

(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2004-518416

(P2004-518416A)

(43) 公表日 平成16年6月24日(2004.6.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A	2 G O 5 4
G O 1 N 21/77	G O 1 N 21/77	Z	4 B O 2 4
G O 1 N 21/78	G O 1 N 21/78	C	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 101 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-537919 (P2002-537919)	(71) 出願人	500169900 ジェン-プローブ・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
(86) (22) 出願日	平成13年10月22日 (2001.10.22)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月23日 (2003.4.23)	(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/045396	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(87) 国際公開番号	W02002/034951	(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
(87) 国際公開日	平成14年5月2日 (2002.5.2)	(74) 代理人	100096013 弁理士 富田 博行
(31) 優先権主張番号	60/242, 620		
(32) 優先日	平成12年10月23日 (2000.10.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/280, 058		
(32) 優先日	平成13年3月30日 (2001.3.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト免疫不全ウイルス2 (H I V - 2) を検出するための組成物および方法

(57) 【要約】

H I V - 2 特異的単位複製配列を合成しそして検出するための組成物および方法。特に記載するのは、ハイブリダイゼーションプローブとして有用なオリゴヌクレオチド、および非常に低レベルのH I V - 2 核酸の検出を促進する増幅プライマーである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H I V - 2 核酸配列を検出するための組成物であって：

配列番号 9 の配列内に含有される 9 - 3 4 の隣接する塩基の配列を含んでなり、1 0 0 ヌクレオチドまでの長さを有する、第一の増幅オリゴヌクレオチド；および

配列番号 1 の配列由来の 1 9 - 4 0 の隣接する塩基の配列を含んでなり、1 0 0 ヌクレオチドまでの長さを有する、第二の増幅オリゴヌクレオチド

を含んでなる、前記組成物。

【請求項 2】

第二の増幅オリゴヌクレオチドの長さが 1 9 - 4 0 ヌクレオチドである、請求項 1 の組成物。 10

【請求項 3】

第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さが 1 8 - 6 0 ヌクレオチドである、請求項 2 の組成物。

【請求項 4】

第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さが 1 8 - 3 4 ヌクレオチドである、請求項 3 の組成物。

【請求項 5】

第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さが 1 8 - 2 5 ヌクレオチドである、請求項 4 の組成物。 20

【請求項 6】

第一の増幅オリゴヌクレオチドの配列が、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3 および配列番号 1 4 からなる群より選択される、請求項 5 の組成物。

【請求項 7】

第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さが 1 8 - 6 0 ヌクレオチドであり、そして第一の増幅オリゴヌクレオチドがプロモーター配列をさらに含んでなる、請求項 2 の組成物。

【請求項 8】

第二の増幅オリゴヌクレオチドの長さが 1 9 - 2 1 ヌクレオチドである、請求項 2 の組成物。

【請求項 9】

第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さが 1 8 - 3 4 ヌクレオチドである、請求項 8 の組成物。 30

【請求項 1 0】

第二の増幅オリゴヌクレオチドの長さが 1 9 - 2 1 ヌクレオチドである、請求項 3 の組成物。

【請求項 1 1】

第一の増幅オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8 および配列番号 1 9 からなる群より選択されるプロモーター - プライマーである、請求項 7 の組成物。

【請求項 1 2】

第二の増幅オリゴヌクレオチドが、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 からなる群より選択される、請求項 1 0 の組成物。 40

【請求項 1 3】

第一の増幅オリゴヌクレオチドがプロモーター配列をさらに含んでなる、請求項 1 0 の組成物。

【請求項 1 4】

第一の増幅オリゴヌクレオチドが、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8 および配列番号 1 9 からなる群より選択されるプロモーター - プライマーである、請求項 1 3 の組成物。

【請求項 1 5】

第二の増幅オリゴヌクレオチドが、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 からなる群より選択される、請求項 13 の組成物。

【請求項 16】

第二の増幅オリゴヌクレオチドが、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 からなる群より選択される、請求項 14 の組成物。

【請求項 17】

第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さが 18 - 25 ヌクレオチドであり、そして第二の増幅オリゴヌクレオチドの長さが 19 - 21 ヌクレオチドである、請求項 1 の組成物。

【請求項 18】

第一の増幅オリゴヌクレオチドが、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13 および配列番号 14 からなる群より選択される、請求項 17 の組成物。 10

【請求項 19】

第二の増幅オリゴヌクレオチドが、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 からなる群より選択される、請求項 17 の組成物。

【請求項 20】

第二の増幅オリゴヌクレオチドが、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 からなる群より選択される、請求項 18 の組成物。

【請求項 21】

配列番号 21 またはその相補体を含んでなる配列を有するオリゴヌクレオチド検出プローブをさらに含んでなる、請求項 1 の組成物。 20

【請求項 22】

前記オリゴヌクレオチド検出プローブが 18 ヌクレオチドまでの長さを有する、請求項 21 の組成物。

【請求項 23】

前記オリゴヌクレオチド検出プローブの配列が、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26 および配列番号 27 からなる群より選択される、請求項 22 の組成物。

【請求項 24】

第一の増幅オリゴヌクレオチドの配列が、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18 および配列番号 19 からなる群より選択され、第二の増幅オリゴヌクレオチドの配列が、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6 および配列番号 7 からなる群より選択され、そしてオリゴヌクレオチド検出プローブの配列が、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26 および配列番号 27 からなる群より選択される、請求項 23 の組成物。 30

【請求項 25】

核酸を含んでなる生物学的試料が、HIV-2 ヌクレオチド塩基配列を含むかどうか決定する方法であって：

生物学的試料の核酸を

配列番号 9 の配列内に含有される 9 - 34 の隣接する塩基の配列を含んでなり、100 ヌクレオチドまでの長さを有する第一の増幅オリゴヌクレオチド、および 40

配列番号 1 の配列由来の 19 - 40 の隣接する塩基の配列を含んでなり、100 ヌクレオチドまでの長さを有する第二の増幅オリゴヌクレオチド

を含んでなる組成物と接触させ；

前記生物学的試料に存在する、いかなる前記 HIV-2 ヌクレオチド塩基配列も増幅して、増幅した核酸を産生し；そして

増幅工程で産生した、前記の増幅した核酸を検出し、それによって、前記の増幅した核酸の検出が、前記生物学的試料が HIV-2 ヌクレオチド塩基配列を含んだことの指標となる

工程を含んでなる、前記方法。 50

【請求項 26】

第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さが18 - 60ヌクレオチドであり、そして第二の増幅オリゴヌクレオチドの長さが19 - 40ヌクレオチドである、請求項25の方法。

【請求項 27】

前記の第一の増幅オリゴヌクレオチドがプロモーター - プライマーであり、そして増幅工程が、TMAによって増幅することを含んでなる、請求項26の方法。

【請求項 28】

検出工程が、まず、増幅した核酸を、前記の増幅した核酸に特異的なハイブリダイゼーションアッセイプローブとハイブリダイズさせ、そしてその後、前記の増幅した核酸にハイブリダイズした、前記ハイブリダイゼーションアッセイプローブの量を測定することを含んでなる、請求項26の方法。

10

【請求項 29】

ハイブリダイゼーションアッセイプローブが、標識した核酸プローブである、請求項28の方法。

【請求項 30】

ハイブリダイゼーションアッセイプローブが配列番号21またはその相補体の配列を含んでなり、22ヌクレオチドまでの長さを有する、請求項28の方法。

【請求項 31】

配列番号21またはその相補体の配列、および検出可能標識を含んでなり、35ヌクレオチドまでの長さを有する、オリゴヌクレオチド。

20

【請求項 32】

長さが22ヌクレオチドまでである、請求項31のオリゴヌクレオチド。

【請求項 33】

配列番号20またはその相補体の配列内に含有される、少なくとも16の隣接するヌクレオチドを有する、請求項32のオリゴヌクレオチド。

【請求項 34】

配列番号20またはその相補体の配列を有する、請求項33のオリゴヌクレオチド。

【請求項 35】

18ヌクレオチドまでの長さを有する、請求項33のオリゴヌクレオチド。

【請求項 36】

長さが18ヌクレオチドである、請求項35のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 37】

配列番号22またはその相補体、配列番号23またはその相補体、配列番号24またはその相補体、配列番号25またはその相補体、配列番号26またはその相補体、および配列番号27またはその相補体からなる群より選択される配列を有する、請求項35のオリゴヌクレオチド。

【請求項 38】

DNAを含んでなる、請求項31のオリゴヌクレオチド。

【請求項 39】

少なくとも1つのヌクレオチド類似体(analog)を含んでなる、請求項31のオリゴヌクレオチド。

40

【請求項 40】

前記の少なくとも1つのヌクレオチド類似体が、リボース部分の2'位にメトキシ基を含んでなる、請求項39のオリゴヌクレオチド。

【請求項 41】

検出可能標識が化学発光標識または放射標識である、請求項37のオリゴヌクレオチド。

【請求項 42】

検出可能標識がアクリジニウムエステルである、請求項41のオリゴヌクレオチド。

【請求項 43】

生物学的試料においてHIV-2核酸の存在を検出する方法であって：

50

(a) 配列番号 2 1 またはその相補体の配列、および検出可能標識を含んでなり、3 5 ヌクレオチドまでの長さを有するハイブリダイゼーションプローブを、前記生物学的試料に提供し；

(b) 高ストリンジェンシー条件下で、生物学的試料に存在する可能性があるいかなる HIV - 2 核酸も、前記ハイブリダイゼーションプローブとハイブリダイズさせて、プローブ：標的ニ重鎖を形成し；そして

(c) 生物学的試料に HIV - 2 が存在する指標として、前記プローブ：標的ニ重鎖を検出する

工程を含んでなる、前記方法。

【請求項 4 4】

提供工程中のハイブリダイゼーションプローブの長さが 2 2 ヌクレオチドまでである、請求項 4 3 の方法。

【請求項 4 5】

前記生物学的試料が、血漿および血清からなる群より選択される、血液産物である、請求項 4 4 の方法。

【請求項 4 6】

工程 (a) の前に、前記生物学的試料に存在する可能性があるいかなる HIV - 2 から核酸を遊離させる工程がある、請求項 4 5 の方法。

【請求項 4 7】

前記生物学的試料に存在する可能性がある前記のいかなる HIV - 2 から遊離させた核酸を、固体支持体上に捕捉する工程をさらに含んでなる、請求項 4 6 の方法。

【請求項 4 8】

前記生物学的試料が溶解物である、請求項 4 4 の方法。

【請求項 4 9】

前記高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件が、0 . 4 8 M リン酸ナトリウム緩衝液、0 . 1 % ドデシル硫酸ナトリウム、並びに各 1 m M の EDT A および EG T A を含んでなる、請求項 4 4 の方法。

【請求項 5 0】

前記高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件が、0 . 6 - 0 . 9 M の範囲の塩濃度を含んでなる、請求項 4 4 の方法。

【請求項 5 1】

工程 (a) 中のハイブリダイゼーションプローブが、配列番号 2 2 またはその相補体、配列番号 2 3 またはその相補体、配列番号 2 4 またはその相補体、配列番号 2 5 またはその相補体、配列番号 2 6 またはその相補体、および配列番号 2 7 またはその相補体からなる群より選択される配列を有する、請求項 4 4 の方法。

【請求項 5 2】

ハイブリダイゼーションプローブが少なくとも 1 つのヌクレオチド類似体を含んでなる、請求項 5 1 の方法。

【請求項 5 3】

ハイブリダイゼーションプローブが検出可能標識を含んでなる、請求項 5 1 の方法。

【請求項 5 4】

検出可能標識がアクリジニウムエステルであり、そして検出工程が、前記プローブ：標的ニ重鎖のいずれも検出する発光測定を行うことを含んでなる、請求項 5 3 の方法。

【請求項 5 5】

(a) 配列番号 9 の配列内に含有される 9 - 3 4 の隣接する塩基の配列を含んでなり、1 0 0 ヌクレオチドまでの長さを有する、第一の増幅オリゴヌクレオチド；および

(b) 配列番号 1 の配列由来の 1 9 - 4 0 の隣接する塩基の配列を含んでなり、1 0 0 ヌクレオチドまでの長さを有する、第二の増幅オリゴヌクレオチド

を含んでなる、H I V - 2 核酸を検出するためのキット。

【請求項 5 6】

10

20

30

40

50

(c) 配列番号 21 またはその相補体の配列、および検出可能標識を含んでなる、オリゴヌクレオチド検出プローブ

をさらに含んでなる、請求項 55 のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願

本出願は、米国仮出願第 60 / 242 , 620 号、2000 年 10 月 23 日出願、および米国仮出願第 60 / 280 , 058 号、2001 年 3 月 30 日出願の優先権を請求する。これらの関連出願の開示は、本明細書に援用される。

【0002】

発明の分野

本発明は、バイオテクノロジーの分野に関する。より具体的には、本発明は、HIV-2 核酸配列を検出するための診断アッセイに関する。

【0003】

発明の背景

HIV/AIDS 汎発性は、主に、HIV-1 による感染のためであるが、AIDS の別の原因として、異なるレトロウイルスが出現してきている。このいわゆる「HIV-2」ウイルスは、1986 年に西アフリカで AIDS 患者から最初に単離され、そして続いて、翌年、米国で初めて、感染性病原体として検出された。1994 年の終わりまでに、米国では 100 症例未満の HIV-2 が報告されてきた。このように表面上は少数であるにもかかわらず、HIV-2 は、HIV-1 感染から生じる AIDS 症例と臨床的に区別不能な、増加する数の免疫抑制疾患における原因病原体として同定されている (Kankira, Science 232:238 (1986); Kankira, Science 236:827 (1987); Clavelら, Science 233:343 (1986); Clavelら, N. Engl. J. Med. 316:1180 (1987))。HIV-2 は、その形態および CD4⁺ 細胞への向性により HIV-1 に関連付けられるが、明らかに別個のウイルスであり、そして単に HIV-1 のエンベローム変異体 (variant) ではない。

【0004】

実際、HIV-2 は、遠くしか HIV-1 に関連しておらず、gag および pol タンパク質ではおよそ 50% のアミノ酸保存であり、そして env 遺伝子産物では 30% 未満のアミノ酸保存しかなく、その存在は、HIV-1 感染を検出するのに用いられる血清学的アッセイによって有効に検出されない (Constantine NT, AIDS 7:1 (1993); Markovitz DM, Ann. Intern. Med. 118:211 (1993))。その結果、HIV-2 ウイルス核酸を特異的に検出するのに使用可能な核酸プローブを開発する試みがなされてきている。

【0005】

興味深いことに、HIV-1 および HIV-2 どちらのゲノムも、異なる単離体間で、実質的な配列不均一性を示す。この不均一性の結果として、HIV-1 のすべての単離体または HIV-2 のすべての単離体間の絶対配列保存の実質的な領域を見出すことが不可能となってきた (公開欧州特許出願 EP 0 887 427 を参照されたい)。実際、これらのウイルス各々に関して、特有のポリヌクレオチド配列を持つ多くのウイルス単離体が同定されてきており、この要因は、信頼性があり、そして有効な核酸試験のためのプローブを構築するのをさらに困難にしている。

【0006】

HIV-1 同様、HIV-2 もまた、血液および血漿を含む体液の交換を通じて伝播性であるため、感染個体において、ウイルスに対する抗体が検出可能になるか、または症状が明らかになる前に、感染した体液を検出可能であることが重要である。そうでなければ HIV-2 感染体液を (例えば輸血中に、全血または血漿を)、あるいは寄付された血液または血漿由来の産物を投与される可能性がある患者を保護するため、寄付された体液中の

10

20

30

40

50

ウイルスの存在を検出し、こうした方法または産物におけるその使用を防止することが特に重要である。H I V - 2 の検出に用いる方法および試薬が、感染初期段階のドナーである可能性がある感染個体に存在しうる、比較的少数のウイルスコピーを検出可能であることもまた、重要である。

【 0 0 0 7 】

H I V - 2 を検出するためのアッセイおよび試薬が、例えば米国特許第 6 , 0 2 0 , 1 2 3 号、第 5 , 6 8 8 , 6 3 7 号、第 5 , 5 4 5 , 7 2 6 号および第 5 , 3 1 0 , 6 5 1 号 ; 欧州特許第 E P 0 4 0 4 6 2 5 B 1 号および第 E P 0 2 3 9 4 2 5 B 1 号 ; 並びに公開欧州特許出願第 E P 1 0 2 6 2 3 6 A 2 号、第 E P 0 8 8 7 4 2 7 A 2 号に先に開示されている。

10

【 0 0 0 8 】

発明の概要

本発明の第一の側面は、H I V - 2 核酸配列を検出するための組成物に関する。該組成物は、1 0 0 ヌクレオチドまでの長さを有する、第一の増幅オリゴヌクレオチドを含む。この第一の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号 9 の配列内に含有される 9 - 3 4 の隣接する塩基の配列を含む。該組成物にやはり含まれるのは、1 0 0 ヌクレオチドまでの長さを有する、第二の増幅オリゴヌクレオチドである。この第二の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 の配列由来の 1 9 - 4 0 の隣接する塩基の配列を含む。本発明の好ましい態様において、第二の増幅オリゴヌクレオチドの長さは、1 9 - 4 0 ヌクレオチドである。本発明のさらにより好ましい態様において、第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さは 1 8 - 6 0 ヌクレオチドであり、より好ましくは 1 8 - 3 4 ヌクレオチドであり、そしてさらにより好ましくは 1 8 - 2 5 ヌクレオチドである。1 8 - 2 5 ヌクレオチドの範囲の長さを有する第一の増幅オリゴヌクレオチドの例を、配列番号 1 0 、配列番号 1 1 、配列番号 1 2 、配列番号 1 3 および配列番号 1 4 に示す。別の好ましい態様において、第二の増幅オリゴヌクレオチドの長さが 1 9 - 4 0 ヌクレオチドの範囲である場合、第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さは 1 8 - 6 0 ヌクレオチドの範囲であり、そしてプロモーター配列を含む。本発明の別の好ましい態様にしたがって、第一の増幅オリゴヌクレオチドが 1 0 0 ヌクレオチドまでの長さを有する場合、第二の増幅オリゴヌクレオチドの長さは 1 9 - 2 1 ヌクレオチドの範囲である。別の好ましい態様において、第一の増幅オリゴヌクレオチドは 1 8 - 3 4 ヌクレオチドの長さを有し、そして第二の増幅オリゴヌクレオチドは 1 9 - 2 1 ヌクレオチドの長さを有する。さらに別の好ましい態様において、第一の増幅オリゴヌクレオチドが 1 8 - 6 0 ヌクレオチドの長さを有する場合、第二の増幅オリゴヌクレオチドは 1 9 - 2 1 ヌクレオチドの長さを有する。本発明のさらに別の好ましい態様において、第一の増幅オリゴヌクレオチドが 1 8 - 6 0 ヌクレオチドの長さを有し、そして第二の増幅オリゴヌクレオチドが 1 9 - 4 0 ヌクレオチドの長さを有する場合、第一の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 5 - 1 9 のいずれか 1 つの配列を有するプロモーター - プライマーである。本発明のさらに別の好ましい態様において、第一の増幅オリゴヌクレオチドが 1 8 - 6 0 ヌクレオチドの長さを有し、そして第二の増幅オリゴヌクレオチドが 1 9 - 2 1 ヌクレオチドの長さを有する場合、第二の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号 2 - 7 のいずれか 1 つの配列を有することが可能である。本発明のさらに別の好ましい態様において、第一の増幅オリゴヌクレオチドが 1 8 - 6 0 ヌクレオチドの長さを有し、そして第二の増幅オリゴヌクレオチドが 1 9 - 2 1 ヌクレオチドの長さを有する場合、第一の増幅オリゴヌクレオチドはプロモーター配列をさらに含むことが可能である。例えば、第一の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号 1 5 - 1 9 のいずれか 1 つの配列を有するプロモーター - プライマーであることが可能である。あるいは、第一の増幅オリゴヌクレオチドが 1 8 - 6 0 ヌクレオチドの長さを有し、第二の増幅オリゴヌクレオチドが 1 9 - 2 1 ヌクレオチドの長さを有し、そして第一の増幅オリゴヌクレオチドがプロモーター配列をさらに含む場合、第二の増幅オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号 2 - 7 のいずれか 1 つであることが可能である。本発明のさらに別の好ましい態様において、第一の増幅オリゴヌクレオチドが 1 8 - 6 0 ヌクレオチドの長さを有し、第二の増幅オリゴヌクレ

20

30

40

50

オチドが19 - 21ヌクレオチドの長さを有し、そして第一の増幅オリゴヌクレオチドが配列番号15 - 19のいずれか1つの配列を有するプロモーター - プライマーである場合、第二の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号2 - 7のいずれか1つに提供される配列を有することが可能である。本発明の別の好ましい態様にしたがって、第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さは18 - 25ヌクレオチドであり、そして第二の増幅オリゴヌクレオチドの長さは19 - 21ヌクレオチドである。この場合、第一の増幅オリゴヌクレオチドは、例えば配列番号10 - 14のいずれか1つである配列を有することが可能である。あるいは、第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さが18 - 25ヌクレオチドであり、そして第二の増幅オリゴヌクレオチドの長さが19 - 21ヌクレオチドである場合、第二の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号2 - 7のいずれか1つに提供される配列を有することが可能である。本発明のさらに別の非常に好ましい態様において、第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さが18 - 25ヌクレオチドであり、そして第二の増幅オリゴヌクレオチドの長さが19 - 21ヌクレオチドであり、そして第一の増幅オリゴヌクレオチドが配列番号10 - 14のいずれか1つに提供される配列を有する場合、第二の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号2 - 7のいずれか1つであることが可能である。別の態様にしたがって、各々100ヌクレオチドまでの長さを有する、第一および第二の増幅オリゴヌクレオチドを含む組成物は、配列番号21またはその相補体を含む配列を有するオリゴヌクレオチド検出プローブをさらに含むことが可能である。好ましくは、検出プローブは、18ヌクレオチドまでの長さを有し、そしてより好ましくは、配列番号22 - 27のいずれか1つの配列を有する。非常に好ましい態様において、第一の増幅オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号10 - 19のいずれか1つであり、第二の増幅オリゴヌクレオチドの配列は、配列番号2 - 7のいずれか1つであり、そしてオリゴヌクレオチド検出プローブの配列は、配列番号22 - 27のいずれか1つである。

10

20

【0009】

本発明の第二の側面は、核酸を含有する生物学的試料が、HIV - 2ヌクレオチド塩基配列を含むかどうか決定する方法に関する。本発明の方法の第一の工程は、生物学的試料の核酸を、配列番号9の配列を含み、そして100ヌクレオチドまでの長さを有する第一の増幅オリゴヌクレオチドを含む組成物と接触させることを伴う。この第一の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号9の配列内に含有される9 - 34の隣接する塩基の配列を有する。該組成物はさらに、配列番号1の配列由来の19 - 40の隣接する塩基を有し、そして100ヌクレオチドまでの長さを有する第二の増幅オリゴヌクレオチドをさらに含む。第二の工程は、生物学的試料に存在する、いかなるHIV - 2ヌクレオチド塩基配列も増幅して、増幅した核酸を産生することを伴う。最後に、増幅工程で産生した、増幅した核酸を検出する工程がある。本発明の方法にしたがって、増幅した核酸の陽性検出は、生物学的試料がHIV - 2ヌクレオチド塩基配列を含んだことの指標となる。好ましい態様において、第一の増幅オリゴヌクレオチドは長さ18 - 60ヌクレオチドであり、そして第二の増幅オリゴヌクレオチドは長さ19 - 40ヌクレオチドである。同じ2つのオリゴヌクレオチドを使用する、さらにより好ましい態様において、第一の増幅オリゴヌクレオチドはプロモーター - プライマーであり、そして増幅工程は、転写仲介増幅反応または「TMA」によって増幅することを伴う。本発明の異なる好ましい態様にしたがって、第一および第二の増幅オリゴヌクレオチドが、それぞれ18 - 60および19 - 40ヌクレオチドの長さを有する場合、検出工程は、まず、増幅した核酸を、増幅した核酸に特異的なハイブリダイゼーションアッセイプローブとハイブリダイズさせ、そしてその後、増幅した核酸にハイブリダイズした、ハイブリダイゼーションアッセイプローブの量を測定することを伴う。これは、例えば、標識した核酸プローブを用いることによって達成可能である。代替法において、ハイブリダイゼーションアッセイプローブは配列番号21またはその相補体の配列を含み、そして35ヌクレオチドまで、または22ヌクレオチドまでの長さを有する。

30

40

【0010】

本発明の第三の側面は、35ヌクレオチドまでの長さを有し、そして配列番号21または

50

その相補体の配列を有するオリゴヌクレオチドに関する。特定の好ましい態様において、標識したオリゴヌクレオチドは、22ヌクレオチドまでの長さを有する。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、配列番号20またはその相補体の配列内に含有される、少なくとも16の隣接するヌクレオチドを有する。1つの態様において、オリゴヌクレオチドは配列番号20またはその相補体の配列を有する。別の好ましい態様において、配列番号21またはその相補体の配列を含む該オリゴヌクレオチドは、18ヌクレオチドまでの長さを有する。例えば、オリゴヌクレオチドは、配列番号22またはその相補体、配列番号23またはその相補体、配列番号24またはその相補体、配列番号25またはその相補体、配列番号26またはその相補体、および配列番号27またはその相補体のいずれか1つの配列を有することが可能である。特定の標識オリゴヌクレオチドは、正確に18ヌクレオチドの長さを有する。本発明の他の態様において、オリゴヌクレオチドが22ヌクレオチドまでの長さを有し、そして配列番号21またはその相補体の配列を含む場合、オリゴヌクレオチドがDNAであることが可能であるが、あるいは、少なくとも1つのヌクレオチド類似体(analog)を含むことが可能である。好ましくは、ヌクレオチド類似体は、リボース部分の2'位にメトキシ基を有する。本発明の別の好ましい態様において、配列番号21またはその相補体の配列を含み、そして18ヌクレオチドまでの長さを有するオリゴヌクレオチドはまた、検出可能標識も含む。有用な検出可能標識の例には、化学発光標識および放射標識が含まれる。化学発光標識の特に好ましい例は、アクリジニウムエステルである。

10

【0011】

本発明の第四の側面は、生物学的試料においてHIV-2核酸の存在を検出する方法に関する。本発明の方法の第一の工程は、長さ35ヌクレオチドまでであり、そして配列番号21またはその相補体の配列を含むハイブリダイゼーションプローブを、生物学的試料に提供することを伴う。次に、高ストリンジェンシー条件下で、生物学的試料に存在する可能性があるいかなるHIV-2核酸も、ハイブリダイゼーションプローブとハイブリダイズさせて、プローブ：標的ニ重鎖を形成する工程がある。最後に、生物学的試料にHIV-2が存在する指標として、プローブ：標的ニ重鎖を検出する工程がある。本発明の方法のいくつかの態様において、生物学的試料に提供するハイブリダイゼーションプローブの長さは、22ヌクレオチドまででなく、わずか22ヌクレオチドまでである。本発明の別の好ましい態様において、生物学的試料は、血漿または血清いずれかである、血液産物である。より好ましい態様において、「提供」工程を行う前に、生物学的試料に存在する可能性があるいかなるHIV-2からも核酸を遊離させる工程がある。本発明のさらにより非常に好ましい態様において、「遊離」工程を行った後に、生物学的試料に存在する可能性があるいかなるHIV-2からも遊離させた核酸を、固体支持体上に捕捉するさらなる工程がある。本発明の別の態様において、方法で用いる生物学的試料は溶解物である。本発明の方法を実施するのに使用可能な、典型的な高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は：(1)0.48Mリン酸ナトリウム緩衝液、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、並びに各1mMのEDTAおよびEGTA；並びに(2)0.6-0.9Mの範囲の塩濃度を含む。さらに別の態様において、本発明の方法の第一の工程において、生物学的試料に提供するハイブリダイゼーションプローブは、配列番号22またはその相補体、配列番号23またはその相補体、配列番号24またはその相補体、配列番号25またはその相補体、配列番号26またはその相補体、および配列番号27またはその相補体のいずれか1つであることが可能な配列を有する。本発明の方法の非常に好ましい態様において、ハイブリダイゼーションプローブは少なくとも1つのヌクレオチド類似体を含む。より非常に好ましい態様において、ハイブリダイゼーションプローブはまた、検出可能標識も含む。例えば、検出可能標識はアクリジニウムエステルであることが可能であり、そして検出工程が、ハイブリダイゼーション工程中に形成された、プローブ：標的ニ重鎖のいずれも検出する発光測定を行うことを含むことが可能である。

20

30

40

【0012】

本発明の第五の側面は、HIV-2核酸を検出するためのキットに関する。一般的に、本

50

発明にしたがったキットは、パッケージングした組み合わせ中に、上述の組成物のいずれを含むことも可能である。本発明のキットの特定の態様は、第一の増幅オリゴヌクレオチドおよび第二の増幅オリゴヌクレオチドを含む。第一の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号9の配列内に含有される9 - 34の隣接する塩基の配列を含み、そして100ヌクレオチドまでの長さを有する。第二の増幅オリゴヌクレオチドは、配列番号1の配列由来の19 - 40の隣接する塩基の配列を含み、そして100ヌクレオチドまでの長さを有する。好ましくは、該キットはまた、第一および第二の増幅オリゴヌクレオチドを用いて合成したHIV-2単位複製配列(amplicon)を検出するのに使用可能な、オリゴヌクレオチド検出プローブも含む。検出プローブは、好ましくは、配列番号21またはその相補体の配列、および検出可能標識を含む。検出プローブは、35ヌクレオチドまでの長さを有することが可能である。本発明のキットは、増幅を行う前に、他の種からHIV-2テンプレート核酸を精製するのに使用可能な捕捉オリゴヌクレオチドをさらに含有することが可能である。キット中にパッケージング可能な捕捉オリゴヌクレオチドの例は、配列番号31および配列番号32の配列を有する。

