

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6615744号  
(P6615744)

(45) 発行日 令和1年12月4日(2019.12.4)

(24) 登録日 令和1年11月15日(2019.11.15)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 Q 1/689 (2018.01)  
C 12 N 15/31 (2006.01)  
G 01 N 33/68 (2006.01)C 12 Q 1/689  
C 12 N 15/31  
G 01 N 33/68Z  
Z N A

請求項の数 21 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2016-500884 (P2016-500884)  
 (86) (22) 出願日 平成26年3月7日 (2014.3.7)  
 (65) 公表番号 特表2016-512030 (P2016-512030A)  
 (43) 公表日 平成28年4月25日 (2016.4.25)  
 (86) 國際出願番号 PCT/US2014/021949  
 (87) 國際公開番号 WO2014/150037  
 (87) 國際公開日 平成26年9月25日 (2014.9.25)  
 審査請求日 平成29年2月21日 (2017.2.21)  
 (31) 優先権主張番号 61/798,757  
 (32) 優先日 平成25年3月15日 (2013.3.15)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73) 特許権者 595117091  
ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニ  
ー  
BECTON, DICKINSON AND COMPANY  
アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O  
7417-1880 フランクリン・レイ  
クス ベクトン・ドライブ 1  
1 BECTON DRIVE, FRA  
NKLIN LAKES, NEW JER  
SEY 07417-1880, UNITED STATES OF AMERICA  
(74) 代理人 100108453  
弁理士 村山 靖彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ナイセリア・ゴノレアの検出

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

ナイセリア・ゴノレアの主要外部タンパク質遺伝子(opcA)に特異的にハイブリダイズすることができる長さが最高で約100スクレオチドのオリゴスクレオチドプライマー対を含む組合せであって、前記プライマー対中の各プライマーが、配列番号1及び2からなる群から選択される配列又は配列番号1及び2からなる群から選択される配列に対して少なくとも95%の同一性を示す配列を含み、前記少なくとも1つのプライマー対が、標準的な核酸増幅条件下でナイセリア・ゴノレアのopcA配列のアンプリコンを生成させるように構成されている、組合せ。

## 【請求項2】

前記プライマー対中の各プライマーが、配列番号1及び2からなる群から選択される配列に対して少なくとも95%の同一性を示す配列からなる、請求項1に記載の組合せ。

## 【請求項3】

前記プライマー対中の各プライマーが、配列番号1及び2からなる群から選択される配列からなる、請求項1に記載の組合せ。

## 【請求項4】

生物試料中のナイセリア・ゴノレアに由来する主要外部タンパク質遺伝子(opcA)配列の存在を決定するための方法であって、

前記生物試料を、ナイセリア・ゴノレアの主要外部タンパク質遺伝子(opcA)に特異的にハイブリダイズすることができる少なくとも1つのプライマー対と接触させる工程であつ

て、前記少なくとも1つのプライマー対中の各プライマーが、配列番号1及び2からなる群から選択される配列又は配列番号1及び2からなる群から選択される配列に対して少なくとも95%の同一性を示す配列を含み、前記少なくとも1つのプライマー対が、標準的な核酸増幅条件下でopcA配列のアンプリコンを生成させるように構成されている、工程と、

前記試料がナイセリア・ゴノレアを含む場合、前記生物試料からopcA配列のアンプリコンを生成させる工程と、

前記生物試料中のナイセリア・ゴノレアのopcA配列の存在の指標として、1つ又は複数の増幅産物の存在又は量を決定する工程と

を含む、

方法。

10

【請求項5】

前記生物試料が、臨床試料である、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記生物試料を、配列番号1及び2を含む配列を有するプライマー対と接触させる、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記プライマー対が、配列番号1及び2からなる配列を有するプライマー対である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、ループ介在等温増幅(LAMP)、鎖置換増幅(SDA)、レプリカーゼ介在増幅、免疫増幅、核酸配列ベース増幅(NASBA)、自家持続配列複製(3SR)、ローリングサークル増幅、及び転写介在増幅(TMA)からなる群から選択される方法を用いて実施される、請求項4に記載の方法。

20

【請求項9】

前記PCRが、定量的リアルタイムPCR(QRT-PCR)である、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記opcAアンプリコンに特異的にハイブリダイズするプローブをさらに含む、請求項1に記載の組合せ。

【請求項11】

前記プローブが、配列番号3の配列又は配列番号3の配列に対して少なくとも95%の同一性を示す配列を含む、請求項10に記載の組合せ。

30

【請求項12】

前記プローブが、配列番号3からなる配列を有する、請求項10に記載の組合せ。

【請求項13】

前記プローブが、蛍光放出部分及び蛍光消光部分を含む、請求項10に記載の組合せ。

【請求項14】

前記プライマー対の各プライマーが、配列番号1及び2からなる群から選択される配列を含む、請求項1に記載の組合せ。

【請求項15】

前記プライマー対が、配列番号1及び2からなる配列を有するプライマー対である、請求項1に記載の組合せ。

40

【請求項16】

前記プライマー対が、配列番号1及び2からなる配列を有するプライマー対であり、前記組合せが、配列番号3からなる配列を有するプローブをさらに含む、請求項1に記載の組合せ。

【請求項17】

前記プライマー対が、配列番号1及び2からなる配列を有するプライマー対であり、前記検出することが、前記増幅産物を配列番号3からなる配列を有するプローブと接触させることを含む、請求項4に記載の方法。

【請求項18】

50

前記プライマー対中の各プライマーが、配列番号1及び2からなる群から選択される配列に対して少なくとも95%の同一性を示す配列からなる、請求項4に記載の方法。

**【請求項19】**

前記検出することが、前記増幅産物をプローブと接触させることを含み、前記プローブが、前記opcAアンブリコンに特異的にハイブリダイズする、請求項4に記載の方法。

**【請求項20】**

前記プローブが、配列番号3の配列、又は配列番号3の配列に対して少なくとも95%の同一性を示す配列を含む、請求項19に記載の方法。

**【請求項21】**

前記プローブが、配列番号3の配列、又は配列番号3の配列に対して少なくとも95%の同一性を示す配列からなる、請求項19に記載の方法。

10

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

**関連出願の相互参照**

本出願は、2013年3月15日出願の米国仮出願第61/798,757号、発明の名称「DETECTION OF NEISSERIA GONORRHOEAE」に基づく優先権を主張するものであり、その内容全体は参照により本明細書に組み込まれる。

**【0002】**

**配列表の参照**

20

電子的フォーマットの配列表と共に本出願を出願する。配列表は、2013年3月15日作成の4Kbの大きさのSEQLISTING.TXTという名称のファイルとして提出する。電子的フォーマットの配列表中の情報は、そのすべてが参照により本明細書に組み込まれる。

**【0003】**

本開示は、ナイセリア・ゴノレア(*Neisseria gonorrhoeae*)を検出するための方法、組成物、プライマー、及びプローブに関する。より詳細には、本開示は、N.ゴノレアの主要外部タンパク質(outer protein)opcA遺伝子領域に結合するプライマー及び/又はプローブを用いる核酸に基づく試験方法による、N.ゴノレアの検出に関する。例えば、これらのプライマー及びプローブを用いて、生物試料中のN.ゴノレア核酸を増幅して、N.ゴノレアの存在を決定するか、又はN.ゴノレア核酸の存在を決定することができる。

30

**【背景技術】**

**【0004】**

ナイセリア・ゴノレアは、淋病、すなわち、主に性的接觸によって伝染する下部生殖器の細菌感染症の原因である、芽胞非形成(non-sporing)性で非運動性のグラム陰性双球菌の種である。N.ゴノレアによる感染の症状は、感染部位、しばしば期間によって異なり、感染症は無症候性である。淋病感染は、結膜炎、咽頭炎、直腸炎、又は尿道炎、前列腺炎、及び精巣炎を引き起こす場合がある。また、女性における上行性感染は、女性不妊症の主要原因の内の1つである急性骨盤内炎症性疾患の発症を招く場合もある。淋病感染は、感染した母親から経産分娩の間にその乳児に移る場合があり、その結果、新生児の眼に淋菌性結膜炎を起こす場合がある。

40

**【0005】**

N.ゴノレアは、1つのタイプの細菌性髄膜炎の原因菌であるN.メニンギティディス(*N. meningitidis*)(髄膜炎菌)と遺伝的に密接に関連しており、時々ヒト病原体となるN.ラクタミカ(*N. lactamica*)との関連性は若干劣る。N.ゴノレアとN.メニンギティディスの両方とも、ヒトのみに感染する。N.シネレア(*N. cinerea*)、N.エロンガータ(*N. elongata*)、N.フラベッセンス(*N. flavescentis*)、N.ムコサ(*N. mucosa*)、N.シッカ(*N. sicca*)、及びN.サブフラバ(*N. subflava*)を含めて、ヒトにおいて常在菌叢とみなされうるナイセリア属の更にいくつかの種がある。

**【0006】**

シトシンDNAメチルトランスフェラーゼ遺伝子を標的とするAmpliCor(登録商標)CT/NG試

50

験(Roche Diagnostic Corporation社、Basel、Switzerland);マルチコピーピリン遺伝子を標的とするProbeTec(商標)Qx増幅アッセイ(Becton, Dickinson and Company社、Franklin Lakes、New Jersey);混濁遺伝子(opacity genes)(opa)を標的とするLCx(登録商標)アッセイ(Abbott Laboratories社、Abbott Park、Illinois);及び16SリボソームRNA遺伝子を標的とするTMAを用いるGenProbe APTIMA(商標)Combo 2バージョン(Gen-Probe, Incorporated社、San Diego、California)を含めて、いくつかの核酸増幅試験(NAAT)が、N.ゴノレア感染症の臨床評価のために開発されている。NAATには、内診も尿道内スワブ検体(男性の場合)も行わずに、(例えば、尿を検査することによって)N.ゴノレアを検出するという利点がある。しかし、ある種のNAATによってN.ゴノレアのために使用されるプライマーは、非淋菌性のナイセリア種と交差反応する場合がある。したがって、高い感度でN.ゴノレアを検出することができ、ナイセリア種等の他の細菌種との交差反応性に起因する偽陽性結果を減少させた試験が必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国特許出願公開第2010-0009351号

【特許文献2】米国特許出願公開第2009-0131650号

【特許文献3】米国特許第5,866,366号

【特許文献4】米国特許第6,090,592号

【特許文献5】米国特許第6,117,635号

【特許文献6】米国特許第6,117,986号

【特許文献7】米国特許第4,683,195号

【特許文献8】米国特許第5,455,166号

【特許文献9】米国特許第6,977,148号

【特許文献10】米国特許第6,410,278号

【特許文献11】米国特許第4,988,617号

【特許文献12】米国特許第5,427,930号

【特許文献13】米国特許第5,849,478号

【特許文献14】米国特許第5,399,491号

【特許文献15】米国特許第5,130,238号

【特許文献16】米国特許第5,854,033号

【特許文献17】欧州特許第0320308号

【特許文献18】米国特許第5,422,252号

【特許文献19】米国特許第4,683,195号

【特許文献20】米国特許第4,683,202号

【特許文献21】米国特許第4,800,159号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】C. R. Newtonら、PCR、第2版、Springer-Verlag (New York: 1997)、24頁

