

(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2004-532027
(P2004-532027A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004.10.21)

(51) Int.Cl.⁷

C12Q 1/68
C12N 15/09
G01N 21/78
G01N 33/53
G01N 33/569

F I

C12Q 1/68 ZNAA
G01N 21/78 C
G01N 33/53 M
G01N 33/569 L
C12N 15/00 A

テーマコード (参考)

2G054
4B024
4B063

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 97 頁)

(21) 出願番号 特願2002-582264 (P2002-582264)
(86) (22) 出願日 平成14年4月17日 (2002.4.17)
(85) 翻訳文提出日 平成15年10月17日 (2003.10.17)
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/012035
(87) 国際公開番号 W02002/083927
(87) 国際公開日 平成14年10月24日 (2002.10.24)
(31) 優先権主張番号 60/284, 334
(32) 優先日 平成13年4月17日 (2001.4.17)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

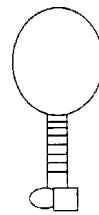
(71) 出願人 593059795
ザ ニューヨーク ブラッド センター
インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 ニューヨーク州 100
21 ニューヨーク イースト シックス
ティセヴンス ストリート 310
(74) 代理人 100082005
弁理士 熊倉 禎男
(74) 代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
(74) 代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
(74) 代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

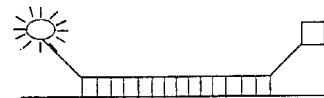
(54) 【発明の名称】 ユニバーサルマルチ変異体検出システム

(57) 【要約】

本発明は、HIV、C型肝炎、B型肝炎(HBV)、パルボウイルスB19等の与えられた病原体の変異体を単一の検出プローブの使用により診断的に検出するための方法を提供する。



A.



B.

Molecular Beacon

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中のターゲット核酸分子の存在を決定するプライマー伸長連鎖反応法において、以下の工程を含む前記方法：

(a) リバースプライマーをターゲット核酸分子と、プライマー伸長連鎖反応を行うのに適した条件下でハイブリダイズする工程；

(b) ターゲット核酸分子を鋳型として用いてリバースプライマーを伸長して、リバースプライマー伸長産物を形成する工程、ここでリバースプライマー伸長産物と結合したリバースプライマーはリバースプライマー増幅産物を構成する；

(c) 前記鋳型由来のリバースプライマー増幅産物を変性させる工程；

10

(d) フォワードプライマーを以下のものとハイブリダイズする工程：

(i) 存在する場合には、ターゲット核酸分子と相補的な核酸分子；又は

(ii) リバースプライマー増幅産物；

(e) 存在する場合には、相補的ターゲット核酸分子又はリバースプライマー増幅産物を鋳型として用いてフォワードプライマーを伸長する工程、ここでフォワードプライマー伸長産物と結合したフォワードプライマーはフォワードプライマー増幅産物を構成する；

(f) 前記鋳型由来のフォワードプライマー増幅産物を変性させる工程；

(g) リバースプライマーをフォワードプライマー増幅産物とハイブリダイズする工程；

(h) フォワードプライマー増幅産物を鋳型として用いてリバースプライマーを伸長して、追加のリバースプライマー伸長産物を形成する工程、ここで追加のリバースプライマー伸長産物と結合したリバースプライマーは追加のリバースプライマー増幅産物を構成する；

20

(i) 前記鋳型由来の追加のリバースプライマー増幅産物を変性させる工程；

(j) フォワードプライマーをリバースプライマー増幅産物とハイブリダイズする工程；

(k) リバースプライマー増幅産物を鋳型として用いてフォワードプライマーを伸長して、追加のフォワードプライマー伸長産物を形成する工程、ここで追加のフォワードプライマー伸長産物と結合したフォワードプライマーは追加のフォワードプライマー増幅産物を構成する；

(l) 前記鋳型由来の追加のフォワードプライマー増幅産物を変性させる工程；

(m) 追加のリバースプライマー増幅産物と追加のフォワードプライマー増幅産物をそれぞれフォワードプライマーとリバースプライマー用の鋳型として用いて、検出可能な量の追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物を産生するのに十分な回数、工程 (g) から (l) を繰り返す工程；及び

30

(n) 追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物の存在を検出する工程；

ここで、リバースプライマーの3'末端のヌクレオチドは以下のものとハイブリダイズし：

(i) フォワードプライマー伸長産物又は追加のフォワードプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチド；又は

(ii) フォワードプライマー伸長産物又は追加のフォワードプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドとはヌクレオチドのギャップで離れたヌクレオチド、ここで前記ギャップは高く保存されていることが知られている配列を含む；及び

40

フォワードプライマーの3'末端のヌクレオチドは以下のものとハイブリダイズする：

(i) リバースプライマー伸長産物又は追加のリバースプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチド；又は

(ii) リバースプライマー伸長産物又は追加のリバースプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドとはヌクレオチドのギャップで離れたヌクレオチド、ここで前記ギャップは高く保存されていることが知られている配列を含む。

【請求項 2】

ターゲット核酸分子が変異体配列を有することが知られている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

50

プライマー伸長連鎖反応がポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ターゲット核酸分子がウイルスである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

ウイルスがヒト免疫不全症ウイルス (HIV) である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

ウイルスが C 型肝炎ウイルス (HCV) 又は B 型肝炎ウイルス (HBV) である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

ギャップがウイルスのゲノムの高く保存された領域を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

ギャップが約 1 ~ 約 5 個のヌクレオチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

ギャップが約 2 個のヌクレオチドを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 (d) (i) のターゲット核酸分子と相補的である核酸分子がターゲット核酸分子の cDNA として単独に与えられる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 11】

追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物の存在を検出する工程が以下の工程を含む、請求項 1 に記載の方法：

(A) 自己変性シグナル発生プローブを用意する工程、ここで前記プローブは以下のものを含む：

(i) 検出可能なシグナルを発生することができるレポーター部分に付着した第 1 核酸配列；

(ii) (a) 第 1 核酸配列に相補的であり、

(b) 第 1 核酸配列と第 2 核酸配列が互いにハイブリダイズする場合にレポーター部分のシグナルを変性することができる相互作用部分に付着した第 2 核酸配列；及び

(iii) 第 1 核酸配列と第 2 核酸配列を繋ぐプローブ配列、ここで前記プローブ配列は以下のもののいずれかを含む：

(a) フォワードプライマーのセグメントのヌクレオチド配列；又は

(b) リバースプライマーのセグメントのヌクレオチド配列；及び

(B) 前記増幅産物を前記プローブと接触させる工程；

ここで、前記プローブのプローブ配列は追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物とハイブリダイズする場合、第 1 及び第 2 核酸配列は変性し、それによってレポーター部分によりシグナルを発生し、

レポーター部分によって発生したシグナルはターゲット分子の存在を示す。

【請求項 12】

プローブ配列が以下のいずれかのものを含む、請求項 11 に記載の方法：

(a) フォワードプライマーのセグメントのヌクレオチド配列、ただしリバースプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列は含まない；又は

(b) リバースプライマーのセグメントのヌクレオチド配列、ただしフォワードプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列は含まない。

【請求項 13】

プローブ配列が以下のいずれかのものを含む、請求項 11 に記載の方法：

(a) フォワードプライマーのセグメントのヌクレオチド配列及びリバースプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列；又は

(b) リバースプライマーのセグメントのヌクレオチド配列及びフォワードプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記プローブによって発生した検出可能なシグナルのレベルがサンプル中のターゲット核酸分子の量に比例する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

約 60 ~ 約 95% の前記プローブ配列が以下のいずれかのものを含む、請求項 1 3 に記載の方法：

(i) フォワードプライマーのセグメントのヌクレオチド配列；又は

(ii) リバースプライマーのセグメントのヌクレオチド配列。

【請求項 1 6】

前記プローブ配列がリバースプライマーのセグメントのヌクレオチド配列を含む場合に、
リバースプライマーとフォワードプライマーのモル比が約 1:5 ~ 約 1:20 の範囲であるか、 10
又は

前記プローブ配列がフォワードプライマーのセグメントのヌクレオチド配列を含む場合に、
フォワードプライマーとリバースプライマーのモル比が約 1:5 ~ 約 1:20 の範囲である、
請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記プローブ配列が約 10 ~ 約 30 個のヌクレオチド残基を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記プローブ配列が約 18 ~ 約 24 個のヌクレオチド残基を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

検出可能なシグナルが発光シグナルである、請求項 1 1 に記載の方法。 20

【請求項 2 0】

発光シグナルが蛍光シグナルである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

発光シグナルが化学発光シグナルである、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2】

レポーター部分が自己変性シグナル発生プローブの 5' 末端又は 3' 末端で付着する、請求項
1 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

相互作用部分が自己変性シグナル発生プローブの 5' 末端又は 3' 末端で付着する、請求項 1
1 に記載の方法。 30

【請求項 2 4】

レポーター部分がフルオロフォアである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

フルオロフォアがキサンテン染料、シアニン染料、ダンシル誘導体、EDANS、クマリン、
ルシファーイエロー、BODIPY、Cy3、Cy5、Cy7、 テキサスレッド、エリトロ
シン、ナフチルアミン、オレゴングリーン、又はそれらの組み合わせである、請求項 2 4
に記載の方法。

【請求項 2 6】

キサンテン染料がフルオレセイン又はローダミンである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

フルオレセインが 5-カルボキシフルオレセイン (5-FAM)、6-カルボキシフルオレセイン
(6-FAM)、2',4',1,4,-テトラクロロフルオレセイン (TET)、2',4',5',7'
,1,4-ヘキサクロロフルオレセイン (HEX)、エオシン、カルシウムグリーン、及び NED から
なる群から選択される、請求項 2 6 に記載の方法。 40

【請求項 2 8】

ローダミンがテトラメチル-6-カルボキシローダミン (TAMRA)、テトラプロパノ-6-カル
ボキシローダミン (ROX)、2',7'ジメトキシ-4',5'-ジクロロ-6-カルボキシローダミン (JOE)、
及びテトラメチルローダミンからなる群から選択される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 9】

相互作用部分がクエンチャーである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 3 0】

クエンチャーが DABCYL、アントロキノン、ニトロチアゾール、ニトロイミダゾール又はマラカイトグリーンである、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

DABCYLが DABSYL、DABMI又はメチルレッドである、請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

相互作用部分がフルオロフォアである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

増幅産物が終点分析により測定及び定量化される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3 4】

増幅産物が実時間分析により測定及び定量化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

増幅産物が一連の閾値サイクル測定から導かれる標準曲線を用いて測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 6】

サンプル中のターゲット核酸分子の検出用キットであって、前記ターゲット核酸分子は変異体配列を有することが知られている、以下のものを含む前記キット：

(i) 請求項 1 に記載の方法に有用な一組のプライマー；

(ii) プライマー伸長連鎖反応を行うための試薬；及び

20

(iii) プライマー増幅産物の存在を検出する自己変性シグナル発生プローブ、ここで前記プローブは検出可能なシグナルを発生することができるレポーター部分に付着した第 1 核酸配列、レポーター部分のシグナルを変性することができる相互作用部分に付着した第 2 核酸配列、並びに第 1 及び第 2 核酸配列を繋ぐプローブ配列を含む。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は2001年4月17日に提出された米国仮出願第60/284,334号の利益を要求し、それは参照によって本明細書に組み込まれるものとする。

【0002】

30

発明の背景

密接に関連している遺伝的変異体の検出は、分析診断の重要な課題である。例えば、ウイルス及びバクテリアのような病原体は、一般にしばしば変異して、前記遺伝的変異体を形成する。

例えば、異なる起源を持っているヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)の核酸配列は、互いに異なっている。異なるタイプのHIV-1はいくつかのグループ及びサブタイプに分けられる。主要なグループMは10個の現在明らかにされているサブタイプから構成され、前記サブタイプはサブタイプA~H、J及びKと呼ばれる。M-グループ・ウイルスに加えて、他の2つのグループ、NとOは、明らかにされている(Simonら、1998、Nature Med、4:1032-1037)。HIV-1複製機構の誤りがちな性質のために、グループ及びサブタイプ内に、新しいウイルスの種は連続的に発生している。

40

同様に、C型肝炎ウイルス(HCV)は、同種のRNA個体群として存在しない。単一の感染した個体内でさえ、多くの異種ウイルスゲノム(準種(quasispecies))が共存するかもしれない。さらに、HCVの多数の遺伝子型は、異なる地域から単離したウイルス変異体のヌクレオチド配列分析に基づいて明らかにされた。1から6まで数によって分類された6つの主なHCV遺伝子型が現在ある。遺伝子型は、サブタイプに従ってさらに細分化される。

【0003】

種内の病原体の前記遺伝的変異のために、信頼できる結果を提供する診断テストの範囲はかなり制限される。サンプル中の病原体を検出するために現在利用できる大抵の検出方法は、病原体の抗原、病原体誘発抗体、又は病原体固有酵素、例えば固有のHIV逆転写酵素

50

の検出のいずれかを基礎とする。不便なことに加えて、前記方法は、しばしばあまり敏感でない。例えば、献血者のHIV-1感染をスクリーニングするために血液銀行で現在実施されている方法は、ウイルス蛋白質に対する抗体の検出である。この方法は、まだウイルスに対する診断抗体を発生していない感染者の急性期の早い段階で個体を検出できない。核酸配列の検出に基づくスクリーニング方法は、敏感で、簡便である。しかし、これらの検査は、必ずしも密接に関連した遺伝的変異体の検出にとって信頼できるとは限らない。現在利用できる核酸配列に基づく検出方法の1つは、分子ビーコンを利用する (Tyagi and Kramer, 1996, Nat. Biotechnol., 14(3):303-308)。分子ビーコンは、基部-ループ (stem-loop) 構造を有する一本鎖オリゴヌクレオチドプローブである (図1参照)。分子のループ部分はターゲット核酸分子に相補的なプローブ配列である。基部は、プローブ配列の末端で相補的なアーム配列のアニリングによって形成される。蛍光性部分は一つのアームの末端に付着し、クエンチング部分はもう一つのアームの末端に付着している。基部のアームの互いへのハイブリダイゼーションはこれら二つの部分を極めて接近した状態に保ち、フルオロフォアの蛍光がエネルギー移動によってクエンチされる (図1a)。ビーコンの相補的DNAターゲットの存在下で、前記ループ構造は前記ターゲットとハイブリダイズし、基部のアームがハイブリダイズしたまま残らないようにする。フルオロフォアとクエンチャーは物理的に離されて、蛍光が得られる (図1b)。

分子ビーコンはリアルタイム定量的PCRのために現在使用される。PCRプライマーは、通常長さが20塩基対未満で、DNAの特定のセグメントを増幅するようにデザインされている。そのループが増幅されたDNA鎖の1つの短い (20~25b.p.) 領域に相補的であるように、ビーコンは一般的にデザインされる。前記増幅されたDNA鎖の相補的な領域は前記鎖の一部であり、前記プライマーに加えられている。

【0004】

分子ビーコンは極めて配列特異的である。実際、この技術の原理的用途の一つは、近年、対立遺伝子の識別又は“分子の遺伝形質を決める (genotyping)” ためにある。分子ビーコンの配列変異に対する感受性は、単一のヌクレオチドであっても与えられたターゲット配列における多形の識別を与える (Tyagiら、1998, Nat. Biotechnol., 16(1):49-53; Kostrikisら、1998, Science, 279:5354:1228-9; Marrasら、1999, Genet. Anal., 14(5-6) 151-6; Tappら、2000, Biotechniques, 28(4):732-8)。

現在まで、配列変異に対するこの感受性は、ウイルス感染の診断への分子ビーコン技術の適用を厳しく制限している。分子ビーコンは、DNA又はRNAターゲットの変異体配列を効率的に検出することができない。例えば、HIV株AからのPCR産物を認識するためにデザインされたビーコンは、HIV株BからのPCR産物を認識することができない (図2参照)。

このように、前記技術は、ウイルスのすべての異なる遺伝子型の検出を可能にするために、いくつかの異なるビーコンを必要とするであろう。すなわち、HIV-1のゲノムのある保存性の高い領域が存在することが知られていても、いくつかの異なるビーコンがこのウイルスのすべての知られているサブタイプを検出するために必要とされる可能性が高い。さらに、いくつかの異なるビーコンを使用しても、明らかにされていないHIV-1のその他の変異体は検出されないかもしれない。

このように、前記技術は、病原体のすべての関連した遺伝的変異体の検出のために便利な又は効率的な診断アッセイを提供しない。

非常に密接な遺伝的変異体を検出することができる敏感で、便利な核酸に基づくスクリーニングアッセイの差し迫った必要性が存在する。すなわち、直接汚染された血において、ウイルス、バクテリア及びその他の病原体を検出することができるアッセイが必要である。このようなアッセイは、病原体感染の急性期の早い段階、例えば個体がウイルスに対する診断抗体を発生する前に、個体から血又は血漿単位を検出するために必要とされる。従って、本発明の目的の1つは、特定のターゲット核酸分子の多数の変異体の検出に便利で、効率的な診断アッセイを提供することによって従来技術における上記制限を克服することである。

【0005】

10

20

30

40

50

発明の要約

これらとその他の目的は、当業者にとって明らかであるよう、HIV、C型肝炎、B型肝炎（HBV）、パルボウイルスB19といった与えられた病原体の変異体を、単一の検出プローブの使用、すなわちユニバーサルマルチ変異体検出システムによって、診断上検出する方法を提供することにより達成される。一の実施態様において、前記単一の検出プローブは分子ビーコンである。

【0006】

好ましい実施態様の詳細な説明

本発明は、単一の検出プローブの使用により生物学的サンプル中のターゲット核酸分子の存在を決定する方法を提供する。

10

前記方法は、プライマー伸長連鎖反応によるターゲット核酸分子の増幅を含み、前記反応のプライマーは、以下に記載されるように、フォワード及びリバースプライマーを含む一組の“向かい合う（nose-to-nose）”プライマーである（図3及び4参照）。

ターゲット核酸分子は、その全配列又は部分配列がプライマー伸長連鎖反応プライマーを作製するためによく知られている核酸分子である。ターゲット核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であってもよい。

ターゲット核酸分子は相同性の高い配列のファミリーとして存在する。ファミリー内のこれらの異なる配列は変異体として参照される。変異体の起源は、例えば遺伝子変異及び遺伝子多形を含む。

変異体を有することが知られている核酸分子としては、例えばウイルスとバクテリアが挙げられる。ウイルスの例としては、HIV、HCV、HBV及びヒトパルボウイルスB19が挙げられる。バクテリアの例としては、大腸菌（*E. coli*）、肺炎連鎖球菌（*S. pneumoniae*）、髄膜炎菌（*N. meningitidis*）、淋菌（*N. gonorrhoeae*）、結核菌（*M. Tuberculosis*）及びボレリア属（*Borrelia*）種（ライム病）が挙げられる。

20

ターゲット核酸分子が検出され得る生物学的サンプルは、任意の体液、細胞又は細胞片である。生物学的サンプルの例としては、血、血清、精液、粘液又はその他の滲出液が挙げられる。

本発明は、ターゲット核酸分子又は前記分子の小領域の増幅をもたらす任意のタイプのプライマー伸長連鎖反応で使用できる。増幅反応は、例えば定量的PCR等のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ストランド置換増幅（SDA）、転写媒介増幅（TMA）、及び核酸配列に基づく増幅（NASBA）が挙げられる。NASBAはRNAを増幅する。NASBAはEP-A-0 329 822に記載される。

30

従来ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅方法は、当該技術においてよく知られている。ポリメラーゼ連鎖反応を実行するのに適した条件は、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第4,965,188号に記載されている。パーキン・エルマー（ノーウォーク、コネチカット）のような商業上のベンダーは、PCR試薬を市場に出し、PCRプロトコルを公表する。PCR増幅反応混合物は、増幅反応を実行するのに必要な試薬を含む。一般的に、前記混合物は、好適な緩衝剤中に熱安定性DNAポリメラーゼ、デオキシヌクレオシド5'三リン酸（dNTP's）、及び2価の金属陽イオンのような重合剤を含む。

【0007】

40

DNA又はRNAターゲット配列のいずれかは、本発明の方法によって増幅できる。ウイルスのゲノムの核酸のようなRNAターゲットのPCR増幅の場合、第一工程は、ターゲット配列のDNAコピー（cDNA）の合成である。逆転写は、別々の工程として、又は好ましくは、複合逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）で実行できる。RNAのRT-PCR増幅は、当該技術においてよく知られ、米国特許第5,322,770号及び及び5,310,652号；Myers and Gelfand, 1991, *Biochemistry* 30(31):7661-7666；米国特許第5,527,669号；Youngら、1993, *J. Clin. Microbiol.* 31(4):882-886；及びYoungら、1995, *J. Clin. Microbiol.* 33(3):654-657に記載されている。

プライマーは前記PCR反応混合物にも含まれる。プライマーはオリゴヌクレオチドであり、鋳型核酸分子にハイブリダイズするときに、増幅反応中に合成開始点としての機能を果

50

たすことができる。鋳型核酸は最初のターゲット核酸分子であり、増幅産物は前記分子から産生される。

本発明のプライマーの長さは重要ではない。一般的に、プライマーの長さは、約15~55個のヌクレオチドの範囲であり、より一般的には約20~45個のヌクレオチド、最も一般的には約25~35個のヌクレオチドである。好ましくは、プライマーは、プライマーとその鋳型のために許容できるミスマッチの数を最大限にする相対的な長さ(>30塩基)であると考えられる。プライマー対は、同じ長さである必要はない。例えば、フォワードプライマーは29個のヌクレオチドで構成されていてもよく、リバースプライマーは22個のヌクレオチドで構成されていてもよい。

前記プライマーは天然又は合成であってもよい。PCRについて、前記プライマーは、好ましくは一本鎖オリゴデオキシリボヌクレオチドである。 10

ハイブリダイゼーションは、相補的な塩基の対形成の結果、2つの一本鎖核酸によって二重構造の形成を参照する。ハイブリダイゼーションは、完全に相補的である核酸ストランド間で、又はミスマッチのより少ない領域を含む“実質的に相補的である”核酸ストランド、すなわち変異体間で起こり得る。ミスマッチの許容される程度は、ハイブリダイゼーション条件の適切な調整によって調整できる。完全に相補的である核酸ストランドがハイブリダイズする条件は、“ストリンジентなハイブリダイゼーション条件”又は“配列-特異的ハイブリダイゼーション条件”と呼ばれる。実質的に相補的な配列の安定な二重鎖は、より少ないストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で達成できる。

【0008】

プライマーがプライマーと鋳型との間のミスマッチを許容することができるように、本発明のハイブリダイゼーション条件、すなわちストリンジエンシーがセットされ、それによってすべての遺伝的変異体へのハイブリダイゼーションを可能にする。例えば、条件は、プライマーと鋳型との間のハイブリダイゼーションがプライマーと鋳型との間に最大20%の塩基対のミスマッチを生じるようにセットされる。

