

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4202750号  
(P4202750)

(45) 発行日 平成20年12月24日(2008.12.24)

(24) 登録日 平成20年10月17日(2008.10.17)

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 Z N A A  
**C 1 2 Q 1/68 (2006.01)** C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 22 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2002-537919 (P2002-537919)	(73) 特許権者	500169900
(86) (22) 出願日	平成13年10月22日(2001.10.22)		ジェンブローブ・インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2004-518416 (P2004-518416A)		アメリカ合衆国カリフォルニア州9212
(43) 公表日	平成16年6月24日(2004.6.24)		1, サン・ディエゴ, ジェネティック・セ
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/045396		ンター・ドライブ 10210
(87) 国際公開番号	W02002/034951	(74) 代理人	100089705
(87) 国際公開日	平成14年5月2日(2002.5.2)		弁理士 社本 一夫
審査請求日	平成16年10月20日(2004.10.20)	(74) 代理人	100076691
(31) 優先権主張番号	60/242, 620		弁理士 増井 忠武
(32) 優先日	平成12年10月23日(2000.10.23)	(74) 代理人	100075270
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小林 泰
(31) 優先権主張番号	60/280, 058	(74) 代理人	100080137
(32) 優先日	平成13年3月30日(2001.3.30)		弁理士 千葉 昭男
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行

最終頁に続く

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

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) 配列番号10を含み、かつ、HIV-2核酸に対して非相補的な5'プロモーター配列を含んでいてもよい、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、HIV-2核酸を検出するためのキット。

【請求項2】

(c) 配列番号21又はその相補体の配列、及び検出可能標識を含む、オリゴヌクレオチド検出プローブ

をさらに含む、請求項1のキット。

【請求項3】

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1のキット。

【請求項4】

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3記載のキット。

【請求項5】

第一の増幅オリゴヌクレオチドの長さが60までである、請求項3又は4記載のキット。

【請求項6】

第一の増幅オリゴヌクレオチドが、前記 5' プロモーター配列を含む、請求項 5 記載のキット。

【請求項 7】

第一の増幅オリゴヌクレオチドが配列番号 15 で示される塩基配列からなるプロモータープライマーである、請求項 6 記載のキット。

【請求項 8】

第一のオリゴヌクレオチドが配列番号 10 からなり、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 のキット。

【請求項 9】

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塩基配列からなる、請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項記載のキット。

10

【請求項 10】

オリゴヌクレオチド検出プローブの長さが 35 までである、請求項 2 記載のキット。

【請求項 11】

オリゴヌクレオチド検出プローブの長さが 22 までである、請求項 10 記載のキット。

【請求項 12】

オリゴヌクレオチド検出プローブの長さが 18 までである、請求項 11 記載のキット。

【請求項 13】

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塩基配列からなる、請求項 12 記載のキット。

20

【請求項 14】

第一の増幅オリゴヌクレオチドの配列が、配列番号 10 又は配列番号 15 であり、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る塩基配列からなる、請求項 13 記載のキット。

【請求項 15】

オリゴヌクレオチド検出プローブが、配列番号 20 又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含む、請求項 11 又は 12 記載のキット。

30

【請求項 16】

オリゴヌクレオチド検出プローブが、配列番号 20 で示される塩基配列又はその相補体からなる、請求項 11 記載のキット。

【請求項 17】

オリゴヌクレオチド検出プローブの長さが 18 ヌクレオチドである、請求項 15 記載のキット。

【請求項 18】

オリゴヌクレオチド検出プローブが、配列番号 22 又はその相補体、配列番号 23 又はその相補体、配列番号 24 又はその相補体、配列番号 25 又はその相補体、配列番号 26 又はその相補体及び配列番号 27 又はその相補体からなる群より選択される塩基配列である、請求項 15 記載のキット。