【非特許文献2】Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1989年

【非特許文献3】Zhuら、FEMS Immunol. Med. Microbiol. 193 ~ 200頁(2002)

【非特許文献4】Zhuら、J. Clin. Microbiol. 458 ~ 62頁(1995)

【非特許文献5】Zhuら、FEMS Microbiol. Lett. 173 ~ 77頁(2001)

【非特許文献6】S. Marras、「Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes」

【非特許文献7】Elghanianら(1997) Science 277: 1078 ~ 1081頁

【非特許文献8】Lizardiら、BioTechnology, 6: 1197頁(1988)

【非特許文献9】「PCR Primer: A Laboratory Manual」Dieffenbach及びDveksler編Cold

10

20

30

40

50

Spring Harbor Laboratory Press、1995年

【非特許文献 10】Mullisら 1987年、Methods in Enzymology、155:335 ~ 350頁

【非特許文献 11】Ausubelら(編)、Current Protocols in Molecular Biology、セクション15、John Wiley & Sons, Inc.、New York (1994)

【発明の概要】

【0009】

本開示の1つの態様は、主要外部タンパク質遺伝子(opcA)にハイブリダイズすることができるプローブ及びプライマーに関する。本明細書において開示されるいくつかの実施形態は、ナイセリア・ゴノレアの主要外部タンパク質遺伝子(opcA)にハイブリダイズすることができる、長さが最高で約100ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドプローブ又はプライマーを提供する。いくつかの実施形態において、プローブ又はプライマーは、配列番号1~6からなる群から選択される配列又は配列番号1~6からなる群から選択される配列に対して少なくとも約85%の同一性を示す配列を含む。

10

【0010】

いくつかの実施形態において、プローブ又はプライマーは、配列番号1~6からなる群から選択される配列又は配列番号1~6からなる群から選択される配列に対して少なくとも約85%の同一性を示す配列からなる。いくつかの実施形態において、プローブ又はプライマーは、配列番号1~6からなる群から選択される配列に対して少なくとも約95%の同一性を示す配列からなる。いくつかの実施形態において、プローブ又はプライマーは、配列番号1~6からなる群から選択される配列からなっている(is consisting of)。

20

【0011】

本開示の別の態様は、生物試料中のナイセリア・ゴノレアに由来するopcA配列の存在を検出するための方法に関する。本明細書において開示されるいくつかの実施形態は、生物試料中のナイセリア・ゴノレアに由来する主要外部タンパク質遺伝子(opcA)配列の存在を決定するための方法を提供し、この方法は、生物試料を、ナイセリア・ゴノレアの主要外部タンパク質遺伝子(opcA)にハイブリダイズすることができる少なくとも1つのプライマー対と接触させる工程であって、少なくとも1つのプライマー対の各プライマーは、配列番号1~6からなる群から選択される配列又は配列番号1~6からなる群から選択される配列に対して少なくとも約85%の同一性を示す配列を含み、少なくとも1つのプライマー対は、標準的な核酸增幅条件下でopcA配列のアンプリコンを生成させるように構成されている、工程と、試料がナイセリア・ゴノレアを含む場合、生物試料からopcA配列のアンプリコンを生成させる工程と、生物試料中のopcA配列の存在の指標として、1つ又は複数の増幅産物の存在又は量を決定する工程とを含む。

30

【0012】

いくつかの実施形態において、生物試料は臨床試料である。いくつかの実施形態において、生物試料は、尿道、陰茎、肛門、咽頭、子宮頸部、又は膣から採取される。いくつかの実施形態において、生物試料は膣試料である。

【0013】

いくつかの実施形態において、生物試料は、1つのプライマー対と接触させられる。いくつかの実施形態において、1つのプライマー対は、a)配列番号1及び2、又はb)配列番号4及び5である。

40

【0014】

いくつかの実施形態において、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、ループ介在等温増幅(LAMP)、鎖置換増幅(SDA)、レプリカーゼ介在増幅、免疫増幅、核酸配列ベース増幅(NASBA)、自家持続配列複製(3SR)、ローリングサークル増幅、及び転写介在増幅(TMA)からなる群から選択される方法を用いて実施される。

【0015】

いくつかの実施形態において、PCRは、リアルタイムPCR、エンドポイントPCR、AFLP、A Iu-PCR、非対称PCR、コロニーPCR、DD-PCR、縮重PCR、ホットスタートPCR、In situ PCR、インバースPCR、ロングPCR、多重PCR、ネステッドPCR、PCR-ELISA、PCR-RFLP、PCR-

50

本鎖高次構造多型(PCR-SSCP)、定量的競合PCR(QC-PCR)、cDNA末端の迅速増幅-PCR(RACE-PCR)、ランダム増幅多型DNA-PCR(RAPD-PCR)、繰り返し遺伝子外パリンドローム-PCR(Rep-PCR)、逆転写酵素PCR(RT-PCR)、TAIL-PCR、タッチダウンPCR、及びベクトレットPCRからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、PCRは、定量的リアルタイムPCR(QRT-PCR)である。

【0016】

いくつかの実施形態において、各プライマーは、増幅それ自体に著しい影響を与えるに增幅産物の増幅後操作を可能にする外来性ヌクレオチド配列を含む。

【0017】

いくつかの実施形態において、プライマー対の各プライマーは、5'末端にフルオロフォア及び3'末端に蛍光消光物質を含む相補的配列に隣接している。 10

【0018】

本開示の更に別の態様は、ナイセリア・ゴノレア配列を検出するための組成物に関する。本明細書において開示されるいくつかの実施形態は、ナイセリア・ゴノレアを検出するための組成物を提供し、この組成物は、ナイセリア・ゴノレアの主要外部タンパク質遺伝子(opcA)の配列又はその相補物に特異的にハイブリダイズする第1の増幅プライマー及び第2の増幅プライマーを含み、第1の増幅プライマー及び第2の増幅プライマーは長さが約10～約50ヌクレオチドであり、opcAは配列番号7のヌクレオチド配列を有する。

【0019】

いくつかの実施形態において、組成物は、opcAアンプリコンに特異的にハイブリダイズするプローブを更に含む。 20

【0020】

いくつかの実施形態において、プローブは、配列番号3若しくは6の配列又は配列番号3若しくは6の配列に対して少なくとも約85%の同一性を示す配列を含む。いくつかの実施形態において、プローブは、配列番号3又は配列番号6の配列を有する。

【0021】

いくつかの実施形態において、プローブは、蛍光放出部分及び蛍光消光部分を含む。

【0022】

前述の概要は例示にすぎず、限定することを決して意図しない。図面及び以下の詳細な説明を参照することにより、前述の例示的な態様、実施形態、及び特徴に加えて、更なる態様、実施形態、及び特徴が明らかになる。 30

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1-1】N.ゴノレアFA1090株のopcA遺伝子領域の配列を示す図である。また、本明細書において説明する実施形態において開示される様々なプライマー及びプローブの位置も示されている。

【図1-2】N.ゴノレアFA1090株のopcA遺伝子領域の配列を示す図である。また、本明細書において説明する実施形態において開示される様々なプライマー及びプローブの位置も示されている。

【図2-1】opcA-6 qPCRシステムを用いた、72種のN.ゴノレア臨床分離株の検出結果を示す図である。 40

【図2-2】opcA-6 qPCRシステムを用いた、72種のN.ゴノレア臨床分離株の検出結果を示す図である。

【図2-3】opcA-6 qPCRシステムを用いた、72種のN.ゴノレア臨床分離株の検出結果を示す図である。

【図3-1】図3Aは、ゴノレア以外のナイセリア属に対する、opcA-6 qPCRシステムの特異性試験の結果を示す図である。

【図3-2】図3Bは、ゴノレア以外のナイセリア属に対する、opcA-6 qPCRシステムの特異性試験の結果を示す図である。

【図4-1】腔臨床試料中に一般に存在する生物に対する、opcA-6 qPCRシステムの特異

10

20

30

40

50

性試験の結果を示す図である。

【図4-2】臍臨床試料中に一般に存在する生物に対する、opcA-6 qPCRシステムの特異性試験の結果を示す図である。

【図4-3】臍臨床試料中に一般に存在する生物に対する、opcA-6 qPCRシステムの特異性試験の結果を示す図である。

【図4-4】臍臨床試料中に一般に存在する生物に対する、opcA-6 qPCRシステムの特異性試験の結果を示す図である。

【図5】BD MAX抽出方法及びViper XT抽出方法を用いて尿マトリックス臨床試料及び臍マトリックス臨床試料中のN.ゴノレアを検出する際の、opcA-6 PCRシステムの検出限界を例示するヒストグラムである。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本明細書において使用されるセクションの見出しあは、系統化するためにすぎず、説明される内容を限定するものとして決して解釈されるべきではない。それだけには限らないが、特許、特許出願、記事、書籍、学術論文、及びインターネットのウェブページを含めて、本出願に引用される文献及び同様の資料はすべて、そのような文献及び同様の資料の形式に関わらず、任意の目的のためにその全体が参照により明確に組み込まれる。組み込まれた文献及び同様の資料内の1つ又は複数が、本出願における用語の定義と相反するような方法でその用語を定義又は使用している場合には、本出願が優先される。本発明の教示は、様々な実施形態と共に説明されるが、本発明の教示がそのような実施形態に限定されることは意図されない。そうではなく、本発明の教示は、当業者には理解されるように、様々な代替案、修正、及び均等物を包含する。

【0025】

ある範囲の値が本明細書において提供される場合は常に、その範囲は、別段の記載が特に無い限り、開始値及び終了値、並びにそれらの間の任意の値又は値範囲を含むことが意図される。例えば、「0.2~0.5」とは、0.2、0.3、0.4、0.5;0.2~0.3、0.3~0.4、0.2~0.4等それらの間の範囲;0.25、0.35、0.225、0.335、0.49等それらの間のインクリメント;及び0.26~0.39等それらの間のインクリメント範囲を意味する。

【0026】

N.ゴノレアの主要外部タンパク質遺伝子opcAに結合するプライマー及び/又はプローブを用いてN.ゴノレアを検出するための方法及び組成物が、本明細書において提供される。これらのプライマー及びプローブを用いて、生物試料中のN.ゴノレア核酸を增幅して、生物試料等の試料中のN.ゴノレアの存在又は不在を決定することができる。更に、これらのプライマー及びプローブを用いて、試料中のN.ゴノレア核酸の量を定量することができる。

【0027】

定義

本明細書において使用される場合、「核酸」とは、窒素を含む複素環式の塩基又は塩基類似体を有し、核酸骨格結合(例えば、リン酸ジエステル結合)によって連結されてポリヌクレオチドを形成する、ヌクレオシド又はヌクレオシド類似体を含む、高分子化合物を意味する。核酸の非限定的な例としては、RNA、DNA、及びそれらの類似体が挙げられる。核酸の骨格は、1つのオリゴヌクレオチド中に、様々な結合、例えば、糖-リン酸ジエステル結合、ペプチド-核酸結合、ホスホロチオアート結合若しくはメチルホスホナート結合、又はこのような結合の混合物の内の1つ又は複数を含んでよい。核酸中の糖部分は、リボース若しくはデオキシリボースのいずれか、又は公知の置換を有する類似化合物である。従来の窒素含有塩基(例えばA、G、C、T、U)、公知の塩基類似体(例えば、イノシン)、プリン塩基又はピリミジン塩基の誘導体、及び「塩基脱落(abasic)」残基(すなわち、1つ又は複数の骨格位置に窒素含有塩基がない)が、核酸という用語に含まれる。すなわち、核酸は、RNA及びDNA中に存在する従来の糖、塩基、及び結合のみを含んでもよく、又は従来の成分と置換の両方を含んでもよい(例えば、メトキシ骨格によって結合された従来