10

【0013】

本発明の第六の側面は、配列番号9の配列内に含有される9 - 34の隣接する塩基の配列を含み、そして100ヌクレオチドまでの長さを有する第一のオリゴヌクレオチドを含む組成物に関する。より好ましくは、第一のオリゴヌクレオチドの長さは18 - 60ヌクレオチドである。さらにより好ましくは、第一のオリゴヌクレオチドの長さは18 - 34ヌクレオチドである。さらにより好ましくは、第一のオリゴヌクレオチドの長さは18 - 25ヌクレオチドである。第一のオリゴヌクレオチドの長さが18 - 34ヌクレオチドの範囲である。特定の好ましい態様において、第一のオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号9の配列内に含有される18 - 34の隣接する塩基を含むことが可能である。この場合、第一のオリゴヌクレオチドの配列は、本発明の非常に好ましい特定の態様において、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13および配列番号14のいずれか1つであることが可能である。本発明の他の好ましい態様において、第一のオリゴヌクレオチドが100ヌクレオチドまでの長さ、または18 - 60ヌクレオチドの長さを有する場合、第一のオリゴヌクレオチドの配列は、プロモーターをさらに含むことが可能である。こうした場合、第一のオリゴヌクレオチドは、プロモーター - プライマーとして機能することが可能である。例えば、この状況下では、第一のオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18および配列番号19のいずれか1つであることが可能である。本発明の異なる態様にしたがって、第一のオリゴヌクレオチドが100ヌクレオチドまでの長さ、または18 - 60ヌクレオチドの長さを有し、そして配列番号9の配列内に含有される9 - 34の隣接する塩基を含む配列を有する場合、第二のオリゴヌクレオチドがさらに含まれることが可能である。この第二のオリゴヌクレオチドは、35ヌクレオチドまでの長さ、またはより好ましくは22ヌクレオチドまでの長さを有し、そして配列番号21を含む配列を有することが可能である。特定の例において、第二のオリゴヌクレオチドの配列は、配列番号20の配列内に含有される少なくとも16の隣接するヌクレオチドを含むことが可能である。この場合、第二のオリゴヌクレオチドの長さが16 - 18ヌクレオチドの範囲であることが非常に好ましい。ある場合、第二のオリゴヌクレオチドがさらに検出可能標識を含むことが望ましい。本発明のさらに異なる態様にしたがって、組成物が、100ヌクレオチドまでの長さを有し、そして配列番号9の配列内に含有される9 - 34の隣接する塩基を含む配列を有する第一のオリゴヌクレオチドを含み、そして22ヌクレオチドまでの長さを有し、そして配列番号21を含む配列を有する第二のオリゴヌクレオチドをさらに含む場合、100ヌクレオチドまでの長さを有し、そして配列番号1の配列由来の19 - 40の隣接する塩基を含む配列を有する第三のオリゴヌクレオチドがさらに含まれる。本態様の非常に好ましい型では、第三のオリゴヌクレオチドの長さは19 - 40ヌクレオチド、またはさらにより好ましくは19 - 21ヌクレオチドである。本発明のこうした態様にしたがって、第三のオリゴヌクレオチドの配列の特定の例は、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6お

20

30

40

50

よび配列番号 7 のいずれか 1 つを含む。

【0014】

定義

以下の用語は、本明細書に明らかに逆に言及しない限り、本開示の目的のため、以下の意味を有する。

【0015】

本明細書において、「生物学的試料」は、ヒトから得た、組織またはポリヌクレオチド含有材料いずれかである。本発明にしたがった生物学的試料には、末梢血、血漿、血清、骨髄、リンパ節を含む生検試料、呼吸組織または滲出物、胃腸組織、子宮頸スワブ試料、精液または他の体液、組織または材料が含まれる。生物学的試料を処理して、組織または細胞構造を破壊し、それによって、酵素、緩衝剤、塩、界面活性剤等を含有してもよい溶液中に、細胞内構成要素を遊離させることが可能である。

10

【0016】

本明細書において、「ポリヌクレオチド」は、RNA または DNA いずれかと共に、配列に存在することが可能であり、そして相補配列を有する第二の分子と該ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションを妨げない合成ヌクレオチド類似体または他の分子いずれかを意味する。該用語は、天然存在ヌクレオチドの類似体を含有するポリマーも含み、そして特に、リボースの 2' 位にメトキシ基 (OMe) を有する類似体を含む。本明細書において、「T」残基を含有するメトキシポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、リボース部分の 2' 位にメトキシ基を有し、そしてヌクレオチドの塩基位にウラシルを有する。

20

【0017】

本明細書において、「検出可能標識」は、検出可能であるか、または検出可能反応を導くことが可能である、化学種である。本発明にしたがった検出可能標識は、直接または間接的にポリヌクレオチドプローブに連結することが可能であり、そして放射性同位体、酵素、ハプテン、色素または検出可能な色を与える粒子 (例えばラテックスビーズまたは金属粒子) などの発色団、発光化合物 (例えば生物発光、燐光または化学発光部分) および蛍光化合物を含む。

【0018】

「均質検出可能標識」は、プローブ上の標識が標的配列にハイブリダイズしているかどうかを測定することによって、均質な方式で検出可能な標識を指す。すなわち、均質検出可能標識は、標識または標識化プローブの非ハイブリダイズ型からハイブリダイズ型を物理的に除去することなく、検出可能である。これらの標識は、Arnoldら、米国特許第 5, 283, 174 号; Woodheadら、米国特許第 5, 656, 207 号; および Nelsonら、米国特許第 5, 658, 737 号に詳細に記載されている。均質アッセイで用いるのが好ましい標識には、化学発光化合物 (例えば、Woodheadら、米国特許第 5, 656, 207 号; Nelsonら、米国特許第 5, 658, 737 号; および Arnold, Jr.ら、米国特許第 5, 639, 604 号を参照されたい) が含まれる。好ましい化学発光標識はアクリジニウムエステル (「AE」) 化合物、例えば標準的 AE またはその誘導体 (例えば、ナフチル-AE、オルト-AE、1-または 3-メチル-AE、2, 7-ジメチル-AE、4, 5-ジメチル-AE、オルト-ジプロモ-AE、オルト-ジメチル-AE、メタ-ジメチル-AE、オルト-メトキシ-AE、オルト-メトキシ (シンナミル) -AE、オルト-メチル-AE、オルト-フルオロ-AE、1-または 3-メチル-オルト-フルオロ-AE、1-または 3-メチル-メタ-ジフルオロ-AE、および 2-メチル-AE) である。合成、および核酸に標識を付着させ、そして標識を検出する方法は、当該技術分野に公知である (例えば Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第 2 版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー, 1989), 第 10 章; Nelsonら

30

40

50

、米国特許第5,658,737号;Woodheadら、米国特許第5,656,207号;Hoganら、米国特許第5,547,842号;Arnoldら、米国特許第5,283,174号;Kourilskyら、米国特許第4,581,333号;およびBeckerら、欧州特許出願第0747706号を参照されたい)。

【0019】

本明細書において、「増幅」は、標的核酸配列、その相補体または断片の多コピーを得るための*in vitro*法を指す。

【0020】

「標的核酸」または「標的」により、標的核酸配列を含有する核酸を意味する。

【0021】

「標的核酸配列」、「標的ヌクレオチド配列」、「標的配列」または「標的領域」により、一本鎖核酸分子のヌクレオチド配列のすべてまたは一部を含んでなる特定のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド配列、およびそれに相補的なデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド配列を意味する。

【0022】

「転写関連増幅」により、RNAポリメラーゼを用い、核酸テンプレートから多数のRNA転写物を産生する核酸増幅のいかなる種類も意味する。「転写仲介増幅」(TMA)と呼ばれる転写関連増幅法の一例は、一般的に、RNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、リボヌクレオシド三リン酸、およびプロモーター-テンプレート相補的オリゴヌクレオチドを使用し、そして所望により、1以上の類似オリゴヌクレオチドを含むことが可能である。多様なTMAが、Burgら、米国特許第5,437,990号;Kacianら、米国特許第5,399,491号および第5,554,516号;Kacianら、PCT第WO93/22461号;Gingerasら、PCT第WO88/01302号;Gingerasら、PCT第WO88/10315号;Malekら、米国特許第5,130,238号;Urdeaら、米国特許第4,868,105号および第5,124,246号;McDonoughら、PCT第WO94/03472号;およびRyderら、PCT第WO95/03430号に詳細に開示されるように、当該技術分野に公知である。Kacianらの方法が、本明細書に開示する種類の核酸増幅法を行うのに好ましい。

【0023】

本明細書において、「プローブ」は、核酸、好ましくは増幅した核酸の標的配列に、ハイブリダイゼーションを促進する条件下で、特異的にハイブリダイズして、検出可能ハイブリッドを形成する核酸オリゴヌクレオチドである。プローブは、プローブの末端に付着してもよいし、または内部であってもよい、検出可能部分を含有することが可能である。標的ポリヌクレオチドと組み合わせるプローブのヌクレオチドは、プローブの配列に関して内部である検出可能部分の場合にそうである可能性があるように、厳密に隣接していなくてもよい。検出は、直接(すなわち標的配列または増幅した核酸に直接ハイブリダイズするプローブから生じる)であっても、または間接的(すなわちプローブを標的配列または増幅した核酸に連結する中間分子構造にハイブリダイズするプローブから生じる)であってもよい。プローブの「標的」は、一般的に、標準的水素結合(すなわち塩基対形成)を用い、プローブオリゴヌクレオチドの少なくとも一部に特異的にハイブリダイズする、増幅した核酸配列内に含有される配列を指す。プローブは、標的的特異的配列およびプローブの三次元コンホメーションに貢献する他の配列(例えば、Lizardiら、米国特許第5,118,801号および第5,312,728号に記載されるようなもの)を含んでなることが可能である。「十分に相補的な」配列は、プローブの標的的特異的配列に完全に相補的でなくても、標的配列へのプローブオリゴヌクレオチドの安定なハイブリダイゼーションを可能にする。

【0024】

本明細書において、「オリゴヌクレオチド」または「オリゴマー」は、少なくとも2、一般的には約5から約100の間の化学サブユニットのポリマー鎖であり、各サブユニット

10

20

30

40

50

は、ヌクレオチド塩基部分、糖部分、および直鎖空間立体配置でサブユニットを連結する連結部分を含んでなる。一般的なヌクレオチド塩基部分は、グアニン（G）、アデニン（A）、シトシン（C）、チミン（T）およびウラシル（U）であるが、水素結合することが可能な、他のまれな、または修飾したヌクレオチド塩基が当業者に公知である。本発明の好ましいオリゴヌクレオチドは、約10から約60残基の下限を有するサイズ範囲に属する。オリゴヌクレオチドは、天然存在供給源から精製することが可能であるが、好ましくは、多様な公知の酵素的または化学的方法のいずれかを用いて合成する。

【0025】

本明細書において、「増幅プライマー」または「増幅オリゴヌクレオチド」は、標的核酸またはその相補体にハイブリダイズし、そして核酸増幅反応に参与するオリゴヌクレオチドである。増幅プライマー、またはより簡単に「プライマー」は、所望により修飾したオリゴヌクレオチドであることが可能であり、テンプレート核酸にハイブリダイズすることが可能であり、そしてDNAポリメラーゼ活性によって伸長することが可能な3'端を有する。

10

【0026】

「実質的に相同」、「実質的に対応している」または「実質的に対応する」により、対象のオリゴヌクレオチドが、参照塩基配列に存在する少なくとも10の隣接する塩基領域に、少なくとも70%相同、好ましくは少なくとも80%相同、より好ましくは少なくとも90%相同、そして最も好ましくは100%相同である、少なくとも10の隣接する塩基領域を含有する塩基配列を有することを意味する（RNAおよびDNA均等物は除く）。当業者は、非特異的ハイブリダイゼーションの許容し得ないレベルを妨げつつ、多様な割合の相同性で、標的配列へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能にするために、ハイブリダイゼーションアッセイ条件に対して行うことが可能である修飾を、容易に認識するであろう。類似性の度合いは、2つの配列を構成する核酸塩基の順序を比較することによって決定し、そして構造的相違が相補塩基との水素結合を妨げない限り、2つの配列間に存在する可能性がある他の構造的相違を考慮に入れない。2つの配列間の相同性の度合いはまた、比較している、少なくとも10の隣接する塩基の各組に存在する塩基ミスマッチ数に関して表すことも可能であり、これは0から2塩基相違の範囲であることが可能である。

20

【0027】

「実質的に相補的」により、対象のオリゴヌクレオチドが、標的核酸配列に存在する少なくとも10の隣接する塩基領域に、少なくとも70%相補的、好ましくは少なくとも80%相補的、より好ましくは少なくとも90%相補的、そして最も好ましくは100%相補的である、少なくとも10の隣接する塩基領域を含有する塩基配列を有することを意味する（RNAおよびDNA均等物は除く）。（当業者は、非特異的ハイブリダイゼーションの許容し得ないレベルを妨げつつ、多様な割合の相補性で、標的配列へのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを可能にするために、ハイブリダイゼーションアッセイ条件に対して行うことが可能である修飾を、容易に認識するであろう。）相補性の度合いは、2つの配列を構成する核酸塩基の順序を比較することによって決定し、そして構造的相違が相補塩基との水素結合を妨げない限り、2つの配列間に存在する可能性がある他の構造的相違を考慮に入れない。2つの配列間の相補性の度合いはまた、比較している、少なくとも10の隣接する塩基の各組に存在する塩基ミスマッチ数に関して表すことも可能であり、これは0から2塩基ミスマッチの範囲であることが可能である。

30

40

【0028】

「十分に相補的」により、一連の相補塩基間の水素結合によって、別の塩基配列にハイブリダイズすることが可能な隣接する核酸塩基配列を意味する。相補塩基配列は、標準的塩基対形成（例えばG:C、A:TまたはA:U塩基対形成）を用い、オリゴヌクレオチドの塩基配列の各位で相補的であってもよいし、または標準的水素結合を用いて相補的ではない1以上の残基（無塩基性「ヌクレオチド」を含む）を含有するが、全体の相補塩基配列が、適切なハイブリダイゼーション条件において、別の塩基配列と特異的にハイブリダ

50

イズすることが可能であるものであってもよい。隣接する塩基は、オリゴヌクレオチドが特異的にハイブリダイズすることが意図される配列に、好ましくは少なくとも約80%、より好ましくは少なくとも約90%、そして最も好ましくは約100%相補的である。当業者には、適切なハイブリダイゼーション条件が公知であり、該条件は、塩基配列組成に基づき予測することが可能であり、または日常的な試験を用いることにより、実験的に決定することが可能である(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー, 1989) §§ 1.90 - 1.91、7.37 - 7.57、9.47 - 9.51および11.47 - 11.57、特に §§ 9.50 - 9.51、11.12 - 11.13、11.45 - 11.47および11.55 - 11.57を参照されたい) 10

【0029】

「捕捉オリゴヌクレオチド」により、塩基対ハイブリダイゼーションによって、標的配列および固定化オリゴヌクレオチドを特異的に連結するための手段を提供する、少なくとも1つの核酸オリゴヌクレオチドを意味する。捕捉オリゴヌクレオチドは、好ましくは、2つの結合領域：標的配列結合領域および固定化プローブ結合領域を、通常、同一のオリゴヌクレオチド上に隣接して含むが、捕捉オリゴヌクレオチドは、1以上のリンカーにより共に連結される、2つの異なるオリゴヌクレオチド上に存在する、標的配列結合領域および固定化プローブ結合領域を含んでもよい。例えば、固定化プローブ結合領域が第一のオリゴヌクレオチド上に存在してもよく、標的配列結合領域が第二のオリゴヌクレオチド上に存在してもよく、そして2つの異なるオリゴヌクレオチドが、第一および第二のオリゴヌクレオチドの配列に特異的にハイブリダイズする配列を含有する第三のオリゴヌクレオチドであるリンカーとの水素結合により、連結される。 20

【0030】

「固定化プローブ」または「固定化核酸」により、固定された支持体に捕捉オリゴヌクレオチドを直接または間接的に連結する核酸を意味する。固定化プローブは、試料中の非結合成分からの、結合した標的配列の分離を促進する、固体支持体に連結したオリゴヌクレオチドである。

【0031】

「分離」または「精製」により、生物学的試料の1以上の構成要素を、該試料の1以上の他の構成要素から除去することを意味する。試料構成要素には、タンパク質、炭水化物、脂質および標識化プローブなどの成分もまた含む可能性がある、一般的に水性溶液相中の核酸が含まれる。好ましくは、分離または精製工程は、少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約90%、そしてさらにより好ましくは少なくとも約95%の、試料に存在する他の試料構成要素を除去する。 30

【0032】

「RNAおよびDNA均等物」により、同一の相補塩基対ハイブリダイゼーション特性を有する、RNAおよびDNA分子を意味する。RNAおよびDNA均等物は、異なる糖部分(すなわち、リボース対デオキシリボース)を有し、そしてRNAにはウラシル、そしてDNAにはチミンが存在する点異なる可能性がある。RNAおよびDNA均等物の間の相違は、均等物が、特定の配列に対し、同じ度合いの相補性を有するため、相同性の相違に貢献しない。 40

【0033】

「本質的にからなる」により、本発明の基本的なそして新規の特性を実質的に変化させないさらなる単数または複数の構成要素、単数または複数の組成物あるいは単数または複数の方法工程が、本発明の組成物またはキットまたは方法に含まれていてもよいことを意味する。こうした特性には、生物学的試料、例えば全血または血漿において、HIV-2核酸の約100コピーのコピー数で、HIV-2核酸を選択的に検出する能力が含まれる。本発明の基本的なそして新規の特性に実質的な影響を有する、いかなる単数または複数の 50

構成要素、単数または複数の組成物あるいは単数または複数の方法工程も、この用語の外に属するであろう。

【0034】

発明の詳細な説明

本発明は、HIV-2の核酸を選択的に検出するための組成物および方法に関する。本明細書に開示する組成物は、ヒト血液、血清、血漿または他の体液あるいは組織などの、ウイルス核酸の存在に関して試験しようとする生物学的試料において、これらの核酸を増幅し、そして検出するのに有用である。本明細書に開示する増幅プライマーは、好適に、多重増幅反応の構成要素として使用可能であり、該反応において、プライマーおよび付属ポリヌクレオチドの複雑な一団から、いくつかの単位複製配列種を産生することが可能である。例えば、本明細書に開示するプライマーは、関連しないウイルスのポリヌクレオチドに対応する単位複製配列を合成する多重増幅反応で使用可能である。

10

【0035】

本明細書に開示するプローブ、プライマーおよび方法は、診断適用において、または感染性粒子を含有する可能性がある、寄付された血液および血液産物または他の組織をスクリーニングするのに使用可能である。

【0036】

序論および概説

一般の当業者は、核酸試験が、寄付された血液または血漿などの生物学的試料において、ウイルス特異的ポリヌクレオチドを検出する、好適でそして非常に高感度の方法に相当することを認識するであろう。HIV-1に新たに感染した個体は、典型的には、感染後1-2ヶ月で、ウイルス抗原に反応性である抗体を検出可能なレベルで産生するため、ウイルスへの曝露後、最初の1ヶ月の間の血清学的試験は、偽陰性の結果を生じ、そしてHIV-1で汚染された試料が、血流に侵入するのを許し、壊滅的な結果を招く可能性がある。HIV-1曝露の早期検出が、寄付される血液供給の安全性を確実にするのに補助するのと同じ方式で、HIV-2曝露の早期検出は、同じ利点を提供することが可能である。したがって、HIV-2を検出するための最も高感度の試験法は、感染に対する宿主免疫反応と区別されるような、ウイルス特異的核酸の検出に頼るであろう。

20

【0037】

本発明は、生物学的試料においてHIV-2核酸を検出するための組成物（核酸捕捉オリゴヌクレオチド、増幅オリゴヌクレオチドおよびプローブ）および方法を含む。こうした使用に適したオリゴヌクレオチド配列を設計するため、類似の配列を有する領域をマッチングし、そしてその後、配列を比較することによって、サブタイプを含む既知のHIV-2 DNA配列をまず並列して、診断アッセイの試薬として働くことが可能なHIV-2 ウイルスゲノムの候補領域を同定した。これらの比較に基づいて、図1に図式的に示す捕捉オリゴヌクレオチド、プライマーおよびプローブを用い、HIV-2ゲノムのLTR領域を検出用を選択した。比較した配列間で、比較的少ない配列変異体を含む配列部分を、捕捉、増幅および増幅した配列の検出に使用するのに適した合成オリゴヌクレオチドを設計するための出発点として選択した。オリゴヌクレオチドを設計する際の他の考慮には、配列の相対GC含量（約30%から約55%の範囲）、および予測される二次構造（例えば分子内ハイブリッドを形成するヘアピンターン）の配列内の相対的な欠如を含んだ。

30

40

【0038】

これらの解析に基づき、以下に示す、捕捉オリゴヌクレオチド、増幅オリゴヌクレオチドおよびプローブ配列を設計した。一般レベルの技術を有する当業者は、T7プロモーター配列を伴うまたは伴わない、HIV-2に特異的なプライマー配列が、以下に記載する、プライマーに基づく多様な *in vitro* 増幅法で、プライマーとして使用可能であることを理解するであろう。さらに、本明細書に開示するハイブリダイゼーションプローブが増幅プライマーとして使用可能であり、そして本明細書に開示する増幅プライマーがハイブリダイゼーションプローブとして使用可能であることもまた、意図する。以下に詳細

50

に記載する増幅および検出アッセイは、H I V - 2の少なくともサブタイプA、B、CおよびDを検出するのに有用である。とりわけ、本明細書に開示するプローブの標的として働く、H I V - 2ゲノムの部分は、H I V - 1ゲノムに対応する配列を見出さない。したがって、プローブは、H I V - 2に特異的であり、そしてH I V - 1に特異的でない。

【0039】

有用な増幅法

本発明と組み合わせて有用な増幅法には：転写仲介増幅（T M A）、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）、核酸配列に基づく増幅（N A S B A）、鎖置換増幅（S D A）、並びに自己複製ポリヌクレオチド分子およびM D V - 1 R N AおよびQ - ベータ酵素のような複製酵素を用いる増幅法が含まれる。これらの多様な増幅技術を実施する方法は、それぞれ、米国特許第5,399,491号；米国特許第4,965,188号；公開欧州特許出願E P 0 525 882、米国特許第5,455,166号、米国特許第5,472,840号およびL i z a r d i r a , B i o T e c h n o l o g y 6 : 1197 (1988)に見出すことが可能である。米国特許第5,554,516号は、標的R N A配列の相補体とハイブリッドを形成するプライマーの非存在下で、単一のプロモーター - プライマーを用いて、標的R N A配列を増幅する方法を記載する。核酸増幅反応をどのように行うかを記載する、これらの文書の開示は、本明細書に援用される。

10

【0040】

本発明の非常に好ましい態様において、H I V - 2核酸配列は、T M Aプロトコルを用いて増幅する。このプロトコルにしたがって、D N Aポリメラーゼ活性を提供する逆転写酵素はまた、内因性R N AアーゼH活性も所持する。この方法に用いるプライマーの1つは、増幅しようとする標的核酸の1つの鎖に相補的な配列の上流に位置するプロモーター配列を含有する。増幅の第一の工程において、プロモーター - プライマーは、定義される部位で、H I V - 2標的R N Aにハイブリダイズする。逆転写酵素は、プロモーター - プライマーの3'端からの伸長によって、標的R N AのD N Aコピーを生成する。生じたR N A : D N A二重鎖中のR N A鎖は、所望により逆転写酵素の固有の活性であってもよい、R N AアーゼH活性によって分解される。その後、第二のプライマーがD N A鎖に結合する。D N Aの第二の鎖は、逆転写酵素によって、プライマー端から合成され、それによって二本鎖D N A分子が生成される。R N Aポリメラーゼは、この二本鎖D N Aテンプレート中のプロモーター配列を認識し、そして転写を開始する。新たに合成したR N A単位複製配列は各々、T M A法に再進入し、そして新たな複製周期のテンプレートとして働き、それによって、R N A単位複製配列の指数的拡大を導く。D N Aテンプレートは各々、100 - 1000コピーのR N A単位複製配列を作成可能であるため、この拡大の結果、1時間未満で、100億の単位複製配列を生じることが可能である。方法全体が自己触媒性であり、そして一定の温度で行われる。

20

30

【0041】

H I V - 2単位複製配列を検出する方法は、オリゴヌクレオチドプライマー対を用いて産生した核酸増幅産物を電気泳動的に分離して染色する程度に、単純である可能性がある。以下に詳細に記載するように、好ましい検出法は、H I V - 2特異的ハイブリダイゼーションプローブを使用する。

40

【0042】

プライマーの構造的特徴

上に示すように、「プライマー」は、テンプレート核酸にハイブリダイズすることが可能であり、そしてD N Aポリメラーゼ活性によって伸長可能な3'端を有する、所望により修飾されたオリゴヌクレオチドを指す。プライマーの5'領域は、標的核酸に非相補性であってもよい。5'非相補領域がプロモーター配列を含む場合、これを「プロモーター - プライマー」と称する。当業者は、プライマーとして作用することが可能ないかなるオリゴヌクレオチド（すなわち標的配列に特異的にハイブリダイズし、そしてD N Aポリメラーゼ活性によって伸長可能な3'端を有するオリゴヌクレオチド）も、5'プロモーター配列を含むよう修飾することが可能であり、そしてしたがってプロモーター - プライマー

50

として機能することが可能であると認識するであろう。同様に、いかなるプロモーター - プライマーもプロモーター配列の除去によって、またはプロモーター配列を含まない合成によって、修飾することが可能であり、そしてそれでもプライマーとして機能する。

【0043】

プライマーのヌクレオチド塩基部分は、修飾塩基部分が、G、A、C、TまたはUと非共有結合を形成する能力を保持し、そして少なくとも1つの修飾ヌクレオチド塩基部分を含んでなるオリゴヌクレオチドが、一本鎖核酸とハイブリダイズするのを立体的に妨げられない限り、例えばプロピル基の付加によって修飾することが可能である。プライマー主鎖を含んでなる一般的な糖部分は、リボースおよびデオキシリボースを含むが、2'-O-メチルリボース(OMe)、ハロゲン化糖、および他の修飾糖もまた、使用可能である。通常、プライマー主鎖の連結基は、リン含有部分であり、最も一般的にはホスホジエステル連結であるが、他の連結、例えばホスホロチオエート、メチルホスホネート、および「ペプチド核酸」(PNA)に見られるペプチド様連結などのリン非含有連結もまた、本明細書に開示するアッセイでの使用に意図する。

10

【0044】

有用なプローブ標識系および検出可能部分

特異的核酸ハイブリダイゼーションを監視するのに使用可能な、本質的にいかなる標識および検出系を、本発明と組み合わせ使用してもよい。有用な標識のコレクションに含まれるのは、放射標識、酵素、ハプテン、連結されたオリゴヌクレオチド、化学発光分子および電気検出法に受け入れられる酸化還元活性部分である。好ましい化学発光分子には、Arnoldらによって、米国特許第5,283,174号に開示される、均質保護アッセイと関連して使用するための種類のアクリジニウムエステル、そしてWoodheadらによって、米国特許第5,656,207号に開示される、単一反応中で、多数の標的を定量化するアッセイと関連して使用するための種類のアクリジニウムエステルが含まれる。これらの特許文書に含まれる開示は、本明細書に援用される。好ましい電氣的標識および検出アプローチは、米国特許第5,591,578号および第5,770,369号、並びに公開国際特許出願第WO 98/57158号に開示され、これらの開示は、本明細書に援用される。本発明において、標識として有用な酸化還元活性部分は、Cd、Mg、Cu、Co、Pd、Zn、FeおよびRuなどの遷移金属を含む。

20

【0045】

本発明にしたがった、プローブ用の特に好ましい検出可能標識は、均質アッセイ系(すなわち混合物中で、結合した標識化プローブが、非結合標識化プローブと比較し、検出可能な変化、例えば安定性または差別的分解を示す系)で検出可能である。均質アッセイで用いるのが好ましい標識は、化学発光化合物(例えば、Woodheadら、米国特許第5,656,207号; Nelsonら、米国特許第5,658,737号; またはArnoldら、米国特許第5,639,604号に記載されるようなもの)である。特に好ましい化学発光標識には、アクリジニウムエステル(「AE」)化合物、例えば標準的AEまたはその誘導体、例えば、ナフチル-AE、オルト-AE、1-または3-メチル-AE、2,7-ジメチル-AE、4,5-ジメチル-AE、オルト-ジプロモ-AE、オルト-ジメチル-AE、メタ-ジメチル-AE、オルト-メトキシ-AE、オルト-メトキシ(シンナミル)-AE、オルト-メチル-AE、オルト-フルオロ-AE、1-または3-メチル-オルト-フルオロ-AE、1-または3-メチル-メタ-ジフルオロ-AE、および2-メチル-AEが含まれる。

30

40

【0046】

いくつかの適用において、検出前にまず、非ハイブリダイズプローブの除去を必要とすることなく、試験試料におけるプローブ:標的二重鎖の検出を容易にするため、プローブが少なくともある程度の自己相補性を示すことが望ましい。たとえば、「分子トーチ」と呼ばれる構造は、領域を連結することによってつなぐれ、そしてあらかじめ決定したハイブリダイゼーションアッセイ条件下で互いにハイブリダイズする、自己相補性の別個の領域を含むよう、設計される(「標的結合ドメイン」および「標的閉鎖ドメイン」を生み出す

50

）。変性条件に曝露された際、分子トーチの2つの相補領域（完全または部分的相補性であってもよい）が融解し、あらかじめ決定したハイブリダイゼーションアッセイ条件を回復すると、標的結合ドメインが、標的配列にハイブリダイズするのに利用可能なままとなる。分子トーチは、標的結合ドメインが、標的閉鎖ドメインより、標的配列へのハイブリダイゼーションを支持するように設計する。分子トーチの標的結合ドメインおよび標的閉鎖ドメインは、分子トーチが標的核酸にハイブリダイズした時と対照的に、分子トーチが自己ハイブリダイズした時に、異なるシグナルを生じ、それによってそれに会合する検出可能標識を有する非ハイブリダイズプローブの存在下で、試験試料中のプローブ：標的二重鎖の検出を可能にするように配置された、相互作用する標識（例えば発光剤/消光剤）を含む。分子トーチは、国際公報第WO 00/01850に完全に記載され、該公報の開示は本明細書に援用される。 10

【0047】

自己相補的ハイブリダイゼーションアッセイプローブの別の例は、一般的に「分子ビーコン」と呼ばれる構造である。分子ビーコンは、標的相補配列を有する核酸分子、標的核酸配列の非存在下で、プローブを閉じたコンホメーションに保持する親和性対（または核酸アーム）、およびプローブが閉じたコンホメーションにあるときに相互作用する標識対を有する核酸分子を含んでなる。標的核酸および標的相補配列のハイブリダイゼーションは、親和性対のメンバーを分離し、それによって、プローブを開いたコンホメーションにシフトする。開いたコンホメーションへのシフトは、例えば発光剤および消光剤（例えばDABCYLおよびEDANS）であることが可能な標識対の相互作用の減少のため、検出可能である。分子ビーコンは、米国特許第5,925,517号に完全に記載され、該特許の開示は本明細書に援用される。 20