当該技術によって与えられるガイダンスに従って、核酸技術の当業者は、経験的に多くの変数、例えばオリゴヌクレオチドの長さ及び塩基対濃度、イオン強度、ミスマッチした塩基対の発生率、及びオリゴヌクレオチドアニリングで選ばれた温度を考慮して適したハイブリダイゼーション条件を決めることができる(例えば、Sambrookら、1989, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, コールドスプリング 30
グ港, ニューヨーク;Wetmur、1991, Critical Reviews in Biochem. And Mol. Biol. 26(3/4):227-259;Ausubelら(編集)、1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク) at Unit 2.10;及び米国特許第5,789,550号)。本発明のプライマー伸長連鎖反応のサイクルの詳細な記述は以下の通りである。記載される特定の反応はPCRである。しかし、その他のタイプのプライマー伸長連鎖反応は、本発明の方法で使用することができる。

図10は、本発明の増幅反応の段階的な例を与える。ターゲット核酸分子はTで表される。ターゲット配列内のXは可能性のある変異のサイトを表す。

ターゲット核酸分子は、一本鎖分子として、又は二本鎖分子の一部として存在することができる。図10で説明された例において、前記ターゲット核酸分子は二本鎖である。TCは 40
、Tに相補的である核酸分子を表す。

従来のPCRでのように、増幅反応の各サイクルにおいて、サンプルにおける任意の二本鎖核酸分子は、変性によって一本鎖化される。次いで、ハイブリダイゼーションは、プライマーとターゲット核酸分子の間に生じる。図10(a)は、リバースプライマー(RP)とターゲット核酸配列(T)の間のハイブリダイゼーションを説明する。

【0009】

図10(b)に示されるように、リバースプライマーは、鋳型としてターゲット核酸分子を用いて、リバースプライマー増幅産物(RPA)を形成するために広げられる。リバースプライマー増幅産物(RPA)は、リバースプライマー伸長産物(RPE)と結合したリバースプライマー(RP)を含む。この明細書の目的のために、リバースプライマー伸長産物は、 50

リバースプライマーに加えられる核酸セグメントである。

図10(b)を見ても分かるように、ターゲット配列に含まれる変異(X)の一部は、RPAに現れない。特異的に、RPで構成されているRPAの一部分は、変異を含まない。

図10(c)に示されるように、工程(b)で形成されたリバースプライマー増幅産物は、その鋳型から変性される。

フォワードプライマー(FP)は、(i)存在する場合、ターゲット核酸分子(TC)に相補的である核酸分子；又は(ii)リバースプライマー増幅産物(RPA)のいずれかとハイブリダイズする。図10(d)は前者の実施態様を説明する。ターゲット核酸分子に相補的である核酸分子は、ターゲット核酸分子が二本鎖分子の一部であった場合、存在するであろう。

フォワードプライマーは、鋳型として相補的である核酸分子(TC)又はリバースプライマー増幅産物(RPA)を用いて、広げられる。図10(e)は前者の実施態様を説明する。

図10(e)に示されるように、フォワードプライマーは、フォワードプライマー増幅産物(FPA)を形成するために、広げられる。フォワードプライマー増幅産物(FPA)は、フォワードプライマー伸長産物(FPE)と結合したフォワードプライマー(FP)を含む。この明細書の目的のために、フォワードプライマー伸長産物は、フォワードプライマーに加えられる核酸セグメントである。

図10(e)に示されるように、ターゲット配列と比較した場合、ターゲット配列に含まれる変異(X)の一部は、FPAに現れない。

【0010】

特異的に、FPで構成されているFPAの一部分は変異を含まない。

図10(f)に示されるように、図10(e)で形成されるフォワードプライマー増幅産物はその鋳型から変性される。

図10(g)に示されるように、リバースプライマーはFPAのFPE部分にハイブリダイズする。

図10(h)に示されるように、リバースプライマーは、鋳型としてFPAのFP部分を用いて、追加のリバースプライマー増幅産物(ARPA)を形成するために伸長され、追加のリバースプライマー伸長産物(ARPE)と結合したリバースプライマーはARPAを構成する。

図10(i)に示されるように、ARPA産物はその鋳型から変性される。

図10(j)に示されるように、フォワードプライマーはRPAのRPE部分にハイブリダイズする。

図10(k)に示されるように、フォワードプライマーは、鋳型としてRPAのRP部分を用いて、追加のフォワードプライマー増幅産物を形成するために伸長され、追加のフォワードプライマー伸長産物と結合したフォワードプライマーはAFPAを構成する。

図10(l)に示されるように、AFPA産物はその鋳型から変性される。

リバース及びフォワードプライマーのために鋳型として追加のリバースプライマー増幅産物及び追加のフォワードプライマー増幅産物を用いて、追加のリバースプライマー増幅産物及び/又は追加のフォワードプライマー増幅産物の検出可能な量を産生するのに十分な回数、工程(g)から(l)は繰り返される。好ましくは、前記工程は、自動サイクリング装置を用いて繰り返し行われる。十分な回数は、少なくとも約10回、好ましくは少なくとも約20回、より好ましくは少なくとも約30回、最も好ましくは少なくとも約40回である。

【0011】

プライマーがある方法で増幅産物とハイブリダイズするとき、本発明者らは利点を発見し、発明者はそれを“向かい合う(nose-to-nose)”と呼ぶ。

図10(g)を見ても分かるように、フォワードプライマー増幅産物及び追加のフォワードプライマー増幅産物の配列は、リバースプライマーの3'末端のヌクレオチドがフォワードプライマー伸長産物又は追加のフォワードプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドとハイブリダイズするものである。

同じように、図10(j)を見ても分かるように、リバースプライマー増幅産物及び追加

10

20

30

40

50

のリバースプライマー増幅産物の配列は、フォワードプライマーの3'末端のヌクレオチドがリバースプライマー伸長産物又は追加のリバースプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドとハイブリダイズするものである。

図10はただ1つの変異体のプライマー伸長連鎖反応を説明する。上で示したように、病原体のファミリーのすべての変異体は、発明の方法によって増幅できる。

どちらの変異体からそれらが産生されたかにかかわらず、追加の増幅産物は同一である。このように、図10に示される例において、追加のリバースプライマー増幅産物は、追加のリバースプライマー伸長産物と直接結合したリバースプライマーの配列を有する。追加のリバースプライマー伸長産物は、フォワードプライマーと相補的である(フォワードプライマー補体)。図10(h)参照のこと。

10

同じように、追加のフォワードプライマー増幅産物は、追加のフォワードプライマー伸長産物に直接に結合したフォワードプライマーの配列を有する。追加のフォワードプライマー伸長産物は、リバースプライマーと相補的である(リバースプライマー補体)。図10(k)を参照のこと。

従って、すべての追加のプライマー増幅産物は、リバースプライマーとフォワードプライマー補体、又はリバースプライマー補体とフォワードプライマーのいずれかの組み合わせである配列を有する。リバース及びフォワードプライマーすべてが同じ配列を有するために、すべての追加のプライマー増幅産物は同じ配列を有する。つまり、すべての可能な変異は排除される。

【0012】

20

別の実施態様において、フォワードプライマー増幅産物及び追加のフォワードプライマー増幅産物の配列は、リバースプライマーの3'末端のヌクレオチドが、フォワードプライマー伸長産物又は追加のフォワードプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドからヌクレオチドのギャップによって隔てられたヌクレオチドとハイブリダイズするものである。同様に、リバースプライマー増幅産物及び追加のリバースプライマー増幅産物の配列は、フォワードプライマーの3'末端のヌクレオチドが、リバースプライマー伸長産物又は追加のリバースプライマー伸長産物の5'末端のヌクレオチドからヌクレオチドのギャップによって隔てられたヌクレオチドとハイブリダイズするものである。

両方の場合において、ギャップは保存性の高いことが知られた配列を含む。ウイルス及びバクテリアのゲノムの保存性の高い領域は知られている。例えば、HCVの公表された配列において、ウイルスゲノムの5'非翻訳領域における核酸の短い広がり、HCV遺伝子型間で高く保存されていることが知られている(Okamotoら、J. Gen. Virol., 1991, 2697-2704; Smithら、J. Gen. Virol., 1995, 76:1749-1761; Simmondsら、J. Gen. Virol., 1993, 74:2391-2399)。

30

ギャップは、好ましくは5個以下のヌクレオチドを含む。ギャップが2~5個のヌクレオチドを含む場合、1又は2個のヌクレオチドはミスマッチであってもよく、プローブ配列とまだハイブリダイズすることができる。ギャップが1個のヌクレオチドを含む場合、このヌクレオチドはミスマッチであってもよい。好ましくは、いかなるミスマッチもない。

一旦増幅反応が完了すると、追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物の存在は、当該技術において知られている方法によって検出される。

40

好ましくは、検出の方法は、追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物の核酸配列の検出に基づく。このような方法で使われる検出プローブは、追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物とハイブリダイズすることができる配列を含む。これらの増幅産物は同一であるため、ただ1つの検出プローブがすべての増幅産物を正確に検出するために必要とされる。

【0013】

さらに、増幅産物の同定は、検出にとって必須のハイブリダイゼーションの間に使われるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を与える。ストリンジェントな条件の使用は、偶然によく似た非ターゲット配列に由来する偽陽性の可能性を減少させることによってより正確な結果をもたらす。

50

検出プローブは、DNA、RNA、又はその組み合わせであってもよい。修正されたヌクレオチドとしては、例えばペプチド核酸（PNA）、ニトロピロール-ベースのヌクレオチド、又は2'-O-メチルリボヌクレオチドが挙げられる。核酸又は修正された核酸分子のヌクレオシドは、通常の方法で、すなわちリン酸リンケージにより連結してもよい。あるいは、ヌクレオシドは、修正されたリンケージ、例えばホスホロチオエートにより連結してもよい。一の実施態様において、プローブ配列は、増幅産物における結合を越えてハイブリダイズする。すなわち、プローブ配列は、AFPAのFP配列とAFPE配列の両方の一部にハイブリダイズし、又はプローブ配列は、ARPAのRP配列及びARPE配列の両方の一部にハイブリダイズする。

この実施態様において、プローブ配列は、1つのプライマーのセグメントのヌクレオチド配列及びもう1つのプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列を含む。より詳細には、プローブ配列は、(i) フォワードプライマーのセグメントのヌクレオチド配列とリバースプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列、又は(ii) リバースプライマーのセグメントのヌクレオチド配列とフォワードプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列のいずれかを含む。プローブ配列は、プライマーの全体又は一部の配列のいずれかと、もう1つのプライマーの補体を含むことができる。

プローブ配列は、1つのプライマーのヌクレオチド配列ともう1つのプライマーの補体のヌクレオチド配列の等しい部分で構成されていてもよい。このような場合、プローブ配列は、増幅産物に“対称的にハイブリダイズ”する（図5A（I）参照）。

【0014】

好ましくは、改善された感受性のために、プローブ配列は増幅産物に“非対称にハイブリダイズする”ようにデザインできる。特に、プローブ配列は、1つのプライマーのヌクレオチド配列ともう1つのプライマーの補体のヌクレオチド配列の等しくない部分で構成できる（図5A（II-IV）参照）。例えば、約60%から約99%のプローブ配列は1つのプライマーのヌクレオチド配列を含む。プローブ配列の残り（例えば、約1%～約40%）は、もう1つのプライマーの補体のヌクレオチド配列を含む。より好ましくは、1つのプライマーの配列と一致するプローブ配列の割合は、約80%から約97%である。

追加の増幅産物の配列がもう1つのプライマーの補体のセグメントに直接隣接した1つのプライマーのセグメントを含む場合、プローブ配列は、追加の増幅産物のすべて、又は一部に正確にハイブリダイズするようにデザインできる。

追加の増幅産物が介在ギャップを含む場合、ギャップは、プローブ配列がギャップと完全に相補的であるようにデザインできるように、好ましくは知られた配列である。しかし、プローブ配列は、上述のように、ギャップにおけるいくらかのミスマッチ残基を含む追加の増幅産物にハイブリダイズできる。

連結部をまたがってハイブリダイズする代わりに、プローブ配列は、またプライマーに相補的である追加の増幅産物のセグメントでのみハイブリダイズできる。従って、この実施態様において、プローブ配列は以下のいずれかを含む：フォワードプライマーのセグメントのヌクレオチド配列、かつリバースプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列ではない；又はリバースプライマーのセグメントのヌクレオチド配列、かつフォワードプライマーに相補的であるセグメントのヌクレオチド配列ではない。

本発明のプライマー伸長連鎖反応の一の実施態様において、等しい濃度のフォワードプライマーとリバースプライマーが使用される。この実施態様において、濃度は対称であるといわれている。

【0015】

好ましい実施態様において、フォワード及びリバースプライマーの“非対称濃度”が使用される。特に、改善された感受性のために、ヌクレオチド配列がプローブ配列の一部を構成するプライマーは、もう1つのプライマーと比較してサンプル中により低い濃度で与えられる。プローブ配列が追加の増幅産物と“非対称にハイブリダイズする”場合、又はプライマーに相補的である追加の増幅産物のセグメントでのみハイブリダイズする場合、プライマーの“非対称濃度”は特に好ましい。

10

20

30

40

50

例えば、プローブ配列がフォワードプライマーのヌクレオチド配列のセグメントを含む場合、フォワードプライマーとリバースプライマーのモル比 (FP:RP) は約1:5から約1:20である。同様に、プローブ配列がリバースプライマーのヌクレオチド配列のセグメントを含む場合、リバースプライマーとフォワードプライマーのモル比 (RP:FP) は、約1:5から約1:20であり、好ましくは約1:6から約1:15であり、最も好ましくは約1:10である。

増幅反応が生体サンプルで十分な回数起こった後、検出プローブをサンプルと接触させる。検出プローブのプローブ配列は、サンプル中に存在するかもしれないどんな追加の増幅産物ともハイブリダイズする。プローブ配列がフォワードプライマーのセグメントのヌクレオチド配列を含む (単独に、又はさらにリバースプライマー補体のセグメントのヌクレオチド配列を含む) 場合、プローブ配列は追加のリバースプライマー増幅産物とハイブリダイズするのである。同様に、プローブ配列がリバースプライマーのセグメントのヌクレオチド配列を含む (単独に、又はさらにフォワードプライマー補体のセグメントのヌクレオチド配列を含む) 場合、プローブ配列は追加のフォワードプライマー増幅産物とハイブリダイズするのである。

10

【0016】

好ましい実施態様において、検出プローブは自己改変シグナル発生プローブである。このプローブは、第1核酸配列；第1核酸配列に相補的である第2核酸配列；及び第1核酸配列を第2核酸配列と連結するプローブ配列を含む。第1核酸配列は、検出可能なシグナルを発生することができるレポーター部分と結合する。レポーター部分及び相互作用部分が互いに十分に近接している場合、第2核酸配列は、レポーター部分によって発生したシグナルを変えることができる相互作用部分と結合する。例えば、第1及び第2核酸配列が互いに“クローズドコンホメーション”として知られているハイブリダイズする場合、レポーター部分は相互作用部分と近接される。従って、シグナルは改変される。シグナルを改変することは、低減、すなわちクエンチング；増加；又はシグナルの強度又は波長のようなシグナルを変える別の方法を含む。シグナルをクエンチングすることはシグナルを低減又は取り除くことを含む。

20

レポーター及び相互作用部分は、追加の増幅産物の検出のためにレポーター部分によって発生したシグナルの相互作用部分による改変を与える検出プローブの任意の点で結合できる。好ましい実施態様において、レポーター部分及び相互作用部分は、自己改変シグナル発生プローブの末端に結合される。

30

追加の増幅産物がない場合、検出プローブはクローズドコンホメーションにある。レポーター及び相互作用部分は互いに近接している。従って、シグナルは改変される。

追加のリバースプライマー増幅産物又は追加のフォワードプライマー増幅産物を有するプローブ配列のハイブリダイゼーションにより、検出プローブの第1及び第2核酸配列は変性する。このことは、“オープンコンホメーション”として知られている。

変性により、相互作用部分は、シグナルを変えるために、もはやレポーター部分と十分に近接していない。変えられたシグナルと不変のシグナルの間の違いが検出される。相互作用部分がシグナルをクエンチするとき、例えば不変シグナルが増え；又はクエンチングが完全である場合、シグナルは生成される。

第1及び第2核酸の間で形成されたハイブリダイゼーション (すなわちプローブの茎) の強度は、完全な機能を達成するルーチン実験によって調節できる。例えば、強度はヌクレオチドの長さの関数である。第1及び第2核酸配列の長さは、約3~15の範囲が好ましく、より好ましくは約4~7ヌクレオチドである。長さに加えて、ハイブリダイゼーションの強度はG-C含有量を減少させることによって、及びヌクレオチドのミスマッチを不安定化することを組み入れることによって低減できる。

40

【0017】

プローブ配列の長さは重要ではない。しかし、長さは、追加の増幅産物と効果的に結合できないほど短くはできない。さらに、長さは、プローブ配列が産物とハイブリダイズされるにもかかわらずレポーター部分と相互作用部分を分離できないほど長くできない。好ましくは、プローブ配列は約10~約30のヌクレオチドを含み、より好ましくは約18~約24の

50

ヌクレオチド、最も好ましくは約19～約22のヌクレオチドである。プローブは溶液中では遊離することができ、又は固体表面に拘束することができる。

検出可能なシグナルを生じる検出プローブのどんな濃度も、本方法で使用できる。例えば、検出プローブの濃度はプライマーの1つ、又は両方とほぼ同じ濃度でサンプルに与えられる。

好ましくは、検出プローブの濃度はプライマーの濃度よりも多い。このように、検出プローブは、核酸配列がプローブ配列の一部であるプライマーと追加の増幅産物のための検出プローブの間での競争で有利である。プローブ配列が増幅産物に“非対称にハイブリダイズする”かあるいは上述のようにプライマーに相補的である追加の増幅産物の一部分にのみハイブリダイズする場合、検出プローブの濃度のこの増加は特に好ましい。例えば、検出プローブは、核酸配列がプローブ配列の一部でないプライマーの濃度の約1.3～約5倍、より好ましくは約1.5～約3倍、最も好ましくは約2倍である濃度で提供される。

好ましい実施態様において、プローブ配列は、例えば、フォワードプライマーの少なくとも65%の配列で作製され、フォワードプライマーはリバースプライマーの濃度約10分の1よりも少ない濃度で提供され、検出プローブはリバースプライマーの2倍の濃度で提供される。

【0018】

レポーター部分によって生成された不変シグナルは、ターゲット核酸分子がサンプルに存在する指標である。プローブによって生成された検出可能な不変シグナルのレベルは、サンプル中のターゲット核酸分子の量に比例する。

検出プローブの検出可能なシグナルは、例えば、発光シグナル、色染料シグナル、又は放射性シグナル等の任意の種類シグナルであってもよい。好ましい実施態様において、検出可能なシグナルは発光シグナルである。発光シグナルは蛍光シグナル又は化学発光シグナルであってもよい。

一の実施態様において、本発明のレポーター及び相互作用部分は、“FRET”対を構成する (Selvin, P.R., “Fluorescence Resonance Energy Transfer”, *Methods in Enzymology* 246: 300-335 (1995).)。FRET対はシグナル発生をエネルギー移動に頼る。レポーター部分は、第1波長のエネルギーを吸収し、第2の、より長い波長を放出する。相互作用部分は、相互作用部分のスペクトルが放射スペクトルと重なる程度まで放出したエネルギーの一部又はほとんどを吸収する。相互作用部分がクエンチャーである場合、クエンチャーは熱としてエネルギーを放出する。相互作用部分がフルオロフォアである場合、相互作用部分の吸収スペクトルがレポーター部分の放射スペクトルと重なることを要求する。FRET相互作用の効率、その重なりと正比例する。

【0019】

別の実施態様において、レポーター部分と相互作用部分は、非FRET対である。特に、相互作用部分は、レポーター部分の放射スペクトルと重なる吸収スペクトルを有する必要はない。すなわち、相互作用部分の吸収波長は、レポーターの励起最大波長と放射波長よりも短くてもよい。非FRET対は米国特許第6,150,097号に記載され、それは参照により本明細書に組み込まれるものとする。非FRET対の検出可能なシグナルは、発光における変化に代わるものとして、吸収スペクトルの変化であってもよい。

好ましくは、本発明の方法で使用される検出プローブのレポーター部分は、フルオロフォアである。フルオロフォアは、キサンテン染料、シアニン染料、ダンシル誘導体、EDANS、3-フェニル-7-イソシアナトクマリン (isocyanatocoumarin) のようなクマリン、ルシファーイエロー、BODIPY、Cy3、Cy5、Cy7、テキサスレッド、エリトロシン、ナフチルアミン、オレゴングリーン、ALEXA蛍光色素、9-イソチオシアナトアクリジン (isothiocyanatoacridine) 及びアクリジンオレンジのようなアクリジン類、N-(p-(2-ベンゾキサゾリル)フェニル)マレイミド、ベンゾキサジアゾール類、スチルベン類及びピレン類であってもよい。

キサンテン染料は、フルオレセイン又はローダミンであってもよい。好ましくは、フルオ

10

20

30

40

50

レセインは、5-カルボキシフルオレセイン (5-FAM) ; 6-カルボキシフルオレセイン (6-FAM) ; 2',4',1,4,-テトラクロロフルオレセイン (TET) ; 2',4',5',7',1,4-ヘキサクロロフルオレセイン (HEX) ; エオシン ; カルシウムグリーン : フルオレセインイソチオシアネート (FITC) ; 又は NED である。好ましくは、ローダミン染料は、テトラメチル-6-カルボキシローダミン (TAMRA) ; テトラプロパノ-6-カルボキシローダミン (ROX) ; 2',7'ジメトキシ-4',5'-ジクロロ-6-カルボキシローダミン (JOE) 又はテトラメチルローダミン (TMR) である。多くの適した形態のこれらの化合物は、結合部位として、又はオリゴヌクレオチドとの結合の機能の結合として使用できるそのキサンテン環に様々な置換基を有するものとして市販されている。

また、フルオロフォアはナフチルアミン化合物であってもよい。ナフチルアミン化合物はアルファ又はベータ位にアミノ基を有する。このようなナフチルアミノ化合物としては、1-ジメチルアミノナフチル-5-スルホネート、1-アニリノ-8-ナフタレンスルホネート及び2-p-トルイジニル-6-ナフタレンスルホネートが挙げられる。

また、フルオロフォアは組み合わせフルオロフォアであってもよい。組み合わせフルオロフォアの例は、例えば Lee ら (1997), *Nucleic Acids Research* 25:2816 に記載されたフルオレセイン-ローダミンダイマーである。フルオロフォアは、可視スペクトル内で、又は可視スペクトルの外側、例えば紫外線又は赤外線範囲で吸収及び放射するように選んでもよい。

【0020】

好ましくは、本発明の方法で使用される検出プローブの相互作用部分はクエンチャーである。クエンチャーは、DABCYL、アントロキノン、ニトロチアゾール、ニトロイミダゾール又はマラカイトグリーンであってもよい。また、DABSYL、DABMI 又はメチルレッドのような DABCYL の変異体も適している。また、米国特許第 6,080,868 号に開示される非対称シアニン染料化合物は、クエンチング部分として使用でき、それは参照により本明細書に組み込まれるものとする。

さらにまた、フルオロフォアはクエンチャーとして使用できる。例えば、プローブがオープンコンホメーションである場合に検出範囲で蛍光を発しないフルオロフォアは、他の特定のフルオロフォアに接近する場合に蛍光をクエンチできる。