10

20

30

40

50

の塩基及び類似体、又はRNA骨格若しくはDNA骨格によって結合された従来の塩基及び1つ若しくは複数の塩基類似体)。

【0028】

本明細書において使用される場合、「核酸を単離する」という用語は、1つ又は複数の細胞成分から核酸を精製することを意味する。それから「核酸を単離する」ために処理される試料が、核酸以外の成分及び不純物を含みうることが、当業者には理解される。単離された核酸を含む試料は、当技術分野において公知である任意の許容される方法を用いて標本から調製することができる。例えば、公知の溶解剤(lysis agent)を用いて細胞を溶解することができ、他の細胞成分から核酸を精製又は部分的に精製することができる。DNA及びRNAの抽出のための適切な試薬及びプロトコルは、例えば、米国特許出願公開第2010-0009351号及び米国特許出願公開第2009-0131650号(それぞれ、その全体が参考により本明細書に組み込まれる)それぞれにおいて見出すことができる。核酸試験(例えば、下記に更に詳細に考察する増幅及びハイブリダイゼーションの方法)において、抽出した核酸溶液は、本明細書において開示される実施形態に従う試験を実施するのに必要とされる(例えば、下記に更に詳細に考察するように、液体中の、基板に結合された、又は凍結乾燥形態等のいずれかの)試薬に直接的に添加することができる。

【0029】

本明細書において使用される場合、「鑄型」とは、少なくとも1つの標的ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの全体又は一部分を意味する。

【0030】

本明細書において使用される場合、「プライマー」とは、核酸鎖伸長反応を開始する働きをすることができるポリヌクレオチドを意味する。プライマーの長さは、例えば、約5～約100ヌクレオチド、約10～約50ヌクレオチド、約15～約40ヌクレオチド、又は約20～約30ヌクレオチドまで様々であってよい。プライマーの長さは、約10ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約25ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約35ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約75ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、又はこれらの値の内の任意の2つの間の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、プライマーの長さは、10～約50ヌクレオチド、すなわち、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50以上のヌクレオチドである。

【0031】

本明細書において使用される場合、「プローブ」とは、ハイブリダイゼーションを可能にする条件下で、核酸中の標的配列に特異的にハイブリダイズし、それによって、標的配列又は増幅された核酸の検出を可能にする、核酸オリゴマーを意味する。一般に、プローブの「標的」とは、標準的な水素結合(すなわち、塩基対合)によってプローブオリゴマーの少なくとも一部分に特異的にハイブリダイズする、増幅された核酸配列の内部の配列又は一部(subset)を意味する。プローブは、標的特異的配列及びプローブの三次元立体構造に寄与する他の配列を含んでよい。プローブの標的特異的配列に完全には相補的ではない標的配列に、プローブオリゴマーが適切なハイブリダイゼーション条件において安定にハイブリダイズするのが可能になる場合、配列は「十分に相補的」である。プローブの長さは、例えば、約5～約100ヌクレオチド、約10～約50ヌクレオチド、約15～約40ヌクレオチド、又は約20～約30ヌクレオチドまで様々であってよい。プローブの長さは、約10ヌクレオチド、約20ヌクレオチド、約25ヌクレオチド、約30ヌクレオチド、約35ヌクレオチド、約40ヌクレオチド、約50ヌクレオチド、約100ヌクレオチド、又はこれらの値の内の任意の2つの間の範囲であってよい。いくつかの実施形態において、プローブの長さは、10～約50ヌクレオチド、すなわち、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50以上のヌクレオチドである。

【0032】

いくつかの実施形態において、プローブは、非配列特異的であってよい。例えば、いく

10

20

30

40

50

つかの実施形態において、

【0033】

好ましくは、本明細書において開示されるオリゴヌクレオチドプライマー及び/又はプローブは、長さが8ヌクレオチドから45ヌクレオチドの間であってよい。例えば、プライマー又はプローブは、長さが少なくとも8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、又は45以上のヌクレオチドであってよい。

【0034】

本明細書において開示されるプライマー配列及びプローブ配列は、5'末端若しくは3'末端、又は両方に付加的ヌクレオチドを含むように改変することができる。增幅プライマー(必ずしもプローブではない)の3'末端への付加的塩基が通常は錆型配列に相補的であることが、当業者には理解される。また、本明細書において開示されるプライマー配列及びプローブ配列は、5'末端又は3'末端のヌクレオチドを除去するように改変することもできる。増幅のために機能するために、プライマー又はプローブは、本明細書において開示される最低限の長さ及びアニーリング温度を有することが、当業者には理解される。

【0035】

オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブは、融解温度( $T_m$ )より低い温度であるアニーリング温度で、標的に結合することができる。本明細書において使用される場合、「 $T_m$ 」及び「融解温度」とは、二重鎖ポリヌクレオチド分子の集団の50%が解離して一本鎖になる温度を意味する同義的用語である。ポリヌクレオチドの $T_m$ を計算するための式は、当技術分野において周知である。例えば、 $T_m$ は、次の式: $T_m=69.3+0.41 \times (G+C)\%-6-50/L$ (式中、Lはプローブのヌクレオチド長である)によって計算することができる。また、ハイブリッドポリヌクレオチドの $T_m$ は、1M塩におけるハイブリダイゼーションアッセイから採用され、PCRプライマーのために $T_m$ を計算するのに一般に使用される式: $[(A+T)の数] \times 2 + (G+C)の数] \times 4$ を用いて推定することもできる。例えば、C. R. Newtonら PCR、第2版、Springer-Verlag (New York: 1997)、24頁を参照されたい。 $T_m$ の計算のために配列特徴だけでなく構造的特徴も考慮に入れる、より高度な他の計算法が、当技術分野に存在する。オリゴヌクレオチドの融解温度は、オリゴヌクレオチドプライマー又はプローブと結合配列との相補性、及び塩条件に依存しうる。いくつかの実施形態において、本明細書において提供されるオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブは、50mM KCl、10mM Tris-HCl緩衝液において約90より低い $T_m$ を有し、例えば、約89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、79、78、77、76、75、74、73、72、71、70、69、68、67、66、65、64、63、62、61、60、59、58、57、56、55、54、53、52、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、又は39以下であり、列挙した値の内の任意の2つの間の範囲が含まれる。

【0036】

いくつかの実施形態において、本明細書において開示されるプライマー、例えば、増幅プライマーは、例えば、フォワードプライマー及びリバースプライマー(第1の増幅プライマー及び第2の増幅プライマー)を含む増幅プライマー対として提供することができる。好ましくは、フォワードプライマー及びリバースプライマーは、差が10以下、例えば、差が10未満、9未満、8未満、7未満、6未満、5未満、4未満、3未満、2未満、又は1未満である $T_m$ を有する。

【0037】

プライマー配列及びプローブ配列は、標的核酸配列に特異的にハイブリダイズするのに十分な相補性をオリゴヌクレオチドが含むことを条件として、オリゴヌクレオチド配列内に(標的配列に対する)ヌクレオチド置換を持たせることによって、改変してよい。この方法では、少なくとも1、2、3、4、又は最高で約5個のヌクレオチドを置換することができる。本明細書において使用される場合、「相補的」という用語は、2つのポリヌクレオチド鎖の領域間の、又は同じポリヌクレオチド鎖の2つの領域間の、配列相補性を意味する。あるポリヌクレオチドの第1の領域と同じ又は異なるポリヌクレオチドの第2の領域を逆平行に並べた場合に、第1の領域の少なくとも1つのヌクレオチドが第2の領域の塩基と塩

10

20

30

40

50

基対合できるならば、これら2つの領域は相補的である。したがって、2つの相補的なポリヌクレオチドがすべてのヌクレオチド位置で塩基対合することが必要とされるわけではない。「完全に相補的」とは、第2のポリヌクレオチドに100%又は「完全に」相補的であり、したがって、すべてのヌクレオチド位置で塩基対を形成する、第1のポリヌクレオチドを意味する。また、「部分的に相補的」とは、100%相補的ではなく(例えば、90%、又は80%、又は70%相補的)、1つ又は複数のヌクレオチド位置に一致しないヌクレオチドを含む、第1のポリヌクレオチドを意味する。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、ユニバーサル塩基を含む。

#### 【0038】

本明細書において使用される場合、「外来性ヌクレオチド配列」とは、増幅産物が、標的ヌクレオチド配列がそれからコピーされた元の鑄型には存在しない配置で外来性ヌクレオチド配列及び標的ヌクレオチド配列を含むように、増幅のために使用されるプライマー又はプローブによって導入される配列を意味する。

#### 【0039】

本明細書において使用される場合、核酸分子に適用される「配列同一性」又は「同一パーセント」とは、最大の同一性パーセントを実現するようにそれらの配列を整列させた後の、対象の核酸分子配列と同一である、候補核酸分子配列中の核酸残基の百分率であり、いかなる核酸残基置換も配列同一性の一部とみなさない。核酸配列同一性は、当技術分野において公知である任意の方法、例えばCLUSTALW、T-COFFEE、BLASTNを用いて決定することができる。

#### 【0040】

本明細書において使用される場合、「十分に相補的な」という用語は、ひと続きの相補的塩基間の水素結合によって別の塩基配列にハイブリダイズすることができる連続した核酸塩基配列を意味する。相補的塩基配列は、標準的な塩基対合(例えばG:C、A:T、若しくはA:U)の使用により、オリゴマー配列中の各位置において相補的であってもよく、又は(塩基脱落位置を含めて)相補的ではない1つ若しくは複数の残基を含んでもよい(ただし、相補的塩基配列全体は、適切なハイブリダイゼーション条件において別の塩基配列と特異的にハイブリダイズすることができる)。連続塩基は、オリゴマーがハイブリダイズすると意図される配列に対して、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、又は100%相補的であってよい。実質的に相補的な配列とは、参照配列と比べて同一性パーセントが100から、99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、89、88、87、86、85、84、83、82、81、80、75、若しくは70以下、又は間の任意の数の範囲に渡る配列を意味することができる。当業者は、塩基配列組成に基づいて予測できるか、又はごく普通の試験を用いることによって決定することができる(例えば、Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.、1989年を参照されたい)適切なハイブリダイゼーション条件を容易に選択することができる。

#### 【0041】

##### オリゴヌクレオチド

opcAは、N.ゴノレア中に存在する主要外部タンパク質遺伝子である。N.ゴノレアのopcA遺伝子のヌクレオチド配列は、2種の参考株FA1090及びMS11から最初に決定された(Zhuら、FEMS Immunol. Med. Microbiol. 193~200頁(2002))。これら2種の淋菌株のopcAにおいて、3つの多型部位、すなわち2つの同義変異及び1つの非同義変異が異なっており、MS11 opcA中に1つのコドン欠失が存在した。淋菌opcAプライマー対を用いるPCRによって、26種のN.ゴノレア株が検査され、これら26種の淋菌株すべてにopcAが存在することが発見された(Zhuら、J. Clin. Microbiol.、458~62頁(1995); Zhuら、2002)。また、51種のN.ゴノレア株も、PCR及びDNAハイブリダイゼーションによってopcAについて検査され、すべての株が、ゲノム中のopcAの存在を示した。Zhuら、FEMS Microbiol. Lett. 173~77頁(2001)。opcA遺伝子に由来するPCR産物を、4種の高頻度切断(frequent-cutting)制限エンドヌクレアーゼを用いて消化した(PCR-RFLP)。参考株FA1090のものと同じPCR-RFLPパターンが、

