

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-552546

(P2023-552546A)

(43)公表日 令和5年12月18日(2023.12.18)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/686(2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z Z N A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6876(2018.01)	C 1 2 Q 1/6876	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全54頁)

(21)出願番号	特願2023-533992(P2023-533992)	(71)出願人	591003013
(86)(22)出願日	令和3年12月3日(2021.12.3)		エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー
(85)翻訳文提出日	令和5年7月31日(2023.7.31)		F . HOFFMANN - LA ROCH
(86)国際出願番号	PCT/EP2021/084099		E AKTIENGESELLSCHA
(87)国際公開番号	WO2022/117784		FT
(87)国際公開日	令和4年6月9日(2022.6.9)		スイス・シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼル
(31)優先権主張番号	63/121,338		・グレンツアーヘルストラツセ 1 2 4
(32)優先日	令和2年12月4日(2020.12.4)	(74)代理人	100099759
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 青木 篤
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100123582
			弁理士 三橋 真二
		(74)代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74)代理人	100141977
			弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マラリアを検出するための組成物および方法

(57)【要約】

生物学的サンプルまたは非生物学的サンプル中のマラリア原虫(プラスモジウムを含む)の存在または非存在を迅速に検出するための方法が記載されている。本方法は、増幅する工程、ハイブリダイズする工程、および検出する工程を実施することを含み得る。さらに、このアッセイは、複数のプラスモジウム標的を同時に増幅および検出するためのマルチプレックスアッセイであり得、これはシングルプレックスアッセイを超える利点を提供する。さらに、マラリア原虫(プラスモジウムを含む)を標的とするオリゴヌクレオチドプライマーおよびオリゴヌクレオチドプローブ、ならびに限定されないが、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、およびサルマラリア原虫のプラスモジウム種を含む、プラスモジウムの検出のために設計されたキットが提供される。マラリア原虫(プラスモジウムを含む)の増幅および検出のためのキット、反応混合物およびオリゴヌクレオチド(例えば、プライマーおよびプローブ)も記載される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の 1 つ以上のマラリア原虫種を検出するための方法であって、前記方法が、
 (a) 前記サンプルを 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットと接触させて、前記 1 つ以上のマラリア原虫種の標的核酸が前記サンプル中に存在する場合、増幅産物を産生することを含む増幅工程を実施する工程；

(b) 前記 1 つ以上のマラリア原虫種の標的核酸が前記サンプル中に存在する場合、1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを前記増幅産物と接触させることを含むハイブリダイゼーション工程を実施する工程；および

(c) 前記増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、前記増幅産物の存在が、前記サンプル中の前記 1 つ以上のマラリア原虫種の存在を示し、前記増幅産物の非存在が、前記サンプル中の前記 1 つ以上のマラリア原虫種の非存在を示す工程、を含み、

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、

(1) 配列番号 3 4、3 5 および 3 6 の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 4 の核酸配列もしくはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブ；ならびに / または

(2) 配列番号 5 6 および 5 7 の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 5 8 の核酸配列もしくはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブを含む、方法。

【請求項 2】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、

(1) 配列番号 3 4、3 5 および 3 6 の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 4 の核酸配列もしくはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブ；ならびに

(3) 配列番号 5 6 および 5 7 の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 5 8 の核酸配列もしくはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 1 つ以上のマラリア原虫種がプラスモジウム属に属する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記プラスモジウム属に属する前記 1 つ以上のマラリア原虫種が、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、および / またはサルマラリア原虫である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記サンプルが生物学的サンプルである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記生物学的サンプルが、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染部である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記生物学的サンプルが全血である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが標識されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、ドナー蛍光部分および対応するアクセ

10

20

30

40

50

プター部分で標識されている、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 (c) が、前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブの前記ドナー蛍光部分と前記アクセプター部分との間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の存在または非存在を検出することをさらに含み、蛍光の存在または非存在が、前記サンプル中の前記 1 つ以上のマラリア原虫種の存在または非存在を示す、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

サンプル中の 1 つ以上のマラリア原虫種の第 1 の標的核酸および / または第 2 の標的核酸を検出するための方法であって、前記方法が、

(a) (a) 前記サンプルを 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットと接触させて、前記 1 つ以上のマラリア原虫種の前記第 1 の標的核酸および / または前記第 2 の標的核酸が前記サンプル中に存在する場合、増幅産物を産生することを含む増幅工程を実施する工程；

(b) (b) 前記 1 つ以上のマラリア原虫種の前記第 1 の標的核酸および / または前記第 2 の標的核酸が前記サンプル中に存在する場合、1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを前記増幅産物と接触させることを含むハイブリダイゼーション工程を実施する工程；ならびに

(c) (c) 前記増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、前記増幅産物の存在が、前記サンプル中の前記 1 つ以上のマラリア原虫種の存在を示し、前記増幅産物の非存在が、前記サンプル中の前記 1 つ以上のマラリア原虫種の非存在を示す工程、を含み、

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、

(1) 前記 1 つ以上のマラリア原虫種の前記第 1 の標的核酸に対する、オリゴヌクレオチドプライマーのセット、およびオリゴヌクレオチドプローブであって、前記オリゴヌクレオチドプライマーのセットが、配列番号 34、35 および 36 の核酸配列またはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含み、前記オリゴヌクレオチドプローブが、配列番号 4 の核酸配列またはその相補体を含む、オリゴヌクレオチドプライマーのセットおよびオリゴヌクレオチドプローブと、

(2) 前記 1 つ以上のマラリア原虫種の前記第 2 の標的核酸に対する、オリゴヌクレオチドプライマーのセット、およびオリゴヌクレオチドプローブであって、前記オリゴヌクレオチドプライマーのセットが、配列番号 56 および 57 の核酸配列またはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含み、前記オリゴヌクレオチドプローブが、配列番号 58 の核酸配列またはその相補体を含む、オリゴヌクレオチドプライマーのセットおよびオリゴヌクレオチドプローブと、を含む、方法。

【請求項 12】

サンプル中の 1 つ以上のマラリア原虫種を検出するための方法であって、前記方法が、

(a) 前記サンプルを 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットと接触させて、前記 1 つ以上のマラリア原虫種の標的核酸が前記サンプル中に存在する場合、増幅産物を産生することを含む増幅工程を実施する工程；

(b) 前記 1 つ以上のマラリア原虫種の前記標的核酸が前記サンプル中に存在する場合、1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを前記増幅産物と接触させることを含むハイブリダイゼーション工程を実施する工程；および

(c) 前記増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、前記増幅産物の存在が、前記サンプル中の前記 1 つ以上のマラリア原虫種の存在を示し、前記増幅産物の非存在が、前記サンプル中の前記 1 つ以上のマラリア原虫種の非存在を示す工程、を含み、

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、配列番号 34、35 および 36 の核酸配列またはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 4 の核酸配列またはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブを含む、方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 13】

サンプル中の 1 つ以上のマラリア原虫種を検出するための方法であって、前記方法が、
 (a) 前記サンプルを 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットと接触させて、前記 1 つ以上のマラリア原虫種の標的核酸が前記サンプル中に存在する場合、増幅産物を産生することを含む増幅工程を実施する工程；

(b) 前記 1 つ以上のマラリア原虫種の前記標的核酸が前記サンプル中に存在する場合、1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを前記増幅産物と接触させることを含むハイブリダイゼーション工程を実施する工程；および

(c) 前記増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、前記増幅産物の存在が、前記サンプル中の前記 1 つ以上のマラリア原虫種の存在を示し、前記増幅産物の非存在が、前記サンプル中の前記 1 つ以上のマラリア原虫種の非存在を示す工程、を含み、

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、配列番号 56 および 57 の核酸配列またはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 58 の核酸配列またはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブを含む、方法。

【請求項 14】

前記 1 つ以上のマラリア原虫種がプラスモジウム属に属する、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記プラスモジウム属に属する前記 1 つ以上のマラリア原虫種が、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、および / またはサルマラリア原虫である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記サンプルが生物学的サンプルである、請求項 11 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記生物学的サンプルが、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染部である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記生物学的サンプルが全血である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが標識されている、請求項 11 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分で標識されている、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

サンプル中に存在し得る 1 つ以上のマラリア原虫種を検出するためのキットであって、前記キットが、DNA ポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー、ならびに 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを含む増幅試薬を含み、前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、

(1) 配列番号 34、35 および 36 の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 4 の核酸配列もしくはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブ；ならびに / または

(2) 配列番号 56 および 57 の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 58 の核酸配列もしくはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブ、を含む、キット。

【請求項 2 2】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、

(1) 配列番号 3 4、3 5 および 3 6 の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 4 の核酸配列もしくはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブ；ならびに

(2) 配列番号 5 6 および 5 7 の核酸配列もしくはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 5 8 の核酸配列もしくはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブ、を含む、請求項 2 1 に記載のキット。

10

【請求項 2 3】

前記 1 つ以上のマラリア原虫種がプラスモジウム属に属する、請求項 2 1 または 2 2 に記載のキット。

【請求項 2 4】

前記プラスモジウム属に属する前記 1 つ以上のマラリア原虫種が、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、および / またはサルマラリア原虫である、請求項 2 3 に記載のキット。

【請求項 2 5】

前記サンプルが生物学的サンプルである、請求項 2 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載のキット。

20

【請求項 2 6】

前記生物学的サンプルが、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染部である、請求項 2 5 に記載のキット。

【請求項 2 7】

前記生物学的サンプルが全血である、請求項 2 6 に記載のキット。

【請求項 2 8】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが標識されている、請求項 2 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 2 9】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分で標識されている、請求項 2 8 に記載のキット。

30

【請求項 3 0】

サンプル中に存在し得る、1 つ以上のマラリア原虫種の第 1 の標的核酸および / または第 2 の標的核酸を検出するためのキットであって、前記キットが、DNA ポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー、ならびに 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを含む増幅試薬を含み、前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、

(1) 前記 1 つ以上のマラリア原虫種の前記第 1 の標的核酸に対する、オリゴヌクレオチドプライマーのセット、およびオリゴヌクレオチドプローブであって、前記オリゴヌクレオチドプライマーのセットが、配列番号 3 4、3 5 および 3 6 の核酸配列またはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含み、前記オリゴヌクレオチドプローブが、配列番号 4 の核酸配列またはその相補体を含む、オリゴヌクレオチドプライマーのセットおよびオリゴヌクレオチドプローブ、ならびに

40

(2) 前記 1 つ以上のマラリア原虫種の前記第 2 の標的核酸に対する、オリゴヌクレオチドプライマーのセット、およびオリゴヌクレオチドプローブであって、前記オリゴヌクレオチドプライマーのセットが、配列番号 5 6 および 5 7 の核酸配列またはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含み、前記オリゴヌクレオチドプローブが、配列番号 5 8 の核酸配列またはその相補体を含む、オリゴヌクレオチドプライマーのセットおよびオリゴヌクレオチドプローブ、を含む、キット。

50

【請求項 3 1】

サンプル中に存在し得る 1 つ以上のマラリア原虫種を検出するためのキットであって、前記キットが、DNA ポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー、ならびに 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを含む増幅試薬を含み、前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、

配列番号 3 4、3 5 および 3 6 の核酸配列またはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 4 の核酸配列またはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブを含む、キット。

【請求項 3 2】

サンプル中に存在し得る 1 つ以上のマラリア原虫種を検出するためのキットであって、前記キットが、DNA ポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー、ならびに 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを含む増幅試薬を含み、前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプライマーのセットおよび前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、

配列番号 5 6 および 5 7 の核酸配列またはそれらの相補体を含むオリゴヌクレオチドプライマーを含むオリゴヌクレオチドプライマーのセットと、配列番号 5 8 の核酸配列またはその相補体を含むオリゴヌクレオチドプローブを含む、キット。

【請求項 3 3】

前記 1 つ以上のマラリア原虫種がプラスモジウム属に属する、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 4】

前記プラスモジウム属に属する前記 1 つ以上のマラリア原虫種が、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、および / またはサルマラリア原虫である、請求項 3 3 に記載のキット。

【請求項 3 5】

前記サンプルが生物学的サンプルである、請求項 3 0 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 6】

前記生物学的サンプルが、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染部である、請求項 3 5 に記載のキット。

【請求項 3 7】

前記生物学的サンプルが全血である、請求項 3 6 に記載のキット。

【請求項 3 8】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが標識されている、請求項 3 0 ~ 3 7 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 9】

前記 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブが、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分で標識されている、請求項 3 8 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本特許出願は、2020年12月4日に提出された米国仮特許出願第63/121,338号に対する優先権を主張し、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、体外診断の分野に関する。この分野において、本発明は、サンプル中に存在し得る標的核酸の増幅および検出、特に、プライマーおよびプローブを使用した、マラリ

10

20

30

40

50

ア原虫の配列変異および/または個体の変異を含む標的核酸の増幅、検出および定量に関する。本発明はさらに、マラリアの増幅および検出のためのプライマーおよびプローブを含有する反応混合物およびキットを提供する。

【背景技術】

【0003】

マラリアは、ヒトおよび他の動物に影響を及ぼす、蚊が媒介する感染症である。マラリアは、感染した雌のハマダラカ (*Anopheles mosquitoes*) に噛まれた後にヒトに伝染する単細胞微生物マラリア原虫 (*Plasmodium*) 寄生虫によって引き起こされる疾患である。マラリアの初期症状としては、発熱、頭痛、および悪寒が挙げられ、入手可能な抗マラリア薬で処置し得る。処置せずに放置すると、貧血、脳マラリア、および呼吸窮迫を含む症状を伴う重度のマラリアが発症する可能性があり、最終的に死に至る可能性がある。

10

【0004】

2018年の世界保健機関 (WHO) 報告書によると、主に熱帯および亜熱帯地域に位置する87か国で、約32億人がマラリアの危険にさらされている。マラリアの年間の症例は約2億1900万件であり、そのうち92%がアフリカ、5%が東南アジア、2%が東地中海国からの症例である。米国では、年間約1,700症例がある。また、マラリアによる死者は、年間435,000人であり、これらの死亡者のうち266,000人が5歳未満の子供である。マラリアを根絶および予防する努力が進められており、殺虫剤処理されたネット、患者の医療へのアクセスの増加、薬物開発ワクチン、および遺伝子改変蚊 (GMO) が挙げられる。米国はマラリアの流行国ではないと考えられているが、米国への/からの世界的な移動により、輸入マラリアの症例の増加がもたらされ得る。

20

【0005】

ヒトに感染することが知られているマラリア原虫には少なくとも5つの種：熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*)、卵形マラリア原虫 (*P. ovale*)、四日熱マラリア原虫 (*P. malariae*)、およびサルマラリア原虫 (*P. knowlesi*) がある。臨床症状は、マラリア原虫の種に応じて異なり得る。熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) は、感染した赤血球において急速な細胞分裂を引き起こすことが知られている最も致命的な種であり、貧血および脳への血管の閉塞を引き起こすマラリア原虫の生活環は複雑であり、寄生生物は蚊における有性生殖とヒト宿主における無性生殖とを交互に行う。この生活環は、CDCウェブサイト (<https://www.cdc.gov/malaria>) から入手した図1に示されている。症状は、血液期に寄生生物によって引き起こされ、蚊に刺された7~30日後に現れることがある。三日熱マラリア原虫 (*P. vivax*) および卵形マラリア原虫 (*P. ovale*) は、肝臓段階で休眠したままであり、数ヶ月または数年後に再活性化し得る。

30

【0006】

血液供給および献血に関して、米国の南部および東部において、マラリアで重大な不足を伴う十分な血液供給を維持するための大きな課題が既に存在しており、血液供給および献血にはさらなる問題がある。例えば、米国は非流行国であると考えられているが、世界旅行によりマラリアの輸入症例が増加し、それによって米国世界全体の血液供給に影響を及ぼす可能性があり、血液供給の安全性を維持するために採用されているマラリアに関する現在の戦略には、(1) 選択的検査、および(2) ドナー離脱 (*Donor Deferral*) が含まれ、米国はドナー離脱の方針に従う。典型的には、ドナーは、スクリーニングの質問票への回答に基づいて、履歴、居住地、旅行に基づいてドナーが延期されることが多い。米国では、推定191,000人のドナーが一時的に延期され(1~3年間)、延期の大部分は流行地域への移動に起因する。さらに、献血が延期されると、一時的に延期されたドナーのおおよそ1/4しか延期期間が終了した後に次の献血のために実際に戻ってこないため、血液供給に悪影響を及ぼす。ドナーの延期は、マラリアの有無にかかわらず、アンケートの回答に基づいて献血が除外されることによって血液供給に悪影響

40

50

が及ぼされる。一方、選択的試験により、ドナー延期と比較して、血液供給在庫に対する影響が低減する。献血の選択的検査もアンケートの回答に基づいているが、選択的検査ポリシーは、ドナーのマラリアの状態に応じて、ドナーの延期時間を短縮したり復帰させたりすることが可能になる。選択的検査方針を有する国では、検査は酵素免疫測定法によって行われる。少なくとも3つの国：フランス、英国およびオーストラリアが献血においてマラリアの試験を実施している。フランスでは、1年間に3,000,000件の献血のうち、約180,000件の献血について試験が行われ、試験された180,000件の献血のうち、約3,300件（または1.8%）が陽性であった。

【0007】

マラリアについては、いくつかの診断およびスクリーニング方法が存在する。ギムザ染色した血液スミアの顕微鏡検査によるマラリアの検出により、種の同定が可能となり、安価であり、依然としてゴールドスタンダードである。しかしながら、顕微鏡検査では、ハイスループットスクリーニング/検出を実施し得ない。マラリア抗原の免疫クロマトグラフィー検出のための方法を用いる迅速診断試験（RDT）は、迅速かつ安価であるが、感度が低く（200~5,000 p/μL）、顕微鏡検査による確認が依然として必要である。血清中の抗マラリア原虫抗体を検出する酵素免疫測定法（EIA）が広く使用されているが、感度も低い。対照的に、核酸検査（NAT）は、ハイスループットスクリーニング/検出に適しており、高感度（<1 p/μL）である。したがって、核酸検査は、その高い感度および高い処理能力のために、マラリアの血液サンプルを検出およびスクリーニングするための最良の方法である。しかしながら、現在のところ、献血をスクリーニングするために利用可能なインビトロ診断核酸検査はない。したがって、血液などの生物学的サンプル中のマラリアの存在を検出および定量化するための迅速で信頼性が高く、特異的かつ高感度の方法が当技術分野で必要とされている。

【0008】

分子診断の分野では、核酸の増幅および検出はかなり重要である。そのような方法は、任意の数のウイルスおよび細菌等の微生物を検出するために使用し得る。最も顕著で広く使用されている増幅技術は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。他の増幅技術としては、リガーゼ連鎖反応、ポリメラーゼリガーゼ連鎖反応、Gap-LCR、修復連鎖反応、3SR、NASBA、鎖置換増幅（SDA）、転写媒介増幅（TMA）およびQ増幅が挙げられる。PCRに基づく分析のための自動化されたシステムは、しばしば、同じ反応容器におけるPCRプロセス中の産物増幅のリアルタイム検出を利用する。そのような方法の重要な点は、レポーター基または標識を有する改変オリゴヌクレオチドの使用である。

【0009】

マラリアを検出するための信頼性が高く、迅速で、安価で、高感度の手段がないため、献血の安全性が脅かされている。したがって、血液などの生物学的サンプル中のマラリアの存在を検出および定量化するための迅速で信頼性が高く、特異的かつ高感度の方法が当技術分野で必要とされている。本開示は、血液サンプルおよび提供物中のマラリア原虫種（熱帯熱マラリア原虫（*P. falciparum*）、三日熱マラリア原虫（*P. vivax*）、卵形マラリア原虫（*P. ovale*）、サルマラリア原虫（*P. knowlesi*）、および四日熱マラリア原虫（*P. malariae*））を検出およびスクリーニングするためのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に基づくアッセイに関する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

マラリアを検出するための信頼性が高く、迅速で、安価で、高感度の手段がないため、献血の安全性が脅かされている。したがって、血液などの生物学的サンプル中のマラリアの存在を検出および定量化するための迅速で信頼性が高く、特異的かつ高感度の方法が当技術分野で必要とされている。本開示は、血液サンプルおよび提供物中のマラリア原虫種（熱帯熱マラリア原虫（*P. falciparum*）、三日熱マラリア原虫（*P. vivax*））を検出およびスクリーニングするための迅速で信頼性が高く、特異的かつ高感度の方法が当技術分野で必要とされている。本開示は、血液サンプルおよび提供物中のマラリア原虫種（熱帯熱マラリア原虫（*P. falciparum*）、三日熱マラリア原虫（*P. vivax*））を検出およびスクリーニングするための迅速で信頼性が高く、特異的かつ高感度の方法が当技術分野で必要とされている。

a x)、卵形マラリア原虫 (P . o v a l e)、サルマラリア原虫 (P . k n o w l e s i)、および四日熱マラリア原虫 (P . m a l a r i a e)) を検出およびスクリーニングするためのポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) に基づくアッセイに関する。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 1 】

