【実施例】

【0091】

(実施例1. 細胞溶解のための試薬の分析および Babesia RNAの安定化)

本実施例の目的は、溶解試薬であって、ヒト全血中の赤血球を有効に溶解し、この溶解したサンプル中の Babesia由来 rRNAを安定化し、そしてRNAseの活性を阻害する溶解試薬を特定することであった。磁性ビーズを使用する Gen-Probeの Target Capture Technologyと適合性であるためには、上記溶解試薬は、好ましくは、効率的標的捕捉のために均質な溶解物を生じるべきである。

50

【0092】

PAXgeneTM Blood RNA System (BD Biosciences) を、Babesia サンプル調製のために最初に評価した。各チューブに含まれる PAXgene 試薬は、細胞膜を溶解しかつ安定化試薬として作用することが公知の第四級アンモニウム塩である活性化合物テトラデシルトリメチルアンモニウムオキサレート (TDTMAO) を含む。

【0093】

調製のために使用したサンプルは、 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-6}$ の範囲に及ぶ希釈において、Babesia 感染ハムスター血液を添加したヒト全血であった。血液サンプル (1 mL) を、PAXgene チューブからの 3 mL の溶解試薬に室温に加え、5 分間振盪させて、細胞溶解を誘導した。次いで、溶解したサンプルのうちの 500 μ L を、500 μ L の標的捕捉試薬 (TCR) に加えた。Gen-Probe、Procleix、および Aptima TCR を評価した。溶解したサンプルを TCR に加えた後、白色の沈殿物が形成された。従って、この PAXgene システムは、全血溶解および Gen-Probe の標的捕捉試薬を使用する Babesia の検出には不適切であった。

【0094】

次の実験では、14 mM 重炭酸ナトリウムで緩衝化した 250 mM 塩化アンモニウム (ACL) の溶解試薬を評価した。ヒト全血に、 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-8}$ の範囲に及ぶ希釈において、Babesia 感染ハムスター血液を添加した。添加した全血のうちの 1 mL を、3 mL の緩衝化 ACL 溶液とともに 5 分間、25 で混合して、赤血球溶解を誘導した。この溶解したサンプルのうちの 500 μ L を、500 μ L TCR に加えた後、沈殿物は観察されなかった。標的捕捉を、米国特許第 6,110,678 号に一般に記載されるように行った。Babesia 18S rRNA を、転写媒介性増幅 (米国特許第 5,399,491 号、同第 5,554,516 号、同第 5,824,518 号および同第 7,833,716 号) によって各サンプル中で検出した。サンプル中の Babesia 18S rRNA を増幅するために使用されるプライマーは、以下のとおりであった：

【表 1】

表 1.

機能	配列 (5'-3')
非 T7 プライマー	ACAGGGAGGTAGTGACAAG (配列番号1)
T7 プライマー	AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGGAATTACCGCGGCTGCTGG (配列番号2)
AE プローブ	ACCCUCCCCAGAGUAUCAAU (配列番号3)
TCO	GGAUUGGGUAAUUUGCGCGCCTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAA (配列番号4)

【0095】

図 1 に示されるように、Babesia 18S rRNA を、 1×10^{-8} という小さな希釈において、添加したヒト全血サンプル中で検出した。しかし、血液の齢 (3 ~ 5 日齢) に関して性能に大きな変動性が観察された。これら結果は、全血溶解および Babesia の検出に緩衝化 ACL 溶液が使用される予定である場合には、安定化成分が含まれるべきであることを示唆した。

【0096】

さらなる溶解試薬を、Gen-Probe の Target Capture Technology とのそれらの適合性に関して評価した。評価した溶解試薬は、以下を含んだ：10% ラウリル硫酸リチウム (LLS) を含む IC 緩衝剤；Roche RBC 溶解緩衝剤；4% テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド (TDTMAB)、250 mM 酒石酸、および 5% Tween 20 とともに製剤化した緩衝化 ACL (HB + PTM 1.1)；5% Tween-20、グアニジニウムチオシアネート、Trito

n X - 100、および還元化合物を有する Roche Stabilizing Reagent; 0.2% サポニン; 4% TDTMAB、250mM 酒石酸、および10% Tween-20とともに製剤化した0.2% サポニン; 4% TDTMAB、250mM 酒石酸、および10% Tween-20; ならびに PAXgene 溶解液。図2に示されるように、Roche RBC 溶解緩衝剤およびIC緩衝剤のみが、この実験において、TCRに加えた場合に、沈殿物の出現も磁性ビーズの喪失もなしに細胞溶解を誘導した。