10

20

30

40

50

試験したすべての淋菌株において観察され、N. ゴノレア中のopcA遺伝子の保存配列が示された。

【 0 0 4 2 】

本明細書において開示されるいくつかの実施形態は、N. ゴノレアのopcA遺伝子領域又はその相補物に(例えば、標準的な核酸増幅条件、例えば、標準的なPCR条件、及び/又はストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で)特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド(例えば、増幅プライマー及びプローブ)を提供する。本明細書において開示される実施形態に關係するopcA遺伝子領域の例示的な配列は、ジェンバンクアクセッション番号AJ242839において提供される。opcA遺伝子領域の例示的な配列は、配列番号7において提供される。いくつかの実施形態において、N. ゴノレアのopcA遺伝子領域(例えば、配列番号7)に特異的に結合するプライマー及びプローブは、生物試料中のN. ゴノレア核酸の存在又は量を検出する際に使用される。いくつかの実施形態において、核酸増幅のための標準的条件下で配列番号7にハイブリダイズするプライマーが提供される。N. ゴノレアのopcA遺伝子領域に特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドの例としては、それだけには限らないが、Table 1(表1)において提供される配列番号1~6が挙げられる。Table 1(表1)において、「オリゴ位置」とは、配列番号7における各オリゴヌクレオチドの位置を意味する。

【 0 0 4 3 】

【表 1】

10

20

Table 1

システムの名称	オリゴ名称	オリゴの大きさ	オリゴ位置	アンブリコンの大きさ(bp)	配列(5'-3')	オリゴのTm
opcA-6	GC.opcA.FP6	19	572-590	74	TACGTGTGCGGATGTGGAA (配列番号 1)	58
	GC.opcA.RP6	27	616-642		TTAGCCTTCTATGTCCCTAACATCTC(配列番号 2)	58
	GC.opcA.D6	21	592-612		CTCGGTGGCAAACGGAGC AA(配列番号 3)	68
opcA-5	GC.opcA.FP5	20	221-240	102	CCTTTCCCTGTCCCTTCTG (配列番号 4)	55
	GC.opcA.RP5	21	302-322		GTTGTGATAAAGGCTTCGCTG(配列番号 5)	54
	GC.opcA.D5	24	266-289		CCCTCGGAGAGTCCCTCGAACAAA(配列番号 6)	62

30

【 0 0 4 4 】

また、配列番号1~6又はその相補物と少なくとも80%同一(例えば、少なくとも81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一)であるオリゴヌクレオチドを含めて、配列番号1~6又はその相補物に対して1、2、3、又は4個以上の不一致又はユニバーサルヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドも、本明細書において提供される。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号1~6から選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号1~6から選択される配列に対して少なくとも約85%同一性である配列を含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号1~6から選択される配列からなる。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、配列番号1~6から選択される配列に対して少なくとも約85%の同一性又は少なくとも約95%同一性である配列からなる。

【 0 0 4 5 】

40

50

また、N.ゴノレアのopcA遺伝子領域の配列に特異的にハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチド(例えば、増幅プライマー及び/又はプローブ)を含む組成物も、本明細書において開示される。例えば、この組成物は、N.ゴノレアのopcA遺伝子領域の配列に特異的にハイブリダイズすることができる1つ若しくは複数の増幅プライマー及び/又は1つ若しくは複数のプローブを含みうる。いくつかの実施形態において、この組成物は、N.ゴノレアのopcA遺伝子領域の配列に特異的にハイブリダイズすることができる第1の増幅プライマー及び第2の増幅プライマーを含む。いくつかの実施形態において、プライマーは、配列番号1、2、4、又は5の配列を含む。いくつかの実施形態において、プライマーは、配列番号1、2、4、又は5の配列に対して少なくとも約85%同一性又は少なくとも約95%同一性である配列を含む。いくつかの実施形態において、プライマーは、配列番号1、2、4、又は5の配列からなる。いくつかの実施形態において、プライマーは、配列番号1、2、4、又は5の配列に対して少なくとも約85%同一性又は少なくとも約95%同一性である配列からなる。

【0046】

いくつかの実施形態において、組成物は、opcAアンプリコンに特異的にハイブリダイズすることができるプローブを更に含む。いくつかの実施形態において、プローブは、配列番号3又は6の配列を含む。いくつかの実施形態において、プローブは、配列番号3又は6の配列に対して少なくとも約85%同一性又は少なくとも約95%同一性である配列を含む。いくつかの実施形態において、プローブは、配列番号3又は6の配列からなる。いくつかの実施形態において、プローブは、配列番号3又は6の配列に対して少なくとも約85%同一性又は少なくとも約95%同一性である配列からなる。

【0047】

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドプローブは、検出可能部分を含んでよい。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書において開示されるオリゴヌクレオチドプローブは、放射性標識を含んでよい。放射性標識の非限定的な例としては、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、及び<sup>35</sup>Sが挙げられる。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドプローブは、それだけには限らないが、リガンド、フルオロフォア、化学発光物質、酵素、及び抗体を含めて、1つ又は複数の非放射性の検出可能なマーカー又は部分を含んでよい。本発明の方法の感度上昇を可能にすることができる、プローブと共に使用するための他の検出可能マーカーとしては、ビオチン及び放射性ヌクレオチド(radio-nucleotide)が挙げられる。個々の標識の選択によって、それがプローブに結合される様式が必然的に決まることが、当業者には明らかである。例えば、オリゴヌクレオチドプローブは、鑄型核酸にハイブリダイズすると検出可能な蛍光変化が生じるように、1つ又は複数の色素で標識される。いくつかの用途には非特異的色素が望ましい場合があるが、配列特異的プローブの方が、増幅のより正確な測定を実現することができる。配列特異的プローブの1つの立体配置は、フルオロフォアにつながれたプローブの一端及び消光物質につながれたプローブの他方の端を含むことができる。プローブがハイブリダイズしていない場合、プローブはステムループ立体配置を保持することができ、この配置ではフルオロフォアが消光物質によって消光され、したがって、フルオロフォアが蛍光を発するのを妨げる。プローブが鑄型核酸配列にハイブリダイズすると、プローブは直鎖状になって、フルオロフォアを消光物質から遠ざけ、したがって、フルオロフォアが蛍光を発することが可能になる。配列特異的プローブの別の立体配置は、FRET対の第1のフルオロフォアにつながれた第1のプローブ及びFRET対の第2のフルオロフォアにつながれた第2のプローブを含むことができる。第1のプローブ及び第2のプローブが同じアンプリコンにハイブリダイズする場合、FRETによるエネルギー移動を可能にするのに十分な近接範囲内にあるアンプリコンの配列にハイブリダイズするように、第1のプローブ及び第2のプローブを構成することができる。

【0048】

いくつかの実施形態において、配列特異的プローブは、フルオロフォアに結合された本明細書において開示されるオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、プローブは、2つ以上のフルオロフォアに結合される。フルオロフォアの例としては、次の

10

20

30

40

50

ものが挙げられる:キサンテン色素、例えば、フルオレセイン色素及びローダミン色素(フルオレセインイソチオシアナート(FITC)、2-[(エチルアミノ)-3-(エチルイミノ)-2-7-ジメチル-3H-キサンテン-9-イル]安息香酸エチルエステル-塩酸塩(R6G)(約500から560nmまでの範囲の波長において応答放射線(response radiation)を発する)、1,1,3,3,3',3'-ヘキサメチルインドジカルボシアニンヨージド(HIDC)(約600から660nmまでの範囲の波長において応答放射線を発する)、6-カルボキシフルオレセイン(略語FAM及びFによって一般に公知)、6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオレセイン(HEX)、6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン(JOE又はJ)、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン(TAMRA又はT)、6-カルボキシ-X-ローダミン(ROX又はR)、5-カルボキシローダミン-6G(R6G5又はG5)、6-カルボキシローダミン-6G(R6G6又はG6)、及びローダミン110等);シアニン色素、例えば、Cy3、Cy5、及びCy7色素;クマリン、例えばウンベリフェロン;ベンズイミド色素、例えば、Hoechst 33258;フェナントリジン色素、例えばテキサスレッド;エチジウム色素;アクリジン色素;カルバゾール色素;フェノキサジン色素;ポルフィリノ色素;ポリメチン色素、例えば、Cy3(約540から580nmまでの範囲の波長において応答放射線を発する)、Cy5(約640から680nmまでの範囲の波長において応答放射線を発する)等のシアニン色素等;BODIPY色素、並びにキノリン色素。関心対象の具体的なフルオロフォアとしては、ピレン、クマリン、ジエチルアミノクマリン、FAM、フルオレセインクロロトリアジニル、フルオレセイン、R110、エオシン、JOE、R6G、HIDC、テトラメチルローダミン、TAMRA、リサミン、ROX、ナフトフルオレセイン、テキサスレッド、ナフトフルオレセイン、Cy3、及びCy5、並びにCAL fluorオレンジ等が挙げられる。

## 【0049】

いくつかの実施形態において、プローブは、消光物質に結合される。消光物質は、電磁放射線を吸収し、それを熱として放散し、それによって暗いままであることができる。消光物質の例としては、Dabcyl、BHQ-1又はBHQ-2(Bioscience社)等のNFQ、IOWA BLACK FQ(IDT社)、及びIOWA BLACK RQ(IDT社)が挙げられる。いくつかの実施形態において、消光物質は、フルオロフォアと対になって、フルオロフォアによって放出される電磁放射線を吸収するように、選択される。本明細書において開示される組成物及び方法において有用なフルオロフォア/消光物質の対は、当技術分野において周知であり、例えば、ワールドワイドウェブサイトmolecular-beacons.org/download/marras, mmb06%28335%293.pdfにおいて入手可能なS. Marras、「Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes」で説明されているのを見出すことができる。

## 【0050】

いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、プローブの第1の端に結合され、消光物質は、プローブの第2の端に結合される。結合は、共有結合を含んでよく、場合によっては、プローブとフルオロフォア又は消光物質との間に配置された、少なくとも1つのリンカー分子を含んでもよい。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、プローブの5'末端に結合され、消光物質は、プローブの3'末端に結合される。いくつかの実施形態において、フルオロフォアは、プローブの3'末端に結合され、消光物質は、プローブの5'末端に結合される。定量的核酸增幅において使用されるプローブの例としては、分子ビーコン、SCORPION(商標)プローブ(Sigma社)、及びTaqman(商標)プローブ(Life Technologies社)等が挙げられる。本明細書において開示される実施形態において有用である他の核酸検出技術としては、それだけには限らないが、ナノ粒子プローブ技術(Elghanianら、(1997) Science 277: 1078 ~ 1081頁を参照されたい)及びAmplifluorプローブ技術(例えば、米国特許第5,866,366号、第6,090,592号、第6,117,635号、及び第6,117,986号を参照されたい)が挙げられる。