本開示は、生物学的サンプルまたは非生物学的サンプル中のマラリア原虫 (プラスモジウムなど) の有無の迅速な検出、例えば、単一の試験管または容器内でのリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によるマラリア原虫 (プラスモジウムなど) の多重検出および定量的なための方法に関する。本明細書では、増幅工程およびハイブリダイズ工程を含み得る少なくとも1つのサイクリング工程を実施することを含む、マラリア原虫 (プラスモジウムなど) の検出方法が開示される。さらに、単一の試験管または容器内でマラリア原虫 (プラスモジウムなど) を検出するために設計されたオリゴヌクレオチドプライマー、オリゴヌクレオチドプローブおよびキットが提供される。

10

【 0 0 1 2 】

一態様は、サンプル中の1以上のマラリア原虫種を検出する方法であって、(a) 1 以上のマラリア原虫種の標的核酸がサンプル中に存在する場合、サンプルを1以上のプライマーのセットと接触させて増幅産物を産生することを含む増幅工程を実施する工程；(b) 1 以上のマラリア原虫種の標的核酸が前記サンプル中に存在する場合、1以上のプローブを増幅産物と接触させることを含むハイブリダイゼーション工程を実施する工程；および(c) 増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、増幅産物の存在がサンプル中の1以上のマラリア原虫種の存在を示し、増幅産物の非存在がサンプル中の1以上のマラリア原虫種の非存在を示す工程を含み；1以上プライマーのセットおよび1以上のプローブが、(1) 配列番号34、35、および36の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むプライマーを含むプライマーのセットと；配列番号4の核酸配列もしくはその相補体を含むプローブとを含み；および/または(2) 配列番号56および57の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むプライマーを含むプライマーのセットと、配列番号58の核酸配列もしくはその相補体を含むプローブとを含む、方法に関する。別の実施形態では、1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブは、(1) 配列番号34、35、および36の核酸配列、もしくはそれらの相補体を含むプライマーを含むプライマーのセットと、配列番号4の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含み；(2) 配列番号56および57の核酸配列またはそれらの相補体を含むプライマーを含むプライマーのセットと、配列番号58の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含む。別の実施形態では、1以上のマラリア原虫種はプラスモジウム属に属する。別の実施形態では、プラスモジウム属に属する1以上のマラリア原虫種は、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、および/またはサルマラリア原虫である。一実施形態では、サンプルは、生物学的サンプルである。別の実施形態では、生物学的サンプルは、生物学的サンプルが、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染症である。他の実施形態では、生物学的サンプルは全血である。別の実施形態では、1以上のプローブは標識されている。別の実施形態では、1以上のプローブは、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分で標識されている。工程(c) は、1以上のプローブのドナー蛍光部分と前記アクセプター部分との間の蛍光共鳴エネルギー移動 (F R E T) の存在または非存在を検出することをさらに含み、蛍光の存在または非存在は、サンプル中の1以上のマラリア原虫種の存在または非存在を示す。

20

30

40

【 0 0 1 3 】

別の態様は、サンプル中の1以上のマラリア原虫種の第1の標的核酸および/または第2の標的核酸を検出する方法であって、(a) 1 以上のマラリア原虫種の第1の標的核酸および/または第2の標的核酸がサンプル中に存在する場合、サンプルを1以上のプライマーのセットと接触させて増幅産物を産生することを含む増幅工程を実施する工程；(b) 1 以上のマラリア原虫種の第1の標的核酸および/または第2の標的核酸がサ

50

ンプル中に存在する場合、1以上のプローブを増幅産物と接触させることを含むハイブリダイゼーション工程を実施する工程；および（c）増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、増幅産物の存在が、前記サンプル中の前記1以上のマラリア原虫種の存在を示し、増幅産物の非存在が、サンプル中の前記1つまたは複数のマラリア原虫種の非存在を示す工程を含み；1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブが、（1）1以上のマラリア原虫種の第1の標的核酸に対する、プライマーのセットおよびプローブ（プライマーのセットが、配列番号34、35および36の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むプライマーを含み、プローブが、配列番号4の核酸配列もしくはその相補体）と；（2）1以上のマラリア原虫種の第2の標的核酸に対する、プライマーのセットおよびプローブ（プライマーのセットが、配列番号56および57の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むプライマーを含み、プローブが、配列番号58の核酸配列もしくはその相補体を含む）とを含む、方法に関する。別の態様は、サンプル中の1以上のマラリア原虫種を検出する方法であって、（a）1以上のマラリア原虫種の標的核酸がサンプル中に存在する場合、サンプルを1以上のプライマーのセットと接触させて増幅産物を産生することを含む増幅工程を実施する工程；（b）1以上のマラリア原虫種の標的核酸がサンプル中に存在する場合、1以上のプローブを増幅産物と接触させることを含むハイブリダイゼーション工程を実施する工程；（c）増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、増幅産物の存在がサンプル中の1以上のマラリア原虫種の存在を示し、増幅産物の非存在がサンプル中の1以上のマラリア原虫種の非存在を示す工程を含み；1以上のプライマーのセットおよび1以上のプライマーが、配列番号34、35および36の核酸配列またはそれらの相補体を含むプライマーのセットと、配列番号4の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含む、方法に関する。別の態様は、サンプル中の1以上のマラリア原虫種を検出する方法であって、（a）1以上のマラリア原虫種の標的核酸がサンプル中に存在する場合、サンプルを1以上のプライマーのセットと接触させて増幅産物を産生することを含む増幅工程を実施する工程；（b）1以上のマラリア原虫種の標的核酸がサンプル中に存在する場合、1以上のプローブを増幅産物と接触させることを含むハイブリダイゼーション工程を実施する工程；（c）増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、増幅産物の存在がサンプル中の1以上のマラリア原虫種の存在を示し、増幅産物の非存在がサンプル中の1以上のマラリア原虫種の非存在を示す工程を含み；プライマーの1以上のセットおよび1以上のプライマーが、配列番号56および57の核酸配列またはそれらの相補体を含むプライマーのセットと、配列番号58の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含む、方法に関する。関連する実施形態では、1以上のマラリア原虫種はプラスモジウム属に属する。別の実施形態では、プラスモジウム属に属する1以上のマラリア原虫種は、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、および/またはサルマラリア原虫である。一実施形態では、サンプルは、生物学的サンプルである。別の実施形態では、生物学的サンプルは、生物学的サンプルが、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染症である。他の実施形態では、生物学的サンプルは全血である。別の実施形態では、1以上のプローブは標識されている。別の実施形態では、前記1以上のプローブは、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分で標識されている。

【0014】

別の態様は、サンプル中に存在し得る1以上のマラリア原虫種を検出するためのキットであって、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー（例えば、ヌクレオシド三リン酸）、ならびに1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブを含む増幅試薬を含み、1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブが、（1）配列番号34、35、および36の核酸配列またはそれらの相補体を含むプライマーを含むプライマーのセットと、配列番号4の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含み；および/または（2）配列番号56および57の核酸配列またはその相補体を含むプライマーを含むプライマーのセットと、配列番号58の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含む。別

の実施形態では、1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブは、(1)配列番号34、35、および36の核酸配列、もしくはそれらの相補体を含むプライマーを含むプライマーのセットと、配列番号4の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含み；(2)配列番号56および57の核酸配列またはそれらの相補体を含むプライマーを含むプライマーのセットと、配列番号58の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含む。別の実施形態では、1以上のマラリア原虫種はプラスモジウム属に属する。別の実施形態では、プラスモジウム属に属する1以上のマラリア原虫種は、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、および/またはサルマラリア原虫である。一実施形態では、サンプルは、生物学的サンプルである。別の実施形態では、生物学的サンプルは、生物学的サンプルが、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染症である。他の実施形態では、生物学的サンプルは全血である。別の実施形態では、1以上のプローブは標識されている。別の実施形態では、前記1以上のプローブは、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分で標識されている。別の態様は、サンプル中に存在し得る、1以上のマラリア原虫種の第1の標的核酸および/または第2の標的核酸を検出するためのキットであって、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー(例えば、ヌクレオシド三リン酸)、ならびに1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブを含む増幅試薬を含み、1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブが、(1)1以上のマラリア原虫種の第1の標的核酸に対する、プライマーのセットおよびプローブ(プライマーのセットが、配列番号34、35および36の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むプライマーを含み、プローブが、配列番号4の核酸配列もしくはその相補体)と；(2)1以上のマラリア原虫種の第2の標的核酸に対する、プライマーのセットおよびプローブ(プライマーのセットが、配列番号56および57の核酸配列もしくはそれらの相補体を含むプライマーを含み、プローブが、配列番号58の核酸配列もしくはその相補体を含む)とを含む、キットに関する。別の態様は、サンプル中に存在し得る1以上のマラリア原虫種を検出するためのキットであって、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー(例えば、ヌクレオシド三リン酸)、ならびに1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブを含む増幅試薬を含み、1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブが、配列番号34、35、および36の核酸配列またはそれらの相補体を含むプライマーを含むプライマーのセットと、配列番号4の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含む、キットに関する。別の態様は、サンプル中に存在し得る1以上のマラリア原虫種を検出するためのキットであって、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー(例えば、ヌクレオシド三リン酸)、ならびに1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブを含む増幅試薬を含み、1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブが、配列番号56および57の核酸配列またはそれらの相補体を含むプライマーを含むプライマーのセットと、配列番号58の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含む、キットに関する。別の実施形態では、1以上のマラリア原虫種はプラスモジウム属に属する。別の実施形態では、プラスモジウム属に属する1以上のマラリア原虫種は、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、および/またはサルマラリア原虫である。一実施形態では、サンプルは、生物学的サンプルである。別の実施形態では、生物学的サンプルは、生物学的サンプルが、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染症である。他の実施形態では、生物学的サンプルは全血である。別の実施形態では、1以上のプローブは標識されている。別の実施形態では、前記1以上のプローブは、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分で標識されている。

【0015】

一態様では、サンプル中のマラリア原虫を検出する方法であって、マラリア原虫の標的核酸がサンプル中に存在する場合、サンプルを1以上のプライマーのセットと接触させて増幅産物を産生することを含ま増幅工程を実施する工程；(b)マラリア原虫の標的核酸がサンプル中に存在する場合、1以上プローブを増幅産物と接触させることを含むハイブ

リダイゼーション工程を実施する工程；（c）増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、増幅産物の存在がサンプル中のマラリア原虫の存在を示し、増幅産物の非存在がサンプル中のマラリア原虫の非存在を示す工程を含み；1以上のプライマーのセットおよび前記1以上のプローブが、（1）配列番号34の核酸配列またはその相補体を含む第1のプライマーと、配列番号36の核酸配列またはその相補体を含む第2のプライマーを含むプライマーのセット、ならびに配列番号4の核酸配列またはその相補体を含むプローブを含み；および/または（2）配列番号22の核酸配列またはその相補体を含む第1のプライマーと、配列番号27の核酸配列またはその相補体を含む第2のプライマーとを含むプライマーのセット；ならびに配列番号25の核酸配列またはその相補体を含むプローブを含み、方法が提供される。一実施形態では、マラリア原虫はプラスモジウム属に属する。別の実施形態では、プラスモジウム属に属するマラリア原虫は、熱帯熱マラリア原虫である。一実施形態では、サンプルは、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染症などの生物学的サンプルである。一実施形態では、生物学的サンプルは全血である。別の実施形態では、1以上のプローブは標識されている。別の実施形態では、1つ以上のプローブは、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分で標識されている。別の実施形態では、工程（c）は、1以上のプローブのドナー蛍光部分とアクセプター部分との間の蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の存在または非存在を検出することをさらに含み、蛍光の存在または非存在は、サンプル中のマラリア原虫の存在または非存在を示す。

10

【0016】

20

一態様では、サンプル中のマラリア原虫の第1の標的核酸および第2の標的核酸を検出する方法であって、（a）マラリア原虫の第1の標的核酸および/または第2の標的核酸がサンプル中に存在する場合、サンプルを1以上のプライマーのセットと接触させて増幅産物を産生することを含む増幅工程を実施する工程；（b）マラリア原虫の第1の標的核酸および/または第2の標的核酸がサンプル中に存在する場合、1以上のプローブを増幅産物と接触させることを含むハイブリダイゼーション工程を実施する工程；および（c）増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、増幅産物の存在がサンプル中のマラリア原虫の存在を示し、増幅産物の非存在がサンプル中のマラリア原虫の非存在を示す工程を含み；1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブが、（1）マラリア原虫の第1の標的核酸に対する、プライマーのセットおよびプローブ（プライマーのセットが、配列番号34の核酸配列またはその相補体を含む第1のプライマーと、配列番号36の核酸配列またはその相補体を含む第2のプライマーとを含むプライマーのセットを含み、プローブが、配列番号4の前記核酸配列またはその相補体を含む）、および/または（2）マラリア原虫の第2の標的核酸に対する、プライマーのセットおよびプローブ（プライマーのセットが、配列番号22の核酸配列またはその相補体を含む第1のプライマーと、配列番号27の核酸配列またはその相補体を含む第2のプライマーとを含むプライマーのセットを含み、プローブが、配列番号25の前記核酸配列またはその相補体を含む）を含む、方法が提供される。本発明の別の態様は、サンプル中のマラリア原虫を検出する方法であって、（a）マラリア原虫の標的核酸がサンプル中に存在する場合、サンプルを1以上のプライマーのセットと接触させて増幅産物を産生することを含む増幅工程を実施する工程；（b）マラリア原虫の標的核酸がサンプル中に存在する場合、1以上のプローブを増幅産物と接触させることを含むハイブリダイゼーション工程を実施する工程；および（c）増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、増幅産物の存在がサンプル中のマラリア原虫の存在を示し、増幅産物の非存在がサンプル中のマラリア原虫の非存在を示す工程を含み；1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブが、配列番号34の核酸配列またはその相補体を含む第1のプライマー、および配列番号36の核酸配列またはその相補体を含む第2のプライマーを含むプライマーのセットと；配列番号4の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含む、方法に関する。本発明の別の態様は、サンプル中のマラリア原虫を検出する方法であって、（a）マラリア原虫の標的核酸がサンプル中に存在する場合、サンプルを1以上のプライマーのセットと接触させて増幅産物

30

40

50

を産生することを含む増幅工程を実施する工程；(b)マラリア原虫の標的核酸がサンプル中に存在する場合、1以上のプローブを増幅産物と接触させることを含むハイブリダイゼーション工程を実施する工程；および(c)増幅産物の存在または非存在を検出する工程であって、増幅産物の存在がサンプル中のマラリア原虫の存在を示し、増幅産物の非存在がサンプル中のマラリア原虫の非存在を示す工程を含み；1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブが、配列番号22の核酸配列またはその相補体を含む第1のプライマー、および配列番号27の核酸配列またはその相補体を含む第2のプライマーを含むプライマーのセットと；配列番号25の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含む、方法に関する。関連する実施形態では、マラリア原虫はプラスモジウム属に属する。別の実施形態では、プラスモジウム属に属するマラリア原虫は、熱帯熱マラリア原虫である。一実施形態では、サンプルは、生物学的サンプルである。関連する実施形態では、サンプルは、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染症などの生物学的サンプルである。他の実施形態では、生物学的サンプルは全血である。一実施形態では、1以上のプローブは標識されている。別の実施形態では、1つ以上のプローブは、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分で標識されている。

10

【0017】

一態様では、サンプル中に存在し得るマラリア原虫を検出するためのキットであって、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー（例えば、ヌクレオシド三リン酸）、ならびに1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブを含む増幅試薬を含み、1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブが、(1)配列番号34の核酸配列もしくはその相補体を含む第1のプライマー、および配列番号36の核酸配列もしくはその相補体を含む第2のプライマーを含むプライマーのセット；ならびに配列番号4の核酸配列またはその相補体を含むプローブを含み；および/または(2)配列番号22の核酸配列もしくはその相補体を含む第1のプライマー、および配列番号27の核酸配列もしくはその相補体を含む第2のプライマーを含むプライマーのセット；ならびに配列番号25の核酸配列またはその相補体を含むプローブを含む、キットが提供される。関連する実施形態では、マラリア原虫はプラスモジウム属に属する。別の実施形態では、プラスモジウム属に属するマラリア原虫は、熱帯熱マラリア原虫である。一実施形態において、サンプルは、生物学的サンプルである。別の実施形態では、生物学的サンプルは、生物学的サンプルが、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染症である。他の実施形態では、生物学的サンプルは全血である。一実施形態では、1以上のプローブは標識されている。別の実施形態では、1つ以上のプローブは、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分で標識されている。

20

30

【0018】

一態様では、サンプル中に存在し得るマラリア原虫の第1の標的核酸および/または第2の標的核酸を検出するためのキットであって、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー（例えば、ヌクレオシド三リン酸）、ならびに1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブを含む増幅試薬を含み、1以上のプライマーのセットおよび1つ以上のプローブが、(1)マラリア原虫の第1の標的核酸に対する、プライマーのセットおよびプローブ（プライマーのセットが、列番号34の核酸配列またはその相補体を含む第1のプライマーと、配列番号36の核酸配列またはその相補体を含む第2のプライマーとを含むプライマーのセットを含み、プローブが、配列番号4の前記核酸配列またはその相補体を含む）、および/またはマラリア原虫の第2の標的核酸に対する、プライマーのセットおよびプローブ（プライマーのセットが、配列番号22の核酸配列またはその相補体を含む第1のプライマーと、配列番号27の核酸配列またはその相補体を含む第2のプライマーとを含み、プローブが、配列番号25の前記核酸配列またはその相補体を含む）を含む、キットが提供される。別の態様は、サンプル中に存在し得るマラリア原虫を検出するためのキットであって、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー（例えば、ヌクレオシド

40

50

三リン酸)、ならびに1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブを含む増幅試薬を含み、1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブが、配列番号34の核酸配列またはその相補体を含む第1のプライマーと、配列番号36の核酸配列またはその相補体を含む第2のプライマーとを含み、ならびにプローブが、配列番号4の前記核酸配列またはその相補体を含むプローブを含む、キットに関する。別の態様は、サンプル中に存在し得るマラリア原虫を検出するためのキットであって、DNAポリメラーゼ、ヌクレオチドモノマー(例えば、ヌクレオシド三リン酸)、ならびに1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブを含む増幅試薬を含み、1以上のプライマーのセットおよび1以上のプローブが、配列番号22の核酸配列またはその相補体を含む第1のプライマーと、配列番号27の核酸配列またはその相補体を含む第2のプライマーとを含み、配列番号25の核酸配列またはその相補体を含むプローブとを含む、キットに関する。関連する実施形態では、マラリア原虫はプラスモジウム属に属する。別の実施形態では、プラスモジウム属に属するマラリア原虫は、熱帯熱マラリア原虫である。一実施形態において、サンプルは、生物学的サンプルである。別の実施形態では、生物学的サンプルは、生物学的サンプルが、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚または軟部組織感染症である。一実施形態では、生物学的サンプルは全血である。別の実施形態では、1以上のプローブは標識されている。別の実施形態では、1つ以上のプローブは、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター部分で標識されている。

10

20

30

40

【0019】

他の態様における開示はまた、配列番号1~58から選択されるヌクレオチドの配列またはその相補体を含むかまたはそれらからなるオリゴヌクレオチドであって、100個以下のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを提供する。本明細書において、本開示は、配列番号1~58の1つと少なくとも70%の配列同一性(例えば、少なくとも75%、80%、85%、90%または95%など)を有する核酸またはその相補体を含むオリゴヌクレオチドであって、100以下のヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを提供する。一般に、これらのオリゴヌクレオチドは、プライマー核酸、プローブ核酸などであり得る。特定の態様では、オリゴヌクレオチドは、40個以下のヌクレオチド(例えば、35個以下のヌクレオチド、30個以下のヌクレオチド、25個以下のヌクレオチド、20個以下のヌクレオチド、15個以下のヌクレオチドなど)を有する。いくつかの態様では、オリゴヌクレオチドは、例えば、非改変ヌクレオチドと比較して核酸ハイブリダイゼーション安定性を変化させるために、少なくとも1つの改変ヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、任意に少なくとも1つの標識および/または任意に少なくとも1つのクエンチャー部分を含む。いくつかの態様では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの保存的に改変された変異を含む。特定の核酸配列の「保存的に改変された変異」もしくは単に「保存的変異」とは、同一もしくは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸、もしくは核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。当技術分野の当業者であれば、コードされた配列中の単一のヌクレオチドまたは低いパーセント比率のヌクレオチド(典型的には5%未満、より典型的には4%、2%または1%未満)を変更、付加または欠失させる個々の置換、欠失または付加は、改変がアミノ酸の欠失、アミノ酸の付加、または化学的に類似したアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす「保存的に改変された変異」であることを認識するであろう。