自己改変シグナル発生プローブの例は、分子ビーコンプローブである。分子ビーコンプローブのループは、上述のようにプローブ配列と一致する。“アーム”と呼ばれるヌクレオチド配列は、上述のように第1及び第2ヌクレオチド配列と一致する。分子ビーコンプローブは、米国特許第 5,925,517 号 ; PCT 出願 W095/13399 ; PCT 出願 W097/39008 ; 及び Tyagi and Kramer (1996) *Nature Biotechnology* 14:303 に記載され、それらは参照により本明細書に組み込まれるものとする。

さらに、分子ビーコンプローブは、増幅産物の検出を可能にするどんな様式で修正してもよい。修正されたプローブとしては、例えば米国特許第 6,037,130 号に記載される“波長シフト”分子ビーコンプローブが挙げられ、それは参照により本明細書に組み込まれるものとする。特に、これらの修正されたプローブは、基本的分子ビーコンプローブ構造、すなわちループ ; 茎デュプレックス ; 一端のクエンチャー ; 及びもう一方の端にクエンチャーとは逆のレポーター部分、一般的にはフルオロフォアを有する。レポーターは“ハーベスターレポーター”とも呼ばれる。プローブの修正は、プローブが“ハーベスターレポーター”の後にいくつかのヌクレオチドの延長を含むことである。延長は、“エミッターレポーター”、一般的には他のフルオロフォアと結合するヌクレオチドで終結する。ターゲット核酸分子の存在下で、クエンチャーはレポーターから分離する。このオープンコンホメーションにおいて、“ハーベスターレポーター”は励起源からエネルギーを吸収するが、エネルギーの有意な部分を、いくつかの構成においては大部分のエネルギーを“エミッターレポーター”に移し、前記エミッターレポーターは移されたエネルギーを受け取り、その特徴であるより長い波長で放射する。

【0021】

別の実施態様において、検出プローブは、追加の増幅産物の隣接領域に相補的である1対

10

20

30

40

50

のオリゴデオキシヌクレオチドを含む (Cardulloら、(1988), Proc. Nat'l. Acad. Sci. 85:8790-8794及びHellerら、EP 00 70685)。1つのオリゴデオキシヌクレオチドは、その5'末端にレポーター部分を含み、もう1つのオリゴデオキシヌクレオチドは、その3'末端に相互作用部分を含む。プローブがターゲット配列にハイブリダイズする場合、2つの部分は互いに接近する。サンプルが適切な振動数の光によって刺激される場合、蛍光共鳴エネルギーは1つの部分からもう1つの部分に移動し、前記部分からスペクトル応答における測定可能な変化を生じ、その結果ターゲットの存在を示唆する。

更に別の実施態様において、検出プローブは一对のオリゴデオキシヌクレオチドを含む。前記1対はお互いに相補的である。また、前記1対の1つはターゲット核酸分子の配列を有し、前記1対のもう1つはターゲット核酸分子に相補的である配列を有する (Morrison and Stols, "Sensitive Fluorescence-Based Thermodynamic and Kinetic Measurements of DNA Hybridization in Solution", Biochemistry 32: 309-3104 (1993)及びMorrison EP 0 232 967 A2,、1986年1月10日に出願された米国出願番号第817,841号の優先権主張)。プローブの各オリゴデオキシヌクレオチドは、その3'末端と結合したレポーター部分及びその5'末端と結合した相互作用部分を含む。プローブの2つのオリゴヌクレオチドが互いにアニールされる場合、それぞれのレポーター部分はもう一方の相互作用部分へ近づく。このコンホメーションにおけるプローブにより、レポーターが適切な波長の光によって刺激される場合、シグナルは相互作用の部分によって変えられ、好ましくはクエンチされる。しかし、どちらかのプローブ分子がターゲットと結合した場合、プローブの相補的であるオリゴデオキシヌクレオチドの変性効果は存在しない。このコンホメーションにおいて、シグナルは生成する。ターゲット結合コンホメーションにおける場合、プローブのオリゴデオキシヌクレオチドが長すぎてFRETによって自己クエンチできない。

10

20

30

40

50

【0022】

検出プローブによって発生するシグナルは、信頼性のある検出及び測定を提供する当該技術においてどのような公知の方法によっても検出及び測定できる。

例えば、ABI-7700 (アプライドバイオシステム社製、フォスターシティー、CA) をシグナル放射、一般的には蛍光放射を測定するために改造する。ABI-7700は、96ウエル増幅反応チューブ配列で各ウエルと連結した光ファイバーを使用する。装置は、レポーター部分を励起するためにレーザーを具備し、増幅の際に連続監視により各チューブからシグナル強度、一般的には蛍光スペクトル強度を測定できる。

追加の増幅産物は、エンドポイント及びリアルタイム測定によって定量化できる。エンドポイントモードにおいて、シグナル測定は増幅反応が完了した後、例えば増幅反応のすべて又は実質的にすべてのサイクルが完了した後行われる。リアルタイムモードにおいて、シグナル測定は増幅反応の間複数回、例えば増幅反応の各熱サイクル後行われる。ターゲット核酸分子の最初の量の定量的測定、例えばサンプル中に存在するウイルスの又はバクテリアの核酸のコピー数が要求される場合、リアルタイムモードが好ましい。

増幅前の検査サンプルに存在するターゲット核酸分子の絶対量は、標準曲線を用いて決定できる。例えば、標準曲線は、一連の平行のプライマー伸長連鎖反応から得られる結果から作成することができる。これらの平行反応は、ターゲット核酸分子と同様である既知の量の核酸分子を含む一連の標準サンプルで行われる。異なる既知の量の一連の約5~約20の標準サンプルが用いられる。平行の伸長反応は、ターゲット核酸分子の伸長反応で使用されるものと同じ反応条件及び試薬を使用する。

各平行の反応において、ベースラインシグナル強度と比較したシグナル強度の増加 (デルタRn) は、各増幅サイクルのアニール温度で測定される。ベースライン値は追加の増幅産物の形成前に検出されるシグナルの大きさである。しきい値 (Ct) は各反応で計算される。Ctは、発生したシグナル強度がベースラインシグナル強度から区別できる増幅サイクル数である。各標準サンプルにおける核酸の開始量は、その対応するCt値に対してプロットできる。このプロットは標準の曲線である。

一般に、しきい値は、ベースライン値と統計的に異なるのに十分に高くなければならないが、増幅反応と関連した飽和現象で得られるシグナルよりも低くなければならない。一般

的には、しきい値は、平均ベースラインシグナル強度よりも約10標準偏差大きく設定される（例えば、Heidら、Genome Research 6:986-994（1996）参照）。

【0023】

また、ターゲット核酸分子を含むサンプルのCt値は計算される。このCt値は標準曲線に対してプロットできる。検査サンプルでターゲット核酸分子の量は、標準曲線を用いて外挿により定量化できる。図9は、以下の実施例に記載された“向かい合う（nose-to-nose）”PCRプライマー及び反応条件を用いたPCRターゲットのこの定量方法（HCV RNAの場合）を示す。

検出装置、例えばABI 7700で用意されるソフトウェアは、増幅の過程中シグナル強度を記録できる。これらの記録された値は、継続する形態でシグナル強度の増加を計算するために使用してもよい。ABI 7700装置は一般的に蛍光をモニターするために使用されるが、Ct値は、蛍光測定から決定される必要がない。Ct値は、多様な異なるタイプのシグナルの測定から決定できるであろう。

本発明は、またキットである本発明の方法を実施するための有用な構成要素を含む多重容器（multicontainer）ユニットに関する。キットは、特定の病原体の変異体の増幅のために1組の向かい合う（nose-to-nose）プライマー及び上述の自己改変シグナル発生プローブのようなプローブを含む。いくつかの場合には、プローブは適切な支持膜に固定される。キットの他の任意要素としては、例えばプライマー伸長産物の合成を触媒する物質、基質ヌクレオシド三リン酸、増幅及び/又はハイブリダイゼーション反応のための適切な緩衝剤、検査サンプルにおける鋳型分子の定量を与えるための核酸参照標準、及び本発明の方法を行うための装置が挙げられる。

【0024】

実施例

以下に示される本発明の実施例は、説明することのみを目的として与えられ、本発明の範囲を制限するものではない。実施例に従う特許請求の範囲に記載される範囲内の多くの本発明の実施態様は、前述の詳細な説明及び以下の実施例を読む当業者にとって明らかであろう。

【0025】

HCV変異体の検出

比較は、主なHCV遺伝子型とサブタイプのためのプロトタイプである8つのHCV系の核酸ベース検出のための3つの異なる方法で行われた。使用した4つの検出方法は、（A）本発明の向かい合う（nose-to-nose）ビーコンRT-PCR、（B）従来のビーコンRT-PCR、及び（C）COBAS AMPLICOR HCVモニター検査バージョン2.0（COBAS HCM-2; Roche Diagnostic Systems Inc, Branchburg, NJ）。RT-PCRベースアッセイであるCOBAS HCM-2は、メーカーの取扱説明書に従って行った。従来のビーコンRT-PCR及び“向かい合う（nose-to-nose）”ビーコンRT-PCRは、以下のように行った。

PCRプライマーをHCVゲノムのRNAの5'非翻訳領域のセグメントを増幅するようにデザインした。ゲノムのこの領域の核酸配列は、HCV遺伝子型とサブタイプの間と比較的高く保存される。

ビーコンPCRのための従来のプライマーをHCV-Hの公表配列のヌクレオチド66～166に一致するDNAの101b.p.セグメントを増幅するようにデザインした [Inchauspeら、Proc Natl Acad Sci (USA), 88:10292-10296, 1991; Genbank M67463]。2つの従来のRT-PCRプライマーの間の介在ギャップは、長さが61b.p.である。プライマーは以下の通りである：

フォワードプライマー：5'-ACGCAGAAAGCGTCTAGCCA-3'（配列番号1）；

リバースプライマー：5'-GTACTCACCGGTTCCGCAGA-3'（配列番号2）。

本発明の“向かい合う（nose-to-nose）”RT-PCRのためのプライマーは、2つのプライマーの間に介在ヌクレオチドギャップがないようにデザインした。増幅された領域は、HCV-Hの公表配列のヌクレオチド83～133に一致する51b.p.セグメントである。プライマーは以下の通りである：

フォワードプライマー：5'-CCATGGCGTTAGTATGAGTGTCGTGCAGC-3'（配列番号3）；

10

20

30

40

50

リバースプライマー：5'-CCCGGGAGGGGGGGTCTGGAG-3'（配列番号4）。

従来のPCRと“向かい合う（nose-to-nose）”PCRの両方について、PCR産物検出で使用する分子ビーコンは、5'-FAM-ccgggcTTAGTATGAGTGTCTGCGTGCAGCCTgccccg-DABCYL-3'（配列番号5）であった。茎核酸は小文字で示され、プローブ核酸（HCV-H配列のヌクレオチド91～113と一致する）は、大文字で示される。

【0026】

相補的DNAは、従来のリバースプライマー、又は上述の向かい合う（nose-to-nose）リバースプライマーのいずれかを使用する抽出した血漿RNAから逆転写された。各20 μ lの反応は、2.5 μ Mのリバースプライマー、1ユニットのMoMuLV逆転写酵素（GIBCO BRL, Grand Island, NY）、1 \times 逆転写酵素バッファー（GIBCO BRL）、5mMのジチオスレイトール（DTT）、0.06ユニットのRNasin（Promega, Madison, WI）、及び0.5mMのdNTP、すなわちdATP、dTTP、dCTP及びdGTP（Pharmacia, Piscataway, NJ）を含む。反応は、45分間42 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。次いで、逆転写酵素を2分間95 $^{\circ}$ Cでさらにインキュベートすることによって不活性化した。

PCR増幅及び検出のために、逆転写の産物をフォワードプライマー（“向かい合う（nose-to-nose）”PCRのために0.1 μ M及び従来のPCRのために1 μ M）、1 μ Mのリバースプライマー、1.25ユニットのAmpliQ Goldポリメラーゼ（Applied Biosystems, Foster City, CA）、1 \times AmpliQ Gold Buffer II（Applied Biosystems）、2mMのMgCl₂、0.2mMのdNTPs、及び10ngの分子ビーコンを含む50 μ Mの最終容積の反応混合物でインキュベートした。PCR増幅は、以下のサイクリングパラメータを用いてApplied Biosystems 7700 Sequence Detectorで行った：10分間95 $^{\circ}$ C（酵素活性化）、続いて44サイクル[95 $^{\circ}$ C、30秒（変性）；60 $^{\circ}$ C、1分（アニーリング）；72 $^{\circ}$ C（伸長）]。分子ビーコンの相対的蛍光は、アニーリング温度で測定した。HCV鋳型分子の定量化は、各RT-PCR実験でRNA標準曲線の算入により求めた。標準曲線は、1 μ g/mlのイーストtRNA（Ambion, Austin, TX）に希釈した10、25、50、10²、10³、10⁴、10⁵又は10⁶の分子の合成HCV RNA転写物を用いて作成した。

表1は、HCVの8つの菌株の検出のための3つの異なる方法の比較を示す。前記菌株はHCVの主遺伝子型とサブタイプのためのプロトタイプである。本発明の向かい合う（nose-to-nose）ビーコンアッセイ（A）は8つのすべての遺伝子型/サブタイプを検出するが、従来のビーコンPCR（B）は、遺伝子型4aと5aを検出することができない。

COBAS-HCM-2アッセイの結果は、国際単位（I.U.）で示される。種々の変換因子が提案されているが（Saldanhaら、Vox Sang, 1999; 76(3):149-158; Cuijpersら、2001; 81(1):12-20）、I.U.とHCV RNAコピー数の間の正確な関係は、特に1a及び1b以外のHCV遺伝子型について検討中である。このため、Roche Diagnostic Systemsは、COBAS-HCM-2アッセイで得られた結果について変換因子を現在示唆しない。従って、分析のために、I.U.及びRNAコピー数が同等であると仮定される。COBAS-HCM-2アッセイと比較すると、向かい合う（nose-to-nose）ビーコンRT-PCRアッセイは遺伝子型1a、1b、2b及び6aと同等であるか、又はわずかに敏感であるが、遺伝子型4aについて1log（10倍）敏感であり、遺伝子型2a及び5aについて0.5log（3.2倍）敏感であり、遺伝子型3aについて0.3log（2倍）敏感である。2つのアッセイの相対的感受性を比較する統計分析を表2に示す。

【0027】

【表1】

10

20

30

40

表1

検査サンプル ¹				
HCV 遺伝子型 /サブタイプ	ウイルス 株名	A. 向い合う ビーコン PCR (Log ₁₀ RNA 分子/ ml)	B. 従来の ビーコンPCR (Log ₁₀ RNA 分子/ ml)	C. COBAS HCM-2 (Log ₁₀ 国際 単位/ ml)
1a	H 株	5.1	5.0	4.9
1b	HC-J4/91	4.7	4.7	4.6
2a	HC-J6	5.1	4.2	4.6
2b	HC-J8	4.0	3.7	3.9
3a	S52	4.3	3.7	4.0

10

20

30

40

【 0 0 2 8 】

【 表 2 】

表1続き

4a	ED43	6.3	<2.6	5.3
5a	SA13	5.2	<2.6	4.7
6a	HK6a	4.8	4.4	4.7

10

【 0 0 2 9 】

1. 検査したサンプルは、各プロトタイプHCV株で感染したチンパンジー由来の血漿である
 :H株 [Inchauspeら、Proc Natl Acad Sci (USA), 88:10292-10296, 1991; Genbank M6746
 3]、HC-J4/91 [Okamotoら、Virology, 190:894-899, 1992; Genbank D10750]、HC-J6 [
 Okamotoら、J Gen Virol, 72:2697-2704, 1991; Genbank D00944]、HC-J8 [Okamotoら、
 Virology, 188:331-341, 1992; Genbank D10988]、S52 [Bukhら、Proc Natl Acad Sci (
 USA) 89:4942-4946, 1992; Genbank M84837]、ED43 [Chamberlainら、78:1341-1347, 19
 97; Genbank Y11604]、SA13 [Bukhら、J Infect Dis, 178:1193-1197; Genbank AF06449
 0]、HK6a [Adamsら、Biochem Biophys Res Commun, 234:393-396, 1997; Genbank Y12083
]。

20

【 0 0 3 0 】

【表 3】

30

表2

向かい合うビーコンPCR及びCOBASHCM-2アッセイによるHCV遺伝子型の検出

HCV 遺伝子型	向かい合うビーコン PCR (Log ₁₀ RNA 分子/ml) x +/- s.d. (n) ¹	COBAS HCM-2 (Log ₁₀ I.U./ml) x +/- s.d. (n)	差
1a	5.1 +/- 0.25 (7)	4.9 +/- 0.12 (2)	1.6x
1b	4.7 +/- 0.19 (7)	4.6 +/- 0.12 (5)	1.3x
2a	5.1 +/- 0.18 (6)	4.6 +/- 0.22 (6)	3.2x (p=0.0013)
2b	4.0 +/- 0.22 (7)	3.9 +/- 0.32 (6)	1.3x
3a	4.3 +/- 0.11 (7)	4.0 +/- 0.12 (6)	2.0x (p=0.0032)
4a	6.3 +/- 0.12 (7)	5.3 +/- 0.33 (6)	10x (p<0.0001)
5a	5.2 +/- 0.12 (6)	4.7 +/- 0.26 (6)	3.2x (p=0.0002)
6a	4.8 +/- 0.19 (7)	4.7 +/- 0.90 (2)	1.3x

10

20

30

40

【0031】

1. 結果は (n) 反復アッセイの平均 +/- 標準偏差で表される。COBAS HCM-2アッセイの結果は、国際単位 (I.U.) で表される。

2. 2つのアッセイの感受性の差は、向かい合う (nose-to-nose) ビーコンPCRによって得られた値とRoche Monitorアッセイによって得られた値との算術比として計算される。両側P

50

値をGraphPad InStatソフトウェアを用いて計算した。

【0032】

様々なHCV遺伝子型に感染した個体由来の血漿サンプルのスクリーニング

本発明の“向かい合う(nose-to-nose)”PCRを用いてICBS HCVマスターパネルから患者血漿サンプルのサブセットをスクリーニングした。連続して伸長される前記パネルは、International Consortium for Blood Safety(ICBS)と共同して疾病管理センター(CDC)によって編集される。前記パネルは、種々の地理上の領域から集められた血漿サンプルから構成される。すべてのサンプルは、HCV抗体に関してスクリーニングされ、CDC及びVisible Genetics Inc.(VGI)の2つの独立した検査室で遺伝子型分析される。

エジプト、ベトナム及びインドネシアで集められた血漿サンプルを含む合計192のサンプルは、CDCによって提供された。これらのうちで、CDC、VGI又は両方によって得られたPCR-遺伝子型データに基づいてHCV RNAに関して明確に陽性のものとして、134がリストアップされた。5つのサンプルは、不確かな又は矛盾するPCR-遺伝子型データを有するものとしてリストアップされた。53のサンプルは、遺伝子型でないものとしてリストアップされた(すなわち、HCV RNAに対して陰性)。

RNAが結合し、96ウェルプレート型のPVDF膜から抽出されるロボット抽出手段を用いて、総RNAを70 μ lの新たに解凍した血漿から抽出した(Lee and Prince, 2001, Transfusion; 41:483-487)。総RNAを50 μ lの量のヌクレアーゼを含まない水で得た。次いで、この10 μ l(14 μ lの血漿と等価である)を、上述の向かい合う(nose-to-nose)プライマー(配列番号3及び配列番号4)及び分子ビーコン(配列番号5)を用いて逆転写及びPCRに供した。

パネルに存在する134の明確にHCV-陽性のサンプルについてのRT-PCRの結果を示す。“向かい合う(nose-to-nose)”PCRは、すべての遺伝子型由来のHCV単離物の大部分を首尾よく検出した。遺伝子型アッセイでHCV RNAに関して陽性でない53のサンプルのうちで、1つのサンプルのみが弱い陽性PCRシグナルを与えた($10^{3.1}$ RNA分子/ml)。

約700コピー/ml(9.9コピー/14 μ l血漿)未満のウイルス負荷を有するサンプルは、上述のロボット抽出と“向かい合う(nose-to-nose)”RT-PCRの組み合わせを使用しても検出されないであろう。表2に示される結果は、本発明が“向かい合う(nose-to-nose)”プライマーと分子ビーコンの1つのセットで種々のHCV遺伝子型の検出を与えることを明確に示す。

【0033】

【表4】

10

20

30

表2

遺伝子型	検出された合計／ 検査した合計	範囲 (Log ₁₀ RNA 分子／ml 血漿)	(%)
1a	22/23	3.13 – 6.93	95.7
1b	19/20	3.18 – 7.13	95.0
1c	3/3	5.84 – 6.72	100
2a	3/3	3.85 – 6.85	100
2e	1/1	6.69	100
3a	3/3	4.36 – 6.8	100
3b	1/1	4.93	100
4a	43/43	3.78 – 7.0	100
4d	9/9	5.08 – 6.56	100
4l	1/1	6.25	100
6a	8/8	3.28 – 6.37	100
10a (3)	5/6	4.22 – 7.23	83.3
不明瞭 ***	12/13	4.11 – 6.85	92.3
合計	130/134		97.0

10

***混ざっている感染を示す遺伝子型分析又は未だに不確定の分類が別々にリストアップされているサンプル。

20

【 0 0 3 4 】

HIV-1グループMサブタイプB変異体の検出のための向かい合うPCR (nose-to-nose) と従来のPCRとの比較

図 6 a は、4つの異なるHIV変異体、グループM (メジャー) サブタイプBのすべて (HIV/RT-1、HIV/RT10、HIV-38-1及びHIV/38/3) のV3領域及びフランキンゲン配列に相当するプロウイルスDNA配列のアラインメントを示す。V3領域は、HIVゲノムの最も高く変化しやすいセグメントである。分子ビーコンは、変異体HIV/RT-1と全く同一のプロープ-ループ構造でデザインされた (示されたV3配列のヌクレオチド76-97)。このプローブ配列は、変異体HIV/RT-10、HIV/38-1及びHIV/38-3と1、3又は4つのミスマッチをそれぞれ有する (図 6 a)。

30

“向かい合う (nose-to-nose) ” PCRのためのPCRプライマーは、以下のようにデザインされた。フォワードプライマー (5'-acaatacaagaaaaaggataactatgggac-3') (配列番号6) は図 6 a に示されるHIV/RT-1の配列のヌクレオチド65-94と一致する。フォワードプライマーは、NBFとして知られている。リバースプライマー (5'tttctcctgttgataaagtactctcccg-3') (配列番号7) は同じ配列のヌクレオチド95-124と一致する。リバースプライマーは、NBRとして知られている。

従来のPCRのためのプライマーは、177b.p.のPCR産物を産生するように以下のようにデザインされた。フォワードプライマー (5'taatagtagcagctgaatgaatctg-3') (配列番号8) は図 6 a に示されるHIV/RT-1の配列のヌクレオチド14-37と一致する。リバースプライマー (5'gttttaaagtgttattccatgc-3') (配列番号9) は同じ配列のヌクレオチド168-190と一致する。