## 【0051】

本明細書において提供される核酸は、様々な形態であってよい。例えば、いくつかの実施形態において、核酸は、溶液、例えば緩衝液中に(単独で、又は様々な他の核酸と組み合わせて)溶解される。いくつかの実施形態において、核酸は、単独で、又は他の単離された核酸と組み合わせて、塩として提供される。いくつかの実施形態において、核酸は、

再構成することができる凍結乾燥形態で提供される。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書において開示される単離された核酸は、単独で凍結乾燥されたペレット中で、又は他の単離された核酸と共に凍結乾燥されたペレット中で、提供されてよい。いくつかの実施形態において、ビーズ又は膜等の固体物質に取り付けられた核酸が、提供される。いくつかの実施形態において、核酸は、宿主細胞、例えば、プラスミドを有する細胞株又は安定に組み込まれた配列を有する細胞株において、提供される。

#### 【0052】

##### 方法

試料中のN.ゴノレアを検出及び/又は定量するための方法が、本明細書において提供される。いくつかの実施形態において、この方法は、分析しようとする試料を、標準的な核酸增幅条件及び/又はストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下でN.ゴノレアのopcA遺伝子領域の配列に特異的にハイブリダイズする1つ又は複数のオリゴヌクレオチドと接触させる工程を含む。いくつかの実施形態において、この方法は、試料がN.ゴノレアを含む場合に、試料からopcA配列のアンプリコンを生成させる工程を含む。また、この方法は、試料中のopcA配列及び/又はN.ゴノレアの存在の指標として、1つ又は複数の增幅産物の存在又は量を決定する工程も含んでよい。

10

#### 【0053】

##### 核酸試験

本明細書において説明される方法は、例えば、核酸試験を含んでよい。例えば、この試験は、試料中の標的核酸配列について試験することを含んでよい。それだけには限らないが、核酸增幅を伴う試験を含めて、様々な形式の核酸試験が、本明細書において開示される実施形態において使用されうる。

20

#### 【0054】

本明細書において使用される場合、核酸增幅とは、配列特異的方法を用いて、標的核酸配列又はその相補物若しくはその断片の複数のコピーを得るための任意の公知の手順を指す。公知の増幅方法の例としては、それだけには限らないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、ループ介在等温增幅(LAMP)、鎖置換増幅(SDA)(例えば、多置換増幅(MDA))、レプリカーゼ介在増幅、免疫増幅、核酸配列ベース増幅(NASBA)、自家持続配列複製(3SR)、ローリングサークル増幅、及び転写介在増幅(TMA)が挙げられる。例えば、Mullis、「Process for Amplifying, Detecting, and/or Cloning Nucleic Acid Sequences」、米国特許第4,683,195号；Walker、「Strand Displacement Amplification」、米国特許第5,455,166号；Deanら、「Multiple displacement amplification」、米国特許第6,977,148号；Notomiら、「Process for Synthesizing Nucleic Acid」、米国特許第6,410,278号；Landegrenら、米国特許第4,988,617号、「Method of detecting a nucleotide change in nucleic acids」；Birkenmeyer、「Amplification of Target Nucleic Acids Using Gap Filling Ligase Chain Reaction」、米国特許第5,427,930号；Cashman、「Blocked-Polymerase Polynucleotide Immunoassay Method and Kit」、米国特許第5,849,478号；Kacianら、「Nucleic Acid Sequence Amplification Methods」、米国特許第5,399,491号；Malekら、「Enhanced Nucleic Acid Amplification Process」、米国特許第5,130,238号；Lizardiら、BioTechnology, 6:

30

1197頁(1988)；Lizardiら、米国特許第5,854,033号、「Rolling circle replication reporter systems」を参照されたい。いくつかの実施形態において、前述の核酸増幅方法の2つ以上を、例えば逐次的に実施することができる。

40

#### 【0055】

例えば、LCR増幅では、少なくとも4つの別々のオリゴヌクレオチドを用いて、ハイブリダイゼーション、ライゲーション、及び変性の複数サイクルを使用することにより、標的及びその相補鎖を増幅する(欧州特許第0320308号)。SDAでは、標的配列を含む半修飾された(hemimodified)DNA二重鎖の一方の鎖に切れ目を入れる制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含むプライマーを用い、繰り返して、一連のプライマー伸長工程及び鎖置換工程で増幅することによって、増幅する(Walkerらに対する米国特許第5,422,252号)。

50

## 【0056】

PCRは、核酸を増幅するための当技術分野において周知の方法である。PCRは、標的配列に隣接する2つ以上の伸長可能な配列特異的オリゴヌクレオチドプライマーを用いる標的配列の増幅を伴う。関心対象の標的配列を含む核酸が、プライマー、熱安定性DNAポリメラーゼ(例えば、Taqポリメラーゼ)、及び様々なdNTPの存在下で複数回の熱サイクル(変性、アニーリング、及び伸長)のプログラムに供され、その結果、標的配列が増幅される。PCRでは、DNA分子の所定の領域の相補鎖が熱安定性DNAポリメラーゼによって同時に合成されるプライマー伸長反応を複数回使用する。各サイクルの最後に、新しく合成された各DNA分子は、次のサイクルのための錆型の役割を果たす。これらの反応を複数回繰り返す間に、新しく合成されたDNA鎖の数は指数関数的に増加し、その結果、20~30回の反応サイクルの後には、最初の錆型DNAが数千倍又は数百万倍に複製されていると考えられる。様々なタイプ及び様式のPCRを実施するための方法は、文献、例えば、「PCR Primer: A Laboratory Manual」Dieffenbach及びDveksler編Cold Spring Harbor Laboratory Press、1995年において、またMullisらによって特許において(例えば、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号、及び第4,800,159号)、及び科学論文(例えば、Mullisら 1987年、Methods in Enzymology、155:335~350頁)において十分に説明されており、各参照文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。10

## 【0057】

PCRは、増幅後の処理に適した二重鎖増幅産物を生成することができる。所望の場合は、アガロースゲル電気泳動を用いた可視化、プローブに基づく比色定量検出を用いる酵素イムノアッセイ形式、蛍光発光技術、又は当業者に公知の他の検出手段によって、増幅産物を検出することができる。20

## 【0058】

多種多様なPCR方法が、多くの情報源、例えば、Ausubelら(編)、*Current Protocols in Molecular Biology*、セクション15、John Wiley & Sons, Inc., New York (1994)において説明されている。PCR方法の例としては、それだけには限らないが、リアルタイムPCR、エンドポイントPCR、増幅断片長多型PCR(AFLP-PCR)、Alu-PCR、非対称PCR、コロニーPCR、DD-PCR、縮重PCR、ホットスタートPCR、*In situ* PCR、インバースPCR、ロングPCR、多重PCR、ネステッドPCR、PCR-ELISA、PCR-RFLP、PCR一本鎖高次構造多型(PCR-SSCP)、定量的競合PCR(QC-PCR)、cDNA末端の迅速増幅-PCR(RACE-PCR)、ランダム増幅多型DNA-PCR(RAPD-PCR)、リアルタイムPCR、繰り返し遺伝子外パリンドローム-PCR(Rep-PCR)、逆転写酵素PCR(RT-PCR)、TAIL-PCR、タッチダウンPCR、及びベクトレットPCRが挙げられる。30

## 【0059】

定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(QRT-PCR)とも呼ばれるリアルタイムPCRは、所与の核酸分子の特定の部分を同時に定量及び増幅するのに使用することができる。これを用いて、特定の配列が試料中に存在するかどうかを判定し、存在する場合には、存在するその配列のコピー数を測定することができる。「リアルタイム」という用語は、PCR中の定期的な観察を意味する。ABI 7700配列検出システム及びABI 7900HT配列検出システム(Applied Biosystems社、Foster City, Calif.)等のいくつかのシステムでは、各熱サイクルの間の予め決定された時点又は使用者が定めた時点に観察を行う。蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)プローブを用いたPCRのリアルタイム解析では、好ましくは任意の内部対照シグナルを差し引いた、サイクル間の蛍光色素のシグナル変化が測定される。リアルタイム手順は、PCRの一般的なパターンに従うが、核酸は、各増幅段階(round)の後に定量される。定量方法の2つの例は、二重鎖DNA中に入り込む蛍光色素(例えば、SYBR Green)及び相補的DNAとハイブリダイズした場合に蛍光を発する修飾されたDNAオリゴヌクレオチドプローブの使用である。挿入剤は、未結合の場合、比較的弱い蛍光を有し、二重鎖核酸に結合すると、比較的強い蛍光を有する。したがって、挿入剤を用いて、核酸増幅反応の進行中の二重鎖核酸の蓄積をモニターすることができる。本明細書において開示される実施形態において有用であるこのような非特異的色素の例としては、SYBR Green I(Molecular Probes社)、ヨウ化プロピジウム、及び臭化工チジウム等の挿入剤が挙げられる。4050

**【 0 0 6 0 】**

特異的な標的配列、プライマー、及びプローブのおかげで、本明細書において開示される方法を用いて、試料中のN.ゴノレアの存在/不在又は量を高い感度及び精度で検出することができる。例えば、それらの方法は、ゴノレアではないナイセリア属の近縁種を除外するほどに、N.ゴノレアを正確に検出することができる。これらの方は、ピリン遺伝子に基づく検出システム(例えば、ProbeTec(商標)Qx増幅アッセイ)と比べて、特異性が向上している、すなわち、ゴノレアではないナイセリア属の近縁種(例えば、N.ラクタミカ、N.シネレア、及びN.シッカ)に対する交差反応性が低下しているか、又はない。

**【 0 0 6 1 】**

本明細書において開示されるプライマーを、同一の化学的性質及び熱PCRプロファイルを用いる補足的PCRシステムと組み合わせることにより、腔中生物を検出するためのアッセイパネルを提供して、アッセイの全体的な感度及び頑健性を向上させることができる。

10

**【 0 0 6 2 】**

いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、本明細書において説明するように検出可能部分を含み、opcA遺伝子領域へのそのオリゴヌクレオチドの特異的ハイブリダイゼーションを、例えば直接的手段又は間接的手段によって検出することができる。したがって、試料中のN.ゴノレアを検出及び/又は同定するためのいくつかの実施形態は、試験試料を提供する工程と、その試料を、標準的な核酸増幅条件及び/又はストリンジメントなハイブリダイゼーション条件下でN.ゴノレアのopcA遺伝子領域に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブと接触させる工程とを含み、このオリゴヌクレオチドプローブは、長さが約10ヌクレオチドから約45ヌクレオチドの間であり、検出可能部分を含み、接触させる工程は、N.ゴノレアが試料中に存在する場合にopcA遺伝子領域へのプライマーの特異的ハイブリダイゼーションを可能にさせる条件下で実施される。(試験される試料中に存在する場合に)opcA遺伝子領域に特異的に結合するプローブの存在及び/又は量を決定することができ、結合したプローブは、試料中のN.ゴノレアの存在を示唆している。いくつかの実施形態において、結合したプローブの量を用いて、試料中のN.ゴノレアの量を決定する。