【0048】

合成技術、および標識を核酸に結合し、そして標識を検出する方法は、当該技術分野に公知である（例えばSambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第2版（Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー, 1989）, 第10章; Nelsonら、米国特許第5,658,737号; Woodheadら、米国特許第5,656,207号; Hoganら、米国特許第5,547,842号; Arnoldら、米国特許第5,283,174号; およびKourilskyら、米国特許第4,581,333号を参照されたい）。 30

【0049】

プローブの化学的組成

本発明にしたがったプローブは、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド類似体を含んでなり、そしてそれに共有結合した検出可能標識を所持することが可能である。プローブのヌクレオシドまたはヌクレオチド類似体は、窒素性複素環塩基、または塩基類似体を含んでなり、該塩基または塩基類似体で、ヌクレオチドは、例えばホスホジエステル結合によって共に連結されて、ポリヌクレオチドを形成する。したがって、プローブは、慣用的なリボ核酸（RNA）およびデオキシリボ核酸（DNA）を含んでなることが可能であるが、これらの分子の化学的類似体もまた、含んでなることが可能である。プローブの「主鎖」は、当該技術分野に知られる多様な連結で構成される可能性があり、該連結には、1以上の糖-ホスホジエステル連結、ペプチド核酸結合（ときに、Hyldig-Nielsenら、PCT国際公報第WO 95/32305号に記載されるように「ペプチド核酸」と称される）、ホスホロチオエート連結、メチルホスホネート連結またはそれらの組み合わせが含まれる。プローブの糖部分は、リボースまたはデオキシリボースいずれか、あるいは、例えば、2'メトキシ置換（OMe）および2'ハロゲン化物置換（例えば2'-F）などの既知の置換を有する同様の化合物であってもよい。窒素性塩基は、慣用的な塩基（A、G、C、T、U）、その既知の類似体（例えばイノシンまたは「I」; The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adamsら監修, 第11版, 1992を参照されたい）、プリンまたはピリミ 40 50

ジン塩基類の既知の誘導体（例えば、 N^4 -メチルデオキシグアノシン、デアザ-またはアザ-プリン類およびデアザ-またはアザ-ピリミジン類、5または6位に置換基を有するピリミジン塩基類、2、6または8位に改変されたまたは置換置換基を有するプリン塩基類、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-ピリミジン類、4-アミノ-ピリミジン類、4-ジメチルヒドラジン-ピリミジン類、および O^4 -アルキル-ピリミジン類（Cook、PCT国際公報第WO 93/13121号を参照されたい））および、主鎖がポリマーの1以上の残基に関し、窒素性塩基を含まない、「無塩基性（abasic）」残基（Arnoldら、米国特許第5,585,481号を参照されたい）であることが可能である。核酸は、RNAおよびDNAに見られる慣用的な糖、塩基および連結のみを含んでなることが可能であるし、または慣用的な構成要素および置換両方（例えばメトキシ主鎖を介して連結される慣用的塩基、または慣用的塩基および1以上の塩基類似体を含む核酸）を含むことが可能である。

10

【0050】

HIV-2に特異的な増幅プライマーおよび検出プローブの選択

望ましい特性を持つ増幅プライマーおよびプローブを設計するのに有用な指針を本明細書に記載する。HIV-2核酸を増幅し、そして探査する（probing）のに最適な部位は、隣接する配列の約350塩基内に、そして好ましくは150塩基内に、長さ約15塩基より大きい、2つ、そして好ましくは3つの保存領域を含有する。プライマーまたはプロモーター-プライマー組で観察される増幅の度合いは、オリゴヌクレオチドがその相補配列にハイブリダイズする能力および酵素的に伸長される能力を含む、いくつかの要因に依る。ハイブリダイゼーション反応の度合いおよび特異性は、いくつかの要因に影響を受けるため、これらの要因を操作すると、標的に完全に相補的であるにしろ、そうでないにしろ、特定のオリゴヌクレオチドの正確な感度および特異性が決定されるであろう。変化するアッセイ条件の影響が当業者に知られ、そしてHoganら、米国特許第5,840,488号に記載され、該特許の開示は本明細書に援用される。

20

【0051】

標的核酸配列の長さ、そしてしたがってプライマー配列またはプローブ配列の長さが重要である可能性がある。ある場合、望ましいハイブリダイゼーション特性を有するプライマーまたはプローブを生じるであろう、位置および長さが異なる、特定の標的領域由来のいくつかの配列がある可能性がある。完全に相補的でない核酸がハイブリダイズすることは可能であるが、通常、完全に相同な塩基配列の最長の伸長が、主にハイブリッド安定性を決定するのである。

30

【0052】

増幅プライマーおよびプローブは、オリゴヌクレオチド：非標的（すなわち標的核酸に類似の配列を持つ核酸）核酸ハイブリッドの安定性を最小限にするよう配置されるべきである。増幅プライマーおよび検出プローブが、標的および非標的配列間を区別可能であることが好ましい。プライマーおよびプローブを設計する際、これらの T_m 値の相違は、可能な限り大きくするべきである（少なくとも2、そして好ましくは5）。

【0053】

ハイブリダイゼーションに阻害性である、強い内部構造を形成することが知られる核酸領域は、プライマーまたはプローブとしてより好ましくない。こうした構造の例には、ヘアピンループが含まれる。同様に、広範な自己相補性を持つオリゴヌクレオチドも回避すべきである。

40

【0054】

非特異的伸長（プライマー二量体または非標的コピー）の度合いもまた、増幅有効性に影響を及ぼす可能性がある。このため、プライマーは、特に配列の3'端で、低い自己または交差相補性を有するよう選択する。長いホモポリマー領域および高いGC含量を回避して、偽のプライマー伸長を減少させる。設計のこの側面を補助するのに、商業的に入手可能なコンピューターソフトウェアが利用可能である。入手可能なコンピュータープログラムには、MacDNASISTM 2.0（Hitachi Software Engi

50

neering American Ltd.) および O L I G O (登録商標) バージョン 4.1 (National Bioscience) が含まれる。

【0055】

当該技術分野の一般的なレベルを有する当業者は、ハイブリダイゼーションが、相補核酸の2つの一本鎖の会合を伴い、水素結合二本鎖を形成することを認識するであろう。2つの鎖の一方が、完全にまたは部分的にハイブリッドに關与しているならば、新たなハイブリッドの形成に、より關与しにくいであろうことが暗黙の了解である。目的の配列のかなりの部分が一本鎖であるように、プライマーおよびプローブを設計することによって、ハイブリダイゼーションの速度および度合いを非常に増加させることが可能である。標的が、組み込まれたゲノム配列である場合、これは当然、二本鎖型を生じるであろう(ポリメラーゼ連鎖反応の産物の場合のように)。これらの二本鎖標的は、当然、プローブとのハイブリダイゼーションに阻害性であり、そしてハイブリダイゼーション工程前に、変性を要する。

10

【0056】

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションの速度は、 $C_0 t_{1/2}$ を決定することによって、測定可能である。ポリヌクレオチドがその標的にハイブリダイズする速度は、標的結合領域における標的二次構造の熱安定性の測定値である。ハイブリダイゼーション速度の標準的な測定値は、リットルあたりのヌクレオチドのモル数に秒を乗じたものとして測定する、 $C_0 t_{1/2}$ である。したがって、これは、その濃度で最大ハイブリダイゼーションの50%が生じる時間を乗じた、プローブ濃度である。この値は、多様な量のポリヌクレオチドを一定量の標的に、固定した時間、ハイブリダイズさせることによって、決定する。 $C_0 t_{1/2}$ は、一般の当業者によく知られる標準法によって、グラフ的に見出される。

20

【0057】

好ましい増幅プライマー

増幅反応を行うのに有用なプライマーは、異なる長さを有することが可能である。例えば、HIV-2 標的核酸配列の一方の鎖に相補的な増幅オリゴヌクレオチドは、好ましくは100塩基まで、より好ましくは18から60塩基、さらにより好ましくは18から34、またはさらにより好ましくは18から25塩基の長さを有し、そしてA A A A T C C C T A G C A G G T T G G C G C C C G A A C A G G G A C (配列番号8) に示される配列に実質的に相補的な、少なくとも9であり、そして34までの隣接する塩基を含む。異なる用語で述べるが、同一のオリゴヌクレオチドを同定すると、これらのプライマーには、G T C C C T G T T C G G G C G C C A A C C T G C T A G G G A T T T T (配列番号9) に実質的に対応する配列に含有される、少なくとも9であり、そして34までの隣接する塩基が含まれる。本発明の実施可能性には本質的でないと考えられるが、表2に列挙するすべてのプライマーは、共通のコア配列 C G G G C G C C A (配列番号34) を共有する。配列番号9の配列および配列番号34の配列の下流(3')に位置するプライマー配列間のミスマッチが許容されるという我々の発見は、配列番号9の配列のサブセットを有するプライマーが、一般的に有用であることを示す。言い換えると、配列番号9に由来し、そして本明細書に使用されるものなどの増幅条件下で、配列番号8の配列を有する標的にハイブリダイズするプライマー配列は、本明細書に記載する増幅法において、使用可能である。一般的に、配列番号9の9-34の隣接する塩基を有するプライマーは、T7プロモーター-プライマーなどのプロモーター-プライマーとして使用するのに、非常に好ましい。もちろん、プライマーがT7プロモーター-プライマーである場合、プライマーの5'端に、T7プロモーター配列が含まれるであろうし、これは典型的には、プライマーの長さを約27-33塩基、増加させる。本発明のこの側面にしたがった、好ましい増幅プライマーの例には、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13および配列番号14に示す配列を有するオリゴヌクレオチドが含まれる。本明細書に開示するオリゴヌクレオチド配列の1つ(配列番号12)は、プライマーに存在する配列番号9のセグメントと比較して、1つのヌクレオチドミスマッチおよび2つのヌクレオチド欠失を

30

40

50

有した。別のオリゴヌクレオチド配列（配列番号13）は、オリゴヌクレオチドに存在する配列番号9の部分と比較して、単一ヌクレオチド欠失を有した。これらの配列はまた、それぞれ、配列番号17および18の配列を有するT7プロモーター-プライマーでも見出すことが可能である。欠失を考慮に入れないと、これらのプライマーは、それぞれ、オリゴヌクレオチドに存在する配列番号9の部分と比較して、総数7および5の塩基ミスマッチを有した。本明細書に開示するT7プロモーター-プライマーは、Kacianら、米国特許第5,399,491号および第5,554,516号に記載する方法を用いて、核酸増幅反応を行うのに特に有用である。これらの特許文書の開示は、本明細書に援用される。プライマーは、所望により、修飾ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体を含むことが可能である。好ましくは、これらのプライマーを用いて合成した単位複製配列の検出は、本明細書に開示するオリゴヌクレオチド検出プローブを用いて達成する。

10

【0058】

増幅反応を実行するのに、上述のプライマーのいずれかと組み合わせて使用可能な他の増幅プライマーは、HIV-2標的核酸配列の相対する鎖に相補的である。HIV-2標的核酸配列のこの相対する鎖に相補的な増幅プライマーは、好ましくは100塩基までの、またはより好ましくは19から40塩基の、またはさらにより好ましくは19から21塩基の長さを有する。これらのプライマーは、非プロモータープライマーとして特に有用である。本明細書に開示するように、これらのプライマーは、GTGTGTGTTCCTCCTCCTAGTCGCCGCTGGTCAATTC（配列番号1）に実質的に対応する配列由来の、少なくとも19の隣接する塩基を有する。これらの条件を満たす特定の増幅プライマーの例には、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6および配列番号7に示す配列を有するオリゴヌクレオチドが含まれる。

20

【0059】

上に明記する可変長の増幅プライマーおよび検出プローブは、標的結合に関与しない可能性があり、そして増幅または検出法に実質的に影響を与えない可能性がある、外来性の（extraneous）配列の包含に対応すると意図するのを理解すべきである。例えば、本発明にしたがって、増幅反応を行うのに有用なプロモーター-プライマーは、HIV-2標的核酸にハイブリダイズする、少なくとも最小の配列、および最小配列上流に位置するプロモーター配列を有する。しかし、標的結合配列およびプロモーター配列間に配列を挿入すると、増幅反応における有用性を危うくすることなく、プライマーの長さを変化させることが可能である。さらに、増幅プライマーおよび検出プローブの長さは、これらのオリゴヌクレオチド配列が、望ましい相補配列にハイブリダイズするのに必須の最小必要条件に適合する限り、選択の問題である。プローブ配列は、配列番号21の14量体配列またはその相補体を、共通のコアとして含むべきである。これは、HIV-2標的配列中の、または増幅法によって合成した単位複製配列中のプローブ結合ドメインを明示する。プローブ結合ドメイン下流にハイブリダイズする増幅プライマーは、配列番号9の配列内に含有される、少なくとも9の隣接する塩基を含む配列を有するべきである。実際、本明細書に示す結果は、HIV-2核酸に相補的である（そして配列番号17のプロモーター-プライマー中に存在する）配列番号12の配列が、配列番号9由来の9以下の隣接する塩基しか持たないにもかかわらず、増幅を促進するのに十分であったことを示す。最後に、プローブ結合ドメイン上流にハイブリダイズする増幅プライマーは、配列番号1の配列由来の、少なくとも19の隣接する塩基を有するべきである。

30

40

【0060】

以下の2つの表は、HIV-2核酸を増幅するためのプライマーとして使用した、オリゴヌクレオチド配列の特定の例を示す。表1は、核酸の一方の鎖上のHIV-2配列に相補的な非T7プライマーの配列を示す。表2は、本発明の開発中に用いた、HIV-2標的相補配列およびT7プロモーター-プライマーの全長配列両方の配列を示す。表1のオリゴヌクレオチド配列と比較して、表2のオリゴヌクレオチド配列は、相対する核酸鎖に相補的である。上に示すように、すべてのT7プロモーター-プライマーは、その3'端に、HIV-2標的に相補的な配列を、そしてその5'端に、T7プロモーター配列を含ん

50

だ。

【 0 0 6 1 】

表 1

増幅プライマーのポリヌクレオチド配列

【 0 0 6 2 】

【 表 1 】

配列	識別子
GTGTGTGTTCCCATCTCTC	配列番号 2
TGTGTTCCCATCTCTCCTAG	配列番号 3
GTTCCCATCTCTCCTAGTCGC	配列番号 4
TCCTAGTCGCCGCCTGGTCA	配列番号 5
CCTAGTCGCCGCCTGGTCA	配列番号 6
TAGTCGCCGCCTGGTCATTC	配列番号 7

10

【 0 0 6 3 】

表 2 は、H I V - 2 標的相補的オリゴヌクレオチド配列 (配列番号 1 0 - 1 4) およびそれぞれ対応する T 7 プロモーター - プライマー配列 (配列番号 1 5 - 1 9) を示す。

20

【 0 0 6 4 】

表 2

増幅プライマーのポリヌクレオチド配列

【 0 0 6 5 】

【 表 2 】

配列	識別子
CGGGCGCCAACCTGCTAGGGATTTT	配列番号 1 0 (H I V - 2 相補プライマー)
GTCCTGTTCGGGCGCCA	配列番号 1 1 (H I V - 2 相補プライマー)
CGGGCGCCACTGCTAGAGATTTT	配列番号 1 2 (H I V - 2 相補プライマー)
CGGGCGCCACCTGCTAGGGATTTT	配列番号 1 3 (H I V - 2 相補プライマー)
CCCTGTTTCGGGCGCCAACCTGCTAG	配列番号 1 4 (H I V - 2 相補プライマー)
AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACGGGCG CCAACCTGCTAGGGATTTT	配列番号 1 5 (T 7 プロモーター - プライマー)
AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCCTG TTCGGGCGCCA	配列番号 1 6 (T 7 プロモーター - プライマー)
AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACGGGCG CCACTGCTAGAGATTTT	配列番号 1 7 (T 7 プロモーター - プライマー)
GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACA CGGGCGCCACCTGCTAGGGATTTT	配列番号 1 8 (T 7 プロモーター - プライマー)
GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACA CCCTGTTTCGGGCGCCAACCTGCTAG	配列番号 1 9 (T 7 プロモーター - プライマー)

30

40

50

【0066】

転写仲介増幅反応において、H I V - 2 L T R領域を増幅するのに好ましいプライマー組には、H I V - 2 L T R転写物にハイブリダイズする第一のプライマー（表2に列挙するプライマーの1つなど）および第一のプライマーの伸長産物の配列に相補的な第二のプライマー（表1に列挙するプライマー配列の1つなど）が含まれる。非常に好ましい態様において、第一のプライマーは、その5'端にT7プロモーター配列を含む、プロモーター-プライマーである。

【0067】

特定の好ましい態様において、H I V - 2核酸を増幅するための、少なくとも2つの増幅プライマーの組が提供され、これには：(i)配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13または配列番号14の塩基配列を有するかまたは該配列に実質的に対応するオリゴヌクレオチドを含んでなる、第一の増幅プライマー；および(ii)配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6または配列番号7の塩基配列を有するかまたは該配列に実質的に対応するオリゴヌクレオチドを含んでなる、第二の増幅プライマーが含まれる。特に好ましい組み合わせでは、第一の増幅プライマーは、配列番号10の塩基配列を有するかまたは該配列に実質的に対応するオリゴヌクレオチドを含んでなる、プロモーター-プライマーであり、そして第二の増幅プライマーは、配列番号6の塩基配列を有するかまたは該配列に実質的に対応するオリゴヌクレオチドを含んでなる。

【0068】

好ましい検出プローブ

本発明の1つの側面は、H I V - 2核酸を検出するハイブリダイゼーションプローブとして使用可能なオリゴヌクレオチドに関する。H I V - 2の核酸中に存在する標的核酸配列を増幅するための方法は、H I V - 2単位複製配列を検出する、さらなる工程を含むことが可能である。H I V - 2核酸（H I V - 2単位複製配列を含む）を検出するためのこの方法は：標的核酸配列またはその相補体に優先的にハイブリダイズするハイブリダイゼーションアッセイプローブと試験試料を、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で接触させ、それによって、検出のため、安定なプローブ：標的ニ重鎖を形成する工程を含む。次に、試験試料中のH I V - 2の存在または非存在の指標として、ハイブリッドが試験試料に存在するかどうか決定する工程がある。これは、生物学的試料におけるH I V - 2の存在の指標として、プローブ：標的ニ重鎖を検出することを伴う可能性がある。したがって、プローブ組成物およびこれらの組成物を使用する方法は、本発明の範囲内に属する。

【0069】

H I V - 2核酸配列を検出するのに有用なハイブリダイゼーションアッセイプローブには、H I V - 2 R N A転写物またはコードするD N Aに実質的に相補的な塩基配列が含まれる。したがって、本発明のプローブは、H I V - 2標的核酸配列の一方の鎖、またはその相補体にハイブリダイズする。本発明のすべてのプローブは、ストリンジェントなハイブリダイゼーションアッセイ条件下で、H I V - 2標的配列に安定してハイブリダイズする。これらのプローブはまた、H I V - 2核酸に相補的であってもなくてもよい、標的核酸領域外のさらなる塩基も有することが可能である。

【0070】

好ましいプローブは、塩濃度が0.6 - 0.9 Mの範囲である場合、約60℃に対応する、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするために、標的核酸に十分に相同である。好ましい塩には、塩化リチウムが含まれるが、塩化ナトリウムおよびクエン酸ナトリウムなどの他の塩もまた、ハイブリダイゼーション溶液中で使用可能である。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件の例は、あるいは、0.48 Mリン酸ナトリウム緩衝液、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、並びに各1 mMのE D T AおよびE G T Aに、あるいは0.6 M L i C l、1%ラウリル硫酸リチウム、60 mMコハク酸リチウム、並びに各10 mMのE D T AおよびE G T Aによって提供される。

【 0 0 7 1 】

本発明の特定の態様において、プローブは、好ましくは、22塩基までの、さらにより好ましくは18塩基までの、そしてさらにより好ましくは16塩基までの標的相補配列を有し；そしてCCTGGTCTGTTAGGACCCCTTCT（配列番号20）に実質的に対応する配列に含有される、14から22の間の隣接するヌクレオチドを含む。とりわけ、本明細書に開示する実施例に使用するプローブは各々、共通の14塩基配列、GTC TGT T A G G A C C C（配列番号21）を含有した。もちろん、本発明のプローブは、あるいは、前述のプローブ配列に相補的な配列を有することが可能である。すべての場合で、プローブがHIV-2核酸（HIV-2単位複製配列を含む）に完全に相補的である場合、プローブ長は、好ましくは35ヌクレオチドまで、より好ましくは22ヌクレオチドまで、さらにより好ましくは18ヌクレオチドまで、そしてさらにより好ましくは16ヌクレオチドまでである。上に示すように、プローブは、DNA、RNA、DNAおよびRNAの組み合わせ、核酸類似体で作成してもよいし、または1以上の修飾ヌクレオシド（例えばリボフラノシル部分に2'-O-メチル置換を有するリボヌクレオシド）を含有してもよい。

10

【 0 0 7 2 】

本明細書に開示するアッセイを行うのに使用可能なプローブの特定の例には、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、および配列番号27に示す塩基配列、またはその相補体を有するか、またはそれらに実質的に対応するオリゴヌクレオチドが含まれる。本発明にしたがったプローブが、非ヌクレオチドリンカー手段によってプローブに連結されたアクリジニウムエステル標識を含むこともまた好ましい。例えば、非常に好ましいプローブには、配列番号26のヌクレオチド9および10（5'から3'方向に読む）間に位置する非ヌクレオチドリンカーを通じてプローブに連結されたアクリジニウムエステル標識が含まれる。

20

【 0 0 7 3 】

以下の表は、HIV-2単位複製配列を検出するのに用いた、好ましい検出プローブの配列を示す。HIV-2核酸配列を検出する別のプローブは、HIV-2の相対するセンス鎖にハイブリダイズ可能であるため、本発明はまた、表3に示す配列に相補的なオリゴヌクレオチドも含む。

【 0 0 7 4 】

表 3

HIV-2単位複製配列検出プローブのポリヌクレオチド配列

30

【 0 0 7 5 】

【表 3】

配列	配列識別子
CCTGGTCTGTTAGGACCC	配列番号22
CTGGTCTGTTAGGACCCCT	配列番号23
TGGTCTGTTAGGACCCTT	配列番号24
GGTCTGTTAGGACCCTTC	配列番号25
GTCTGTTAGGACCCTT	配列番号26
GTCTGTTAGGACCCTTCT	配列番号27

40

【 0 0 7 6 】

本発明のいくつかの態様において、増幅したLTR配列を検出するプローブ配列には、メトキシ主鎖、または核酸主鎖中の少なくとも1つのメトキシ連結が含まれる。好ましくは

50

、検出プローブは、米国特許第5,585,481号；および米国特許第5,639,604号に実質的に記載されるように、特に後者の特許の第10欄第6行から第11欄第3行に、そして実施例8に記載されるように、リンカーを介してプローブ配列に付着した化学発光AE化合物で標識する。これらの特許文書に含有される開示は、本明細書に援用される。

【0077】

捕捉オリゴヌクレオチドの選択および使用

好ましい捕捉オリゴヌクレオチドには、固体支持体上の固定用の標的として働く第二の配列（すなわち「テール」配列）に共有結合した、LTR領域中のHIV-2配列に相補的な第一の配列（すなわちHIV-2結合配列）が含まれる。捕捉オリゴヌクレオチドの塩基配列を連結するいかなる主鎖も使用可能である。特定の好ましい態様において、捕捉オリゴヌクレオチドは、主鎖中、少なくとも1つのメトキシ連結を含む。好ましくは捕捉オリゴヌクレオチドの3'端にあるテール配列を用いて、相補的塩基配列にハイブリダイズさせ、生物学的試料中の他の構成要素に優先して、ハイブリダイズした標的HIV-2核酸を捕捉する手段を提供する。

10

【0078】

テール配列中で、相補塩基配列にハイブリダイズするいかなる塩基配列も使用可能であるが、ハイブリダイズする配列が、約5から50ヌクレオチド残基の長さに渡ることが好ましい。特に好ましいテール配列は、実質的にホモポリマー性であり、約10から約40ヌクレオチド残基、またはより好ましくは約14から約30残基を含有する。本発明にしたがった捕捉オリゴヌクレオチドは、HIV-2標的ポリヌクレオチドに特異的に結合する第一の配列、および固体支持体に固定されたオリゴ(dT)伸長に特異的に結合する第二の配列を含むことが可能である。

20

【0079】

図1に例示する構成要素を用いて、生物学的試料中のHIV-2配列を検出する1つのアッセイは、捕捉オリゴヌクレオチドを用いて標的核酸を捕捉し、少なくとも2つのプライマーを用いて、捕捉した標的領域を増幅し、そしてまず増幅した核酸に含有される配列に標識化プローブをハイブリダイズさせ、そしてその後、結合した標識化プローブから生じるシグナルを検出することによって、増幅した核酸を検出する工程を含む。

【0080】

捕捉工程は、好ましくは、捕捉オリゴヌクレオチドを用い、該工程では、ハイブリダイゼーション条件下で、1部分の捕捉オリゴヌクレオチドが標的核酸中の配列に特異的にハイブリダイズし、そしてテール部分が、標的領域を試料の他の構成要素から分離するのを可能にする、リガンド（例えばビオチン-アビジン結合対）などの結合対の1つの構成要素として働く。好ましくは、捕捉オリゴヌクレオチドのテール部分は、固体支持体粒子に固定した相補配列にハイブリダイズする配列である。好ましくは、まず、捕捉オリゴヌクレオチドおよび標的核酸は、溶液相ハイブリダイゼーション動力学を利用するため、溶液中にある。ハイブリダイゼーションは、捕捉オリゴヌクレオチド：標的核酸複合体を産生し、該複合体は、相補固定化配列を含む捕捉オリゴヌクレオチドのテール部分のハイブリダイゼーションを通じて、固定化プローブに結合可能である。したがって、標的核酸、捕捉オリゴヌクレオチドおよび固定化プローブを含んでなる複合体が、ハイブリダイゼーション条件下で形成される。好ましくは、固定化プローブは、テール配列に相補的であり、そして固体支持体に付着する、反復配列であり、そしてより好ましくは、ホモポリマー配列（例えばポリA、ポリT、ポリCまたはポリG）である。例えば、捕捉オリゴヌクレオチドのテール部分がポリA配列を含有する場合、固定化プローブはポリT配列を含有するであろうが、相補配列のいかなる組み合わせを用いてもよい。捕捉オリゴヌクレオチドはまた、標的にハイブリダイズする塩基配列および固定化プローブにハイブリダイズするテールの塩基配列間に位置する、1以上の塩基である、「スペーサー」残基も含有することが可能である。標的核酸：捕捉オリゴヌクレオチド複合体に結合するのに、いかなる固体支持体を用いてもよい。有用な支持体は、マトリックスまたは溶液中の遊離粒子（例えばニ

30

40

50

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、および好ましくは磁気誘引可能粒子)いずれかであることも可能である。固体支持体に固定化プローブを付着させる方法が公知である。支持体は、好ましくは、標準法(例えば遠心分離、磁気粒子の磁気誘引など)を用いて溶液から回収可能な粒子である。好ましい支持体は常磁性単分散粒子(すなわち \pm 約5%でサイズが均一)である。

【0081】

標的核酸：捕捉オリゴヌクレオチド：固定化プローブ複合体を回収すると、(生物学的試料におけるその濃度に比較し)標的核酸が効率的に濃縮され、そして生物学的試料に存在する可能性がある増幅阻害因子から標的核酸が精製される。捕捉された標的核酸は、例えば付着した標的核酸：捕捉オリゴヌクレオチド：固定化プローブ複合体を含む粒子を、洗浄溶液に再懸濁し、そしてその後、上述のように、洗浄溶液から、付着した複合体を含む粒子を回収することによって、1回以上、洗浄し、標的をさらに精製することが可能である。好ましい態様において、捕捉工程は、連続的に、捕捉オリゴヌクレオチドを標的核酸とハイブリダイズさせ、そしてその後、ハイブリダイゼーション条件を調整し、捕捉オリゴヌクレオチドのテール部分と、固定化相補配列とのハイブリダイゼーションを可能にすることによって、行う(例えば、PCT第WO 98/50583号に記載されるように)。捕捉工程、およびいかなるものでもよい所望による洗浄工程が完了すると、標的核酸が増幅可能である。操作工程数を制限するため、標的核酸は、所望により、捕捉オリゴヌクレオチドから遊離させることなく、増幅させることが可能である。

10

20

【0082】

HIV-2ポリヌクレオチド配列を増幅し、そして検出するのに好ましい方法

本発明の好ましい方法を、以下に示す実施例に記載し、そして例示する。図1を参照すると、HIV-2ゲノム(太い水平な実線によって示す)の標的領域を検出するための1つの系が例示される。この系は、4つのオリゴヌクレオチド(より短い実線によって示す)：標的領域でHIV-2配列に特異的にハイブリダイズする配列、および生物学的試料に存在する標的領域を捕捉するため、固体支持体に固定された相補配列にハイブリダイズするテール(「T」)を含む、1つの捕捉オリゴヌクレオチド；標的領域でHIV-2配列に特異的にハイブリダイズする配列、および二重鎖で、T7RNAポリメラーゼの機能するプロモーターとして作用するT7プロモーター配列(「P」)を含む、1つのT7プロモーター-プライマー；T7プライマーを用いて、標的領域配列から作成される第一鎖cDNAに特異的にハイブリダイズする配列を含む、1つの非T7プライマー；および2つのプライマーを用いて増幅される標的領域の一部に特異的にハイブリダイズする配列を含む、1つの標識化プローブを含む。

30

【0083】

上に示すように、2つのプライマーを用いる、捕捉された標的領域の増幅は、多様な既知の核酸増幅反応を用いて、達成可能である。好ましい態様において、TMAなどの転写関連増幅反応を使用する。こうした態様において、標的核酸の単一コピーから、多くの鎖の核酸を産生し、こうして、増幅した配列に結合するプローブを検出することによって、標的の検出を可能にする。好ましくは、転写関連増幅は、溶液中で、適切な塩および緩衝剤と共に、2種類のプライマー(1つはプロモーター配列を含有するため、プロモーター-プライマーと称され、図1ではRNAポリメラーゼを表す「P」と示す)、2つの酵素(逆転写酵素およびRNAポリメラーゼ)、および基質(デオキシリボヌクレオシド三リン酸、リボヌクレオシド三リン酸)を用い、核酸テンプレートから多数のRNA転写物を生じる。