【0097】

異なる溶解試薬のさらなる分析を、ProcleixおよびAptima TCR溶液 (Grifols SA, カタログ番号302573およびHologic, Inc., カタログ番号302178)との適合性に関して、図3に示されるように行った。多くの試薬は、一方または両方のTCRにおいて全く活性を示さなかったかまたは減少した活性を示した(5% Tween-20ありおよびなしのサポニン; PAXgene 溶解液; PTM1.0、1.1、および1.2)。いくらかは、TCRを加えた場合に沈殿物(PPT)を生成した。他のものは、一方または両方のTCRにおいて妥当な候補であった一方で、TPM2.4(250mM ACL、14mM 重炭酸ナトリウム、および5% LLS)は、Procleix TCRにおいて良好な候補であり、IC緩衝剤は、両方のTCRにおいて良好な候補であった。

10

【0098】

PTM2.4溶液およびIC緩衝剤(10% LLS)を使用する研究を行って、Babesiaを検出するためのこれら溶解試薬の有効性を比較した。ヒト全血に、 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-6}$ の範囲に及ぶ希釈において、Babesia感染ハムスター血液を添加した。血液サンプルを、緩衝化ACLおよび5% LLSという溶解試薬、またはIC緩衝剤という溶解試薬で、1:3(血液:試薬)の比において溶解した。Babesia 18S rRNAを、上記のようにProcleix TCRおよびTMAによる増幅を使用して、各サンプル中で検出した。図4に示されるように、Babesia 18S rRNA検出は、血液がPTM2.4またはIC緩衝剤を使用して溶解される場合に匹敵している。しかし、これら実験では、赤血球を全血からペレット化するための最初の遠心分離工程なしでは、IC緩衝剤は、溶解工程後に細胞デブリを生じ、これは、標的捕捉および磁性ビーズ洗浄工程を潜在的に妨害し得ることが観察された。従って、PTM2.4(「緩衝化ACLおよび5% LLS」)を、さらなる評価のために選択した。

20

30

【0099】

(実施例2。ACL溶解溶液中のLLSの評価)

緩衝化ACL溶液中のLLSの必要性を、本実施例において試験した。LLSを、緩衝化ACL溶液中に、0%(コントロール)、1%、2%、3%、および5%という濃度で含めた。ヒト全血に、 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-9}$ の範囲に及ぶ希釈において、Babesia感染ハムスター血液を添加した。添加された全血サンプルを、上記緩衝化ACL/LLS溶液の各々で溶解した。Babesia 18S rRNAを、上記のようにProcleix TCRおよびTMAによる増幅を使用して、各サンプル中で検出した。図5に示されるように、LLSの濃度の低下は、Babesia 18S rRNAの検出のより大きな変動性を生じる。これは、おそらくTMAによる増幅の前に、Babesia 18S rRNA標的を安定化するために存在するLLSの不十分な量に起因する。

40

【0100】

(実施例3。Babesiaの検出感度)

緩衝化ACLおよび5% LLSを使用して、ヒト全血におけるBabesiaの検出感度を調べた。ヒト全血に、 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-11}$ の希釈において、Babesia感染ハムスター血液を添加した。血液サンプルを、緩衝化ACLおよび5% LLSの溶解試薬で溶解した。Babesia 18S rRNAを、上記のようにProcleix TCRおよびTMAによる増幅を使用して、各サンプルにおいて検出した。図6Aに示されるように、Babesia 18S rRNAは、この溶解試薬およびアッセ

50

イブコトルを使用した場合に、 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-9}$ という希薄さの希釈において、ヒト全血中で検出できた。