40

図 6 a で示される4つの各HIV変異体の検出のために向かい合う (nose-to-nose) PCRで従来のビーコンPCRの能力を比べるために実験の結果を図 7 に示す。PCR反応は、HIV/RT-1、HIV/RT-10、HIV/38-1又はHIV/38-3の10⁶の鑄型分子、図 6 b に示される分子ビーコン、及び上述の従来又は向かい合う (nose-to-nose) プライマーのいずれかを含んでいた。コントロールPCR反応は鑄型がないか、又は150ngのヒトのゲノムのDNAを含んでいた。以下のサイクルパラメータを用いて、増幅をPerkin Elmer 7700で行った: 95 で10分間、続いて95 で30秒間 (変性)、50 で1分間 (アニーリング) 及び72 で30秒間 (伸長) を40サイクル。分子ビーコンの蛍光は、50 のアニーリング温度で測定した。次いで、蛍光をPC

50

Rサイクル数に対してグラフにプロットした。PCR増幅/検出の効率は“しきいサイクル”、すなわちポジティブ蛍光シグナルを生じるのに必要な最低PCRサイクル数によって決められる。

図7aに示すように、後者の場合に得られる蛍光のピーク・レベルが正確に一致する鋳型のもの約2分の1であったが、従来のビーコンPCR技術は、同じしきいサイクル(サイクル23)でHIV/RT-1(ビーコンと正確に一致する)及びHIV/RT-10(1つのミスマッチ)の両方を検出することができた。ゲル分析(図8)で示されるように、PCR産物が4つのすべての変異体から産生された事実にもかかわらず、従来のビーコンPCR技術はHIV/38-1(3つのミスマッチ)又はHIV/38-3(4つのミスマッチ)のいずれも検出できなかった。

対照的に、向かい合う(nose-to-nose)PCR技術は、類似のしきいサイクルで4つのすべてのHIV変異体(0、1、3又は4つのミスマッチ)を検出することができた(図7b)。重要なことには、いかなるシグナルも、鋳型を含まない、又は150ngのヒトゲノムDNAを含む反応管で検出されなかった。

【0035】

HIV-1グループMの異なるサブタイプの検出

PCRプライマーはHIV-1ゲノムRNAのgag遺伝子のセグメントを増幅するようにデザインされ、HIV-1グループMの異なるサブタイプ間で比較的よく保存されている。この相対的な保存にもかかわらず、個々のHIV-1サブタイプは、ゲノムのこの領域内に20%までのヌクレオチド配列多様性を示す(Robertonら、1999: Human Retroviruses and AIDS 1999, pp 492-505, Editors Kuikenら、ロスアラモス国立研究所、ロスアラモス、ニューメキシコ)。

ビーコンPCRのための従来のプライマーは、サブタイプB HIV-1単離HXB2の公開配列のヌクレオチド1478~1571に対応するRNAの94b.p.セグメントを増幅するようにデザインされていた[ラトナーら、1985, Nature, 313(6000):277-284; Genbank K03455]。2つの従来のRT-PCRプライマーの間の介在ギャップは53b.p.である。プライマーは以下の通りである:

フォワードプライマー: 5'-AACCAAGGGGAAGTGACATA-3' (配列番号10);

リバースプライマー: 5'-ATTTCTCCTACTGGGATAGGT-3' (配列番号11)。

本発明の“向かい合う(nose-to-nose)”RT-PCRのためのプライマーは、HIV-1 HXB2の公開配列のヌクレオチド1502~1558に対応する57b.p.セグメントを増幅するようにデザインされた。2つのプライマーの間に介在ギャップは存在しない。プライマーは以下の通りである:

フォワードプライマー: 5'-GAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAG-3' (配列番号12);

リバースプライマー: 5'-GGATAGGTGGATTATTTGTCATCCATC-3' (配列番号13)。

従来及び“向かい合う(nose-to-nose)”PCRの両方について、PCR産物の検出に使用した分子ビーコンは5'-FAM-cgcctTACCCTTCAGGAACAAATAGagcg-DABCYL-3' (配列番号14)であった。茎核酸は小文字で示され、プローブ核酸(HIV-1 HXB2配列のヌクレオチド1512~1530と一致する)は大文字で示される。

HIV-1サブタイプA、B、C、D、F及びG由来のウイルス単離物は、AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIHから細胞を含まない培養上清として得られた。RNAは、140ulの新たに解凍した培養上清から抽出した。相補DNAは、従来のリバースプライマー、又は上述の向かい合う(nose-to-nose)リバースプライマーのいずれかを用いて抽出したRNAから逆転写された。cDNA合成及びPCR増幅の両方についての反応条件は、HCVについて上述のものと本質的に同じであった。すべてのアッセイは3通の行った。HIV鋳型分子の定量化は、各RT-PCR実験でRNA標準曲線の算入によって達成された。標準曲線は、1µg/mlのイーストtRNA(Ambion、オースティン、TX)に希釈された1、10、10²、10³、10⁴、10⁵又は10⁶分子のHIV-1 RNAを用いて作成された。

HIV-1サブタイプの検出のための従来のRT-PCR及び“向かい合う(nose-to-nose)”RT-PCRの比較を表3に示す。本発明の“向かい合う(nose-to-nose)”アッセイ(A)は、検査した6つのHIV-1サブタイプのすべてを検出したが、従来のアッセイはサブタイプA、D及びGを検出できなかった。

【0036】

10

20

30

40

50

【表 5】

表3

検査サンプル ¹		Log ₁₀ 検出された培養上清のml当たりのRNA分子	
HIV-1 サブタイプ [°]	ウイルス株名	従来の ビーコンRT-PCR	”向かい合う” ビーコンRT-PCR
A	92UG029 ²	<3.9	9.7 +/- 0.05
B	92BR014 ²	9.3 +/- 0.3	9.3 +/- 0.1
C	92BR025 ²	9.4 +/- 0.2	9.2 +/- 0.3
D	94UG114 ²	<3.9	10.2 +/- 0.06
F	93BR020 ²	4.8 +/- 0.6	5.6 +/- 0.2
G	Jv1083 ³	<3.9	9.8 +/- 0.2
鋳型なし	-	<3.9	<3.9

1. 検査サンプルは、AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIHから細胞を含まない培養上清として得られたウイルス単離物であった。

2. 単離物は、UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization、及びDAIDS, NIAIDから得た。

3. Abimikuら、1994、AIDS Res Hum Retroviruses、10(11):1581-1583。

【 0 0 3 7 】

HIV-1グループM及びHIV-1グループO変異体の両方を同時に検出する方法の適応

HIV-1グループO(アウトライアー)由来のウイルス単離物はHIV-1グループM(メジャー)のメンバー由来のマーク配列変異体を示す。グループOウイルスはアフリカの一部で主に流行しているが、アフリカの外の血液銀行によって集められたサンプルの中の頻度は、増

10

20

30

40

50

加しているようである (Jaffe and Schochetman, 1998, Infect Dis Clim North Am; 12(1):39-46; Couturierら, 2000, AIDS;14(3):289-296; Fed Regist, 1997, Sept 23;62(184):49695)。本発明は、“向かい合う (nose-to-nose)” プライマー及び分子ビーコンの1つのセットを用いて、グループM及びグループ0の両方のメンバーの検出を可能にする。本発明の“向かい合う (nose-to-nose)” RT-PCRのためのプライマーは、HIV-1ゲノムRNAのpol遺伝子の64b.p.セグメントを増幅するようにデザインされ、HIV-1 HXB2の公開配列のヌクレオチド4750~4813と一致している。2つのプライマーの間の介在ギャップは存在しない。プライマーは以下の通りである：

フォワードプライマー：5'-CAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATTCACAATTT-3' (配列番号15)；
リバープライマー：5'-CTGTATCCCCCAATCCCCCTTTTCTTTTA-3' (配列番号16)。

PCR産物検出で使用した分子ビーコンは、5'-FAM-cgcacgGCAGTATTCATTCACCAATTTTcgtgcg-DABCYL-3' (配列番号17)であった。茎核酸は小文字で示され、プローブループ核酸は大文字で示される。

次いで、新しいプライマー及びビーコンは、HIV-1グループM (サブタイプA、B、C、D、F及びG) 及びグループ0由来のウイルス単離物を増幅及び検出する能力について試験され、AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID/NIHからの細胞を含まない培養上清として得られた。RNA抽出の前に、すべての細胞上清は、リン酸緩衝食塩水 (PBS) で1000倍に希釈された。RNA抽出は、以下の単離物を除いては、上述のように希釈上清で実質的に行われ、すべてのRNAサンプルはRNaseを含まないDNase (Ambion、オースティン、TX) で処理されてプロウイルスDNAの汚染の除去を確実にする。相補DNAは、上述の向かい合う (nose-to-nose) リバープライマー (配列番号16) を用いて抽出RNAから逆転写された。cDNA合成及びPCR増幅の両方のための反応条件は、上述のものと本質的に同じであった。HIV-1鑄型分子の定量化は、各RT-PCR実験におけるRNA標準曲線の算入によって達成された。

表4は、本発明のpol領域“向かい合う (nose-to-nose)” プライマーを用いるRT-PCRの結果、及びCOBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Assay Version 1.0 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ) との比較を示す。“向かい合う (nose-to-nose)” RT-PCRアッセイは、COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Assay (1.0) と同じ (グループM、サブタイプB及びC) 又はより高い (グループM、サブタイプA、D及びF) 感受性で、検査されたすべてのグループM及びグループ0単離物を検出できた。後者のアッセイは、検査されたグループ0ウイルス単離物のいずれも検出できず、またグループMサブタイプGも検出できなかった。これらのデータは、COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Assay (1.0) 又はもその改良バージョン (1.5) のいずれもグループ0ウイルスを検出できないという最近の報告 (Yangら、Transfusion, 2001; 41:643-651) と一致している。対照的に、本発明は、“向かい合う (nose-to-nose)” プライマー及び分子ビーコンの1つのセットですべてのウイルス単離物の検出を可能にする。

【0038】

【表6】

表4

検査サンプル1		Log ₁₀ 検出された希釈培養上清のml当たりのRNA分子	
HIV-1 サブタイプ ¹	ウイルス株 ² 名	”向かい合う” ビーコンRT-PCR	COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Version 1.0
A	92UG029	5.1 +/- 0.17	3.5 +/- 0.10
B	92BR014	5.4 +/- 0.62	5.2 +/- 0.03
C	92BR025	5.6 +/- 0.04	5.5 +/- 0.04
D	94UG114	5.9 +/- 0.46	5.2 +/- 0.05
F	93BR020	5.7 +/- 0.80	3.7 +/- 0.09
G	Jv1083	7.3 +/- 0.08	陰性
O	L20571	5.4 +/- 0.66	陰性
O	Y14496	6.0 +/- 0.38	陰性
ヒト DNA (100 ng) ³		<3.0	検査せず
ヒト RNA (100 ng) ³		<3.0	検査せず

10

20

1. RNA抽出の前に、すべての細胞を含まない上清をPBS (“向かい合う” RT-PCRについて) 又は普通のヒトの血漿 (COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Version 1.0について) のいずれかで1000倍に希釈した。2. ウイルス単離物は表3に記載される; 単離物L20571, Gurtler LGら, 1994, J Virol, 68:1581; 単離物Y14496, Loussert-Ajaka Iら, J Virol 69:5640, 1995。3. “向かい合う” PCR又はRT-PCRは、また観測されたシグナルがウイルス増幅によるものであり、ヒトの核酸を汚染するものの増幅によるものではないことを証明するために100ngのヒトのDNA又はRNAで行った。

30

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】分子ビーコンのグラフィカルな例である。適切なアニール温度で、ビーコンは: (A) 相補的ターゲット配列の非存在下で、レポーター部分 () の発光をクエンチするクエンチング部分 () を生じる基部ループ構造を形成し; 又は (B) 相補的ターゲットの存在下で、レポーターがそのシグナルを出すことを可能にするターゲットと結合する。

【図2】分子ビーコンを利用した従来のPCRである。PCRプライマーは、ウイルスRNAのセグメントを増幅するようにデザインされている。そのプローブが2つのPCRプライマーに内在的であるPCR産物のセグメントにハイブリダイズするように、分子ビーコンはデザインされる。ビーコンは、ウイルスの菌種AのPCR産物とハイブリダイズできるが、ターゲット配列 (小文字で示される) におけるミスマッチのためにウイルスの菌種BのPCR産物を検出することができない。

40

【図3】本発明の原理の1つのグラフィカルな例である。(a) リバース及びフォワードPCRプライマー (>30b.p.) は、ターゲットRNA (又はDNA) 及びその相補的DNA鎖に直接 “向かい合って (nose-to-nose)” ハイブリダイズするようにデザインされ、その結果産生したPCR産物は介在配列を持たない。分子ビーコンのターゲット-特異的ループは、プライマーの1つのジャンクション及びその他のプライマーの補体によって生じるDNA配列にハイ

50

ブリダイズするようにデザインされている。PCRプライマーは、ミスマッチ残基（“ X ”で示される）を有するターゲット鋳型にハイブリダイズする。点線はハイブリダイゼーションを示す。（b）すべての鋳型から増幅されたPCR産物のDNA配列は、プライマーの1つとその他のプライマーの補体の組み合わせた配列と一致する。このように、分子ビーコンは、すべての鋳型から産生されるPCR産物とハイブリダイズすることができる。

【図4】本発明の方法の例である。“向かい合う（nose-to-nose）”プライマー及び1つのプライマーともう1つのプライマーの補体のジャンクションによって作られる配列を認識するようにデザインされた分子ビーコンを用いるHIVの異なるサブタイプの増幅である。HIV変異体の配列とプライマー又はビーコンループのいずれかとの間のミスマッチは、小文字のボールド体で示される。

10

【図5】プライマーの位置の変異の例である。（A）ビーコンループは、（I）に示される2つのPCRプライマーによって等しく作られる増幅配列にハイブリダイズするようにデザインできる。あるいは、ビーコンは、（II）～（IV）に示されるフォワード又はリバースプライマーのいずれかによって主として作られる増幅配列に“非対称に”ハイブリダイズするようにデザインできる。（B）別の変異において、フォワード及びリバースプライマーは、ウイルスゲノムの保存性の高い領域と一致するヌクレオチドギャップによって分離される。

【図6】従来のPCR及び“向かい合う（nose-to-nose）”PCRの両方について分子ビーコン及びプライマーの位置を示すHIVの4つの変異体のV3ループ及びフランキング領域のDNA配列アラインメントである。（a）HIV/RT-1のタンパク質コーディング鎖は、3つの他のウイルス変異体、HIV/RT-10、HIV-38-1及びHIV/38-3のタンパク質コーディング鎖と並べられる。HIV/RT-1の配列及び分子ビーコンとのミスマッチは、下部ケースにおいてボールド体で示される。従来のPCRについてフォワード及びリバースプライマーの相対的な位置は、それぞれ点線（ ）及び破線（-----）で示される。向かい合う（nose-to-nose）PCRについてフォワード及びリバースプライマーの相対的な位置は、それぞれ二重線（=）及び実線（-）で示される。ビーコンプロープの位置は、配列上に示される。すべてのプライマー及びビーコンプロープ配列は、HIV/RT-1の配列から誘導される。（b）分子ビーコンの構造である。プロープループは大文字で示され、相補的な基部ヌクレオチドは小文字で示される。フルオロフォアFAMは5'末端と結合し、クエンチャーDABCYLは3'末端と結合する。

20

30

【図7】従来のPCR及び向かい合う（nose-to-nose）PCRの実時間定量PCR法の比較である。（a）従来のPCR法又は（b）“向かい合う（nose-to-nose）”PCR法を用いる4つの異なるHIV変異体の実時間定量PCRである。10⁶のコピーを含むPCR反応、HIV/RT-1（ ）、HIV/RT-10（ ）、HIV/38-1（ ）、HIV/38-3（ ）、鋳型を含まない（+）又は150ngのヒトDNA（x）。

【図8】従来のPCRにより産生される産物のアガロースゲル分析である。ゲルは、従来のPCR法によりHIV/RT-1、HIV/RT-10、HIV/38-1、及びHIV/38-3から産生されるPCR産物を示す。レーン1：50bpラダー、レーン2：鋳型を含まない、レーン3：HIV/RT-1、レーン4：HIV/RT-10、レーン5：HIV/38-1、レーン6：HIV/38-3。

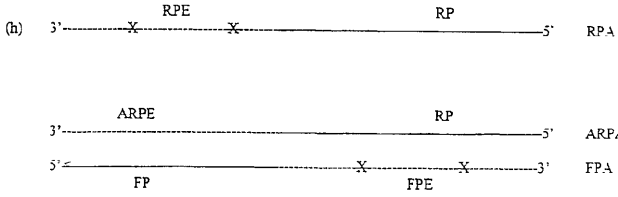
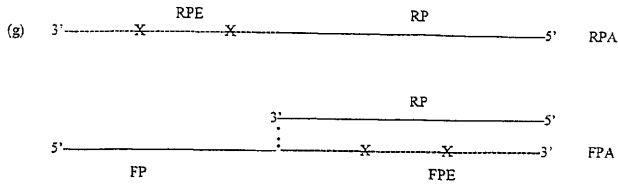
【図9】分子ビーコンを用いた産物検出で“向かい合う（nose-to-nose）”RT-PCRを用いたHCV RNAの定量化のための標準曲線の例である。（a）HCV RNAについて“向かい合う（nose-to-nose）”RT-PCRを、RT-PCR反応当りの0、10、25、50、100、10³、10⁴、10⁵又は10⁶の合成HCV RNA分子の入力により実施した。蛍光の変化（デルタRn）は、ABI7700配列検出器において各PCRサイクルについてアニーリング温度で測定した。しきい値（Ct）は、機器に付属のソフトウェアを用いて計算した。（b）各標準サンプルのRNAコピー数は、そのCt値に対してプロットした（ ）。未知の検査サンプルのCt値（ ）は、標準曲線に対してプロットし、RNAコピー数はX軸から外挿される。

40

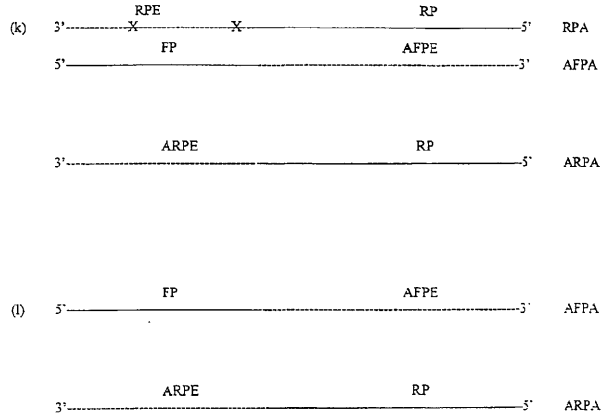
【図10】本発明の増幅反応の段階的な例である。

【 図 1 0 - 1 】

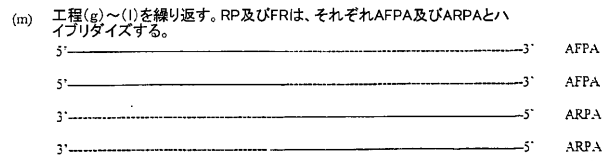
PCR
ラウンド2



【 図 1 0 - 2 】



PCR
ラウンド3



【 図 1 0 - 3 】

図 1 0 の定義

- T = ターゲット核酸分子
- TC = ターゲット核酸補体
- RP = リバースプライマー
- RPE = リバースプライマー伸長産物
- RPA = リバースプライマー増幅産物
- FP = フォワードプライマー
- FPE = フォワードプライマー伸長産物
- FPA = フォワードプライマー増幅産物
- ARPE = 追加のリバースプライマー伸長産物
- ARPA = 追加のリバースプライマー増幅産物
- AFPE = 追加のフォワードプライマー伸長産物
- AFPA = 追加のフォワードプライマー増幅産物

【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
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

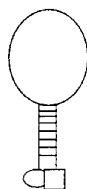
(10) International Publication Number
WO 02/083927 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q
- (21) International Application Number: PCT/US02/12035
- (22) International Filing Date: 17 April 2002 (17.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/284,334 17 April 2001 (17.04.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE NEW YORK BLOOD CENTER, INC. [US/US]; 310 East 67th Street, New York, NY 10021 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): ANDRUS, Linda [GH/US]; Apartment C 1406, 370 East 76th Street, New York, NY 10021 (US). NICHOLS, Carmen, Nicola [GB/US]; 324 South 11th Street, Apt. 1, Philadelphia, PA 19107 (US).
- (74) Agent: BARON, Ronald, J.; Hoffmann & Baron, LLP, 6900 Jericho Turnpike, Syosset, NY 11791 (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, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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, CH, 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.

(54) Title: UNIVERSAL MULTI-VARIANT DETECTION SYSTEM



A.



B.

Molecular Beacon

(57) Abstract: The present invention provides a method to diagnostically detect the variants of a given pathogen, such as HIV, hepatitis C, hepatitis B (HBV), Parvovirus B19, etc., with the use of a single detection probe.

WO 02/083927 A2

WO 02/083927

PCT/US02/12035

UNIVERSAL MULTI-VARIANT DETECTION SYSTEM**CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION**

5 This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/284,334, filed April 17, 2001, which is incorporated herein by reference.

BACKGROUND OF THE INVENTION

10 The detection of closely related genetic variants is a significant challenge of analytical diagnostics. Pathogens such as, for example, viruses and bacteria, generally mutate frequently and form such genetic variants.

For example, the nucleic acid sequences of human immunodeficiency virus (HIV-1) having different origins, are different from each other. The different types of HIV-1 are divided into groups and subtypes. The major group M consists of ten
15 currently identified subtypes, designated as subtypes A through H, J and K. In addition to M-group viruses, two other groups, N and O, have been identified (Simon et al, 1998, Nature Med, 4:1032-1037). Within groups and subtypes, new strains of the virus are continuously being generated due to the error-prone nature of the HIV-1 replicative machinery.

20 Similarly, hepatitis C virus (HCV) does not exist as a homogeneous RNA population. Even within a single infected individual, numerous heterogeneous viral genomes (quasispecies) may co-exist. In addition, multiple genotypes of HCV have been identified on the basis of nucleotide sequence analysis of viral variants isolated from different geographic regions. There are currently six main HCV genotypes,
25 classified numerically from 1 to 6. Genotypes are further subdivided according to subtype.

Due to this genetic variation of pathogens within a species, the range of diagnostic tests that provide reliable results are highly limited. Most detection methods currently available for detecting pathogens in a sample are based either on

WO 02/083927

PCT/US02/12035

the detection of the pathogens' antigens, pathogen-induced antibodies, or the pathogens' intrinsic enzymes, e.g. intrinsic HIV reverse transcriptase. In addition to being inconvenient, such methods are frequently not very sensitive. For example, the method currently implemented by blood banks for screening of HIV-1 infection in blood donors is the detection of antibodies to virus proteins. This method fails to detect individuals in the early acute phase of the infection who have not yet developed diagnostic antibodies to the virus.

Screening methods that are based on the detection of nucleic acid sequences are sensitive and convenient. However, these tests may not always be reliable for detection of closely related genetic variants.