40

【0084】

図1を参照すると、転写仲介増幅中、捕捉された標的核酸は、T7プロモーター-プライマーとして示される第一のプライマーにハイブリダイズする。逆転写酵素を用いて、標的RNAをテンプレートとして用い、T7プロモーター-プライマーからcDNAを合成する。非T7プライマーとして示される、第二のプライマーは、該cDNA鎖にハイブリダ

50

イズし、そして逆転写酵素の作用によって伸長されてDNA二重鎖が形成され、それにより二本鎖T7プロモーター領域が形成される。その後、T7 RNAポリメラーゼは、機能するT7プロモーターを用いることによって、多数のRNA転写物を生成する。TMAの自己触媒機構は、cDNA合成工程に続いて、反復ハイブリダイゼーションおよび重合工程を使用し、さらなるRNA転写物を産生して、それによって標的領域特異的核酸配列を増幅する。

【0085】

検出工程は、上述の増幅したRNA転写物または単位複製配列に特異的に結合する、少なくとも1つの検出プローブを用いる。好ましくは、検出プローブは、均質検出系を用いて検出可能な、検出可能標識で標識される。より好ましくは、標識化プローブは、上述のよ

10

【0086】

HIV-2核酸を検出するキット

本発明のさらに別の側面は、HIV-2核酸テンプレートを用いたポリヌクレオチド増幅反応を行うためのキットに関する。好ましくは、本発明にしたがったキットは、*in vitro*増幅反応中で、HIV-2核酸を増幅するのに使用可能なオリゴヌクレオチドプライマー対を含有する。典型的なキットは：(1)配列番号9の配列内に含有される9-34の隣接する塩基の配列を含み、そして100ヌクレオチドまでの長さを有する、第一の増幅オリゴヌクレオチド；および(2)配列番号1の配列由来の19-40の隣接する塩基の配列を含み、そして100ヌクレオチドまでの長さを有する、第二の増幅オリゴヌクレオチドを含むことが可能である。もちろん、本明細書に開示する、より短い増幅オリゴヌクレオチドもまた、キット形式内にパッケージングすることが可能である。該キットは、配列番号21またはその相補体の配列を含む、オリゴヌクレオチド検出プローブをさらに含有することが可能である。このプローブは、長さ35ヌクレオチドまでであることが可能であるが、あるいは、本明細書に開示するように、長さ22ヌクレオチドまでであるか、またはより短いことが可能である。さらに、該キットは、増幅前に、他の種からHIV-2テンプレート核酸を精製するための捕捉オリゴヌクレオチドを含有することが可能である。典型的な捕捉オリゴヌクレオチドは、配列番号31および配列番号32の配列を有する。実際、HIV-2核酸を検出する本発明の方法を実施するのに有用なキットは、互いにパッケージングした組み合わせで、本明細書に開示する、増幅オリゴヌクレオチド組成物および/または検出プローブ組成物の、本質的にいずれを含むことも可能である。

20

30

【0087】

多重増幅反応

多数の解析物ポリヌクレオチドを検出する簡便な試験形式は、異なるプライマー組を用いて同時に増幅反応を行うことを伴い、ここで、反応中合成する単位複製配列は、ハイブリダイゼーションによって検出する。これに関して、Gen-Probe Incorporated(カリフォルニア州サンディエゴ)は、3つの重要な工程を用いて、単一試験管多重形式でHIV-1および/またはHCV(C型肝炎ウイルス)核酸を検出するHIV-1/HCV試験を開発した。最初の試料調製法において、血漿を界面活性剤で処理してウイルスゲノムRNAを遊離させ、標的特異的オリゴヌクレオチドを標的にハイブリダイズさせ、そして磁気微小粒子上に捕捉して、該粒子を磁場中で血漿から分離する。次に、転写に基づくポリヌクレオチド増幅系を使用して、単一反応中で、HIV-1および/またはHCV標的RNAを増幅する。最後に、HIV-1またはHCV単位複製配列に相補的な化学発光プローブの核酸ハイブリダイゼーションを用いて、検出を達成する。アッセイが陽性結果を生じたら、識別試験を行って、2つのウイルス間を区別する。

40

【0088】

多重増幅反応において、各組のプライマーが異なる解析物ポリヌクレオチドに特異的である、異なるプライマー組の数が増加するにつれて、プライマー間、並びにプライマーおよ

50

び無関係な単位複製配列間の望ましくない相互作用の機会が増加する。本明細書に開示するプライマー配列は、好適に、HIV-1、B型肝炎ウイルス(HBV)およびC型肝炎ウイルス(HCV)由来のウイルス特異的配列を増幅することもまた可能な、単一ポリヌクレオチド増幅反応における試薬として使用可能である。

【0089】

本発明の一般的な原理は、以下の限定されない実施例を参照することによって、より完全に認識可能である。第一の実施例は有用な増幅プライマーを同定する方法を記載する。

【0090】

HIV-2末端反復配列(LTR)のポリヌクレオチド配列を増幅するのに好ましいプライマーの組み合わせは、異なる数の核酸テンプレート分子を使用する一連の方法で同定した。以下に記載するように、最初の試験は、5,000コピー/反応レベルで、合成HIV-2テンプレートを用いて行った。続く試験は、100または500コピー/反応いずれかを用いて行い、アッセイ感度に関する情報を提供した。反復試験の結果を解析すると、単位複製配列産生の平均値と共に、方法の再現性に関する情報が得られた。T7プロモーター-プライマーおよび非T7プライマーは、以下に記載する溶液相法を用いて、組み合わせでスクリーニングした。以下に記載する方法は、特に、転写仲介増幅(TMA)プロトコルを用いて実施したが、本明細書に開示するプライマーを用いて、一般の当業者によく知られるであろう代替法によって、単位複製配列を産生することが可能である。

【0091】

実施例1は、HIV-2ポリヌクレオチド配列を増幅するプライマーを同定するのに用いた方法を記載する。

【0092】

【実施例】

実施例1

増幅プライマーの同定

HIV-2 HIV2FGサブタイプLTR(GenBank寄託番号J03654)の塩基1-644の配列を含むin vitro転写RNAは、標準的実験法にしたがって、テンプレートとして直線化プラスミドクローンを用いて調製した。その後、生じたin vitro転写物を、本質的にKacianら、米国特許第5,399,491号に記載されるようなTMA反応において、プライマーの対の組を使用する増幅反応のテンプレートとして用いた。各プロモーター-プライマーは各々、5'端に、T7プロモーター配列AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGGA(配列番号28)またはGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACA(配列番号29)いずれかを、そして3'端に標的相補配列を含んだ。増幅反応はまず、100μlの標準的反応緩衝液中、合成RNAテンプレート5,000コピーおよび各15pmolのプライマーを用いて、いくつかのプライマーの組み合わせに関して行った。標的核酸およびプライマーを60℃に10分間加熱して、そしてその後、42℃に冷却し、プライマーアニーリングを促進した。その後、モロニーネズミ白血病ウイルス(MMLV)逆転写酵素(2000単位)およびT7 RNAポリメラーゼ(2000単位)を混合物に添加した。最終増幅反応は、50mM Tris HCl(pH8.5)、35mM KCl、4mM GTP、4mM ATP、4mM UTP、4mM CTP、1mM dATP、1mM dTTP、1mM dCTP、1mM dGTP、20mM MgCl₂、20mM N-アセチル-L-システイン、および5%(w/v)グリセロールを含有した。42℃で1時間インキュベーションした後、100μl増幅反応すべてを、その開示が本明細書に援用されるArnoldら、米国特許第5,639,604号に本質的に記載されるように、均質保護アッセイにおいて、アクリジニウムエステル標識化プローブを用いて、ハイブリダイゼーションによってアッセイした。配列番号27の配列を有するプローブは、 1.94×10^8 RLU/pmolの比活性にAEで標識し、そしてその後、各ハイブリダイゼーション反応のため、 1.9×10^7 RLUに均等の量を用いてHIV-2単位複製配列を検出した。プローブハイブリダイゼーションは、0.05Mコハク酸リチウ

10

20

30

40

50

△ (pH 5)、0.6 M LiCl、1% (w/v) ラウリル硫酸リチウム、10 mM EDTA、10 mM EGTAを含有する溶液 200 μl 中、60 で15分間行い、その後、300 μl の0.15 M 四ホウ酸ナトリウム (pH 8.5)、1% TRITON (登録商標) X-100 (Union Carbide Corporation; コネチカット州ダンベリー) を添加した。この混合物をまず、60 で10分間インキュベーションし、非ハイブリダイズプローブを不活性化し、そしてその後、室温に冷却した。各試料中に残った化学発光は、1 mM 硝酸および0.1% (v/v) 過酸化水素を自動的に注入した後、1 N 水酸化ナトリウムを含有する溶液を注入するよう設定した、Gen-Probe LEADER (登録商標) I 発光測定装置を用いてアッセイした。化学発光反応に関して測定した結果は、相対光単位 (RLU) で表した。

10

【0093】

表4は、5,000コピーのテンプレートポリヌクレオチドを用いて行った増幅法からの結果を示す。とりわけ、配列番号17の配列を有するプロモーター-プライマーは、HIV-1ポリヌクレオチド配列を効率的に増幅し(データ未提示)、そしてHIV-1およびHIV-2核酸が共通のプライマーを用いて同時増幅可能であるかどうか決定する、本方法に含まれた。このプライマーの配列は、HIV-1およびHIV-2が挿入/欠失によって異なる配列領域に渡る。したがって、配列番号9の配列(本発明のプロモーター-プライマー配列はこれに由来する)と比較して、プロモーター-プライマーのHIV-2標的相補部分は、配列番号9の配列において、28位のヌクレオチドでミスマッチを、そして19-20位のACヌクレオチド対に対応する2つのヌクレオチドの欠失を有する。表に示す結果は、増幅および検出法の4回の試験(配列番号16の配列を有するプロモーター-プライマーに関して)または5回の試験(配列番号15および17の配列を有するプロモーター-プライマーに関して)の反復から得ている。表に示す陰性対照エントリーのいくつかは、異なる時点で行ったアッセイから得た。すべての陰性対照値は、いかなるHIV-2テンプレートも非存在下で行った試験から得た。アッセイの非常に再現性がある性質を考慮し、合理的に、陰性対照反応の大きさはまた、異なる実験間でも同等であろうと仮定した。入手不能なデータは、表中、「NA」と示す。

20

【0094】

表4

異なるプライマーの組み合わせを用いた、HIV-2ポリヌクレオチド配列の増幅

30

【0095】

【表4】

T7プロモーター- プライマー識別子	結果	非T7プライマー識別子		
		配列番号2	配列番号3	配列番号7
配列番号15	平均RLU	12,002,375	11,450,076	11,701,970
	陰性対照	400,916	27,993	53,954
	%CV	4	7	5
配列番号16	平均RLU	12,160,598	4,894,812	11,501,174
	陰性対照	NA	NA	29,936
	%CV	5	5	6
配列番号17	平均RLU	9,712,454	4,989,813	11,032,883
	陰性対照	NA	115,172	NA
	%CV	15	62	6

40

【0096】

表4に示す結果は、5,000コピー/反応のテンプレートレベルで試験したプライマー

50

の組み合わせが各々、陽性結果を生じることを示した。方法において、プロモーター-プライマーはすべて、容易に検出可能な増幅シグナルを生じたが、配列番号15と同定するプロモーター-プライマーは、試験した非T7プライマー各々と組み合わせで用いた際、好適に、優れた結果を生じた。とりわけ、配列番号15の配列を有するプロモーター-プライマーを含む増幅反応は、均質に、低い%CV値と関連し、それによって、このプライマーを含む増幅反応の高い度合いの再現性および特別の堅牢性が示された。興味深いことに、表に示す結果は、HIV-1配列を非常に効率的な方式で増幅する配列番号17の配列を有するプロモーター-プライマーであってもまた、この方法では、HIV-2配列を増幅することを示した。

【0097】

表4に示す知見に基づいて、さらなるプロモーター-プライマーおよびより低いレベルの投入テンプレートを用いて、さらなる試験を行って、有用なプロモーター-プライマーの設計およびアッセイの感度に関する柔軟性を立証した。より具体的には、上述の増幅および検出法は、各反応において、配列番号15および17の配列を有するプロモーター-プライマーを、非T7プライマーおよび100または500コピーいずれかのHIV-2テンプレートと組み合わせで用いて、反復した。その後、非T7プライマーの1つを、T7プロモーター配列を所持するT7プロモーター-プライマーおよび配列番号15-17に同定する配列を有するプロモーター-プライマーのいずれに存在するものとも異なる標的相補配列のコレクションと組み合わせで試験するために選択した。これらの方法の結果を表5-8に示す。

【0098】

表5

異なるプライマーの組み合わせを用いた、500コピー/反応でのHIV-2ポリヌクレオチド配列の増幅

【0099】

【表5】

T7プロモーター- プライマー識別子	結果	非T7プライマー識別子		
		配列番号2	配列番号3	配列番号7
配列番号15	平均RLU	11,551,224	11,709,201	10,728,899
	陰性対照	91,900	84,559	93,300
	%CV	7	3	10
配列番号17	平均RLU	158,707	2,813,144	1,416,150
	陰性対照	NA	115,172	99,001
	%CV	19	128	182

【0100】

表6

異なるプライマーの組み合わせを用いた、100コピー/反応でのHIV-2ポリヌクレオチド配列の増幅

【0101】

【表6】

		非T7プライマー識別子		
T7プロモーター- プライマー識別子	結果	配列番号2	配列番号3	配列番号7
配列番号15	平均RLU	10,805,600	9,581,007	11,022,067
	陰性対照	91,900	84,559	93,300
	%CV	11	17	4
配列番号17	平均RLU	1,710,494	129,235	846,399
	陰性対照	497,960	115,172	99,001
	%CV	184	19	165

10

【0102】

表5および6に示す結果によって、配列番号15に同定するプロモーター-プライマーが、投入テンプレートレベルがわずかに100コピー/反応であっても、示した非T7プライマー各々を用いて、HIV-2ポリヌクレオチド配列を効率的に増幅することが確認された。配列番号17の配列を有するプロモーター-プライマーはまた、配列番号15の配列を有するプロモーター-プライマーと比較して、幾分減少したレベルであっても、増幅反応の構成要素として有用であった。しかし、明らかに、これらの2つのプライマーは、HIV-2核酸増幅アッセイにおいて、プライマー結合のための標的として有用であるLTRの領域を明示した。

20

【0103】

3つのさらなる非T7プライマーを合成して、そしてHIV-2増幅アッセイにおいて、配列番号15のプロモーター-プライマーと組み合わせて試験した。これらのさらなるプライマーは、配列番号4-6に示す配列を有し、各オリゴヌクレオチドの1-4位は、2'メトキシ残基によって占められた。表7は、各反応において、合成HIV-2テンプレートRNA 100コピーを用いて、これらのプライマー組を上述の増幅プロトコルで試験し、そして本質的に上述のように増幅産物を検出した際に得た結果を示す。

30

【0104】

表7

異なるプライマーの組み合わせを用いた、100コピー/反応でのHIV-2ポリヌクレオチド配列の増幅

【0105】

【表7】

		非T7プライマー識別子		
T7プロモーター- プライマー識別子	結果	配列番号4	配列番号5	配列番号6
配列番号15	平均RLU	15,143,148	15,149,932	13,731,644
	陰性対照	133,313	82,829	11,547
	%CV	4.3	5.5	8.5

40

【0106】

表7に示した結果は、3つのプライマーの組み合わせがすべて、増幅法において、例外的に優れた結果を生じることを示した。とりわけ、配列番号6の配列を有するプライマーおよび配列番号15の配列を有するプロモーター-プライマーの組み合わせは、HIV-2テンプレート配列を効率的に増幅し、そして好適に、陰性対照反応では、非常に低い読み取りを生じた。本明細書に開示するプライマーおよびプライマーの組み合わせは各々、本

50

発明の好ましい態様に相当する。配列番号 6 の配列を有するプライマーおよび配列番号 15 の配列を有するプロモーター - プライマーの組み合わせは、H I V - 2 ポリヌクレオチド配列を増幅するのに、非常に好ましい組み合わせである。

【 0 1 0 7 】

最後に、500 または 100 コピー / 反応の H I V - 2 テンプレートいずれかを用いて行う増幅反応において、配列番号 18 および 19 に同定するプロモーター - プライマーと組み合わせ、配列番号 6 の配列を有するプライマーを試験した。重要なことに、2 つのプライマー中の標的相補配列および T7 プロモーター配列はどちらも、配列番号 15 - 17 のプロモーター - プライマーで使用する T7 プロモーター配列とは異なった。やはり重要なことに、配列番号 18 に同定するプロモーター - プライマーは、配列番号 9 に示す配列の 19 位の A 残基に対応する単一塩基欠失を含有する。表 8 に示す数値は、それぞれ、500 および 100 コピー / 反応の H I V - 2 標的を用いて行った、5 および 4 の反復試験の結果である。

【 0 1 0 8 】

表 8

異なるプライマーの組み合わせを用いた、500 または 100 コピー / 反応での H I V - 2 ポリヌクレオチド配列の増幅

【 0 1 0 9 】

【 表 8 】

T7プロモーター- プライマー識別子	H I V - 2 標的 コピー数	結果	非T7プライマー識別子
			配列番号 6
配列番号 18	500	平均 R L U	2,800,000
		陰性対照	4,778
		%CV	8
	100	平均 R L U	2,800,000
		陰性対照	7,367
		%CV	6
配列番号 19	500	平均 R L U	2,700,000
		陰性対照	2,710
		%CV	10
	100	平均 R L U	2,800,000
		陰性対照	36,207
		%CV	8

【 0 1 1 0 】

表 8 に示す結果は、配列番号 18 - 19 に同定する T7 プロモーター - プライマーがどちらも増幅アッセイで優れた結果を生じ、陽性シグナルは、500 コピー / 反応の H I V - 2 標的を用いて行う陰性対照反応で測定されるシグナルより、500 - 1,000 倍、上の範囲であることを立証した。著しいことに、これらのプロモーター - プライマーを含む陰性対照反応で測定したプロンプハイブリダイゼーションシグナルは、好適に、非常に低かった。結果はさらに、異なる T7 プロモーター配列を増幅法で使用して、優れた結果を生じることが可能であることをさらに立証した。

【 0 1 1 1 】

表 3 - 7 に示す結果を総合すると、上述の非 T 7 プライマー各々が結合する L T R 標的領域が、T 7 プロモーター - プライマーと組み合わせて H I V - 2 配列を増幅するのに使用するための、さらなるプライマーを設計するのに使用可能なドメインを明示することが示された。このドメインは、G T G T G T G T T C C C A T C T C T C C T A G T C G C C G C C T G G T C A T T C (配列番号 1) に示す長さ 4 0 ヌクレオチドの配列を含んだ。この配列に実質的に対応する配列またはそのサブセットを有するオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載する増幅反応においてプライマーとして使用可能である。さらに、表 4 - 8 の結果は、上述の T 7 プロモーター - プライマー各々が結合する L T R 標的領域が、非 T 7 プライマーと組み合わせて H I V - 2 配列を増幅するのに使用可能なドメインを明示することを示した。このドメインは、長さ 3 4 ヌクレオチドの配列 A A A A T C C C T A G C A G G T T G G C G C C C G A A C A G G G A C (配列番号 8) を含んだ。この配列に、またはこの配列に実質的に相補的な配列に、相補的なオリゴヌクレオチドは、本明細書に記載する増幅反応において、プライマーとして使用可能である。

10

【 0 1 1 2 】

実施例 2 は、H I V - 2 単位複製配列を検出するのに有用なプローブを同定するのに使用する方法を記載する。この方法において、一連の異なるプローブ配列に相補的な単一の合成オリゴヌクレオチド標的は、プローブ結合アッセイの標的として働いた。

【 0 1 1 3 】

実施例 2

H I V - 2 を検出するオリゴヌクレオチドプローブ

配列 G A A G G G U C C U A A C A G A C C A G G G U C U U G U U A (配列番号 3 0) を有する合成アンチセンス H I V - 2 オリゴヌクレオチドは、標準的な実験法にしたがって、2'メトキシヌクレオチドを用いて調製した。このオリゴヌクレオチドは、モデル R N A 標的として働いた。2'メトキシヌクレオチドを用いて調製し、そしてプローブとして試験した、6つの異なるオリゴヌクレオチドは、表 3 に示す配列を有した。

20

【 0 1 1 4 】

ハイブリダイゼーション反応は、 1×10^6 R L U に対応する量の A E 標識化プローブを含有するプローブ保護緩衝液 1 0 0 μ l 体積および 2 p m o l の合成 H I V - 2 R N A 標的を含有する 1 0 0 μ l からなつた。緩衝溶液は、7 5 m M コハク酸、1 2 9 m M ラウリル硫酸リチウム、7 5 m M 水酸化リチウム、1 5 m M アルドリチオール - 2、1 . 0 M 塩化リチウム、1 m M E D T A、3 % v / v エチルアルコールを含み、そして p H を 4 . 2 に調整した。混合物は、6 0 で 1 5 分間ハイブリダイズさせ、そしてその後、6 0 0 m M ホウ酸、2 3 5 m M N a O H および 1 % v o l / v o l T R I T O N X - 1 0 0 を含む選択試薬溶液 (p H 9 に調整済み) 2 5 0 μ l を用いて選択し、そしてその後、室温に 1 0 分間冷却した。陰性対照ハイブリダイゼーション反応では、アンチセンス H I V - 2 標的オリゴヌクレオチドを省いた。ハイブリダイズしたプローブに会合する A E 標識の量を反映する化学発光は、上述の方法を用いて測定した。この方法から得た結果を表 9 に示す。

30

【 0 1 1 5 】

表 9

プローブハイブリダイゼーションの結果

【 0 1 1 6 】

【 表 9 】

40

ハイブリダイゼーション反応	平均ハイブリダイゼーション (投入%)				
	配列番号 2 2	配列番号 2 3	配列番号 2 4	配列番号 2 5	配列番号 2 6
陰性対照	0.07	0.22	0.10	0.09	0.06
合成 HIV-2 RNA 単位複製配列	22	15	21	54	97

10

【0117】

表9に示す結果が示すように、該方法で試験したプローブは各々、低レベルのバックグラウンドハイブリダイゼーションを生じ、そしてHIV-2標的配列と、少なくとも中程度のレベルの陽性反応を生じた。より具体的には、陰性対照値はすべて、投入プローブレベルの0.25%未満であり、一方、HIV-2標的配列の存在下で行った反応はすべて、15%より大きかった。実施例1で、配列番号27の配列を有するプローブが、HIV-2単位複製配列を検出するのに有用であることが示されたのと合わせると、表9の結果は、表3に示す配列がすべて、検出プローブとして有用であることを示した。

【0118】

上述の方法で達成した成功は、さらなる検出プローブを設計するのに使用可能なHIV-2配列ドメインを明示した。より具体的には、このドメインは、配列CCTGGTCTGTTAGGACCCCTTCTT(配列番号20)を有する、長さ22ヌクレオチドの伸長に渡った。この配列に実質的に対応する配列、そのサブセット、またはその相補体を有するオリゴヌクレオチドは、HIV-2核酸を検出するためのプローブとして使用可能である。もちろん、有用なプローブは、このドメインの長さより長くてもよいし、そして有用なプローブのHIV-2相補部分は、分子ビーコンなどの、特定の二次構造を有するプローブに取り込んでてもよい。配列番号20の配列は、HIV-1のゲノムに欠けているHIV-2ゲノムの部分に由来するため、これらのプローブはHIV-2に特異的であり、そしてHIV-1に特異的でない。

20

【0119】

とりわけ、配列番号26および25の配列を有するプローブは、この方法において、非常に優れた結果を生じた。これらのプローブのオリゴヌクレオチド配列は、上述のアッセイの検出工程で使用するのに、非常に好ましい。もちろん、いかなる検出可能標識の配置も多様であることが可能であり、そしてそれでも本発明の範囲内に属する。例えば、上述の方法を用いて、HIV-2単位複製配列の検出用に、9および10位の間に連結したAE標識を持つ、配列番号26の配列を有するプローブを使用するのが非常に好ましい。

30

【0120】

候補オリゴヌクレオチドが、溶液からHIV-2核酸を捕捉するのに使用可能であるかどうか決定する方法は、モデル標的として、上述の*in vitro*転写HIV-2RNAを用いて行った。2つの異なる候補捕捉オリゴヌクレオチドは各々、オリゴ(dA)伸長に連結したHIV-2特異的配列を含んだ。HIV-2RNA標的、およびオリゴ(dT)を提示するよう修飾した磁気粒子と組み合わせると、機能する捕捉オリゴヌクレオチドは、HIV-2標的および粒子を架橋し、そしてHIV-2標的を固定した。溶液からの粒子性の複合体の除去は、HIV-2テンプレートの濃縮手段に有効に相当した。以下の実施例に記載する方法において、2つの捕捉オリゴヌクレオチドを、別個に、HIV-2RNAおよびオリゴ(dT)で修飾した磁気粒子と接触させた。粒子を収集し、そしてその後、洗浄した後、結合したHIV-2配列は、均質保護アッセイで検出した。各場合で、捕捉オリゴヌクレオチドは、HIV-2RNA標的を磁気粒子上に固定した。

40

【0121】

以下の実施例は、HIV-2捕捉オリゴヌクレオチドを同定するのに用いた方法を記載す

50

る。

【0122】

実施例 3

捕捉オリゴヌクレオチドを用いた HIV-2 標的配列の検出

in vitro 転写した HIV-2 LTR RNA 標的 (上述) 5×10^{11} コピーは、配列番号 31 および 32 の配列を有する捕捉オリゴヌクレオチド、0、1.5 pmol、3.5 pmol または 5 pmol いずれか、並びに常磁性粒子 (0.7 - 1.05 μ 粒子、Seradyne、インディアナ州インディアナポリス) に連結した固定化ポリ (dT₁₄) 約 100 μ g を含有する溶解 / 捕捉緩衝液 400 μ l 中に分散した。溶解 / 捕捉緩衝液は、790 mM HEPES、230 mM コハク酸、10% (w/v) ラウリル硫酸リチウム、680 mM 水酸化リチウム水和物を含んだ。配列番号 31 の配列を有する捕捉オリゴヌクレオチドは、2'-メトキシヌクレオチド類似体が占める 1-20 位およびデオキシリボヌクレオチドが占める 21-53 位を有した。配列番号 32 の配列を有する捕捉オリゴヌクレオチドは、2'-メトキシヌクレオチド類似体が占める 1-18 位およびデオキシリボヌクレオチドが占める 19-51 位を有した。配列 5'-TTT-3' に示されるスパーサーを、捕捉オリゴヌクレオチド各々に関して、HIV-2 相補配列およびポリ (A) テール領域間に挿入した。Lundら、Nuc. Acids Res. 16:10861-10880 (1988) に記載されるようなカルボジイミド化学反応を用いて、ポリ (dT₁₄) を常磁性粒子に連結した。混合物を 55-60 に約 15 から 30 分間加熱し、そしてその後、室温に冷却してハイブリダイゼーションを可能にした。Wangら、米国特許第 4,895,650 号に記載するものなどの方法を用いて、磁場を適用し、固定化捕捉オリゴヌクレオチドおよび HIV-2 RNA を含有する粒子複合体を収集した。粒子は、再懸濁および磁気分離工程の反復によって、1 ml の洗浄緩衝液 (10 mM HEPES、6.5 mM NaOH、1 mM EDTA、0.3% (v/v) エタノール、0.02% (w/v) メチル-パラベン、0.01% (w/v) プロピル-パラベン、150 mM NaCl、0.1% (w/v) ラウリル硫酸ナトリウム) で 2 回洗浄した。洗浄した粒子は、100 μ l のハイブリダイゼーション緩衝液に懸濁し、そして配列番号 27 の配列を有するプローブの代わりに、配列番号 33 の配列を有するプローブを用いたことを除いて、先の実施例に記載した、プローブハイブリダイゼーションおよび検出法に、混合物を供した。各アッセイ条件に関して、偽捕捉対照は、アッセイで達成可能な最大化学発光値を示した。表 10 は、捕捉オリゴヌクレオチドの各レベルに関して、2 つのアッセイの反復に関する化学発光測定値を示す。

【0123】

表 10

標的捕捉の有効性

【0124】

【表 10】

捕捉オリゴヌクレオチド	結果	捕捉オリゴヌクレオチド量 / 反応		
		1.5 pmol	3.5 pmol	5 pmol
配列番号 31	平均 RLU	214,064	210,545	1,033,935
	効率%	18.4	18.1	88.9
	%CV	5	6	13
配列番号 32	平均 RLU	126,948	174,640	1,334,771
	効率%	10.9	15.0	114.81
	%CV	16	13	4

40

50

【0125】

表10に示す結果は、方法で試験したオリゴヌクレオチドがどちらも、溶液からHIV-2 RNAを捕捉するのに使用可能であることを確証した。

【0126】

実施例4は、生物学的試料において、HIV-2核酸を検出するため、したがうことが可能な方法を記載する。この実施例は、既知の量のHIV-2核酸を含有する対照試料を記載するが、ヒトドナー血液試料から得た血漿試料で置き換えてもよいことが理解されるべきである。後者の場合の陽性ハイブリダイゼーション結果は、ドナー試料におけるHIV-2核酸の存在の指標となるであろう。

【0127】

実施例4

核酸増幅を用いたHIV-2核酸の検出

既知の量のHIV-2(反応試験管あたり100コピーのHIV-2)を含有するヒト血漿の第一の試料を、実施例3に記載するように、等体積の溶解/捕捉緩衝液と混合する。HIV-2標的RNAを捕捉するため、混合物はまた、配列番号31の配列を有する捕捉オリゴヌクレオチド約3.5pmolおよび常磁性粒子(0.7-1.05μ粒子、Seradyne、インディアナ州インディアナポリス)に付着した固体化ポリdT₁₄プローブ約100μgも含有する。混合物は、55-60に約15から30分間加熱し、そしてその後、室温に冷却して、ハイブリダイゼーションを可能にする。その後、磁場を適用して粒子複合体を収集する。粒子は、1mlの洗浄緩衝液で2回洗浄し、そしてその後、実質的に、Kacianら、米国特許第5,399,491号および第5,554,516号に記載されるような方法を用いた転写関連増幅のため、核酸増幅試薬溶液75μl中に再懸濁する。