40

【請求項 19】

オリゴヌクレオチド検出プローブが DNA を含む、請求項 10 記載のキット。

【請求項 20】

オリゴヌクレオチド検出プローブが、リボース部分の 2' 位に少なくとも 1 のメトキシ基を含む、請求項 10 記載のキット。

【請求項 21】

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 18 記載のキット。

【請求項 22】

検出可能標識がアクリジニウムエステルである、請求項 21 記載のキット。

50

## 【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。

10

## 【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<sup>+</sup>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のエンベロップ変異体(variant)ではない。

20

## 【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。

30

## 【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。

40

## 【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。HIV-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

50

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。

【 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

10

20

30

40

50

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

50

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

50

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および配列番号7のいずれか1つを含む。

20

30

40

#### 【0014】

定義

50

以下の用語は、本明細書に明らかに逆に関及しない限り、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、界面活性剤等を含んでもよい溶液中に、細胞内構成要素を遊離させることが可能である。

【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むポリマーも含み、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」残基を含む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。「OMeT」と特に明記する場合、ヌクレオチドの塩基位がチミン残基に占められることを意味する。

【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またはその誘導體(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、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

10

20

30

40

50

Beckerら、欧州特許出願第0 747 706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。

10

【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WO 93/22461号;Gingerasら、PCT第WO 88/01302号;Gingerasら、PCT第WO 88/10315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WO 94/03472号;およびRyderら、PCT第WO 95/03430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。

20

【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。

30

40

【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

50

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関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

50

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）。

【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。

【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。

【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が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。

【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】

10

20

30

40

50

### 発明の詳細な説明

本発明は、H I V - 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。

#### 【 0 0 3 5 】

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。

#### 【 0 0 3 6 】

### 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。H I V - 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H I V - 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。H I V - 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を補助するのと同じ方式で、H I V - 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、H I V - 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。

#### 【 0 0 3 7 】

本発明は、生物学的試料においてH I V - 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H I V - 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H I V - 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、H I V - 2 ゲノムのLTR領域を検出用に選択した。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。

#### 【 0 0 3 8 】

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、H I V - 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

10

20

30

40

50

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。

【 0 0 3 9 】

#### 有用な増幅法

本発明と組み合わせる有用な増幅法には：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 , 3 9 9 , 4 9 1 号；米国特許第 4 , 9 6 5 , 1 8 8 号；公開欧州特許出願 E P 0 5 2 5 8 8 2、米国特許第 5 , 4 5 5 , 1 6 6 号、米国特許第 5 , 4 7 2 , 8 4 0 号および L i z a r d i ら , B i o T e c h n o l o g y 6 : 1 1 9 7 ( 1 9 8 8 ) に見出すことが可能である。米国特許第 5 , 5 5 4 , 5 1 6 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。

【 0 0 4 0 】

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 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 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、1 0 0 - 1 0 0 0 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、1 0 0 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。

【 0 0 4 1 】

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。

【 0 0 4 2 】

#### 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。

## 【 0 0 4 3 】

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

## 【 0 0 4 4 】

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て使用してもよい。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

## 【 0 0 4 5 】

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に比較し、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-ジブプロモ-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

## 【 0 0 4 6 】

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)。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

50

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。

#### 【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。

#### 【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）。

#### 【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チ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、Hyldeg-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ジン塩基類の既知の誘導体（例えば、N<sup>4</sup>-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

10

20

30

40

50

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。

#### 【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、いくつかの要因に応じる。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。

#### 【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であろう。

#### 【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。

#### 【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、MacDNASIS™2.0(Hitachi Software Engineering American Ltd.)およびOLIGO(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関与しているならば、新たなハイブリッドの形成に、より関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て、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

30

40

50

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、K a c i a n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。

【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、H I V - 2 標的核酸配列の相対する鎖に相補的である。H I V - 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、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。

【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 ( e x t r a n e o u s ) 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、H I V - 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、H I V - 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、H I V - 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。

【0060】

以下の2つの表は、H I V - 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H I V - 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、H I V - 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、H I V - 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だ。