【0020】

一態様には、増幅は、5'から3'へのヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ酵素を使用し得る。したがって、ドナー蛍光部分およびアクセプター部分、例えば、クエンチャーは、プローブの長さに沿って互いに5~20ヌクレオチド(例えば、7または10ヌクレオチド)以内であり得る。別の態様では、プローブは、二次構造の形成を可能にする核酸配列を含む。そのような二次構造の形成は、第1の蛍光部分と第2の蛍光部分との間の空間的近接をもたらし得る。この方法によれば、プローブ上の第2の蛍光部分はクエンチャーであり得る。

50

【0021】

本開示はまた、個体からの生物学的サンプル中のマラリア原虫（プラスモジウムなど）またはマラリア原虫（プラスモジウムなど）核酸の存在または非存在を検出する方法を提供する。これらの方法は、血液スクリーニングおよび診断試験に使用するために、血漿中のマラリア原虫（プラスモジウムなど）核酸の存在または非存在を検出するために使用し得る。さらに、マラリア原虫（プラスモジウムなど）核酸を検出および/または定量するために尿および他の種類のサンプルを評価するために当業者が同じ試験を使用してもよい。そのような方法は、一般に、増幅工程および色素結合工程を含む少なくとも1つのサイクリング工程を実施することを含む。典型的には、増幅工程は、核酸分子がサンプル中に存在する場合に1つ以上の増幅産物を生成する複数対のオリゴヌクレオチドプライマーとサンプルを接触させることを含み、色素結合工程は、増幅産物を二本鎖DNA結合色素と接触させることを含み、そのような方法はまた、増幅産物への二本鎖DNA結合色素の結合の存在または非存在を検出することを含み、結合の存在はサンプル中のマラリア原虫（プラスモジウムなど）核酸の存在を示し、結合の非存在はサンプル中のマラリア原虫核酸の非存在を示す。代表的な二本鎖DNA結合色素は、臭化エチジウムである。他の核酸結合色素としては、DAPI、Hoechst色素、PicoGreen（登録商標）、RiboGreen（登録商標）、OliGreen（登録商標）、およびシアニン色素、例えばYO-YO（登録商標）およびSYBR Greenが挙げられる。さらに、そのような方法はまた、増幅産物と二本鎖DNA結合色素との間の融解温度を測定することを含み得、融解温度によりマラリア原虫（プラスモジウムを含む）核酸の存在または非存在が確認される。

10

20

【0022】

さらなる態様では、マラリア原虫（プラスモジウムなど）の1以上の核酸を検出および/または定量するためのキットが提供される。キットは、遺伝子標的の増幅に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの1以上のセット；および増幅産物の検出に特異的な1以上の検出可能なオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。

【0023】

一態様では、キットは、ドナーおよび対応するアクセプター部分、例えば、他の蛍光部分または暗色クエンチャーで既に標識されているプローブを含み得、またはプローブを標識するためのフルオロフォア部分を含み得る。キットはまた、ヌクレオシド三リン酸、核酸ポリメラーゼおよび核酸ポリメラーゼの機能に必要な緩衝液をさらに含み得る。キットはまた、添付文書、ならびにサンプル中のマラリア原虫（プラスモジウムなど）核酸の存在または非存在を検出するためのプライマー、プローブおよび蛍光色素部分を使用するための説明書を含み得る。

30

【0024】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または同等の方法および材料が本主題の実施または試験で使用され得るが、好適な方法および材料が以下に記載される。加えて、材料、方法、および実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照によりその全体が援用される。矛盾する場合は、定義をも含む本明細書が優先する。

40

【0025】

本発明の1つ以上の実施形態の詳細は、添付の図面および以下の説明に示されている。本発明の他の特徴、目的および利点は、図面および発明を実施するための形態、ならびに特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0026】

特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面を含む本特許または特許出願公開の写しは、請求に応じて、必要な手数料を支払うことにより、特許庁によって提供されることになる。

50

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、蚊における有性生殖とヒト宿主における無性生殖との間で寄生生物が交互に繰り返される、複雑な生活環プラスモジウムの図を示す（CDCウェブサイト（<https://www.cdc.gov/malaria>から改変））。

【0028】

【図2A】図2Aは、18S-1標的（配列番号1および2の核酸配列を有するプライマー、ならびに配列番号3の核酸配列を有するプローブによる）のデータを示す。

【0029】

【図2B】図2Bは、18S-3標的（配列番号5および6の核酸配列を有するプライマー、ならびに配列番号7の核酸配列を有するプローブによる）のデータを示す。

10

【0030】

【図2C】図2Cは、18S-4標的（配列番号8および9の核酸配列を有するプライマー、ならびに配列番号10の核酸配列を有するプローブによる）のデータを示す。

【0031】

【図2D】図2Dは、MT-1標的（配列番号16および17の核酸配列を有するプライマー、ならびに配列番号18の核酸配列を有するプローブによる）のデータを示す。

【0032】

【図2E】図2Eは、MT-2標的（配列番号11および12の核酸配列を有するプライマー、ならびに配列番号15の核酸配列を有するプローブによる）のデータを示す。

20

【0033】

【図2F】図2Fは、R125標的（配列番号21および22の核酸配列を有するプライマー、ならびに配列番号23の核酸配列を有するプローブによる）のデータを示す。

【0034】

【図3】図3は、 $1:10^5$ 希釈レベルでの溶出液についての実施例1からのデータを示す。

【0035】

【図4】図4は、実施例1に記載されているように、再設計されたプローブ（配列番号4）を使用した18S-1標的に対する熱帯熱マラリア原虫培養物から熱帯熱マラリア原虫を使用したプラスモジウムアッセイのリアルタイムPCR増幅曲線を示す。元の18S-1プローブ（配列番号3）を使用した曲線を青色で示し、再設計された18S-1プローブ（配列番号4）を使用した曲線を赤色で示す。使用される全てのプライマーは、配列番号1および2の核酸配列を有する。

30

【0036】

【図5】図5は、熱帯熱マラリア原虫培養物のddPCRの結果を示す。結果は、熱帯熱マラリア原虫培養物の $1:10^5$ 培養希釈物のコピー数（ μl あたり）を示す。18S-1標的に対する試験では、配列番号1および2の核酸配列を有するプライマーと、配列番号37の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-3標的に対する試験では、配列番号5および6の核酸配列を有するプライマーと、配列番号38の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-4標的に対する試験では、配列番号8および9の核酸配列を有するプライマーと、配列番号39の核酸配列を有するプローブとを用いた。MT-1標的に対する試験では、配列番号16および17の核酸配列を有するプライマーと、配列番号42の核酸配列を有するプローブとを用いた。MT-2標的に対する試験では、配列番号11および12の核酸配列を有するプライマーと、配列番号41の核酸配列を有するプローブとを用いた。R125標的に対する試験では、配列番号21および22の核酸配列を有するプライマーと、配列番号40の核酸配列を有するプローブとを用いた。

40

【0037】

【図6A】図6Aは、18S-1および18S-4標的に対するプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックスアッセイからのデータを示す。

【0038】

50

【図 6 B】図 6 B は、18S - 1 および 18S - 4 標的に対するプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックスアッセイからのリアルタイム PCR 増幅曲線を示す。18S - 1 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 1 および 2 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 4 の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S - 4 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 8 および 9 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 10 の核酸配列を有するプローブとを用いた。

【0039】

【図 7 A】図 7 A は、500 ng の全血ゲノム DNA のバックグラウンドにおいて、4 つの異なる希釈レベル (1 : 10⁴、1 : 10⁵、1 : 10⁶、1 : 10⁷) で熱帯熱マラリア原虫培養物からの熱帯熱マラリア原虫を使用した、18S - 1 および R125 標的に対するプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックスアッセイからのデータを示す。

10

【0040】

【図 7 B】図 7 B は、18S - 1 および R125 標的に対するプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックスアッセイからのリアルタイム PCR 増幅曲線を示す。18S - 1 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 1 および 2 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 4 の核酸配列を有するプローブとを用いた。R125 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 21 および 22 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 25 の核酸配列を有するプローブとを用いた。

【0041】

20

【図 8】図 8 は、500 ng の全血ゲノム DNA のバックグラウンドにおいて、5 つの異なるレベル (10⁵、10⁴、10³、10² および 10 コピー) の 18S - 1 および R125 標的のインビトロ転写物を使用した、18S - 1 および R125 標的に対するプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックスアッセイからのデータを示す。18S - 1 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 1 および 2 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 4 の核酸配列を有するプローブとを用いた。R125 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 21 および 22 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 25 の核酸配列を有するプローブとを用いた。

【0042】

【図 9】図 9 は、500 ng の全血ゲノム DNA / RNA のバックグラウンドにおいて、R125 標的のインビトロ転写物 (10³ コピー) を増幅および検出するためのプライマー (配列番号 22 および 26) およびプローブ (配列番号 25) を使用したシングルプレックスアッセイからのリアルタイム PCR 増幅曲線を示す。フォワードプライマーは配列番号 26 の核酸配列を有し、リバースプライマーは配列番号 22 の核酸配列を有し、プローブは配列番号 25 の核酸配列を有する。

30

【0043】

【図 10 A】図 10 A は、cobas 6800 装置で抽出された全血核酸のバックグラウンドにおいて、4 つの異なる希釈レベル (1 : 10⁴、1 : 10⁵、1 : 10⁶、1 : 10⁷) で熱帯熱マラリア原虫培養物からの熱帯熱マラリア原虫を使用した、18S - 1 および R125 標的に対するプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックスアッセイからのデータを示す。

40

【0044】

【図 10 B】図 10 B は、18S - 1 および R125 標的に対するプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックスアッセイからのリアルタイム PCR 増幅曲線を示す。18S - 1 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 34 および 36 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 4 の核酸配列を有するプローブとを用いた。R125 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 27 および 22 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 25 の核酸配列を有するプローブとを用いた。

【0045】

【図 11】図 11 は、cobas 6800 機器で抽出された全血核酸のバックグラウンド

50

において、2つの異なる希釈レベル（ $1:10^4$ および $1:10^5$ ）で熱帯熱マラリア原虫培養物からの熱帯熱マラリア原虫を使用した、18S-1および18S-3標的に対するプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックスアッセイからのリアルタイムPCR増幅曲線を示す。18S-1標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号34～36の核酸配列を有するプライマーと、配列番号4の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-3標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号56および57の核酸配列を有するプライマーと、配列番号58の核酸配列を有するプローブとを用いた。

【0046】

【図12】図12は、cobas 6800機器で抽出された全血核酸のバックグラウンドにおいて、2つの異なる希釈レベル（ $1:10^3$ および $1:10^4$ ）で三日熱マラリア原虫培養物からの三日熱マラリア原虫を使用した、18S-1および18S-3標的に対するプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックスアッセイからのリアルタイムPCR増幅曲線を示す。18S-1標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号34～36の核酸配列を有するプライマーと、配列番号4の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-3標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号56および57の核酸配列を有するプライマーと、配列番号58の核酸配列を有するプローブとを用いた。

10

【0047】

【図13】図13は、PCR反応レベル当たり1000コピーのサルマラリア原虫18S rRNA配列を含有するDNAプラスミドを使用した、18S-1および18S-3標的に対するプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックスアッセイからのリアルタイムPCR増幅曲線を示す。18S-1標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号34～36の核酸配列を有するプライマーと、配列番号4の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-3標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号56および57の核酸配列を有するプライマーと、配列番号58の核酸配列を有するプローブとを用いた。

20

【0048】

【図14】図14は、PCR反応レベル当たり1000コピーの四日熱マラリア原虫18S rRNA配列を含むDNAプラスミドを使用した、18S-1および18S-3標的に対するプライマーおよびプローブを用いたマルチプレックスアッセイからのリアルタイムPCR増幅曲線を示す。18S-1標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号34～36の核酸配列を有するプライマーと、配列番号4の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-3標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号56および57の核酸配列を有するプライマーと、配列番号58の核酸配列を有するプローブとを用いた。

30

【0049】

【図15】図15は、PCR反応レベル当たり1000コピーの卵形マラリア原虫18S rRNA配列を含むDNAプラスミドを使用した、18S-1および18S-3標的に対するプライマーおよびプローブを使用したマルチプレックスアッセイからのリアルタイムPCR増幅曲線を示す。18S-1標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号34～36の核酸配列を有するプライマーと、配列番号4の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-3標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号56および57の核酸配列を有するプライマーと、配列番号58の核酸配列を有するプローブとを用いた。

40

【発明を実施するための形態】

【0050】

核酸増幅によるマラリア原虫（プラスモジウムなど）感染の診断により、マラリア原虫（プラスモジウムなど）感染を迅速、正確、確実、特異的、かつ感度よく検出および/または定量する方法が提供される。非生物学的または生物学的サンプル中のDNAおよび/

50

またはRNAを含むマラリア原虫核酸を検出および/または定量するためのリアルタイムPCRアッセイを本明細書に記載する。マラリア原虫(プラスモジウムなど)を検出および/または定量するためのプライマーおよびプローブが提供され、そのようなプライマーおよびプローブを含有する製造品またはキットも提供される。他の方法と比較したマラリア原虫(プラスモジウムなど)の検出のためのリアルタイムPCRの特異性および感度の増大、ならびにサンプルの封じ込め、増幅産物のリアルタイム検出および定量化を含むリアルタイムPCRの改善された特徴により、臨床検査室におけるマラリア原虫(プラスモジウムなど)感染の日常的な診断のためのこの技術の実施が実現可能になる。さらに、この技術は、血液スクリーニングならびに予後診断に使用し得る。このマラリア原虫(プラスモジウムなど)検出アッセイは、また、他の核酸、例えば、他の細菌および/またはウイルスの検出のための他のアッセイと並行して多重化し得る。

10

【0051】

本開示は、例えば、TaqMan(登録商標)増幅および検出技術を用いてマラリア原虫(プラスモジウムなど)を特異的に同定するために、マラリア原虫(プラスモジウムなど)ゲノムにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーおよび蛍光標識加水分解プローブを含む。

【0052】

開示される方法は、1以上のプライマー対を使用してサンプルからの核酸分子遺伝子標的の1以上の部分を増幅することを含む、少なくとも1つのサイクリング工程を実施することを含み得る。本明細書で使用される「プラスモジウムプライマー」は、マラリア原虫(プラスモジウムなど)ゲノムに見られる核酸配列に特異的にアニーリングし、それぞれの増幅産物を産生する適切な条件下でそこからDNA合成を開始するオリゴヌクレオチドプライマーを指す。プラスモジウム種およびゲノムに見られる核酸配列の例としては、ミトコンドリアDNA標的領域(MT-1およびMT-2)内の核酸、RNA反復配列R125および18SリボソームRNAなどの標的が挙げられる。論じられるプラスモジウムプライマーのそれぞれは、各増幅産物の少なくとも一部が標的に対応する核酸配列を含むように標的にアニーリングする。1以上の増幅産物は、1以上の核酸がサンプル中に存在し、したがって1以上の増幅産物の存在がサンプル中のプラスモジウムの存在を示すことを条件として産生される。増幅産物は、プラスモジウムに対する1以上の検出可能なプローブに相補的な核酸配列を含有すべきである。本明細書で使用される場合、「プラスモジウムプローブ」は、プラスモジウムゲノムに見られる核酸配列に特異的にアニーリングするオリゴヌクレオチドプローブを指す。各サイクリング工程は、増幅工程、ハイブリダイゼーション工程および検出工程を含み、サンプル中のプラスモジウムの存在または非存在を検出するために、サンプルを1以上の検出可能なプラスモジウムプローブと接触させる。

20

30

【0053】

本明細書で使用される場合、「増幅する」という用語は、鋳型核酸分子の一方または両方の鎖に相補的な核酸分子、(例えば、プラスモジウムゲノムからの核酸分子)を合成するプロセスを指す。核酸分子を増幅することは、典型的には、テンプレート核酸を変性すること、プライマーの融解温度未満の温度でプライマーをテンプレート核酸にアニーリングすること、および増幅産物を生成するためにプライマーから酵素的に伸長することを含む。増幅には、典型的には、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、DNAポリメラーゼ酵素(例えば、Platinum(登録商標)Taq)ならびにポリメラーゼ酵素の最適な活性のための適切な緩衝液および/または補因子(例えば、MgCl₂および/またはKCl)の存在が必要である。

40

【0054】

本明細書で使用される「プライマー」という用語は、当業者に知られており、オリゴマー化合物、主にオリゴヌクレオチドを指すが、鋳型依存性DNAポリメラーゼによるDNA合成を「プライミング」し得る改変オリゴヌクレオチドも指しており、すなわち、例えばオリゴヌクレオチドの3'末端が遊離3'-OH基を提供し、そこに、3'から5'への

50

スホジエステル結合を確立する鋳型依存性DNAポリメラーゼによってさらに「ヌクレオチド」が結合され得て、それによってデオキシヌクレオシド三リン酸が使用され、それによってピロリン酸が放出される。

【0055】

「ハイブリダイズする」という用語は、増幅産物への1つ以上のプローブのアニールングを指す。「ハイブリダイゼーション条件」は、典型的には、プローブの融解温度より低い、プローブの非特異的ハイブリダイゼーションを回避する温度を含む。

【0056】

「5'から3'へのヌクレアーゼ活性」という用語は、典型的には核酸鎖合成に関連し、それによってヌクレオチドが核酸鎖の5'末端から除去される核酸ポリメラーゼの活性を指す。

10

【0057】

「熱安定性ポリメラーゼ」という用語は、熱安定性であるポリメラーゼ酵素を指し、すなわち、該酵素は、鋳型に相補的なプライマー伸長産物の形成を触媒し、二本鎖鋳型核酸の変性をもたらすのに必要な時間にわたり高温に曝された場合、不可逆的には変性しない。一般に、合成は各プライマーの3'末端で開始され、テンプレート鎖に沿って5'から3'方向へ進行する。熱安定性ポリメラーゼは、例えば、サーマス・サーモフィルス(Thermus flavus)、T.ルーバー(T. ruber)、T.サーモフィルス(T. thermophilus)、T.アクアティカス(T. aquaticus)、T.ラクテウス(T. lacteus)、T.ルベンス(T. rubens)、バチルス・ステアロテルモフィルス(Bacillus stearothermophilus)、およびメタノサーマス・フェルビダス(Methanothermobacter feravidus)から単離されている。それにもかかわらず、必要に応じて酵素が補充されるならば、熱安定性でないポリメラーゼをPCRアッセイに用いることもできる。

20

【0058】

「その相補体」という用語は、所与の核酸と同じ長さであり、正確に相補的である核酸を指す。

【0059】

核酸に関して使用される場合の「伸長」または「延長」という用語は、追加のヌクレオチド(または他の類似の分子)が核酸に組み込まれる場合を指す。例えば、核酸は、ヌクレオチドを取り込む生体触媒によって、例えば、典型的には核酸の3'末端にヌクレオチドを付加するポリメラーゼによって、任意に伸長される。

30

【0060】

2以上の核酸配列の文脈における「同一」または「同一性」パーセントという用語は、例えば、当業者に利用可能な配列比較アルゴリズムの1つを使用してまたは目視検査によって測定して最大の一致に関して比較およびアラインメントした場合に、同一または特定パーセンテージの同一ヌクレオチドを有する2以上の配列または部分配列を指す。パーセント配列同一性および配列類似性の決定に適した例示的なアルゴリズムは、BLASTプログラムであり、例えば、例えば、Altschulら.(1990) "Basic local alignment search tool" J. Mol. Biol. 215: 403 - 410, Gishら.(1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search" Nature Genet. 3: 266 - 272, Maddenら.(1996) "Applications of network BLAST server" Meth. Enzymol. 266: 131 - 141, Altschulら.(1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402, およびZhangら.(1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or aut

40

50

omated sequence analysis and annotation” Genome Res. 7: 649 - 656 に開示され、これらは、参照により本明細書に組み込まれる。