【0128】

簡潔には、付着した複合体を含む洗浄粒子を、反応混合物(40mM Tris塩基(pH7.5)、17.5mM KCl、20mM MgCl₂、5%ポリビニルピロリドン(PVP)、各1mMのdNTP、各4mMのrNTP)中で、配列番号15および6の配列を有する増幅オリゴヌクレオチド各15pmolと混合し、不活性油の層で覆って蒸発を防止し、60で10分間インキュベーションし、そしてその後、41.5-42で10分間インキュベーションする。酵素(反応あたり約3,000単位のMMLV逆転写酵素および約3,000単位のT7 RNAポリメラーゼ)を添加し、混合し、そして標的HIV-2核酸を41.5-42で1時間増幅する。

【0129】

実質的に先に記載するように、増幅したHIV-2標的配列は、配列番号26の配列を有するAE標識化プローブとハイブリダイズさせ、そしてその後、化学発光によって検出し、そして結果を相対光単位(RLU)で表した。各アッセイ条件に関して、陰性対照は、HIV-2含有試料の代わりに、HIV-2核酸を含有しない、等体積の血漿を有する。その後、これらのアッセイで検出したRLU読み取り値を比較する。

【0130】

これらの方法の結果は、HIV-2核酸配列が、本発明の方法を用いて、生物学的試料において、容易に検出可能であることを示す。より具体的には、陰性対照試料は、背景シグナルのみに対応するプローブハイブリダイゼーション結果を生じる。逆に、HIV-2核酸を含有する試料は、バックグラウンドの数倍のハイブリダイゼーションシグナルを生じる。これは、増幅および検出反応が実行可能であることを示す。

【0131】

本発明は、いくつかの特定の実施例およびその態様に関して記載している。もちろん、前述の詳細な説明を概観すれば、本発明のいくつかの異なる態様が、当業者に示唆されるであろう。したがって、本発明の真の範囲は、付随する請求項を参照して、決定すべきである。

【図面の簡単な説明】

10

20

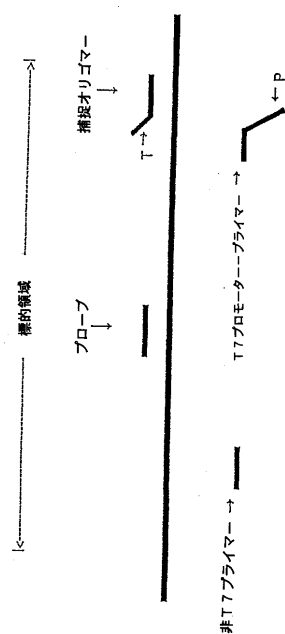
30

40

50

【図1】図1は、HIV-2 核酸内の標的領域を検出するのに使用可能な多様なポリヌクレオチドを例示する模式図である(太い水平線で示す)。以下の核酸の位置を、標的領域に相対して示す: 「捕捉オリゴヌクレオチド」は、増幅前に標的核酸にハイブリダイズし、そして該核酸を捕捉するのに用いる核酸を指し、「T」は、相補配列を有する固定化オリゴヌクレオチド(示していない)にハイブリダイズするのに用いるテール配列を示す; 「非T7プライマー」および「T7プロモーター-プライマー」は、TMAを行うのに用いる2つの増幅プライマーを示し、「P」は、T7プロモーター-プライマーのプロモーター配列を示し;そして「プローブ」は、増幅した核酸を検出するのに用いるプローブを指す。

【図1】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 May 2002 (02.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/34951 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/45396
- (22) International Filing Date: 22 October 2001 (22.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
 - 60/242,620 23 October 2000 (23.10.2000) US
 - 60/280,058 30 March 2001 (30.03.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
GEN-PROBE INCORPORATED [US/US], Patent Dept., 10210 Genetic Center Drive, San Diego, CA 92121-4362 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): YANG, Yeasing, Y. [US/US]; 13569 Gleneliff Way, San Diego, CA 92130 (US). BURRELL, Terrie, A. [US/US]; 4302 Plumosa Way, San Diego, CA 92103 (US).
- (74) Agent: GILLY, Michael, J., Patent Dept., 10210 Genetic Center Drive, San Diego, CA 92121-4362 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

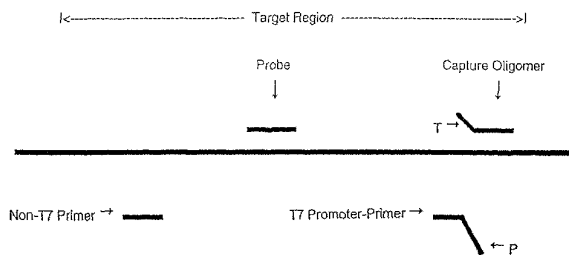
Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/34951 A2

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTING HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS 2 (HIV-2)



(57) Abstract: Compositions and methods for synthesizing and detecting HIV-2 specific amplicons. Particularly described are oligonucleotides that are useful as hybridization probes, and amplification primers that facilitate detection of very low levels of HIV-2 nucleic acids.

WO 02/34951

PCT/US01/45396

COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTING
HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS 2 (HIV-2)

Related Applications

5 This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/242,620,
filed October 23, 2000, and U.S. Provisional Application No. 60/280,058, filed March 30,
2001. The disclosures of these related applications are hereby incorporated by reference.

Field of the Invention

10 The present invention relates to the field of biotechnology. More specifically, the
invention relates to diagnostic assays for detecting HIV-2 nucleic acid sequences.

Background of the Invention

15 Although the HIV/AIDS pandemic is principally due to infection by HIV-1, a different
retrovirus has emerged as another cause of AIDS. This so-called "HIV-2" virus was first
isolated from AIDS patients in West Africa in 1986, and was subsequently detected as an
infectious agent for the first time in the United States the following year. Fewer than 100 cases
of HIV-2 had been reported in the United States through the end of 1994. Despite this
seemingly low number, HIV-2 is being identified as the etiologic agent in growing numbers of
immunosuppressive diseases that are clinically indistinguishable from AIDS cases that result
from HIV-1 infection (Kanki et al., *Science* **232**:238 (1986); Kanki et al., *Science* **236**:827
20 (1987); Clavel et al., *Science* **233**:343 (1986); Clavel et al., *N. Engl. J. Med.* **316**:1180 (1987)).
Although HIV-2 is related to HIV-1 by its morphology and tropism for CD4⁺ cells, it clearly is
a distinct virus and not merely an envelope variant of HIV-1.

Indeed, since HIV-2 is only distantly related to HIV-1, with approximately 50% amino
acid conservation in the *gag* and *pol* proteins and less than 30% conservation in the *env* gene
products, its presence is not effectively detected by serologic assays used for detecting HIV-1
25 infection (Constantine NT, *AIDS* **7**:1 (1993); Markovitz DM, *Ann. Intern. Med.* **118**:211
(1993)). As a result, attempts have been made to develop nucleic acid probes that can be used
for specifically detecting HIV-2 viral nucleic acids.

30 Interestingly, the genomes of both HIV-1 and HIV-2 show substantial sequence
heterogeneity among different isolates. As a consequence of this heterogeneity, it has been
impossible to find substantial regions of absolute sequence conservation between all isolates of
HIV-1 or all isolates of HIV-2 (see published European Patent Application EP 0 887 427).

WO 02/34951

PCT/US01/45396

Indeed, numerous viral isolates with unique polynucleotide sequences have been identified for each of these viruses, a factor that further complicates the construction of probes for reliable and effective nucleic acid testing.

5 Since, like HIV-1, HIV-2 also is transmissible through exchange of body fluids, including blood and plasma, it is important to be able to detect infected body fluids before antibodies to the virus are detectable or symptoms are evident in an infected individual. For protection of patients who might otherwise receive an HIV-2-infected body fluid (e.g., whole blood or plasma during transfusion), or products derived from donated blood or plasma, it is particularly important to detect the presence of the virus in the donated body fluid to prevent its
10 use in such procedures or products. It is also important that procedures and reagents used for detecting HIV-2 can detect relatively low numbers of viral copies which may be present in an infected individual, who may be a donor, during the early stages of infection.

Assays and reagents for detecting HIV-2 have been previously disclosed in, for example, U.S. Patent Nos. 6,020,123, 5,688,637, 5,545,726 and 5,310,651; European Patent
15 Nos. EP 0404625 B1 and EP 0239425 B1; and published European Patent Application Nos. EP 1026236 A2, EP 0887427 A2.

Summary of the Invention

A first aspect of the invention relates to a composition for detecting an HIV-2 nucleic acid sequence. The composition includes a first amplification oligonucleotide having a length
20 of up to 100 nucleotides. This first amplification oligonucleotide includes a sequence of 9-34 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9. Also included in the composition is a second amplification oligonucleotide having a length of up to 100 nucleotides. This second amplification oligonucleotide includes a sequence of 19-40 contiguous bases from the sequence of SEQ ID NO:1. In a preferred embodiment of the invention, the length of the
25 second amplification oligonucleotide is 19-40 nucleotides. In an even more preferred embodiment of the invention, the length of the first amplification oligonucleotide is 18-60 nucleotides, more preferably 18-34 nucleotides, and still more preferably 18-25 nucleotides. Examples of first amplification oligonucleotides having lengths in the range of 18-25 nucleotides are given by SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 and
30 SEQ ID NO:14. In another preferred embodiment, when the length of the second amplification oligonucleotide is in the range of 19-40 nucleotides, the length of the first amplification oligonucleotide is in the range of 18-60 nucleotides and includes a promoter sequence.

WO 02/34951

PCT/US01/45396

According to another preferred embodiment of the invention, when the first amplification oligonucleotide has a length of up to 100 nucleotides, the length of the second amplification oligonucleotide is in the range of 19-21 nucleotides. In another preferred embodiment, the first amplification oligonucleotide has a length of 18-34 nucleotides, and the second amplification oligonucleotide has a length of 19-21 nucleotides. In still another preferred embodiment, when the first amplification oligonucleotide has a length of 18-60 nucleotides the second amplification oligonucleotide has a length of 19-21 nucleotides. In yet another preferred embodiment of the invention, when the first amplification oligonucleotide has a length of 18-60 nucleotides, and the second amplification oligonucleotide has a length of 19-40 nucleotides, the first amplification oligonucleotide is a promoter-primer having the sequence of any one of SEQ ID NOs:15-19. In still yet another preferred embodiment of the invention, when the first amplification oligonucleotide has a length of 18-60 nucleotides, and the second amplification oligonucleotide has a length of 19-21 nucleotides, the second amplification oligonucleotide can have the sequence of any one of SEQ ID NOs:2-7. In still yet another preferred embodiment of the invention, when the first amplification oligonucleotide has a length of 18-60 nucleotides, and the second amplification oligonucleotide has a length of 19-21 nucleotides, the first amplification oligonucleotide can further include a promoter sequence. For example, the first amplification oligonucleotide can be a promoter-primer having the sequence of any one of SEQ ID NOs:15-19. Alternatively, when the first amplification oligonucleotide has a length of 18-60 nucleotides, when the second amplification oligonucleotide has a length of 19-21 nucleotides, and when the first amplification oligonucleotide further includes a promoter sequence, the sequence of the second amplification oligonucleotide can be any one of SEQ ID NOs:2-7. In still yet another preferred embodiment of the invention, when the first amplification oligonucleotide has a length of 18-60 nucleotides, when the second amplification oligonucleotide has a length of 19-21 nucleotides, and when the first amplification oligonucleotide is a promoter-primer having the sequence of any one of SEQ ID NOs:15-19, the second amplification oligonucleotide can have a sequence given by any one of SEQ ID NOs:2-7. According to another preferred embodiment of the invention, the length of the first amplification oligonucleotide is 18-25 nucleotides, and the length of the second amplification oligonucleotide is 19-21 nucleotides. When this is the case, the first amplification oligonucleotide can have a sequence, for example, that is any one of SEQ ID NOs:10-14. Alternatively, when the length of the first amplification oligonucleotide is 18-25 nucleotides,

WO 02/34951

PCT/US01/45396

and the length of the second amplification oligonucleotide is 19-21 nucleotides, the second amplification oligonucleotide can have a sequence given by any one of SEQ ID NOs:2-7. In still yet another highly preferred embodiment of the invention, when the length of the first amplification oligonucleotide is 18-25 nucleotides and the length of the second amplification oligonucleotide is 19-21 nucleotides, and when the first amplification oligonucleotide has a sequence given by any one of SEQ ID NOs:10-14, the second amplification oligonucleotide can be any one of SEQ ID NOs:2-7. According to another embodiment, the composition which includes the first and second amplification oligonucleotides, each having lengths of up to 100 nucleotides, may further include an oligonucleotide detection probe having a sequence that includes SEQ ID NO:21 or the complement thereof. Preferably, the detection probe has a length of up to 18 nucleotides, and more preferably has the sequence of any one of SEQ ID NOs:22-27. In a highly preferred embodiment the sequence of the first amplification oligonucleotide is any one of SEQ ID NOs:10-19, the sequence of the second amplification oligonucleotide is any one of SEQ ID NOs:2-7, and the sequence of the oligonucleotide detection probe is any one of SEQ ID NOs:22-27.

A second aspect of the invention relates to a method for determining whether a biological sample containing nucleic acids includes an HIV-2 nucleotide base sequence. A first step of the invented method involves contacting the nucleic acids of the biological sample with a composition that includes a first amplification oligonucleotide that includes the sequence of SEQ ID NO:9 and has a length of up to 100 nucleotides. This first amplification oligonucleotide has a sequence of 9-34 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9. The composition further includes a second amplification oligonucleotide having 19-40 contiguous bases from the sequence of SEQ ID NO:1 and a length of up to 100 nucleotides. A second step involves amplifying any of the HIV-2 nucleotide base sequence present in the biological sample to produce amplified nucleic acids. Finally, there is a step for detecting the amplified nucleic acids produced in the amplifying step. According to the invented method, positive detection of the amplified nucleic acids indicates that the biological sample included the HIV-2 nucleotide base sequence. In a preferred embodiment, the first amplification oligonucleotide is 18-60 nucleotides long and the second amplification oligonucleotide is 19-40 nucleotides long. In an even more preferred embodiment that employs the same two oligonucleotides, the first amplification oligonucleotide is a promoter-primer, and the amplifying step involves amplifying by the Transcription Mediated Amplification reaction, or

WO 02/34951

PCT/US01/45396

"TMA." According to a different preferred embodiment of the invention, when the first and second amplification oligonucleotides have lengths of 18-60 and 19-40 nucleotides, respectively, the detecting step involves first hybridizing the amplified nucleic acids with a hybridization assay probe that is specific for the amplified nucleic acids, and thereafter
5 measuring the amount of the hybridization assay probe that hybridized to the amplified nucleic acids. This can be accomplished, for example, by using a labeled nucleic acid probe. In an alternative procedure, the hybridization assay probe includes the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof, and has a length of up to 35, or up to 22 nucleotides.

A third aspect of the invention relates to an oligonucleotide having a length of up to 35
10 nucleotides, and having the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof. In certain preferred embodiments the labeled oligonucleotide has a length of up to 22 nucleotides. Preferably, the oligonucleotide has at least 16 contiguous nucleotides contained within the sequence of SEQ ID NO:20 or the complement thereof. In one embodiment the oligonucleotide has the sequence of SEQ ID NO:20 or the complement thereof. In another
15 preferred embodiment, the oligonucleotide that includes the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof has a length of up to 18 nucleotides. For example, the oligonucleotide can have the sequence of any one of SEQ ID NO:22 or the complement thereof, SEQ ID NO:23 or the complement thereof, SEQ ID NO:24 or the complement thereof, SEQ ID NO:25 or the complement thereof, SEQ ID NO:26 or the complement thereof, and SEQ ID NO:27 or the
20 complement thereof. Certain labeled oligonucleotides have lengths of exactly 18 nucleotides. In other embodiments of the invention, wherein the oligonucleotide has a length of up to 22 nucleotides and includes the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof, the oligonucleotide can be DNA, but alternatively can include at least one nucleotide analog. Preferably, the nucleotide analog has a methoxy group at the 2' position of a ribose moiety. In
25 another preferred embodiment of the invention, the oligonucleotide that includes the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof, and that has a length of up to 18 nucleotides, also includes a detectable label. Examples of useful detectable labels include chemiluminescent labels and radiolabels. A particularly preferred example of a chemiluminescent label is an acridinium ester.

A fourth aspect of the invention relates to a method for detecting the presence of HIV-2
30 nucleic acids in a biological sample. A first step in the invented method involves providing to the biological sample a hybridization probe that is up to 35 nucleotides in length and that

WO 02/34951

PCT/US01/45396

includes the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof. Next, there is a step for hybridizing under a high stringency condition any HIV-2 nucleic acid that may be present in the biological sample with the hybridization probe to form a probe:target duplex. Finally, there is a step for detecting the probe:target duplex as an indicator of the presence of HIV-2 in the biological sample. In some embodiments of the invented method the length of the hybridization probe provided to the biological sample is only up to 22 nucleotides instead of up to 22 nucleotides. In another preferred embodiment of the invention, the biological sample is a blood product that is either plasma or serum. In a more preferred embodiment, prior to carrying out the "providing" step there is a step for releasing nucleic acid from any HIV-2 that may be present in the biological sample. In an even more highly preferred embodiment of the invention, after conducting the "releasing" step there is an additional step for capturing onto a solid support the nucleic acid released from any HIV-2 that may be present in the biological sample. In another embodiment of the invention, the biological sample used in the method is a lysate. Exemplary high stringency hybridization conditions that can be used for carrying out the invented method include: (1) 0.48 M sodium phosphate buffer, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 1 mM each of EDTA and EGTA; and (2) a salt concentration in the range of 0.6 - 0.9 M. In still another embodiment, the hybridization probe provided to biological sample in the first step of the invented method has a sequence that can be any one of of SEQ ID NO:22 or the complement thereof, SEQ ID NO:23 or the complement thereof, SEQ ID NO:24 or the complement thereof, SEQ ID NO:25 or the complement thereof, SEQ ID NO:26 or the complement thereof, and SEQ ID NO:27 or the complement thereof. In a highly preferred embodiment of the invented method, the hybridization probe includes at least one nucleotide analog. In a more highly preferred embodiment, the hybridization probe also includes a detectable label. For example, the detectable label can be an acridinium ester, and the detecting step can include performing luminometry to detect any of the probe:target duplex that formed during the hybridizing step.

A fifth aspect of the invention relates to a kit for detecting HIV-2 nucleic acids. In general, kits in accordance with the present invention may include any of the above-described compositions in packaged combination. A particular embodiment of the invented kit includes a first amplification oligonucleotide and a second amplification oligonucleotide. The first amplification oligonucleotide includes a sequence of 9-34 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9, and has a length of up to 100 nucleotides. The second

WO 02/34951

PCT/US01/45396

amplification oligonucleotide includes a sequence of 19-40 contiguous bases from the sequence of SEQ ID NO:1, and has a length of up to 100 nucleotides. Preferably the kit also includes an oligonucleotide detection probe that may be employed for detecting HIV-2 amplicons that were synthesized using the first and second amplification oligonucleotides. The detection probe
5 preferably includes the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof, and a detectable label. The detection probe may have a length of up to 35 nucleotides. The invented kits may further contain capture oligonucleotides that may be used for purifying HIV-2 template nucleic acids away from other species prior to conducting an amplification. Examples of capture oligonucleotides that may be packaged into kits have the sequences of SEQ ID NO:31 and SEQ
10 ID NO:32.

A sixth aspect of the invention relates to a composition that includes a first oligonucleotide which includes a sequence of 9-34 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9, and which has a length of up to 100 nucleotides. More preferably, the length of the first oligonucleotide is 18-60 nucleotides. Still more preferably, the length of the first oligonucleotide is 18-34 nucleotides. Yet even more preferably, the length of the first
15 oligonucleotide is 18-25 nucleotides. In certain preferred embodiments wherein the length of the first oligonucleotide is in the range of 18-34 nucleotides, the sequence of the first oligonucleotide can include 18-34 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9. When this is the case, the sequence of the first oligonucleotide can, in certain highly preferred embodiments of the invention, be any one of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ
20 ID NO:12, SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:14. In other preferred embodiments of the invention, when the first oligonucleotide has a length of up to 100 nucleotides, or a length of 18-60 nucleotides, the sequence of the first oligonucleotide can further include a promoter. In such an instance, the first oligonucleotide may function as a promoter-primer. For example,
25 under this circumstance the sequence of the first oligonucleotide may be any one of SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 and SEQ ID NO:19. In accordance with a different embodiment of the invention, when the first oligonucleotide has a length of up to 100 nucleotides, or a length of 18-60 nucleotides, and a sequence that includes 9-34 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9, there can be further included
30 a second oligonucleotide. This second oligonucleotide may have a length of up to 35 nucleotides, or more preferably up to 22 nucleotides, and a sequence that includes SEQ ID NO:21. In a particular example, the sequence of the second oligonucleotide may include at

WO 02/34951

PCT/US01/45396

least 16 contiguous nucleotides contained within the sequence of SEQ ID NO:20. When this is the case, it is highly preferred for the length of the second oligonucleotide to be in the range of 16-18 nucleotides. In some instances, it is desirable for the second oligonucleotide to further include a detectable label. In accordance with still a different embodiment of the invention, when the composition includes a first oligonucleotide having a length of up to 100 nucleotides and a sequence that includes 9-34 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9, and further includes a second oligonucleotide having a length of up to 22 nucleotides and a sequence that includes SEQ ID NO:21, there is further included a third oligonucleotide having a length of up to 100 nucleotides and a sequence that includes 19-40 contiguous bases from the sequence of SEQ ID NO:1. In a highly preferred version of this embodiment, the length of the third oligonucleotide is 19-40 nucleotides, or even more preferably 19-21 nucleotides. Particular examples of sequences of the third oligonucleotide in accordance with such embodiments of the invention include any one of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7.

15 Definitions

The following terms have the following meanings for the purposes of this disclosure, unless expressly stated to the contrary herein.

As used herein, a "biological sample" is any tissue or polynucleotide-containing material obtained from a human. Biological samples in accordance with the invention include peripheral blood, plasma, serum, bone marrow, biopsy tissue including lymph nodes, respiratory tissue or exudates, gastrointestinal tissue, cervical swab samples, semen or other body fluids, tissues or materials. A biological sample may be treated to disrupt tissue or cell structure, thereby releasing intracellular components into a solution which may contain enzymes, buffers, salts, detergents and the like.

As used herein, "polynucleotide" means either RNA or DNA, along with any synthetic nucleotide analogs or other molecules that may be present in the sequence and that do not prevent hybridization of the polynucleotide with a second molecule having a complementary sequence. The term includes polymers containing analogs of naturally occurring nucleotides and particularly includes analogs having a methoxy group at the 2' position of the ribose (OMe). As used herein, methoxy polynucleotides or oligonucleotides containing "T" residues have a methoxy group at the 2' position of the ribose moiety, and a uracil at the base position of the nucleotide. When particularly specified as "OMeT" it is meant that the base position of

WO 02/34951

PCT/US01/45396

the nucleotide is occupied by a thymine residue.

As used herein, a "detectable label" is a chemical species that can be detected or can lead to a detectable response. Detectable labels in accordance with the invention can be linked to polynucleotide probes either directly or indirectly, and include radioisotopes, enzymes, haptens, chromophores such as dyes or particles that impart a detectable color (e.g., latex beads or metal particles), luminescent compounds (e.g., bioluminescent, phosphorescent or chemiluminescent moieties) and fluorescent compounds.

A "homogeneous detectable label" refers to a label that can be detected in a homogeneous fashion by determining whether the label is on a probe hybridized to a target sequence. That is, homogeneous detectable labels can be detected without physically removing hybridized from unhybridized forms of the label or labeled probe. These labels have been described in detail by Arnold et al., U.S. Patent No. 5,283,174; Woodhead et al., U.S. Patent No. 5,656,207; and Nelson et al., U.S. Patent No. 5,658,737. Preferred labels for use in homogenous assays include chemiluminescent compounds (e.g., see Woodhead et al., U.S. Patent No. 5,656,207; Nelson et al., U.S. Patent No. 5,658,737; and Arnold, Jr., et al., U.S. Patent No. 5,639,604). Preferred chemiluminescent labels are acridinium ester ("AE") compounds, such as standard AE or derivatives thereof (e.g., naphthyl-AE, ortho-AE, 1- or 3-methyl-AE, 2,7-dimethyl-AE, 4,5-dimethyl-AE, ortho-dibromo-AE, ortho-dimethyl-AE, meta-dimethyl-AE, ortho-methoxy-AE, ortho-methoxy(cinnamyl)-AE, ortho-methyl-AE, ortho-fluoro-AE, 1- or 3-methyl-ortho-fluoro-AE, 1- or 3-methyl-meta-difluoro-AE, and 2-methyl-AE). Synthesis and methods of attaching labels to nucleic acids and detecting labels are well known in the art (e.g., see Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Chapter 10; Nelson et al., U.S. Patent No. 5,658,737; Woodhead et al., U.S. Patent No. 5,656,207; Hogan et al., U.S. Patent No. 5,547,842; Arnold et al., U.S. Patent No. 5,283,174; Kourilsky et al., U.S. Patent No. 4,581,333; and Becker et al., European Patent App. No. 0 747 706).

As used herein, "amplification" refers to an *in vitro* procedure for obtaining multiple copies of a target nucleic acid sequence, its complement or fragments thereof.

By "target nucleic acid" or "target" is meant a nucleic acid containing a target nucleic acid sequence.

By "target nucleic acid sequence," "target nucleotide sequence," "target sequence" or "target region" is meant a specific deoxyribonucleotide or ribonucleotide sequence comprising

WO 02/34951

PCT/US01/45396

all or part of the nucleotide sequence of a single-stranded nucleic acid molecule, and the deoxyribonucleotide or ribonucleotide sequence complementary thereto.

By "transcription associated amplification" is meant any type of nucleic acid amplification that uses an RNA polymerase to produce multiple RNA transcripts from a nucleic acid template. One example of a transcription associated amplification method, called "Transcription Mediated Amplification" (TMA), generally employs an RNA polymerase, a DNA polymerase, deoxyribonucleoside triphosphates, ribonucleoside triphosphates, and a promoter-template complementary oligonucleotide, and optionally may include one or more analogous oligonucleotides. Variations of TMA are well known in the art as disclosed in detail in Burg et al., U.S. Patent No. 5,437,990; Kacian et al., U.S. Patent Nos. 5,399,491 and 5,554,516; Kacian et al., PCT No. WO 93/22461; Gingeras et al., PCT No. WO 88/01302; Gingeras et al., PCT No. WO 88/10315; Malek et al., U.S. Patent No. 5,130,238; Urdea et al., U.S. Patent Nos. 4,868,105 and 5,124,246; McDonough et al., PCT No. WO 94/03472; and Ryder et al., PCT No. WO 95/03430. The methods of Kacian et al. are preferred for conducting nucleic acid amplification procedures of the type disclosed herein.

As used herein, a "probe" is a nucleic acid oligonucleotide that hybridizes specifically to a target sequence in a nucleic acid, preferably in an amplified nucleic acid, under conditions that promote hybridization, to form a detectable hybrid. A probe may contain a detectable moiety which either may be attached to the end(s) of the probe or may be internal. The nucleotides of the probe which combine with the target polynucleotide need not be strictly contiguous, as may be the case with a detectable moiety internal to the sequence of the probe. Detection may either be direct (i.e., resulting from a probe hybridizing directly to the target sequence or amplified nucleic acid) or indirect (i.e., resulting from a probe hybridizing to an intermediate molecular structure that links the probe to the target sequence or amplified nucleic acid). The "target" of a probe generally refers to a sequence contained within an amplified nucleic acid sequence which hybridizes specifically to at least a portion of a probe oligonucleotide using standard hydrogen bonding (i.e., base pairing). A probe may comprise target-specific sequences and other sequences that contribute to three-dimensional conformation of the probe (e.g., as described in Lizardi et al., U.S. Patent Nos. 5,118,801 and 5,312,728). Sequences that are "sufficiently complementary" allow stable hybridization of a probe oligonucleotide to a target sequence that is not completely complementary to the probe's target-specific sequence.

WO 02/34951

PCT/US01/45396

As used herein, an "oligonucleotide" or "oligomer" is a polymeric chain of at least two, generally between about five and about 100, chemical subunits, each subunit comprising a nucleotide base moiety, a sugar moiety, and a linking moiety that joins the subunits in a linear spacial configuration. Common nucleotide base moieties are guanine (G), adenine (A), cytosine (C), thymine (T) and uracil (U), although other rare or modified nucleotide bases able to hydrogen bond are well known to those skilled in the art. Preferred oligonucleotides of the present invention fall in a size range having a lower limit of about 10 to about 60 residues. Oligonucleotides may be purified from naturally occurring sources, but preferably are synthesized using any of a variety of well known enzymatic or chemical methods.

As used herein, an "amplification primer" or "amplification oligonucleotide" is an oligonucleotide that hybridizes to a target nucleic acid, or its complement, and participates in a nucleic acid amplification reaction. Amplification primers, or more simply "primers," may be an optionally modified oligonucleotide which is capable of hybridizing to a template nucleic acid and which has a 3' end that can be extended by a DNA polymerase activity.

By "substantially homologous," "substantially corresponding" or "substantially corresponds" is meant that the subject oligonucleotide has a base sequence containing an at least 10 contiguous base region that is at least 70% homologous, preferably at least 80% homologous, more preferably at least 90% homologous, and most preferably 100% homologous to an at least 10 contiguous base region present in a reference base sequence (excluding RNA and DNA equivalents). Those skilled in the art will readily appreciate modifications that could be made to the hybridization assay conditions at various percentages of homology to permit hybridization of the oligonucleotide to the target sequence while preventing unacceptable levels of non-specific hybridization. The degree of similarity is determined by comparing the order of nucleobases making up the two sequences and does not take into consideration other structural differences which may exist between the two sequences, provided the structural differences do not prevent hydrogen bonding with complementary bases. The degree of homology between two sequences can also be expressed in terms of the number of base mismatches present in each set of at least 10 contiguous bases being compared, which may range from 0 to 2 base differences.