One of the currently available nucleic acid sequence-based detection methods utilizes molecular beacons (Tyagi and Kramer, 1996, *Nat. Biotechnol.*, 14(3):303-308). Molecular beacons are single-stranded oligonucleotide probes that have a stem-loop structure. (See Figure 1.) The loop portion of the molecule is a probe sequence complementary to a target nucleic acid molecule. The stem is formed by the annealing of complementary arm sequences on the ends of the probe sequence. A fluorescent moiety is attached to the end of one arm; and a quenching moiety is attached to the end of the other arm. The hybridization of the arms of the stem to each other keeps these two moieties in close proximity, causing the fluorescence of the fluorophore to be quenched by energy transfer (Figure 1a). In the presence of the beacon's complementary DNA target, the loop structure hybridizes to the target, preventing the arms of the stem from remaining hybridized. The fluorophore and quencher are physically separated, and fluorescence is obtained (Figure 1b).

Molecular beacons are currently used for real-time quantitative PCR. PCR primers are designed to amplify a specific segment of DNA, usually less than 200 base pairs in length. The beacon is typically designed so that its loop is complementary to a short (20-25 b.p.) region on one of the amplified DNA strands. The complementary region of these amplified DNA strands is the portion of these strands which has been added to the primers.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

Molecular beacons are highly sequence-specific. In fact, one of the principle applications of this technology in recent years has been for allele discrimination or "molecular genotyping." The sensitivity of molecular beacons to sequence variation permits discrimination between even single nucleotide polymorphisms in a give target
5 sequence (Tyagi et al, 1998, *Nat. Biotechnol.*, 16(1):49-53; Kostrikis et al., 1998, *Science*, 279:5354:1228-9; Marras et al., 1999, *Genet. Anal.*, 14(5-6)151-6; Tapp et al., 2000, *Biotechniques*, 28(4):732-8).

To date, this sensitivity to sequence variation has severely limited the application of molecular beacon technology to the diagnosis of viral infection. The
10 molecular beacons cannot efficiently detect the variant sequences of DNA or RNA targets. For example, a beacon designed to recognize PCR product from HIV strain A may not recognize PCR product from HIV strain B. (See Figure 2.)

Thus, the present technology would require several different beacons to allow for the detection of all the different genotypes of the virus. That is, even though some
15 highly conserved regions of the genome of HIV-1 are known to exist, it is likely that several different beacons would be needed to detect all the known subtypes of this virus. Moreover, even with the use of several different beacons, other variants of HIV-1 that have not been identified may not be detected.

Thus, current technology does not provide a convenient or efficient diagnostic
20 assay for detection of all related genetic variants of pathogens.

There is an urgent need for sensitive, convenient nucleic acid-based screening assays capable of detecting closely related genetic variants. For example, there is a need for assays capable of detecting viruses, bacteria and other pathogens, directly in
25 contaminated blood. Such assays are needed to detect blood or plasma units from individuals in the early acute stages of a pathogen infection, i.e., before the individual has developed diagnostic antibodies to the virus.

Accordingly, one of the purposes of the present invention is to overcome the above limitations in the prior art by providing a convenient and efficient diagnostic assay for detection of multiple variants of a particular target nucleic acid molecule.

SUMMARY OF THE INVENTION

These and other objects, as will be apparent to those having ordinary skill in the art, have been met by providing a method to diagnostically detect the variants of a given pathogen, such as HIV, hepatitis C, hepatitis B (HBV), Parvovirus B19, etc., with the use of a single detection probe, i.e., a universal multi-variant detection system. In one embodiment, the single detection probe is a molecular beacon.

BRIEF DESCRIPTION OF FIGURES

Figure 1: A graphical illustration of a molecular beacon. At the appropriate annealing temperature the beacon will either: (A) in the absence of a complementary target sequence, form a stem loop structure causing the quenching moiety (Q) to quench the luminescence of the reporter moiety (R); or (B) in the presence of a complementary target, bind to the target allowing the reporter to emit its signal.

Figure 2: Conventional PCR using molecular beacons. PCR primers are designed to amplify a segment of viral RNA. A molecular beacon is designed so that its probe loop will hybridize to a segment of the PCR product which is internal to the two PCR primers. The beacon is capable of hybridizing to PCR product of virus strain A, but fails to detect PCR product of virus strain B because of mismatches in the target sequence (shown in lower case).

Figure 3: A graphical illustration of one of the principles of the invention. (a.) Reverse and forward PCR primers (>30b.p.) are designed to hybridize directly "nose-to-nose" to the target RNA (or DNA) and its complementary DNA strand respectively, such that the generated PCR product possesses no intervening sequence. The target-specific loop of the molecular beacon is designed to hybridize to the DNA sequence created by the junction of one of the primers and the other primer's complement. PCR primers will hybridize to target templates with mismatched residues, indicated by "X." Dotted lines indicate hybridization. (b.) The DNA sequence of the PCR product amplified from all templates is identical to the combined sequence of one of the primers and the other primer's complement. The

WO 02/083927

PCT/US02/12035

molecular beacon is thus capable of hybridizing to PCR products generated from all templates.

Figure 4: An example of the method. An amplification of different subtypes of HIV using "nose-to-nose" primers and a molecular beacon designed to
5 recognize a sequence created by the junction of one of the primers and the other primer's complement. Mismatches between the sequence of the HIV variants and either the primers or beacon loop are shown in lower case boldface.

Figure 5: Illustration of Variations on Primer Location. (A). The beacon loop can be designed to hybridize to an amplified sequence created equally by the two
10 PCR primers as shown in (I). Alternatively, the beacon can be designed to hybridize "asymmetrically" to an amplified sequence created primarily by either the forward or reverse primer as shown in (II) to (IV). (B). In a further variation, the forward and reverse primers are separated by a nucleotide gap which corresponds to a highly conserved region of the viral genome.

Figure 6: DNA sequence alignment of the V3 loop and flanking regions
15 of four variants of HIV showing the positions of molecular beacon and primers for both conventional and "nose-to-nose" PCR (a). The protein coding strand of HIV/RT-1 is aligned with that of 3 other virus variants, HIV/RT-10, HIV-38-1 and HIV/38-3. Mismatches to the sequence of HIV/RT-1 and to the molecular beacon are shown in
20 lower case in bold. The relative location of forward and reverse primers for conventional PCR are indicated by dotted (.....) and dashed (----) lines respectively. The relative location of forward and reverse primers for nose-to-nose PCR are indicated by double (==) and solid (—) lines respectively. The location of the beacon probe is shown above the sequence. All primers and the beacon probe sequences are
25 derived from the sequence of HIV/RT-1. (b). Structure of the molecular beacon. The probe loop is shown in upper case, the complementary stem nucleotides are shown in lower case. The fluorophore FAM is conjugated to the 5' end, the quencher DABCYL is conjugated to the 3' end.

Figure 7: Comparison of Conventional and Nose-to-Nose PCR Real
30 Time Quantitative PCR Methods. Real Time Quantitative PCR of four different HIV

WO 02/083927

PCT/US02/12035

variants using: (a) conventional or (b) "Nose-to-Nose" PCR methods. PCR reactions contained 10^6 copies HIV/RT-1 (●), HIV/RT-10 (○), HIV/38-1 (▼), HIV/38-3 (□), no template (+) or 150ng Human DNA (x).

Figure 8: Agarose Gel Analysis of Products Generated by Conventional PCR. Gel shows PCR products generated from HIV/RT-1, HIV/RT-10, HIV/38-1, and HIV/38-3 by the conventional PCR method. Lane 1: 50bp ladder, Lane 2: No template, Lane 3: HIV/RT-1, Lane 4: HIV/RT-10, Lane 5: HIV/38-1, Lane 6: HIV/38-3.

Figure 9: An example of a standard curve for quantitation of HCV RNA using "nose-to-nose" RT-PCR with product detection using a molecular beacon. (a). "Nose-to-Nose" RT-PCR for HCV RNA was performed with an input of 0, 10, 25, 50, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 or 10^6 synthetic HCV RNA molecules per RT-PCR reaction. Change in fluorescence (ΔR_n) was measured at the annealing temperature for each PCR cycle in the ABI 7700 Sequence Detector. Threshold values (C_t) were then calculated using software provided with the instrument. (b). The RNA copy number of each standard sample is plotted against its C_t value (●). The C_t values for unknown test samples (○) are plotted against the standard curve and RNA copy number is extrapolated from the X-axis.

Figure 10: A step-by-step illustration of an amplification reaction of the invention.

DETAILED DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS

The present invention provides a method for determining the presence of a target nucleic acid molecule in a biological sample with the use of a single detection probe.

The method comprises the amplification of a target nucleic acid molecule by means of a primer extension chain reaction wherein the primers of the reaction are a set of "nose-to-nose" primers, including a forward and reverse primer, as described below. (See Figures 3 and 4.)

WO 02/083927

PCT/US02/12035

The target nucleic acid molecule is a nucleic acid molecule whose full or partial sequence is sufficiently known to make primer extension chain reaction primers. The target nucleic acid molecule can be single or double stranded.

5 The target nucleic acid molecule exists as a family of highly homologous sequences. These different sequences within a family are referred to as variants. The origin of the variants include, for example, gene mutations and polymorphisms.

10 Nucleic acid molecules which are known to have variants include, for example, viruses and bacteria. Examples of viruses include HIV, HCV, HBV and human parvovirus B19. Examples of bacteria include *E. coli*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *M. Tuberculosis* and *Borrelia species* (*Lyme disease*).

A biological sample from which a target nucleic acid molecule can be detected is any bodily fluid, cells or cellular debris. Examples of biological samples include blood, serum, semen, mucous or other bodily exudates.

15 The present invention can be used in any type of primer extension chain reaction that leads to the amplification of the target nucleic acid molecule or a subregion of this molecule. Amplification reactions include, for example, the polymerase chain reaction (PCR), including quantitative PCR; strand displacement amplification (SDA); transcription mediated amplification (TMA); and nucleic acid sequence based amplification (NASBA). NASBA amplifies RNA. NASBA is
20 described in EP-A-0 329 822.

The conventional polymerase chain reaction (PCR) amplification process is well known in the art. Conditions suitable for carrying out a polymerase chain reaction are described in U.S. Patents 4,683,195; 4,683,202; and 4,965,188. Commercial vendors, such as Perkin Elmer (Norwalk, Conn.), market PCR reagents
25 and publish PCR protocols. A PCR amplification reaction mixture contains reagents necessary to carry out an amplification reaction. Typically, the mixture contains an agent for polymerization, such as thermostable DNA polymerase; deoxynucleoside 5' triphosphates (dNTP's); and a divalent metal cation in a suitable buffer.

30 Either DNA or RNA target sequences can be amplified by the methods of the present invention. In the case of PCR amplification of an RNA target, such as a viral

WO 02/083927

PCT/US02/12035

genomic nucleic acid, the first step is the synthesis of a DNA copy (cDNA) of the target sequence. The reverse transcription can be carried out as a separate step or, preferably, in a combined reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The RT-PCR amplification of RNA is well known in the art and described in U.S. Patents 5,322,770 and 5,310,652; Myers and Gelfand, 1991, *Biochemistry* 30(31):7661-7666; U.S. Patent 5,527,669; Young et al., 1993, *J. Clin. Microbiol.* 31(4):882-886; and Young et al., 1995, *J. Clin. Microbiol.* 33(3):654-657.

Primers are also included in the PCR reaction mixture. A primer is an oligonucleotide which, upon hybridizing to a template nucleic acid molecule, is capable of acting as a point of synthesis initiation during an amplification reaction. The template nucleic acid is the initial target nucleic acid molecules; and the amplification products generated from these molecules.

The length of the primers of the present invention is not critical. Typically the primer length ranges from about 15 to 55 nucleotides; more typically from about 20 to 45 nucleotides; and most typically from about 25 to 35 nucleotides. Preferably, the primers are constructed to be relatively long (>30 bases) to maximize the number of mismatches that can be tolerated between a primer and its template. A primer pair need not be of the same length. For example, the forward primer may be made up of twenty-nine nucleotides; while the reverse primer can be made up of twenty-two nucleotides.

The primers can be natural or synthetic. For PCR, the primers are preferably single-stranded oligodeoxyribonucleotides.

Hybridization refers to the formation of a duplex structure by two single-stranded nucleic acids due to complementary base pairing. Hybridization can occur between fully complementary nucleic acid strands or between "substantially complementary" nucleic acid strands that contain minor regions of mismatch, i.e. variants. The degree of mismatch tolerated can be controlled by suitable adjustment of the hybridization conditions. Conditions under which only fully complementary nucleic acid strands will hybridize are referred to as "stringent hybridization conditions" or "sequence-specific hybridization conditions." Stable duplexes of

WO 02/083927

PCT/US02/12035

substantially complementary sequences can be achieved under less stringent hybridization conditions.

The hybridization conditions, i.e. stringency, of the present invention are set so that the primers can tolerate mismatches between the primers and the template, thereby allowing hybridization to all genetic variants. For example, the conditions could be set so that hybridization between a primer and a template can occur with up to 20% of the base pairs between the primer and the template mismatched.

Those skilled in the art of nucleic acid technology can determine suitable hybridization conditions empirically considering a number of variables including, for example, the length and base pair concentration of the oligonucleotides, ionic strength, the incidence of mismatched base pairs, and the temperature chosen for oligonucleotide annealing, following the guidance provided by the art (see, e.g., Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning--A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; Wetmur, 1991, *Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol.* 26(3/4):227-259; Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, Inc., New York) at Unit 2.10; and U.S. Patent No. 5,789,550.)

A detailed description of a cycle of a primer extension chain reaction of the present invention follows. The specific reaction described is PCR. However, other types of primer extension chain reactions can be used in the methods of this invention.

Figure 10 gives a step-by-step illustration of an amplification reaction of the invention. The target nucleic acid molecule is represented by T. The X's within the target sequence represent sites of potential variations.

The target nucleic acid molecule can exist as a single-stranded molecule, or as part of a double stranded molecule. In the example illustrated in Figure 10, the target nucleic acid molecule is double stranded. TC represents a nucleic acid molecule which is complementary to T.

As in conventional PCR, in each cycle of the amplification reaction any double-stranded nucleic acid molecules in a sample are rendered single-stranded by denaturation. Hybridization then takes place between the primers and the target

WO 02/083927

PCT/US02/12035

nucleic acid molecules. Figure 10(a) illustrates hybridization between a reverse primer (RP) and a target nucleic acid sequence (T).

As shown in Figure 10(b), the reverse primers then are extended, using the target nucleic acid molecules as templates, to form reverse primer amplification products (RPA). The reverse primer amplification products (RPA) are comprised of the reverse primer (RP) joined to the reverse primer extension product (RPE). For the purposes of this specification, the reverse primer extension product is the nucleic acid segment which is added to the reverse primer.

As can be seen from Figure 10(b), some of the variations (X) contained in the target sequence do not appear in the RPA. Specifically, the portion of the RPA which is made up of the RP does not contain variations.

As shown in Figure 10(c), the reverse primer amplification products formed in step(b) are denatured from their templates.

The forward primers (FP) are hybridized to either: (i) nucleic acid molecules which are complementary to the target nucleic acid molecules (TC), if present; or (ii) the reverse primer amplification products (RPA). Figure 10(d) illustrates the former embodiment. Nucleic acid molecules complementary to the target nucleic acid molecules, would be present if the target nucleic acid molecules were part of a double-stranded molecule.

The forward primers are then extended, using as templates the complementary nucleic acid molecules (TC) or using the reverse primer amplification products (RPA). Figure 10(e) illustrates the former embodiment.

As shown in Figure 10(e), the forward primers are extended to form forward primer amplification products (FPA). The forward primer amplification product (FPA) is comprised of the forward primer (FP) joined to the forward primer extension product (FPE). For the purposes of this specification, the forward primer extension product is the nucleic acid segment which is added to the forward primer.

As shown in Figure 10(e), when compared with the target sequence, some of the variations (X) contained in the target sequence do not appear in the FPA.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

Specifically, the portion of the FPA which is made up of the FP does not contain variations.

As shown in Figure 10(f), the forward primer amplification products formed in Figure 10(c) are denatured from their templates.

5 As shown in Figure 10(g), the reverse primers hybridize to the FPE portion of the FPA.

As shown in Figure 10(h), the reverse primers are extended, using the FP portion of the FPA as templates, to form additional reverse primer amplification products (ARPA), wherein a reverse primer joined to an additional reverse primer extension product (ARPE) constitutes an ARPA.

10 As shown in Figure 10(i), the ARPA products are denatured from their templates.

As shown in Figure 10(j), the forward primers hybridize to the RPE portion of the RPA.

15 As shown in Figure 10(k), the forward primers are extended, using the RP portion of the RPAs as templates, to form additional forward primer amplification products, wherein a forward primer joined to an additional forward primer extension product constitutes an AFPA.

As shown in Figure 10(l), the AFPA products are denatured from their

20 templates.

Steps (g) to (l) are repeated, using the additional reverse primer amplification products and the additional forward primer amplification products as templates for the reverse and forward primers, a sufficient number of times to produce a detectable quantity of additional reverse primer amplification product and/or of additional forward primer amplification product. Preferably, the steps are repeated using an automated cycling instrument. A sufficient number of times is at least about ten times, preferably at least about twenty times; more preferably at least about thirty times; and most preferably at least about forty times.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

The present inventors have discovered advantages when the primers hybridize with the amplification products in a certain way, which the inventors refer to as "nose-to-nose."

5 As can be seen in Figure 10(g), the sequence of the forward primer amplification products and the additional forward primer amplification products are such that the nucleotide at the 3' end of the reverse primer hybridizes with the nucleotide at the 5' end of the forward primer extension product or of the additional forward primer extension product.

10 Analogously, as can be seen in Figure 10(j), the sequence of the reverse primer amplification products and the additional reverse primer amplification products are such that the nucleotide at the 3' end of the forward primer hybridizes with the nucleotide at the 5' end of the reverse primer extension product or of the additional reverse primer extension product.

15 Figure 10 illustrates the primer extension chain reaction of only one variant. As indicated above, all variants of a family of pathogens can be amplified by the method of the invention.

The additional amplification products are identical, regardless of which variant they were generated from. Thus, in the example shown in Figure 10, the additional reverse primer amplification products have the sequence of the reverse primer directly joined to the additional reverse primer extension product. The additional reverse primer extension product is complementary to the forward primer (the forward primer complement). See Figure 10(h).

25 Analogously, the additional forward primer amplification products have the sequence of the forward primer directly joined to the additional forward primer extension product. The additional forward primer extension product is complementary to the reverse primer (reverse primer complement). See Figure 10(k).

30 Therefore, all of the additional primer amplification products have sequences that are combinations of either the reverse primer and forward primer complement, or the reverse primer complement and the forward primer. Since the reverse and forward primers all have the same sequences, all of the additional primer

WO 02/083927

PCT/US02/12035

amplification products have the same sequences. In other words, all of the potential variations have been eliminated.

In another embodiment, the sequence of the forward primer amplification products and the additional forward primer amplification products are such that the nucleotide at the 3' end of the reverse primer hybridizes with a nucleotide separated
5 from the nucleotide at the 5' end of the forward primer extension product or of the additional forward primer extension product by a gap of nucleotides. Analogously, the sequence of the reverse primer amplification products and the additional reverse primer amplification products are such that the nucleotide at the 3' end of the forward
10 primer hybridizes with a nucleotide separated from the nucleotide at the 5' end of the reverse primer extension product or of the additional reverse primer extension product by a gap of nucleotides.

In both cases, the gap comprises a sequence known to be highly conserved. Highly conserved regions of the genomes of viruses and bacteria are known. For
15 example, in the published sequence of HCV, short stretches of nucleic acids in the 5' non-coding region of the viral genome are known to be highly conserved between HCV genotypes (Okamoto et al., *J. Gen. Virol.*, 1991, 2697-2704; Smith et al., *J. Gen. Virol.*, 1995, 76:1749-1761; Simmonds et al., *J. Gen. Virol.*, 1993, 74: 2391-2399).

The gap preferably contains no more than five nucleotides. If the gap contains
20 two to five nucleotides, one or two of the nucleotides can be mismatched and still hybridize with the probe sequence. If the gap contains one nucleotide, this nucleotide can be a mismatch. Preferably, there are no mismatches.

Once the amplification reaction has been completed, the presence of the additional reverse primer amplification products or the additional forward primer
25 amplification products is detected by methods known in the art.

Preferably, the method of detection is based on the detection of the nucleic acid sequences of the additional reverse primer amplification products or of the additional forward primer amplification products. The detection probe used in such a
30 method comprises a sequence that is capable of hybridizing with the additional reverse primer amplification products or with the additional forward primer

WO 02/083927

PCT/US02/12035

amplification products. Since these amplification products are identical, only one detection probe is needed to reliably detect all the amplification products.

Additionally, the identity of the amplification products allows for stringent hybridization conditions to be used during the hybridization required for detection.

- 5 The use of stringent conditions leads to more reliable results by reducing the possibility of false positives from coincidentally similar non-target sequences.

The detection probe can be DNA, RNA, or combinations thereof. Modified nucleotides may be included, for example peptide nucleic acid (PNA), nitropyrole-based nucleotides, or 2'-O-methylribonucleotides. The nucleosides of the nucleic acid
10 or modified nucleic acid molecules may be linked in the usual manner, i.e. through phosphate linkages. Alternatively, the nucleosides may be linked through modified linkages, for example phosphorothioates.

In one embodiment, the probe sequence hybridizes over the junction in the amplification products. That is, the probe sequence hybridizes to a portion of both the
15 FP sequence and the AFPE sequence of the AFPA; or the probe sequence hybridizes to a portion of both the RP sequence and the ARPE sequence of the ARPA.

In this embodiment, the probe sequence is comprised of the nucleotide sequence of a segment of one of the primers and the nucleotide sequence of a segment which is complementary to the other primer. More specifically, the probe sequence
20 comprises either: (i) the nucleotide sequence of a segment of the forward primer and the nucleotide sequence of a segment which is complementary to the reverse primer; or (ii) the nucleotide sequence of a segment of the reverse primer and the nucleotide sequence of a segment which is complementary to the forward primer. The probe sequence can comprise either whole or partial sequences of the primer, and the other
25 primer's complement.

The probe sequence can be made up of equal portions of the nucleotide sequence of one of the primers and the nucleotide sequence of the other primer's complement. In such a case, the probe sequence will "hybridize symmetrically" to the amplification products. (See Figure 5A(I).)

WO 02/083927

PCT/US02/12035

Preferably, for improved sensitivity, the probe sequence can be designed to “hybridize asymmetrically” to the amplification products. In particular, the probe sequence can be made up of unequal portions of the nucleotide sequence of one of the primers and the nucleotide sequence of the other primer’s complement. (See Figure 5A(II-IV).) For example, about 60% to about 99% of the probe sequence comprises the nucleotide sequence of one of the primers. The remainder of the probe sequence (e.g., about 1% to about 40%) comprises the nucleotide sequence of the complement of the other primer. More preferably, the percentage of the probe sequence which corresponds to the sequence of one of the primers is from about 80% to about 97%.

Where the sequence of the additional amplification products contains a segment of one of the primers directly adjoined to a segment of the other primer’s complement, the probe sequence can be designed to hybridize exactly to all, or a portion of, the additional amplification products.