【0061】

オリゴヌクレオチドの文脈における「改変ヌクレオチド」とは、オリゴヌクレオチド配列の少なくとも1つのヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドに所望の特性を提供する異なるヌクレオチドによって置き換えられる変化を指す。本明細書に記載のオリゴヌクレオチド中で置換され得る例示的な修飾ヌクレオチドとしては、例えば、t - ブチルベンジル、C5 - メチル - dC、C5 - エチル - dC、C5 - メチル - dU、C5 - エチル - dU、2, 6 - ジアミノプリン、C5 - プロピニル - dC、C5 - プロピニル - dU、C7 - プロピニル - dA、C7 - プロピニル - dG、C5 - プロパルギルアミノ - dC、C5 - プロパルギルアミノ - dU、C7 - プロパルギルアミノ - dA、C7 - プロパルギルアミノ - dG、7 - デアザ - 2 - デオキシ - キサントシン、ピラゾロピリミジン類似体、擬似 dU、ニトロピロール、ニトロインドール、2' - O - メチルリボ - U、2' - O - メチルリボ - C、N4 - エチル - dC、N6 - メチル - dA、5 - プロピニル dU、5 - プロピニル dC、7 - デアザ - デオキシグアノシン（デアザ G (u - デアザ)）などが挙げられる。オリゴヌクレオチド中で置換され得る多くの他の修飾ヌクレオチドは、本明細書で言及されるか、または当技術分野で知られている。特定の実施形態では、修飾ヌクレオチド置換は、対応する修飾されていないオリゴヌクレオチドの融解温度と比較して、該オリゴヌクレオチドの融解温度 (T_m) を修飾する。さらに説明すると、特定の改変ヌクレオチド置換は、いくつかの実施形態では、非特異的核酸増幅を減少させ（例えば、プライマーダイマー形成などを最小限に抑える）、意図する標的アンプリコンの収率を増加させることなどができる。これらのタイプの核酸修飾の例は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第 6, 001, 611 号に記載されている。他の修飾ヌクレオチド置換は、オリゴヌクレオチドの安定性を変化させ得るか、または他の望ましい特徴を提供し得る。

【0062】

マラリア原虫（プラスモジウムを含む）標的核酸の検出 / 定量

本開示は、例えば、プラスモジウムの核酸配列の一部を増幅することによって、マラリア原虫（プラスモジウムを含む）を検出する方法を提供する。具体的には、本開示の実施形態によって、プラスモジウム核酸分子標的を増幅および検出および / または定量するためのプライマーおよびプローブが提供される。

【0063】

マラリア原虫（プラスモジウムを含む）の検出および / または定量のために、プラスモジウムを増幅および検出 / 定量するためのプライマーおよびプローブが提供される。本明細書に例示されるもの以外のプラスモジウム核酸も、サンプル中のプラスモジウムを検出するために使用し得る。例えば、機能的変異体は、日常的な方法を使用して当業者によって特異性および / または感度について評価され得る。代表的な機能的バリエーションは、例えば、本明細書に開示されるプラスモジウム核酸において、1つ以上の欠失、挿入および / または置換を含み得る。

【0064】

より具体的には、オリゴヌクレオチドの実施形態はそれぞれ、配列番号 1 ~ 58 から選択される配列を有する核酸、配列番号 1 ~ 58 の1つと少なくとも、例えば、80%、90%、もしくは95%の配列同一性を有するその実質的に同一のバリエーション、もしくは配列番号 1 ~ 58 の相補体およびバリエーションを含む。

【0065】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

種類	オリゴIDおよび 配列番号：	配列
F. プライマー	PM-18S_1F (配列番号1)	GGAGCCTGAGAAATAGCTACCA<t_BB_dC>
R. プライマー	PM-18S_1R (配列番号2)	TTTCTTGTCACCTACCTCTCTTTAGAG<t_BB_dA>
プローブ	PM-18S_1P (配列番号3)	<FAM_Thr>AAGGA<BHQ_2>AGGCAGCAGGCG CGTAAATTACCC<SpC_C3>
プローブ	PM-18S_1P2 (配列番号4)	<FAM_Thr>AGGCA<BHQ_2>GCAGGCGCGTAA ATTACCCAA<SpC_C3>
F. プライマー	PM-18S_2A1F (配列番号5)	CGGAAGGGCACCAACC<t_BB_dA>
R. プライマー	PM-18S_2A1R (配列番号6)	ATCTGTCAATCCTACTCTTGTCTTAAACT<t_BB_dA>
プローブ	PM-18S_2A1P (配列番号7)	<FAM_Thr>TGGAG<BHQ_2>CTTGCGGCTTAA TTTGACTCAACACGG<SpC_C3>
F. プライマー	PM-18S_2A2F (配列番号8)	ACAAGAGTAGGATTGACAGATTAATAGCT<t_BB_dC>
R. プライマー	PM-18S_2A2R (配列番号9)	CGTTATCGGAATTAACCAGACAAATCAT<t_BB_dA>
プローブ	PM-18S_2A2P (配列番号10)	<FAM_Thr>TGGAT<BHQ_2>GGTGATGCATGG CCGTTTTTAGTTTCGT<SpC_C3>
F. プライマー	RM_44F1 (配列番号11)	ACAGGTTAACGCCTGGAGTT<t_BB_dC>
R. プライマー	RM_44R1 (配列番号12)	TGTCGTCTCATCGCAGC<t_BB_dC>
R. プライマー	RM_44R2. MOD (配列番号13)	GCACCTCCATGTCGTCTC<t_BB_dA>
R. プライマー	RM_44R3. MOD (配列番号14)	TCTTTATATACTATTGGCACCTCCATGT<t_BB_dC>
プローブ	RM_44P1 (配列番号15)	<HEX_Thr>CGTGAC<BHQ_2>GAGCGGTGTGT ACAAGGCAACA<Phos>
F. プライマー	RM_75F1 (配列番号16)	TCTGCCCGGCATCAATGATAA<t_BB_dA>
R. プライマー	RM_75R1 (配列番号17)	GGAGTCTCACACTAGCGACA<t_BB_dA>
プローブ	RM_75P1 (配列番号18)	<HEX_Thr>CCTTGTCG<BHQ_2>GGTAATCTC CGTCCTGCATGAACG<Phos>
プローブ	RM_75P1_FAM (配列番号19)	<FAM_Thr>CCTTGTCG<BHQ_2>GGTAATCTC CGTCCTGCATGAACG<SpC_C3>
プローブ	RM_75P1_FAM Q5 (配列番号20)	<FAM_Thr>CCTTG<BHQ_2>TCGGGTAATCTC CGTCCTGCATGAACG<SpC_C3>
F. プライマー	RM_125F1 (配列番号21)	TTCTGCGTCCCAATGATAGGA<t_BB_dA>
R. プライマー	RM_125R1 (配列番号22)	GGCCTATCGATCCTTTATATTTGC<t_BB_dA>

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

種類	オリゴIDおよび配列番号：	配列
プローブ	RM_125P1 (配列番号23)	<HEX_Thr>ACGTTCG<BHQ_2>CTAGGAGCGCT TGGCAGC<Phos>
プローブ	RM_125P1_FAM (配列番号24)	<FAM_Thr>ACGTTCG<BHQ_2>CTAGGAGCGCT TGGCAGC<SpC_C3>
プローブ	RM_125P1_FAMQ5 (配列番号25)	<FAM_Thr>ACGTC<BHQ_2>GCTAGGAGCGCT TGGCAGC<SpC_C3>
F. プライマー	RM125_F44 (配列番号26)	TGAACAATCCGACACTTTGAGAC
F. プライマー	R125_F44_TBC (配列番号27)	TGAACAATCCGACACTTTGAGA<t_BB_dC>
F. プライマー	R125B_FOR2 (配列番号28)	GCCACGCTTTCACGTTTTTC
R. プライマー	R125B_REV1 (配列番号29)	CGGTACATCTGTTAAAAATAACGCA
プローブ	R125B_P1MOD2 (配列番号30)	<FAM_Thr>AGA<p dU><p dU><BHQ_2><p dU><p dC>TGTTCTCTTTGAGCTTGTCTTTGGACAT<SpC_C3>
F. プライマー	18S-1_F332 (配列番号31)	GGGTATTGGCCTAACATGGCTA
F. プライマー	18S-1_F332_INC (配列番号32)	GGGTATTGACCTAACATGGCTA
R. プライマー	PM-18S_1R_2 (配列番号33)	TTTCTTGTCACCTCCTCTTTTAGA
F. プライマー	18S-1_F333_TBBA (配列番号34)	GGTATTGGCCTAACATGGCTATG<t_BB_dA>
F. プライマー	18S-1_F333_INC (配列番号35)	GGTATTGACCTAACATGGCTATG<t_BB_dA>
R. プライマー	PM-18S_1RM2 (配列番号36)	TTTCTTGTCACCTCCTCTTTTAG<t_BB_dA>A
プローブ	DDPM-18S_1P (それぞれ配列番号44 および45；配列番号37 として開示される全長 配列)	<FAM_Thr>AAGGAAGGCA<ZEN>GCAGGCGCG TAAATTACCC<IB_FQ>
プローブ	DDPM-18S_2A 1P (それぞれ配列番号46 および47；配列番号38 として開示される全長 配列)	<FAM_Thr>TGGAGCTTGC<ZEN>GGCTTAATT TGACTCAACACGG<IB_FQ>

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

種類	オリゴIDおよび配列番号：	配列
プローブ	DDPM-18S_2A 2P (それぞれ配列番号48 および49；配列番号3 9として開示される全長 配列)	<FAM_Thr>TGGATGGTGA<ZEN>TGCATGGCC GTTTTTAGTTTCGT<IB_FQ>
プローブ	DDRM_125P1 (それぞれ配列番号50 および51；配列番号4 0として開示される全長 配列)	<FAM_Thr>ACGTCGCTAG<ZEN>GAGCGCTTG GCAGC<IB_FQ>
プローブ	DD_RM_44P1 (それぞれ配列番号52 および53；配列番号4 1として開示される全長 配列)	<FAM_Thr>CGTGACGAG<ZEN>CGGTGTGTAC AAGGCAACA<IB_FQ>
プローブ	DDRM_75P1 (それぞれ配列番号54 および55；配列番号4 2として開示される全長 配列)	<FAM_Thr>CCTTGTCGGG<ZEN>TAATCTCCG TCCTGCATGAACG<IB_FQ>
R. プライマー	RM_125R1_2I NC (配列番号43)	GGCCTATCGATATCCTTTATGTTTG<t_BB_dC >
F. プライマー	18S_1273F2_ TBBA (配列番号56)	CAACACGGGAAACTCACTAGTTT<t_BB_dA>
R. プライマー	18S_1273R1 (配列番号57)	ACCAGACAAATCATATTCACGAACTAAA
プローブ	18S_1273P1M OD (配列番号58)	<FAM_Thr>TGA<pdU><pdU><BHQ_2>TCTT GGATGGTGTATGCATGGCCGT<Sp_c_C3>

表1：プラスモジウムアッセイで使用されるオリゴヌクレオチド（プライマーおよびプローブ）

【0066】

一実施形態では、プラスモジウムを含有すると疑われる生物学的サンプル中のマラリア原虫（プラスモジウムを含む）の検出を提供するために、上記のプラスモジウムプライマーのセットおよびプローブが使用される（表1）。プライマーのセットおよびプローブは、配列番号1～58の核酸配列を含むかまたはこれからなる、マラリア原虫（プラスモジウムを含む）の核酸配列に特異的なプライマーおよびプローブを含むかまたはこれからなり得る。別の実施形態では、プラスモジウム標的に対するプライマーおよびプローブは、配列番号1～58のプライマーおよびプローブのいずれかの機能的に活性なバリエーションを含むか、またはこれからなる。

【0067】

配列番号1～58のプライマーおよび/またはプローブのいずれかの機能的に活性なバリエーションは、開示される方法においてプライマーおよび/またはプローブを使用することによって同定され得る。配列番号1～58のいずれかのプライマーおよび/またはプローブの機能的に活性なバリエーションは、配列番号1～58のそれぞれの配列と比較して、記載の方法もしくはキットにおいて、類似し、もしくはより高い特異性および感度を提供するプライマーおよび/またはプローブに関する。

10

20

30

40

50

【0068】

バリエーションは、例えば、配列番号1～58のそれぞれの配列の5'末端および/または3'末端における1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失もしくは置換などの1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失もしくは置換によって、配列番号1～58の配列から変化し得る。上に詳述したように、プライマーおよび/またはプローブは化学的に修飾されていてもよく、すなわち、プライマーおよび/またはプローブは修飾ヌクレオチドもしくは非ヌクレオチド化合物を含んでいてもよい。したがって、プローブ(またはプライマー)は改変オリゴヌクレオチドである。「修飾ヌクレオチド」(または「ヌクレオチド類縁体」)は、いくつかの修飾によって天然の「ヌクレオチド」とは異なるが、依然として、塩基もしくは塩基様化合物、ペントフラノシル糖もしくはペントフラノシル糖様化合物、リン酸部分もしくはリン酸様部分、またはそれらの組み合わせからなる。例えば、「ヌクレオチド」の塩基部分に「標識」を結合させて、「改変ヌクレオチド」を得ることが可能である。「ヌクレオチド」中の天然塩基は、例えば、7-デアザプリンで置き換えられてもよく、それによっても同様に「改変ヌクレオチド」が得られる。「改変ヌクレオチド」または「ヌクレオチド類似体」という用語は、本出願において互換的に使用される。「改変ヌクレオチド」(または「ヌクレオチド類縁体」)は、「改変ヌクレオチド」(または「ヌクレオチド類縁体」)について上に概説したように、何らかの改変によって天然のヌクレオチドとは異なる。

10

【0069】

プラスモジウム標的をコードする核酸分子、例えば、プラスモジウムの代替部分をコードする核酸を増幅する修飾オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド類似体を含むオリゴヌクレオチドは、例えばOLIGO(Molecular Biology Insights Inc.、コロラド州カスケード)などのコンピュータプログラムを使用して設計し得る。増幅プライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドを設計する際の重要な特徴としては、検出(例えば、電気泳動によって)を容易にするための適切なサイズの増幅産物、一对のプライマーのメンバーに対する同様の融解温度、および各プライマーの長さ(すなわち、プライマーは、配列特異性でアニーリングし、合成を開始するのに十分な長さである必要があるが、オリゴヌクレオチド合成中に正確性が低下するほど長くはない)が挙げられるが、これらに限定されない。典型的には、オリゴヌクレオチドプライマーは8～50ヌクレオチド長(例えば、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48または50ヌクレオチド長)である。マラリア原虫(プラスモジウムを含む)の検出および増幅のための開示されるプライマーとしては、配列番号1、2、5、6、8、9、11～14、16、17、21、22、26～29、31～36、43、56および57が挙げられる。

20

30

【0070】

プライマーのセットに加えて、本方法は、プラスモジウムの存在または非存在を検出するために1以上のプローブを使用し得る。「プローブ」という用語は、合成的または生物学的に産生された核酸(DNAまたはRNA)を指し、これは、設計または選択により、それらが定義された所定のストリンジェンシーの下でプラスモジウム(標的)核酸、この場合はプラスモジウム(標的)核酸に特異的に(すなわち、優先的に)ハイブリダイズすることを可能にする特定のヌクレオチド配列を含む。「プローブ」は、標的核酸を検出することを意味する「検出プローブ」と称され得る。

40

【0071】

いくつかの実施形態では、記載されるプラスモジウムプローブは、少なくとも1つの蛍光標識で標識され得る。一実施形態では、プラスモジウムプローブは、ドナー蛍光部分、例えば、蛍光色素、および対応するアクセプター部分、例えば、クエンチャーで標識され得る。一実施形態では、プローブは蛍光部分を含むか、もしくはそれからなり、核酸配列は配列番号3、4、7、10、15、18～20、23～25、30、37～42、および58を含むか、もしくはそれからなる。例えば、アンプリコンへのハイブリダイゼーシ

50

ョン/アニーリングを介したマラリア原虫(プラスモジウムを含む)の検出のために開示されたプローブとしては、配列番号3、4、7、10、15、18~20、23~25、30、37~42および58が挙げられる。

【0072】

プローブとして使用されるオリゴヌクレオチドの設計は、プライマーの設計と同様の方法で行い得る。複数の実施形態は、増幅産物の検出のために単一のプローブまたは対のプローブを使用し得る。実施形態に応じて、使用するプローブは、少なくとも1種の標識および/または少なくとも1種のクエンチャー部分を含み得る。プライマーと同様に、プローブは通常、同様の融解温度を有し、各プローブの長さは、配列特異的ハイブリダイゼーションが起こるのに十分でなければならないが、合成中に忠実度が低下するほど長くはない。オリゴヌクレオチドプローブは、一般に15~40(例えば、15、16、18、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、39、または40)ヌクレオチド長である。

10

【0073】

コンストラクトは、それぞれがプラスモジウムプライマーおよびプローブ核酸分子(例えば、配列番号1~58)のうちの1つを含有するベクターを含み得る。コンストラクトは、例えば、対照鑄型核酸分子として使用し得る。使用に適したベクターは、市販されている、および/または当技術分野で日常的な組換え核酸技術法によって製造される。プラスモジウム核酸分子は、例えば、化学合成、プラスモジウムからの直接クローニング、または核酸増幅によって得ることが可能である。

20

【0074】

本方法での使用に適したコンストラクトは、典型的には、プラスモジウム核酸分子、および/またはプラスモジウム(例えば、配列番号1~58の1以上の配列を含む核酸分子)の増幅および/または検出のためのプライマー/プローブに加えて、所望の構築物および/または形質転換体を選択するための選択マーカー(例えば、抗生物質耐性遺伝子)をコードする配列、ならびに複製起点を含む。ベクター系の選択は、通常、宿主細胞の選択、複製効率、選択性、誘導性および回収の容易さを含むがこれらに限定されない、いくつかの要因に依存する。

【0075】

プラスモジウム核酸分子および/またはプラスモジウムの増幅および/または検出のためのプライマー/プローブを含有するコンストラクトは、宿主細胞内で増殖させ得る。本明細書で使用される宿主細胞という用語は、原核生物および真核生物、例えば酵母、植物および動物細胞を含むことを意味する。原核生物宿主には、大腸菌(*E. coli*)、サルモネラ・チフィリウム(*Salmonella typhimurium*)、セラチア・マルセセンス(*Serratia marcescens*)およびバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)が含まれ得る。真核生物宿主としては、*S. cerevisiae*、*S. pombe*、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)などの酵母、COS細胞またはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞などの哺乳動物細胞、昆虫細胞、ならびにアラビドプシス・タリアナ(*Arabidopsis thaliana*)およびニコチアナ・タバカム(*Nicotiana tabacum*)などの植物細胞が挙げられる。コンストラクトを、当業者に一般的に知られている技術のいずれかを使用して宿主細胞に導入し得る。例えば、リン酸カルシウム沈殿、エレクトロポレーション、熱ショック、リポフェクション、マイクロインジェクションおよびウイルス媒介核酸移入は、核酸を宿主細胞に導入するための一般的な方法である。さらに、ネイキッドDNAを細胞に直接送達し得る(例えば、米国特許第5,580,859号および同第5,589,466号参照)。

30

40

【0076】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)

米国特許第4,683,202号、同第4,683,195号、同第4,800,159号および同第4,965,188号は、従来のPCR技術を開示している。PCRは、

50

典型的には、選択された核酸鋳型（例えば、DNAまたはRNA）に結合する2種のオリゴヌクレオチドプライマーを用いる。いくつかの実施形態で有用なプライマーとしては、記載されるプラスモジウム核酸配列（例えば、配列番号1、2、5、6、8、9、11～14、16、17、21、22、26～29、31～36および43）内の核酸合成の開始点として作用し得るオリゴヌクレオチドが挙げられる。プライマーは、従来の方法によって制限消化物から精製し得るか、または合成的に生成し得る。プライマーは増幅における最大効率には一本鎖が好ましいが、プライマーは二本鎖であってもよい。二本鎖プライマーは、最初に変性され、すなわち、鎖を分離するために処理される。二本鎖核酸を変性させる1つの方法は、加熱によるものである。

【0077】

10

鋳型核酸が二本鎖である場合、PCRで鋳型として使用し得るようにする前に、2本の鎖を分離することが必要である。鎖分離は、物理的、化学的、または酵素的手段を含む任意の好適な変性方法によって達成し得る。核酸鎖を分離する1つの方法は、核酸が優位に変性する（例えば、50%、60%、70%、80%、90%、または95%を超える変性）まで加熱することを含む。鋳型核酸を変性させるのに必要な加熱条件は、例えば、緩衝塩濃度、ならびに変性される核酸の長さおよびヌクレオチド組成に依存するが、典型的には、温度および核酸長などの反応の特徴に応じて、約90～約105の範囲である。変性は、典型的には、約30秒間～4分間（例えば、1分～2分30秒、または1.5分）行われる。