By "substantially complementary" is meant that the subject oligonucleotide has a base sequence containing an at least 10 contiguous base region that is at least 70% complementary, preferably at least 80% complementary, more preferably at least 90% complementary, and most

WO 02/34951

PCT/US01/45396

preferably 100% complementary to an at least 10 contiguous base region present in a target nucleic acid sequence (excluding RNA and DNA equivalents). (Those skilled in the art will readily appreciate modifications that could be made to the hybridization assay conditions at various percentages of complementarity to permit hybridization of the oligonucleotide to the target sequence while preventing unacceptable levels of non-specific hybridization.) The degree of complementarity is determined by comparing the order of nucleobases making up the two sequences and does not take into consideration other structural differences which may exist between the two sequences, provided the structural differences do not prevent hydrogen bonding with complementary bases. The degree of complementarity between two sequences can also be expressed in terms of the number of base mismatches present in each set of at least 10 contiguous bases being compared, which may range from 0 to 2 base mismatches.

By "sufficiently complementary" is meant a contiguous nucleic acid base sequence that is capable of hybridizing to another base sequence by hydrogen bonding between a series of complementary bases. Complementary base sequences may be complementary at each position in the base sequence of an oligonucleotide using standard base pairing (e.g., G:C, A:T or A:U pairing) or may contain one or more residues that are not complementary using standard hydrogen bonding (including abasic "nucleotides"), but in which the entire complementary base sequence is capable of specifically hybridizing with another base sequence in appropriate hybridization conditions. Contiguous bases are preferably at least about 80%, more preferably at least about 90%, and most preferably about 100% complementary to a sequence to which an oligonucleotide is intended to specifically hybridize. Appropriate hybridization conditions are well known to those skilled in the art, can be predicted readily based on base sequence composition, or can be determined empirically by using routine testing (e.g., See Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) at §§ 1.90-1.91, 7.37-7.57, 9.47-9.51 and 11.47-11.57 particularly at §§ 9.50-9.51, 11.12-11.13, 11.45-11.47 and 11.55-11.57).

By "capture oligonucleotide" is meant at least one nucleic acid oligonucleotide that provides means for specifically joining a target sequence and an immobilized oligonucleotide due to base pair hybridization. A capture oligonucleotide preferably includes two binding regions: a target sequence-binding region and an immobilized probe-binding region, usually contiguous on the same oligonucleotide, although the capture oligonucleotide may include a target sequence-binding region and an immobilized probe-binding region which are present on

WO 02/34951

PCT/US01/45396

two different oligonucleotides joined together by one or more linkers. For example, an immobilized probe-binding region may be present on a first oligonucleotide, the target sequence-binding region may be present on a second oligonucleotide, and the two different oligonucleotides are joined by hydrogen bonding with a linker that is a third oligonucleotide containing sequences that hybridize specifically to the sequences of the first and second oligonucleotides.

By "immobilized probe" or "immobilized nucleic acid" is meant a nucleic acid that joins, directly or indirectly, a capture oligonucleotide to an immobilized support. An immobilized probe is an oligonucleotide joined to a solid support that facilitates separation of bound target sequence from unbound material in a sample.

By "separating" or "purifying" is meant that one or more components of the biological sample are removed from one or more other components of the sample. Sample components include nucleic acids in a generally aqueous solution phase which may also include materials such as proteins, carbohydrates, lipids and labeled probes. Preferably, the separating or purifying step removes at least about 70%, more preferably at least about 90% and, even more preferably, at least about 95% of the other components present in the sample.

By "RNA and DNA equivalents" is meant RNA and DNA molecules having the same complementary base pair hybridization properties. RNA and DNA equivalents have different sugar moieties (i.e., ribose versus deoxyribose) and may differ by the presence of uracil in RNA and thymine in DNA. The differences between RNA and DNA equivalents do not contribute to differences in homology because the equivalents have the same degree of complementarity to a particular sequence.

By "consisting essentially of" is meant that additional component(s), composition(s) or method step(s) that do not materially change the basic and novel characteristics of the present invention may be included in the compositions or kits or methods of the present invention. Such characteristics include the ability to selectively detect HIV-2 nucleic acids in biological samples such as whole blood or plasma, at a copy number of about 100 copies of the HIV-2 nucleic acid. Any component(s), composition(s), or method step(s) that have a material effect on the basic and novel characteristics of the present invention would fall outside of this term.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 is a schematic diagram illustrating the various polynucleotides that can be used for detecting a target region within the HIV-2 nucleic acid (represented by a thick horizontal

WO 02/34951

PCT/US01/45396

line). Positions of the following nucleic acids are shown relative to the target region: "Capture Oligonucleotide" refers to the nucleic acid used to hybridize to and capture the target nucleic acid prior to amplification, where "T" refers to a tail sequence used to hybridize an immobilized oligonucleotide having a complementary sequence (not shown); "Non-T7 Primer" and "T7 Promoter-Primer" represent two amplification primers used for conducting TMA, where "P" indicates the promoter sequence of the T7 promoter-primer; and "Probe" refers to the probe used for detecting amplified nucleic acid.

Detailed Description of the Invention

The present invention relates to compositions and methods for selectively detecting the nucleic acids of HIV-2. The compositions disclosed herein are useful for amplifying and detecting these nucleic acids in biological samples such as human blood, serum, plasma or other body fluid or tissue to be tested for the presence of viral nucleic acids. The amplification primers disclosed herein advantageously can be used as components of multiplex amplification reactions, wherein several amplicon species can be produced from a complex assortment of primers and accessory polynucleotides. For example, the primers disclosed herein can be used in multiplex amplification reactions that synthesize amplicons corresponding to polynucleotides of unrelated viruses.

The probes, primers and methods disclosed herein can be used either in diagnostic applications or for screening donated blood and blood products or other tissues that may contain infectious particles.

Introduction and Overview

Those having an ordinary level of skill in the art will appreciate that nucleic acid testing represents a convenient and highly sensitive method for detecting virus-specific polynucleotides in biological samples, such as donated blood or plasma. Since individuals newly infected with HIV-1 typically produce detectable levels of antibodies reactive with viral antigens 1-2 months after infection, serologic testing during the first month following exposure to the virus could give a false-negative result and allow samples contaminated with HIV-1 to enter the blood supply with devastating consequences. In the same way that early detection of HIV-1 exposure can help ensure safety of the donated blood supply, early detection of HIV-2 exposure could provide the same benefits. Accordingly, the most sensitive testing procedures for detecting HIV-2 will rely on detection of virus-specific nucleic acids as distinguished from a host's immune response to infection.

WO 02/34951

PCT/US01/45396

The present invention includes compositions (nucleic acid capture oligonucleotides, amplification oligonucleotides and probes) and methods for detecting HIV-2 nucleic acids in a biological sample. To design oligonucleotide sequences appropriate for such uses, known HIV-2 DNA sequences, including subtypes, were first aligned by matching regions having similar sequences and then comparing the sequences to identify candidate regions of the HIV-2 viral genome that could serve as reagents in a diagnostic assay. Based on these comparisons, the LTR region of the HIV-2 genome was selected for detection using the capture oligonucleotides, primers and probes shown schematically in Figure 1. Portions of sequences containing relatively few sequence variants between the compared sequences were chosen as starting points for designing synthetic oligonucleotides suitable for use in capture, amplification and detection of amplified sequences. Other considerations in designing oligonucleotides included the relative GC content of the sequence (ranging from about 30% to about 55%), and the relative absence of predicted secondary structure (e.g., hairpin turns forming intramolecular hybrids) within a sequence.

Based on these analyses, the capture oligonucleotide, amplification oligonucleotides and probe sequences presented below were designed. Those having an ordinary level of skill in the art will appreciate that primer sequences specific for HIV-2, with or without the T7 promoter sequence, may be used as primers in the various primer-based *in vitro* amplification methods described below. Additionally, it is also contemplated that the hybridization probes disclosed herein could be used as amplification primers, and that the amplification primers disclosed herein could be used as hybridization probes. The amplification and detection assay detailed below is useful for detecting at least subtypes A, B, C and D of HIV-2. Notably, the portion of the HIV-2 genome that serves as a target for the probes disclosed herein does not find a corresponding sequence in the HIV-1 genome. Thus, the probes are specific for HIV-2 and not HIV-1.

Useful Amplification Methods

Amplification methods useful in connection with the present invention include: Transcription Mediated Amplification (TMA), the Polymerase Chain Reaction (PCR), Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA), Strand Displacement Amplification (SDA), and amplification methods using self-replicating polynucleotide molecules and replication enzymes like MDV-1 RNA and Q-beta enzyme. Methods for carrying out these various amplification techniques respectively can be found in U.S. Patent No. 5,399,491; U.S. Patent

WO 02/34951

PCT/US01/45396

No. 4,965,188; published European patent application EP 0 525 882, U.S. Patent No. 5,455,166, U.S. Patent No. 5,472,840 and Lizardi et al., *BioTechnology* 6:1197 (1988). U.S. Patent No. 5,554,516 describes a method of amplifying a target RNA sequence using a single promoter-primer in the absence of a primer that forms a hybrid with the complement of the target RNA sequence. The disclosures of these documents which describe how to perform nucleic acid amplification reactions are hereby incorporated by reference.

In a highly preferred embodiment of the invention, HIV-2 nucleic acid sequences are amplified using a TMA protocol. According to this protocol, the reverse transcriptase which provides the DNA polymerase activity also possesses an endogenous RNase H activity. One of the primers used in this procedure contains a promoter sequence positioned upstream of a sequence that is complementary to one strand of a target nucleic acid that is to be amplified. In the first step of the amplification, a promoter-primer hybridizes to the HIV-2 target RNA at a defined site. Reverse transcriptase creates a DNA copy of the target RNA by extension from the 3' end of the promoter-primer. The RNA strand in the resulting RNA:DNA duplex is degraded by an RNase H activity which optionally may be an inherent activity of the reverse transcriptase. A second primer then binds to the DNA strand. A second strand of DNA is synthesized from the end of the primer by reverse transcriptase, thereby creating a double-stranded DNA molecule. RNA polymerase recognizes the promoter sequence in this double-stranded DNA template and initiates transcription. Each of the newly synthesized RNA amplicons re-enters the TMA process and serves as a template for a new round of replication, thereby leading to an exponential expansion of the RNA amplicon. Since each of the DNA templates can make 100-1000 copies of RNA amplicon, this expansion can result in the production of 10 billion amplicons in less than one hour. The entire process is autocatalytic and is performed at a constant temperature.

Methods of detecting HIV-2 amplicons may be as simple as staining a electrophoretically separated nucleic acid amplification products produced using a pair of oligonucleotide primers. As detailed below, preferred detection methods employ HIV-2 specific hybridization probes.

Structural Features of Primers

As indicated above, a "primer" refers to an optionally modified oligonucleotide which is capable of hybridizing to a template nucleic acid and which has a 3' end that can be extended by a DNA polymerase activity. The 5' region of the primer may be non-complementary to the

WO 02/34951

PCT/US01/45396

target nucleic acid. If the 5' non-complementary region includes a promoter sequence, it is referred to as a "promoter-primer." Those skilled in the art will appreciate that any oligonucleotide that can function as a primer (i.e., an oligonucleotide that hybridizes specifically to a target sequence and has a 3' end capable of extension by a DNA polymerase activity) can be modified to include a 5' promoter sequence, and thus could function as a promoter-primer. Similarly, any promoter-primer can be modified by removal of, or synthesis without, a promoter sequence and still function as a primer.

Nucleotide base moieties of primers may be modified, e.g., by the addition of propyne groups, so long as the modified base moiety retains the ability to form a non-covalent association with G, A, C, T or U and an oligonucleotide comprising at least one modified nucleotide base moiety is not sterically prevented from hybridizing with a single-stranded nucleic acid. Common sugar moieties that comprise the primer backbone include ribose and deoxyribose, although 2'-O-methyl ribose (OMe), halogenated sugars, and other modified also may be used. Usually, the linking group of the primer backbone is a phosphorus-containing moiety, most commonly a phosphodiester linkage, although other linkages, such as, for example, phosphorothioates, methylphosphonates, and non-phosphorus-containing linkages such as peptide-like linkages found in "peptide nucleic acids" (PNA) also are intended for use in the assay disclosed herein.

Useful Probe Labeling Systems and Detectable Moieties

Essentially any labeling and detection system that can be used for monitoring specific nucleic acid hybridization can be used in conjunction with the present invention. Included among the collection of useful labels are radiolabels, enzymes, haptens, linked oligonucleotides, chemiluminescent molecules and redox-active moieties that are amenable to electronic detection methods. Preferred chemiluminescent molecules include acridinium esters of the type disclosed by Arnold et al., in U.S. Patent No. 5,283,174 for use in connection with homogenous protection assays, and of the type disclosed by Woodhead et al., in U.S. Patent No. 5,656,207 for use in connection with assays that quantify multiple targets in a single reaction. The disclosures contained in these patent documents are hereby incorporated by reference. Preferred electronic labeling and detection approaches are disclosed in U.S. Patent Nos. 5,591,578 and 5,770,369, and the published international patent application WO 98/57158, the disclosures of which are hereby incorporated by reference. Redox active moieties useful as labels in the present invention include transition metals such as Cd, Mg, Cu,

WO 02/34951

PCT/US01/45396

Co, Pd, Zn, Fe and Ru.

Particularly preferred detectable labels for probes in accordance with the present invention are detectable in homogeneous assay systems (i.e., where, in a mixture, bound labeled probe exhibits a detectable change, such as stability or differential degradation, compared to unbound labeled probe). A preferred label for use in homogenous assays is a chemiluminescent compound (e.g., as described by Woodhead et al., in U.S. Patent No. 5,656,207; by Nelson et al., in U.S. Patent No. 5,658,737; or by Arnold et al., in U.S. Patent No. 5,639,604). Particularly preferred chemiluminescent labels include acridinium ester ("AE") compounds, such as standard AE or derivatives thereof, such as naphthyl-AE, ortho-AE, 1- or 3-methyl-AE, 2,7-dimethyl-AE, 4,5-dimethyl-AE, ortho-dibromo-AE, ortho-dimethyl-AE, meta-dimethyl-AE, ortho-methoxy-AE, ortho-methoxy(cinnamyl)-AE, ortho-methyl-AE, ortho-fluoro-AE, 1- or 3-methyl-ortho-fluoro-AE, 1- or 3-methyl-meta-difluoro-AE, and 2-methyl-AE.

In some applications, probes exhibiting at least some degree of self-complementarity are desirable to facilitate detection of probe:target duplexes in a test sample without first requiring the removal of unhybridized probe prior to detection. By way of example, structures referred to as "Molecular Torches" are designed to include distinct regions of self-complementarity (coined "the target binding domain" and "the target closing domain") which are connected by a joining region and which hybridize to one another under predetermined hybridization assay conditions. When exposed to denaturing conditions, the two complementary regions (which may be fully or partially complementary) of the Molecular Torch melt, leaving the target binding domain available for hybridization to a target sequence when the predetermined hybridization assay conditions are restored. Molecular Torches are designed so that the target binding domain favors hybridization to the target sequence over the target closing domain. The target binding domain and the target closing domain of a Molecular Torch include interacting labels (e.g., luminescent/quencher) positioned so that a different signal is produced when the Molecular Torch is self-hybridized as opposed to when the Molecular Torch is hybridized to a target nucleic acid, thereby permitting detection of probe:target duplexes in a test sample in the presence of unhybridized probe having a viable label associated therewith. Molecular Torches are fully described in International Publication No. WO 00/01850, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

Another example of a self-complementary hybridization assay probe is a structure

WO 02/34951

PCT/US01/45396

commonly referred to as a "Molecular Beacon." Molecular Beacons comprise nucleic acid molecules having a target complement sequence, an affinity pair (or nucleic acid arms) holding the probe in a closed conformation in the absence of a target nucleic acid sequence, and a label pair that interacts when the probe is in a closed conformation. Hybridization of the target nucleic acid and the target complement sequence separates the members of the affinity pair, thereby shifting the probe to an open confirmation. The shift to the open confirmation is detectable due to reduced interaction of the label pair, which may be, for example, a fluorophore and a quencher (e.g., DABCYL and EDANS). Molecular Beacons are fully described in U.S. Patent No. 5,925,517, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

Synthetic techniques and methods of bonding labels to nucleic acids and detecting labels are well known in the art (e.g., see Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Chapter 10; Nelson et al., U.S. Patent No. 5,658,737; Woodhead et al., U.S. Patent No. 5,656,207; Hogan et al., U.S. Patent No. 5,547,842; Arnold et al., U.S. Patent No. 5,283,174; and Kourilsky et al., U.S. Patent No. 4,581,333).

Chemical Composition of Probes

Probes in accordance with the invention comprise polynucleotides or polynucleotide analogs and may carry a detectable label covalently bonded thereto. Nucleosides or nucleoside analogs of the probe comprise nitrogenous heterocyclic bases, or base analogs, where the nucleosides are linked together, for example by phosphodiester bonds to form a polynucleotide. Accordingly, a probe may comprise conventional ribonucleic acid (RNA) and deoxyribonucleic acid (DNA), but also may comprise chemical analogs of these molecules. The "backbone" of a probe may be made up of a variety of linkages known in the art, including one or more sugar-phosphodiester linkages, peptide-nucleic acid bonds (sometimes referred to as "peptide nucleic acids" as described by Hyldig-Nielsen et al., PCT Int'l Pub. No. WO 95/32305), phosphorothioate linkages, methylphosphonate linkages or combinations thereof. Sugar moieties of the probe may be either ribose or deoxyribose, or similar compounds having known substitutions, such as, for example, 2' methoxy substitutions (OMe) and 2' halide substitutions (e.g., 2'-F). The nitrogenous bases may be conventional bases (A, G, C, T, U), known analogs thereof (e.g., inosine or "I"; see The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, Adams et al., ed., 11th ed., 1992), known derivatives of purine or pyrimidine bases (e.g., N⁴-methyl

WO 02/34951

PCT/US01/45396

deoxyguanosine, deaza- or aza-purines and deaza- or aza-pyrimidines, pyrimidine bases having substituent groups at the 5 or 6 position, purine bases having an altered or a replacement substituent at the 2, 6 or 8 positions, 2-amino-6-methylaminopurine, O⁶-methylguanine, 4-thio-pyrimidines, 4-amino-pyrimidines, 4-dimethylhydrazine-pyrimidines, and O⁴-alkyl-pyrimidines (see, Cook, PCT Int'l Pub. No. WO 93/13121) and "abasic" residues where the backbone includes no nitrogenous base for one or more residues of the polymer (see Arnold et al., U.S. Patent No. 5,585,481). A nucleic acid may comprise only conventional sugars, bases and linkages found in RNA and DNA, or may include both conventional components and substitutions (e.g., conventional bases linked via a methoxy backbone, or a nucleic acid including conventional bases and one or more base analogs).

10 Selection of Amplification Primers and Detection Probes Specific for HIV-2

Useful guidelines for designing amplification primers and probes with desired characteristics are described herein. The optimal sites for amplifying and probing HIV-2 nucleic acids contain two, and preferably three, conserved regions greater than about 15 bases in length, within about 350 bases, and preferably within 150 bases, of contiguous sequence. The degree of amplification observed with a set of primers or promotor-primers depends on several factors, including the ability of the oligonucleotides to hybridize to their complementary sequences and their ability to be extended enzymatically. Because the extent and specificity of hybridization reactions are affected by a number of factors, manipulation of those factors will determine the exact sensitivity and specificity of a particular oligonucleotide, whether perfectly complementary to its target or not. The effects of varying assay conditions are known to those skilled in the art, and are described by Hogan et al., in U.S. Patent No. 5,840,488, the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

The length of the target nucleic acid sequence and, accordingly, the length of the primer sequence or probe sequence can be important. In some cases, there may be several sequences from a particular target region, varying in location and length, which will yield primers or probes having the desired hybridization characteristics. While it is possible for nucleic acids that are not perfectly complementary to hybridize, the longest stretch of perfectly homologous base sequence will normally primarily determine hybrid stability.

30 Amplification primers and probes should be positioned to minimize the stability of the oligonucleotide:nontarget (i.e., nucleic acid with similar sequence to target nucleic acid) nucleic acid hybrid. It is preferred that the amplification primers and detection probes are able

WO 02/34951

PCT/US01/45396

to distinguish between target and non-target sequences. In designing primers and probes, the differences in these T_m values should be as large as possible (e.g., at least 2°C and preferably 5°C).

5 Regions of the nucleic acid which are known to form strong internal structures inhibitory to hybridization are less preferred as primers or probes. Examples of such structures include hairpin loops. Likewise, oligonucleotides with extensive self-complementarity should be avoided.

10 The degree of non-specific extension (primer-dimer or non-target copying) can also affect amplification efficiency. For this reason, primers are selected to have low self- or cross-complementarity, particularly at the 3' ends of the sequence. Long homopolymer tracts and high GC content are avoided to reduce spurious primer extension. Commercially available computer software is available to aid in this aspect of the design. Available computer programs include MacDNASIS™ 2.0 (Hitachi Software Engineering American Ltd.) and OLIGO® ver. 4.1 (National Bioscience).

15 Those having an ordinary level of skill in the art will appreciate that hybridization involves the association of two single strands of complementary nucleic acid to form a hydrogen bonded double strand. It is implicit that if one of the two strands is wholly or partially involved in a hybrid that it will be less able to participate in formation of a new hybrid. By designing primers and probes so that substantial portions of the sequences of interest are single
20 stranded, the rate and extent of hybridization may be greatly increased. If the target is an integrated genomic sequence, then it will naturally occur in a double stranded form (as is the case with the product of the polymerase chain reaction). These double-stranded targets are naturally inhibitory to hybridization with a probe and require denaturation prior to the hybridization step.

25 Rate of polynucleotide hybridization can be measured by determining the $C_{0.5}$. The rate at which a polynucleotide hybridizes to its target is a measure of the thermal stability of the target secondary structure in the target binding region. The standard measurement of hybridization rate is the $C_{0.5}$ which is measured as moles of nucleotide per liter multiplied by seconds. Thus, it is the concentration of probe multiplied by the time at which 50% of maximal
30 hybridization occurs at that concentration. This value is determined by hybridizing various amounts of polynucleotide to a constant amount of target for a fixed time. The $C_{0.5}$ is found graphically by standard procedures familiar to those having an ordinary level of skill in the art.

WO 02/34951

PCT/US01/45396

Preferred Amplification Primers

Primers useful for conducting amplification reactions can have different lengths. For example, amplification oligonucleotides complementary to one strand of the HIV-2 target nucleic acid sequence preferably have lengths of up to 100 bases, more preferably from 18 to 60 bases, still more preferably from 18 to 34, or still more preferably from 18 to 25 bases and include at least 9 and up to 34 contiguous bases substantially complementary to the sequence given by AAAATCCCTAGCAGGTTGGCGCCCGAACAGGGAC (SEQ ID NO:8). Stated in different terms, but identifying the same oligonucleotides, these primers include at least 9 and up to 34 contiguous bases contained in a sequence substantially corresponding to

5
10
15
20
25
30

GTCCTGTTTCGGGCGCCAACCTGCTAGGGATTTT (SEQ ID NO:9). Although it is not believed essential for operability of the invention, all of the primers listed in Table 2 share the common core sequence CGGGCGCCA (SEQ ID NO:34). Our finding that mismatches are tolerated between the sequence of SEQ ID NO:9 and the primer sequence located downstream (3') of the sequence of SEQ ID NO:34 shows the general utility of primers having a subset of the sequence of SEQ ID NO:9. In other words, primer sequences which are derived from SEQ ID NO:9 and which hybridize to a target having the sequence of SEQ ID NO:8 under amplification conditions such as those employed herein can be used in the amplification procedures described herein. In general, primers having 9-34 contiguous bases of SEQ ID NO:9 are highly preferred for use as promoter-primers, such as T7 promoter-primers. Of course, if the primer is a T7 promoter-primer there will be included at the 5' end of the primer a T7 promoter sequence which typically adds about 27-33 bases to the length of the primer. Examples of preferred amplification primers in accordance with this aspect of the invention include oligonucleotides having the sequences given by SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:14. One of the oligonucleotide sequences disclosed herein (SEQ ID NO:12) had one nucleotide mismatch and two nucleotide deletions compared with the segment of SEQ ID NO:9 that was present in the primer. Another of the oligonucleotide sequences (SEQ ID NO:13) had a single nucleotide deletion compared with the portion of SEQ ID NO:9 that was present in the oligonucleotide. These sequences also can be found in the T7 promoter-primers having the sequences of SEQ ID NO:17 and 18, respectively. Without taking account of the deletions, these primers respectively had a total of 7 and 5 base mismatches compared with the portions of SEQ ID NO:9 that were present in the oligonucleotides. The T7 promoter-primers disclosed herein are particularly useful for

WO 02/34951

PCT/US01/45396

performing nucleic acid amplification reactions using the methods described by Kacian et al., in U.S. Patent Nos. 5,399,491 and 5,554,516. The disclosures of these patent documents are incorporated herein by reference. Primers optionally may include modified nucleotides or nucleotide analogs. Preferably, detection of amplicons synthesized using these primers is
5 accomplished using the oligonucleotide detection probes disclosed herein.

Other amplification primers, that can be used in any combination with the above-described primers for carrying out amplification reactions, are complementary to the opposite strand of the HIV-2 target nucleic acid sequence. Amplification primers complementary to this opposite strand of the HIV-2 target nucleic acid sequence preferably have lengths of up to
10 100 bases, or more preferably 19 to 40 bases, or still more preferably 19 to 21 bases. These primers are particularly useful as non-promoter primers. As disclosed herein, these primers have at least 19 contiguous bases from a sequence substantially corresponding to
GTGTGTGTTCCCATCTCTCCTAGTCGCCGCTGGTCATTC (SEQ ID NO:1). Examples
15 of particular amplification primers fulfilling these conditions include oligonucleotides having the sequences given by SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7.

It should be understood that the above-specified variable lengths of the amplification primers and detection probes are intended to accommodate inclusion of extraneous sequences that may not participate in target binding, and that may not substantially affect amplification or
20 detection procedures. For example, promoter-primers useful for performing amplification reactions in accordance with the invention have at least a minimal sequence that hybridizes to the HIV-2 target nucleic acid, and a promoter sequence positioned upstream of that minimal sequence. However, insertion of sequences between the target binding sequence and the
25 promoter sequence could change the length of the primer without compromising its utility in the amplification reaction. Additionally, the lengths of the amplification primers and detection probes are matters of choice as long as the sequences of these oligonucleotides conform to the minimal essential requirements for hybridizing the desired complementary sequence. Probe sequences should include the 14-mer sequence of SEQ ID NO:21, or the complement thereof,
30 as a common core. This defines a probe-binding domain in the HIV-2 target sequence, or in amplicons synthesized by an amplification procedure. Amplification primers that hybridize downstream of the probe-binding domain should have sequences with at least 9 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9. Indeed, the results presented herein

WO 02/34951

PCT/US01/45396

indicate that the sequence of SEQ ID NO:12 which is complementary to HIV-2 nucleic acids (and which was present in the promoter-primer of SEQ ID NO:17) was sufficient to promote amplification even though this sequence had no more than 9 contiguous bases from SEQ ID NO:9. Finally, amplification primers that hybridize upstream of the probe-binding domain should have at least 19 contiguous bases from the sequence of SEQ ID NO:1.

The following two Tables present specific examples of oligonucleotide sequences that were used as primers for amplifying HIV-2 nucleic acids. Table 1 presents the sequences of non-T7 primers that were complementary to HIV-2 sequences on one strand of nucleic acid. Table 2 presents the sequences of both the HIV-2 target-complementary sequences and the full sequences for T7 promoter-primers that were used during development of the invention. Compared with the oligonucleotide sequences in Table 1, the oligonucleotide sequences in Table 2 are complementary to the opposite nucleic acid strand. As indicated above, all T7 promoter-primers included sequences complementary to an HIV-2 target at their 3' ends, and a T7 promoter sequence at their 5' ends.

Table 1
Polynucleotide Sequences of Amplification Primers

Sequence	Identifier
GTGTGTGTCCCATCTCTC	SEQ ID NO:2
TGTGTTCCCATCTCTCCTAG	SEQ ID NO:3
GTCCCATCTCTCCTAGTCGC	SEQ ID NO:4
TCCTAGTCGCCCGCTGGTCA	SEQ ID NO:5
CCTAGTCGCCCGCTGGTCA	SEQ ID NO:6
TAGTCGCCCGCTGGTCATTC	SEQ ID NO:7

Table 2 presents HIV-2 target-complementary oligonucleotide sequences (SEQ ID NOs:10-14) and the respectively corresponding T7 promoter-primer sequences (SEQ ID NOs:15-19).

WO 02/34951

PCT/US01/45396

Table 2
Polynucleotide Sequences of Amplification Primers

Sequence	Identifier
CGGGCGCCAACTGCTAGGGATTTT	SEQ ID NO:10 (HIV-2 complementary primer)
GTCCTGTTCGGGCGCCA	SEQ ID NO:11 (HIV-2 complementary primer)
CGGGCGCCACTGCTAGAGATTTT	SEQ ID NO:12 (HIV-2 complementary primer)
CGGGCGCCACTGCTAGGGATTTT	SEQ ID NO:13 (HIV-2 complementary primer)
CCCTGTTCGGGCGCCAACTGCTAG	SEQ ID NO:14 (HIV-2 complementary primer)
AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACGGGCG CCAACCTGCTAGGGATTTT	SEQ ID NO:15 (T7 promoter-primer)
AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCCCTG TTCGGGCGCCA	SEQ ID NO:16 (T7 promoter-primer)
AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACGGGCG CCTGCTAGAGATTTT	SEQ ID NO:17 (T7 promoter-primer)
GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACA CGGGCGCCACTGCTAGGGATTTT	SEQ ID NO:18 (T7 promoter-primer)
GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACA CCCTGTTCGGGCGCCAACTGCTAG	SEQ ID NO:19 (T7 promoter-primer)

Preferred sets of primers for amplifying the HIV-2 LTR region in a transcription-mediated amplification reaction include a first primer that hybridizes the HIV-2 LTR transcript (such as one of the primers listed in Table 2) and a second primer that is complementary to the sequence of an extension product of the first primer (such as one of the primer sequences listed in Table 1). In a highly preferred embodiment, the first primer is a promoter-primer that includes a T7 promoter sequence at its 5' end.

In certain preferred embodiments, a set of at least two amplification primers for amplifying HIV-2 nucleic acid is provided which includes: (i) a first amplification primer comprising an oligonucleotide having or substantially corresponding to the base sequence of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 or SEQ ID NO:14; and (ii) a second amplification primer comprising an oligonucleotide having or substantially corresponding to the base sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 or SEQ ID NO:7. In a particularly preferred combination, the first

WO 02/34951

PCT/US01/45396

amplification primer is a promoter-primer that comprises an oligonucleotide having or substantially corresponding to the base sequence of SEQ ID NO:10, and the second amplification primer comprises an oligonucleotide having or substantially corresponding to the base sequence of SEQ ID NO:6.