Where the additional amplification products contain an intervening gap, the gap is preferably a known sequence so that the probe sequence can be designed to be fully complementary to the gap. However, a probe sequence can hybridize to additional amplification products which contain a certain number of mismatched residues in the gap, as described above.

Instead of hybridizing over the junction, the probe sequence can also hybridize exclusively with the segment of the additional amplification product that is complementary to a primer. Accordingly, in this embodiment, the probe sequence is comprised of either: the nucleotide sequence of a segment of the forward primer, and not the nucleotide sequence of a segment which is complementary to the reverse primer; or the nucleotide sequence of a segment of the reverse primer, and not the nucleotide sequence of a segment which is complementary to the forward primer.

In one embodiment of the primer extension chain reactions of the invention, equal concentrations of the forward primer and reverse primer are used. In this embodiment, the concentrations are said to be symmetric.

In a preferred embodiment, “asymmetric concentrations” of the forward and reverse primers are used. In particular, for improved sensitivity, the primer whose

WO 02/083927

PCT/US02/12035

nucleotide sequence makes up part of the probe sequence is provided in a lower concentration in the sample as compared with the other primer. "Asymmetric concentrations" of primers are particularly preferred if the probe sequences "hybridize asymmetrically" with the additional amplification products; or hybridize exclusively with the segment of the additional amplification products that is complementary to a primer.

For example, if the probe sequence comprises a segment of the nucleotide sequence of the forward primer, then the molar ratio of the forward primer to the reverse primer (FP:RP) is about 1:5 to about 1:20. Analogously, if the probe sequence comprises a segment of the nucleotide sequence of the reverse primer, then the molar ratio of the reverse primer to the forward primer (RP:FP) is about 1:5 to about 1:20, more preferably from about 1:6 to about 1:15, and most preferably about 1:10.

After the amplification reaction has taken place in the biological sample a sufficient number of times, the detection probe is contacted with the sample. The probe sequence of the detection probe hybridizes with any additional amplification products that may be present in the sample. If the probe sequence comprises the nucleotide sequence of a segment of the forward primer (exclusively or further comprising the nucleotide sequence of a segment of the reverse primer complement), the probe sequence will hybridize with the additional reverse primer amplification products. Analogously, if the probe sequence comprises the nucleotide sequence of a segment of the reverse primer (exclusively or further comprising and the nucleotide sequence of a segment of the forward primer complement), the probe sequence will hybridize with the additional forward primer amplification products.

In a preferred embodiment, the detection probe is a self-altering signal-generating probe. This probe comprises a first nucleic acid sequence; a second nucleic acid sequence complementary to the first nucleic acid sequence; and a probe sequence which connects the first nucleic acid sequence with the second nucleic acid sequence. The first nucleic acid sequence is attached to a reporter moiety which is capable of generating a detectable signal. The second nucleic acid sequence is attached to an interactive moiety which is capable of altering the signal generated by the reporter moiety when the reporter moiety and the interactive moiety are in

WO 02/083927

PCT/US02/12035

sufficient proximity to each other. For example, when the first and the second nucleic acid sequences are hybridized to one another, known as the "closed conformation," the reporter moiety is brought into proximity with the interactive moiety. Therefore, the signal is altered. Altering the signal includes decreasing, i.e. quenching; increasing; or otherwise changing the signal, such as the intensity or wavelength of the signal. Quenching the signal includes reducing or eliminating the signal.

The reporter and interactive moieties can be attached at any point on the detection probe which would allow for the alteration by the interactive moiety of a signal generated by the reporter moiety for detection of the additional amplification products. In the preferred embodiment, the reporter moiety and the interactive moiety are attached at the distal termini of the self-altering signal-generating probe.

In the absence of additional amplification products, the detection probe is in the closed conformation. The reporter and interactive moieties are in proximity to each other. Therefore, the signal is altered.

Upon hybridization of the probe sequence with the additional reverse primer amplification product or with the additional forward primer amplification product, the first and second nucleic acid sequences of the detection probe become denatured. This is known as the "open conformation."

Upon denaturation, the interactive moiety is no longer in sufficient proximity to the reporter moiety to alter the signal. The difference between the altered signal and the unaltered signal is detected. When the interactive moiety quenches the signal, for example, the unaltered signal is increased; or if the quenching was complete, a signal is generated.

The strength of the hybridization formed between the first and second nucleic acids (i.e., the stem of the probe) can be adjusted by routine experimentation to achieve proper functioning. For example, the strength is a function of the length of the nucleotides. The lengths of the first and second nucleic acid sequences are preferably in the range of about 3 to 15, more preferably about 4 to 7 nucleotides. In addition to length, the strength of the hybridization can be reduced by decreasing the G-C content and by inserting destabilizing mismatches in the nucleotides.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

The length of the probe sequence is not critical. However, the length cannot be so short that effective binding with the additional amplification products is not achieved. Additionally, the length cannot be so great that separation of the reporter moiety and the interactive moiety is not achieved despite the probe sequence being
5 hybridized with the products. Preferably, the probe sequence comprises from about ten to about thirty nucleotides; more preferably from about eighteen to about twenty-four nucleotides; and most preferably from about nineteen to about twenty-two nucleotides. The probes can be free in solution, or they can be tethered to a solid surface.

10 Any concentration of the detection probe that produces a detectable signal can be used in the methods. For example, the concentration of the detection probe can be provided in the sample at about the same concentration as one, or both, of the primers.

Preferably, the concentration of the detection probe is greater than the concentrations of the primers. In this manner, the detection probe is favored in the
15 competition between the primer, whose nucleic acid sequence is part of the probe sequence, and the detection probe for the additional amplification products. This increase in the concentration of the detection probe is particularly preferred when the probe sequence "hybridizes asymmetrically" to the amplification products, or hybridizes exclusively to the portion of the additional amplification products which
20 are complementary to a primer, as described above. For example, the detection probe can be provided at a concentration which is from about 1.3 to about 5 times; more preferably from about 1.5 to about 3 times; and most preferably about twice as great as the concentration of the primer whose nucleic acid sequence is not part of the probe sequence.

25 In a preferred embodiment, the probe sequence is made up of, for example, at least 65% of the sequence of the forward primer; the forward primer is provided in a concentration which is about ten times less than the concentration of the reverse primer; and the detection probe is provided in a concentration which is about twice as great as the reverse primer.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

An unaltered signal generated by the reporter moiety is an indication that the target nucleic acid molecule is present in the sample. The level of the detectable unaltered signal generated by the probe is proportional to the quantity of the target nucleic acid molecules in the sample.

5 The detectable signal of the detection probes can be any kind of signal including, for example, a luminescent signal, a color dye signal, or a radioactive signal. In the preferred embodiment, the detectable signal is a luminescent signal. The luminescent signal can be a fluorescent signal or chemiluminescent signal.

In one embodiment, the reporter and interactive moieties of this invention constitute a "FRET" pair. (Selvin, P. R., "Fluorescence Resonance Energy Transfer," Methods in Enzymology 246: 300-335 (1995).) FRET pairs rely on energy transfer for signal generation. The reporter moiety absorbs energy at a first wavelength and emits a second, longer wavelength. The interactive moiety absorbs some or most of the emitted energy to the degree the interactive moiety's spectrum overlaps the
15 emission spectrum. If the interactive moiety is a quencher, the quencher releases the energy as heat. If the interactive moiety is a fluorophore, the interactive moiety re-emits at a third, still longer wavelength. The mechanism of FRET-pair interaction requires that the absorption spectrum of the interactive moiety overlaps the emission spectrum of the reporter moiety. The efficiency of FRET interaction is linearly
20 proportional to that overlap.

In another embodiment, the reporter moiety and interactive moiety are a non-FRET pair. In particular, the interactive moiety need not have an absorption spectrum that overlaps the emission spectrum of the reporter moiety. That is, the absorption wavelength of the interactive moiety can be shorter than the reporter's excitation
25 maximum and emission wavelength. Non-FRET pairs are described in U.S. Patent 6,150,097 and are incorporated herein by reference. The detectable signal in a non-FRET pair can be a change in the absorption spectra, as an alternative to a change in luminescence.

Preferably, the reporter moieties of the detection probes used in the methods
30 of this invention are fluorophores. The fluorophore can be a xanthene dye, a cyanine

WO 02/083927

PCT/US02/12035

dye, a dansyl derivative, EDANS, coumarin, such as 3-phenyl-7-isocyanatocoumarin, Lucifer yellow, BODIPY, Cy3, Cy5, Cy7, Texas red, erythrosine, naphthylamine, Oregon green, ALEXA fluor dyes, acridines, such as 9-isothiocyanatoacridine and acridine orange, N-(p-(2-benzoxazolyl)phenyl)maleimide, benzoxadiazoles, stilbenes, and pyrenes.

The xanthene dye can be fluorescein or rhodamine. Preferably, the fluorescein is 5-carboxyfluorescein (5-FAM); 6-carboxyfluorescein (6-FAM); 2',4',1,4,-tetrachlorofluorescein (TET); 2',4',5',7', 1,4-hexachlorofluorescein (HEX); eosin; calcium green; fluorescein isothiocyanate (FITC); or NED. Preferably, the rhodamine dye is tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA); tetrapropano-6-carboxyrhodamine (ROX); 2',7'dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxyrhodamine (JOE) or tetramethylrhodamine (TMR). Many suitable forms of these compounds are commercially available with various substituents on their xanthene rings which can be used as the site for bonding or as the bonding functionality for attachment to an oligonucleotide.

The fluorophore can also be a naphthylamine compound. The naphthylamine compounds have an amino group in the alpha or beta position. Included among such naphthylamino compounds are 1-dimethylaminonaphthyl-5-sulfonate, 1-anilino-8-naphthalene sulfonate and 2-p-toluidinyl-6-naphthalene sulfonate.

The fluorophore can also be a combination fluorophore. An example of a combination fluorophore are fluorescein-rhodamine dimers, described, for example, by Lee et al. (1997), *Nucleic Acids Research* 25:2816. Fluorophores may be chosen to absorb and emit in the visible spectrum or outside the visible spectrum, such as in the ultraviolet or infrared ranges.

Preferably, the interactive moieties of the detection probes used in the methods of this invention are quenchers. The quencher can be DABCYL, anthroquinone, nitrothiazole, nitroimidazole or malachite green. Variants of DABCYL, such as DABSYL, DABMI or methyl red, are also suitable. Also the asymmetric cyanine dye compounds disclosed in U.S. Patent 6,080,868 can be used as the quenching moiety; and are incorporated by reference.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

Additionally, fluorophores can also be used as the quenchers. For example, fluorophores that do not fluoresce in the detection range when the probe is in the open conformation can quench fluorescence when in proximity with certain other fluorophores.

5 An example of a self-altering signal-generating probe is a molecular beacon probe. The loop of a molecular beacon probe corresponds to the probe sequence, as described above. Nucleotide sequences, referred to as "arms," correspond to the first and second nucleotide sequences, as described above. Molecular beacon probes are described in U.S. Patent 5,925,517; PCT application WO95/13399; PCT application
10 WO97/39008; and Tyagi and Kramer (1996) *Nature Biotechnology* 14:303; and are incorporated herein by reference.

Additionally, the molecular beacon probes can be modified in any manner which allows for detection of the amplification products. Modified probes include, for example, the "wavelength-shifting" molecular beacon probes described in U.S.
15 Patent 6,037,130; and incorporated herein by reference. In particular, these modified probes have the basic molecular beacon probe structure, namely, a loop; stem duplex; a quencher on one end; and a reporter moiety, typically a fluorophore, opposite the quencher on the other end. The reporter is referred to as the "harvester reporter." The modification of the probe is that the probe includes an extension of several
20 nucleotides past the "harvester reporter." The extension terminates in a nucleotide that is linked to an "emitter reporter," typically another fluorophore. In the presence of the target nucleic acid molecule, the quencher separates from the reporters. In this open conformation the "harvester reporter" absorbs energy from the excitation source but transfers a significant portion of the energy, in some constructions the great
25 majority of the energy, to the "emitter reporter," which receives the transferred energy and emits it at its characteristic, longer wavelength.

In another embodiment, the detection probe includes a pair of oligodeoxynucleotides complementary to contiguous regions of the additional
amplification products. (Cardullo et al. (1988), *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 85: 8790-8794
30 and Heller et al. *EP 00 70685*. One oligodeoxynucleotide contains the reporter moiety on its 5' end, and the other oligodeoxynucleotide contains the interactive

WO 02/083927

PCT/US02/12035

moiety on its 3' end. When the probe is hybridized to the target sequence, the two moieties are brought very close to each other. When the sample is stimulated by light of an appropriate frequency, fluorescence resonance energy transfer from one moiety to the other occurs, producing a measurable change in spectral response from the moieties, thus signaling the presence of targets.

In yet another embodiment, the detection probe includes a pair of oligodeoxynucleotides. The pair is complementary to one another. Also, one of the pair has the sequence of the target nucleic acid molecule; and the other of the pair has the sequence which is complementary to the target nucleic acid molecule. (Morrison and Stols, "Sensitive Fluorescence-Based Thermodynamic and Kinetic Measurements of DNA Hybridization in Solution," *Biochemistry* 32: 309-3104 (1993) and Morrison EP 0 232 967 A2, claiming priority of U.S. application Ser. No. 817,841, filed Jan. 10, 1986.) Each oligodeoxynucleotide of the probe includes a reporter moiety conjugated to its 3' end and an interactive moiety conjugated to its 5' end. When the two oligonucleotides of the probe are annealed to each other, the reporter moiety of each is held in close proximity to the interactive moiety of the other. With the probe in this conformation, if the reporter is then stimulated by light of an appropriate wavelength, the signal is altered, preferably quenched, by the interactive moiety. However, when either probe molecule is bound to a target, the altering effect of the complementary oligodeoxynucleotide of the probe is absent. In this conformation a signal is generated. The oligodeoxynucleotides of the probe are too long to self-quench by FRET when in the target-bound conformation.

The signal generated by the detection probe can be detected and measured by any means known in the art which provides reliable detection and measurement.

For example, the ABI 7700 (manufactured by Applied Biosystems, Inc. in Foster City, CA) is adapted for measuring signal emission, typically fluorescence emissions. The ABI 7700 uses fiber optics connected with each well in a 96-well amplification reaction tube arrangement. The instrument includes a laser for exciting the reporter moieties and is capable of measuring the signal intensity, typically fluorescence spectra intensity, from each tube with continuous monitoring during amplification.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

The additional amplification products can be quantified by endpoint and real-time measurements. In an end-point mode, the signal measurement is performed after the amplification reaction is complete, e.g., after all or substantially all of the cycles of an amplification reaction have been completed. In a real-time mode, signal
5 measurement is performed multiple times during the amplification reaction, e.g., after each thermocycle of an amplification reaction. The real-time mode is preferred when a quantitative measure of the initial amount of target nucleic acid molecule is required, e.g., the copy-number of viral or bacterial nucleic acids present in a sample.

The absolute amount of a target nucleic acid molecule present in a test sample
10 prior to amplification can be determined using a standard curve. For example, a standard curve can be generated from the results obtained from a series of parallel primer extension chain reactions. These parallel reactions are performed on a series of standard samples that contain a known amount of a nucleic acid molecule which is similar to the target nucleic acid molecule. A series of about five to about twenty
15 standard samples of different known amounts are used. The parallel extension reactions use the same reaction conditions and reagents as used in the extension reaction of the target nucleic acid molecule.

In each parallel reaction, the increase in signal intensity as compared with the baseline signal intensity (ΔR_n) is measured at the annealing temperature for each
20 amplification cycle. The baseline value is the magnitude of the signal detected prior to the formation of the additional amplification products. Threshold values (C_t) are calculated for each reaction. C_t is the amplification cycle number at which the generated signal intensity is distinguishable from the baseline signal intensity. The starting quantity of the nucleic acid in each standard sample can be plotted against its
25 corresponding C_t value. This plot is the standard curve.

In general, the threshold value must be high enough to be statistically different from the baseline value but below the signal obtained for the saturation phenomenon associated with amplification reactions. Typically, the threshold value is set at about ten standard deviations above the mean baseline signal intensity. (See, for example,
30 Heid, et al. Genome Research 6:986-994 (1996)).

WO 02/083927

PCT/US02/12035

The Ct value for the sample including the target nucleic acid molecule is also calculated. This Ct value can be plotted against the standard curve. Using the standard curve, the amount of the target nucleic acid molecule in the test sample can then be quantified by extrapolation. Figure 9 illustrates this method of PCR target
5 quantitation (in the case of HCV RNA) using the "nose-to-nose" PCR primers and reaction conditions described in the Example below.

Computer software provided with detection instruments, for example the ABI 7700, is capable of recording the signal intensity over the course of an amplification. These recorded values can be used to calculate the increase in signal intensity on a
10 continuous basis. Although the ABI 7700 instrument is typically used to monitor fluorescence, the Ct values need not be determined from fluorescence measurements. Ct values could be determined from measurements of a variety of different types of signals.

The present invention also relates to kits, multicontainer units comprising
15 useful components for practicing the present method. The kit comprises a set of nose-to-nose primers for the amplification of the variants of a particular pathogen; and a probe, such as the self-altering signal-emitting probes described above. In some cases, the probes are fixed to an appropriate support membrane. Other optional components of the kit include, for example, an agent to catalyze the synthesis of
20 primer extension products, the substrate nucleoside triphosphates, the appropriate buffers for amplification and/or hybridization reactions, a nucleic acid reference standard to permit quantitation of template molecules in test samples, and instructions for carrying out the present method.

EXAMPLES

25 The examples of the present invention presented below are provided only for illustrative purposes and not to limit the scope of the invention. Numerous embodiments of the invention within the scope of the claims that follow the examples will be apparent to those of ordinary skill in the art from reading the foregoing text and following examples.

Detection of HCV Variants

A comparison was made of three different methods for nucleic acid-based detection of eight strains of HCV which are prototypes for the main HCV genotypes and subtypes. The four detection methods used were: (A.) The nose-to-nose beacon RT-PCR of the present invention, (B.) Conventional beacon RT-PCR, and (C.) The COBAS AMPLICOR HCV MONITOR Test Version 2.0 (COBAS HCM-2; Roche Diagnostic Systems Inc, Branchburg, NJ). The COBAS HCM-2, which is an RT-PCR-based assay, was carried out according to the manufacturers' instructions. Conventional beacon RT-PCR and "nose-to-nose" beacon RT-PCR were carried out as follows:

PCR primers were designed to amplify a segment of the 5' non-coding region of the HCV genomic RNA. The nucleic acid sequence of this region of the genome is relatively highly conserved between HCV genotypes and subtypes.

Conventional primers for beacon PCR were designed to amplify a 101 b.p. segment of DNA corresponding to nucleotides 66 to 166 of the published sequence of HCV-H [Inchauspe et al, Proc Natl Acad Sci (USA), 88:10292-10296, 1991; Genbank M67463]. The intervening gap between the two conventional RT-PCR primers is 61 b.p. in length. The primers are as follows:

Forward primer: 5'-ACGCAGAAAGCGTCTAGCCA-3' (SEQ ID NO: 1);

Reverse primer: 5'-GTACTCACC GGTTCCGCAGA-3' (SEQ ID NO:2).

The primers for "nose-to-nose" RT-PCR of the present invention were designed such that there is no intervening nucleotide gap between the two primers. The region amplified is a 51 b.p. segment corresponding to nucleotides 83 to 133 of the published sequence of HCV-H. The primers are as follows:

Forward primer: 5'-CCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 3);

Reverse primer: 5'-CCCGGAGGGGGGGTCTGGAG-3' (SEQ ID NO: 4).

For both conventional and "nose-to-nose" PCR, the molecular beacon used for PCR product detection was 5'-FAM-

WO 02/083927

PCT/US02/12035

ccgggcTTAGTATGAGTGTCTGTCGAGCCTgccggg-DABCYL-3' (SEQ ID NO: 5).
The stem nucleic acids are shown in lower case, and the probe loop nucleic acids
(corresponding to nucleotides 91 to 113 of the HCV-H sequence) are shown in upper
case.

5 Complementary DNA was reverse transcribed from extracted plasma RNA
using either the conventional reverse primer, or the nose-to-nose reverse primer
described above. Each 20 μ l reaction contained 2.5 μ M reverse primer, 1 unit Mo-
MuLV reverse transcriptase (GIBCO BRL, Grand Island, NY), 1X reverse
transcriptase buffer (GIBCO BRL), 5 mM dithiothreitol (DTT), 0.06 units RNasin
10 (Promega, Madison, WI), and 0.5 mM dNTPs, i.e. dATP, dTTP, dCTP and dGTP
(Pharmacia, Piscataway, NJ). Reactions were incubated at 42°C for 45 min. The
reverse transcriptase was then inactivated by a further incubation at 95°C for 2 min.

For PCR amplification and detection, the products of reverse transcription
were incubated in a final volume of 50 μ l reaction mix containing forward primer (0.1
15 μ M for "nose-to-nose PCR and 1 μ M for conventional PCR), 1 μ M reverse primer,
1.25 units AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1X
AmpliTaq Gold Buffer II (Applied Biosystems), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, and
and 10 ng molecular beacon. PCR amplification was performed in the Applied
Biosystems 7700 Sequence Detector using the following cycling parameters: 95°C for
20 10 min (enzyme activation), followed by 44 cycles [95°C, 30 sec (denaturation);
60°C, 1 min (annealing); 72°C (extension)]. Relative fluorescence of the molecular
beacon was measured at the annealing temperature. Quantitation of HCV template
molecules was achieved by inclusion of an RNA standard curve in each RT-PCR
experiment. The standard curve was constructed using 10, 25, 50, 10², 10³, 10⁴, 10⁵
25 or 10⁶ molecules synthetic HCV RNA Transcript diluted in 1 μ g/ml yeast tRNA
(Ambion, Austin, TX).

Table 1 shows a comparison of the three different methods for detection of
eight strains of HCV. These strains are prototypes for the main HCV genotypes and
subtypes. The nose-to-nose beacon assay of the present invention (A) detects all eight
30 genotypes/subtypes, while conventional beacon PCR (B) fails to detect Genotypes 4a
and 5a.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

Results from the COBAS-HCM-2 assay are presented as International Units (I.U.). Although various conversion factors have been suggested (Saldanha et al, Vox Sang, 1999;76(3):149-158; Cuijpers et al, 2001;81(1):12-20), the exact relationship between I.U. and HCV RNA copy number is still under debate, particularly for HCV
5 genotypes other than 1a and 1b. Because of this, Roche Diagnostic Systems does not currently suggest a conversion factor for results obtained with the COBAS-HCM-2 assay. For analytical purposes, it is therefore assumed that I.U. and RNA copy number are equivalent. In comparison with the COBAS-HCM-2 assay, the nose-to-nose beacon RT-PCR assay is equivalent to or slightly more sensitive for Genotypes
10 1a, 1b, 2b and 6a, but is 1 log (10-fold) more sensitive for Genotype 4a, 0.5 log (3.2-fold) more sensitive for Genotypes 2a and 5a, and 0.3 log (2-fold) more sensitive for Genotype 3a. A statistical analysis comparing the relative sensitivity of the two assays is shown in Table 2.