【0061】

表1

増幅プライマーのポリヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

【 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
TCCTAGTCGCCGCTGGTCA	配列番号 5
CCTAGTCGCCGCTGGTCA	配列番号 6
TAGTCGCCGCTGGTCATTC	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。

【 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 】

20

配列	識別子
CGGGCGCCAACCTGCTAGGGATTTT	配列番号 1 0 (H I V - 2 相補プライマー)
GTCCCTGTTCGGGCGCCA	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)
CCCTGTTCGGGCGCCAACCTGCTAG	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 CCCTGTTCGGGCGCCAACCTGCTAG	配列番号 1 9 (T 7 プロモーター - プライマー)

30

40

【 0 0 6 6 】

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

50

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。

#### 【 0 0 6 7 】

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 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、配列番号 1 3 または配列番号 1 4 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 ( i i ) 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 1 0 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。

10

#### 【 0 0 6 8 】

##### 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。

20

#### 【 0 0 6 9 】

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 RNA 転写物またはコードする DNA 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。

30

#### 【 0 0 7 0 】

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 6 0 °C 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 . 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 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、6 0 m M コハク酸リチウム、並びに各 1 0 m M の E D T A および E G T A によって提供される。

40

#### 【 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、2 2 塩基までの、さらにより好ましくは 1 8 塩基までの、そしてさらにより好ましくは 1 6 塩基までの標的相補配列を有し；そして C C T G G T C T G T T A G G A C C C T T C T ( 配列番号 2 0 ) に実質的に

50

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 TAG GACCC (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チド(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チド)を含有してもよい。

10

## 【0072】

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

## 【0073】

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。

## 【0074】

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

## 【0075】

## 【表3】

30

配列	配列識別子
CCTGGTCTGTTAGGACCC	配列番号22
CTGGTCTGTTAGGACCCT	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

## 【0076】

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、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

50

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。

【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。

20

【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

30

40

50

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 ± 約 5 % でサイズが均一）である。

#### 【 0 0 8 1 】

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

#### 【 0 0 8 2 】

H I V - 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、H I V - 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H I V - 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H I V - 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、T7 RNA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。

20

30

#### 【 0 0 8 3 】

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

#### 【 0 0 8 4 】

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

50

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、上述のような、化学発光シグナルが産生され、そして検出される、アクリジニウムエステル化合物で標識される。

【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。

【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。

【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。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 9 】

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。

## 【 0 0 9 0 】

H I V - 2 末端反復配列 ( L T R ) 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H I V - 2テンプレートをを用いて行った。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、組み合わせて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 ( T M A ) 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。

10

## 【 0 0 9 1 】

実施例1は、H I V - 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。

## 【 0 0 9 2 】

## 【実施例】

## 実施例1

20

増幅プライマーの同定

H I V - 2 H I V 2 F G サブタイプ L T R ( G e n B a n k 寄託番号 J 0 3 6 5 4 ) の塩基1-644の配列を含む *i n v i t r o* 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を用いて調製した。その後、生じた *i n v i t r o* 転写物を、本質的にK a c i a n 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A A T T T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A G A (配列番号28) またはG A A A T T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A G A C C A C A (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、100  $\mu$  l 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15 p m o l 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 ( M M L V ) 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、50 m M T r i s H C l ( p H 8 . 5 ) 、 35 m M K C l 、 4 m M G T P 、 4 m M A T P 、 4 m M U T P 、 4 m M C T P 、 1 m M d A T P 、 1 m M d T T P 、 1 m M d C T P 、 1 m M d G T P 、 20 m M M g C l <sub>2</sub> 、 20 m M 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、100  $\mu$  l 増幅反応すべてを、その開示が本明細書に援用されるA r n o l d 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、 $1.94 \times 10^8$  R L U / p m o l の比活性にA E 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、 $1.9 \times 10^7$  R L U に均等の量を用いてH I V - 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、0.05 M コハク酸リチウム ( p H 5 ) 、 0.6 M L i C l 、 1% ( w / v ) ラウリル硫酸リチウム、10 m M E D T A 、 10 m M E G T A を含有する溶液200  $\mu$  l 中、60 で15分間行い、その後、300  $\mu$  l の0.15 M 四ホウ酸ナトリウム ( p H 8 . 5 ) 、 1% T R I T O N (登録商標) X - 100 ( U n i o n C a r b i d e C o r p o r a t i o n ; コネ