5 Preferred Detection Probes

One aspect of the invention relates to oligonucleotides that can be used as hybridization probes for detecting HIV-2 nucleic acids. Methods for amplifying a target nucleic acid sequence present in the nucleic acid of HIV-2 can include an additional step for detecting HIV-2 amplicons. This procedure for detecting HIV-2 nucleic acids (including HIV-2 amplicons) includes steps for: contacting a test sample with a hybridization assay probe which preferentially hybridizes to the target nucleic acid sequence, or the complement thereof, under stringent hybridization conditions, thereby forming a probe:target duplex that is stable for detection. Next there is a step for determining whether the hybrid is present in the test sample as an indication of the presence or absence of HIV-2 in the test sample. This may involve detecting the probe:target duplex as an indicator of the presence of HIV-2 in the biological sample. Thus, probe compositions and methods employing these compositions fall within the scope of the present invention.

Hybridization assay probes useful for detecting HIV-2 nucleic acid sequences include a base sequence substantially complementary to an HIV-2 RNA transcript or the encoding DNA. Thus, probes of the invention hybridize one strand of an HIV-2 target nucleic acid sequence, or the complement thereof. All probes of the present invention stably hybridize an HIV-2 target sequence under stringent hybridization assay conditions. These probes may also have additional bases outside of the targeted nucleic acid region which may or may not be complementary to HIV-2 nucleic acid.

Preferred probes are sufficiently homologous to the target nucleic acid to hybridize under stringent hybridization conditions corresponding to about 60°C when the salt concentration is in the range of 0.6-0.9 M. Preferred salts include lithium chloride, but other salts such as sodium chloride and sodium citrate also can be used in the hybridization solution. Example high stringency hybridization conditions are alternatively provided by 0.48 M sodium phosphate buffer, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 1 mM each of EDTA and EGTA, or by 0.6 M LiCl, 1% lithium lauryl sulfate, 60 mM lithium succinate and 10 mM each of EDTA and EGTA.

WO 02/34951

PCT/US01/45396

In certain embodiments of the invention, probes preferably have target-complementary sequences of up to 22 bases, still more preferably up to 18 bases, and still more preferably up to 16 bases; and include between 14 and 22 contiguous nucleotides contained in a sequence substantially corresponding to CCTGGTCTGTAGGACCCCTTCT (SEQ ID NO:20). Notably, 5 each of the probes employed in the Examples disclosed herein contained a common 14 base sequence GTCTGTAGGACCC (SEQ ID NO:21). Of course, probes of the present invention alternatively can have sequences that are complementary to the foregoing probe sequences. In all cases, when the probes are entirely complementary to HIV-2 nucleic acids (including HIV-2 amplicons), the probe lengths are preferably up to 35 nucleotides, more preferably up to 22 10 nucleotides, still more preferably up to 18 nucleotides, and even still more preferably up to 16 nucleotides. As indicated above, probes may be made of DNA, RNA, a combination DNA and RNA, a nucleic acid analog, or contain one or more modified nucleosides (e.g., a ribonucleoside having a 2'-O-methyl substitution to the ribofuranosyl moiety).

Specific Examples of probes that can be used to carry out the assay disclosed herein 15 include oligonucleotides having or substantially corresponding to the base sequences, or complements thereof, given by SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, and SEQ ID NO:27. It is also preferable for probes in accordance with the present invention to include an acridinium ester label joined to the probe by means of a non-nucleotide linker. For example, a highly preferred probe includes an acridinium ester label 20 joined to the probe through a non-nucleotide linker positioned between nucleotides 9 and 10 (reading 5' to 3') of SEQ ID NO:26.

The following Table presents the sequences of preferred detection probes that were used for detecting HIV-2 amplicons. Since alternative probes for detecting HIV-2 nucleic acid sequences can hybridize the opposite-sense strand of HIV-2, the present invention also includes 25 oligonucleotides that are complementary to the sequences presented in Table 3.

WO 02/34951

PCT/US01/45396

Table 3
Polynucleotide Sequences of HIV-2 Amplicon Detection Probes

Sequence	Sequence Identifier
CCTGGTCTGTTAGGACCC	SEQ ID NO:22
CTGGTCTGTTAGGACCCT	SEQ ID NO:23
TGGTCTGTTAGGACCCTT	SEQ ID NO:24
GGTCTGTTAGGACCCTTC	SEQ ID NO:25
GTCTGTTAGGACCCTT	SEQ ID NO:26
GTCTGTTAGGACCCTTCT	SEQ ID NO:27

In some embodiments of the invention, the probe sequence for detecting amplified LTR sequences includes a methoxy backbone or at least one methoxy linkage in the nucleic acid backbone. Preferably, detection probes are labeled with chemiluminescent AE compounds that are attached to the probe sequences via a linker substantially as described in U.S. Patent No. 5,585,481; and in U.S. Patent No. 5,639,604, particularly as described at column 10, line 6 to column 11, line 3, and in Example 8. The disclosures contained in these patent documents are hereby incorporated by reference.

Selection and Use of Capture Oligonucleotides

Preferred capture oligonucleotides include a first sequence that is complementary to an HIV-2 sequence in the LTR region (i.e., an HIV-2-binding sequence) covalently attached to a second sequence (i.e., a "tail" sequence) that serves as a target for immobilization on a solid support. Any backbone to link the base sequence of a capture oligonucleotide may be used. In certain preferred embodiments the capture oligonucleotide includes at least one methoxy linkage in the backbone. The tail sequence, which is preferably at the 3' end of a capture oligonucleotide, is used to hybridize to a complementary base sequence to provide a means for capturing the hybridized target HIV-2 nucleic acid in preference to other components in the biological sample.

Although any base sequence that hybridizes to a complementary base sequence may be used in a tail sequence, it is preferred that the hybridizing sequence span a length of about 5 to 50 nucleotide residues. Particularly preferred tail sequences are substantially homopolymeric, containing about 10 to about 40 nucleotide residues, or more preferably about 14 to about 30 residues. A capture oligonucleotide according to the present invention may include a first sequence that specifically binds an HIV-2 target polynucleotide, and a second sequence that

WO 02/34951

PCT/US01/45396

specifically binds an oligo(dT) stretch immobilized to a solid support.

Using the components illustrated in Figure 1, one assay for detecting HIV-2 sequences in a biological sample includes the steps of capturing the target nucleic acid using the capture oligonucleotide, amplifying the captured target region using at least two primers, and detecting the amplified nucleic acid by first hybridizing the labeled probe to a sequence contained in the amplified nucleic acid and then detecting a signal resulting from the bound labeled probe.

The capturing step preferably uses a capture oligonucleotide where, under hybridizing conditions, one portion of the capture oligonucleotide specifically hybridizes to a sequence in the target nucleic acid and a tail portion serves as one component of a binding pair, such as a ligand (e.g., a biotin-avidin binding pair) that allows the target region to be separated from other components of the sample. Preferably, the tail portion of the capture oligonucleotide is a sequence that hybridizes to a complementary sequence immobilized to a solid support particle. Preferably, first, the capture oligonucleotide and the target nucleic acid are in solution to take advantage of solution phase hybridization kinetics. Hybridization produces a capture oligonucleotide:target nucleic acid complex which can bind an immobilized probe through hybridization of the tail portion of the capture oligonucleotide with a complementary immobilized sequence. Thus, a complex comprising a target nucleic acid, capture oligonucleotide and immobilized probe is formed under hybridization conditions. Preferably, the immobilized probe is a repetitious sequence, and more preferably a homopolymeric sequence (e.g., poly-A, poly-T, poly-C or poly-G), which is complementary to the tail sequence and attached to a solid support. For example, if the tail portion of the capture oligonucleotide contains a poly-A sequence, then the immobilized probe would contain a poly-T sequence, although any combination of complementary sequences may be used. The capture oligonucleotide may also contain "spacer" residues, which are one or more bases located between the base sequence that hybridizes to the target and the base sequence of the tail that hybridizes to the immobilized probe. Any solid support may be used for binding the target nucleic acid:capture oligonucleotide complex. Useful supports may be either matrices or particles free in solution (e.g., nitrocellulose, nylon, glass, polyacrylate, mixed polymers, polystyrene, silane polypropylene and, preferably, magnetically attractable particles). Methods of attaching an immobilized probe to the solid support are well known. The support is preferably a particle which can be retrieved from solution using standard methods (e.g., centrifugation, magnetic attraction of magnetic particles, and the like). Preferred supports are

WO 02/34951

PCT/US01/45396

paramagnetic monodisperse particles (*i.e.*, uniform in size \pm about 5%).

Retrieving the target nucleic acid:capture oligonucleotide:immobilized probe complex effectively concentrates the target nucleic acid (relative to its concentration in the biological sample) and purifies the target nucleic acid from amplification inhibitors which may be present
5 in the biological sample. The captured target nucleic acid may be washed one or more times, further purifying the target, for example, by resuspending the particles with the attached target nucleic acid:capture oligonucleotide:immobilized probe complex in a washing solution and then retrieving the particles with the attached complex from the washing solution as described above. In a preferred embodiment, the capturing step takes place by sequentially hybridizing
10 the capture oligonucleotide with the target nucleic acid and then adjusting the hybridization conditions to allow hybridization of the tail portion of the capture oligonucleotide with an immobilized complementary sequence (e.g., as described in PCT No. WO 98/50583). After the capturing step and any optional washing steps have been completed, the target nucleic acid can then be amplified. To limit the number of handling steps, the target nucleic acid optionally can
15 be amplified without releasing it from the capture oligonucleotide.

Preferred Methods for Amplifying and Detecting HIV-2 Polynucleotide Sequences

Preferred methods of the present invention are described and illustrated by the Examples presented below. With reference to Figure 1, one system for detecting a target
20 region of the HIV-2 genome (shown by a thick solid horizontal line) is illustrated. This system includes four oligonucleotides (shown by the shorter solid lines): one capture oligonucleotide that includes a sequence that hybridizes specifically to an HIV-2 sequence in the target region and a tail ("T") that hybridizes to complementary sequence immobilized on a solid support to capture the target region present in a biological sample; one T7 promoter-primer which
25 includes a sequence that hybridizes specifically to an HIV-2 sequence in the target region and a T7 promoter sequence ("P") which, when double-stranded, serves as a functional promoter for T7 RNA polymerase; one non-T7 primer which includes a sequence that hybridizes specifically to a first strand cDNA made from the target region sequence using the T7 primer; and one labeled probe which includes a sequence that hybridizes specifically to a portion of the target
30 region that is amplified using the two primers.

As indicated above, amplifying the captured target region using the two primers can be accomplished using a variety of known nucleic acid amplification reactions. In a preferred embodiment, a transcription-associated amplification reaction, such as TMA, is employed. In

WO 02/34951

PCT/US01/45396

such an embodiment, many strands of nucleic acid are produced from a single copy of target nucleic acid, thus permitting detection of the target by detecting probes that are bound to the amplified sequences. Preferably, transcription-associated amplification uses two types of primers (one being referred to as a promoter-primer because it contains a promoter sequence, labeled "P" in Figure 1, for an RNA polymerase) two enzymes (a reverse transcriptase and an RNA polymerase), and substrates (deoxyribonucleoside triphosphates, ribonucleoside triphosphates) with appropriate salts and buffers in solution to produce multiple RNA transcripts from a nucleic acid template.

Referring to Figure 1, during transcription-mediated amplification, the captured target nucleic acid is hybridized to a first primer shown as a T7 promoter-primer. Using reverse transcriptase, cDNA is synthesized from the T7 promoter-primer using the target RNA as a template. The second primer, shown as a non-T7 primer, hybridizes to the cDNA strand and is extended by the action of a reverse transcriptase to form a DNA duplex, thereby forming a double-stranded T7 promoter region. T7 RNA polymerase then generates multiple RNA transcripts by using this functional T7 promoter. The autocatalytic mechanism of TMA employs repetitive hybridization and polymerization steps following the cDNA synthesis step to produce additional RNA transcripts, thereby amplifying target region-specific nucleic acid sequences.

The detecting step uses at least one detection probe that binds specifically to the amplified RNA transcripts or amplicons described above. Preferably, the detection probe is labeled with a detectable label that can be detected using a homogeneous detection system. More preferably, the labeled probe is labeled with an acridinium ester compound from which a chemiluminescent signal is produced and detected, as described above.

Kits for Detecting HIV-2 Nucleic Acids

Yet another aspect of the invention relates to kits for performing polynucleotide amplification reactions using HIV-2 nucleic acid templates. Preferably, kits in accordance with the present invention contain a pair of oligonucleotide primers that may be used for amplifying HIV-2 nucleic acids in an *in vitro* amplification reaction. Exemplary kits may include: (1) a first amplification oligonucleotide that includes a sequence of 9-34 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9, and that has a length of up to 100 nucleotides; and (2) and a second amplification oligonucleotide that includes a sequence of 19-40 contiguous bases from the sequence of SEQ ID NO:1, and that has a length of up to 100 nucleotides. Of course,

WO 02/34951

PCT/US01/45396

shorter amplification oligonucleotides which are disclosed herein also may be packaged into kit formats. The kits may further contain an oligonucleotide detection probe that includes the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof. This probe may be of up to 35 nucleotides in length, but alternatively be of up to 22 nucleotides in length or shorter as disclosed herein. Still further, the kits may contain capture oligonucleotides for purifying HIV-2 template nucleic acids away from other species prior to amplification. Exemplary capture oligonucleotides have the sequences of SEQ ID NO:31 and SEQ ID NO:32. Indeed, kits useful for practicing the invented method of detecting HIV-2 nucleic acids may include essentially any of the amplification oligonucleotide compositions and/or detection probe compositions disclosed herein in packaged combination with one another.

Multiplex Amplification Reactions

A convenient testing format for detecting multiple analyte polynucleotides involves conducting simultaneous amplification reactions using different primer sets, wherein amplicons synthesized in the reaction are detected by hybridization. In this regard, Gen-Probe Incorporated (San Diego, CA) has developed an HIV-1/HCV test that detects HIV-1 and/or HCV (Hepatitis C Virus) nucleic acids in a single-tube multiplex format using three key steps. In an initial sample preparation procedure plasma is treated with detergent to release viral genomic RNA, target-specific oligonucleotides are hybridized to the target and captured onto magnetic microparticles which are separated from plasma in a magnetic field. Next, a transcription-based polynucleotide amplification system is employed to amplify HIV-1 and/or HCV target RNA in a single reaction. Finally, detection is accomplished using nucleic acid hybridization of chemiluminescent probes that are complementary to the HIV-1 or HCV amplicons. If the assay gives a positive result, discriminatory tests are performed to differentiate between the two viruses.

As the number of different primer sets in a multiplex amplification reaction increases, with each set of primers being specific for a different analyte polynucleotide, there is an increased opportunity for undesired interaction among primers and between primers and irrelevant amplicons. The primer sequences disclosed herein advantageously can be used as reagents in a single polynucleotide amplification reaction which is also capable of amplifying virus-specific sequences from HIV-1, hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV).

The general principles of the present invention may be more fully appreciated by reference to the following non-limiting Examples. The first Example describes procedures for

WO 02/34951

PCT/US01/45396

identifying useful amplification primers.

Preferred primer combinations for amplifying polynucleotide sequences of the HIV-2 long terminal repeat (LTR) were identified in a series of procedures that employed different numbers of nucleic acid template molecules. As described below, an initial test was performed using a synthetic HIV-2 template at a level of 5,000 copies/reaction. Subsequent tests carried out using either 100 or 500 copies/reaction provided information about sensitivity of the assay. Analysis of results from replicate trials yielded average values for amplicon production as well as information about reproducibility of the procedure. T7 promoter-primers and non-T7 primers were screened in combination using the solution-phase procedure described below. Although the below-described procedures were particularly carried out using a Transcription Mediated Amplification (TMA) protocol, the primers disclosed herein may be used to produce amplicons by alternative methods that will be familiar to those having an ordinary level of skill in the art.

Example 1 describes the methods used for identifying primers that amplified HIV-2 polynucleotide sequences.

Example 1

Identification of Amplification Primers

In vitro transcribed RNA that included the sequence of bases 1-644 of the HIV-2 HIV2PG subtype LTR (GenBank accession number J03654) was prepared using a linearized plasmid clone as a template according to standard laboratory procedures. The resulting *in vitro* transcripts were then used as a template in amplification reactions that employed paired sets of primers in TMA reactions essentially as described by Kacian et al., in U.S. Patent No. 5,399,491. Each promoter-primer included either a T7 promoter sequence AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA (SEQ ID NO:28) or GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACA (SEQ ID NO:29) at the 5' end, and a target-complementary sequence at the 3' end. Amplification reactions were initially conducted for some of the primer combinations using 5,000 copies of the synthetic RNA template and 15 pmols of each primer in 100 μ l of standard reaction buffer. The target nucleic acid and primers were heated to 60°C for 10 minutes and then cooled to 42°C to facilitate primer annealing. Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) reverse transcriptase (2000 units) and T7 RNA polymerase (2000 units) were then added to the mixtures. The final amplification reactions contained 50 mM Tris HCl (pH 8.5), 35 mM KCl, 4 mM GTP, 4 mM ATP, 4 mM UTP, 4 mM

WO 02/34951

PCT/US01/45396

CTP, 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 20 mM MgCl₂, 20 mM N-Acetyl-L-Cysteine, and 5% (w/v) glycerol. After a one hour incubation at 42°C, the entire 100 µl amplification reaction was assayed by hybridization essentially as described by Arnold et al., in U.S. Patent No. 5,639,604, the disclosure of which is incorporated herein by reference, using an acridinium ester labeled probe in a homogeneous protection assay. A probe having the sequence of SEQ ID NO:27 was labeled with AB to a specific activity of 1.94×10^8 RLU/pmol and then used in an amount equivalent to 1.9×10^7 RLU for each hybridization reaction to detect HIV-2 amplicons. Probe hybridization was performed in 200 µl of a solution containing 0.05M lithium succinate (pH 5), 0.6M LiCl, 1% (w/v) lithium lauryl sulfate, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, at 60°C for 15 minutes, followed by addition of 300 µl of 0.15 M sodium tetraborate (pH 8.5), 1% TRITON® X-100 (Union Carbide Corporation; Danbury, CT). This mixture was first incubated at 60°C for 10 minutes to inactivate unhybridized probe, and thereafter cooled to room temperature. The remaining chemiluminescence in each sample was assayed using a Gen-Probe LEADER® I luminometer configured for automatic injection of 1 mM nitric acid and 0.1% (v/v) hydrogen peroxide followed by injection of a solution containing 1 N sodium hydroxide. Results measured for the chemiluminescent reaction were expressed in Relative Light Units (RLU).

Table 4 presents results from amplification procedures that were conducted using 5,000 copies of template polynucleotide. Notably, the promoter-primer having the sequence of SEQ ID NO:17 efficiently amplified HIV-1 polynucleotide sequences (data not shown) and was included in the present procedure to determine whether HIV-1 and HIV-2 nucleic acids could be co-amplified using a common primer. The sequence of this primer spans a region of sequence where HIV-1 and HIV-2 differ by an insertion/deletion. Thus, compared with the sequence of SEQ ID NO:9 (from which promoter-primer sequences of the present invention are derived), the HIV-2 target-complementary portion of the promoter-primer has a mismatch at nucleotide position 28 and a two nucleotide deletion corresponding to the AC nucleotide pair at positions 19-20 in the sequence of SEQ ID NO:9. Results shown in the table are derived from replicates of 4 trials (for the promoter-primer having the sequence of SEQ ID NO:16) or 5 trials (for the promoter-primers having the sequences of SEQ ID NOs:15 and 17) of the amplification and detection procedure. Some of the negative control ("Neg. control") entries shown in the table were obtained from assays that were carried out at different times. All negative control values were obtained from trials conducted in the absence of any HIV-2 template. In view of

WO 02/34951

PCT/US01/45396

the highly reproducible nature of the assay, we reasonably assumed that the magnitude of the negative control reactions also would be comparable across different experiments. Data that is not available is represented in the table by "NA".

Table 4
Amplification of HIV-2 Polynucleotide Sequences Using
Different Primer Combinations

T7 Promoter-Primer Identifier	Result	Non T7 Primer Identifier		
		SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:7
SEQ ID NO:15	Avg. RLU	12,002,375	11,450,076	11,701,970
	Neg. control	400,916	27,993	53,954
	%CV	4	7	5
SEQ ID NO:16	Avg. RLU	12,160,598	4,894,812	11,501,174
	Neg. control	NA	NA	29,936
	%CV	5	5	6
SEQ ID NO:17	Avg. RLU	9,712,454	4,989,813	11,032,883
	Neg. control	NA	115,172	NA
	%CV	15	62	6

The results presented in Table 4 showed that each of the primer combinations tested at template levels of 5,000 copies/reaction gave positive results. Although all of the promoter-primers in the procedure gave easily detectable amplification signals, the promoter-primer identified as SEQ ID NO:15 advantageously gave good results when used in combination with each of the non-T7 primers that was tested. Notably, amplification reactions that included the promoter-primer having the sequence of SEQ ID NO:15 uniformly were associated with low %CV values, thereby indicating a high degree of reproducibility and particular robustness of amplification reactions that included this primer. Interestingly, the results shown in the table indicated that even the promoter-primer having the sequence of SEQ ID NO:17, which amplifies HIV-1 sequences in a highly efficient manner, also amplified HIV-2 sequences in this procedure.

Based on the findings presented in Table 4, further testing was carried out using additional promoter-primers and lower levels of input template to demonstrate flexibility with respect to the design of useful promoter-primers and sensitivity of the assay. More particularly, the above-described amplification and detection procedures were repeated using the promoter-

WO 02/34951

PCT/US01/45396

primers having the sequences of SEQ ID NOs:15 and 17 in combination with non-T7 primers and either 100 or 500 copies of the HIV-2 template in each reaction. Thereafter, one of the non-T7 primers was selected for testing in combination with a collection of T7 promoter-primers that possessed T7 promoter sequences and target-complementary sequences different from those present in any of the promoter-primers having sequences identified by SEQ ID

5 NOs:15-17. Results from these procedures are presented in Tables 5-8.

Table 5
Amplification of HIV-2 Polynucleotide Sequences at 500 Copies/Reaction Using Different Primer Combinations

T7 Promoter-Primer Identifier	Result	Non T7 Primer Identifier		
		SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:7
SEQ ID NO:15	Avg. RLU	11,551,224	11,709,201	10,728,899
	Neg. control	91,900	84,559	93,300
	%CV	7	3	10
SEQ ID NO:17	Avg. RLU	158,707	2,813,144	1,416,150
	Neg. control	NA	115,172	99,001
	%CV	19	128	182

Table 6
Amplification of HIV-2 Polynucleotide Sequences at 100 Copies/Reaction Using Different Primer Combinations

T7 Promoter-Primer Identifier	Result	Non T7 Primer Identifier		
		SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:7
SEQ ID NO:15	Avg. RLU	10,805,600	9,581,007	11,022,067
	Neg. control	91,900	84,559	93,300
	%CV	11	17	4
SEQ ID NO:17	Avg. RLU	1,710,494	129,235	846,399
	Neg. control	497,960	115,172	99,001
	%CV	184	19	165

The results presented in Tables 5 and 6 confirmed that the promoter-primer identified by SEQ ID NO:15 efficiently amplified HIV-2 polynucleotide sequences with each of the indicated non-T7 primers, even at input template levels of only 100 copies/reaction. The promoter-primer having the sequence of SEQ ID NO:17 also was useful as a component in the

WO 02/34951

PCT/US01/45396

amplification reaction, although at a level somewhat reduced level compared to the promoter-primer having the sequence of SEQ ID NO:15. Clearly though, these two primers defined a region of the LTR that was useful as a target for primer-binding in the HIV-2 nucleic acid amplification assay.

5 Three additional non-T7 primers were synthesized and tested in combination with the promoter-primer of SEQ ID NO:15 in the HIV-2 amplification assay. These additional primers had the sequences given by SEQ ID NOs:4-6, where positions 1-4 of each oligonucleotide were occupied by 2' methoxy residues. Table 7 presents results obtained when these primer sets were tested in the above-described amplification protocol using 100 copies of the synthetic
10 HIV-2 template RNA in each reaction and the amplification products detected essentially as described above.

Table 7
Amplification of HIV-2 Polynucleotide Sequences at 100 Copies/Reaction Using
Different Primer Combinations

T7 Promoter-Primer Identifier	Result	Non-T7 Primer Identifier		
		SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
SEQ ID NO:15	Avg. RLU	15,143,148	15,149,932	13,731,644
	Neg. control	133,313	82,829	11,547
	%CV	4.3	5.5	8.5

20 The results presented in Table 7 showed that all three primer combinations gave exceptionally good results in the amplification procedure. Notably, the combination of the primer having the sequence of SEQ ID NO:6 and the promoter-primer having the sequence of SEQ ID NO:15 efficiently amplified the HIV-2 template sequence and advantageously gave a very low reading for the negative control reaction. Each of the primers and primer combinations disclosed herein represents a preferred embodiment of the invention. The combination of the primer having the sequence of SEQ ID NO:6 and the promoter-primer having the sequence of SEQ ID NO:15 is a highly preferred combination for amplifying HIV-2 polynucleotide sequences.

30 Finally, the primer having the sequence of SEQ ID NO:6 was tested in combination with promoter-primers identified by SEQ ID NOs:18 and 19 in amplification reactions that were conducted using either 500 or 100 copies/reaction of the HIV-2 template. Significantly, both the target-complementary sequence and the T7 promoter sequence in the two primers

WO 02/34951

PCT/US01/45396

differed from the T7 promoter sequence employed in the promoter-primers of SEQ ID NOs:15-17. Also significant is the fact that the promoter-primer identified by SEQ ID NO:18 contains a single base deletion corresponding to the A residue at position 19 of the sequence given by SEQ ID NO:9. The numerical values presented in Table 8 are respectively the results of 5 and 4 replicate trials conducted using 500 and 100 copies/reaction of HIV-2 target.

Table 8
Amplification of HIV-2 Polynucleotide Sequences at 500 or 100 Copies/Reaction Using Different Primer Combinations

T7 Promoter-Primer Identifier	HIV-2 Target Copy Number	Result	Non T7 Primer Identifier
			SEQ ID NO:6
SEQ ID NO:18	500	Avg. RLU	2,800,000
		Neg. control	4,778
		%CV	8
	100	Avg. RLU	2,800,000
		Neg. control	7,367
		%CV	6
SEQ ID NO:19	500	Avg. RLU	2,700,000
		Neg. control	2,710
		%CV	10
	100	Avg. RLU	2,800,000
		Neg. control	36,207
		%CV	8

The results presented in Table 8 demonstrated that both of the T7 promoter-primers identified by SEQ ID NOs:18-19 gave good results in the amplification assay, with positive signals ranging from 500-1,000 fold above the signals measured in the negative control reactions conducted using 500 copies/reaction of the HIV-2 target. Remarkably, the probe hybridization signals measured in the negative control reactions that included these promoter-primers advantageously were very low. The results further demonstrated that different T7 promoter sequences could be used in the amplification procedure with good results.

The aggregated results presented in Tables 3-7 showed that the LTR target region bound by each of the above-described non-T7 primers defined a domain that could be used for designing additional primers for use in combination with T7 promoter-primers to amplify HIV-

WO 02/34951

PCT/US01/45396

2 sequences. This domain encompassed the 40 nucleotide long sequence given by GTGTGTGTTCCCATCTCTCCTAGTCGCCGCTGGTCATT (SEQ ID NO:1). Oligonucleotide having sequences substantially corresponding to this sequence, or a subset thereof, can be used as primers in the amplification reactions described herein. Additionally, the results in Tables 4-8 showed that the LTR target region bound by each of the above-described T7 promoter-primers defined a domain that could be used in combination with non-T7 primers to amplify HIV-2 sequences. This domain encompassed the 34 nucleotide long sequence AAAATCCCTAGCAGGTTGGCGCCGAAACAGGGAC (SEQ ID NO:8). Oligonucleotides complementary to this sequence, or to a sequence substantially complementary to this sequence, can be used as primers in the amplification reactions described herein.

Example 2 describes the methods used to identify probes that were useful for detecting HIV-2 amplicons. In this procedure a single synthetic oligonucleotide target complementary to a series of different probe sequences served as a target in a probe-binding assay.

Example 2

Oligonucleotide Probes for Detecting HIV-2

A synthetic antisense HIV-2 oligonucleotide having the sequence GAAGGGUCCUAAACAGACCAGGGUCUUGUUA (SEQ ID NO:30) was prepared using 2' methoxy nucleotides according to standard laboratory procedures. This oligonucleotide served as a model RNA target. Six different oligonucleotides that were prepared using 2' methoxy nucleotides and tested as probes had the sequences given in Table 3.

Hybridization reactions consisted of 100 μ l volumes of probe protection buffer containing amounts of AE-labeled probe corresponding to 1×10^6 RLU and 100 μ l containing 2 pmols of the synthetic HIV-2 RNA target. The buffer solution included 75 mM succinic acid, 129 mM lithium lauryl sulfate, 75 mM lithium hydroxide, 15 mM aldrithiol-2, 1.0 M lithium chloride, 1 mM EDTA 3% v/v ethyl alcohol, and was pH-adjusted to 4.2. Mixtures were hybridized for 15 minutes at 60°C and then selected with 250 μ l of selection reagent solution that included 600 mM boric acid, 235 mM NaOH and 1% vol/vol TRITON X-100 (the solution having been adjusted to pH 9) for 10 minutes, and then cooled to room temperature for 10 minutes. Negative control hybridization reactions omitted the antisense HIV-2 target oligonucleotide. Chemiluminescence that reflected the amount of AE label associated with hybridized probe was determined using the method described above. The results from this

WO 02/34951

PCT/US01/45396

procedure are presented in Table 9.

Table 9
Probe Hybridization Results

		Average Hybridization (% of Input)				
Hybridization Reaction	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26	
Negative Control	0.07	0.22	0.10	0.09	0.06	
Synthetic HIV-2 RNA Amplicon	22	15	21	54	97	

As indicated by the results presented in Table 9, each of the probes tested in the procedure gave low levels of background hybridization and at least moderate levels of positive reaction with the HIV-2 target sequence. More particularly, the negative control values were all lower than 0.25%, while the reactions conducted in the presence of the HIV-2 target sequence were all greater than 15% of the input level of probe. Taken together with the showing in Example 1 that the a probe having the sequence of SEQ ID NO:27 was useful for detecting HIV-2 amplicons, the results in Table 9 showed that all of the sequences presented in Table 3 were useful as detection probes.