Table 1

Test Sample ¹				
HCV Genotype / Subtype	Virus Strain Name	A. Nose-to-Nose Beacon PCR (Log ₁₀ RNA Molecules/ml)	B. Conventional Beacon PCR (Log ₁₀ RNA Molecules/ml)	C. COBAS HCM-2 (Log ₁₀ International Units/ml)
1a	H strain	5.1	5.0	4.9
1b	HC-J4/91	4.7	4.7	4.6
2a	HC-J6	5.1	4.2	4.6
2b	HC-J8	4.0	3.7	3.9
3a	S52	4.3	3.7	4.0

WO 02/083927

PCT/US02/12035

4a	ED43	6.3	<2.6	5.3
5a	SA13	5.2	<2.6	4.7
6a	HK6a	4.8	4.4	4.7

1. Samples tested were plasma from chimpanzees which were infected with each of the prototype HCV strains: H strain [Inchauspe et al, Proc Natl Acad Sci (USA), 88:10292-10296, 1991; Genbank M67463], HC-J4/91 [Okamoto et al, Virology, 190:894-899, 1992; Genbank D10750], HC-J6 [Okamoto et al, J Gen Virol, 72:2697-2704, 1991; Genbank D00944], HC-J8 [Okamoto et al, Virology, 188: 331-341, 1992; Genbank D10988], S52 [Bukh et al, Proc Natl Acad Sci (USA) 89:4942-4946, 1992; Genbank M84837], ED43 [Chamberlain et al, 78:1341-1347, 1997; Genbank Y11604], SA13 [Bukh et al, J Infect Dis, 178:1193-1197; Genbank AF064490],
5 HK6a [Adams et al, Bichem Biophys Res Commun, 234:393-396, 1997; Genbank Y12083].
10

Table 2

Detection of HCV Genotypes by Nose-to-Nose Beacon PCR and COBAS HCM-2 Assays

HCV Genotype	Nose-to-Nose Beacon PCR (Log ₁₀ RNA Molecules/ml) x +/- s.d. (n) ¹	COBAS HCM-2 (Log ₁₀ I.U./ml) x +/- s.d. (n)	Fold Difference ²
1a	5.1 +/- 0.25 (7)	4.9 +/- 0.12 (2)	1.6x
1b	4.7 +/- 0.19 (7)	4.6 +/- 0.12 (5)	1.3x
2a	5.1 +/- 0.18 (6)	4.6 +/- 0.22 (6)	3.2x (p=0.0013)
2b	4.0 +/- 0.22 (7)	3.9 +/- 0.32 (6)	1.3x
3a	4.3 +/- 0.11 (7)	4.0 +/- 0.12 (6)	2.0x (p=0.0032)
4a	6.3 +/- 0.12 (7)	5.3 +/- 0.33 (6)	10x (p<0.0001)
5a	5.2 +/- 0.12 (6)	4.7 +/- 0.26 (6)	3.2x (p=0.0002)
6a	4.8 +/- 0.19 (7)	4.7 +/- 0.90 (2)	1.3x

WO 02/083927

PCT/US02/12035

1. Results are presented as mean +/- standard deviation of (n) replicate assays. Results from the COBAS HCM-2 assay are expressed as International Units (I.U.)
2. Fold difference in sensitivity of the two assays is calculated as the arithmetic ratio of values obtained by Nose-to-Nose Beacon PCR to those obtained by the Roche Monitor Assay. Two-tailed P values were calculated using GraphPad InStat Software.

Screening of Plasma Samples from Individuals Infected with Diverse HCV

Genotypes

The "nose-to-nose" PCR of the present invention was used to screen a subset of patient plasma samples from the ICBS HCV Master Panel. This panel, which is being expanded continually, is compiled by the Centers for Disease Control (CDC) in collaboration with the International Consortium for Blood Safety (ICBS). The panel consists of plasma samples collected from diverse geographic regions. All samples are screened for HCV antibody and are subjected to genotype analysis in two independent testing laboratories at the CDC and at Visible Genetics Inc. (VGI).

A total of 192 specimens, comprising plasma samples collected in Egypt, Vietnam and Indonesia were provided by the CDC. Of these, 134 were listed as being unequivocally positive for HCV RNA on the basis of PCR-genotyping data obtained by CDC, VGI or both. Five samples were listed as having equivocal or conflicting PCR-genotype data. Fifty-three samples were listed as not genotypeable (i.e. negative for HCV RNA).

Total RNA was extracted from 70 μ l freshly thawed plasma using a robotic extraction procedure in which RNA is bound and eluted from PVDF membranes in 96-well plate format (Lee and Prince, 2001, *Transfusion*; 41:483-487). Total RNA was obtained in a volume of 50 μ l nuclease-free water. Ten microliters of this (equivalent to 14 μ l plasma) were then subjected to reverse transcription and PCR using the nose-to-nose primers (SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4) and molecular beacon (SEQ ID NO: 5) described above.

Table 2 shows the results of RT-PCR for the 134 unequivocally HCV-positive samples present in the panel. "Nose-to-nose" PCR successfully detected the vast majority of HCV isolates from all genotypes. Of the 53 samples which were not

WO 02/083927

PCT/US02/12035

positive for HCV RNA in genotype assays, only one sample gave a weakly positive PCR signal ($10^{3.1}$ RNA molecules per ml).

Samples with a virus burden less than ~700 copies/ml (9.9 copies per 14 ul plasma) would not be detected using the combination of robotic extraction and "nose-to-nose" RT-PCR describe above. The results shown in Table 2 clearly demonstrate that the present invention permits the detection of diverse HCV genotypes with a single set of "nose-to-nose" primers and molecular beacon.

Table 2

10

Genotype	Total Detected / Total Tested	Range (Log ₁₀ RNA Molecules/ml Plasma)	(%)
1a	22/23	3.13 – 6.93	95.7
1b	19/20	3.18 – 7.13	95.0
1c	3/3	5.84 – 6.72	100
2a	3/3	3.85 – 6.85	100
2e	1/1	6.69	100
3a	3/3	4.36 – 6.8	100
3b	1/1	4.93	100
4a	43/43	3.78 – 7.0	100
4d	9/9	5.08 – 6.56	100
4l	1/1	6.25	100
6a	8/8	3.28 – 6.37	100
10a (3)	5/6	4.22 – 7.23	83.3
Ambiguous***	12/13	4.11 – 6.85	92.3
TOTAL	130/134		97.0

*** Samples for which genotyping analysis indicated mixed infection or as yet indeterminate classification have been listed separately.

15 **Comparison of Nose-to-Nose PCR and Conventional PCR for Detection of HIV-1 Group M Subtype B Variants**

Figure 6a shows an alignment of proviral DNA sequences corresponding to the V3 region and flanking sequences of four different HIV variants, all of Group M (Major) Subtype B (HIV/RT-1, HIV/RT10, HIV-38-1 and HIV/38/3). The V3 region is the most highly variable segment of the HIV genome. A molecular beacon was designed with a probe-loop structure exactly identical to variant HIV/RT-1

WO 02/083927

PCT/US02/12035

(nucleotides 76-97 on the V3 sequence shown). This probe sequence possesses 1, 3, or 4 mismatches with variants HIV/RT-10, HIV/38-1 and HIV/38-3 respectively (Figure 6a).

5 PCR primers for "nose-to-nose" PCR were designed as follows. The forward primer (5'-acaatacaagaaaaggataactatgggac-3') (SEQ ID NO: 6) corresponds to nucleotides 65-94 of the sequence of HIV/RT-1 shown in Figure 6a. The forward primer is known as NBF. The reverse primer (5'tttctctgtgtataaagtactctcccg-3') (SEQ ID NO: 7) corresponds to nucleotides 95-124 of the same sequence. The reverse primer is known as NBR.

10 Primers for conventional PCR were designed to generate a 177b.p. PCR product as follows. The forward primer (5'taatagtagacgtgaatgatctg-3') (SEQ ID NO: 8) corresponds to nucleotides 14-37 of the sequence of HIV/RT-1 shown in Figure 6a. The reverse primer (5'gtttaaagtgtattccatgc-3') (SEQ ID NO: 9) corresponds to nucleotides 168-190 of the same sequence.

15 Figure 7 shows the results of an experiment to compare the ability of conventional beacon PCR with nose-to-nose PCR for detection of each of the 4 HIV variants shown in Figure 6a. PCR reactions contained 10^6 template molecules of HIV/RT-1, HIV/RT-10, HIV/38-1 or HIV/38-3, the molecular beacon shown in Figure 6b, and either the conventional or nose-to-nose primers described above. Control PCR reaction contained either no template or 150ng human genomic DNA. Amplification was performed in the Perkin Elmer 7700 using the following cycling parameters: 95°C for 10min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec (denaturation), 20 50°C for 1 min (annealing) and 72°C for 30 sec (extension). Fluorescence of the molecular beacon was measured at the 50°C annealing temperature. Fluorescence was then plotted graphically against PCR cycle number. Efficiency of PCR amplification/detection is determined by the "threshold cycle" i.e. the lowest 25 numbered PCR cycle required to generate a positive fluorescent signal.

As shown in Figure 7a, the conventional beacon PCR technique was capable of detecting both HIV/RT-1 (exact match to the beacon) and HIV/RT-10 (one 30 mismatch), with an equivalent threshold cycle (cycle 23) although the peak level of

WO 02/083927

PCT/US02/12035

fluorescence obtained in the latter case was ~2 fold lower than that for the exact-match template. The conventional beacon PCR technique failed to detect either HIV/38-1 (3 mismatches) or HIV/38-3 (4 mismatches), despite the fact that PCR product was generated from all 4 variants, as shown by gel analysis (Figure 8).

- 5 By contrast, the nose-to-nose PCR technique was capable of detecting all 4 HIV variants (0, 1, 3 or 4 mismatches) with comparable threshold cycle (Figure 7b). Importantly, no signal was detected in reaction tubes containing either no template, or 150ng human genomic DNA.

10 **Detection of Different Subtypes of HIV-1 Group M**

PCR primers were designed to amplify a segment of the gag gene of the HIV-1 genomic RNA, which is relatively well conserved between the different Subtypes of HIV-1 Group M. Despite this relative conservation, individual HIV-1 Subtypes show up to 20% nucleotide sequence diversity within this region of the genome (Roberton et al, 1999 in: Human Retroviruses and AIDS 1999, pp 492-505, Editors Kuiken et al, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico).

Conventional primers for beacon PCR were designed to amplify a 94 b.p. segment of RNA corresponding to nucleotides 1478 to 1571 of the published sequence of the Subtype B HIV-1 isolate HXB2 [Ratner et al, 1985, Nature, 20 313(6000):277-284; Genbank K03455]. The intervening gap between the two conventional RT-PCR primers is 53 b.p. The primers are as follows:

Forward primer: 5'- AACCAAGGGGAAGTGACATA -3' (SEQ ID NO: 10);

Reverse primer: 5'- ATTTCCTCTACTGGGATAGGT-3' (SEQ ID NO: 11).

The primers for "nose-to-nose" RT-PCR of the present invention were 25 designed to amplify a 57 b.p. segment corresponding to nucleotides 1502 to 1558 of the published sequence of HIV-1 HXB2. There is no intervening gap between the two primers. The primers are as follows

Forward primer: 5'- GAACTACTAGTACCC TTCAGGAACAAATAG-3'
(SEQ ID NO: 12);

WO 02/083927

PCT/US02/12035

Reverse primer: 5' -GGATAGGTGGATTATTGTTCATCCATC-3' (SEQ ID NO: 13).

For both conventional and "nose-to-nose" PCR, the molecular beacon used for PCR product detection was 5'-FAM- egcctTACCCTTCAGGAACAAATAGagcg -
5 DABCYL-3' (SEQ ID NO: 14). The stem nucleic acids are shown in lower case, and the probe loop nucleic acids (corresponding to nucleotides 1512 to 1530 of the HIV-1 HXB2 sequence) are shown in upper case.

Virus isolates from HIV-1 Subtypes A, B, C, D, F and G were obtained as cell-free culture supernatants from the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID,NIH. RNA was extracted from 140 ul freshly thawed culture supernatant. Complementary DNA was reverse transcribed from extracted RNA using either the conventional reverse primer, or the nose-to-nose reverse primer described above. Reaction conditions for both cDNA synthesis and PCR amplification were essentially the same as those described above for HCV. All
10 assays were carried out in triplicate. Quantitation of HIV template molecules was achieved by inclusion of an RNA standard curve in each RT-PCR experiment. The standard curve was constructed using 1, 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ or 10⁶ molecules HIV-1 RNA diluted in 1 µg/ml yeast tRNA (Ambion, Austin, TX).

Table 3 shows a comparison of conventional RT-PCR and "nose-to-nose" RT-
20 PCR for detection of HIV-1 Subtypes. The "nose-to-nose" assay of the present invention (A.) detects all 6 HIV-1 Subtypes tested, while the conventional assay fails to detect Subtypes A, D and G.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

Table 3

Test Sample ¹		Log ₁₀ RNA molecules per ml of culture supernatant detected by:	
HIV -1 Subtype	Virus Strain Name	Conventional Beacon RT-PCR	"Nose-to-Nose" Beacon RT-PCR
A	92UG029 ²	<3.9	9.7 +/- 0.05
B	92BR014 ²	9.3 +/- 0.3	9.3 +/- 0.1
C	92BR025 ²	9.4 +/- 0.2	9.2 +/- 0.3
D	94UG114 ²	<3.9	10.2 +/- 0.06
F	93BR020 ²	4.8 +/- 0.6	5.6 +/- 0.2
G	Jv1083 ³	<3.9	9.8 +/- 0.2
No Template	-	<3.9	<3.9

1. Test samples were virus isolates obtained as cell-free culture supernatants from the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID,NIH.
2. Isolates contributed by The UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization, and the DAIDS, NIAID.
3. Abimiku et al, 1994, AIDS Res Hum Retroviruses, 10(11):1581-1583.

Adaptation of the Method for Simultaneous Detection of Both HIV-1 Group M and HIV-1 Group O Variants

Virus isolates from HIV-1 Group O (Outlier) show marked sequence variation from members of HIV-1 Group M (Major). Although Group O viruses are mainly prevalent in parts of Africa, their frequency among samples collected by blood banks outside Africa appears to be increasing (Jaffe and Schochetman, 1998, Infect Dis Clin North Am;12(1):39-46; Couturier et al, 2000, AIDS;14(3):289-296; Fed Regist, 1997, Sept 23;62(184):49695). The present invention permits detection of members of both Group M and Group O using a single set of "nose-to-nose" primers and molecular beacon.

The primers for "nose-to-nose" RT-PCR of the present invention were designed to amplify a 64 b.p. segment of the *pol* gene of the HIV-1 genomic RNA, corresponding to nucleotides 4750 to 4813 of the published sequence of HIV-1 HXB2. There is no intervening gap between the two primers. The primers are as follows

Forward primer: 5'-CAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATTCACAATTT-3' (SEQ ID NO: 15);

Reverse primer: 5' -CTGTATCCCCCAATCCCCCTTTTC'TTTA-3' (SEQ ID NO: 16).

The molecular beacon used for PCR product detection was 5'-FAM-cgcaagGCAGTATTCATTCACCAATTTTcgtcg -DABCYL-3' (SEQ ID NO: 17). The stem nucleic acids are shown in lower case, and the probe loop nucleic acids are shown in upper case.

The new primers and beacon were then tested for their ability to amplify and detect virus isolates from HIV-1 Group M (Subtypes A, B, C, D, F and G) and Group O, which were obtained as cell-free culture supernatants from the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID/NIH. Prior to RNA extraction, all cell supernatants were diluted 1000-fold in phosphate buffered saline (PBS). RNA extraction was performed on the diluted supernatant essentially as described above, except that following isolation, all RNA samples were treated with RNase-free DNase (Ambion, Austin, TX) to ensure removal of contaminating proviral

WO 02/083927

PCT/US02/12035

DNA. Complementary DNA was reverse transcribed from extracted RNA using the nose-to-nose reverse primer (SEQ ID NO: 16) described above. Reaction conditions for both cDNA synthesis and PCR amplification were essentially the same as those described above. Quantitation of HIV-1 template molecules was achieved by inclusion of an RNA standard curve in each RT-PCR experiment.

Table 4 shows the results of RT-PCR using the *pol* region "nose-to-nose" primers of the present invention, and a comparison with the COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Assay Version 1.0 (Roche Diagnostics, Branchburg, NJ). The "nose-to-nose" RT-PCR assay was capable of detecting all Group M and Group O isolates tested, with sensitivity equal to (Group M, Subtypes B and C) or greater than (Group M, Subtypes A, D and F) the COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Assay (1.0). The latter assay failed to detect either of the Group O virus isolates tested, and also failed to detect Group M Subtype G. These data are in agreement with a recent report that neither the COBAS AMPLICOR HIV-1 Monitor Assay (1.0) nor its improved version (1.5) are capable of detecting group O viruses (Yang et al, Transfusion, 2001;41:643-651). In contrast, the present invention permits detection of all virus isolates with a single set of "nose-to-nose" primers and molecular beacon.

Table 4

Test Sample ¹		Log ₁₀ RNA molecules per ml of diluted culture Supernatant detected by:	
HIV -1 Subtype	Virus Strain ² Name	"Nose-to-Nose" ³ Beacon RT-PCR	COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Version 1.0
A	92UG029	5.1 +/- 0.17	3.5 +/- 0.10
B	92BR014	5.4 +/- 0.62	5.2 +/- 0.03
C	92BR025	5.6 +/- 0.04	5.5 +/- 0.04
D	94UG114	5.9 +/- 0.46	5.2 +/- 0.05
F	93BR020	5.7 +/- 0.80	3.7 +/- 0.09
G	Jv1083	7.3 +/- 0.08	Negative
O	L20571	5.4 +/- 0.66	Negative
O	Y14496	6.0 +/- 0.38	Negative
Human DNA (100 ng) ³		<3.0	Not Tested
Human RNA (100 ng) ³		<3.0	Not Tested

1. Prior to RNA extraction, all cell free supernatants were diluted 1000 fold in either PBS (for "nose-to-nose" RT-PCR) or normal human plasma (for COBAS Amplicor HIV-1 Monitor Version 1.0). 2. Virus isolates are as described in Table 3; isolate L20571, Gurtler LG et al, 1994, J Virol, 68:1581; isolate Y14496, Loussert-Ajaka I, et al. J Virol 69:5640, 1995. 3. "Nose-to-nose" PCR or RT-PCR was also performed on 100 ng of human DNA or RNA to verify that the observed signals were due to virus amplification, and not amplification of contaminating human nucleic acids.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

We Claim:

1. In a primer extension chain reaction method for determining the presence of a target nucleic acid molecule in a sample, the method comprising:
 - 5 (a) hybridizing a reverse primer to the target nucleic acid molecule under conditions suitable for carrying out a primer extension chain reaction;
 - (b) extending the reverse primer using the target nucleic acid molecule as a template to form a reverse primer extension product, wherein the reverse primer joined to the reverse primer extension product constitutes a reverse primer amplification product;
 - 10 (c) denaturing the reverse primer amplification product from its template;
 - (d) hybridizing a forward primer to:
 - 15 (i) a nucleic acid molecule which is complementary to the target nucleic acid molecule, if present, or
 - (ii) the reverse primer amplification product;
 - (e) extending the forward primer using the complementary target nucleic acid molecule, if present, or the reverse primer amplification product, as a template, wherein the forward primer joined to the forward primer extension product constitutes a forward primer amplification product;
 - 20 (f) denaturing the forward primer amplification product from its template;
 - (g) hybridizing the reverse primer to the forward primer amplification product;
 - 25 (h) extending the reverse primer using the forward primer amplification product as a template to form an additional reverse primer

WO 02/083927

PCT/US02/12035

extension product, wherein the reverse primer joined to the additional reverse primer extension product constitutes an additional reverse primer amplification product;

5 (i) denaturing the additional reverse primer amplification product from its template;

(j) hybridizing the forward primer to the reverse primer amplification product;

10 (k) extending the forward primer using the reverse primer amplification product as a template to form an additional forward primer extension product, wherein the forward primer joined to the additional forward primer extension product constitutes an additional forward primer amplification product;

(l) denaturing the additional forward primer amplification product from its template;

15 (m) repeating steps (g) through (l), using the additional reverse primer amplification product and the additional forward primer amplification product as templates for the forward primer and the reverse primer, respectively, a sufficient number of times to produce a detectable quantity of additional reverse primer amplification product or of additional forward primer amplification product; and

20 (n) detecting the presence of the additional reverse primer amplification product or the additional forward primer amplification product; the improvement wherein the nucleotide at the 3' end of the reverse primer hybridizes with:

25 (i) the nucleotide at the 5' end of the forward primer extension product or of the additional forward primer extension product; or

(ii) a nucleotide separated from the nucleotide at the 5' end of the forward primer extension product or of the additional

WO 02/083927

PCT/US02/12035

forward primer extension product by a gap of nucleotides,
wherein the gap comprises a sequence known to be highly
conserved; and

wherein the nucleotide at the 3' end of the forward primer hybridizes

5 with:

(i) the nucleotide at the 5' end of the reverse primer
extension product or of the additional reverse primer extension
product; or

10 (ii) a nucleotide separated from the nucleotide at the 5' end
of the reverse primer extension product or of the additional
reverse primer extension product by a gap of nucleotides,
wherein the gap comprises a sequence known to be highly
conserved.

2. The method according to Claim 1 wherein the target nucleic acid
15 molecules are known to have variant sequences.

3. The method according to Claim 1 wherein the primer extension chain
reaction is a polymerase chain reaction (PCR).

4. The method according to Claim 1 wherein the target nucleic acid
molecule is a virus.

20 5. The method according to Claim 4 wherein the virus is human
immunodeficiency virus (HIV).

6. The method according to Claim 4 wherein the virus is hepatitis C virus
(HCV) or hepatitis B virus (HBV).

25 7. The method according to Claim 4 wherein the gap comprises a highly
conserved region of the genome of the virus.

8. The method according to Claim 1 wherein the gap comprises from
about one to about five nucleotides.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

9. The method according to Claim 8 wherein the gap comprises about two nucleotides.
10. The method according to Claim 3 wherein the nucleic acid molecule which is complementary to the target nucleic acid molecule of step (d)(i) is provided separately as the cDNA of the target nucleic acid molecule.
11. The method according to Claim 1 wherein detecting the presence of the additional reverse primer amplification product or the additional forward primer amplification product comprises:
- (A) providing a self-altering signal-generating probe, wherein the probe comprises:
- (i) a first nucleic acid sequence attached to a reporter moiety capable of generating a detectable signal;
- (ii) a second nucleic acid sequence that:
- (a) is complementary to the first nucleic acid sequence, and
- (b) is attached to an interactive moiety capable of altering the signal of the reporter moiety when the first nucleic acid sequence and the second nucleic acid sequence are hybridized to each other; and
- (iii) a probe sequence which connects the first nucleic acid sequence and the second nucleic acid sequence; wherein the probe sequence comprises either:
- (a) the nucleotide sequence of a segment of the forward primer; or
- (b) the nucleotide sequence of a segment of the reverse primer; and
- (B) contacting the amplification products with the probe; wherein when the probe sequence of the probe hybridizes with the additional reverse primer amplification product or with the additional forward primer amplification product, the first and second nucleic acid sequences become denatured, thereby generating a signal by the reporter moiety; and

WO 02/083927

PCT/US02/12035

wherein the signal generated by the reporter moiety indicates the presence of the target molecule.