【0078】

20

二本鎖の鋳型核酸が熱により変性された場合、反応混合物は、その標的配列に対する各プライマーのアニーリングを促進する温度まで冷却される。アニーリングの温度は、通常、約35～約65、（例えば、約40～約60、約45～約50）である。アニーリング時間は、約10秒～約1分（例えば、約20秒～約50秒、約30秒～約40秒）であり得る。次いで、ポリメラーゼの活性が促進または最適化される温度、すなわち、アニーリングされたプライマーから伸長が起こって、鋳型核酸に相補的な産物を生成するのに十分な温度に、反応混合物を調節する。温度は、核酸鋳型にアニーリングされた各プライマーから伸長産物を合成するのに充分でなくてはならないが、その相補的な鋳型から伸長産物を変性させるほど高くすべきではない（例えば、伸長のための温度は、一般的に、約40～約80（例えば、約50～約70、約60）の範囲である）。伸長時間は、約10秒～約5分（例えば、約30秒～約4分、約1分～約3分、約1分30秒～約2分）であり得る。

30

【0079】

レトロウイルスまたはRNAウイルスのゲノムは、リボ核酸、すなわち、RNAから構成される。そのような場合、鋳型核酸であるRNAは、酵素逆転写酵素の作用を介して相補的DNA（cDNA）に最初に転写されなければならない。逆転写酵素は、RNA鋳型およびRNAの3'末端に相補的な短いプライマーを使用して、第1鎖cDNAの合成を指示し、次いでこれをポリメラーゼ連鎖反応の鋳型として直接使用し得る。

【0080】

PCRアッセイでは、プラスモジウム核酸、ならびに/またはRNAもしくはDNA（cDNA）などのプラスモジウムを増幅および/もしくは検出するプライマー/プローブを使用し得る。鋳型核酸は精製される必要はなく；鋳型核酸は、ヒト細胞に含まれるプラスモジウム核酸などの複合混合物の微量画分であり得る。プラスモジウム核酸分子、および/またはプラスモジウムを増幅および/もしくは検出するプライマー/プローブは、*Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing, ら. (編), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.)に記載されているような日常的な技術によって生物学的サンプルから抽出され得る。核酸は、任意の数の供給源、例えばプラスミド、または、細菌、酵母、ウイルス、細胞小器官、または植物もしくは動物などの高等生物を含む天然供給源から得

40

50

ることが可能である。

【0081】

オリゴヌクレオチドプライマー（例えば、配列番号1、2、5、6、8、9、11~14、16、17、21、22、26~29、31~36、および43）を、プライマー伸長を誘導する反応条件下でPCR試薬と組み合わせる。例えば、鎖伸長反応には、一般に、50mM KCl、10mM Tris-HCl (pH 8.3)、15mM MgCl₂、0.001% (w/v)ゼラチン、0.5~1.0 μgの変性された鋳型DNA、50 pmolの各オリゴヌクレオチドプライマー、2.5 UのTaqポリメラーゼおよび10% DMSO)が含まれる。反応物は、通常、それぞれ150~320 μMのdATP、dCTP、dTTP、dGTP、またはそれらの1つ以上の類似体含有する。

10

【0082】

新規に合成された鎖は、反応の後続工程で使用できる二本鎖分子を形成する。鎖分離、アニーリングおよび伸長の工程は、マラリア原虫（プラスモジウムを含む）の標的核酸分子に対応する所望量の増幅産物を産生するために必要に応じて頻りに繰り返す得る。反応の制限因子は、反応中に存在するプライマー、熱安定性酵素、およびヌクレオシド三リン酸の量である。サイクリング工程（すなわち、変性、アニーリング、および伸長）は、好ましくは少なくとも1回繰り返される。検出での使用では、サイクリング工程の数は、例えば、サンプルの性質による。サンプルが核酸の複雑な混合物である場合、検出に十分な標的配列を増幅するために、より多くのサイクリング工程が必要となる。概して、サイクリング工程は少なくとも約20回繰り返されるが、40、60、または100回繰り返してもよい。

20

【0083】

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)

FRET技術（例えば、米国特許第4,996,143号、同第5,565,322号、同第5,849,489号、同第6,162,603号を参照）は、ドナー蛍光部分および対応するアクセプター蛍光部分が互いに一定の距離内に配置されると、2つの蛍光部分間でエネルギー移動が生じ、それを可視化し得、または他の方法で検出および/または定量し得るという概念に基づいている。典型的に、ドナーは好適な波長の光照射によって励起されると、アクセプターにエネルギーを移動させる。典型的に、アクセプターは移動されたエネルギーを異なる波長の光照射の形態で再発光する。特定の系では、非蛍光エネルギーは、実質的に非蛍光のドナー部分（例えば、米国特許第7,741,467号を参照されたい）を含む生体分子を介して、ドナー部分とアクセプター部分との間で移動され得る。

30

【0084】

一例では、オリゴヌクレオチドプローブは、ドナー蛍光部分もしくは色素（例えば、HEXもしくはFAM）と、蛍光性であってもなくてもよく、光以外の形態で伝達されたエネルギーを散逸させる対応するクエンチャー（例えば、Black Hole Quencher (商標) (BHQ) (BHQ-2など)）とを含有し得る。プローブがインタクトである場合、エネルギー移動は、典型的には、ドナー蛍光部分からの蛍光発光がアクセプター部分によってクエンチされるように、ドナー部分とアクセプター部分との間で起こる。ポリメラーゼ連鎖反応の伸長工程中、増幅産物に結合したプローブは、ドナー蛍光部分の蛍光発光がもはやクエンチされないように、例えばTaqポリメラーゼの5'から3'へのヌクレアーゼ活性によって切断される。この目的のための例示的なプローブは、例えば、米国特許第5,210,015号、同第5,994,056号、および同第6,171,785号に記載されている。一般的に使用されるドナー-アクセプター対は、FAM-TAMRA対を包含する。一般的に使用されるクエンチャーは、DABCYLおよびTAMRAである。一般的に使用されるダーククエンチャーは、Black Hole Quencher (商標) (BHQ) (BHQ2など)、(Biosearch Technologies, Inc.、カリフォルニア州ノヴァト)、Iowa Black (商標) (Integrated DNA Tech., Inc.、アイオワ州コーラルビル)、

40

50

BlackBerry (登録商標) Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc、ミシガン州デクスタ) を包含する。

【0085】

別の例では、それぞれが蛍光部分を含む2つのオリゴヌクレオチドプローブは、プラスモジウム標的核酸配列に対するオリゴヌクレオチドプローブの相補性によって決定される特定の位置で増幅産物にハイブリダイズし得る。オリゴヌクレオチドプローブが適切な位置で増幅産物核酸にハイブリダイゼーションすると、FRETシグナルが生成される。ハイブリダイゼーション温度は、約10秒間~約1分間、約35~約65の範囲であり得る。

【0086】

蛍光分析は、例えば、光子計数落射蛍光顕微鏡システム(適切なダイクロイックミラーおよび特定の範囲の蛍光発光を監視するためのフィルタを備える)、光子計数光電子増倍管システム、または蛍光光度計を使用して行い得る。エネルギー移動を開始するため、または蛍光体の直接検出を可能にするための励起は、アルゴンイオンレーザー、高強度水銀(Hg)アークランプ、キセノンランプ、光ファイバー光源、または所望の範囲の励起のために適切にフィルタリングされた他の高強度光源を用いて行い得る。

10

【0087】

ドナー部分および対応するアクセプター部分に関して本明細書で使用される場合、「対応する」とは、ドナー蛍光部分の発光スペクトルと重複する吸光度スペクトルを有するアクセプター蛍光部分またはダークエンチャーを指す。アクセプター蛍光部分の発光スペクトルの波長最大値は、ドナー蛍光部分の励起スペクトルの波長最大値よりも少なくとも100nm大きくなければならない。したがって、それらの間で効率的な非放射エネルギー伝達を生成し得る。

20

【0088】

蛍光ドナー部分および対応するアクセプター部分は、一般に、(a)高効率Försterエネルギー移動、(b)大きな最終ストークスシフト(>100nm)、(c)可能な限り可視スペクトルの赤色部分(>600nm)への発光のシフト;および(d)ドナー励起波長での励起によって生じるラマン水蛍光発光よりも高い波長への発光のシフトのために選択される。例えば、ドナー蛍光部分は、レーザー線付近のその最大励起波長(例えば、ヘリウム-カドミウム442nmまたはアルゴン488nm)、高い吸光係数、高い量子収率、および、その蛍光発光の対応するアクセプター蛍光部分の励起スペクトルとの良好な重複を有するものを選択し得る。対応するアクセプター蛍光部分は、高い吸光係数、高い量子収率、ドナー蛍光部分の発光とのその励起の良好な重複、および可視スペクトルの赤色部分(>600nm)の発光を有するものを選択し得る。

30

【0089】

FRET技術において様々なアクセプター蛍光部分と共に使用し得る代表的なドナー蛍光部分としては、フルオレセイン、ルシファーイエロー、B-フィコエリトリン、9-アクリジンイソチオシアネート、ルシファーイエローVS、4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸、7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアナトフェニル)-4-メチルクマリン、スクシンミル1-ピレンブチレート、および4-アセトアミド-4'-イソチオシアナトスチルベン-2,2'-ジスルホン酸誘導体が挙げられる。代表的なアクセプター蛍光部分としては、使用されるドナー蛍光部分に応じて、LC Red 640、LC Red 705、Cy5、Cy5.5、リサミンローダミンBスルホニルクロリド、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、ローダミンXイソチオシアネート、エリスロシンイソチオシアネート、フルオレセイン、ジエチレントリアミンペンタアセテート、またはランタニドイオンの他のキレート(例えば、ユウロピウム、またはテルビウム)が挙げられる。ドナー蛍光部分およびアクセプター蛍光部分は、例えば、Molecular Probes(オレゴン州ジャンクシオンシティ)またはSigma Chemical Co.(ミズーリ州セントルイス)から得ることが可能である。

40

50

【0090】

ドナー蛍光部分およびアクセプター蛍光部分を、リンカーアームを介して適切なプローブオリゴヌクレオチドに結合し得る。リンカーアームはドナー蛍光部分とアクセプター蛍光部分との間の距離に影響を及ぼすので、各リンカーアームの長さは重要である。リンカーアームの長さは、ヌクレオチド塩基から蛍光部分までのオングストローム()の距離であり得る。一般に、リンカーアームは約10 ~ 約25 である。リンカーアームは、国際公開第84/03285号に記載されている種類のものであってもよい。国際公開第84/03285号はまた、リンカーアームを特定のヌクレオチド塩基に結合させる方法、および蛍光部分をリンカーアームに結合させる方法も開示している。

【0091】

LC Red 640などのアクセプター蛍光部分を、アミノリンカー(例えば、ABI(カリフォルニア州フォスターシティ)またはGlen Research(バージニア州スターリング)から入手可能なC6-アミノホスホラミダイト)を含有するオリゴヌクレオチドと組み合わせて、例えば、LC Red 640標識オリゴヌクレオチドを生成し得る。フルオレセインなどのドナー蛍光部分をオリゴヌクレオチドに結合させるためによく使用されるリンカーとしては、チオ尿素リンカー(FITC由来、例えばGlen ResearchまたはChemGene(マサチューセッツ州アッシュランド)製のフルオレセイン-CPG)、アミド-リンカー(BioGenex(カリフォルニア州サンラモン)製のCX-フルオレセイン-CPGなどの、フルオレセイン-NHS-エステル由来)、またはオリゴヌクレオチド合成後にフルオレセイン-NHS-エステルの結合を必要とする3'-アミノ-CPGが挙げられる。

【0092】

プラスモジウム増幅産物(アンプリコン)の検出

本開示は、生物学的サンプルまたは非生物学的サンプル中のマラリア原虫(プラスモジウムを含む)の存在または非存在を検出する方法を提供する。提供される方法は、サンプルの汚染、偽陰性、および偽陽性の問題を回避する。この方法は、1対以上のプラスモジウムプライマーを使用してサンプルからのプラスモジウム標的核酸分子の一部を増幅することを含む、少なくとも1つのサイクリング工程と、FRET検出工程とを行うことを含む。複数のサイクリング工程は、好ましくはサーモサイクラーで行われる。プラスモジウムの存在を検出するためにプラスモジウムプライマーおよびプローブを使用して方法を実施し得、プラスモジウムの検出はサンプル中のプラスモジウムの存在を示す。

【0093】

本明細書に記載されるように、増幅産物は、FRET技術を利用する標識ハイブリダイゼーションプローブを使用して検出し得る。1つのFRETフォーマットは、TaqMan(登録商標)技術を利用して増幅産物の存在または非存在、したがってマラリア原虫(プラスモジウムを含む)の存在または非存在を検出する。TaqMan(登録商標)技術は、例えば1種の蛍光部分もしくは色素(例えばHEXもしくはFAM)と、蛍光性であってもなくてもよい1種のクエンチャー(例えば、BHQ-2)で標識された1つの一本鎖ハイブリダイゼーションプローブとを利用する。第1の蛍光部分が適切な波長の光で励起されると、吸収されたエネルギーは、FRETの原理に従って第2の蛍光部分またはダーククエンチャーに移動する。第2の蛍光部分は、一般的には、クエンチャー分子である。PCR反応のアニーリング工程中、標識されたハイブリダイゼーションプローブは、標的DNA(すなわち、増幅産物)に結合し、その後の伸長段階中に、例えばTaqポリメラーゼの5'から3'へのヌクレアーゼ活性によって分解される。その結果、蛍光部分とクエンチャー部分とが互いに空間的に分離される。結果として、クエンチャーの非存在下において第1の蛍光部分を励起すると、第1の蛍光部分からの蛍光発光を検出し得る。例として、ABI PRISM(登録商標)7700配列検出システム(Applied Biosystems)は、TaqMan(登録商標)技術を使用し、サンプル中のマラリア原虫(プラスモジウムを含む)の存在または非存在を検出するための本明細書に記載の方法を実施するのに適している。

10

20

30

40

50

【0094】

FRETと組み合わせた分子ビーコンを使用して、リアルタイムPCR法を使用して増幅産物の存在を検出もし得る。分子ビーコン技術は、第1の蛍光部分および第2の蛍光部分で標識されたハイブリダイゼーションプローブを使用する。第2の蛍光部分は一般的にはクエンチャーであり、蛍光標識は典型的にはプローブの各端部に配置される。分子ビーコン技術は、二次構造形成を可能にする配列（例えば、ヘアピン）を有するプローブオリゴヌクレオチドを使用する。プローブ内で二次構造が形成された結果、プローブが溶液中にある場合、両方の蛍光部位が空間的に近接する。標的核酸（すなわち、増幅産物）へのハイブリダイゼーション後、プローブの二次構造が破壊され、蛍光部分が互いに分離され、それにより、適切な波長の光による励起後、第1の蛍光部分の発光を検出し得る。

10

【0095】

FRET技術の別の共通形式は、2つのハイブリダイゼーションプローブを利用する。各プローブは、異なる蛍光部分で標識し得、一般に、標的DNA分子（例えば、増幅産物）内で互いに近接してハイブリダイズするように設計される。ドナー蛍光部分、例えばフルオレセインは、LightCycler（登録商標）Instrumentの光源によって470nmで励起される。FRETの間、フルオレセインは、そのエネルギーをアクセプター蛍光部分、例えばLightCycler（登録商標）-Red 640（LCRed 640）or LightCycler（登録商標）-Red 705（LCRed 705）に移動する。次いで、アクセプター蛍光部分はより長い波長の光を放出し、これはLightCycler（登録商標）機器の光学検出システムによって検出される。効率的なFRETは、蛍光部分が直接局所的に近接しており、ドナー蛍光部分の発光スペクトルがアクセプター蛍光部分の吸収スペクトルと重なっている場合にのみ起こり得る。放出されたシグナルの強度は、元の標的DNA分子の数（例えば、プラスモジウム（Plasmodium）ゲノムの数）と関連させ得る。プラスモジウム標的核酸の増幅が起こり、増幅産物が産生される場合、ハイブリダイズする工程は、プローブ対のメンバー間のFRETに基づく検出可能なシグナルをもたらす。

20

【0096】

一般に、FRETの存在はサンプル中のプラスモジウムの存在を示し、FRETの非存在はサンプル中のプラスモジウムの非存在を示す。しかしながら、不十分な検体収集、輸送遅延、不適切な輸送条件、または特定の収集スワブ（アルギン酸カルシウムまたはアルミニウムシャフト）の使用はいずれも、試験結果の成功および/または精度に影響を及ぼし得る条件である。

30

【0097】

本方法の実施に使用し得る代表的な生物学的サンプルとしては、全血、呼吸器検体、尿、糞便検体、血液検体、血漿、皮膚スワブ、鼻スワブ、創傷スワブ、血液培養物、皮膚および軟部組織感染が挙げられるが、これらに限定されない。生物学的サンプルの収集および保存方法は、当業者に知られている。生物学的サンプルを処理（例えば、当技術分野で公知の核酸抽出方法および/またはキットによって）してプラスモジウム核酸を放出させ得、またはいくつかの場合では、生物学的サンプルをPCR反応成分および適切なオリゴヌクレオチドと直接接触させ得る。いくつかの例では、生物学的サンプルは全血である。全血を典型的に収集する場合、全血を適切な温度で保存することを可能にする、ヘパリン、クエン酸塩、もしくはEDTAなどの抗凝固剤を含む容器に収集することが多い。しかし、そのような条件下では、全血内の核酸はかなりの量の分解を受ける。したがって、核酸安定化溶液などの、核酸を含む全血成分を溶解、変性および安定化する試薬に血液を回収することが有利であり得る。そのような場合、核酸は、後続の単離およびPCRなどの核酸試験などによる分析のために、より良好に保存および安定化され得る。そのような核酸安定化溶液は当技術分野で周知であり、これには、限定するものではないが、pH7.5で4.2Mグアニジニウム塩（GuHCl）および50mM Trisを含有するcobas PCR培地が含まれる。

40

【0098】

50

サンプルは、分析前にサンプルを適切に保持および保存するように設計された任意の方法もしくは装置によって回収し得る。そのような方法および装置は、当技術分野で周知である。サンプルが全血などの生物学的サンプルである場合、方法もしくは装置は、採血管を含み得る。このような採血チューブ管は、当該技術において周知であり、例えば採血チューブを含み得る。多くの場合、採血チューブを使用することが有利であり得、この場合、採血管は、サンプル取り込みのために意図された空間内で圧力下にあり、例えば、バキュテナー採血チューブのような、真空チャンバを有する血液管などである。真空チャンバを有するそのような採血チューブ、例えばバキュテナー採血チューブは、当技術分野で周知である。核酸を含む全血成分を溶解、変性、および安定化する溶液、例えば核酸安定化溶液を内部に含む採血管内に、吸引される全血が採血管内の核酸安定化溶液と直ちに接触するように、真空チャンバの有無にかかわらず、血液を回収することがさらに有利であり得る。

10

【0099】

融解曲線分析は、サイクルプロファイルに含み得る追加の工程である。融解曲線分析は、DNA二本鎖の半分が一本鎖に分離した温度として定義される融解温度 (T_m) と呼ばれる特徴的な温度でDNAが融解するという事実に基づいている。DNAの融解温度は、主にそのヌクレオチド組成に依存する。したがって、GおよびCヌクレオチドが豊富なDNA分子は、AおよびTヌクレオチドが豊富なDNA分子よりも高い T_m を有する。シグナルが失われる温度を検出することにより、プローブの融解温度を決定し得る。同様に、シグナルが発生する温度を検出することにより、プローブのアニール温度を決定し得る。プラスモジウム増幅産物からのプラスモジウムプローブの融解温度により、サンプル中のプラスモジウムの存在または非存在を確認し得る。

20

【0100】

各サーモサイクラーランの間に、対照サンプルも同様にサイクルし得る。陽性対照サンプルは、例えば、対照プライマーおよび対照プローブを使用して、(記載された標的遺伝子の増幅産物以外の)標的核酸対照鋳型を増幅し得る。陽性対照サンプルはまた、例えば標的核酸分子を含むプラスミドコンストラクトを増幅し得る。そのようなプラスミド対照は、意図された標的の検出に使用されるのと同じプライマーおよびプローブを使用して、内部で(例えば、サンプル中で)または患者のサンプルと並んで実行される別々のサンプル中で増幅し得る。そのような対照は、増幅、ハイブリダイゼーションおよび/またはFRET反応の成功または失敗の指標である。各サーモサイクラー実行はまた、例えば標的鋳型DNAを欠く陰性対照を含み得る。陰性対照は汚染を測定し得る。これにより、システムおよび試薬が偽陽性シグナルを生じないことが保証される。したがって、対照反応は、例えば、プライマーが配列特異性によりアニールし、伸長を開始する能力、ならびにプローブが配列特異性によりハイブリダイズし、FRETが発生する能力を容易に決定し得る。