The success achieved in the above procedure defined an HIV-2 sequence domain that could be used for designing additional detection probes. More particularly, this domain extended over the 22 nucleotide long stretch having the sequence CCTGGTCTGTAGGACCCTTCT (SEQ ID NO:20). Oligonucleotides having sequences substantially corresponding to this sequence, a subset thereof, or the complement thereof, can be used as probes for detecting HIV-2 nucleic acids. Of course, useful probes may be longer than the length of this domain, and the HIV-2 complementary portion of useful probes may be incorporated into probes, such as molecular beacons, having particular secondary structures. Since the sequence of SEQ ID NO:20 is derived from a portion of the HIV-2 genome that is absent from the genome of HIV-1, these probes are specific for HIV-2 and not HIV-1.

Notably, probes having the sequences of SEQ ID NOs:26 and 25 gave unusually good results in this procedure. The oligonucleotide sequences of these probes are highly preferred for use in the detection step of the assay described above. Of course, the positioning of any detectable label can be varied and still fall within the scope of the invention. For example, it is highly preferred to use a probe having the sequence of SEQ ID NO:26 with an AE label linked

WO 02/34951

PCT/US01/45396

between positions 9 and 10 for detection of HIV-2 amplicon using the procedures described above.

5 Methods for determining whether candidate oligonucleotides could be used to capture HIV-2 nucleic acids from solution were carried out using the above-described *in vitro* transcribed HIV-2 RNA as a model target. Each of two different candidate capture oligonucleotides included an HIV-2 specific sequence linked to an oligo-(dA) stretch. When combined with the HIV-2 RNA target and magnetic particles modified to display oligo-(dT), a functional capture oligonucleotide bridged the HIV-2 target and the particle and immobilized the HIV-2 target. Removing the particulate complexes from solution effectively represented a means for enriching the HIV-2 template. In the procedure described in the following Example, 10 two capture oligonucleotides were separately contacted with the HIV-2 RNA and magnetic particles modified with oligo-(dT). After collecting and then washing the particles, bound HIV-2 sequences were detected in homogenous protection assays. In each instance, the capture oligonucleotide immobilized the HIV-2 RNA target onto the magnetic particle.

15 The following Example describes methods that were used for identifying HIV-2 capture oligonucleotides.

Example 3

Detection of HIV-2 Target Sequences Using

Capture Oligonucleotides

20 5×10^{11} copies of an *in vitro* transcribed HIV-2 LTR RNA target (described above) were dispersed in 400 μ l of lysis/capture buffer containing either 0, 1.5 pmols, 3.5 pmols or 5 pmols of capture oligonucleotides having the sequences of SEQ ID NOs:31 and 32, and about 100 μ g of immobilized poly-(dT₁₄) linked to paramagnetic particles (0.7-1.05 μ particles, Seradyn, Indianapolis, IN). The lysis/capture buffer included 790 mM HEPES, 230 mM succinic acid, 10% (w/v) lithium lauryl sulfate, 680 mM lithium hydroxide monohydrate. The 25 capture oligonucleotide having the sequence of SEQ ID NO:31 had positions 1-20 occupied by 2'-methoxy nucleotide analogs and positions 21-53 occupied by deoxyribonucleotides. The capture oligonucleotide having the sequence of SEQ ID NO:32 had positions 1-18 occupied by 2'-methoxy nucleotide analogs and positions 19-51 occupied by deoxyribonucleotides. A 30 spacer represented by the sequence 5'-TTT-3' was interposed between the HIV-2 complementary sequence and the poly(A) tail region for each of the capture oligonucleotides. The poly-(dT₁₄) was linked to the paramagnetic particles using carbodiimide chemistry as

WO 02/34951

PCT/US01/45396

described by Lund et al., in *Nuc. Acids Res.* **16**:10861-10880 (1988). The mixtures were heated at 55-60°C for about 15 to 30 minutes and then cooled to room temperature to allow hybridization. A magnetic field was applied to collect the particle complexes containing immobilized capture oligonucleotide and HIV-2 RNA using procedures such as those described by Wang in U.S. Patent No. 4,895,650. The particles were washed twice with 1 ml of a washing buffer (10 mM HEPES, 6.5 mM NaOH, 1 mM EDTA, 0.3% (v/v) ethanol, 0.02% (w/v) methyl-paraben, 0.01% (w/v) propyl-paraben, 150 mM NaCl, 0.1% (w/v) sodium lauryl sulfate) by resuspension and repetition of the magnetic separation step. Washed particles were suspended in 100 µl of hybridization buffer, and the mixture subjected to the probe hybridization and detection procedure described in the previous Example, except that a probe having the sequence SEQ ID NO:33 was used instead of a probe having the sequence of SEQ ID NO:27. For each assay condition, a mock capture control indicated the maximum chemiluminescence value that could be achieved in the assay. Table 10 presents the chemiluminescence measurements for replicates of two assays for each level of capture oligonucleotide.

Table 10
Efficiency of Target Capture

Capture Oligonucleotide	Result	Amount of Capture Oligonucleotide / Reaction		
		1.5 pmols	3.5 pmols	5 pmols
SEQ ID NO:31	Avg. RLU	214,064	210,545	1,033,935
	% Efficiency	18.4	18.1	88.9
	%CV	5	6	13
SEQ ID NO:32	Avg. RLU	126,948	174,640	1,334,771
	% Efficiency	10.9	15.0	114.81
	%CV	16	13	4

The results presented in Table 10 confirmed that both of the oligonucleotides tested in the procedure could be used for capturing the HIV-2 RNA from solution.

Example 4 describes procedures that can be followed to detect HIV-2 nucleic acids in a biological sample. Although this Example describes a control sample containing a known amount of HIV-2 nucleic acids, it is to be understood that a sample of plasma obtained from a human donor blood sample could be substituted. A positive hybridization result in the latter

WO 02/34951

PCT/US01/45396

case would indicate the presence of HIV-2 nucleic acids in the donor sample.

Example 4

Detection of HIV-2 Nucleic Acids Using

Nucleic Acid Amplification

5 A first sample of human plasma containing a known amount of HIV-2 (100 copies of HIV-2 per reaction tube) is mixed with an equal volume of a lysis/capture buffer, as described in Example 3. To capture the HIV-2 target RNA, the mixture also contains about 3.5 pmols of capture oligonucleotide having the sequence of SEQ ID NO:31 and about 100 µg of immobilized poly-dT₁₄ probe attached to paramagnetic particles (0.7-1.05 µ particles, Seradyn,
10 Indianapolis, IN). The mixture is heated at 55-60 °C for about 15 to 30 minutes and then cooled to room temperature to allow hybridization. A magnetic field is then applied to collect particle complexes. Particles are washed twice with 1 ml of a washing buffer and then resuspended in 75 µl of a nucleic acid amplification reagent solution for transcription associated amplification using methods substantially as described by Kacian et al., in U.S.
15 Patent Nos. 5,399,491 and 5,554,516.

Briefly, the washed particles with the attached complexes are mixed with 15 pmol each of amplification oligonucleotides having the sequences of SEQ ID NOs:15 and 6 in a reaction mixture (40 mM Tris base (pH 7.5), 17.5 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 5% polyvinylpyrrolidone (PVP), 1 mM each dNTP, 4 mM each rNTP), covered with a layer of inert oil to prevent
20 evaporation, incubated at 60 °C for 10 minutes, and then at 41.5- 42 °C for 10 minutes. Enzymes (about 3,000 Units of MMLV reverse transcriptase and about 3,000 of Units T7 RNA polymerase per reaction) are added, mixed, and the target HIV-2 nucleic acid amplified at 41.5-42 °C for 1 hour.

Amplified HIV-2 target sequences are hybridized with an AE-labeled probe having the
25 sequence of SEQ ID NO:26 and then detected by chemiluminescence and the results expressed in relative light units (RLU) substantially as described previously. For each assay condition, negative controls have an equal volume of plasma that contained no HIV-2 nucleic acid substituted for the HIV-2 containing samples. The detected RLU readings of these assays are then compared.

30 Results from these procedures show that HIV-2 nucleic acid sequences can be readily detected in a biological sample using the methods of the present invention. More particularly, negative control samples give probe hybridization results corresponding to background signals

WO 02/34951

PCT/US01/45396

only. Conversely, samples containing HIV-2 nucleic acids give hybridization signals that are several fold greater than the background. This indicates that the amplification and detection reactions are operable.

5 This invention has been described with reference to a number of specific examples and embodiments thereof. Of course, a number of different embodiments of the present invention will suggest themselves to those having ordinary skill in the art upon review of the foregoing detailed description. Thus, the true scope of the present invention is to be determined upon reference to the appended claims.

WO 02/34951

PCT/US01/45396

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A composition for detecting an HIV-2 nucleic acid sequence, comprising:
a first amplification oligonucleotide comprising a sequence of 9-34 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9, said first amplification oligonucleotide having a length of up to 100 nucleotides; and
a second amplification oligonucleotide comprising a sequence of 19-40 contiguous bases from the sequence of SEQ ID NO:1, said second amplification oligonucleotide having a length of up to 100 nucleotides.
2. The composition of Claim 1, wherein the length of the second amplification oligonucleotide is 19-40 nucleotides.
3. The composition of Claim 2, wherein the length of the first amplification oligonucleotide is 18-60 nucleotides.
4. The composition of Claim 3, wherein the length of the first amplification oligonucleotide is 18-34 nucleotides.
5. The composition of Claim 4, wherein the length of the first amplification oligonucleotide is 18-25 nucleotides.
6. The composition of Claim 5, wherein the sequence of the first amplification oligonucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:14.
7. The composition of Claim 2, wherein the length of the first amplification oligonucleotide is 18-60 nucleotides, and wherein the first amplification oligonucleotide further comprises a promoter sequence.
8. The composition of Claim 2, wherein the length of the second amplification oligonucleotide is 19-21 nucleotides.
9. The composition of Claim 8, wherein the length of the first amplification oligonucleotide is 18-34 nucleotides.
10. The composition of Claim 3, wherein the length of the second amplification oligonucleotide is 19-21 nucleotides.
11. The composition of Claim 7, wherein the first amplification oligonucleotide is a promoter-primer selected from the group consisting of SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 and SEQ ID NO:19.
12. The composition of Claim 10, wherein the second amplification oligonucleotide

WO 02/34951

PCT/US01/45396

is selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7.

13. The composition of Claim 10, wherein the first amplification oligonucleotide further comprises a promoter sequence.

14. The composition of Claim 13, wherein the first amplification oligonucleotide is a promoter-primer selected from the group consisting of SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 and SEQ ID NO:19.

15. The composition of Claim 13, wherein the second amplification oligonucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7.

16. The composition of Claim 14, wherein the second amplification oligonucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7.

17. The composition of Claim 1, wherein the length of the first amplification oligonucleotide is 18-25 nucleotides, and wherein the length of the second amplification oligonucleotide is 19-21 nucleotides.

18. The composition of Claim 17, wherein the first amplification oligonucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 and SEQ ID NO:14.

19. The composition of Claim 17, wherein the second amplification oligonucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7.

20. The composition of Claim 18, wherein the second amplification oligonucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7.

21. The composition of Claim 1, further comprising an oligonucleotide detection probe having a sequence that comprises SEQ ID NO:21 or the complement thereof.

22. The composition of Claim 21, wherein said oligonucleotide detection probe has a length of up to 18 nucleotides.

23. The composition of Claim 22, wherein the sequence of said oligonucleotide detection probe is selected from the group consisting of SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:27.

WO 02/34951

PCT/US01/45396

24. The composition of Claim 23, wherein the sequence of the first amplification oligonucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18 and SEQ ID NO:19, wherein the sequence of the second amplification oligonucleotide is selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 and SEQ ID NO:7, and wherein the sequence of the oligonucleotide detection probe is selected from the group consisting of SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:27.

25. A method for determining whether a biological sample comprising nucleic acids includes an HIV-2 nucleotide base sequence, said method comprising the steps of:

contacting the nucleic acids of the biological sample with a composition comprising,

a first amplification oligonucleotide comprising a sequence of 9-34 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9, said first amplification oligonucleotide having a length of up to 100 nucleotides, and

a second amplification oligonucleotide comprising a sequence of 19-40 contiguous bases from the sequence of SEQ ID NO:1, said second amplification oligonucleotide having a length of up to 100 nucleotides;

amplifying any of said HIV-2 nucleotide base sequence present in said biological sample to produce amplified nucleic acids; and

detecting said amplified nucleic acids produced in the amplifying step, whereby detection of said amplified nucleic acids indicates that said biological sample included the HIV-2 nucleotide base sequence.

26. The method of Claim 25, wherein the length of the first amplification oligonucleotide is 18-60 nucleotides, and wherein the length of the second amplification oligonucleotide is 19-40 nucleotides.

27. The method of Claim 26, wherein said first amplification oligonucleotide is a promoter-primer, and wherein the amplifying step comprises amplifying by TMA.

28. The method of Claim 26, wherein the detecting step comprises first hybridizing the amplified nucleic acids with a hybridization assay probe specific for said amplified nucleic acids, and thereafter measuring an amount of said hybridization assay probe that hybridized

WO 02/34951

PCT/US01/45396

said amplified nucleic acids.

29. The method of Claim 28, wherein the hybridization assay probe is a labeled nucleic acid probe.
30. The method of Claim 28, wherein the hybridization assay probe comprises the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof, said hybridization assay probe having a length of up to 22 nucleotides.
31. An oligonucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof and a detectable label, said oligonucleotide having a length of up to 35 nucleotides.
32. The oligonucleotide of Claim 31, wherein the length of said oligonucleotide is up to 22 nucleotides.
33. The oligonucleotide of Claim 32, having at least 16 contiguous nucleotides contained within the sequence of SEQ ID NO:20 or the complement thereof.
34. The oligonucleotide of Claim 33, wherein said oligonucleotide has the sequence of SEQ ID NO:20 or the complement thereof.
35. The oligonucleotide of Claim 33, wherein said oligonucleotide has a length of up to 18 nucleotides.
36. The oligonucleotide of Claim 35, wherein the length of said oligonucleotide is 18 nucleotides.
37. The oligonucleotide of Claim 35, wherein said oligonucleotide has a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:22 or the complement thereof, SEQ ID NO:23 or the complement thereof, SEQ ID NO:24 or the complement thereof, SEQ ID NO:25 or the complement thereof, SEQ ID NO:26 or the complement thereof, and SEQ ID NO:27 or the complement thereof.
38. The oligonucleotide of Claim 31, wherein said oligonucleotide comprises DNA.
39. The oligonucleotide of Claim 31, wherein said oligonucleotide comprises at least one nucleotide analog.
40. The oligonucleotide of Claim 39, wherein said at least one nucleotide analog comprises a methoxy group at the 2' position of a ribose moiety.
41. The oligonucleotide of Claim 37, wherein the detectable label is a chemiluminescent label or a radiolabel.
42. The oligonucleotide of Claim 41, wherein the detectable label is an acridinium

WO 02/34951

PCT/US01/45396

ester.

43. A method for detecting the presence of HIV-2 nucleic acids in a biological sample, comprising the steps of:
- (a) providing to said biological sample a hybridization probe comprising the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof and a detectable label, said oligonucleotide having a length of up to 35 nucleotides;
 - (b) hybridizing under a high stringency condition any HIV-2 nucleic acid that may be present in the biological sample with said hybridization probe to form a probe:target duplex; and
 - (c) detecting said probe:target duplex as an indicator of the presence of HIV-2 in the biological sample.
44. The method of Claim 43, wherein the length of the hybridization probe in the providing step is up to 22 nucleotides.
45. The method of Claim 44, wherein said biological sample is a blood product selected from the group consisting of plasma and serum.
46. The method of Claim 45, wherein before step (a) there is a step for releasing nucleic acid from any HIV-2 that may be present in said biological sample.
47. The method of Claim 46, further comprising a step for capturing onto a solid support the nucleic acid released from said any HIV-2 that may be present in said biological sample.
48. The method of Claim 44, wherein said biological sample is a lysate.
49. The method of Claim 44, wherein said high stringency hybridization condition comprises 0.48 M sodium phosphate buffer, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 1 mM each of EDTA and EGTA.
50. The method of Claim 44, wherein said high stringency hybridization condition comprises a salt concentration in the range of 0.6 - 0.9 M.
51. The method of Claim 44, wherein the hybridization probe in step (a) has a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:22 or the complement thereof, SEQ ID NO:23 or the complement thereof, SEQ ID NO:24 or the complement thereof, SEQ ID NO:25 or the complement thereof, SEQ ID NO:26 or the complement thereof, and SEQ ID NO:27 or the complement thereof.
52. The method of Claim 51, wherein the hybridization probe comprises at least one

WO 02/34951

PCT/US01/45396

nucleotide analog.

53. The method of Claim 51, wherein the hybridization probe comprises a detectable label.

54. The method of Claim 53, wherein the detectable label is an acridinium ester, and wherein the detecting step comprises performing luminometry to detect any of said probe:target duplex.

55. A kit for detecting HIV-2 nucleic acids, comprising:

(a) a first amplification oligonucleotide comprising a sequence of 9-34 contiguous bases contained within the sequence of SEQ ID NO:9, said first amplification oligonucleotide having a length of up to 100 nucleotides; and

(b) a second amplification oligonucleotide comprising a sequence of 19-40 contiguous bases from the sequence of SEQ ID NO:1, said second amplification oligonucleotide having a length of up to 100 nucleotides.

56. The kit of Claim 55, further comprising:

(c) an oligonucleotide detection probe that comprises the sequence of SEQ ID NO:21 or the complement thereof, and a detectable label.

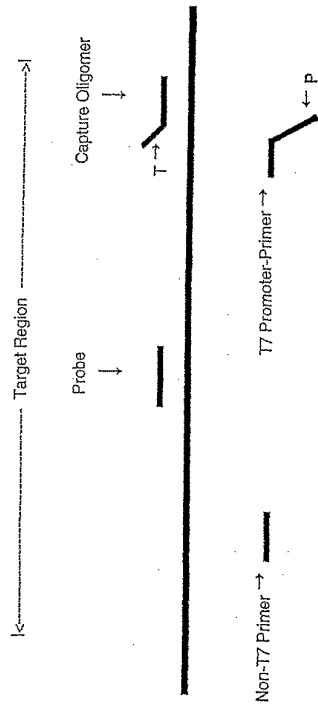


Fig. 1

WO 02/34951

PCT/US01/45396

SEQUENCE LISTING

<110> Yang, Yeasing
Burrell, Terrie

<120> Compositions and Methods for Detecting
Human Immunodeficiency Virus 2 (HIV-2)

<130> GP117-03.UT

<150> 60/242,620
<151> 2000-10-23

<150> 60/280,058
<151> 2001-03-30

<160> 34

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 40
<212> DNA
<213> HIV-2

<400> 1
gtgtgtgttc caatctctcc tagtcgccgc ctggcattc 40

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> HIV-2

<400> 2
gtgtgtgttc caatctctc 19

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> HIV-2

<400> 3
tgtgttccca tctctctag 20

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> HIV-2

<400> 4
gttcccatct ctctctagtcg c 21

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> HIV-2

<400> 5
tcctagtcgc cgcctgtca 20

<210> 6
<211> 19

WO 02/34951	PCT/US01/45396
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 6	
cctagtcgcc gcctgggtca	19
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 7	
tagtcgccgc ctggtcattc	20
<210> 8	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 8	
aaaatcccta gcaggttggc gcccgaaacag ggac	34
<210> 9	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 9	
gtccctgttc gggcgccaac ctgctagggga tttt	34
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 10	
cgggcgccaa cctgctaggg atttt	25
<210> 11	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 11	
gtccctgttc gggcgcca	18
<210> 12	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Primer mismatches HIV-2 sequence by deletion of two nucleotides and mutation at a third position	
<400> 12	
cgggcgccac tgctagagat ttt	23
<210> 13	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

WO 02/34951

PCT/US01/45396

<223> Primer mismatches HIV-2 sequence by deletion of one nucleotide

<400> 13
 cgggagccac ctgctagga tttt 24

<210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> HIV-2

<400> 14
 ccctgttcgg gggccaacct gctag 25

<210> 15
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T7 promoter primer having a promoter sequence appended at the 5' end of an HIV-2 complementary primer sequence

<400> 15
 aatttaatac gactcaactat agggagacgg gggccaacct gctaggatt tt 52

<210> 16
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T7 promoter primer having a promoter sequence appended at the 5' end of an HIV-2 complementary primer sequence

<400> 16
 aatttaatac gactcaactat agggagagtc cctgttcggg cgcca 45

<210> 17
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T7 promoter primer having a promoter sequence appended at the 5' end of the sequence given as SEQ ID NO:12

<400> 17
 aatttaatac gactcaactat agggagacgg gggccaactgc tagagatttt 50

<210> 18
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> T7 promoter primer having a promoter sequence appended at the 5' end of the sequence given as SEQ ID NO:13

<400> 18

WO 02/34951 PCT/US01/45396

gaaattaata cgactcacta tagggagacc acacgggcgc cacctgctag ggatttt 57
 <210> 19
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 77 promoter primer having a promoter sequence
 appended at the 5' end of an HIV-2 complementary
 primer sequence

<400> 19
 gaaattaata cgactcacta tagggagacc acacctgtt cgggcgcca cctgctag 58
 <210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> HIV-2

<400> 20
 cctggtctgt taggaccctt ct 22
 <210> 21
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> HIV-2

<400> 21
 gtctgttagg accc 14
 <210> 22
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> HIV-2

<400> 22
 cctggtctgt taggacc 18
 <210> 23
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> HIV-2

<400> 23
 ctggtctggt aggaccct 18
 <210> 24
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> HIV-2

<400> 24
 tggctctgta ggaccctt 18
 <210> 25
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> HIV-2

<400> 25
 ggtctgttag gacccttc 18
 <210> 26

WO 02/34951	PCT/US01/45396
<211> 16	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 26	
gtctgttagg accctt	16
<210> 27	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 27	
gtctgttagg acccttct	18
<210> 28	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 28	
aatttaatac gactcactat agggaga	27
<210> 29	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 29	
gaaattaata cgactcacta tagggagacc aca	33
<210> 30	
<211> 30	
<212> RNA	
<213> HIV-2	
<400> 30	
gaaggguccu aacagaccag ggucuuguua	30
<210> 31	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 31	
ttcctgccc ccttactgcc tttaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaa	53
<210> 32	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 32	
ttcctgccc ccttactggt taaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa a	51
<210> 33	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> HIV-2	
<400> 33	
aaaggtcct aacaga	16
<210> 34	

WO 02/34951

PCT/US01/45396

<211> 9

<212> DNA

<213> HIV-2

<400> 34

cgggcgcca

9

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
2 May 2002 (02.05.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/034951 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/US01/45396
- (22) International Filing Date: 22 October 2001 (22.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/242,620 23 October 2000 (23.10.2000) US
60/280,058 30 March 2001 (30.03.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
GEN-PROBE INCORPORATED [US/US]; Patent
Dept., 10210 Genetic Center Drive, San Diego, CA
92121-4362 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): YANG, Vensing,
Y. [US/US]; 13569 Glencourt Way, San Diego, CA 92130
(US). BURRELL, Terrie, A. [US/US]; 4302 Plumosa
Way, San Diego, CA 92103 (US).
- (74) Agent: GILLY, Michael, J.; Patent Dept., 10210 Genetic
Center Drive, San Diego, CA 92121-4362 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NI, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IL,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CI,
CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NF, SN, TD,
TG).
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
24 December 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/034951 A3

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR DETECTING HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS 2 (HIV-2)

(57) Abstract: Compositions and methods for synthesizing and detecting HIV-2 specific amplicons. Particularly described are oligonucleotides that are useful as hybridization probes, and amplification primers that facilitate detection of very low levels of HIV-2 nucleic acids.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internat application No PCT/US 01/45396
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
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) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-internal, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 1 026 263 A (ORTHO CLINICAL DIAGNOSTICS INC) 9 August 2000 (2000-08-09) page 4, line 23-28 page 4, line 43-49; tables 1,2	1-55
Y	BUSH C E ET AL: "DETECTION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 RNA IN PLASMA SAMPLES FROM HIGH-RISK PEDIATRIC PATIENTS BY USING THE SELF-SUSTAINED SEQUENCE REPLICATION REACTION" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 30, no. 2, February 1992 (1992-02), pages 281-286, XP000980605 ISSN: 0095-1137 the whole document	1-55
--- --- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
E earlier document but published on or after the international filing date		*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
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)		*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
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 13 January 2003	Date of mailing of the international search report 28/01/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016	Authorized officer Rutz, B	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US 01/45396

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 470 572 A (KRAISELBURD EDMUNDO) 28 November 1995 (1995-11-28) column 10, line 24-39 column 6, line 5-9 - & DATABASE GSN 'OnLine! 21 June 1996 (1996-06-21) retrieved from EBI Database accession no. AAT06604 XP002226197 abstract	31-33, 35-38, 41
X	----- DATABASE GSN 'OnLine! 16 July 1998 (1998-07-16) retrieved from EBI Database accession no. AAV19509 XP002226198 abstract	31-33, 35-38, 41
A	----- PIENIAZEK D ET AL: "IDENTIFICATION OF MIXED HIV-1/HIV-2 INFECTIONS IN BRAZIL BY POLYMERASE CHAIN REACTION" AIDS, LONDON, GB, vol. 5, no. 11, 1991, pages 1293-1299, XP001006264 ISSN: 0269-9370	
A	----- WALTHER-JALLOW L ET AL: "High concordance between polymerase chain reaction and antibody testing of specimens from individuals dually infected with HIV types 1 and 2 in Guinea-Bissau, West Africa." AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES. UNITED STATES 20 JUL 1999, vol. 15, no. 11, 20 July 1999 (1999-07-20), pages 957-962, XP002226195 ISSN: 0889-2229	
A	----- GEMEN VAN B ET AL: "THE ONE-TUBE QUANTITATIVE HIV-1 RNA NASBA: PRECISION, ACCURACY, AND APPLICATION" PCR METHODS & APPLICATIONS, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, vol. 4, no. 4, 1 February 1995 (1995-02-01), pages S177-S184, XP000579764 ISSN: 1054-9803	
	----- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 01/45396
--

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BAAR DE M P ET AL: "DESIGN AND EVALUATION OF A HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 RNA ASSAY USING NUCLEIC SEQUENCE-BASED AMPLIFICATION TECHNOLOGY ABLE TO QUANTIFY BOTH GROUP M AND O VIRUSES BY USING THE LONG TERMINAL REPEAT AS TARGET" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 37, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 1813-1818, XP000923207 ISSN: 0095-1137</p>	
A	<p>BERKHOUT B ET AL: "Secondary structure of the HIV-2 leader RNA comprising the tRNA-primer binding site." NUCLEIC ACIDS RESEARCH. ENGLAND 11 MAR 1993, vol. 21, no. 5, 11 March 1993 (1993-03-11), pages 1171-1178, XP001121818 ISSN: 0305-1048 -& DATABASE GSN 'Online! 24 June 1993 (1993-06-24) retrieved from EBI Database accession no. X72325 XP00226199 abstract</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US 01/45396

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 1026263	A	09-08-2000	AU 1482800 A	03-08-2000
			AU 1482900 A	03-08-2000
			CN 1271020 A	25-10-2000
			EP 1026263 A2	09-08-2000
			JP 2000342274 A	12-12-2000
			NO 20000513 A	03-08-2000
			US 6303293 B1	16-10-2001
US 5470572	A	28-11-1995	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 33/58	A
G 0 1 N 33/60	G 0 1 N 33/60	Z

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72) 発明者 ヤン, イーシン・ワイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 3 0, サン・ディエゴ, グレンクリフ・ウェイ 1 3 5 6
9

(72) 発明者 パーレル, テリー・エイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 2 1 0 3, サン・ディエゴ, プルモサ・ウェイ 4 3 0 2

F ターム(参考) 2G045 AA35 DA13 FB02 FB12 GC15

2G054 AA10 CA22 CE02 EA01 GA04

4B024 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 HA11 HA13 HA14

4B063 QQ03 QQ10 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR39 QR42 QR56

QR62 QR84 QS16 QS34 QS36 QX01 QX02

专利名称(译)	用于检测人类免疫缺陷病毒2 (HIV-2) 的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2004518416A	公开(公告)日	2004-06-24
申请号	JP2002537919	申请日	2001-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	簡・探針公司		
申请(专利权)人(译)	根 - Probe公司		
[标]发明人	ヤンイーシンワイ バーレルテリーエイ		
发明人	ヤン,イーシン・ワイ バーレル,テリー・エイ		
IPC分类号	G01N33/53 C07H21/02 C07H21/04 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N21/77 G01N21/78 G01N33/58 G01N33/60		
CPC分类号	C12Q1/703		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A G01N21/77.Z G01N21/78.C G01N33/53.M G01N33/58.A G01N33/60.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/DA13 2G045/FB02 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA10 2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/GA04 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QQ03 4B063/QQ10 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR39 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR84 4B063/QS16 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/242620 2000-10-23 US 60/280058 2001-03-30 US		
其他公开文献	JP4202750B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于合成和检测HIV-2特异性扩增子的组合物和方法。具体描述了可用作杂交探针和扩增引物的寡核苷酸，其有助于检测极低水平的HIV-2核酸。

		(P2004-518416)
		(43) 公表日 平成16年6月24日(2004.6.2)
(51) Int. Cl. 7	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNA A 2G045
C12Q 1/68	C12Q 1/68	A 2G054
G01N 21/77	G01N 21/77	Z 4B024
G01N 21/78	G01N 21/78	C 4B063
G01N 33/53	G01N 33/53	M
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 101 頁) 最終頁に於	
(21) 出願番号	特願2002-537919 (P2002-537919)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成13年10月22日 (2001.10.22)	ジェン・プローブ・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月23日 (2003.4.23)	アメリカ合衆国カリフォルニア州9211, サン・ディエゴ, ジェネテック・インター・ドライブ 10210
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/045396	
(87) 国際公開番号	WO2002/034951	
(87) 国際公開日	平成14年5月2日 (2002.5.2)	(74) 代理人
(31) 優先権主張番号	60/242,620	弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成12年10月23日 (2000.10.23)	(74) 代理人
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 堀井 忠式
(31) 優先権主張番号	60/280,058	(74) 代理人
(32) 優先日	平成13年3月30日 (2001.3.30)	弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人
		弁理士 千葉 昭夫
		(74) 代理人
		弁理士 富田 博行