30

40

50

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。

## 【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 mismatches 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。

## 【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

## 【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

## 【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る際、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て用いて、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て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。

10

【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

20

【0099】

【表5】

		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
T7プロモーター- プライマー識別子	結果			
	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15	平均RLU	158,707	2,813,144	1,416,150
	陰性対照	NA	115,172	99,001
	%CV	19	128	182

30

【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】

40

		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。

## 【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

30

## 【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 1 5 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 1 8 および 1 9 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 T 7 プロモーター配列はどちらも、配列番号 1 5 - 1 7 のプロモーター - プライマーで使用する T 7 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 1 8 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 1 9 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。

10

【 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】

20

T 7 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 T 7 プライマー識別子
			配列番号 6
配列番号 1 8	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 1 9	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

30

40

【 0 1 1 0 】

表 8 に示す結果は、配列番号 1 8 - 1 9 に同定する T 7 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 , 0 0 0 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 T 7 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 】

50

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 2H 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、 $1 \times 10^6$  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  $\mu$  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  $\mu$  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  $\mu$  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

## 【 0 1 1 7 】

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 . 2 5 % 未満であり、一方、H I V - 2 標的配列の存在下で行った反応はすべて、1 5 % より大きかった。実施例 1 で、配列番号 2 7 の配列を有するプローブが、H I V - 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。

## 【 0 1 1 8 】

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 H I V - 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 C C T G G T C T G T T A G G A C C C T T C T (配列番号 2 0) を有する、長さ 2 2 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、H I V - 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 H I V - 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もよい。配列番号 2 0 の配列は、H I V - 1 のゲノムに欠けている H I V - 2 ゲノムの部分に由来するため、これらのプローブは 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。

20

## 【 0 1 1 9 】

とりわけ、配列番号 2 6 および 2 5 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、H I V - 2 単位複製配列の検出用に、9 および 1 0 位の間に連結した A E 標識を持つ、配列番号 2 6 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

## 【 0 1 2 0 】

候補オリゴヌクレオチドが、溶液から H I V - 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 H I V - 2 R N A 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 ( d A ) 伸長に連結した H I V - 2 特異的配列を含んだ。H I V - 2 R N A 標的、およびオリゴ ( d T ) 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、H I V - 2 標的および粒子を架橋し、そして H I V - 2 標的を固定した。溶液からの粒子性の複合体の除去は、H I V - 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、H I V - 2 R N A およびオリゴ ( d T ) 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 H I V - 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、H I V - 2 R N A 標的を磁気粒子上に固定した。

40

## 【 0 1 2 1 】

以下の実施例は、H I V - 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)  $5 \times 10^{11}$ 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  $\mu$ 粒子、Seradyn、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(dT<sub>14</sub>)約100  $\mu$ gを含有する溶解/捕捉緩衝液400  $\mu$ 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(dT<sub>14</sub>)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、1ml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  $\mu$ 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

## 【 0 1 2 5 】

表 1 0 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 H I V - 2 R N A を捕捉するのに使用可能であることを確証した。

## 【 0 1 2 6 】

実施例 4 は、生物学的試料において、H I V - 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 H I V - 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 H I V - 2 核酸の存在の指標となるであろう。