30

【0101】

一実施形態では、本方法は、汚染を回避する工程を含む。例えば、ウラシル-DNAグリコシラーゼを利用する酵素的方法は、あるサーモサイクラー運転と次のサーモサイクラー運転との間の汚染を低減または排除するために、米国特許第5,035,996号、同第5,683,896号および同第5,945,313号に記載される。

40

【0102】

FRET技術と組み合わせた従来PCR法を使用して、この方法を実施し得る。一実施形態では、LightCycler(登録商標)機器が使用される。以下の特許出願：国際特許公開第97/46707号、第97/46714号、および第97/46712号は、LightCycler(登録商標)技術で使用されるリアルタイムPCRを記載している。

【0103】

LightCycler(登録商標)は、PCワークステーションを使用して動作させ得、Window NTオペレーティングシステムを利用し得る。サンプルからのシグナ

50

ルは、機械が光学ユニット上に毛細管を順次配置するときを得られる。ソフトウェアは、各測定の後リアルタイムで蛍光シグナルを表示し得る。蛍光取得時間は10～100ミリ秒(ms)である。各サイクリング工程の後、蛍光対サイクル数の定量的表示を、全てのサンプルについて連続的に更新し得る。生成されたデータは、さらなる分析のために保存し得る。

【0104】

FRETの代替として、蛍光DNA結合色素(例えば、SYBR(登録商標)GreenまたはSYBR(登録商標)Gold(Molecular Probes))のような二本鎖DNA結合色素を用いて、増幅産物を検出し得る。二本鎖核酸との相互作用の際、このような蛍光DNA結合色素は、好適な波長の光で励起した後、蛍光シグナルを発する。また、核酸インターカレート色素などの二本鎖DNA結合色素をも使用し得る。二本鎖DNA結合色素を使用する場合、増幅産物の存在を確認するために、通常は融解曲線分析を行う。

10

【0105】

当業者は、他の核酸またはシグナル増幅方法も使用され得ることを理解するであろう。そのような方法の例としては、限定されないが、分岐DNAシグナル増幅、ループ媒介等温増幅(LAMP)、核酸配列ベース増幅(NASBA)、自立配列複製(3SR)、鎖置換増幅(SDA)、またはスマート増幅プロセスバージョン2(SMAP2)が挙げられる。

【0106】

本開示の実施形態は、1つ以上の市販の機器の構成によって限定されないことが理解される。

20

【0107】

製造品/キット

本開示の実施形態は、マラリア原虫(プラスモジウムを含む)を検出するための製造品またはキットをさらに提供する。製造品は、適切な包装材料と共に、プラスモジウム遺伝子標的を検出するために使用されるプライマーおよびプローブを含み得る。プラスモジウムの検出のための代表的なプライマーおよびプローブは、プラスモジウム標的核酸分子にハイブリダイズし得る。さらに、キットはまた、固体支持体、緩衝液、酵素およびDNA標準のような、DNA固定化、ハイブリダイゼーションおよび検出に必要な適切に包装された試薬および材料を含み得る。プライマーおよびプローブを設計する方法は本明細書に開示されており、プラスモジウム標的核酸分子を増幅およびハイブリダイズするプライマーおよびプローブの代表的な例が提供される。

30

【0108】

製造品はまた、プローブを標識するための1種以上の蛍光部分を含み得、あるいは、キットと共に供給されるプローブを標識し得る。例えば、製造品は、プラスモジウムプローブを標識するためのドナーおよび/またはアクセプター蛍光部分を含み得る。好適なFRETドナー蛍光部分および対応するアクセプター蛍光部分の例を上記に提供する。

【0109】

製造品はまた、プラスモジウムプライマーおよびプローブを使用してサンプル中のプラスモジウムを検出するための説明書を有する添付文書または包装ラベルを含み得る。製造品は、本明細書に記載される方法を実施するための試薬(例えば、緩衝液、ポリメラーゼ酵素、補因子、または汚染を防止するための薬剤)をさらに含み得る。そのような試薬は、本明細書に記載の市販の機器の1つに特異的であり得る。

40

【0110】

本開示の実施形態はまた、サンプル中のマラリア原虫(プラスモジウムを含む)を検出するための一セットのプライマーおよび1以上の検出可能なプローブを提供する。

【実施例】

【0111】

本開示の実施形態は、特許請求の範囲に記載される発明の範囲を限定しない以下の実施

50

例においてさらに説明される。

【0112】

以下の実施例および図面は、主題の理解を助けるために提供されており、その主題の真の範囲は、添付の特許請求の範囲に記載されている。本発明の要旨から逸脱することなく、記載された手順に変更を加え得ることが理解される。

【0113】

この試験では、完全に自動化されたサンプル調製（核酸の抽出および精製）に続いてPCR増幅および検出を実施した。使用したシステムは、サンプル供給モジュール、移動モジュール、処理モジュール、および分析モジュールからなる、cobas（登録商標）6800/8800システムであった。

【0114】

標的核酸の選択的増幅は、標的核酸の高度に保存された領域から選択された特異的フォワードプライマーおよびリバースプライマーの使用によって達成された。熱安定性DNAポリメラーゼ酵素を逆転写および増幅の両方に使用した。マスターミックスは、新たに合成されたDNA（増幅産物またはアンプリコン）に組み込まれるデオキシチミジン三リン酸（dTTP）の代わりにデオキシウリジン三リン酸（dUTP）を含んでいた。以前のPCR実行からの混入アンプリコンはいずれも、第1の熱サイクル工程で加熱することにより、PCRミックスに含まれていたAmpErase酵素（ウラシル-N-グリコシラーゼ）によって破壊された。しかし、AmpErase酵素は55°Cを超える温度に一度曝露されると不活性化されたので、新たに形成されたアンプリコンは破壊されなかった。

【0115】

cobas（登録商標）プラスモジウムマスターミックスは、プラスモジウムおよび対照核酸に特異的な検出プローブを含んでいた。特定のプラスモジウムおよび対照検出プローブをそれぞれ、レポーターとして作用する2種のユニークな蛍光色素のうちの1種で標識した。それぞれのプローブは、クエンチャーとして作用する第2の色素も有していた。レポーター色素は、規定された波長で測定され、したがって、増幅されたプラスモジウム標的および対照の検出および識別を可能にする。完全なプローブの蛍光シグナルは、クエンチャー色素によって抑制された。PCR増幅工程の間、プローブの特異的な一本鎖DNA鑄型へのハイブリダイゼーションにより、DNAポリメラーゼの5'から3'へのヌクレアーゼ活性により切断され、レポーター色素およびクエンチャー色素が分離し、蛍光シグナルが産生された。各PCRサイクルに伴い、切断プローブ量が増加し、レポーター色素の累積シグナルが同時に増加した。2種の特定のレポーター色素が規定の波長で測定されるので、増幅されたプラスモジウム標的および対照の同時検出および識別が可能であった。

【0116】

プラスモジウム試験用のプライマーおよびプローブは、アラインメントに基づいて最も保存された領域にゲノムに沿ってプライマーおよびプローブを播種することによって設計した。次いで、プライマーおよびプローブをアッセイに組み合わせ、アッセイを、インシリコ評価における包含性および排他性に基づいてスコア化した。ゲノム保存に加えて、ゲノム範囲（どの配列が公的に入手可能であるかに大いに依存する）もアッセイのスコアリングに含まれた。プラスモジウムゲノムの標的領域は、ミトコンドリアDNA標的（MT-1およびMT-2）、RNA反復配列R125、および18SリボソームRNAであった。開示されたマラリア原虫アッセイは、以下のプラスモジウム属種：熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、サルマラリア原虫を検出し得る汎マラリアアッセイであるように設計されている。このアッセイは、密接に関連する種（例えば、寄生生物および細菌）およびヒトと相同性を共有する標的配列、ならびに様々なアッセイ試薬に見られ得る環境DNAを除外する。マラリアアッセイは、全血などの生物学的サンプルなどのサンプル中のプラスモジウム種を検出するように設計されている。開示されたマラリアアッセイは、約1.1mlの全血中のプラスモジウム種を検出する。いくつかの状況では、全血サンプルは、採血される全血が採血容器内の核酸安定

10

20

30

40

50

化溶液に直ちに接触するように、核酸を含む全血成分を溶解、変性、安定化する試薬 / 溶液、例えば核酸安定化溶液もその中に含む、真空チューブ / 容器などのチューブ / 容器内にある。配列番号 16 および 17 の核酸配列を有する開示されたプライマー対、ならびに配列番号 18 ~ 20 の核酸配列を有する開示されたプローブは、ミトコンドリア DNA 標的 MT - 1 を検出および / または増幅する。配列番号 11 ~ 14 の核酸配列を有する開示されたプライマー、および配列番号 15 の核酸配列を有する開示されたプローブは、ミトコンドリア DNA 標的 MT - 2 を検出および / または増幅する。配列番号 21、22 および 26 の核酸配列を有する開示されたプライマー対、ならびに配列番号 23 ~ 25 の核酸配列を有する開示されたプローブは、RNA 反復配列 R 125 を検出および / または増幅する。配列番号 1 および 2 の核酸配列を有する開示されたプライマー対、ならびに配列番号 3 および / または 4 の核酸配列を有する開示されたプローブは、18S リボソーム RNA 標的 18S - 1 を検出および / または増幅する。配列番号 5 および 6 の核酸配列を有する開示されたプライマー対、ならびに配列番号 7 の核酸配列を有する開示されたプローブは、18S リボソーム RNA 標的 18S - 3 を検出および / または増幅する。配列番号 8 および 9 の核酸配列を有する開示されたプライマー対、ならびに配列番号 10 の核酸配列を有する開示されたプローブは、18S リボソーム RNA 標的 18S - 4 を検出および / または増幅する。

10

【 0 1 1 7 】

実施例 1 : リアルタイム PCR による熱帯熱マラリア原虫の増幅および検出

プラスモジウム核酸アッセイを、ATCC (カタログ番号 30930) からの熱帯熱マラリア原虫培養物からの熱帯熱マラリア原虫を使用して試験し、全ての標的 (18S rRNA 遺伝子 (18S - 1、18S - 3、18S - 4 を含む)、ミトコンドリア遺伝子 (MT - 1 および MT - 2)、および R - 125 についてシングルプレックスフォーマットで試験を行った。熱帯熱マラリア原虫の 6 つの異なる希釈レベル : 希釈なし、1 : 10、1 : 10²、1 : 10³、1 : 10⁴、および 1 : 10⁵ でプラスモジウムアッセイを試験した。使用される試薬としては、cobas (登録商標) 6800 / 8800 と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有する cobas (登録証用) 6800 / 8800 汎用 PCR Master Mix、および TaqMan (登録商標) 増幅および検出技術を使用することが挙げられる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、プライマーについては 0.3 μM、プローブについては 0.2 μM であった。使用した cobas (登録商標) 6800 / 8800 PCR プロファイルを以下の表 2 に示す :

20

30

【 表 2 】

cobas (登録商標) 6800 / 8800 PCR プロファイル				
工程	サイクル	標的 (°C)	ホールドタイム (hh:mm:ss)	Ramp
Pre-PCR	1	50	00:02:00	4.4
		94	00:00:05	4.4
		55	00:02:00	2.2
		60	00:06:00	4.4
		65	00:04:00	4.4
1. Meas	5	95	00:00:05	4.4
		55	00:00:30	2.2
2. Meas	45	91	00:00:05	4.4
		58	00:00:25	2.2
Post	1	40	00:02:00	2.2

40

50

【 0 1 1 8 】

18S - 1 標的に対する試験では、配列番号 1 および 2 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 3 の核酸配列を有するプローブとを用い、その結果を図 2 A に示す。18S - 3 標的に対する試験では、配列番号 5 および 6 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 7 の核酸配列を有するプローブとを用い、その結果を図 2 B に示す。18S - 4 標的に対する試験では、配列番号 8 および 9 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 10 の核酸配列を有するプローブとを用い、その結果を図 2 C に示す。MT - 1 標的に対する検討では、配列番号 16 および 17 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 18 の核酸配列を有するプローブとを用い、その結果を図 2 D に示す。MT - 2 標的に対する試験では、配列番号 11 および 12 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 15 の核酸配列を有するプローブを用い、その結果を図 2 E に示す。R125 標的に対する試験では、配列番号 21 および 22 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 23 の核酸配列を有するプローブとを用い、その結果を図 2 F に示す。図 2 A ~ 2 F および図 3 は、試験した全ての希釈レベルで全ての標的が検出されたことを示す。図 3 は、1 : 10⁵ 希釈レベルでの溶出液のデータをまとめて示す。

10

【 0 1 1 9 】

18S - 1 標的の RFI 信号を改善するために、プローブを再設計して T_m を増加させた。その目的のために、今回は配列番号 1 および 2 の核酸配列を有するプライマー、ならびに配列番号 4 の核酸配列を有するプローブを使用して、18S - 1 標的についてのさらなる試験を行った。元の 18S - 1 プローブ (配列番号 3) と再設計された 18S - 1 プローブ (配列番号 4) の結果を比較し、再設計された 18S - 1 プローブが RFI シグナルを改善したことを示し、その結果を図 4 に示す。

20

【 0 1 2 0 】

したがって、これらの結果により、プラスモジウムアッセイのプライマーおよびプローブがリアルタイム PCR アッセイにおいて効率的かつ特異的に熱帯熱マラリア原虫の存在を増幅および検出し得ることを実証している。

【 0 1 2 1 】

実施例 2 : 熱帯熱マラリア原虫培養物のコピー数定量のための液滴デジタル PCR (ddPCR)

液滴デジタル PCR (ddPCR) アッセイを使用して、ATCC (カタログ番号 30930) からの熱帯熱マラリア原虫培養物からの熱帯熱マラリア原虫を使用して、インビトロ転写物、DNA ミニ遺伝子、および熱帯熱マラリア原虫培養物のストック標的コピー数を決定した。ddPCR アッセイでは、全ての標的 (18S rRNA 遺伝子 (18S - 1、18S - 3、18S - 4 を含む)、ミトコンドリア遺伝子 (MT - 1 および MT - 2)、および R - 125 をシングルプレックス形式で試験した。18S - 1 標的に対する試験では、配列番号 1 および 2 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 37 の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S - 3 標的に対する試験では、配列番号 5 および 6 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 38 の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S - 4 標的に対する試験では、配列番号 8 および 9 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 39 の核酸配列を有するプローブとを用いた。MT - 1 標的に対する試験では、配列番号 16 および 17 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 42 の核酸配列を有するプローブとを用いた。MT - 2 標的に対する試験では、配列番号 11 および 12 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 41 の核酸配列を有するプローブとを用いた。R125 標的に対する試験では、配列番号 21 および 22 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 40 の核酸配列を有するプローブとを用いた。実施例 1 と同様に、使用される試薬としては、cobas (登録商標) 6800 / 8800 と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有し、TaqMan (登録商標) 増幅および検出技術を使用する、cobas (登録商標) 6800 / 8800 generic PCR Master Mix が挙げられる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、プライマーについては 0.3 μM、プローブについては 0.2 μM であった。使用した cobas

30

40

50

(登録商標) 6800 / 8800 PCRプロファイルを上記の表2に示す。

【0122】

熱帯熱マラリア原虫培養物のddPCR結果は、RNA標的がDNA標的よりもはるかに多いことを示し、図5に示す。結果は、熱帯熱マラリア原虫培養物の1:10⁵培養希釈物のコピー数(μlあたり)を示し、18S-3、MT-1およびMT-2標的と比較して、18S-1、18S-4およびR125標的のコピー数が高いことを示す。

【0123】

したがって、これらの試験により、熱帯熱マラリア原虫培養物内の18S-1、18S-4、およびR125標的のコピー数が高いことが示される。

【0124】

実施例3:リアルタイムPCRによる熱帯熱マラリア原虫培養物中の18S-1および18S-4標的のマルチプレックス増幅および検出

18S-1および18S-4は、ATCC(カタログ番号30930)由来の熱帯熱マラリア原虫培養物からの熱帯熱マラリア原虫において最も高い発現標的であったので(実施例2、図5参照)、同じサンプル内の18S-1および18S-4標的(すなわち、二重)を同時に増幅および検出するためのマルチプレックスアッセイを設計および開発した。特に、18S-1および18S-4標的をマルチプレックスとして試験して、2つの18S標的が感受性を改善するかどうかを判定した。一般に、複数のコピー標的を並行して検出することにより、感度の向上が可能になり、また、複数の標的をカバーすることによって任意の1つのシングルプレックスアッセイが失敗するリスクが軽減する。このマルチプレックスアッセイを、500ngのヒト全血ゲノムDNA/全RNAのバックグラウンドにおいて、熱帯熱マラリア原虫の4つの異なる希釈レベル(1:10⁴、1:10⁵、1:10⁶、1:10⁷)で試験した。使用される試薬としては、cobas(登録商標)6800/8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas(登録証用)6800/8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan(登録商標)増幅および検出技術を使用することが挙げられる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、プライマーについては0.3μM、プローブについては0.2μMであった。使用したcobas(登録商標)6800/8800PCRプロファイルを上記の表2に示す。18S-1標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号1および2の核酸配列を有するプライマーと、配列番号4の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-4標的について、このマルチプレックス解析では、配列番号8および9の核酸配列を有するプライマーと、配列番号10の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-1および18S-4標的をFAMチャンネルで流し、内部対照(GIC)をCy5.5チャンネルで流した。データを図6Aに示し、結果を図6Bに示す。具体的には、図6Aおよび図6Bは、18S-1および18S-4のCt値は同等であるが、18S-1のRFIは18S-4のRFIよりも高いことを示す。これらの結果により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの18S-1および18S-4標的を効果的かつ同時に増幅および検出することが示される。全血バックグラウンドがマルチプレックスアッセイに与える影響に関する試験では、非特異的相互作用および/または有意なPCR阻害の問題は確認されなかった(データは示さず)。

【0125】

これらの試験により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの18S-1および18S-4標的を首尾よくかつ効果的に同時に増幅および検出し得ることが実証されている。

【0126】

実施例4:リアルタイムPCRによる熱帯熱マラリア原虫培養物中の18S-1およびR125標的のマルチプレックス増幅および検出

同じサンプル内の18S-1標的およびR125標的を同時に(すなわち、二重に)増幅および検出するためのマルチプレックスアッセイを設計および開発した。一般に、複数のコピー標的を並行して検出することにより、感度の向上が可能になり、また、複数の標

10

20

30

40

50

的をカバーすることによって任意の1つのシングルプレックスアッセイが失敗するリスクが軽減する。例えば、配列バリエーションが、例えば18S配列中に存在する場合、既存のプライマー/プローブセットで18S配列バリエーションを検出できないリスクは、第2の別個の標的を検出する別のプライマー/プローブのセットの存在によって軽減される。これは、シングルプレックスアッセイに対するマルチプレックスアッセイの最大の利点である。この例では、500 ngの全血ゲノムDNAのバックグラウンドにおいて、4つの異なる希釈レベルの熱帯熱マラリア原虫(1:10⁴、1:10⁵、1:10⁶、1:10⁷)でこのマルチプレックスアッセイを試験した。使用される試薬としては、cobas(登録商標)6800/8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas(登録証用)6800/8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan(登録商標)増幅および検出技術を使用することが挙げられる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、プライマーについては0.3 μM、プローブについては0.2 μMであった。使用したcobas(登録商標)6800/8800 PCRプロファイルを上記の表2に示す。18S-1標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号1および2の核酸配列を有するプライマーと、配列番号4の核酸配列を有するプローブとを用いた。R125標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号21および22の核酸配列を有するプライマーと、配列番号25の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-1およびR125標的をFAMチャンネルで流し、内部対照(GIC)をCy5.5チャンネルで流した。データを図7Aに示し、結果を図7Bに示す。データは、18S-1およびR125のCt値は同等であるが、18S-1のRFIはR125のそれよりも高いことを示す。これらの結果により、マルチプレックスアッセイがプラスモジウムの18S-1およびR125標的を効果的かつ同時に増幅および検出することが示される。全血バックグラウンドがマルチプレックスアッセイに与える影響に関する試験では、非特異的相互作用および/または有意なPCR阻害の問題は確認されなかった(データは示さず)。