【0101】

この方法によって検出可能なインビトロ転写物 (IVT) の数もまた、決定した。この実験において使用されるインビトロ転写物は、以下の配列を有した：

【化1】

GGGCGAAUUGGGUACCGGGCCCCCCCUCGAGGUCGACGCUUAGUAUAAGCUUUUA
 UACAGCGAAACUGCGAAUGGCUCAUUAACAGUUAUAGUUUAUUUGAUGUUCG
 UUUUACAUGGAUAACCGUGGUAUUCUAGGGCUAAUACAUGCUCGAGGGCGCGUU
 UUCGCGUGGGCGUUUAUAGACUUUAACCAACCCUUCGGGUAUUCGGUGAUUCAU
 AAUAAAUUAGCGAAUCGCAUGGCUUUGCCGGCGAUGUAUCAUUAAGUUUCUGA
 CCUAUCAGCUUUGGACGGUAGGGUAUUGGCCACCGGGGCGACGACGGGUGACGG
 GGAAUUGGGGUUCGAUUCGGAGAGGGAGCCUGAGAAACGGCUACCACAUCUAA
 GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAUUAACCAAUCCUGACACAGGGAGGUAGUGACAA
 GAAUAACAUAACAGGGGCUAAAGUCUUGUAAUUGGAAUGAUGGGAAUCUAAAC
 CCUCCCCAGAGUAUCAAUUGGAGGGCAAGUCUGGUGCCAGCAGCCGCGGUAUUC
 CAGCUCCAUAAGCGUAUAUUAAGUUGUUGCAGUUAAGAAGCUCGUAGUUGAAU
 UUCUGCCUUGUCAUUAUUCUCGCUUCCGAGCGUUUUUUUAUUGACUUGGCAUCU
 UCUGGAUUUGGUGCCUUCGGGUACUAUUUUCAGGAUUUACUUUGAGAAAACUA
 GAGUGUUUCAACAGGCAUUCGCCUUGAAUACUACAGCAUGGAAUAAUGAAGUA
 GGACUUUGGUUCUAUUUUGUUGGUUAUUGAGCCAGAGUAAUGGUUAAUAGGAGC
 AGUUGGGGGCAUUCGUAAUUAACUGUCAGAGGUGAAAUUCUUAAGAUUUGUAAA
 GACGAACUACUGCGAAAGCAUUUGCCAAGGAUGUUUUAUUAUAAUCAAGAACGAA
 AGUUAGGGGAUCGAAGACGAUCAGAUACCGUCGUAGUCCUAACCAUAAACUAUG
 CCGACUAGAGAUUGGAGGUCGUCAGUUUAAACGACUCCUUCAGCACCUUGAGAG
 AAUCAAAGUCUUUGGGUUCUGGGGGGAGUAUGGUCGCAAGUCUGAAACUAAA
 GGAAUUGACGGAAGGGCACCACCAGGCGUGGAGCCUGCGGCUAAAUUUGACUCA
 ACACGGGAAACCUCACCAGGUCCAGACAUAAGAGAGGAUUGACAGAUUGAUAGCU
 CUUUCUUGAUGAAUU (配列番号5)

10

20

30

【0102】

上記アッセイの分析感度を、*Babesia* 18S rRNA 標的のインビトロ転写物 (IVT) を使用することによって決定した。*Babesia* 18S rRNA の 10、100、1000、または10,000のIVTコピーを、IC緩衝剤へと添加した。IVTを、Procleix TCRおよび上記IVTを捕捉するための手順を使用し、続いて、上記のようにその捕捉されたIVTのTMA増幅によって、検出した。図6Bに示されるように、1mLあたり10 IVTコピーという希薄なものが検出できた。

【0103】

上記アッセイによって検出可能な*Babesia* 寄生生物の数を、これら結果に基づいて計算した。*Babesia* 感染ハムスター血液の寄生虫血症のスミア (parasitemic smear) から示されるように、 $1 \mu\text{L}$ あたり 7.20×10^6 個の赤血球のうち約 5.04×10^6 個が感染していた (RBCのうち約70%)。従って、*Babesia* 18S rRNAが緩衝化ACLおよび5% LLSを使用するアッセイによって検出可能である $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-7}$ の希釈において、約1~10の寄生生物が、添加したヒト全血サンプルのうち体積1mL中で検出可能であった。図6Aに示されるように、上記方法は、 1×10^{-9} という希薄さの希釈において、*Babesia* 18S rRNAを検出し得る。これは、上記方法の感度が、ヒト全血100mLあたり $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 18S rRNAコピーに相関する、サンプル100mLあたり1~10個の寄生生物またはこれより少ないという、少ない寄生生物を検出できることを示す。