12. The method according to Claim 11 wherein the probe sequence comprises either:
- 5 (a) the nucleotide sequence of a segment of the forward primer, and not the nucleotide sequence of a segment which is complementary to the reverse primer; or
- (b) the nucleotide sequence of a segment of the reverse primer, and not the nucleotide sequence of a segment which is complementary to the forward primer.
- 10 13. The method according to Claim 11 wherein the probe sequence comprises either:
- (a) the nucleotide sequence of a segment of the forward primer and the nucleotide sequence of a segment which is complementary to the reverse primer; or
- 15 (b) the nucleotide sequence of a segment of the reverse primer and the nucleotide sequence of a segment which is complementary to the forward primer.
14. The method according to Claim 11 wherein the level of the detectable signal generated by the probe is proportional to the quantity of the target nucleic acid molecule in the sample.
- 20 15. The method according to Claim 13 wherein about sixty to about ninety-five percent of the probe sequence comprises either:
- (i) the nucleotide sequence of a segment of the forward primer; or
- 25 (ii) the nucleotide sequence of a segment of the reverse primer.
16. The method according to Claim 11 wherein:

WO 02/083927

PCT/US02/12035

if the probe sequence comprises the nucleotide sequence of a segment of the reverse primer, the molar ratio of the reverse primer to the forward primer is in the range from about 1:5 to about 1:20; or

5 if the probe sequence comprises the nucleotide sequence of a segment of the forward primer, the molar ratio of the forward primer to the reverse primer is in the range from about 1:5 to about 1:20.

17. The method according to Claim 11 wherein the probe sequence comprises from about ten to about thirty nucleotide residues.

10 18. The method according to Claim 17 wherein the probe sequence comprises from about eighteen to about twenty-four nucleotide residues.

19. The method according to Claim 11 wherein the detectable signal is a luminescent signal.

20. The method according to Claim 19 wherein the luminescent signal is a fluorescent signal.

15 21. The method according to Claim 19 wherein the luminescent signal is chemiluminescent signal.

22. The method of Claim 11 wherein the reporter moiety is attached at the 5' terminus or 3' terminus of the self-altering signal-generating probe.

20 23. The method of Claim 11 wherein the interactive moiety is attached at the 5' terminus or 3' terminus of the self-altering signal-generating probe.

24. The method according to Claim 11 wherein the reporter moiety is a fluorophore.

25. The method according to Claim 24 wherein the fluorophore is a xanthene dye, a cyanine dye, a dansyl derivative, EDANS, coumarin, Lucifer yellow, 25 BODIPY, Cy3, Cy5, Cy7, Texas red, erythrosine, naphthylamine, Oregon green, or combinations thereof.

26. The method according to Claim 25 wherein the xanthene dye is a fluorescein or a rhodamine.

WO 02/083927

PCT/US02/12035

27. The method according to Claim 26 wherein the fluorescein is selected from the group consisting of 5-carboxyfluorescein (5-FAM); 6-carboxyfluorescein (6-FAM); 2',4',1,4-tetrachlorofluorescein (TET); 2',4',5',7', 1,4-hexachlorofluorescein (HEX); eosin; calcium green; and NED.
- 5 28. The method according to Claim 26 wherein the rhodamine is selected from the group consisting of tetramethyl-6-carboxyrhodamine (TAMRA); tetrapropano-6-carboxyrhodamine (ROX); 2',7'dimethoxy-4',5'-dichloro-6-carboxyrhodamine (JOE); and tetramethylrhodamine.
29. The method according to Claim 11 wherein the interactive moiety is a
10 quencher.
30. The method according to Claim 29 wherein the quencher is DABCYL, anthroquinone, nitrothiazole, nitroimidazole or malachite green.
31. The method according to Claim 30 wherein the DABCYL is DABSYL, DABMI or methyl red.
- 15 32. The method according to Claim 11 wherein the interactive moiety is a fluorophore.
33. The method of Claim 1 wherein the amplification products are measured and quantitated by end-point analysis.
34. The method of Claim 1 wherein the amplification products are
20 measured and quantitated by real-time analysis.
35. The method of Claim 1 wherein the amplification products are measured using a standard curve derived from a series of threshold cycle measurements.
36. A kit for the detection of a target nucleic acid molecules in a sample,
25 wherein the target nucleic acid molecules are known to have variant sequences, comprising:
- (i) a set of primers useful in the method of Claim 1;

WO 02/083927

PCT/US02/12035

(ii) reagents for performing primer extension chain reaction and;

5

(iii) a self-altering signal-generating probe which detects the presence of primer amplification products, wherein the probe comprises a first nucleic acid sequence attached to a reporter moiety capable of generating a detectable signal; a second nucleic acid sequence attached to an interactive moiety capable of altering the signal of the reporter moiety; and a probe sequence which connects the first and second nucleic acid sequences.

10

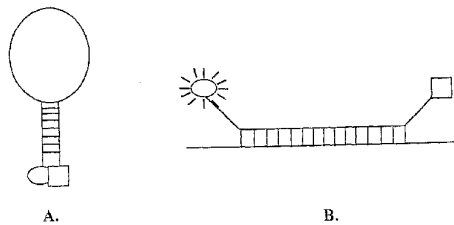


Figure 1: Molecular Beacon

WO 02/083927

2/15

PCT/US02/12035

VIRUS A

Forward PCR primer
5'-AGTACCCCTCAGGAAACAAT-3'
5'-AGTACCCCTCAGGAAACAAT-3'

3'-TTTTCTACCTATTAGGACC-5'
Reverse PCR primer

PCR PRODUCT

5'-AGTACCCCTCAGGAAACAATAGGATGGATGACAAATATCCACCTATCCAGTAGGAGAAATTTATAAATTTATAAAGATGGATATCCTGGG-3'
3'-TCTATGGGAACTCTTTTATTCCTACCTACTACTTATTTAGGATGGATAGGCTATCCTCTTTAAATTTAAATTTTCTACCTATTAGGACC-5'
AATCCACCTAATCCAGTAGG
Loop of molecular beacon

Beacon hybridizes and fluoresces

VIRUS B

Forward PCR primer
5'-AGTACCCCTCAGGAAACAAT-3'
5'-AGTACCCCTCAGGAAACAATAGGATGGATGACAAATATCCACCTATCCAGTAGGAGAAATTTATAAATTTATAAAGATGGATATCCTGGG-3'

3'-TTTTCTACCTATTAGGACC-5'
Reverse PCR primer

PCR PRODUCT

5'-AGTACCCCTCAGGAAACAATAGGATGGATGACAAATATCCACCTATCCAGTAGGAGAAATTTATAAATTTATAAAGATGGATATCCTGGG-3'
3'-TCTATGGGAACTCTTTTATTCCTACCTACTACTTATTTAGGATGGATAGGCTATCCTCTTTAAATTTAAATTTTCTACCTATTAGGACC-5'
AATCCACCTAATCCAGTAGG
X

Beacon does not hybridize:
No fluorescence

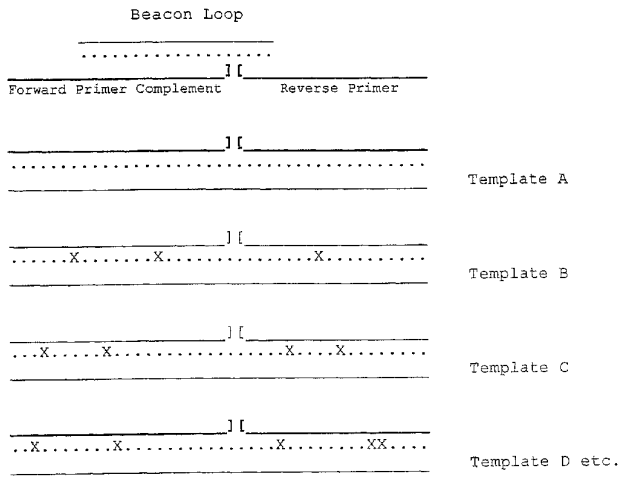
Figure 2: Conventional PCR using molecular beacons.

WO 02/083927

3/15

PCT/US02/12035

a.



b.

Double stranded PCR product from all templates:

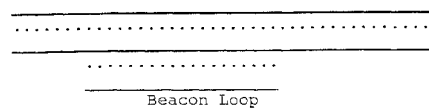


Figure 3: A graphical representation of one of the principles of the invention.

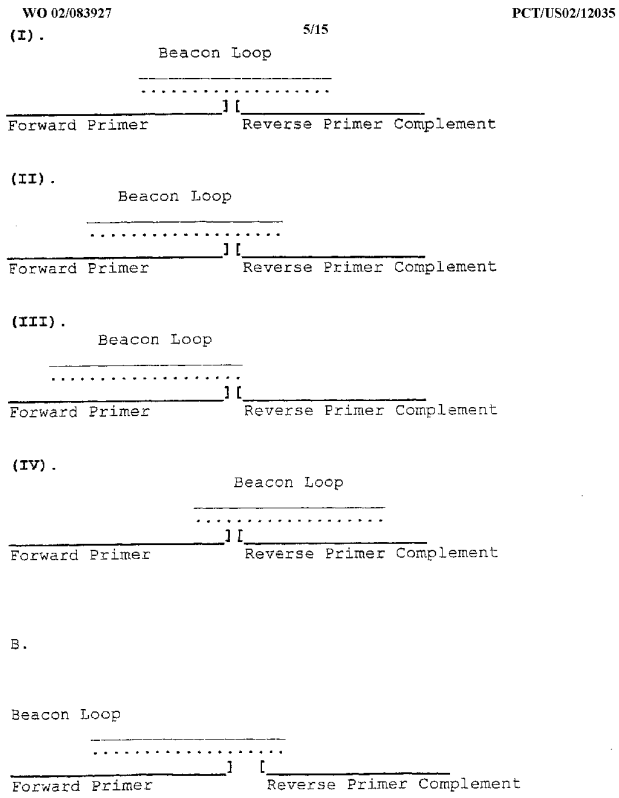


Figure 5: Illustration of variations on primer location.

WO 02/083927

7/15

PCT/US02/12035

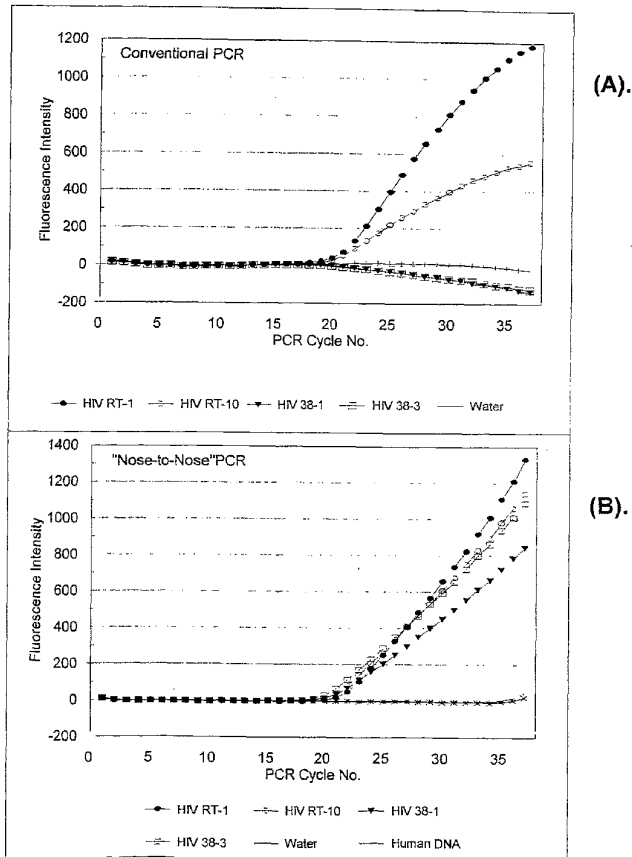


Figure 7: Comparison of conventional and "nose-to-nose" real time quantitative PCR for detection of the 4 HIV variants described in Figure 6.

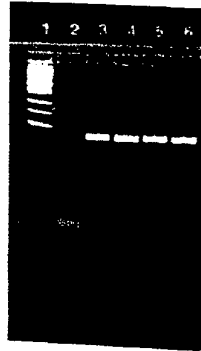


Figure 3: Agarose Gel Analysis of Products Generated by Conventional PCR. Gel shows PCR products generated from HIV/RT-1, HIV/RT-10, HIV/38-1, and HIV/38-3 by the conventional PCR method. Lane 1 50bp ladder, Lane 2 No template, Lane 3 HIV/RT-1, Lane 4 HIV/RT-10, Lane 5 HIV/38-1, Lane 6 HIV/38-3.

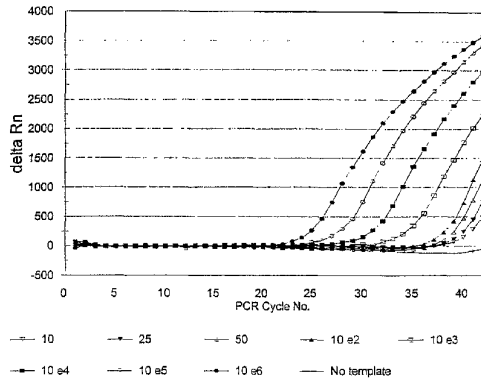
WO 02/083927

9/15

PCT/US02/12035

Figure 9

(a)



(b).

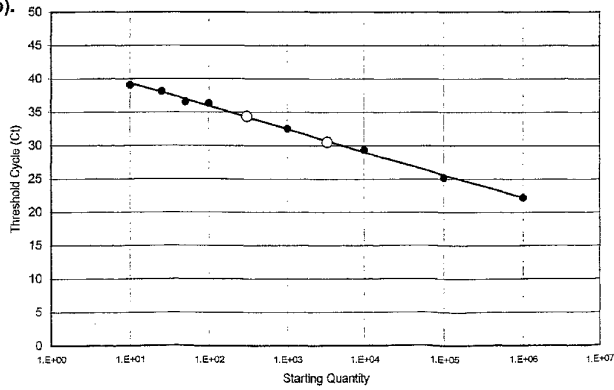
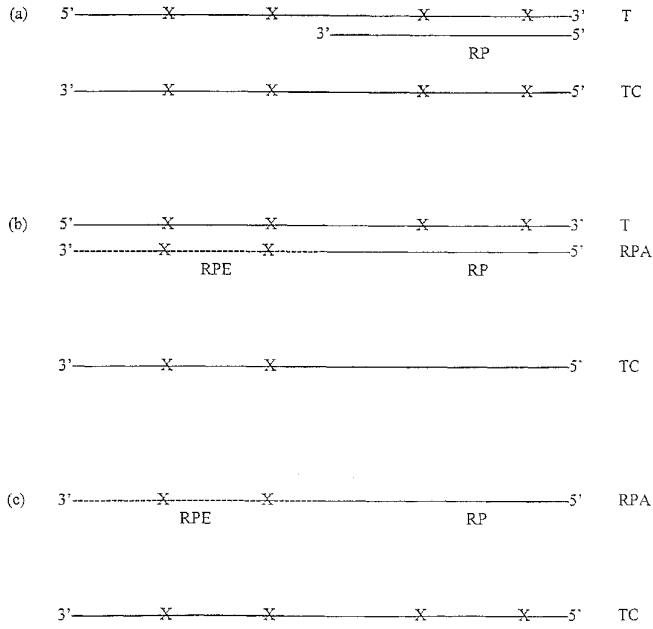


FIGURE 10

PCR
ROUND 1

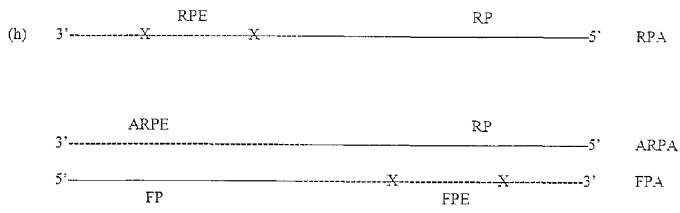
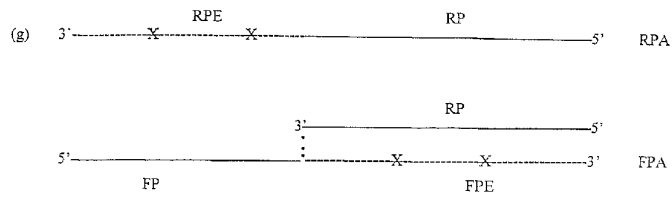


WO 02/083927

12/15

PCT/US02/12035

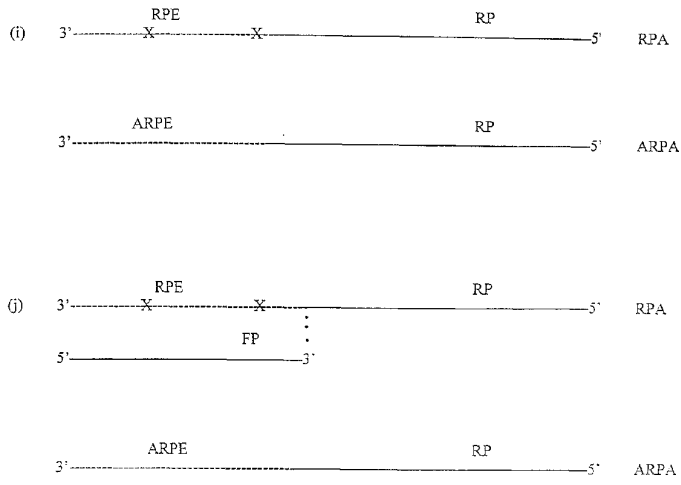
PCR
ROUND 2



WO 02/083927

13/15

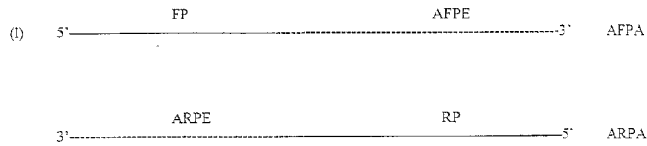
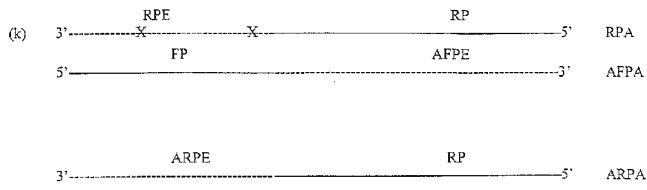
PCT/US02/12035



WO 02/083927

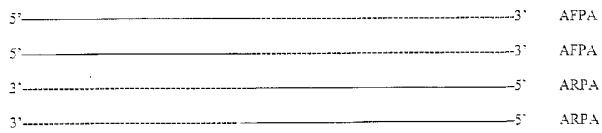
14/15

PCT/US02/12035



PCR
ROUND 3

(m) Repeat steps (g)-(l). RP and FP hybridize to AFPA and ARPA, respectively



Definitions for Figure 10

T = target nucleic acid molecule
TC = target nucleic acid complement
RP = reverse primer
RPE = reverse primer extension product
RPA = reverse primer amplification product
FP = forward primer
FPE = forward primer extension product
FPA = forward primer amplification product
ARPE = additional reverse primer extension product
ARPA = additional reverse primer amplification product
AFPE = additional forward primer extension product
AFPA = additional forward primer amplification product

【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

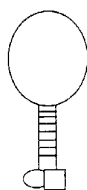
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
24 October 2002 (24.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/083927 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68, C12P 19/34, C07H 21/02
- (21) International Application Number: PCT/US02/12035
- (22) International Filing Date: 17 April 2002 (17.04.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/284,334 17 April 2001 (17.04.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **THE NEW YORK BLOOD CENTER, INC.** [US/US]; 310 East 67th Street, New York, NY 10021 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **ANDRUS, Linda** [GH/US]; Apartment C 1406, 370 East 76th Street, New York, NY 10021 (US); **NICHOLS, Carmen, Nicola** [GB/US]; 324 South 11th Street, Apt. 1, Philadelphia, PA 19107 (US).
- (74) Agent: **BARON, Ronald, J.**; Hoffmann & Baron, LLP, 6900 Jericho Turnpike, Syosset, NY 11791 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, 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: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 20 March 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.

(54) Title: UNIVERSAL MULTI-VARIANT DETECTION SYSTEM



A.



B.

Molecular Beacon

(57) Abstract: The present invention provides a method to diagnostically detect the variants of a given pathogen, such as HIV, hepatitis C, hepatitis B (HBV), Parvovirus B19, etc., with the use of a single detection probe.

WO 02/083927 A3

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/12035
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; C12P 19/34; C07H 21/02 US CL : 435/6, 91.1, 91.2; 536/23.1 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) U.S. : 435/6, 91.1, 91.2; 536/23.1 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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,150,097 A (TYAGI et al) 21 November 2000 (21.11.2000), see entire document.	1-36
Y	US 6,117,635 A (NAZARENKO et al) 12 September 2000 (12.09.2000), see entire document.	1-36
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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 application or patent 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)	*V* 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	*G* 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 12 August 2002 (12.08.2002)	Date of mailing of the international search report 12 DEC 2002	
Name and mailing address of the ISA/US Comptroller of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20531 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Young J. Kim Telephone No. (703) 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/12035

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST Patent Database (USPT, USPGP, EPO, JPO, DERWENT, IBM-TDB)
Search terms: PCR, polymerase chain reaction, amplification, molecular beacons, beacon probes, HIV, HCV, HBV.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,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,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 アンドラス リンダ

アメリカ合衆国 ニューヨーク州 10021 ニューヨーク イースト セヴンティシックス ストリート 370 アpartment シー 1406

(72)発明者 ニコルズ カーマン ニコラ

アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 19107 フィラデルフィア サウス イレヴンス ストリート 324 アpartment 1

Fターム(参考) 2G054 AA06 AB05 CA21 CA22 CE02 EA01 EA03

4B024 AA14 CA09 HA12

4B063 QA18 QA19 QQ10 QQ42 QR08 QR32 QR42 QR55 QR56 QR62

QS25 QS34 QS36 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004532027A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002582264	申请日	2002-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	紐約血液中心有限公司		
申请(专利权)人(译)	纽约血液中心，公司		
[标]发明人	アンドラスリンダ ニコルズカーメンニコラ		
发明人	アンドラス リンダ ニコルズ カーマン ニコラ		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6818 C12Q1/6858 C12Q1/70 G01N21/78 G01N33/569		
CPC分类号	C12Q1/707 C12Q1/6818 C12Q1/6858 C12Q1/701 C12Q1/702 C12Q1/703 C12Q1/706 C12Q2537/101 C12Q2525/301 C12Q2561/113 C12Q2535/125		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N21/78.C G01N33/53.M G01N33/569.L C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB05 2G054/CA21 2G054/CA22 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03 4B024 /AA14 4B024/CA09 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ10 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063 /QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	60/284334 2001-04-17 US		
其他公开文献	JP2004532027A JP4271944B2		

摘要(译)

本发明提供了一种使用单一检测探针诊断检测给定病原体（例如HIV，丙型肝炎，乙型肝炎（HBV），细小病毒B19等）的变体的方法。