10

20

【0127】

これらの試験により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの18S-1およびR125標的を首尾よくかつ効果的に同時に増幅および検出し得ることが実証される。

【0128】

実施例5：全血中のインビトロ転写物の18S-1およびR125標的のマルチプレックス増幅および検出

30

同じサンプル内の18S-1標的およびR125標的を同時に(すなわち、二重に)増幅および検出するように設計および開発され、上記の実施例4に記載されたマルチプレックスアッセイを、18S-1およびR125標的のインビトロ転写物に対して試験し、次いで全血から抽出したDNA/RNAに添加した。前述のように、一般に、複数のコピー標的を並行して検出することにより、感度の向上が可能になり、また、複数の標的をカバーすることによって任意の1つのシングルプレックスアッセイが失敗するリスクが軽減する。例えば、配列バリエーションが、例えば18S配列中に存在する場合、既存のプライマー/プローブセットで18S配列バリエーションを検出できないリスクは、第2の別個の標的を検出する別のプライマー/プローブのセットの存在によって軽減される。これは、シングルプレックスアッセイに対するマルチプレックスアッセイの最大の利点である。この実施例では、このマルチプレックスアッセイを、500 ngの全血ゲノムDNA/RNAのバックグラウンドにおいて、18S-1およびR125:10⁵、10⁴、10³、10²、ならびに10コピーの5つの異なるレベルのインビトロ転写物で試験した。18S-1およびR125転写物のインビトロ転写物ストックのコピー数をddPCRによって定量した。使用される試薬としては、cobas(登録商標)6800/8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas(登録証用)6800/8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan(登録商標)増幅および検出技術を使用することが挙げられる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、プライマーについては0.3 μM、プローブについては0.2 μMであった。使用した

40

50

c o b a s (登録商標) 6 8 0 0 / 8 8 0 0 P C R プロファイルを上記の表 2 に示す。1 8 S - 1 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 1 および 2 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 4 の核酸配列を有するプローブとを用いた。R 1 2 5 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 2 1 および 2 2 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 2 5 の核酸配列を有するプローブとを用いた。1 8 S - 1 および R 1 2 5 標的を F A M チャンネルで流し、内部対照 (G I C) を C y 5 . 5 チャンネルで流した。マルチプレックスアッセイも、比較のために、シングルプレックスアッセイとして別々に実行した。データを図 8 に示し、これは、マルチプレックスおよびシングルプレックスアッセイが 1 0 コピーの入力に対して感受性であったことを示している。全血バックグラウンドがマルチプレックスアッセイに与える影響に関する試験では、非特異的相互作用および / または有意な P C R 阻害の問題は確認されなかった (データは示さず)。

【 0 1 2 9 】

これらの試験により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの 1 8 S - 1 および R 1 2 5 標的を首尾よくかつ効果的に同時に増幅および検出し得ることが実証される。

【 0 1 3 0 】

実施例 6 : 全血中のインビトロ転写物の R 1 2 5 標的の増幅および検出

R 1 2 5 標的についてのシングルプレックスアッセイでは、新しい再設計されたフォワードプライマーを R 1 2 5 標的のインビトロ転写物 (1 0 ³ コピー) に対して試験し、次いで全血から抽出した D N A / R N A に添加した。フォワードプライマーは配列番号 2 6 の核酸配列を有し、リバースプライマーは配列番号 2 2 の核酸配列を有し、プローブは配列番号 2 5 の核酸配列を有する。R 1 2 5 転写物のインビトロ転写物ストックのコピー数を、上記のように d d P C R によって定量した。R 1 2 5 標的を F A M チャンネルで流し、内部対照 (G I C) を C y 5 . 5 チャンネルで流した。結果を、再設計されたオリゴヌクレオチドセット (配列番号 2 2 、 2 5 および 2 6) が、マラリア原虫を含むマラリア原虫由来の R 1 2 5 標的を増幅および検出し得ることを示す、図 9 に示す。

【 0 1 3 1 】

これらの試験により、シングルプレックスアッセイが、プラスモジウムの R 1 2 5 標的を首尾よく効果的に増幅および検出し得ることが実証される。

【 0 1 3 2 】

実施例 7 : リアルタイム P C R による熱帯熱マラリア原虫培養物中の 1 8 S - 1 および R 1 2 5 標的のマルチプレックス増幅および検出

同じサンプル内の 1 8 S - 1 標的および R 1 2 5 標的を同時に (すなわち、二重に) 増幅および検出するためのマルチプレックスアッセイを設計および開発した。一般に、複数のコピー標的を並行して検出することにより、感度の向上が可能になり、また、複数の標的をカバーすることによって任意の 1 つのシングルプレックスアッセイが失敗するリスクが軽減する。例えば、配列バリエーションが、例えば 1 8 S 配列中に存在する場合、既存のプライマー / プローブセットで 1 8 S 配列バリエーションを検出できないリスクは、第 2 の別個の標的を検出する別のプライマー / プローブのセットの存在によって軽減される。これは、シングルプレックスアッセイに対するマルチプレックスアッセイの最大の利点である。この実施例では、このマルチプレックスアッセイを、c o b a s (登録商標) 6 8 0 0 / 8 8 0 0 装置で抽出した全血核酸のバックグラウンドにおいて、4 つの異なる希釈レベルの熱帯熱マラリア原虫 (1 : 1 0 ⁴ 、 1 : 1 0 ⁵ 、 1 : 1 0 ⁶ 、 1 : 1 0 ⁷) で試験した。使用される試薬としては、c o b a s (登録商標) 6 8 0 0 / 8 8 0 0 と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有する c o b a s (登録証用) 6 8 0 0 / 8 8 0 0 汎用 P C R M a s t e r M i x 、 および T a q M a n (登録商標) 増幅および検出技術を使用することが挙げられる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、プライマーについては 0 . 3 μ M 、 プローブについては 0 . 2 μ M であった。使用した c o b a s (登録商標) 6 8 0 0 / 8 8 0 0 P C R プロファイルを上記の表 2 に示す。1 8 S - 1 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 3 4 および 3 6 の核

酸配列を有するプライマーと、配列番号4の核酸配列を有するプローブとを用いた。R125標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号22および27の核酸配列を有するプライマーと、配列番号25の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-1およびR125標的をFAMチャンネルで流し、内部対照(GIC)をCy5.5チャンネルで流した。データを図10Aに、結果を図10Bに示す。データは、18S-1およびR125のCt値は同等であるが、18S-1のRFIはR125のそれよりも高いことを示す。これらの結果により、マルチプレックスアッセイがプラスモジウムの18S-1およびR125標的を効果的かつ同時に増幅および検出することが示される。全血バックグラウンドがマルチプレックスアッセイに与える影響に関する試験では、非特異的相互作用および/または有意なPCR阻害の問題は確認されなかった(データは示さず)。

10

【0133】

これらの試験により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの18S-1およびR125標的を首尾よくかつ効果的に同時に増幅および検出し得ることが実証される。

【0134】

実施例8：リアルタイムPCRによる熱帯熱マラリア原虫培養物中の18S-1および18S-3標的のマルチプレックス増幅および検出

同じサンプル内の18S rRNA領域(18S-1および18S-3)で2つの標的を同時に(すなわち、二重に)増幅および検出するために、マルチプレックスアッセイを設計および開発した。一般に、複数のコピー標的を並行して検出することにより、感度の向上が可能になり、また、複数の標的をカバーすることによって任意の1つのシングルプレックスアッセイが失敗するリスクが軽減する。例えば、配列バリエーションが、例えば18S配列中に存在する場合、既存のプライマー/プローブセットで18S配列バリエーションを検出できないリスクは、第2の別個の標的を検出する別のプライマー/プローブのセットの存在によって軽減される。これは、シングルプレックスアッセイに対するマルチプレックスアッセイの最大の利点である。この実施例では、このマルチプレックスアッセイを、cobas(登録商標)6800/8800装置で抽出した全血核酸のバックグラウンドにおいて、2つの異なる希釈レベルの熱帯熱マラリア原虫(1:10⁴および1:10⁵)で試験した。使用される試薬としては、cobas(登録商標)6800/8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas(登録証用)6800/8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan(登録商標)増幅および検出技術を使用することが挙げられる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、プライマーについては0.3 μM、プローブについては0.2 μMであった。使用したcobas(登録商標)6800/8800 PCRプロファイルを上記の表2に示す。18S-1標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号34~36の核酸配列を有するプライマーと、配列番号4の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-3標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号56および57の核酸配列を有するプライマーと、配列番号58の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-1および18S-3標的をFAMチャンネルで流し、内部対照(GIC)をCy5.5チャンネルで流した。この18S-1および18S-3マルチプレックスマラリアアッセイの結果を図11に示す。これらの結果により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの18S-1および18S-3標的を効果的かつ同時に増幅および検出することが示される。全血バックグラウンドがマルチプレックスアッセイに与える影響に関する試験では、非特異的相互作用および/または有意なPCR阻害の問題は確認されなかった(データは示さず)。

20

30

40

【0135】

これらの試験により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの18S rRNA(18S-1および18S-3標的)領域を首尾よくかつ効果的に同時に増幅および検出し得ることが実証される。

【0136】

実施例9：リアルタイムPCRによる三日熱マラリア原虫培養における18S-1およ

50

び 18S - 3 標的のマルチプレックス増幅および検出

同じサンプル内の 18S rRNA 領域 (18S - 1 および 18S - 3) で 2 つの標的を同時に (すなわち、二重に) 増幅および検出するために、マルチプレックスアッセイを設計および開発した。一般に、複数のコピー標的を並行して検出することにより、感度の向上が可能になり、また、複数の標的をカバーすることによって任意の 1 つのシングルプレックスアッセイが失敗するリスクが軽減する。例えば、配列バリエーションが、例えば 18S 配列中に存在する場合、既存のプライマー/プローブセットで 18S 配列バリエーションを検出できないリスクは、第 2 の別個の標的を検出する別のプライマー/プローブのセットの存在によって軽減される。これは、シングルプレックスアッセイに対するマルチプレックスアッセイの最大の利点である。この実施例では、このマルチプレックスアッセイを、Cobas (登録商標) 6800 / 8800 装置で抽出した全血核酸のバックグラウンドにおいて、4 つの異なる希釈レベルの三日熱マラリア原虫 (1 : 10³ および 1 : 10⁴) で試験した。使用される試薬としては、cobas (登録商標) 6800 / 8800 と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有する cobas (登録証用) 6800 / 8800 汎用 PCR Master Mix、および TaqMan (登録商標) 増幅および検出技術を使用することが挙げられる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、プライマーについては 0.3 μM、プローブについては 0.2 μM であった。使用した cobas (登録商標) 6800 / 8800 PCR プロファイルを上記の表 2 に示す。18S - 1 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 34 ~ 36 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 4 の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S - 3 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 56 および 57 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 58 の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S - 1 および 18S - 3 標的を FAM チャネルで流し、内部対照 (GIC) を Cy5.5 チャネルで流した。この 18S - 1 および 18S - 3 マルチプレックスマラリアアッセイの結果を図 12 に示す。これらの結果により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの 18S - 1 および 18S - 3 標的を効果的かつ同時に増幅および検出することが示される。全血バックグラウンドがマルチプレックスアッセイに与える影響に関する試験では、非特異的相互作用および / または有意な PCR 阻害の問題は確認されなかった (データは示さず)。

【0137】

これらの試験により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの 18S rRNA (18S - 1 および 18S - 3 標的) 領域を首尾よくかつ効果的に同時に増幅および検出し得ることが実証される。

【0138】

実施例 10 : リアルタイム PCR によるサルマラリア原虫の 18S rRNA 配列中の 18S - 1 および 18S - 3 標的のマルチプレックス増幅および検出

同じサンプル内の 18S rRNA 領域 (18S - 1 および 18S - 3) で 2 つの標的を同時に (すなわち、二重に) 増幅および検出するために、マルチプレックスアッセイを設計および開発した。一般に、複数のコピー標的を並行して検出することにより、感度の向上が可能になり、また、複数の標的をカバーすることによって任意の 1 つのシングルプレックスアッセイが失敗するリスクが軽減する。例えば、配列バリエーションが、例えば 18S 配列中に存在する場合、既存のプライマー/プローブセットで 18S 配列バリエーションを検出できないリスクは、第 2 の別個の標的を検出する別のプライマー/プローブのセットの存在によって軽減される。これは、シングルプレックスアッセイに対するマルチプレックスアッセイの最大の利点である。この実施例では、このマルチプレックスアッセイを、PCR 反応レベル当たり 1,000 コピーでサルマラリア原虫 18S rRNA 配列を含有する DNA プラスミドに対して試験した。使用される試薬としては、cobas (登録商標) 6800 / 8800 と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有する cobas (登録証用) 6800 / 8800 汎用 PCR Master Mix、および TaqMan (登録商標) 増幅および検出技術を使用することが挙げられる。マスターミックス

中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、プライマーについては0.3 μM、プローブについては0.2 μMであった。使用したcobas（登録商標）6800/8800 PCRプロファイルを上記の表2に示す。18S-1標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号34～36の核酸配列を有するプライマーと、配列番号4の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-3標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号56および57の核酸配列を有するプライマーと、配列番号58の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-1および18S-3標的をFAMチャンネルで流し、内部対照（GIC）をCy5.5チャンネルで流した。この18S-1および18S-3マルチプレックスマラリアアッセイの結果を図13に示す。これらの結果により、マルチプレックスアッセイが、サルマラリア原虫18S rRNA配列を含有するDNAプラスミドの18S-1および18S-3標的を効果的かつ同時に増幅および検出することが示される。

10

【0139】

これらの試験により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの18S rRNA（18S-1および18S-3標的）領域を首尾よくかつ効果的に同時に増幅および検出し得ることが実証される。

【0140】

実施例11：リアルタイムPCRによる四日熱マラリア原虫18S rRNA配列中の18S-1および18S-3標的のマルチプレックス多重増幅および検出

同じサンプル内の18S rRNA領域（18S-1および18S-3）で2つの標的を同時に（すなわち、二重に）増幅および検出するために、マルチプレックスアッセイを設計および開発した。一般に、複数のコピー標的を並行して検出することにより、感度の向上が可能になり、また、複数の標的をカバーすることによって任意の1つのシングルプレックスアッセイが失敗するリスクが軽減する。例えば、配列バリエーションが、例えば18S配列中に存在する場合、既存のプライマー/プローブセットで18S配列バリエーションを検出できないリスクは、第2の別個の標的を検出する別のプライマー/プローブのセットの存在によって軽減される。これは、シングルプレックスアッセイに対するマルチプレックスアッセイの最大の利点である。この実施例では、このマルチプレックスアッセイを、PCR反応レベル当たり1,000コピーで、四日熱マラリア原虫18S rRNA配列を含有するDNAプラスミドに対して試験した。使用される試薬としては、cobas（登録商標）6800/8800と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有するcobas（登録証用）6800/8800汎用PCR Master Mix、およびTaqMan（登録商標）増幅および検出技術を使用することが挙げられる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、プライマーについては0.3 μM、プローブについては0.2 μMであった。使用したcobas（登録商標）6800/8800 PCRプロファイルを上記の表2に示す。18S-1標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号34～36の核酸配列を有するプライマーと、配列番号4の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-3標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号56および57の核酸配列を有するプライマーと、配列番号58の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S-1および18S-3標的をFAMチャンネルで流し、内部対照（GIC）をCy5.5チャンネルで流した。この18S-1および18S-3マルチプレックスマラリアアッセイの結果を図14に示す。これらの結果により、マルチプレックスアッセイが、四日熱マラリア原虫18S rRNA配列を含有するDNAプラスミドの18S-1および18S-3標的を効果的かつ同時に増幅および検出することが示される。

20

30

40

【0141】

これらの試験により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの18S rRNA（18S-1および18S-3標的）領域を首尾よくかつ効果的に同時に増幅および検出し得ることが実証される。

【0142】

50

実施例 12 : リアルタイム PCR による卵形マラリア原虫 18S rRNA 配列中の 18S - 1 および 18S - 3 標的のマルチプレックス増幅および検出

同じサンプル内の 18S rRNA 領域 (18S - 1 および 18S - 3) で 2 つの標的を同時に (すなわち、二重に) 増幅および検出するために、マルチプレックスアッセイを設計および開発した。一般に、複数のコピー標的を並行して検出することにより、感度の向上が可能になり、また、複数の標的をカバーすることによって任意の 1 つのシングルプレックスアッセイが失敗するリスクが軽減する。例えば、配列バリエーションが、例えば 18S 配列中に存在する場合、既存のプライマー/プローブセットで 18S 配列バリエーションを検出できないリスクは、第 2 の別個の標的を検出する別のプライマー/プローブのセットの存在によって軽減される。これは、シングルプレックスアッセイに対するマルチプレックスアッセイの最大の利点である。この実施例では、このマルチプレックスアッセイを、PCR 反応レベルあたり 1,000 コピーで、卵形マラリア原虫 18S rRNA 配列を含有する DNA プラスミドに対して試験した。使用される試薬としては、cobas (登録商標) 6800/8800 と共に使用するためのプロファイルおよび条件を有する cobas (登録証用) 6800/8800 汎用 PCR Master Mix、および TaqMan (登録商標) 増幅および検出技術を使用することが挙げられる。マスターミックス中のオリゴヌクレオチドの最終濃度は、プライマーについては 0.3 μM、プローブについては 0.2 μM であった。使用した cobas (登録商標) 6800/8800 PCR プロファイルを上記の表 2 に示す。18S - 1 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 34 ~ 36 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 4 の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S - 3 標的について、このマルチプレックスアッセイでは、配列番号 56 および 57 の核酸配列を有するプライマーと、配列番号 58 の核酸配列を有するプローブとを用いた。18S - 1 および 18S - 3 標的を FAM チャネルで流し、内部対照 (GIC) を Cy5.5 チャネルで流した。この 18S - 1 および 18S - 3 マルチプレックスマラリアアッセイの結果を図 15 に示す。これらの結果により、マルチプレックスアッセイが、卵形マラリア原虫 18S rRNA 配列を含有する DNA プラスミドの 18S - 1 および 18S - 3 標的を効果的かつ同時に増幅および検出することが示される。

【0143】

これらの試験により、マルチプレックスアッセイが、プラスモジウムの 18S rRNA (18S - 1 および 18S - 3 標的) 領域を首尾よくかつ効果的に同時に増幅および検出し得ることが実証される。特に、実施例 8 ~ 12 は、18S - 1 および 18S - 3 を標的とするマルチプレックスアッセイにより、18S - 1 標的に対するオリゴヌクレオチドが配列番号 34 ~ 36 の核酸配列を有するプライマーおよび配列番号 4 の核酸配列を有するプローブを有し、18S - 3 標的に対するオリゴヌクレオチドが配列番号 56 および 57 の核酸配列を有するプライマーおよび配列番号 58 の核酸配列を有するマラリア原虫 (プラスモジウム (熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、サルマラリア原虫、および四日熱マラリア原虫を含む) を含む) を特異的かつ効率的に増幅および検出することが実証される。

【0144】

したがって、まとめると、これらの結果により、配列番号 1 ~ 58 のオリゴヌクレオチドセットが全血中のマラリア原虫 (プラスモジウム (熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、サルマラリア原虫、および四日熱マラリア原虫を含む) を含む) を特異的かつ効率的に増幅および検出することが実証される。

【0145】

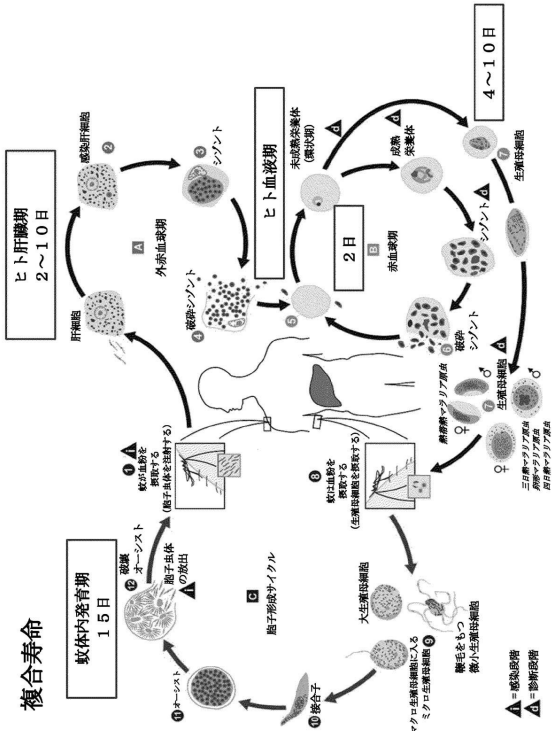
前述の発明を明確化および理解するためにある程度詳細に説明してきたが、本開示を読むことにより、本発明の真の範囲から逸脱することなく、形態および詳細の様々な変更を行い得ることが当業者には明らかであろう。例えば、上述した全ての技術および装置を、様々な組み合わせで使用し得る。本出願で引用される全ての刊行物、特許、特許出願、および/または他の文献は、あたかも各個別の刊行物、特許、特許出願、および/または他