40

【0104】

50

(実施例4．血液 対 溶解試薬の最適比の決定)

本実施例の目的は、上記方法において使用するための、全血 対 溶解試薬の最適比を決定することであった。ヒト全血に、 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-11}$ の範囲に及ぶ希釈において、*Babesia*感染ハムスター血液を添加した。次いで、上記サンプルを、1：2または1：3（血液：試薬）の比において、緩衝化ACLおよび5% LLSの溶解試薬で溶解した。*Babesia* 18S rRNAを、上記のようにProcleix TCRおよびTMAによる増幅を使用して各サンプルにおいて検出した。図7に示されるように、1：3（血液：試薬）の比は、 1×10^{-9} という希薄さでの感度で、ヒト全血中の低濃度の*Babesia*を検出するのに優れていた。対照的に、1：2（血液：試薬）の比を使用する場合には、検出感度は低下した。

10

【0105】

(実施例5．サンプル間の*Babesia*検出の再現性)

*Babesia*検出アッセイの再現性を、ドナー血液の複数サンプルにわたって決定した。この実験では、ヒト全血を、6名の異なるドナー患者から集めた。各サンプルに、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-12}$ の間の希釈において*Babesia*感染ハムスター血液を添加した。次いで、サンプルを、緩衝化ACLおよび5% LLSという溶解試薬で溶解した。*Babesia* 18S rRNAを、上記のようにProcleix TCRおよびTMAによる増幅を使用して、各サンプル中で検出した。図8で示されるように、このプロトコルでの溶解試薬の使用は、 1×10^{-6} および 1×10^{-8} という希薄さの希釈において、*Babesia* 18S rRNAの検出に関して異なるドナーサンプル間で優れた再現性を生じた。

20

【0106】

(実施例6．*Babesia*寄生生物および核酸の安定性)

実験を行って、ヒト全血中の*Babesia*寄生生物の安定性を経時的に決定した。寄生生物安定性を決定するために、ヒト全血に、 $1 \times 10^{-2} \sim 1 \times 10^{-9}$ の範囲に及ぶ希釈において、*Babesia*感染ハムスター血液を添加した。分析する前に、サンプルの一方の群を、添加後に25℃で5日間貯蔵した。別の群を、ヒト全血に添加したその同じ日に分析した。添加した全血サンプルを、緩衝化ACLおよび5% LLSという溶解試薬を使用して溶解した。*Babesia* 18S rRNAを、上記のようにProcleix TCRおよびTMAによる増幅を使用して各サンプル中で検出した。図9で示されるように、感度の顕著な喪失が、25℃で5日間の貯蔵後に、特に 1×10^{-7} および 1×10^{-8} の希釈において、観察された。

30

【0107】

さらなる研究を行って、RBC溶解後のサンプル中の*Babesia* 18S rRNAの安定性を決定した。ヒト全血に、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-9}$ の間の範囲に及ぶ希釈において、*Babesia*感染ハムスター血液を添加した。上記サンプルを、緩衝化ACLおよび5% LLSという溶解試薬を使用して溶解した。溶解したサンプルを、分析する前に、4℃で0～4日間貯蔵した。*Babesia* 18S rRNAを、上記のようにProcleix TCRおよびTMAによる増幅を使用して各サンプル中で検出した。図10で示されるように、感度の喪失が、4℃での貯蔵後に、特に、3日間および4日間の貯蔵後に観察された。感度のこの喪失は、 1×10^{-9} の希釈を有するサンプルでは容易に観察できた。

40

【0108】

本発明は、理解を明瞭にする目的で詳細に記載されてきたが、ある種の改変が、添付の請求項の範囲内で実施され得る。本出願において引用されるアクセッション番号、ウェブサイトなどを含む全ての刊行物、および特許文書は、引用により各々が個々に援用されると示されているのと同程度まで、全ての目的のためにそれらの全体において参考として援用される。配列、ウェブサイトまたは他の参考文献の種々のバージョンが、種々の時間で存在し得る程度まで、有効な出願日での上記参考文献と関連するバージョンが意味を持つ。有効な出願日は、発行時のアクセッション番号が開示される最も早い優先日を意味する