20

**【 0 0 6 3 】**

測定する工程は、それだけには限らないがin situハイブリダイゼーションを含む当業者に公知の任意の方法を、接触させる工程に統いて用いて、達成することができる。ハイブリッド二重鎖の(すなわち、opcA遺伝子領域に特異的に結合したプローブ)の検出は、いくつかの方法によって実施することができる。典型的には、ハイブリダイズしていない核酸からハイブリダイゼーション二重鎖を分離し、次いで、二重鎖に結合した標識を検出する。このような標識は、当技術分野において標準的に使用される放射性、蛍光性、生物学的、又は酵素学的なタグ又は標識を指す。標識は、オリゴヌクレオチドプローブ又は生物試料に由来する核酸のいずれかに結合させることができる。過剰な試料/標的核酸又はオリゴヌクレオチドプローブ(並びに、該当する場合は、未結合の結合体)を洗い落とすために洗浄工程を使用してよいことが、当業者には理解される。更に、標準的な不均一系アッセイ形式も、オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブ上に存在する標識を用いてハイブリッドを検出するのに適している。

30

**【 0 0 6 4 】**

いくつかの実施形態において、N.ゴノレアの存在について試験される試料は、本明細書において開示される方法を実施する前に処理される。例えば、いくつかの実施形態において、試料は、本明細書において開示される方法を実施する前に、単離されるか、濃縮されるか、又は他の様々な処理工程に供されうる。例えば、いくつかの実施形態において、試料は、本明細書において開示されるように、試料をオリゴヌクレオチドと接触させる前に、試料から核酸を単離するために処理されうる。いくつかの実施形態において、本明細書において開示される方法は、試料をin vitroで培養せずに、試料上で実施される。いくつかの実施形態において、本明細書において開示される方法は、本明細書において開示されるように試料をオリゴヌクレオチドと接触させる前に、試料から核酸を単離することなく

40

50

、試料上で実施される。

【0065】

本明細書において開示される方法は、自動化された状態に修正可能であり、それによって、N.ゴノレアの検出のためのハイスループットな選択肢を提供する。様々な多重PCRプラットホーム、例えば、BD MAX(商標)プラットホーム、Viper(商標)プラットホーム、又はViper(商標)LTプラットホームを用いて、開示される方法の1つ又は複数の工程を実施することができる。これらの方は、多重方式で実施することができる。例えば、いくつかの実施形態において、核酸増幅は、多重PCRを実施する工程を含む。

【0066】

試料

10

本明細書において開示される方法及び組成物を用いて、多種多様の試料中のN.ゴノレアの存在/不在及び量を検出することができる。本明細書において使用される場合、「試料」とは、N.ゴノレア核酸を含有すると推測されるか、又は潜在的に含有する、1つ又は複数の対象又は供給源から取得された試料を意味する。

【0067】

試料が採取される供給源は限定されない。例えば、試料は、組織、血液、唾液、痰、粘液、汗、尿、尿道、尿道スワブ、子宮頸部、子宮頸部スワブ、陰茎、肛門、咽頭、膣、泌尿生殖器スワブ又は肛門スワブ、結膜スワブ、接眼レンズ液、脳脊髄液、乳汁、腹水、滑液、腹膜液、羊水、発酵培養液、細胞培養物、及び化学反応混合物等の生物学的供給源から取得することができる。生物試料は、(i)対象若しくは供給源から得られたまま直接的に、又は(ii)試料の特徴を変える前処理の後に、使用されうる。すなわち、試験試料は、例えば、血液から血漿又は血清を調製すること、細胞又はウイルス粒子を破壊すること、固体材料から液体を調製すること、粘性流体を希釈すること、液体を濾過すること、液体を濃縮すること、干渉成分を不活性化すること、試薬を添加すること、及び核酸を精製すること等によって、使用前に前処理されてよい。また、試料調製は、解析用の試料を調製するのに使用される緩衝剤、塩、及び/又は洗浄剤等を含有する溶液の使用も含んでよい。いくつかの実施形態において、試料は、分子的試験の前に処理される。いくつかの実施形態において、試料は直接的に解析され、試験前に前処理されない。

20

【0068】

試料は、生物試料、例えば臨床試料であってよい。いくつかの実施形態において、試料は、対象の尿道、陰茎、肛門、咽頭、子宮頸部、又は膣から採取されうる。いくつかの実施形態において、生物試料は膣試料である。

30

【0069】

膣試料又は尿試料は、複数の生物に感染していることが多い。開示されるプライマー及びプローブは、膣マトリックス又は尿マトリックスの混合感染に対して耐性がある。

【実施例】

【0070】

以下の実施例は、本技術が適用されうる具体的な状況及び設定を実証するために提供され、本発明の範囲及び本開示に含まれる特許請求の範囲を制限することを意図しない。

【0071】

40

(実施例1)

72種のN.ゴノレア臨床分離株の検出

試料緩衝液に72種のN.ゴノレア臨床分離株/株を加え、それぞれ熱溶解した。BD MAX(商標)システムを用いて各試料溶液からDNAを抽出し、抽出したDNAを、Table 1(表1)に示すopcA-6 PCRシステムを用いて増幅して、N.ゴノレア中のopcA遺伝子領域配列の存在を検出した。図2に示すように、opcA-6システムは、試験した72種の異なるN.ゴノレア臨床分離株すべてを成功裏に同定した。

【0072】

本実施例から、opcA-6 PCRシステムを用いて多種多様なN.ゴノレア臨床分離株を検出できることが示される。

50

## 【0073】

(実施例2)

## opcA-6 PCRシステムの特異性試験

試料緩衝液にナイセリア属生物を加え、それぞれ熱溶解した。BD MAX(商標)システムを用いて各試料溶液からDNAを抽出し、抽出したDNAを、Table 1(表1)に示すopcA-6 PCRシステム又はピリンqPCRシステムを用いて增幅して、試料溶液中のナイセリア属生物の存在を検出した。図3Aに示すように、opcA-6システムでは、ゴノレア以外のナイセリア属のみを加えたどの試料においても増幅産物を生じず、したがって、試験したゴノレア以外のナイセリア属の種すべてについて偽陽性をもたらさなかった。図3Bに示すように、ピリンに基づくqPCRシステムは、ゴノレア以外のナイセリア属のいくつかの種(例えば、N.シネレア、N.シッカ、N.ラクタミカ)と交差反応したのに対し、opcA-6システムは、N.ゴノレアを加えた試料においてのみ増幅産物を生じた。

## 【0074】

本実施例により、opcA-6 PCRシステムがN.ゴノレアに対して高度に特異的であり、ゴノレア以外のナイセリア属のいかなる配列とも交差反応しないことが示される。

## 【0075】

(実施例3)

## opcA-6 PCRシステムの特異性試験

試料緩衝液に、膣臨床試料中に一般に存在する生物を加え、それぞれ熱溶解した。BD MAX(商標)システムを用いて試料溶液からDNAを抽出し、抽出したDNAを、Table 1(表1)に示すopcA-6 PCRシステムを用いて増幅した。図4に示すように、opcA-6システムは、試料に加えた115種の生物のいずれとも交差反応せず、増幅産物を生じなかった。

## 【0076】

本実施例により、opcA-6 PCRシステムがN.ゴノレアに対して高度に特異的であり、膣臨床試料中に一般に存在する生物の配列と交差反応しないことが示される。

## 【0077】

(実施例4)

## opcA-6 PCRシステムの検出限界

尿マトリックス臨床試料及び膣マトリックス臨床試料にN.ゴノレアを加え、熱溶解した。BD MAX(商標)システム及びViper(商標)XTRシステムを用いて、それぞれ試料からDNAを抽出し、抽出したDNAを、Table 1(表1)に示すopcA-6 PCRシステムを用いて増幅して、システムの検出限界を決定した。結果を図5に示す。図5に示すように、opcA-6 qPCRシステムは、Viper(商標)XTRシステム(図5においてGC Qxと名付けられている)において現在使用されているN.ゴノレア増幅システムよりも高い陽性率をMAX(商標)システムにおいて有していた。

## 【0078】

様々な態様及び実施形態が本明細書において開示されたが、他の態様及び実施形態が当業者には明らかである。本明細書において開示される様々な態様及び実施形態は、例証のためであり、限定することを意図せず、真の範囲及び精神は、以下の特許請求の範囲によって示される。

## 【0079】

本明細書において開示されるこの工程及び方法並びに他の工程及び方法について、これらの工程及び方法において実行される機能は、異なる順序で果たされうることが、当業者には理解される。更に、概説した工程及び作業は例として提供されるにすぎず、これらの工程及び作業の内の一部は、開示される実施形態の本質を損ねることなく、任意選択であるか、より少ない工程及び作業にまとめるか、又は追加の工程及び作業に発展させることができる。

## 【0080】

実質的に任意の複数形の用語及び/又は単数形の用語を本明細書において使用することに関して、当業者は、文脈及び/又は用途に対して適切であるように、複数形から単数形

10

20

30

40

50

に、及び/又は単数形から複数形に、置き換えることができる。様々な単数/複数の置き換えは、明確にするために本明細書においてはっきりと説明される場合がある。

#### 【0081】

一般に、本明細書、特に添付の特許請求の範囲(例えば、添付の特許請求の範囲の本体部)において使用される用語は、通常は「非限定的(open)」用語として意図される(例えば、「含む(including)」という用語は、「それだけには限らないが、含む(including but not limited to)」と解釈されるべきであり、「有する」という用語は、「少なくとも有する」と解釈されるべきであり、「含む.includes)」という用語は、「それだけには限らないが、含む(including but not limited to)」と解釈されるべきである、等)ことが、当業者には理解される。導入される請求項記載の特定の数が意図される場合、そのような意図はその請求項中に明示的に記載され、そのような記載がない場合は、そのような意図も存在しないことが、当業者には更に理解される。例えば、理解を助けるものとして、下記の添付の特許請求の範囲は、請求項記載を導入するために「少なくとも1つの」及び「1つ又は複数の」といった導入句の使用を含む場合がある。しかし、このような句の使用は、不定冠詞「1つの(a)」又は「1つの(an)」によって請求項記載を導入した場合に、そのような導入される請求項記載を含む任意の特定の請求項が、そのような記載を1つしか含まない実施形態に限定されることを含意すると解釈されるべきではなく、これは、同じ請求項が導入句「1つ又は複数の」又は「少なくとも1つの」及び「1つの(a)」又は「1つの(an)」等の不定冠詞を含む場合であってもそうである(例えば、「1つの(a)」及び/又は「1つの(an)」は、「少なくとも1つの」又は「1つ又は複数の」を意味すると解釈されるべきである)。定冠詞を使用して請求項記載を導入した場合も、同じことが当てはまる。更に、導入される請求項記載の特定の数が明示的に記載されている場合でも、そのような記載は、少なくとも記載された数であることを意味すると解釈されるべきであることを、当業者は認識する(例えば、他の修飾語を伴わない、「2つの記載事項」という単独の記載は、少なくとも2つの記載、又は2つ以上の記載を意味する)。更に、「A、B、及びC等の内の少なくとも1つ」に類似する記載方法(convention)が使用されるような場合、一般に、そのような構文は、当業者がその記載方法を理解するであろう意味で意図されている(例えば、「A、B、及びC等の内の少なくとも1つを有するシステム」は、例えば、Aのみ、Bのみ、Cのみ、AとBと一緒に、AとCと一緒に、BとCと一緒に、及び/又はAとBとCと一緒に有するシステム等を含むが、それだけには限らない)。「A、B、又はC等の内の少なくとも1つ」に類似する記載方法が使用されるような場合、一般に、そのような構文は、当業者がその記載方法を理解するであろう意味で意図されている(例えば、「A、B、又はC等の内の少なくとも1つを有するシステム」は、例えば、Aのみ、Bのみ、Cのみ、AとBと一緒に、AとCと一緒に、BとCと一緒に、及び/又はAとBとCと一緒に有するシステム等を含むが、それだけには限らない)。2つ以上の選択可能な用語を与える実質的に任意の離接的な単語及び/又は句は、明細書中、特許請求の範囲中、又は図面中であるかを問わずに、それら用語の内の1つ、それらの用語の内のいずれか、又は両方の用語を包含する可能性を企図すると理解されるべきであることが、当業者には更に理解される。例えば、「A又はB」という句は、「A」若しくは「B」又は「A及びB」である可能性を包含するものと理解される。