## 【 0 1 2 7 】

## 実施例 4

核酸増幅を用いた H I V - 2 核酸の検出

既知の量の H I V - 2 ( 反応試験管あたり 1 0 0 コピーの H I V - 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。H I V - 2 標的 R N A を捕捉するため、混合物はまた、配列番号 3 1 の配列を有する捕捉オリゴヌクレオチド約 3 . 5 p m o l および常磁性粒子 ( 0 . 7 - 1 . 0 5 μ 粒子、S e r a d y n、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 d T<sub>14</sub> プロープ約 1 0 0 μ g も含有する。混合物は、5 5 - 6 0 に約 1 5 から 3 0 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、1 m l の洗浄緩衝液で 2 回洗浄し、そしてその後、実質的に、K a c i a n ら、米国特許第 5 , 3 9 9 , 4 9 1 号および第 5 , 5 5 4 , 5 1 6 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 7 5 μ l 中に再懸濁する。

## 【 0 1 2 8 】

簡潔には、付着した複合体を含む洗浄粒子を、反応混合物 ( 4 0 m M T r i s 塩基 ( p H 7 . 5 )、1 7 . 5 m M K C l、2 0 m M M g C l<sub>2</sub>、5 % ポリビニルピロリドン ( P V P )、各 1 m M の d N T P、各 4 m M の r N T P ) 中で、配列番号 1 5 および 6 の配列を有する増幅オリゴヌクレオチド各 1 5 p m o l と混合し、不活性油の層で覆って蒸発を防止し、6 0 で 1 0 分間インキュベーションし、そしてその後、4 1 . 5 - 4 2 で 1 0 分間インキュベーションする。酵素 ( 反応あたり約 3 , 0 0 0 単位の M M L V 逆転写酵素および約 3 , 0 0 0 単位の T 7 R N A ポリメラーゼ ) を添加し、混合し、そして標的 H I V - 2 核酸を 4 1 . 5 - 4 2 で 1 時間増幅する。

## 【 0 1 2 9 】

実質的に先に記載するように、増幅した H I V - 2 標的配列は、配列番号 2 6 の配列を有する A E 標識化プロープ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 ( R L U ) で表した。各アッセイ条件に関して、陰性対照は、H I V - 2 含有試料の代わりに、H I V - 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 R L U 読み取り値を比較する。

## 【 0 1 3 0 】

これらの方法の結果は、H I V - 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プハイブリダイゼーション結果を生じる。逆に、H I V - 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。

## 【 0 1 3 1 】

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。

## 【配列表】

10

## 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 ccatctctcc tagtcgccc ctggtcattc 40

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

<400> 2  
gtgtgtgttc ccatctctc 19

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

<400> 3  
tgtgttcca tctctcctag 20

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

<400> 4  
gttcccatct ctcttagtcg c 21

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

<400> 5  
tcttagtcg cgcctggtca 20

<210> 6  
<211> 19

20

30

40

<212> DNA  
 <213> HIV-2  
  
 <400> 6  
 cctagtcgcc gcctggctca 19  
  
 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> HIV-2  
  
 <400> 7  
 tagtcgccgc ctggctattc 20  
  
 <210> 8  
 <211> 34 10  
 <212> DNA  
 <213> HIV-2  
  
 <400> 8  
 aaaatcccta gcaggtggc gcccgaaacag ggac 34  
  
 <210> 9  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> HIV-2  
  
 <400> 9  
 gtcacctgttc gggcgccaac ctgctagggg tttt 34  
  
 <210> 10  
 <211> 25 20  
 <212> DNA  
 <213> HIV-2  
  
 <400> 10  
 cggcgcccaa cctgctaggg atttt 25  
  
 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> HIV-2  
  
 <400> 11  
 gtcacctgttc gggcgcca 18  
  
 <210> 12  
 <211> 23 30  
 <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  
 cggcgccac tgctagagat ttt 23  
  
 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220> 40

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

<400> 13  
 cgggcgccac ctgctagga tttt 24

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

<400> 14  
 ccctgttcgg ggcgcaacct gctag 25

<210> 15  
 <211> 52 10  
 <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 gactcactat agggagacgg ggcgcaacct gctagggatt tt 52

<210> 16  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence 20

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

<400> 16  
 aatttaatac gactcactat 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 30