50

。文脈から別段明らかでなければ、本発明の任意の要素、実施形態、工程、特徴または局面が、任意の他のものと組み合わせて実施され得る。

【 図 1 】

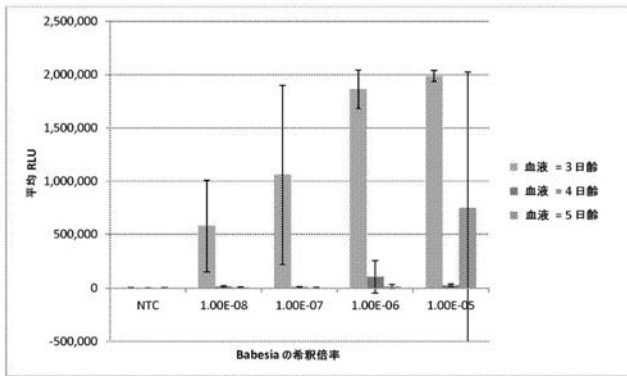


FIG. 1

【 図 2 a 】

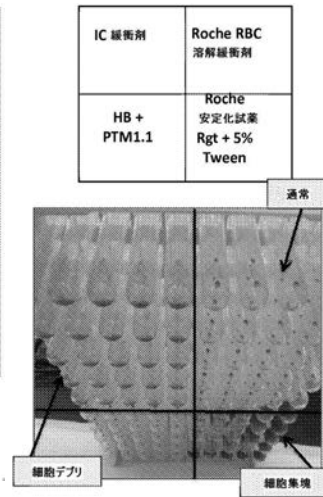


FIG. 2A

【 図 2 b 】

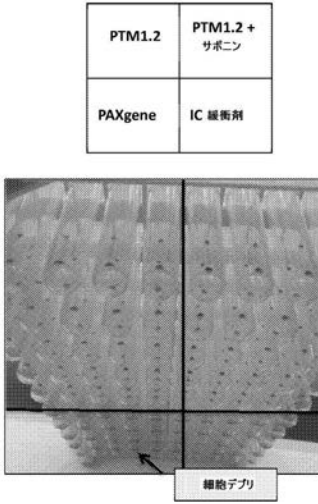


FIG. 2B

【 図 2 c 】

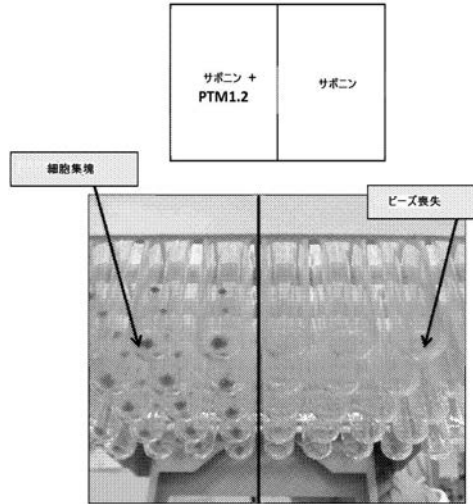


FIG. 2C

【 図 3 】

FIG 3

試薬/試薬名	安定化因子		阻害剤/阻害剤		消滅因子/安定化因子		RNAse/安定化		pH/安定化		TCR	
	4%	TDMAB/250mM Gibco	NH4Cl/NANCOS	Tween-20	β-メルカプトエーテル (BME)	UIS	pH 7.0	Proclon	Apical			
PAXgene 溶解液	X	X		X								
PTM1.0	X	X										
PTM1.1 (5% Tween)	X	X		X								
PTM1.2 (10% Tween)	X	X		X								
PTM1.4 (Paxgene-BME)	X	X		X								
Gibco 溶解液/溶解液			X									
Isendevine 0.2% 溶解液	X	X										
PTM1.0	X	X		X								
PTM1.1	X	X		X								
PTM1.2	X	X		X								
PTM1.3	X	X		X								
PTM1.4 (5% UIS)					X							
PTM1.4 (5% UIS)					X							
IC 緩衝剤 (0.5% UIS)					X							
PTM1.0 (IC+BME)					X							
サボニン + 5% Tween					X							