#### 【0082】

更に、本開示の特徴又は態様がマーカッシュ群によって説明される場合、それにより、本開示が、マーカッシュ群の任意の個々の構成要素又は構成要素の下位集団の観点からも説明されるということを、当業者は認識する。

#### 【0083】

当業者に理解されるように、任意及びあらゆる目的のために、例えば、書面による説明を提供するという観点から、本明細書において開示される範囲はいずれも、任意及びすべての存在しうる部分範囲及びその部分範囲の組合せをも包含する。挙げられた任意の範囲は、同範囲が少なくとも均等な半分、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1等に細分化されることを十分に説明し、可能にすることが容易に認識されうる。非限定的な例として、本明細書において考察される各範囲は、下3分の1、中央3分の1、上3分の1等に容易に細分化

10

20

30

40

50

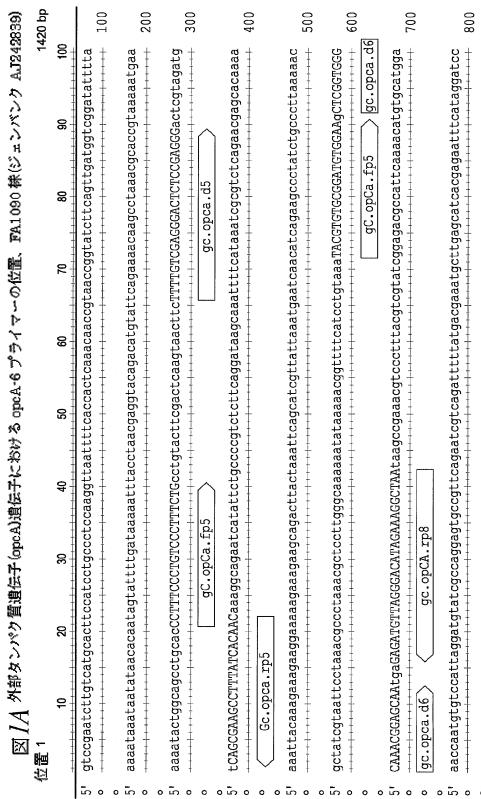
されうる。また、当業者には理解されるように、「最高で」及び「少なくとも」等の言い回しはすべて、記載された数を含み、前述したように後で部分範囲に細分化されうる範囲を指す。最後に、当業者には理解されるように、範囲は、個々の各構成要素を含む。したがって、例えば、1~3個の細胞を有する群とは、1、2、又は3個の細胞を有する群を意味する。同様に、1~5個の細胞を有する群とは、1、2、3、4、又は5個の細胞を有する群を意味し、以下同様である。

【 0 0 8 4 】

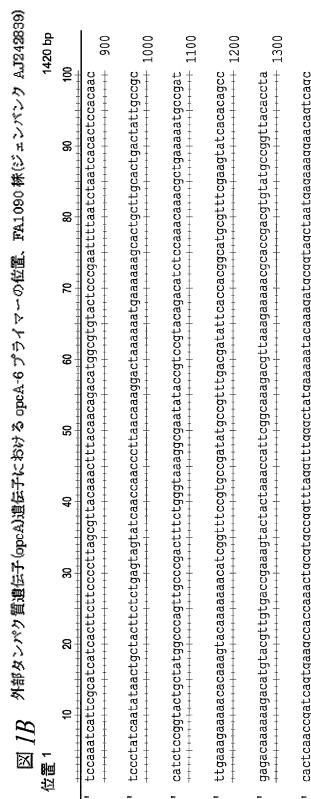
前述の内容から、本開示の様々な実施形態は、例証のために本明細書において説明されたこと、及び本開示の範囲からも精神からも逸脱することなく、様々な修正を加えられることが、認識される。したがって、本明細書において開示される様々な実施形態は、限定することを意図せず、真の範囲及び精神は、以下の特許請求の範囲によって示される。

10

【 义 1 - 1 】



【 义 1 - 2 】



1

1B

7

【図2-1】

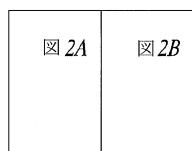


図2

【図2-2】

試料番号	生物	図2A	
		株/ATCC番号	結果
1	ナイセリア・ゴノレア	53421	+
2	ナイセリア・ゴノレア	53424	+
3	ナイセリア・ゴノレア	CHD5	+
4	ナイセリア・ゴノレア	NGC0193	+
5	ナイセリア・ゴノレア	NGC115	+
6	ナイセリア・ゴノレア	NGC5	+
7	ナイセリア・ゴノレア	NGC6	+
8	ナイセリア・ゴノレア	700717	+
9	ナイセリア・ゴノレア	700718	+
10	ナイセリア・ゴノレア	19424	+
11	ナイセリア・ゴノレア	53425	+
12	ナイセリア・ゴノレア	10150	+
13	ナイセリア・ゴノレア	43069	+
14	ナイセリア・ゴノレア	53423	+
15	ナイセリア・ゴノレア	23051	+
16	ナイセリア・ゴノレア	27628	+
17	ナイセリア・ゴノレア	27629	+
18	ナイセリア・ゴノレア	27633	+
19	ナイセリア・ゴノレア	31151	+
20	ナイセリア・ゴノレア	31397	+
21	ナイセリア・ゴノレア	31407	+
22	ナイセリア・ゴノレア	31953	+
23	ナイセリア・ゴノレア	53420	+
24	ナイセリア・ゴノレア	53422	+
25	ナイセリア・ゴノレア	6016178	+
26	ナイセリア・ゴノレア	728SPR	+
27	ナイセリア・ゴノレア	CLG14	+
28	ナイセリア・ゴノレア	IU2254	+
29	ナイセリア・ゴノレア	IU2265	+
30	ナイセリア・ゴノレア	IU2266	+
31	ナイセリア・ゴノレア	TC548	+
32	ナイセリア・ゴノレア	IU2273	+
33	ナイセリア・ゴノレア	IU24929	+
34	ナイセリア・ゴノレア	IU330576	+
35	ナイセリア・ゴノレア	BDSWE8658	+
36	ナイセリア・ゴノレア	BDAR13	+

【図2-3】

図2B ナイセリア・ゴノレアの特異性試験			
試料番号	生物	株/ATCC番号	結果
37	ナイセリア・ゴノレア	BDAR150	+
38	ナイセリア・ゴノレア	BDRGC3	+
39	ナイセリア・ゴノレア	BDRGC6	+
40	ナイセリア・ゴノレア	BDRGC9	+
41	ナイセリア・ゴノレア	BDRGC12	+
42	ナイセリア・ゴノレア	BDRGC13	+
43	ナイセリア・ゴノレア	BDF28	+
44	ナイセリア・ゴノレア	UCLA537	+
45	ナイセリア・ゴノレア	BD4-11	+
46	ナイセリア・ゴノレア	BD4-18	+
47	ナイセリア・ゴノレア	UCLA949	+
48	ナイセリア・ゴノレア	UCLA969	+
49	ナイセリア・ゴノレア	UCLA1020	+
50	ナイセリア・ゴノレア	BD9	+
51	ナイセリア・ゴノレア	BD15	+
52	ナイセリア・ゴノレア	35542	+
53	ナイセリア・ゴノレア	BD7	+
54	ナイセリア・ゴノレア	27632	+
55	ナイセリア・ゴノレア	27631	+
56	ナイセリア・ゴノレア	35201	+
57	ナイセリア・ゴノレア	35541	+
58	ナイセリア・ゴノレア	27630	+
59	ナイセリア・ゴノレア	D4-05	+
60	ナイセリア・ゴノレア	D4-11	+
61	ナイセリア・ゴノレア	D4-17	+
62	ナイセリア・ゴノレア	D4-08	+
63	ナイセリア・ゴノレア	BDF18	+
64	ナイセリア・ゴノレア	BDF45	+
65	ナイセリア・ゴノレア	BD8658	+
66	ナイセリア・ゴノレア	BD86-36238	+
67	ナイセリア・ゴノレア	MAYO4844	+
68	ナイセリア・ゴノレア	MHD2900	+
69	ナイセリア・ゴノレア	WHO3	+
70	ナイセリア・ゴノレア	WHO5	+
71	ナイセリア・ゴノレア	WHO7	+
72	ナイセリア・ゴノレア	UCLA493	+

【図3-1】

図3A ゴノレア以外のナイセリア属の特異性試験(GC-opcA-6)		
生物	試験した株	交差反応の数
ブランハメラ・カタラーリス (Brachamella catarrhalis)	1	0
ナイセリア・シネレア	6	0
ナイセリア・エロンゴータ	1	0
ナイセリア・フラバ(Neisseria flava)	2	0
ナイセリア・フベッセンス	3	0
ナイセリア・ラクタミカ	9	0
ナイセリア・メニンギティディス	9	0
ナイセリア・メニンギティディス A	1	0
ナイセリア・メニンギティディス B	1	0
ナイセリア・メニンギティディス C	4	0
ナイセリア・メニンギティディス D	1	0
ナイセリア・メニンギティディス Y	1	0
ナイセリア・メニンギティディス W135	1	0
ナイセリア・ムコサ	3	0
ナイセリア・ベルフラバ (Neisseria perflava)	1	0
ナイセリア・ボリサッカレア (Neisseria polysaccharea)	1	0
ナイセリア・シッカ	3	0
ナイセリア・サブフラバ	14	0
ナイセリア・ウェアベリ (Neisseria weaveri)	1	0

【図3-2】

図3B ゴノレア以外のナイセリア属の特異性試験(GC-opcA-6)		
生物	試験した株	交差反応の数
ナイセリア・ゴノレア	Yes	Yes
プランハメラ・カラターリス	NO	NO
ナイセリア・シネレア	Yes	NO
ナイセリア・エロンガータ	NO	NO
ナイセリア・フラバ	NO	NO
ナイセリア・ラバベッセンス	NO	NO
ナイセリア・ラクタミカ	Yes	NO
ナイセリア・メンギティディス	NO	NO
ナイセリア・メンギティディスA	NO	NO
ナイセリア・メンギティディスB	NO	NO
ナイセリア・メンギティディスC	NO	NO
ナイセリア・メンギティディスD	NO	NO
ナイセリア・メンギティディスY	NO	NO
ナイセリア・メンギティディスW135	NO	NO
ナイセリア・ムコサ	NO	NO
ナイセリア・ペルラバ	NO	NO
ナイセリア・ポリサッカレア	NO	NO
ナイセリア・シッカ	Yes	NO
ナイセリア・サブフラバ	NO	NO
ナイセリア・ウェアベリ	NO	NO