<400> 17  
 aatttaatac gactcactat agggagacgg ggcgcaactgc tagagatttt 50

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

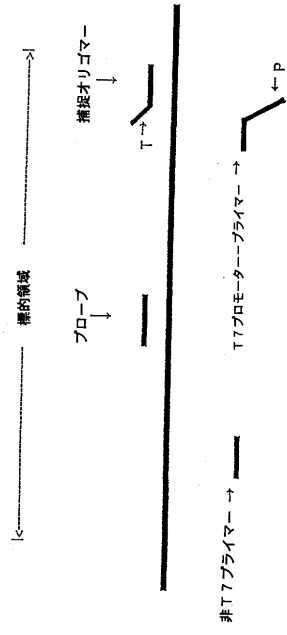
<220>  
 <223> T7 promoter primer having a promoter sequence appended at the 5' end of the sequence given as SEQ ID NO:13

<400> 18 40

gaaattaata cgactcacta tagggagacc acacgggccc cacctgctag ggatttt	57	
<210> 19		
<211> 58		
<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> 19		
gaaattaata cgactcacta tagggagacc acaccctggt cgggogccaa cctgctag	58	
<210> 20		10
<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		20
<211> 18		
<212> DNA		
<213> HIV-2		
<400> 22		
cctggtctgt taggaccc	18	
<210> 23		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> HIV-2		
<400> 23		
ctggtctggt aggaccct	18	
<210> 24		30
<211> 18		
<212> DNA		
<213> HIV-2		
<400> 24		
tggtctgtta ggaccctt	18	
<210> 25		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> HIV-2		
<400> 25		
ggtctgttag gacccttc	18	
<210> 26		40

<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		10
<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		20
<211> 30		
<212> RNA		
<213> HIV-2		
<400> 30		
gaaggguccu aacagaccag ggucuugua	30	
<210> 31		
<211> 53		
<212> DNA		
<213> HIV-2		
<400> 31		
ttcctgcgc cttactgcc tttaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa	53	
<210> 32		30
<211> 51		
<212> DNA		
<213> HIV-2		
<400> 32		
ttcctgcgc cttactggt taaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a	51	
<210> 33		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> HIV-2		
<400> 33		
aaagggcct aacaga	16	
<210> 34		40
<211> 9		
<212> DNA		
<213> HIV-2		
<400> 34		
cgggcgcca	9	

【 図 1 】



## フロントページの続き

- (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92130, サン・ディエゴ, グレンクリフ・ウェイ 1356  
9
- (72)発明者 バーレル, テリー・エイ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92103, サン・ディエゴ, プルモサ・ウェイ 4302

審査官 山中 隆幸

- (56)参考文献 特開2000-093187(JP, A)  
特開平11-069987(JP, A)  
欧州特許出願公開第01026263(EP, A1)  
国際公開第96/003528(WO, A1)  
特表平05-504475(JP, A)  
特表平04-505558(JP, A)  
米国特許第05470572(US, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N1/00-15/00  
CAplus(STN)  
REGISTRY(STN)  
BIOSIS/WPI(DIALOG)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq  
SwissProt/PIR/GeneSeq  
PubMed  
JSTPlus(JDreamII)

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	<a href="#">JP4202750B2</a>	公开(公告)日	2008-12-24
申请号	JP2002537919	申请日	2001-10-22
[标]申请(专利权)人(译)	简·探针公司		
申请(专利权)人(译)	根 - Probe公司		
当前申请(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	C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/53 C07H21/02 C07H21/04 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		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
审查员(译)	山隆行		
优先权	60/242620 2000-10-23 US 60/280058 2001-03-30 US		
其他公开文献	JP2004518416A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 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。

配列	識別子
GTGTGTGTCCCATCTCTC	配列番号2
TGTGTCCCATCTCTCCTAG	配列番号3
GTTCCCATCTCTCCTAGTCGC	配列番号4
TCCTAGTCGCGCCTGGTCA	配列番号5
CCTAGTCGCGCCTGGTCA	配列番号6
TAGTCGCGCCTGGTCATTC	配列番号7