問題なしの場合
活性は変動する(血液の他に存在する)
活性なしまたは活性が低減
沈殿物
細胞デブリ
細胞集塊の形成が抑制された
細胞集塊の形成が促進された

【 図 4 】

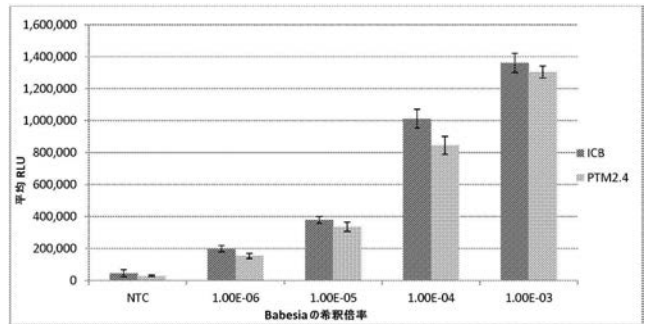


FIG. 4

【 図 5 】

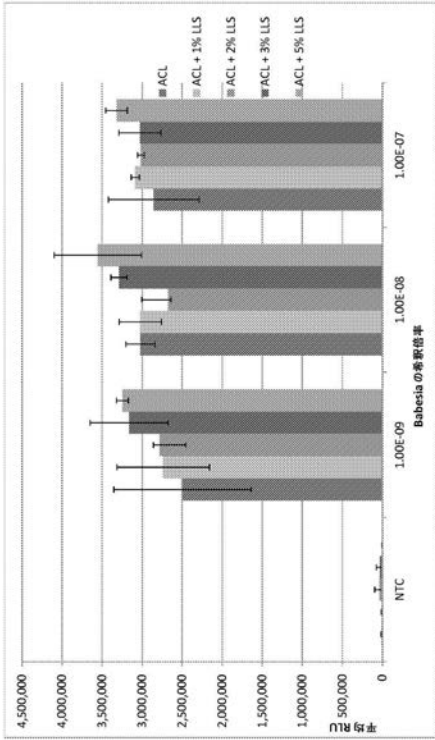


FIG. 5

【 図 6 A 】

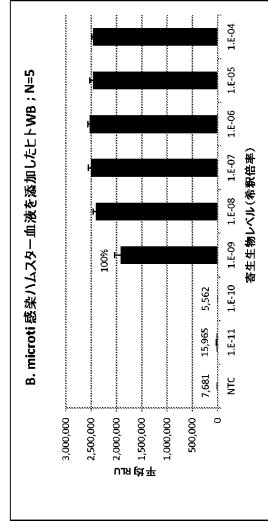


FIG. 6A

【 図 6 B 】

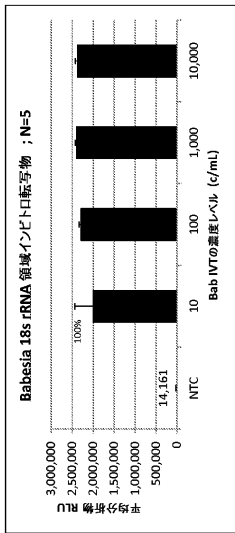


FIG. 6B

【 図 7 】

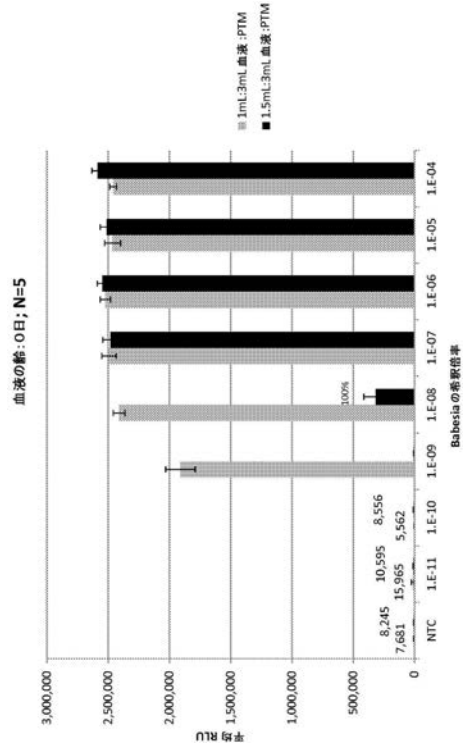


FIG. 7

【 図 8 】

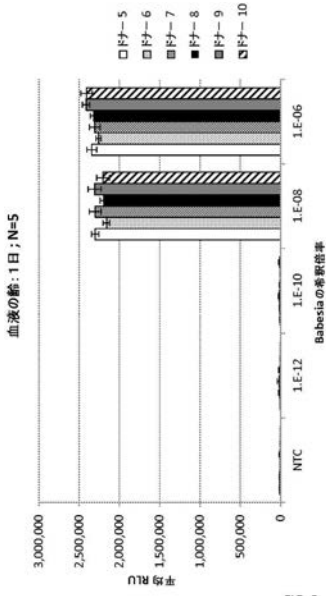


FIG. 8

【 図 9 】

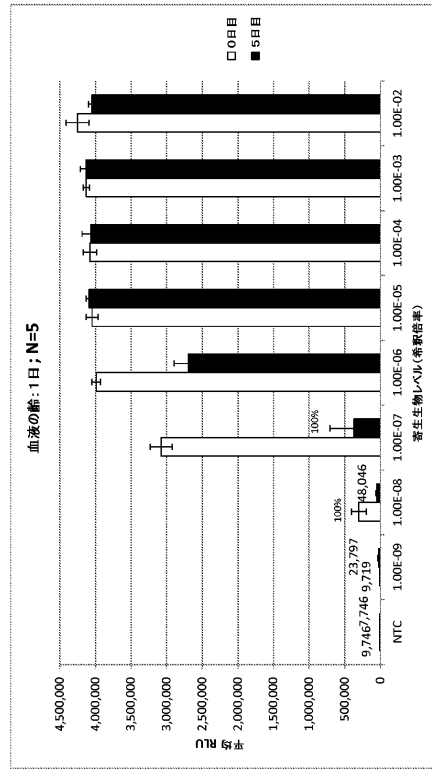


FIG. 9

【 図 10 】

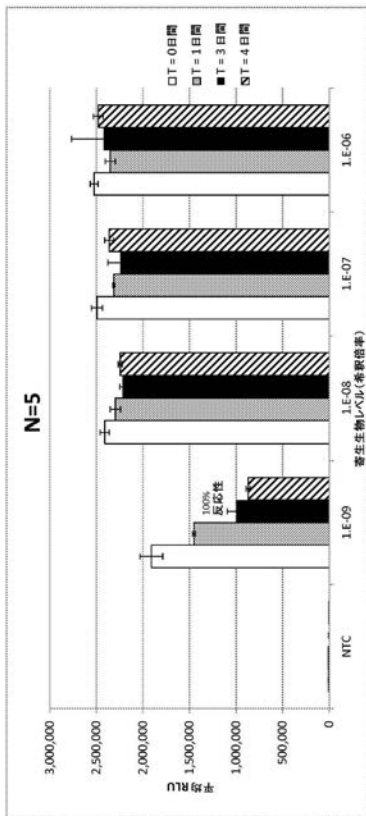


FIG. 10

【配列表】

2017537652000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/056480
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/483(2006.01)i, C12N 5/078(2010.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/68; C07H 21/04; A01N 1/02; C12Q 1/00; C07H 21/02; C07H 21/00; G01N 33/483; C12N 5/078		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: red blood cell, RNA, ammonium chloride, lithium lauryl sulfate, anti-coagulant, sodium bicarbonate, pathogen		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5973137 A (HEATH) 26 October 1999 See abstract; columns 4-6; claims 1-13.	1-4, 21-23
A	US 7670768 B1 (HEATH et al.) 02 March 2010 See abstract; column 13; claims 39-40.	1-4, 21-23
A	US 2005-0208501 A1 (GOLDRICK) 22 September 2005 See abstract; paragraph [0030].	1-4, 21-23
A	US 2009-0143572 A1 (INOMATA et al.) 04 June 2009 See abstract; paragraph [0189].	1-4, 21-23
A	US 2004-0142318 A1 (WU et al.) 22 July 2004 See abstract; claims 6-18.	1-4, 21-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 29 December 2015 (29.12.2015)		Date of mailing of the international search report 04 January 2016 (04.01.2016)
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. +82-42-481-3371

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2015/056480

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 19,28,31-32
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 19, 28 and 31-32 are unclear since they each refer to a multiple dependent claim which does not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. Claims Nos.: 5-18,20,24-27,29-30
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2015/056480