【図4-1】

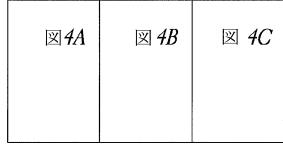


図4

【図4-2】

図4A 壁のパネル		
試料番号	生物	結果
1	ラーネラ・アクアティリス(Rahnella aquatilis)	-
2	エンテロバクター・エアロゲンス(Enterobacter aerogenes)	-
3	カンピロバクター・コリ(Campylobacter coli)	-
4	エイケネラ・コローデンス(Eikenella corrodens)	-
5	クロモバクテリウム・ビオラセウム(Chromobacterium violaceum)	-
6	アグロバクテリウム・ラジバクター(Agrobacterium radiobacter)	-
7	エシエリキア・コリ(Escherichia coli)	-
8	プロテウス・ブルガリス(Proteus vulgaris)	-
9	アシネトバクター・バクマニ(Actinobacter baumannii)	-
10	クリフィエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca)	-
11	キンゲラ・デニトリフィカンス(Kingella denitrificans)	-
12	エリシペロスリクス・ルンゴバクター(Erysipelothrix rhusiopathiae)	-
13	アクチノマイセス・ビオガネス(Actinomyces pyogenes)	-
14	コリネバクテリウム・ジェニタリウム(Corynebacterium genitalium)次亜種1	-
15	アエロロッカス・ビリダクス(Aerococcus viridans)	-
16	ストレプトコッカス・サンギス(Streptococcus sanguis)	-
17	ストレプトコッカス・サバリウス(Streptococcus salivarius)	-
18	スタフィロロッカス・サブコイリクス(Staphylococcus saprophyticus)	-
19	リスチリニア・モノサイトゲネス(Listeria monocytogenes)	-
20	エンテロコッカス・アビウム(Enterococcus avium)	-
21	クリプトコッカス・ネオフォルマニス(Cryptococcus neoformans)	-
22	エンテロコッカス・フェカリス(Enterococcus faecalis)	-
23	エンテロコッカス・フェシウム(Enterococcus faecium)	-
24	クリエラ・オザエナセ(Leptospira ozaenae)	-
25	プロテウス・ミラビリス(Proteus mirabilis)	-
26	サルモネラ・コラエイクス(Salmonella choleraesuis)	-
27	サルモネラ・ティフィムリウム(Salmonella typhimurium)	-
28	スタフィロロッカス・アリシクス(Staphylococcus aureus)、プロテインA非産生	-
29		-
30	スタフィロロッカス・エピデルミディス(Staphylococcus epidermidis)	-
31		-
32	ストレプトコッカス・ビオガネス(Streptococcus pyogenes)(A群)	-
33	ストレプトコッカス・ミティス(Streptococcus mitis)	-
34	ストレプトコッカス・ミティス	-
35	ストレプトコッカス・ミュータンス(Streptococcus mutans)	-
36	ストレプトコッカス・ニューベニエ(Streptococcus pneumoniae)	-
37	ストレプトマイセス・グリセウス(Streptomyces griseus)	-
38	ビブリオ・バラモリチカス(Vibrio parahaemolyticus)	-
39	エルシニア・エンテロコリカ(Enterococcus enterocolitica)	-
40	アシネトバクター・カルコアティカス(Actinobacter calcoaceticus)	-

【図4-3】

図4B 壁のパネル		
試料番号	生物	結果
41	アシネトバクター・ルオフィ(Acinetobacter lwoffii)	-
42	エアロモナス・ハイドロフィラ(Aeromonas hydrophila)	-
43	アルカリオネス・フェカリス(Alcaligenes faecalis)	-
44	バチルス・サブリリス(Bacillus subtilis)	-
45	カシジダ・アルビカанс(Candida albicans)	-
46	カシジダ・グラブラタ(Candida glabrata)	-
47	カシジダ・ロビカリス(Candida tropicalis)	-
48	シトロバクター・フレウンドー(Citrobacter freundii)	-
49	コリネバクテリウム・レナーレ(Corynebacterium renale)	-
50	エドワード・ターダ(Edwardsiella tarda)	-
51	エンテロバクター・クロアフ(Enterobacter cloacae)	-
52	フラボバクテリウム・メンニゴセラカム(Flavobacterium meningosepticum)	-
53	ゲメラ・ヘモリゲンス(Gemella haemolysans)	-
54	ヘモフィルス・インフルエンザ(Haemophilus influenzae)	-
55	キンゲラ・キング(Kingella kingae)	-
56	ラクトバチルス・ジェンセニイ(Lactobacillus jensenii)	-
57	モラクセラ・オストロニシス(Moraxella osloensis)	-
58	モラクセラ・オラエンス	-
59	モルガネラ・モルガニ(—Morganella morganii)	-
60	ブレジオモナス・シゲロイデス(Plesiomonas shigelloides)	-
61	プロビデンシア・ステュアルティア(Providencia stuartii)	-
62	ロドッカス・エクリ(Rhodococcus equi)	-
63	サルモネラ・ミニタ(Salmonella minnesota)	-
64	エシエリキア・コリ	-
65	クリエラ・ニコモニエ(Klebsiella pneumoniae)	-
66	ストレプトコッカス・アグラチア(Streptococcus agalactiae)(B群)	-
67	アシネトバクター・カルコセラカム(Acinetobacter calcoaceticus)	-
68	カシジダ・グラブラタ	-
69	ガードネラ・バギナリス(Gardnerella vaginalis)	-
70	セラチア・マルセセンス(Serratia marcescens)	-
71	ストレプトコッカス・ボビス(Streptococcus bovis)	-
72	コリネバクテリウム・キセロシス(Corynebacterium xerosis)	-
73	ペプストレプトコッカス・アネロビクス(Peptostreptococcus anaerobius)	-
74	大腸菌(E. coli):HPV6	-
75	大腸菌 HPV 11	-
76	大腸菌 HPV 16	-
77	大腸菌 HPV 18	-
78	ペイロネラ・パルブラ(Vellonella parvula)	-
79	クロストリジウム・バーフリンジエンス(Clostridium perfringens)	-
80	ラクトバチルス・アシドフィルス(Lactobacillus acidophilus)	-

【図4-4】

図4C 壁のパネル		
試料番号	生物	結果
81	バクテリオイデス・フラジリス(Bacteroides fragilis)	-
82	ペプストレプトコッカス・アネロビクス	-
83	シュードモナス・エルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa)	-
84	ペプストレプトコッカス・プロダクツ(Peptostreptococcus products)	-
85	プロビオニバクテリウム・アクネス(Propionibacterium acnes)	-
86	シュードモナス・フルオレセンス(Pseudomonas fluorescens)	-
87	シュードモナス・プチリカ(Pseudomonas putida)	-
88	カシジダ・バラブロシス(Candida parapsilosis)	-
89	レジオネラ・ニューモフィラ(Legionella pneumophila)	-
90	マイコバクテリウム・スマグマチス(Mycobacterium smegmatis)	-
91	カシジダ・ロバクテリウム・ジェユニ(Campylobacter jejuni)	-
92	モビルンカス・ムリエリス(Mobiluncus mulieris)	-
93	アクチノマイセス・イスラエリイ(Actinomyces israelii)	-
94	ラクトバチルス・ブリビス(Lactobacillus brevis)	-
95	ビフィドバクテリウム・アドレセンティス(Bifidobacterium adolescentis)	-
96	クロストリジウム・ディフィシル(Clostridium difficile)	-
97	アーボビウム・バギナエ(Atopobium vaginale)	-
98	アナエロコッカス・バギナリス(Anaerococcus vaginalis)	-
99	ビフィドバクテリウム・インファンティス(Bifidobacterium infantis)	-
100	ビフィドバクテリウム・ブレビス(Bifidobacterium brevis)	-
101	サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)	-
102	ミクロコッカス・ルテナス(Micrococcus leutus)	-
103	ロイコヌストック・バラメセンテロイデス(Leuconostoc paramesenteroides)	-
104	ラクトバチルス・バギナリス(Lactobacillus vaginalis)	-
105	ビフィドバクテリウム・インファンティス	-
106	ビフィドバクテリウム・ブリビス	-
107	サッカロマイセス・セレビシエ	-
108	ミクロコッカス・ルテウス	-
109	ロイコヌストック・バラメセンテロイデス	-
110	ラクトバチルス・バギナリス	-
111	ビフィドバクテリウム・ビフィダム(Bifidobacterium bifidum)	-
112	モビルンカス・クルティシイ(Mobiluncus curtisi)	-
113	ペプストレプトコッカス・アサッカロリチカス(Peptostreptococcus asaccharolyticus)	-
114	バクテリオイデス・ウレオエオイチカム(Bacteroides ureolyticum)	-
115	アクロモバクター・キセロシス(Achromobacter xerosis)	-
116	ラクトバチルス・イネルス(Lactobacillus iners)	-

【図5】

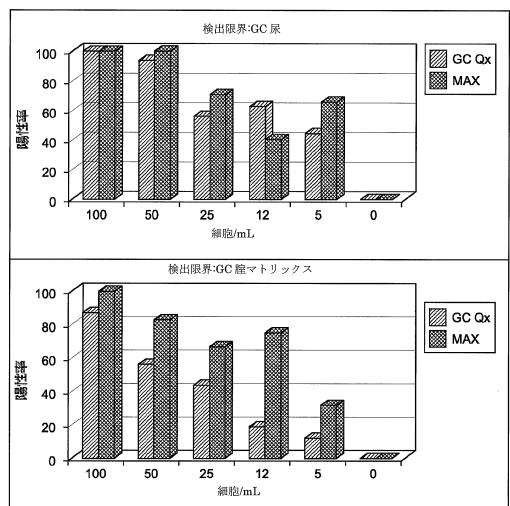


図5

【配列表】

0006615744000001.app

---

フロントページの続き

(74)代理人 100110364  
弁理士 実広 信哉  
(74)代理人 100133400  
弁理士 阿部 達彦  
(72)発明者 キース・エドワード・ソーントン  
アメリカ合衆国・メリーランド・21117・オーウィングス・ミルズ・ワイルドブランチ・コート・11128  
(72)発明者 ポール・マデボグ  
アメリカ合衆国・メリーランド・21229・ボルチモア・ワーレン・ツリー・ウェイ・4631  
(72)発明者 ダニエル・コッフェンバーガー<sup>1</sup>  
アメリカ合衆国・ペンシルベニア・17363・ステュワーツタウン・ポブラー・スプリングス・ブルヴァード・51

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特表2007-514427(JP, A)  
米国特許出願公開第2011/0182981(US, A1)  
特表2009-533023(JP, A)  
特表2004-537977(JP, A)  
P.Zhu, et al., "Identification of *opcA* gene in *eisseria polyscharella*: interspecies diversity of *Opc* protein family" , Gene, 2003, 307, pp.31-40

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/689  
C12N 15/00  
G01N 33/68  
JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDreamIII)  
CAPLus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)  
WPI DSS (STN)