の文献が全ての目的のために参照により組み込まれることが個別に示されているのと同程度に、全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。

【 図 面 】

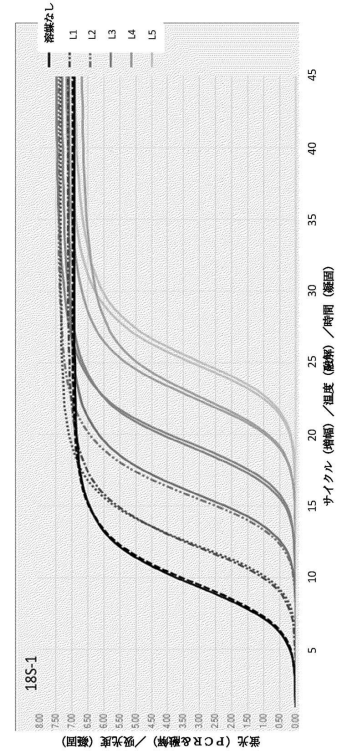
【 図 1 】

図 1



【 図 2 A 】

図 2 A



10

20

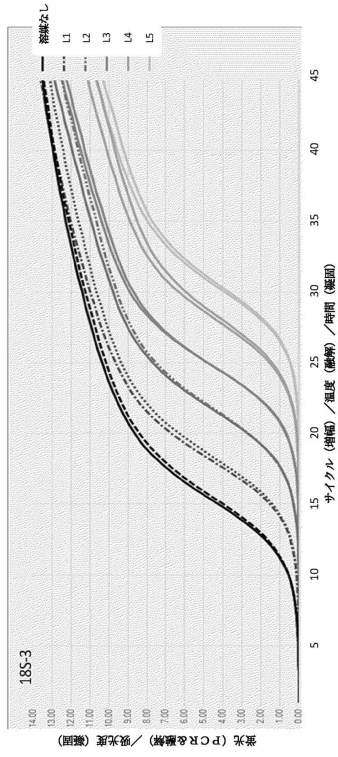
30

40

50

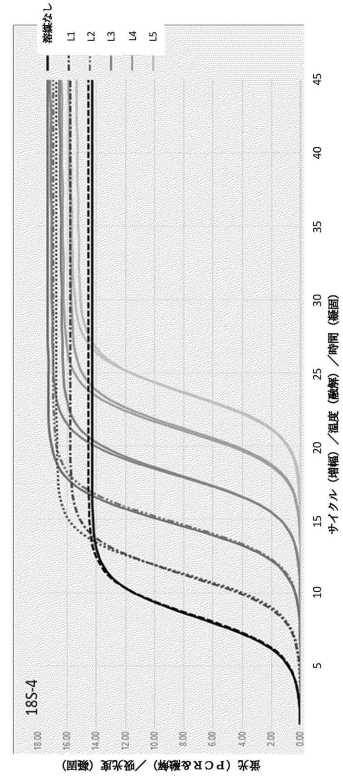
【 図 2 B 】

図 2 B



【 図 2 C 】

図 2 C

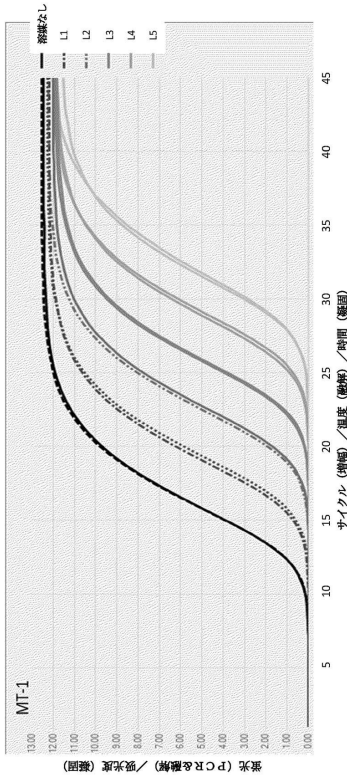


10

20

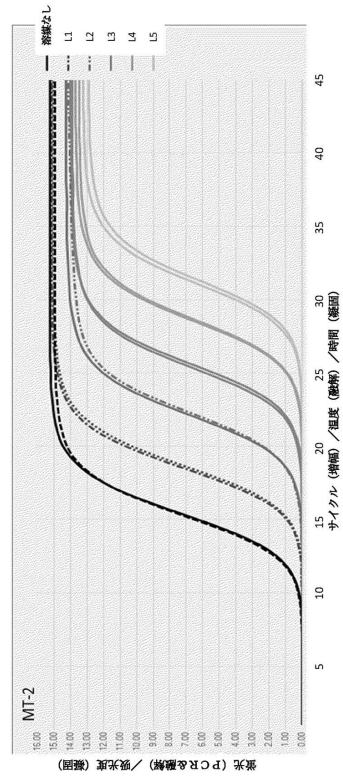
【 図 2 D 】

図 2 D



【 図 2 E 】

図 2 E



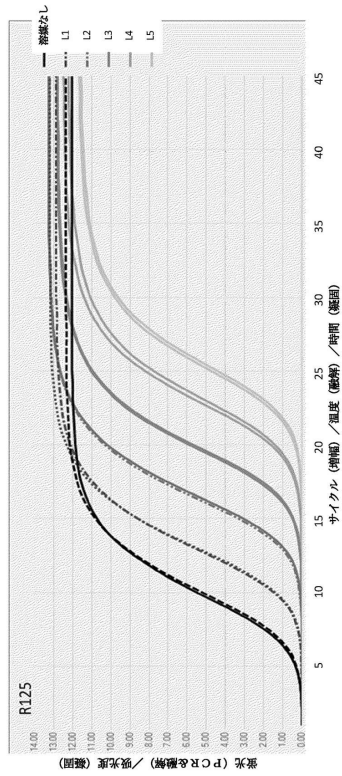
30

40

50

【 図 2 F 】

図 2 F



【 図 3 】

図 3

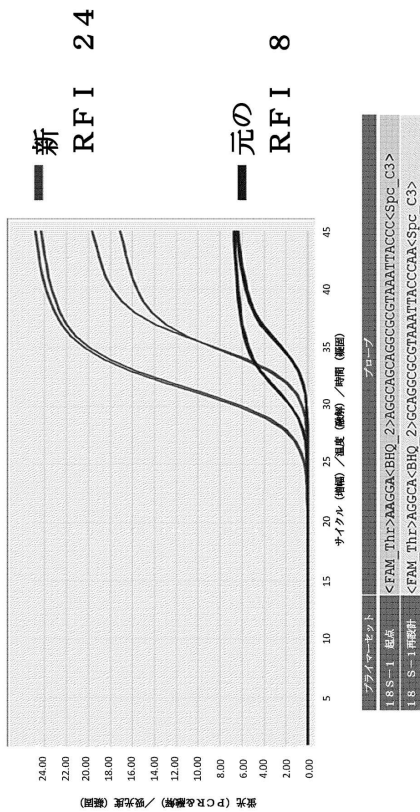
標的	CT	RFI	ベースライン	勾配
18S-1	21.1	8.0	0.9	-3.14
18S-3	25.3	11.3	0.9	-3.10
18S-4	20.3	16.2	0.8	-3.06
R125	20.7	12.6	1.4	-3.12
MT-1	26.6	12.6	2.0	-3.22
MT-2	27.5	14.1	1.1	-3.15

10

20

【 図 4 】

図 4



【 図 5 】

図 5

標的	1 : 10 ⁵ 希釈した培養液の P & E におけるコピー/uL
18S-1	16100
18S-3	510
18S-4	16380
R125	6230
MT-1	81
MT-2	28

30

40

50

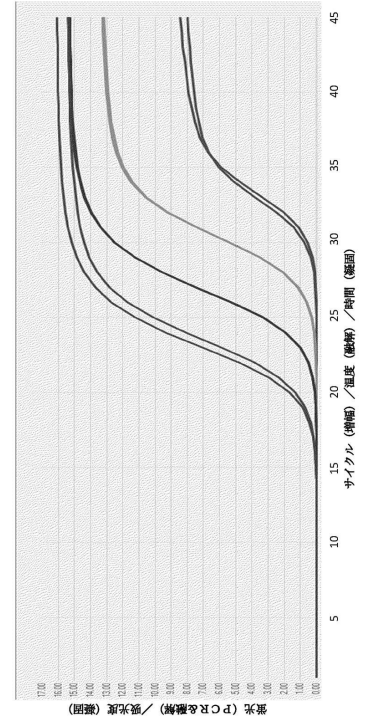
【 図 6 A 】

図 6 A

F AMチャネル	マルチプレックス		18S-1+GIC		18S-4+GIC	
	CT	RFI	CT	RFI	CT	RFI
1:10 ⁴ 希釈	19.2	16.5	19.2	22.8	19.2	9.9
1:10 ⁵ 希釈	22.7	16.2	22.8	22.2	22.6	10.0
1:10 ⁶ 希釈	26.5	14.0	26.3	20.2	25.8	9.0
1:10 ⁷ 希釈	29.6	9.0	29.7	15.5	28.6	5.9
勾配	-3.5		-3.5		-3.14	

【 図 6 B 】

図 6 B



10

20

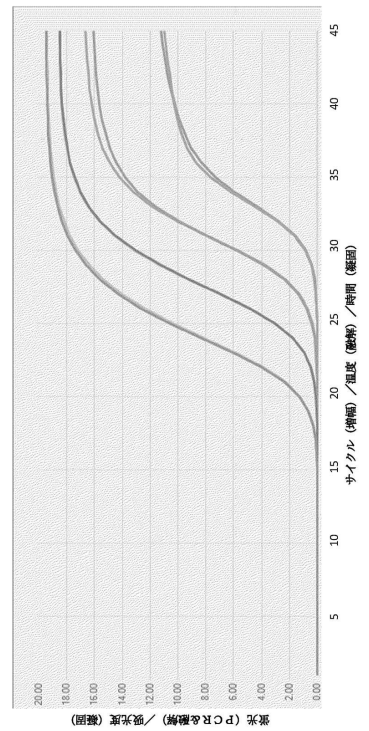
【 図 7 A 】

図 7 A

F AMチャネル	マルチプレックス		18S-1+GIC		R125+GIC	
	CT	RFI	CT	RFI	CT	RFI
1:10 ⁴ 希釈	19.4	20.1	20.0	25.8	19.1	15.2
1:10 ⁵ 希釈	22.8	19.3	23.6	25.0	22.6	14.9
1:10 ⁶ 希釈	26.4	17.2	27.2	22.4	26.0	14.3
1:10 ⁷ 希釈	29.6	11.8	30.7	17.7	29.3	13.7
勾配	-3.4		-3.6		-3.4	

【 図 7 B 】

図 7 B



30

40

50

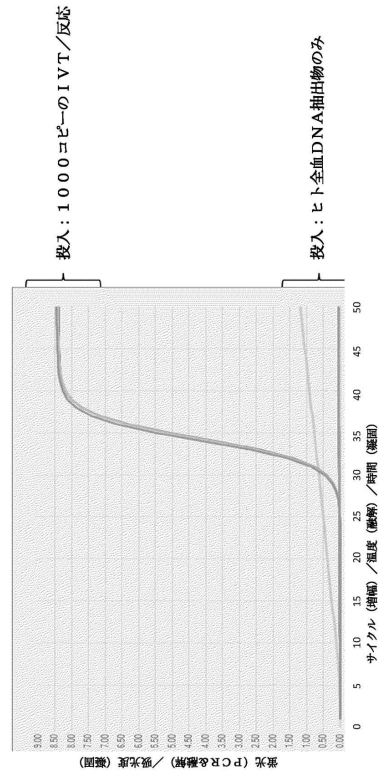
【 図 8 】

図 8

IVT コピー	18S-1				18S-1				18S-1				18S-1+GIC				R125+GIC			
	CT	RFI	ベ-スライ	RFI	CT	RFI	ベ-スライ	RFI	CT	RFI	ベ-スライ	RFI	CT	RFI	ベ-スライ	RFI	CT	RFI	ベ-スライ	
10 ²	202	139	2.2	19.2	8.4	2.1	20.2	25.1	1.0	19.5	14.1	1.3								
10 ⁴	237	11.9	2.5	22.7	8.2	2.3	23.9	24.1	1.1	23.0	13.4	1.4								
10 ⁶	272	10.8	2.5	26.1	7.5	2.5	27.4	21.3	1.2	26.3	12.8	1.5								
10 ⁸	30.3	7.7	2.3	29.2	6.6	2.4	30.6	14.5	1.1	29.7	11.3	1.4								
10	32.2	3.4	2.3	32.4	4.2	2.5	32.6	5.5	1.2	32.3	9.2	1.4								
勾配	-3.4			-3.3			-3.5			-3.4										

【 図 9 】

図 9



10

20

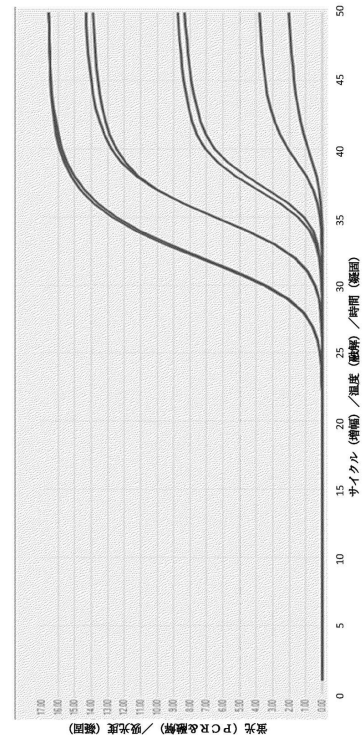
【 図 10 A 】

図 10 A

投入	マルチプレックス 18S+R125	
	CT	RFI
1 : 10 ⁴ 希釈	27.44	17.01
1 : 10 ⁵ 希釈	30.80	14.58
1 : 10 ⁶ 希釈	33.56	9.21
1 : 10 ⁷ 希釈	35.68	3.73

【 図 10 B 】

図 10 B



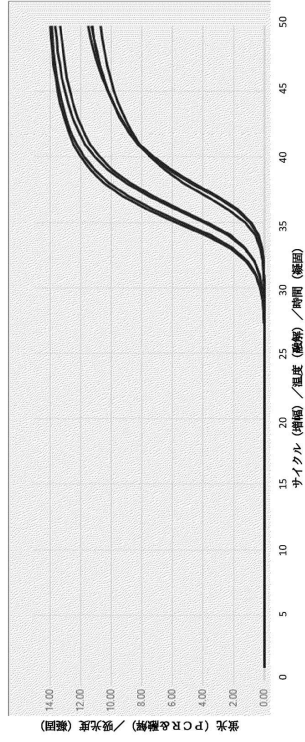
30

40

50

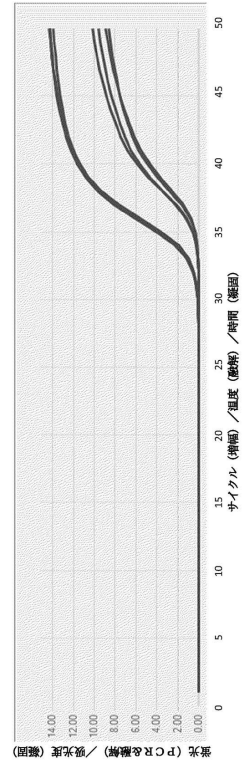
【 図 1 1 】

図 1 1



【 図 1 2 】

図 1 2

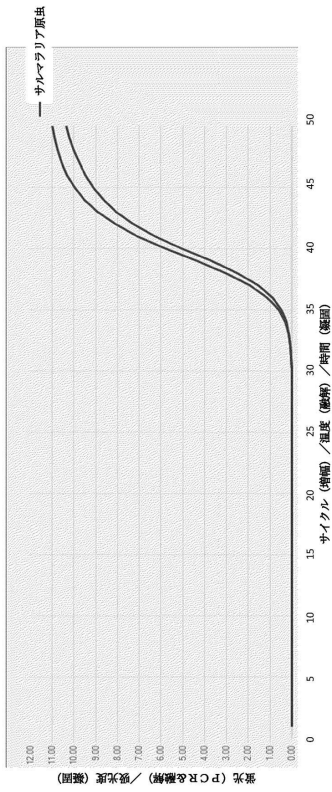


10

20

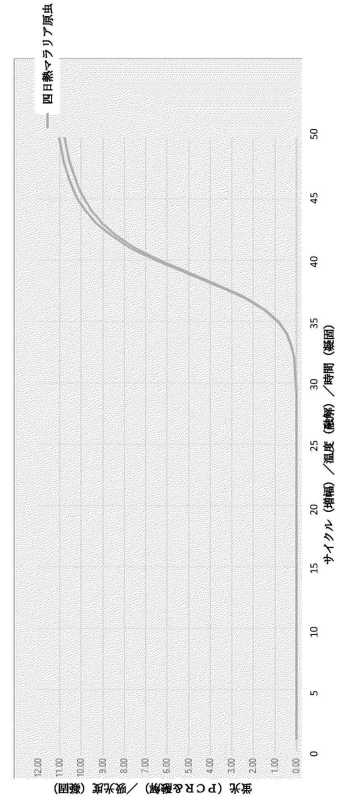
【 図 1 3 】

図 1 3



【 図 1 4 】

図 1 4



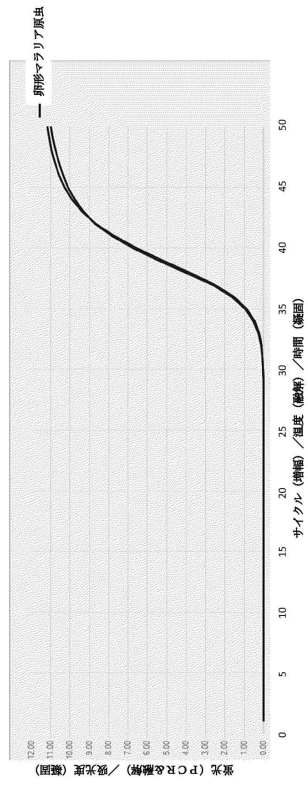
30

40

50

【 図 1 5 】

図 1 5



10

20

30

40

50

【 配列表 】

202355254600001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2021/084099

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/6893 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
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) EPO-Internal, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/146938 A1 (UNIV EHIME [JP]; OTSUKA PHARMA CO LTD [JP] ET AL.) 4 December 2008 (2008-12-04) abstract; claims 1,17,18; example 4 -----	1-39
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 March 2022		Date of mailing of the international search report 18/03/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Celler, Jakub

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

International application No.

PCT/EP2021/084099

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/084099

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008146938 A1	04-12-2008	CN 101688242 A	31-03-2010
		EP 2152899 A1	17-02-2010
		EP 2527475 A1	28-11-2012
		ES 2397115 T3	04-03-2013
		ES 2542407 T3	05-08-2015
		HK 1139185 A1	10-09-2010
		HK 1139186 A1	10-09-2010
		JP 5631006 B2	26-11-2014
		JP 2010527583 A	19-08-2010
		TW 200907069 A	16-02-2009
		TW 201319259 A	16-05-2013
		US 2010183679 A1	22-07-2010
		US 2013017221 A1	17-01-2013
		US 2015176083 A1	25-06-2015
		US 2015184252 A1	02-07-2015
		US 2015322534 A1	12-11-2015
		WO 2008146938 A1	04-12-2008

10

20

30

40

50

フロントページの続き

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

- (74)代理人 100138210
弁理士 池田 達則
- (74)代理人 100182730
弁理士 大島 浩明
- (72)発明者 マイケル リー
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 8 , プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0 ,
シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 ロチャック メータ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 8 , プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0 ,
シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 エレン オーディナリオ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 8 , プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0 ,
シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 ジャヤ ラジャマニ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 8 , プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0 ,
シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 ジンタオ サン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 8 , プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0 ,
シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 マリンサ ヘイル
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 8 , プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0 ,
シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 シャロン チウ
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 8 , プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0 ,
シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 チトラ マノハー
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 8 , プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0 ,
シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- (72)発明者 イボン ギチェル
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 8 8 , プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4 3 0 0 ,
シーノオー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド
- F ターム (参考) 4B063 QA01 QQ03 QQ12 QQ42 QR08 QR32 QR62 QS25 QX02