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5973137 A	26/10/1999	None	
US 7670768 B1	02/03/2010	CA 2319665 A1 CA 2319665 C DE 69938774 D1 EP 1053357 A1 EP 1053357 B1 EP 1950312 A1 EP 2290099 A1 EP 2290099 B1 JP 2003-529314 A JP 4616990 B2 WO 99-39009 A1	05/08/1999 29/06/2010 03/07/2008 22/11/2000 21/05/2008 30/07/2008 02/03/2011 10/10/2012 07/10/2003 19/01/2011 05/08/1999
US 2005-0208501 A1	22/09/2005	DE 602005023133 D1 EP 1728078 A1 EP 1728078 B1 JP 2007-529225 A JP 2011-200236 A WO 2005-090984 A1	07/10/2010 06/12/2006 25/08/2010 25/10/2007 13/10/2011 29/09/2005
US 2009-0143572 A1	04/06/2009	CN 101233233 A EP 1920054 A1 EP 1920054 A4 JP 2007-089574 A JP 4956727 B2 US 7884201 B2 WO 2007-026929 A1	30/07/2008 14/05/2008 26/08/2009 12/04/2007 20/06/2012 08/02/2011 08/03/2007
US 2004-0142318 A1	22/07/2004	CA 2447586 A1 EP 1422509 A1 US 7247484 B2	01/05/2004 26/05/2004 24/07/2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 N	5/078 (2010.01)	C 1 2 N	5/078	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 ガオ, クイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 3 1, サンディエゴ, ドーバーヒル ロード 1 1
 1 3 4

(72)発明者 リネン, ジェフリー エム.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 6 4, パウエイ, ブロンコ ウェイ 1 3 3 0 2

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA25 AA28 AA29 BA13 BB02 BB03 BB29 BB40 CA02
 CA25 CB17 CB21 DA14 FB01 FB02 FB08 FB12 FB13 FB15
 GC12
 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR50 QR51
 QS34 QX02
 4B065 AA15X AA15Y AA90X CA46

专利名称(译)	赤血球溶解溶液		
公开(公告)号	JP2017537652A	公开(公告)日	2017-12-21
申请号	JP2017539532	申请日	2015-10-20
[标]申请(专利权)人(译)	简·探针公司		
申请(专利权)人(译)	根 - Probe公司		
[标]发明人	シェリーセリージジュモン ガオクイ リネンジェフリーエム		
发明人	シェリーセリー, ジジュモン ガオ, クイ リネン, ジェフリー エム.		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/02 G01N33/48 G01N33/53 C12N1/20 C12N15/09 C12N5/078		
CPC分类号	C12N1/06 C12Q1/6806 G01N33/48 C12Q2527/125 C12N15/1003 C12Q1/6844 C12Q1/6888 G01N33/50 G01N33/5002 C12Q1/6893 C12Q2600/158		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/02 G01N33/48.K G01N33/53.M C12N1/20.A C12N15/00.A C12N5/078		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA25 2G045/AA28 2G045/AA29 2G045/BA13 2G045/BB02 2G045/BB03 2G045/BB29 2G045/BB40 2G045/CA02 2G045/CA25 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA14 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GC12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR50 4B063/QR51 4B063/QS34 4B063/QX02 4B065/AA15X 4B065/AA15Y 4B065/AA90X 4B065/CA46		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	62/066244 2014-10-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供用于裂解红细胞的裂解试剂，从而以适于分析的形式从寄生虫释放靶标（例如RNA）。该试剂至少含有氯化铵和阴离子表面活性剂，并可含有抗凝血剂。该试剂可以通过溶解红细胞来制备，它用于保护目标，它是由裂解物降解的释放，和随后的处理（例如，靶标捕获用于分析其目标，扩增，检测，或测序）兼容。

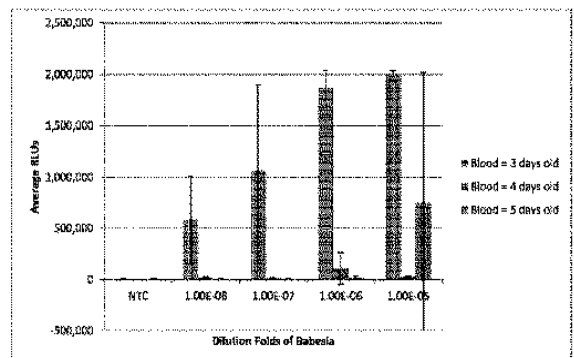


FIG. 1